



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA

ELEMÁRCIA MARTINS DA SILVA PAIXÃO

**Efeito da suplementação com ácidos graxos n-3 nas  
subpopulações de linfócitos T, citocinas pró-inflamatórias e  
prostaglandina E<sub>2</sub> em mulheres recém-diagnosticadas com câncer  
de mama**

Brasília  
2015

**ELEMÁRCIA MARTINS DA SILVA PAIXÃO**

**Efeito da suplementação com ácidos graxos n-3 nas subpopulações de linfócitos T, citocinas pró-inflamatórias e prostaglandina E<sub>2</sub> em mulheres recém-diagnosticadas com câncer de mama**

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Nutrição Humana.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Marina K. Ito

Co-orientadora: Nathália M. Pizato

Brasília  
2015

**BANCA EXAMINADORA****Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marina Kiyomi Ito**

Universidade de Brasília - Presidente da Banca

**Prof. Dr. João Felipe Mota**

Universidade Federal de Goiás – Membro

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Imaculada Muniz B. Junqueira**

Universidade de Brasília - Membro

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kênia Mara Baiocchi de Carvalho**

Universidade de Brasília - Membro

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andrea Barretto Motoyama**

Universidade de Brasília - Membro

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliane Said Dutra**

Universidade de Brasília - Suplente

*Às mulheres que participaram deste estudo, dando-lhe forma e conteúdo: mulheres pelas quais e para as quais este trabalho existiu. Meu sincero agradecimento por permitirem que eu entrasse em suas vidas em um momento tão difícil e doloroso, pelo exemplo de coragem, paciência, resignação e sobretudo, esperança.*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

***A Deus,***

*Obrigada por ter sido meu refúgio, minha força, meu orientador, presente em todos os momentos dessa jornada.*

## AGRADECIMENTOS

À minha família pelo amor incondicional, apoio em todos os momentos. Sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui. Obrigada por ser meu alicerce nesta jornada. Perdão por estar sempre com pressa, pela falta de atenção e momentos ausentes.

À minha amiga e orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marina K. Ito pela oportunidade de fazer especialização, mestrado e doutorado sob sua orientação. Marina, muito obrigada por acreditar em mim!!! Obrigada pelas orientações, pela confiança e sobretudo pela amizade.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nathalia Pizato pela co-orientação e amizade durante toda essa trajetória.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Imaculada Muniz Barbosa Junqueira, por seus ensinamentos e sugestões valiosas para o desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigada! Seu apoio foi muito importante para meu crescimento acadêmico.

Às queridas amigas e professoras Dr.<sup>a</sup> Kênia Baiocchi e Dr.<sup>a</sup> Eliane Said pela torcida, pelo carinho e apoio emocional. Sempre com palavras de ânimo, otimismo e carinho. Sou uma grande admiradora de vocês e serei eternamente grata.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kelly Magalhães e ao professor Dr. Jurandir Rodrigues por terem aberto as portas de seus laboratórios, viabilizando a realização das análises realizadas e pelo apoio científico.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiana Karla dos Santos, pela amizade, apoio e colaboração na análise de dados das citocinas que tanto foram úteis para a finalização desse trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Cristina Gonzalez que em 2007 me incentivou a retomar essa trajetória acadêmica e ver que nunca é tarde para ir atrás de novas realizações.

As colegas de projeto: Meg, Clarissa, Juliana, Babiana, Bruna, Ivana e Ana Carolina. Aninha, minha amiga e companheira infalível. Formamos uma verdadeira

dupla dinâmica, não é mesmo? Obrigada pela amizade, pelos bons momentos e apoio em todas as dificuldades que passamos juntas durante a coleta e análise dos dados. Sem você tudo teria sido muito mais difícil ou talvez impossível. Mas... como a música que fazia a gente rir... “Para nossa alegria” chegamos ao final. Valeu amiga!!!

A todos os técnicos e alunos dos laboratórios por onde passei, que não só aturaram todas as minhas perguntas e usos de equipamentos, mas sempre se dispuseram a ajudar. Deixo aqui meu agradecimento especial ao Sr. Nelson Pelet Nascimento (*in memoriam*), a Shirley Claudino, a Mariangela Souza, ao Luís Eduardo e a Thaís Amanda. Mariangela, seu apoio foi fundamental. Obrigada amiga! Luís e Thaís, vocês chegaram na hora certa! Não tenho palavras para expressar minha gratidão.

As equipes de Mastologia do Hospital Universitário de Brasília e do Hospital de Base do Distrito Federal, por nos receberem em seus ambulatórios e apoiarem a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Nakano pela análise estatística dos dados obtidos no presente trabalho.

À banca de qualificação e defesa por aceitarem compartilhar seus conhecimentos e enriquecer este estudo com suas considerações.

Ao PPGNH e à CAPES pelo incentivo à produção científica e qualificação profissional.

À FAP-DF pelo incentivo à pesquisa e auxílio financeiro (edital número 04/2009, projeto 193.000.557/2009) que viabilizou o desenvolvimento dessa tese.

À Relthy Laboratórios Ltda, que gentilmente realizou a encapsulação dos óleos usados na intervenção deste estudo.

A todos aqueles que oraram, torceram e participaram dessa minha conquista, muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>21</b>
2.1 Estado atual do câncer de mama.....	22
2.1.1 Epidemiologia do câncer de mama .....	22
2.1.2 Etiologia do câncer de mama .....	22
2.1.3 Fatores de risco do câncer de mama .....	23
2.1.4 Diagnóstico do câncer de mama.....	24
2.1.5 Classificação e estadiamento clínico.....	25
2.1.5.1 Classificação histológica e molecular.....	25
2.1.5.2 Estadiamento Clínico .....	27
2.1.6 Abordagem terapêutica do câncer de mama.....	28
2.2 Sistema imunológico e o câncer de mama.....	28
2.2.1 Imunoedição do câncer.....	28
2.2.2 Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , T CD8 <sup>+</sup> e razão CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> no câncer de mama	31
2.2.3 Inflamação e câncer de mama.....	33
2.2.3.1 Prostaglandina E2 .....	33
2.2.3.2 Citocinas pró-inflamatórias .....	37
2.2.3.2.1 Interleucina-6.....	37
2.2.3.2.2 Interleucina-1 $\beta$ .....	41
2.2.3.2.3 Fator de necrose tumoral.....	41
2.2.3.3 Resposta de fase aguda.....	42
2.2.3.3.1 Proteína C-reativa.....	42
2.3 Ácidos graxos e câncer de mama .....	43
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>53</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>55</b>
4.1 objetivos gerais .....	56

4.2 objetivos específicos .....	56
<b>5 MÉTODOS</b> .....	57
5.1 Tipo de estudo .....	58
5.2 Aspectos éticos .....	58
5.3 Critérios de inclusão e exclusão .....	58
5.4 Randomização.....	59
5.5 Intervenção nutricional .....	59
5.6 instrumentos e variáveis coletadas .....	60
5.6.1 Variáveis antropométricas. ....	61
5.6.1 Peso e altura .....	61
5.6.2 Índice de massa corporal (IMC) .....	61
5.6.3 Análise de impedância bioelétrica .....	61
5.6.2 Consumo alimentar.....	62
5.6.3 Variáveis bioquímicas .....	62
5.6.4 Fenotipagem de linfócitos .....	63
5.6.5 Dosagem de citocinas .....	64
5.6.6 Dosagem de prostaglandina E <sub>2</sub> e metabólitos .....	65
5.6.7 Análise dos ácidos graxos .....	68
5.7 Análise estatística .....	69
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	70
6.1 Artigo .....	71
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	100
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	102
<b>9. ANEXOS</b> .....	118
Anexo 1: <i>Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS®)</i> , sistema TNM, Classificação clínica câncer de mama.....	119
Anexo 2 Aprovação CEP Faculdade Ciências da SES – DF .....	123
Anexo 3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	126
Anexo 4 Avaliação socioeconômica e cultural.....	129
Anexo 5 Recordatório 24 horas .....	134

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

#### Figura 1

Classificação histológica dos subtipos de carcinoma mamário, categorizando a heterogeneidade baseada nas características arquiteturais e padrões de crescimento. .... 25

#### Figura 2

Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama. .... 26

#### Figura 3

Os três Es da imunoedição do câncer. .... 30

#### Figura 4

Regulação da resposta imune pela PGE<sub>2</sub>. .... 36

#### Figura 5

Biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados nas células eucarióticas..... 45

#### Figura 6

Conversão enzimática dos ácidos graxos n-3 e n-6 em eicosanoides envolvidos na inflamação e carcinogênese. .... 48

#### Figura 7

Frasco de armazenamento das cápsulas de óleo de peixe e óleo mineral (placebo) de mesmo aspecto, cor e tamanho. .... 60

#### Figura 8

Metabolismo da Prostaglandina E<sub>2</sub> ..... 66

#### Figura 9

Reação catalisada pela acetilcolinesterase ..... 67

### RESULTADOS E DISCUSSÃO: ARTIGO

#### Figura 1

Fluxograma da seleção e randomização das pacientes. .... 80

#### Figura 2

Varição após tratamento ( $\Delta\%$ ) da proteína C-reativa de acordo com os grupos de estudo ..... 86

#### Figura 3

Varição após tratamento ( $\Delta\%$ ) das citocinas pró-inflamatórias de acordo com os grupos de estudo ..... 87

#### Figura 4

Varição após tratamento ( $\Delta\%$ ) das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e razão CD4<sup>+</sup>/ CD8<sup>+</sup> de acordo com os grupos de estudo..... 88

#### Figura 5

Varição após tratamento ( $\Delta\%$ ) da prostaglandina E<sub>2</sub> de acordo com os grupos de estudo. .... 89

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DA LITERATURA

#### **Tabela 1**

Estudos que analisaram IL-6 sérica em pacientes com câncer de mama.  
..... 39

#### **Tabela 2**

Estudos experimentais que avaliaram os efeitos dos ácidos graxos EPA e DHA no desenvolvimento do câncer de mama..... 51

### RESULTADOS E DISCUSSÃO: ARTIGO

#### **Tabela 1**

Caracterização sócio-demográfica e clinicopatológica das pacientes randomizadas de acordo com o grupo de estudo ..... 81

#### **Tabela 2**

Indicadores nutricionais e consumo dietético no início e ao final da suplementação de acordo com os grupos de estudo ..... 83

#### **Tabela 3**

Perfil dos ácidos graxos no sangue e parâmetros bioquímicos no início e ao final da suplementação de acordo com os grupos estudados ..... 84

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido araquidônico
AG	Ácido graxo
AGI	Ácido graxo insaturado
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AGS	Ácido graxo saturado
ALA	Ácido $\alpha$ -Linolênico
AIB	Análise de impedância bioelétrica
AF	Ângulo de fase
AFP	Ângulo de fase padronizado
BI-RADS	<i>Breast Imaging Reporting and Data System</i>
CCD	Cromatografia de camada delgada
CDIS	Carcinoma ductal in situ
CDI	Carcinoma ductal infiltrante
CLI	Carcinoma lobular invasivo
COX	Ciclooxigenase
DGLA	Ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico
DHA	Ácido docosahexaenóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPA	Ácido docosapentaenóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
DMSO	Dimetil sulfóxido
ELISA	Teste Imunoabsorvente Ligado à Enzima
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FASN	Ácido graxo sintase
GF	Fator de crescimento
GFR	Receptor de fator de crescimento
GO	Grupo óleo de peixe
GP	Grupo placebo
GPCRS	Receptores acoplados a proteína G

EGF	Fator de crescimento epidérmico
HER-2	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2
HBDF	Hospital de Base de Brasília DF
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IIQ	Intervalos interquartis
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IMC	Índice de Massa Corporal
IL-6	Interleucina-6
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
LA	Ácido linoleico
LT	Leucotrienos
LOX	Lipoxigenase
Ki-67	Antígeno KI-67 KS
NF $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução fosfato-salina
PCR	Proteína C-reativa
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PI3K/AKT	Proteína quinase B
PPAR	Receptores nucleares ativados por proliferador de peroxissomos
OMS	Organização mundial de saúde
R	Resistência
RP	Receptor de progesterona
RE	Receptor de estrogênio
R24h	Recordatório de 24 horas
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
SA	Ácido estearidônico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
TNM	Tumor, nódulos e metástases
TX	Troboxano

VCAM-1 Molécula de adesão celular-vascular-1  
Xc Reactância

## RESUMO

**Introdução:** Há evidências de que pacientes com câncer de mama apresentam alteração da função imune, o que pode favorecer a progressão do câncer. A inflamação crônica está envolvida em todos os estágios de carcinogênese. Estudos tem demonstrado que ácidos graxos poliinsaturados n-3 eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) apresentam propriedades imunomoduladoras e antiinflamatórias, sendo utilizados na prevenção e tratamento de diferentes patologias, incluindo o câncer. Neste contexto, este estudo teve como objetivo investigar o efeito da suplementação com óleo de peixe, em pacientes recém diagnosticadas com câncer de mama, nas subpopulações de linfócitos, citocinas pró-inflamatórias, proteína C-reativa e Prostaglandina E<sub>2</sub>. **Metodologia:** Estudo de intervenção, randomizado, placebo controlado, duplo-cego, conduzido em pacientes com diagnóstico de câncer de mama, distribuídas em dois grupos (grupo óleo de peixe – GO e grupo placebo – GP). As pacientes do GO receberam diariamente 2 g de concentrado de óleo de peixe contendo 1,8 g de ácidos graxos n-3. O grupo placebo recebeu 2 cápsulas de 1 g 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 antropometria, composição corporal, consumo dietético e amostras sanguíneas para fenotipagem de linfócitos, exames laboratoriais (glicemia de jejum, albumina sérica, perfil lipídico), análise do perfil de ácidos graxos séricos e marcadores inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , proteína C-reativa e prostaglandina E<sub>2</sub>). A análise estatística foi realizada utilizando testes paramétricos e não paramétricos para comparar os resultados dos dois grupos. **Resultados:** O GO foi constituído de 18 pacientes e o GP 19. No início do estudo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto aos parâmetros socioeconômicos, antropométricos e clinicopatológicos. A maioria das pacientes apresentou carcinoma ductal infiltrante e 55,6% e 57,9% do GO e GP, respectivamente, apresentaram tumor HER2 negativo. Após a intervenção, no grupo óleo de peixe houve aumento significativo da quantidade de EPA (p=0,004), DHA (p=0,007) e total de ácidos graxos n3 (p=0,004) no fosfolípido plasmático. Observou-se redução da razão n6/n3 (p=0,002). No GO observou-se manutenção tanto da percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico como dos níveis séricos da proteína C-reativa, enquanto no GP houve redução da percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico e aumento da proteína C-reativa. Não houve mudanças significativas nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias e da prostaglandina E<sub>2</sub>. **Conclusão:** A suplementação de 1,8g de ácidos graxos n-3 em pacientes recém diagnosticadas com câncer de mama, durante 4 semanas promoveu mudança significativa na composição dos ácidos graxos plasmáticos, manteve a percentagem das células T CD4<sup>+</sup> e os níveis séricos de PCR, sugestivo da sua ação benéfica no sistema imunológico.

**Palavras-chave:** câncer de mama, ácidos graxos n-3, óleo de peixe, imunonutrição, citocinas, ácido eicosapentaenóico (EPA).

## ABSTRACT

**Introduction:** There is evidence that breast cancer patients have impaired immune function, which can promote cancer progression. Chronic inflammation is involved in all stages of carcinogenesis. Studies have shown that n-3 polyunsaturated fatty acids eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids have immunomodulatory and anti-inflammatory properties and are useful in the prevention and treatment of various diseases, including cancer. In this context, this study aimed to investigate in patients with newly diagnosed breast cancer the effects of fish oil supplementation in lymphocytes subpopulation, proinflammatory cytokines, C-reactive protein (CRP) and prostaglandin E<sub>2</sub>. **Methodology:** A randomized, placebo controlled, double-blind clinical trial was conducted in patients diagnosed with breast cancer, divided into two groups (fish oil group - GO and placebo group - GP). The GO patients received 2 g/day of fish oil concentrate containing 1.8 g of n-3 fatty acids. The placebo group received two capsules/day of 1 g of mineral oil with similar appearance to fish oil. All patients were supplemented for four weeks during the period prior to surgical treatment. Before and at the end of supplementation, we collected anthropometric, body composition and dietary intake data and blood samples for lymphocyte phenotyping, laboratory tests (fasting glucose, serum albumin, lipid profile), serum fatty acids analysis and inflammatory markers (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CRP and prostaglandin E<sub>2</sub>). Statistical analysis was performed using parametric and non-parametric tests to compare the results of both groups. **Results:** GO consisted of 18 patients and the GP 19. At baseline no significant differences were observed between the groups in terms of socioeconomic, anthropometric and clinicopathological parameters. Most of the patients had infiltrating ductal carcinoma and 55.6% and 57.9% of GO and GP, respectively, had negative HER2 tumor. After the intervention there was a significant increase in the amount of EPA ( $p = 0.004$ ), DHA ( $p = 0.007$ ) and the total of n3 fatty acids ( $p = 0.004$ ) in plasma phospholipid of the GO patients. There was a reduction in the n6/n3 ratio ( $p = 0.002$ ). In GP patients there was a reduction in the percentage of peripheral blood CD4+ T lymphocytes counts and increased plasma C-reactive protein concentration. In GO patients The proportion of peripheral blood CD4 + T lymphocytes and serum of CRP levels were maintained. There were no significant changes in serum levels of proinflammatory cytokines and prostaglandin E<sub>2</sub>. **Conclusion:** Supplementation of treatment naïve breast cancer patients with 1.8 g/day of n-3 fatty acids for 4 weeks caused a significant change in the composition of plasma fatty acids, kept the frequency of CD4+ T cells and serum CRP, suggestive of a beneficial effect of the supplement on patient's immune system.

**Keywords:** breast cancer, n-3 fatty acids, fish oil, immunonutrition, cytokines, eicosapentaenoic acid (EPA).

# ***INTRODUÇÃO***

---

## 1 INTRODUÇÃO

---

O câncer de mama é uma doença que tem acompanhado a humanidade desde tempos antigos. O arquivo médico mais remoto que contém informações sobre essa doença provém do Egito Antigo: o papiro de Edwin Smith (GOMES *et al.*, 2002; EKMEKTZOGLOU *et al.*, 2009). Descoberto em 1862, em Tebas, o papiro de Edwin Smith é datado de 1600 a.C., porém acredita-se que este é uma cópia de um papiro muito mais velho, talvez de 3000 a.C. (VARGAS *et al.*, 2012). Dentre as descrições relatadas neste papiro encontra-se a seguinte: “*Uma mama com tumor protuberante e fria ao toque representa uma doença para a qual não existe cura*”. Este registro provavelmente representa a primeira descrição de um caso de câncer de mama (GOMES *et al.*, 2002).

Hipócrates (460 – 377 a.C.) foi o primeiro a fazer diferença entre tumores malignos e benignos (EKMEKTZOGLOU *et al.*, 2009). Ele considerou o câncer de mama como uma doença incurável e não recomendou qualquer tipo de tratamento. Relacionou seu aparecimento com a cessação da menstruação, dizendo que não devia tratar porque aceleraria a morte da mulher (GOMES *et al.*, 2002; EKMEKTZOGLOU *et al.*, 2009).

Aulus Cornelius Celsus (25 a 30 a.C – 45 a 50 d.C) relatou o aumento dos linfonodos axilares que acompanha casos de câncer de mama. Celsus aconselhou a remoção cirúrgica somente de tumores que ocupam menos de metade da mama (hoje definidos como tumores em estágio inicial). Ele descreveu doenças recorrentes, inchaços nas axilas e sua propagação por todo o corpo (hoje são características reconhecíveis de câncer de mama metastático) e foi o primeiro a classificar o câncer de mama (EKMEKTZOGLOU *et al.*, 2009).

Leonides de Alexandria, no segundo século da era cristã, registrou o envolvimento axilar dos tumores e efetuou a primeira extirpação cirúrgica da mama a partir de uma incisão na pele em uma região sã da mesma, seguida de cauterização para evitar hemorragia; o processo era repetido até a retirada completa do órgão (MORA *et al.*, 2013). Os métodos cirúrgicos utilizados eram bárbaros comparados aos atuais. Segundo GOMES *et al.* (2002), no renascimento, Lorenj Heister defendia o uso de uma guilhotina para tornar a mastectomia um procedimento mais rápido e menos doloroso. A primeira abordagem médico-paciente foi feita por Lorenj Heister,

que dizia: “*muitas mulheres podem tolerar a operação com a maior coragem e sem gemer absolutamente. Outras, entretanto, fazem um escândalo tal que pode desencorajar o mais destemido dos cirurgiões e dificultar a operação. Para realizá-la, o cirurgião, portanto deve ser persistente e não permitir-se desconcentrar-se com o choro da paciente*”.

A mortalidade operatória era muito alta, quer no próprio ato cirúrgico como no pós-operatório imediato. A dor e a hemorragia durante o ato cirúrgico atuavam sinergicamente para desencadear o choque operatório e no pós-operatório imediato muitas das pacientes que sobreviviam à agressão cirúrgica morriam devido à infecção. Somando-se a mortalidade própria da doença estava, assim, criado um quadro desolador, que desencorajava os mais animados quanto à cirurgia e abria a porta aos tratamentos locais mais esotéricos: pomadas variadas, extratos vegetais, animais vivos abertos ao meio, urina e até mesmo fezes (MORA *et al.*, 2013).

Em 1846, com a descoberta da antissepsia por Joseph Lister e da anestesia por Horace Wells, foram amenizadas a dor e a infecção. Neste mesmo período, Rudolf Virchow, pela primeira vez, observou microscopicamente um tumor, trazendo o aperfeiçoamento de técnicas cirúrgicas baseadas em conhecimentos anatômicos mais precisos (GOMES *et al.*, 2002; EKMEKTZOGLOU *et al.*, 2009).

Em 1852, Willian Stewart Halsted e Willy Meyer, descreveram a técnica de mastectomia radical, que permaneceu como padrão de tratamento de câncer de mama por mais de 70 anos (EKMEKTZOGLOU, *et al.*, 2009). Baseada no princípio científico de que a mutilação era considerada a cura para o câncer, a Escola de Halsted legou à humanidade uma terrível visão do tratamento do câncer de mama.

Em 1895, Emile Grube, estudante de medicina, irradiou a primeira paciente com câncer de mama, mas somente no início do século XX que a radioterapia foi introduzida pós mastectomia radical. Neste mesmo período ocorreram várias modificações nas técnicas cirúrgicas propostas até então e chegou-se a conclusão que cirurgias conservadoras alcançam os mesmos objetivos que as cirurgias radicais. Em 1990, o *National Cancer Institute* (NCI) sancionou a cirurgia conservadora da mama como o tratamento preferencial da fase I e II de cânceres de mama (EKMEKTZOGLOU *et al.*, 2009; MORA, *et al.*, 2013).

No final da década de 60 observou-se que a aplicação de quimioterapia após a cirurgia aumentava as taxas de cura (CARTER, 1972; MORA *et al.*, 2013). Desde então a quimioterapia passou por grandes modificações, novos medicamentos

surgiram trazendo melhores perspectivas de tratamento. Atualmente, o tratamento para câncer de mama consiste da combinação de várias linhas de tratamento: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia. Dentre essas, a imunoterapia tem sido considerada como uma estratégia terapêutica interessante e promissora. Além dos tratamentos convencionais citados, tratamentos adjuvantes alternativos como o uso de compostos bioativos presentes em alimentos, também tem sido investigados. É dentro desse contexto que a suplementação com os ácidos graxos polinsaturados n-3 eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) , é abordada neste estudo.

## ***REVISÃO DE LITERATURA***

---

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1 Estado atual do câncer de mama

#### 2.1.1 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer de mama é apontado como a neoplasia mais comum entre as mulheres em todo o mundo, atingindo 25% de todos os cânceres femininos (INCA, 2014). Estima-se que a incidência mundial de câncer de mama feminino irá atingir cerca de 3,2 milhões de novos casos por ano até 2050 (HORTOBAGYI *et al.*, 2005). Esses números refletem a magnitude da incidência de câncer de mama, o seu efeito sobre a sociedade mundial e a necessidade urgente medidas preventivas e de tratamento.

No Brasil, para o ano de 2015 foram estimados 57 mil casos novos de câncer de mama feminina, que será o segundo tipo mais incidente no país, sendo o mais incidente nas regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste (INCA, 2014). No Distrito federal, para este mesmo ano, estimou-se uma taxa bruta de incidência de 62,8 por 100 mil habitantes e de 920 novos casos de câncer de mama em mulheres (INCA, 2014).

A taxa de mortalidade por câncer de mama, ajustada pela população mundial, apresenta uma curva ascendente e, na população feminina brasileira representa a primeira causa de morte por câncer, com 11,28 óbitos por 100 mil mulheres em 2009. As regiões Sul, Sudeste são as que apresentam as maiores taxas, com 12,7 e 12,62 óbitos por 100 mil mulheres em 2009, respectivamente (BRASIL, 2013).

#### 2.1.2 Etiologia do câncer de mama

Segundo Barros (2009), o carcinoma mamário é uma doença multifatorial, genética e epigenética que se inicia em uma única célula na unidade ducto-lobular. A célula inicialmente modificada multiplica-se, formando um clone celular que se expande com instabilidade genômica e suscetibilidade a novas mutações no DNA e alterações nos mecanismos de reparo dessas modificações. Seu potencial de gerar metástase é geneticamente determinado, e sua evolução depende das interações de

diversos fatores no microambiente tumoral. Além disso, há uma interação entre fatores endócrinos, nutricionais e ambientais.

Cinco a 10% de todos os casos de câncer de mama são considerados hereditários ou familiares (AMENDOLA E VIEIRA, 2005; BARROS, 2009).

A iniciação genética depende de duas forças antagônicas que atuam de forma independente ou combinada: inativação de genes supressores e ativação de oncogenes. O câncer de mama hereditário é sempre causado primariamente por inativação de genes supressores.

Os proto-oncogenes, entre eles o fator de crescimento epidérmico 2 (HER-2), são genes normais, envolvidos na codificação de proteínas reguladoras da multiplicação celular normal e podem transformar-se em oncogenes por vários processos genéticos e epigenéticos. Os oncogenes ativados promovem uma síntese proteica estimuladora do crescimento e proliferação anormal de células (BARROS, 2009).

Na carcinogênese mamária, os genes supressores de tumor (*BRCA1* e *BRCA2*) desempenham importantes funções em diferentes processos celulares, incluindo a ativação e a regulação transcricional, o reparo de lesões no DNA, além de controle do ciclo celular, da proliferação e diferenciação celular. A maneira pela qual a inativação dos genes BRCA conduz ao desenvolvimento de tumor ainda não está completamente esclarecida. As prevalências estimadas para portadores de mutações em *BRCA1/2* são, respectivamente, 0,11% e 0,12% na população geral e entre 12,8%-16% em famílias de alto risco (AMENDOLA E VIEIRA, 2005).

### 2.1.3 Fatores de risco associados ao câncer de mama

De acordo com o *World Cancer Research Fund* (2007), o principal fator de risco para as neoplasias mamárias é a predisposição genética. A idade também é outro importante fator de risco, sendo a incidência maior com o aumento da idade; juntamente com a menarca precoce; a menopausa tardia (instalada após os 50 anos de idade); primeira gestação após os 30 anos de idade; nuliparidade; e fatores ambientais como o uso de tabaco, consumo de bebidas alcoólicas, gorduras e açúcares em excesso, sedentarismo, estresse e obesidade (MENKE, 2007a).

Segundo a OMS (2011), o risco de câncer de mama pode ser reduzido se a mulher com idade acima de 18 anos for ativa fisicamente (150 minutos semanais de

atividade física moderada), tiver bom controle de seu peso corporal e tiver um hábito alimentar que inclua uma boa oferta de frutas e vegetais. O ato de amamentar auxilia de forma positiva para diminuição no risco. Outros fatores controláveis como o consumo moderado de álcool e o hábito de não fumar também contribuem para uma menor incidência da doença.

Com relação aos fatores dietéticos, a influência dos lipídios da dieta no risco de câncer de mama tem sido questão de interesse. Segundo revisão de Vera-Ramirez *et al.* (2012), estudos com animais tem demonstrado que ácidos graxos poliinsaturados n-6, com exceção do  $\gamma$ -linoleico (18:3n-6) e o ácido linoleico conjugado, exercem efeitos pro-carcinogênicos. Ao contrário destes, estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado que os ácidos graxos poliinsaturados n-3 exercem efeitos inibitórios no crescimento e metástases de tumor mamário. Ainda de acordo com estes autores, os ácidos graxos saturados promovem carcinogênese experimental, mas de uma forma mais fraca comparada com os ácidos graxos n-6 e similar aos ácidos graxos trans. Estudos com ácidos graxos monoinsaturados, principalmente ácido oleico (18:1n-9), tem demonstrado resultados conflitantes.

#### 2.1.4 Diagnóstico do câncer de mama

Segundo o documento de consenso “Controle do Câncer de Mama” do Ministério da Saúde (INCA, 2004 a), o exame clínico da mama (ECM) é parte fundamental da propedêutica para o diagnóstico de câncer. Devendo ser realizado como parte do exame físico e ginecológico, e constitui a base para a solicitação de exames complementares. A ultrassonografia (USG) é o método de escolha para avaliação por imagem das lesões palpáveis, em mulheres com menos de 35 anos. Naquelas com idade igual ou superior a 35 anos a mamografia é o método de eleição. Em algumas situações esta deve ser complementada com a ultrassonografia.

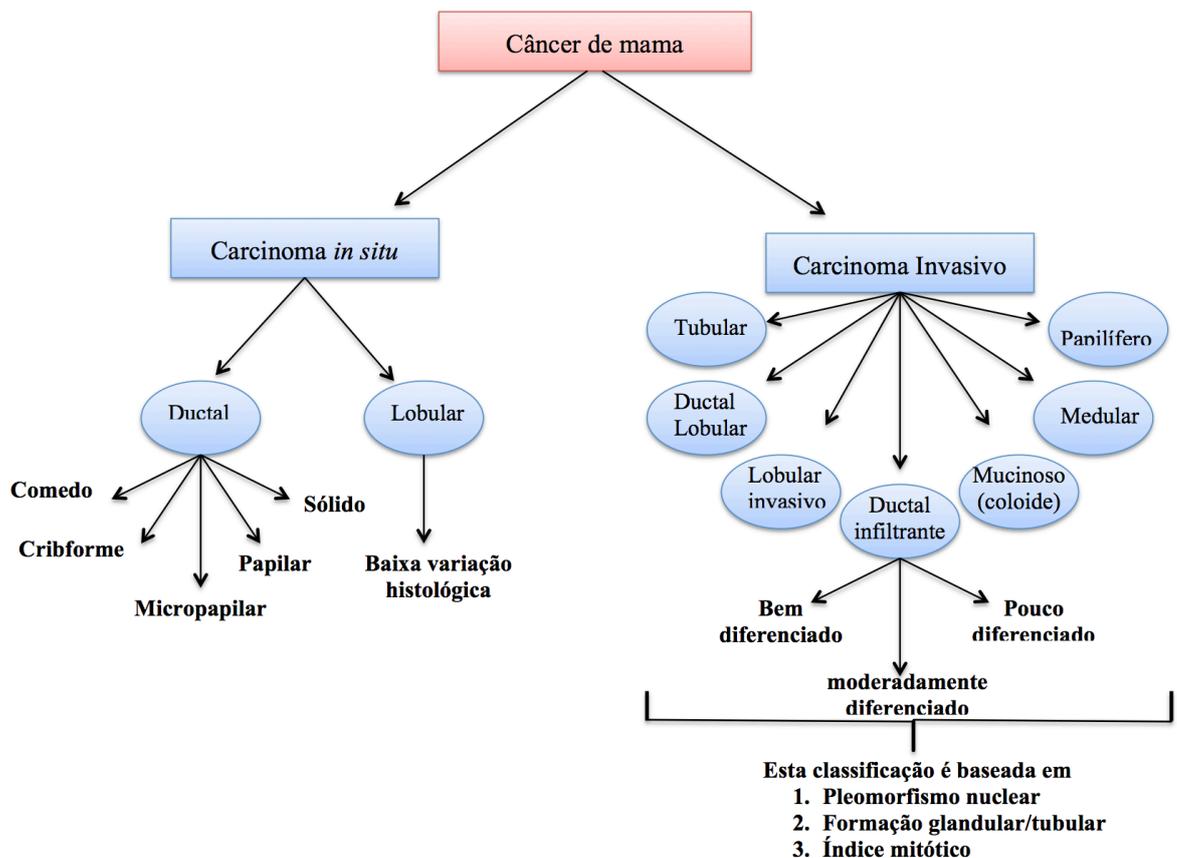
Ainda de acordo com o consenso, se houver lesões suspeitas deve-se buscar a confirmação do diagnóstico que pode ser citológico, por meio de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), ou histológico, quando o material for obtido por punção, utilizando-se agulha grossa (PAG ou *core biopsy*). A conduta nas lesões não palpáveis segue a proposta do *Breast Imaging Reporting and Data System* (BI-

RADS®), publicado pelo Colégio Americano de Radiologia (ACR) e recomendada pelo colégio Brasileiro de Radiologia (ICBR), em reunião de Consenso em 1998. Esse sistema utiliza categorias de 0 a 6 para descrever os achados do exame e prevê recomendações de conduta (Anexo 1).

### 2.1.5 Classificação e estadiamento clínico

#### 2.1.5.1 Classificação Histológica e molecular

De acordo com Malhotra *et al.* (2014), histologicamente o carcinoma mamário pode ser dividido em carcinoma *in situ* e carcinoma infiltrante ou invasivo. O carcinoma *in situ* dependendo dos padrões de crescimento e características citológicas do tumor pode ser subclassificado em ductal e lobular (Figura 1).



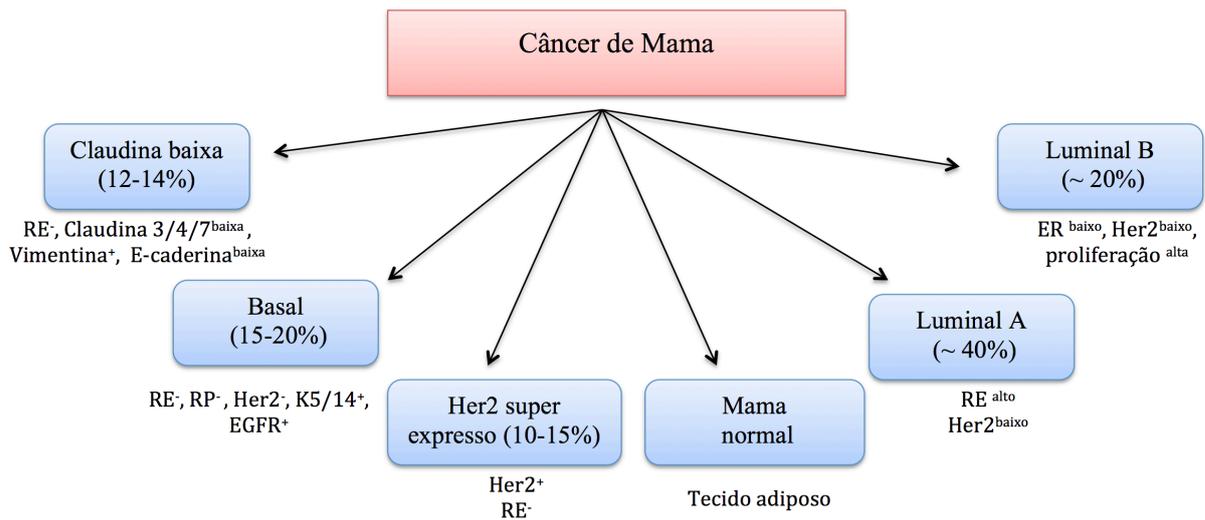
**Figura 1.** Classificação histológica dos subtipos de carcinoma mamário, categorizando a heterogeneidade baseada nas características arquiteturais e padrões de crescimento.

**Fonte:** Adaptado de Malhotra *et al* (2014)

O carcinoma ductal *in situ* é considerado mais comum que o carcinoma lobular *in situ* e, baseando-se na arquitetura do tumor, este pode ainda ser subclassificado nos seguintes subtipos: Comedocarcinoma, cribiforme, micropapilar, papilar e sólido.

De maneira semelhante aos carcinomas *in situ*, os carcinomas invasivos também são classificados em subtipos histológicos. Os principais tipos de carcinomas invasivos são: ductal infiltrante, lobular invasivo, ductal/lobular, mucinoso (coloide), tubular, medular e papilífero (Figura 1). Destes, o carcinoma ductal infiltrante é o tipo predominante, correspondendo a aproximadamente 70% de todas as lesões invasivas (MALHOTRA *et al.*, 2014). Na prática clínica, com base nos níveis de pleomorfismo nuclear, formação glandular e tubular e índice mitótico, o carcinoma ductal infiltrante é classificado em: bem diferenciado (grau 1), moderadamente diferenciado (grau 2) e pouco diferenciado (grau 3).

Do ponto de vista molecular as neoplasias mamárias podem ser classificadas em seis subtipos conforme demonstrado na figura 2.



**Figura 2.** Classificação dos subtipos moleculares do Câncer de mama. RE, receptor de estrogênio; RP, receptor de progesterona; Her2, receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; EGFR, receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico.

**Fonte:** Adaptado de Malhotra *et al* (2014)

O subtipo luminal A, que representa cerca de 40 a 60% dos casos de carcinomas de mama, apresenta, com relação aos demais, o melhor prognóstico. Na sua maioria, são tumores de baixo grau histológico e apresentam resposta inferior à quimioterapia, enquanto, tumores luminais B apresentam maior proliferação e são,

muitas vezes, de alto grau histológico e associados a um maior risco de recorrência, e menor sobrevida (ABREU *et al.*, 2002; MALHOTRA *et al.*, 2014).

O subtipo superexpressão do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) possui o segundo pior prognóstico em relação aos demais grupos. Sem a terapia adjuvante sistêmica, tem menor sobrevida livre de doença e elevada taxa de recorrência, porém se beneficia de terapias alvo específicas (ABREU *et al.*, 2002)

O subtipo basaloide demonstra prognóstico mais reservado, associado à menor sobrevida livre de doença e à menor sobrevida global. O subtipo Claudina baixa, recentemente identificado, demonstra um padrão imunofenotípico triplo-negativo não basaloide e ainda é assunto de muita discussão (ABREU *et al.*, 2002; MALHOTRA *et al.*, 2014).

#### 2.1.5.2 *Estadiamento Clínico*

Para orientar as ações de saúde no câncer de mama, uniformizando as condutas, foram criados critérios de estadiamento. O sistema TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis* – TNM) proposto pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) é o padrão aceito mundialmente (INCA, 2004; MENKE *et al.*, 2007b). Este baseia-se no diâmetro máximo do tumor (T), na presença ou não de linfonodos metastáticos na axila (N) e nas metástases à distância, ausentes ou não (M) (Anexo1).

Considerando a classificação da UICC, são estabelecidos grupos por estágio, constituindo a classificação clínica (Anexo 1). Esta classificação só se aplica a carcinomas e a tumores primários, virgens de tratamento.

O estadiamento da doença é um dos fatores mais importantes na determinação prognóstica da paciente quando da instituição do tipo de tratamento. O atraso para a realização deste pode comprometer as possibilidades de cura (INCA, 2004 b).

#### 2.1.6 *Abordagem terapêutica multidisciplinar do câncer de mama*

Como citado no início desta revisão, o tratamento do câncer de mama avançou bastante nas últimas décadas. Atualmente, o câncer de mama é tratado

dentro de um contexto multidisciplinar, onde a cirurgia e a radioterapia têm papel fundamental no controle loco regional, e a quimioterapia, a hormonioterapia e a terapia biológica no tratamento sistêmico. Dessa forma, o tratamento deve ser individualizado, e orientado não apenas pela extensão da doença, mas também por suas características biológicas, e condições da paciente (idade, status menopausal, comorbidades e preferências).

A cirurgia representa a base do tratamento do câncer de mama. A indicação de diferentes tipos de cirurgia depende do estadiamento clínico e do tipo histológico, podendo esta ser conservadora ou não. A cirurgia conservadora deve ser associada à radioterapia complementar pós ou pré-operatória. Seu objetivo principal é eliminar lesões microscópicas eventualmente não extirpadas pela cirurgia, e reduzir o risco de recidiva local (Brasil, 2013). Para indicação dessa modalidade terapêutica, deve-se levar em conta a possibilidade de controle da doença com bom resultado estético, devendo ser indicada em tumores pequenos, palpáveis ou não, sem evidência de multicentricidade, e sem metástase à distância.

O tratamento sistêmico será determinado de acordo com o risco de recorrência e as características tumorais. A terapia apropriada baseia-se principalmente na mensuração dos receptores hormonais, quando hormonioterapia pode ser indicada, e também no fator de crescimento epidérmico 2 (HER-2), para consideração de terapia biológica anti-HER-2.

Na doença localmente avançada, o tratamento deve ser inicialmente sistêmico, e o tratamento cirúrgico estará indicado após resposta adequada com redução do tumor. Havendo metástase à distância, o tratamento cirúrgico tem indicações restritas, sendo o tratamento sistêmico a principal opção.

De forma geral, os tratamentos oncológicos, são complexos e agressivos ao organismo. Cada modalidade de tratamento pode resultar em efeitos colaterais que geram impacto negativo no estado nutricional do paciente (DE CICCIO *et al.*, 2002).

## **2.2 Sistema imunológico e o câncer de mama**

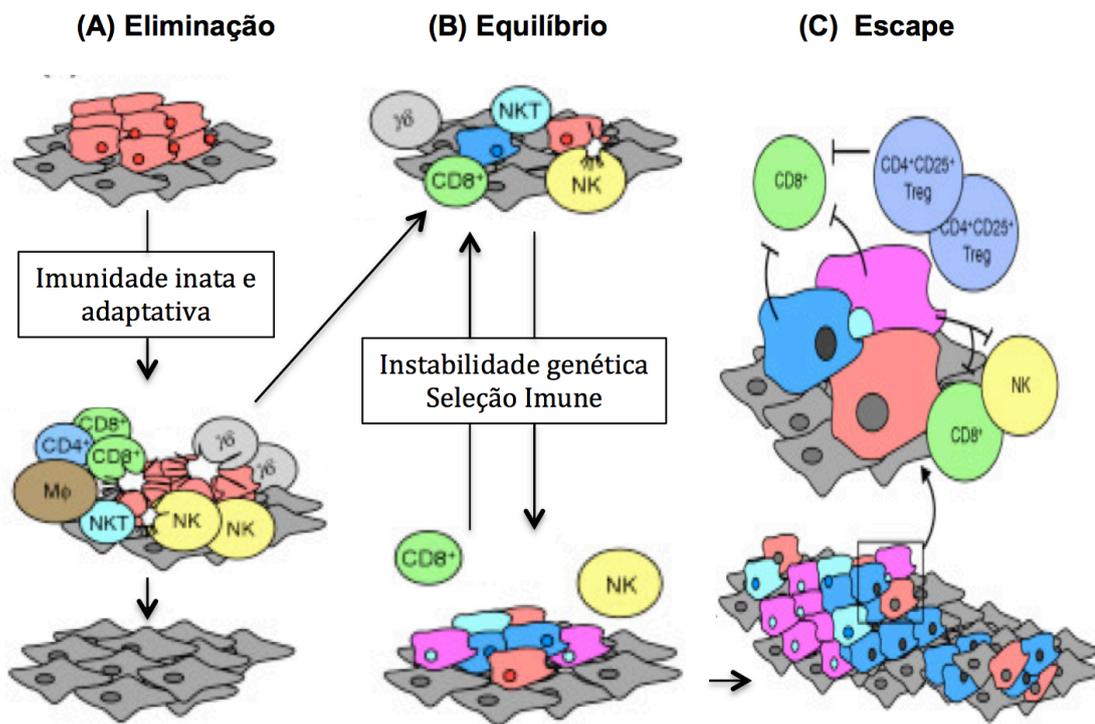
### *2.2.1 Imunoedição do câncer*

O conceito de que o sistema imune poderia controlar o câncer foi proposto pela primeira vez por Paul Ehrlich no início do século passado (DUNN *et al.*, 2002,

2004). Ehrlich sugeriu que o sistema imunitário poderia suprimir o desenvolvimento de tumores e propôs que a incidência de câncer poderia ser muito maior, se não fosse a habilidade do sistema imune para identificar e eliminar as células tumorais que surgem naturalmente por alterações hereditárias e mutações (DUNN *et al.*, 2002, 2004). Cerca de 50 anos mais tarde, Macfarlane Burnet e Lewis Thomas desenvolveram a hipótese da imunovigilância, que propunha que o sistema imune adaptativo era responsável por prevenir o aparecimento de tumores em hospedeiros imunocompetentes (DUNN *et al.*, 2002, 2004). Um requisito para aceitação dessa hipótese seria a observação experimental de que animais imunodeficientes apresentassem incidência maior de neoplasias. Porém, os estudos em camundongos atímicos realizados neste período não demonstraram um aumento na incidência de tumores espontâneos ou induzidos, o que relegou o conceito de imunovigilância ao abandono por pelo menos duas décadas.

Em 1990, utilizando camundongos *knockout* para os genes interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) tipo II ou Rag2<sup>-/-</sup> (fator de transcrição necessário para o desenvolvimento de células T, B e NK), foi possível observar uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de tumores induzidos por carcinógenos, na ausência de componentes essenciais do sistema adaptativo. Trabalhos posteriores permitiram concluir que a vigilância imune ocorre por meio de mecanismos diversos, os quais provavelmente são ditados de acordo com o tecido e o ambiente de desenvolvimento tumoral (DUNN *et al.*, 2002).

A existência de casos clínicos de câncer, apesar da vigilância imune, e a observação de que tumores que surgem em indivíduos com alguma deficiência imune são mais imunogênicos do que aqueles que surgem em hospedeiros imunocompetentes (SHAKARAN *et al.*, 2001), levaram a uma nova abordagem do papel do sistema imune na tumorigênese. Hoje, considera-se que o sistema imune possui um papel dualístico no estabelecimento do tumor, em um processo chamado de imunoeedição do câncer (DUNN *et al.*, 2002). Nesse processo o sistema imune exerce uma pressão seletiva sobre os tumores, induzindo uma eliminação ou seleção de subclones menos imunogênicos, e assim, molda seu fenótipo durante a progressão tumoral. A imunoeedição do câncer é um processo composto por três fases contínuas e progressivas: eliminação, equilíbrio e evasão, conhecidas como os três “Es” da imunoeedição (DUNN *et al.*, 2004) (Figura 3).



**Figura 3. Os três “Es” da imunoeedição do câncer: eliminação, equilíbrio e escape.** (A) Após transformação de células normais (células em forma de diamante) em células cancerígenas (com formas irregulares), ocorre invasão por vários tipos diferentes de células do sistema imunológico (indicado por células redondas) que podem levar à eliminação das células cancerígenas. (B) Se a eliminação for bem sucedida o hospedeiro permanece livre de tumores. Entretanto, se uma variante rara de célula tumoral não é eliminada, o sistema imunológico e o câncer podem chegar a um equilíbrio no qual células do sistema imunológico mantém o câncer em estado de dormência proliferativa, mas não pode removê-lo completamente. Durante a fase de eliminação, existe seleção das células cancerígenas, cujos genomas também são instáveis. Isto pode levar ao escape (C), em que as células cancerígenas se tornam mutadas e capaz de inibir o sistema imunológico. O câncer pode então crescer sem controle. CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg, e NKT são todas células T; Mφ são macrófagos e NK são células assassinas naturais.

**Fonte:** Adaptado de Strausberg, 2005.

A fase da eliminação corresponde à imunovigilância. Nesta fase, a imunidade inata e adaptativa trabalha em conjunto para eliminar os tumores nascentes, muito antes de serem clinicamente detectáveis. Independente do mecanismo de reconhecimento inato, as vias efetoras são mediadas pela via do IFN- $\gamma$ . Células dendríticas apresentadoras de antígenos tumorais drenam para um linfonodo e estimulam a proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> tumor específicas. Por fim, as células da imunidade adaptativa são atraídas para o local da neoplasia onde reconhecem e destroem as células tumorais que expressam os antígenos

específicos (DUNN *et al.*, 2004). Em um segundo momento, as células tumorais que não foram destruídas geram variantes que carregam mutações possibilitando a resistência. Segue-se a fase de equilíbrio, onde o crescimento tumoral é combatido, principalmente, por mecanismos imunes adaptativos (linfócitos T, interleucinas, IFN- $\gamma$ ). Na terceira fase, chamada de evasão ou escape, os tumores adquirem habilidades que impedem o ataque do sistema imune. Isto pode ocorrer através da liberação de citocinas inibitórias (TGF-beta ou IL-10) ou através de modificações estruturais como a perda de antígenos, perda de componentes de MHC ou adquirindo insensibilidade ao IFN- $\gamma$ . Neste processo, as novas variantes de células tumorais, que não são reconhecidas pelo sistema imune, crescem de maneira descontrolada (DUNN *et al.*, 2004; STRAUSBERG, 2005).

### 2.2.2 Linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> no câncer de mama

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> desempenham papel central na imunoedição do câncer (DUNN *et al.*, 2004). Linfócitos T CD8<sup>+</sup> são capazes de reconhecer antígenos tumorais ligados às moléculas de MHC de classe I na superfície de células tumorais matando-os diretamente. Por outro lado, acredita-se que a geração da resposta de linfócitos T citotóxicos tumor-específico (CTL) depende da ajuda de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados, que reconhece antígenos tumorais apresentados com moléculas de MHC classe II. A partir da produção de citocinas, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> estabelecem uma comunicação estreita entre a resposta imune inata e adaptativa, que é fundamental para uma resposta antitumoral eficiente (NISHIMURA *et al.*, 1999).

As percentagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de indivíduos saudáveis pode variar entre 50-60% e 20-25%, respectivamente, e a proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> para T CD8<sup>+</sup> é de aproximadamente 2:1 (ABBAS, 2011).

O papel dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e a razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> em relação ao diagnóstico e prognóstico de câncer tem sido investigado em diferentes tipos de câncer, incluindo gástrico (REY-FERRO *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 1994), urológico (XU *et al.*, 1999; KAVER *et al.*, 1992), de próstata (KAVER *et al.*, 1992) e de mama (SEVCIKOVÁ *et al.*, 1992; SCHRÖDER *et al.*, 1997; GOEDERT *et al.*, 2012; SALEH *et al.* 2008). Estes estudos têm demonstrado mudanças nas percentagens dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes com câncer quando

comparado com controles. Tem sido demonstrado que pacientes com câncer de mama tem uma função imune mediada por células debilitada quando comparadas com controles saudáveis (McCLUSKEY *et al.*, 1983). Em pacientes recém-diagnosticadas com câncer de mama observou-se menores percentagens de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (McCLUSKEY *et al.*, 1983; WANG *et al.*, 2012) no sangue periférico dessas pacientes. Por outro lado, há estudos que observaram resultados contrários aos citados anteriormente (MURTA *et al.*, 2000; CAMPBELL *et al.*, 2005) ou ainda aqueles que não evidenciaram diferença entre pacientes e controles (WHITFORD *et al.*, 1992). Com relação à razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> tem sido demonstrado uma variação conforme o estadiamento clínico, sendo normal nos estadiamentos iniciais e reduzida na fase avançada da doença (McCLUSKEY *et al.*, 1983; SEVCIKOVA *et al.*, 1992).

Além de mudanças nas frequências das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, pacientes com câncer de mama podem apresentar desequilíbrio na produção das citocinas produzidas por linfócitos T (CAMPBELL *et al.*, 2005). Essas citocinas são críticas para a eficácia de uma dada resposta imune e um desequilíbrio nessas respostas pode desempenhar um papel importante na progressão do câncer. Campbell *et al.* (2005), utilizando citometria de fluxo, avaliaram os perfis de citocinas intracelulares de linfócitos T no sangue periférico de 84 mulheres com câncer de mama e 26 voluntárias saudáveis. Estes autores exploraram a relação destas respostas com a presença de câncer nos nódulos linfáticos e na medula óssea. Os percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produzindo citocinas tipo 1 (IL-2, IFN- gama ou TNF- alfa) e tipo 2 (IL-4) foram significativamente menores nas pacientes com câncer de mama em comparação com controles saudáveis. Além disso, essas pacientes apresentaram um aumento da razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, que segundo os autores, pode ser em decorrência a um aumento no número de células T reguladoras. Estes resultados indicam uma disfunção imunológica geral, em vez de uma mudança no equilíbrio de células tipo 1 e tipo 2, como já demonstrado em estudos com outros tipos de câncer. Tais respostas desreguladas das células T não se correlacionaram com a idade, estágio da doença ou status nodal. No entanto, observou-se uma correlação entre o número de micro metástases na medula óssea e responsividade das células T.

Em 2014, Jia *et al.* conduziu um estudo de caso controle com mulheres recém diagnosticadas de câncer de mama (n=494) e demonstrou que a função

imune pode diferir dentre os diferentes fenótipos ou subtipos de câncer de mama. Neste estudo, cânceres de mama ER<sup>-</sup> (negativo para receptor de estrogênio) e TN (triplo negativo) foram associados a baixos níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, baixa razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e altos níveis de T CD8<sup>+</sup> e NK (células natural Killer) quando comparados com cânceres de mama ER<sup>+</sup> (positivo para receptor de estrogênio) e luminal A. Em geral, os cânceres de mama ER<sup>-</sup> e TN tem um pior prognóstico do que aqueles que são ER<sup>+</sup> e luminal A. Estes resultados indicam um maior grau de supressão da função imunológica e ativação antitumoral, refletindo o aumento da agressividade de ER<sup>-</sup> e TN.

### 2.2.3 Inflamação e câncer

#### 2.2.3.1 Prostaglandina E<sub>2</sub> e câncer de mama

Além de atuar via imunoedição, com ação especialmente das células imune adaptativas, o sistema imunológico também pode influenciar o desenvolvimento local do câncer pela inflamação e suas ações inatas.

A relação funcional entre inflamação e câncer não é nova. Desde 1863, a hipótese de que o câncer poderia se desenvolver em sítios de inflamação crônica vinha sendo cogitada por Rudolf Virchow, que estabeleceu a relação entre inflamação e carcinogênese a partir da presença de leucócitos em tecidos neoplásicos (BALKWILL & MANTOVANI, 2001). Desde então, estudos epidemiológicos tem demonstrado que inflamação crônica predispõe indivíduos a vários tipos de cânceres. Estima-se que as infecções subjacentes e respostas inflamatórias estão relacionadas a 20% de todas as mortes por câncer no mundo (MANTOVANI *et al.*, 2008).

Mantovani *et al.* (2008) considera que o câncer e a inflamação são conectados por duas vias: uma via intrínseca e outra extrínseca. A via intrínseca é ativada por eventos genéticos que causam neoplasia. Estes eventos incluem a ativação de vários tipos de oncogenes por mutação, amplificação ou rearranjo cromossômico, e a inativação de genes supressores de tumores. As células que são transformadas desta maneira produzem mediadores inflamatórios, gerando assim um microambiente tumoral inflamatório para os quais não existe condição inflamatória subjacente (por exemplo, tumores de mama). Por outro lado, na via

extrínseca, condições inflamatórias ou infecciosas aumentam o risco de desenvolvimento de câncer em certos sítios anatômicos (cólon, pâncreas e próstata). As duas vias convergem resultando na ativação de fatores de transcrição, principalmente NF- $\kappa$ B, transdutor de sinal e ativador de transcrição-3 (Signal transducer and activator of transcription 3 – STAT3) e fator-1 $\alpha$  induzido pela hipóxia (Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  – HIF1 $\alpha$ ), em células tumorais. Estes fatores de transcrição coordenam a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, bem como a produção de prostaglandinas. Estes fatores recrutam e ativam vários leucócitos, principalmente as células da linhagem mielomonocítica. As citocinas ativam os mesmos fatores de transcrição em células inflamatórias, células estromais e células do tumor, resultando em mais mediadores inflamatórios, sendo produzido um microambiente inflamatório relacionado ao câncer.

A ciclooxigenase 2 (COX-2), enzima limitante na cascata de síntese de eicosanóides, está envolvida na regulação da resposta inflamatória e pode ser altamente induzida durante a progressão tumoral. Superexpressão de COX-2 é encontrada em tecidos e em linhagens de células de tumores de mama, cólon, vias biliares, pele, pulmão e fígado (READER *et al.*, 2011; BASU *et al.*, 2013).

Experimentalmente a COX-2 está envolvida em tumores mamários em ratos, induzidos por vários carcinógenos (READER *et al.*, 2011). Estudos clínicos também corroboram o papel protumorigênico da enzima COX-2 no câncer de mama. Níveis elevados de COX-2 têm sido observados em todos os estágios do câncer de mama e detectados imunohistoquimicamente em aproximadamente 40% dos carcinomas invasivos de mama (READER *et al.*, 2011; BASU *et al.*, 2013; HARRIS *et al.*, 2014). Ristima"ki *et al.* (2002) analisando a expressão de COX-2 por imunohistoquímica em tecido de câncer de mama invasivo de 1576 pacientes, encontraram uma expressão elevada de COX-2 que esteve associada a um maior tamanho tumoral, um alto grau histológico, status negativo de receptor hormonal, elevado índice de proliferação (identificado por Ki-67), alta expressão da p53, e a presença de amplificação do oncogene HER-2, ( $p < 0,0001$  para todas as comparações), juntamente com metástases e tipo histológico ductal ( $p = 0,0001$  e  $p = 0,0017$ , respectivamente). Os resultados deste estudo indicaram que a expressão elevada de COX-2 é mais comum em câncer da mama com características de mau prognóstico e está associada a um resultado desfavorável.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o uso de agentes que inibem a COX-2, como anti-inflamatórios não esteroides, reduzem o risco de desenvolvimento de câncer de cólon, de mama e da mortalidade associada a estas doenças (PORTA *et al.*, 2009; HARRIS *et al.*, 2014). De acordo com Reader *et al.* (2011) e HARRIS *et al.* (2014), o câncer de mama experimental pode ser suprimido pela inibição da atividade da COX-2 por drogas antiinflamatórias não esteroides (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs- NSAIDs), como aspirina, ibuprofeno e outros ou por inibidores seletivos de COX-2 (Selective COX-2 inhibitors – COXibs), tais como celocoxibe e nimesulida. A expressão de COX-2 está associada com metástase em câncer de mama e antagonismo de COX-2 diminui a invasão e motilidade das células cancerígenas neste tipo de câncer.

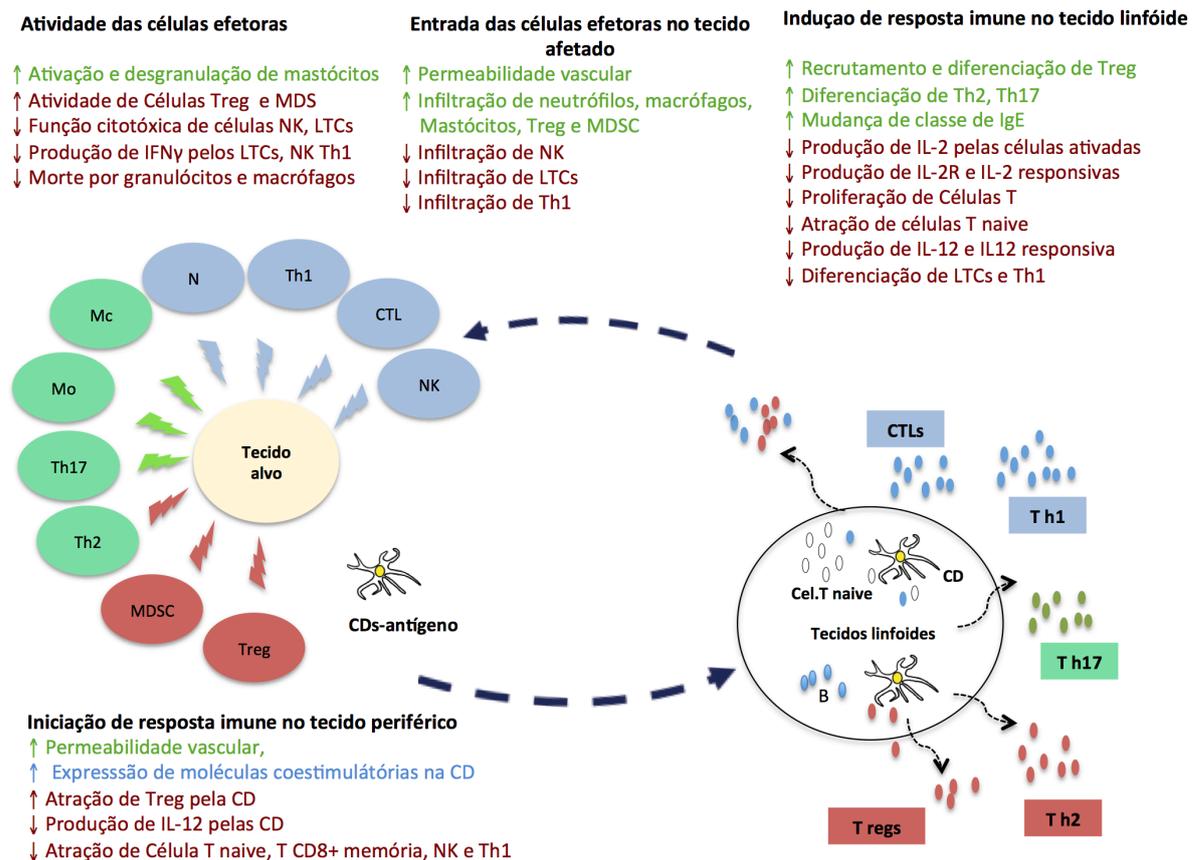
A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) é considerada o principal produto tumorigênico derivado da COX-2 (CHEN *et al.*, 2011), sendo produzida por uma variedade de tipos de células, incluindo fibroblastos, macrófagos e alguns tipos de células malignas (HARRIS *et al.*, 2014; KALINISKI *et al.*, 2012).

A PGE<sub>2</sub> exerce suas ações de maneira autócrina ou parácrina e seus efeitos celulares são mediados pelos seus quatro subtipos de receptores (EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub>). Estes são receptores acoplados a proteína G (GPCRs), que são proteínas transmembrana envolvidas na transdução de sinais celulares. Evidências experimentais têm indicado que os receptores EP podem desempenhar um importante papel no câncer de mama, incluindo câncer de mama metastático (READER *et al.*, 2011). Contudo, o papel preciso de cada EP no comportamento do câncer ainda não está bem determinado.

De acordo com Harris *et al.* (2014), a PGE<sub>2</sub> promove a sobrevivência de células tumorais e encontra-se em altas concentrações em tecidos de tumores malignos quando comparado com tecidos normais. A sobrevivência do tumor é mediada pela PGE<sub>2</sub> por vários mecanismos incluindo inibição de apoptose e indução da proliferação de células tumorais. A PGE<sub>2</sub> pode estimular a angiogênese, alterar a morfologia celular, aumentando a motilidade e a migração de células, contribuindo assim com a progressão tumoral.

A PGE<sub>2</sub> atua no sistema imune de forma complexa, regulando as funções de diferentes populações de células, como macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T (KALINISKI *et al.*, 2012) (Figura 4). Ela inibe a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> via diminuição da liberação de cálcio intracelular e atividade da proteína tirosina quinase

p59. Embora menos conhecido sobre seus efeitos nas células T CD8<sup>+</sup>, tem sido demonstrado que a PGE<sub>2</sub> inibe a proliferação destas células (HARRIS *et al.*, 2002; READER *et al.*, 2011;). Além de diminuir a proliferação de células T, a PGE<sub>2</sub> tem forte efeito na produção de citocinas pelas células Th1 e Th2. A PGE<sub>2</sub> aumenta a produção da interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-10 pelas células Th2 e inibe drasticamente a produção de IL-2 e interferon gama (*Interferon gamma - INF-γ*) pelas células Th1, prejudicando a resposta antitumoral. Ela também inibe a produção de INF-γ pelas células T CD8<sup>+</sup>, o que fortalece ainda mais a resposta Th2 (HARRIS *et al.*, 2002; READER *et al.*, 2011 ).



**Figura 4. Regulação da resposta imune pela Prostaglandina E<sub>2</sub>.** Azul indica relevante para imunidade contra patógenos intracelular e câncer; verde indica relevante para imunidade contra patógenos extracelular; vermelho indica relevante para supressão imune. ↓, supressão; ↑, aumento; Mo, monócitos; Mc, macrófagos; N, neutrófilos; MDSD, células supressoras derivadas de mielóides, Treg, linfócitos T reguladores; CTL, linfócitos T citotóxicos; Th, linfócitos T auxiliares; CD, células dendríticas.

**Fonte:** adaptado de Kaliniski (2012)

A PGE<sub>2</sub> afeta de forma complexa o desenvolvimento e atividade das células B imaturas, suprimindo a proliferação e induzindo apoptose dessas células. Por outro

lado, ela não induz morte ou inibe a proliferação de células B maduras, mas regula sua atividade (READER *et al.*, 2011).

Nas células dendríticas a PGE<sub>2</sub> atua inibindo sua maturação, alterando sua capacidade de apresentação de antígeno e produção de IL-12, Fator de necrose tumoral (*Tumor necrosis factor* - TNF-  $\alpha$ ) e IL-1  $\beta$ , suprimindo ainda mais a resposta imune Th1.

Pockaj *et al.*, (2004) demonstraram que níveis aumentados de PGE<sub>2</sub> suprime a imunocompetência de linfócitos T auxiliares e dendríticas em pacientes recém diagnosticada com câncer de mama. Níveis elevados de PGE<sub>2</sub> foram associados com reduzida secreção de fatores antitumorais pelas células T (INF- $\gamma$ , TNF-  $\alpha$ , IL-2 e IL-12) e perda de imunocompetência em células dendríticas. Função prejudicada de células dendríticas devido à biossíntese de PGE<sub>2</sub> dirigida por COX-2 é portanto um importante mecanismo pelo qual tumores evadem a imunovigilância.

### 2.2.3.2 Citocinas Pró-inflamatórias

#### 2.2.3.2.1 Interleucina-6 (IL-6)

Recente revisão realizada por Dethlefsen *et al.* (2013) apresenta IL-6 como uma citocina pleiotrópica que desempenha um importante papel na inflamação. Estudos revisados por estes autores demonstraram que durante a inflamação aguda a IL-6 regula a produção de proteínas de fase aguda e, ao mesmo tempo, controla a extensão da resposta inflamatória por estimular citocinas anti-inflamatórias. Assim, durante a resposta de fase aguda a IL-6 apresenta efeitos pro- e anti-inflamatórios. Por outro lado, durante a inflamação crônica a IL-6 medeia efeitos exclusivamente pró-inflamatórios e aumenta a infiltração de monócitos nos sítios de inflamação.

Estudo de Walter *et al.* (2009) sugere que a IL-6 estimula a produção de proteínas antiapoptóticas e angiogênicas pelas células tumorais, promovendo assim o crescimento tumoral. Para Goldberg *et al.* (2010) os mecanismos pelos quais a IL-6 promove o câncer de mama ainda não são claros e os estudos recentes usando modelos de culturas de células têm gerado resultados controversos. Dependendo do tipo de células, os estudos têm demonstrado efeitos inibitórios ou promotores do crescimento e da proliferação celular.

Diversos estudos (Tabela 1) tem demonstrado que pacientes com câncer de

mama apresentam níveis séricos de IL-6 elevados em comparação a controles saudáveis. Acredita-se que a IL-6 circulante em pacientes com câncer de mama pode ser derivada de múltiplas fontes celulares, incluindo células imunes, estromais e do próprio tumor (GOLDBERG *et al.*, 2010). Conforme revisão de Dethlefsen *et al.* (2013) níveis séricos de IL-6 correlacionam-se positivamente com o estágio do tumor, infiltração de nódulos linfáticos, número de metástases e recorrência da doença.

LV *et al.* (2011) em estudo conduzido em mulheres chinesas portadoras de câncer de mama, encontraram diferença significativa entre níveis séricos de IL-6 de pacientes portadoras de câncer de mama HER2<sup>+</sup> e HER2<sup>-</sup>. Por outro lado, Goswami *et al.* (2013) não encontraram correlação significativa entre os níveis séricos de IL-6 e o status de receptores de estrogênio, progesterona e HER2.

Estudos revisados por Esquivel-Valázquez *et al.* (2015) demonstraram que pacientes com altas concentrações séricas de IL-6 apresentam pior resposta à quimioterapia e terapia hormonal.

**Tabela 1.** Estudos que analisaram IL-6 sérica em pacientes com câncer de mama.

Referência	População	Objetivo do estudo	Principais resultados
Goswami <i>et al.</i> (2013)	n= 30 Idade média:50 anos EC* avançado	Correlacionar os níveis de IL-6 com carga tumoral e status dos receptores hormonais	Níveis séricos de IL-6 variou de acordo com: 1. progressão da doença: aumentou de T3N1M0 para T4dN2M0 (41,4 ± 31,9 vs. 164,0 ± 31,1 pg/ml respectivamente, $p = 0,001$ ). 2. Grade histológica – grade I 42,8 ± 32,2 e grade III 128,9 ± 61,0 pg/ml, respectivamente. 3. Invasão do tecido adiposo e índice mitótico (102,0 ± 68,3 e 55,8 ± 40,5 pg /ml em tumores com índice mitótico 2 e 1 respectivamente).
Lyon <i>et al.</i> (2008)	n= 35 casos 24 controles Idade média:48 anos  EC I/II/III/IV	Comparar os níveis séricos de IL-6 de mulheres com câncer de mama com controles	Observaram-se altos níveis de IL-6 em pacientes com câncer em diferentes estágios quando comparado com controles. No grupo câncer de mama a IL-6 variou de 77,5 – 226 pg/ml e no grupo controle a variação foi de 44,0 – 55,5 pg/ml.
Bozcuk <i>et al.</i> (2004)	n= 43	Investigar a relação de vários fatores de crescimento e citocinas com o prognóstico clínico em pacientes com câncer de mama.	Altos níveis séricos de IL-6 (ponto de corte > 5 pg/ml, mediana) foram associados com menor sobrevida geral e tempo livre de doença.
Bachelot <i>et al.</i> (2003)	n= 80 Idade média: 54 anos EC avançado	Investigar a associação entre níveis de IL-6 e prognóstico clínico em pacientes com câncer de mama metastático	Altos níveis séricos de IL-6 (ponto de corte ≥ 55 pg/ml, mediana) foi associado com menor sobrevida geral e tempo livre de doença
Jiang <i>et al.</i> (2000)	n= 111 casos e 36 controles	Comparar os níveis séricos de IL-6 de mulheres com câncer de mama com controles	Observam-se altos níveis de IL-6 em pacientes com câncer quando comparado com controles.  Mediana IL-6 0,7 ± 2,5 pg/ml vs 38.3 ± 138,7 pg/ml

## Continuação

Referência	População	Objetivo do estudo	Principais resultados
Salgado <i>et al.</i> (2003)	n= 96 54 anos	Avaliar prospectivamente a importância prognóstica da IL-6 circulante em pacientes com câncer de mama metastático e verificar se há associação com variáveis clinicopatológicas. Carga e tamanho tumoral	Um sítio metastático: $3.06 \pm 6.6$ pg/ml Dois ou mais sítios metastáticos: $8.3 \pm 1.7$ pg/ml Metástase hepática: $8.3 \pm 2.4$ pg/ml Os autores concluíram que a IL-6 circulante está associada com pior sobrevida em pacientes com câncer metastático e está correlacionada com a extensão da doença.

\*EC = Estadiamento clínico da doença

#### 2.2.3.2.2 Interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

A IL-1 $\beta$  pertence a grande família das IL-1 e é geralmente produzida por monócitos e macrófagos, mas também por outros tipos de células, incluindo linfócitos, fibroblastos e células epiteliais (GOLDBERG *et al.*, 2010).

A IL-1 $\beta$  tem sido associada à proliferação, angiogênese e inibição de apoptose em células de câncer de mama (ESQUIVEL-VALÁZQUEZ *et al.*, 2015). A IL-1 $\beta$  desempenha um papel importante na progressão do câncer de mama, pois ela participa da regulação de células teciduais e imunológicas dentro do microambiente tumoral, induzindo a expressão de várias citocinas, incluindo a IL-8 que é uma citocina angiogênica (PRENKUMAR, *et al.*, 2007).

Estudos revisados por Goldberg *et al.* (2010) demonstraram que a expressão de IL-1  $\beta$  está aumentada em aproximadamente 90% dos carcinomas invasivos de mama negativos para receptores de estrogênio e que altos níveis de IL-1 $\beta$  correlaciona-se com recorrência da doença. Estes estudos sugerem que IL-1 $\beta$  pode ser um importante mediador de crescimento e progressão de câncer de mama.

#### 2.2.3.2.3 Fator de necrose tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

O TNF- $\alpha$  é um importante mediador da inflamação (VENDRAMINI-COSTA *et al.*, 2012). Semelhante a IL-6 é uma citocina extremamente pleiotrófica, produzida por numerosos tipos de células, incluindo células imunes (principalmente macrófagos ativados) fibroblastos e células tumorais (GOLDBERG *et al.*, 2010). TNF- $\alpha$  pode induzir necrose tumoral por afetar a vascularização do tumor e iniciar morte celular apoptótica. Mas, paradoxalmente, ele também pode promover a proliferação celular (BALKWILL *et al.*, 2002).

Miles *et al.* (1994) analisaram amostras de tecidos de câncer de mama e demonstraram expressão aumentada de TNF- $\alpha$  em carcinomas invasivos comparados com tecidos de mama benignos. Neste estudo, a expressão de TNF- $\alpha$  foi focal e limitada ao estroma tumoral. A presença de TNF- $\alpha$  foi confirmada por imunohistoquímica e novamente foi predominantemente estromal.

Estudo de Sheen-Chen *et al.* (1997) com objetivo de investigar possível correlação entre os níveis sérios de TNF- $\alpha$  e características clinicopatológicas e ainda avaliar sua significância prognóstica em câncer de mama, demonstrou níveis

séricos aumentados de TNF- $\alpha$  em pacientes com carcinoma de mama invasivo quando comparados com controles. Em análise multivariada, o estadiamento clínico foi observado como preditor independente de altas concentrações séricas de TNF- $\alpha$  na população estudada. Recente estudo de Hamed *et al.* (2012) demonstrou resultados semelhantes, sendo observados níveis séricos aumentados de TNF- $\alpha$  em pacientes com câncer de mama em estadiamento clínico avançado quando comparado com estágios iniciais e controles saudáveis.

Há cada vez mais evidências que os níveis séricos de IL-6 e TNF- $\alpha$  refletem a manutenção e agressividade do tumor em pacientes com câncer de mama. Trabalhos recentes demonstraram que níveis séricos de IL-6 e TNF- $\alpha$  são marcadores independentes de prognóstico e sobrevida em câncer de mama (PAPADOPOULOU *et al.*, 2010, TRIPSIANIS *et al.*, 2012). Além disso, co-expressão aumentada IL-6 e TNF- $\alpha$  foi independentemente associada com a extensão de envolvimento de nódulos linfáticos (> 3) e invasão linfovascular, aumentando a significância prognóstica de cada citocina separadamente; também forneceu informação prognóstica adicional em relação à sobrevivência, definindo um subgrupo de pacientes com alto risco de menor sobrevida e maior risco de morte em comparação com pacientes com ambas as citocinas baixas e pacientes com apenas uma citocina alta. Os resultados sugerem que a co-expressão destas duas citocinas pode ser utilizada clinicamente como um marcador tumoral útil para a extensão e o prognóstico da doença (TRIPSIANIS *et al.*, 2014).

### 2.2.3.3 Resposta de fase Aguda

#### 2.2.3.3.1 Proteína C-reativa

A PCR é um marcador de resposta inflamatória de fase aguda. Ela é produzida principalmente por hepatócitos, em resposta a citocinas como IL-6, IL-1 e TNF- $\alpha$  (HEIKKILÄ *et al.*, 2007; PIERCE *et al.*, 2009). A PCR atua no sistema imunológico exercendo várias funções, como a opsonização (para fagocitose) e ativação do sistema de complemento pela via clássica (SCHULTZ *et al.*, 1990).

Segundo HEIKKILÄ *et al.* (2006), concentrações elevadas de PCR tem sido relatada em várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, artrite e muitos tipos de cânceres. Para esses autores, três possíveis mecanismos

podem ser propostos para a relação entre PCR e câncer. Em primeiro lugar, o crescimento do tumor pode causar inflamação no tecido e, portanto, elevar os níveis de PCR. Segundo, a PCR pode ser um indicador de uma resposta imune para antígenos tumorais. Terceiro, há evidências que as células tumorais podem aumentar a produção de proteínas inflamatórias, o que poderia explicar altas concentrações de PCR em pacientes com câncer.

Estudos epidemiológicos tem demonstrado que níveis elevados de PCR podem estar associados com pior prognóstico de vários tipos de cânceres, incluindo endometrial, cervical, colorretal, pancreático, hepatocelular e pulmonar de pequenas células (ALLIN, *et al.*, 2011). Um grande estudo, envolvendo 700 mulheres com câncer de mama na fase inicial, demonstrou que níveis séricos elevados de PCR medidos dois anos e meio após o momento do diagnóstico foram associados com redução da sobrevida global e tempo livre de doença (PIERCE *et al.*, 2009).

### **1.3 Ácidos graxos poliinsaturados n-3: sua relação com o sistema imune e o câncer de mama**

Os ácidos graxos (AGs) são as unidades fundamentais de lipídios, componentes principais das gorduras dietéticas. Os AGs dietéticos são incorporados aos lipídios sanguíneos, aos depósitos de gordura e nos lipídios estruturais das membranas celulares. Estes podem ser representados pela fórmula  $RCO_2H$ , onde, na maioria das vezes, o agrupamento R é uma cadeia carbônica longa, não ramificada, com número par de átomos de carbono (CURI, 2002; FAHY *et al.*, 2005). O número de carbonos na cadeia e o tipo de ligação entre estes dará origem a diferentes tipos de AG (HARDMAN, 2004).

De acordo com o tamanho da cadeia hidrocarbônica podem ser denominados AGs 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. Os de 20 ou mais carbonos são também denominados de AGs de cadeia muito longa. Segundo o número de insaturações da cadeia, podem ser denominados ácidos graxos saturados (AGS) quando não há insaturações, ou insaturados (AGIs), quando possuem uma ou mais insaturações na molécula. Os AGIs são

categorizados em 2 subclasses: ácido graxo monoinsaturado-AGMI (contém uma dupla ligação) e ácido graxo poli-insaturado-AGPI (contém mais de uma dupla ligação) (CURI, 2002).

Na nomenclatura, o termo “n” refere-se à posição da primeira dupla ligação do AG relativa ao grupo metila da molécula de hidrocarboneto (CURI, 2002; CHILTON et al., 2008). Em quase todos os AGIs que ocorrem naturalmente, as duplas ligações estão na configuração *cis* e normalmente são posicionados no n-3, n-6 ou n-9 em relação ao átomo de carbono do grupo metila (RATNAYAKE & GALLI, 2009).

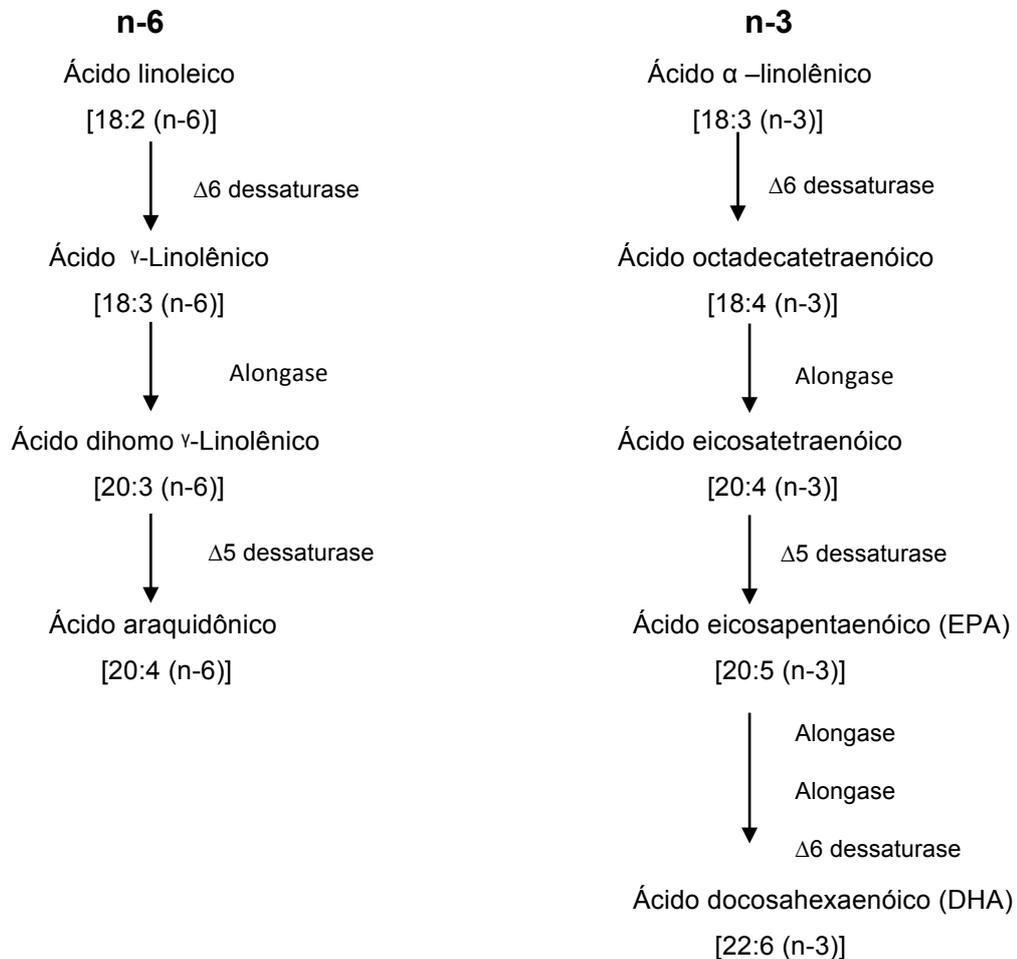
De acordo com a localização das duplas ligações, existem 12 diferentes famílias de AGPIs (RATNAYAKE & GALLI, 2009). As famílias mais importantes, em termos de extensão de ocorrência, saúde humana e nutrição, são as famílias n-6 e n-3 baseado no ácido linoleico (*Linoleic acid* - LA, 18:2 n-6) e no ácido  $\alpha$ -linolênico ( *$\alpha$ -Linolenic acid* - ALA, 18:3 n-3), respectivamente.

Os animais não podem sintetizar o LA e o ALA. Assim, estes ácidos graxos são considerados essenciais e necessitam ser obtidos através da dieta (RATNAYAKE & GALLI, 2009; CALDER, 2012). Embora os animais não possam sintetizar o LA e o ALA, eles podem metabolizá-los a outros AG n-3 de cadeia longa mais insaturados (CALDER, 2012). Isto ocorre por uma série de reações de dessaturação e alongamento que acontecem no retículo endoplasmático, predominantemente nas células hepáticas (Figura 5).

A conversão de ALA em ácido eicosapentaenoico (*Eicosapentaenoic acid* - EPA, 20:5 n-3) sofre competição com a conversão do LA em ácido araquidônico (*Arachidonic acid* - AA, 20:4 n-6), uma vez que as mesmas enzimas são usadas (Figura 5). A reação da  $\Delta 6$  dessaturase é limitante da velocidade nesta via. O substrato preferido para a  $\Delta 6$  dessaturase é o ALA. No entanto, o LA é muito mais prevalente nas dietas humanas que o ALA, e assim o metabolismo dos ácidos graxos n-6 é quantitativamente o mais importante. As atividades da  $\Delta 6$  e  $\Delta 5$  dessaturases são regulados pelo estado nutricional, hormônios e pela inibição de feedback por produtos finais (CALDER, 2013a).

O EPA pode ser convertido em ácido docosahexaenóico (*Docosahexaenoic acid* - DHA, 22:6 n-3). Esta conversão envolve atividade da  $\Delta 6$  dessaturase e é limitada pela  $\beta$ -oxidação peroxissomal. Segundo Calder (2013), estudos em humanos têm demonstrado que a conversão do ALA para EPA e DHA não é eficiente e depende da quantidade de ALA e LA na dieta. A eficácia da conversão

ALA para EPA é de 0,2% e para o DHA é de 0,05% (RATNAYAKE & GALLI, 2009). A conversão do ácido estearidônico (*Stearidonic acid* – SA, 18:4 n-3) para EPA é superior que a do ALA, provavelmente porque a conversão do SA não requer a atividade da enzima  $\Delta 6$  dessaturase. A  $\beta$ -oxidação de DHA, apesar de limitada, pode gerar EPA e DPA num processo chamado retro conversão.



**Figura 5.** Biossíntese dos ácidos graxos poliinsaturados nas células eucarióticas.  
**Fonte:** Adaptado de Calder, 2012

O ALA é geralmente o ácido graxo n-3 mais consumido na maioria das dietas humanas (CALDER, 2013a), pois o mesmo está presente em quantidades moderadas nas folhas verdes, em alguns óleos vegetais (canola, soja, linhaça), nozes e sementes. No entanto, o principal AGPI na maioria das dietas ocidentais é o LA (predominante nos óleos vegetais), que é normalmente consumido 5 a 20 vezes em maior quantidade que o ALA.

Alimentos de origem marinha são boas fontes de AGPI, EPA e DHA, sendo encontrados em grandes concentrações nos óleos de peixes de águas frias e profundas, como a sardinha, cavala, salmão, atum e também no fígado de alguns peixes magros (CALDER, 213a). O suplemento à base de óleo de peixe é preparado a partir da carne de peixes gordos ou a partir de fígado de peixes magros. Num típico suplemento de óleo de peixe, EPA e DHA em conjunto, compreendem cerca de 30% dos AG n-3 presentes, de modo que uma cápsula de um grama de óleo de peixe irá fornecer cerca de 0,3 g de EPA + DHA. Preparações encapsuladas que contêm ácidos graxos em quantidades mais elevadas do que encontrado em óleos de peixe padrão são produzidas por processamento de concentração, separação e purificação destes ácidos graxos ("óleo de peixe concentrado") (CALDER, 2013a).

Após os processos de digestão e absorção o destino final dos ácidos graxos poliinsaturados é definido de acordo com a necessidade orgânica: armazenamento de energia (estoque em adipócitos); unidades estruturais de membrana ou produção de eicosanoides. Apenas uma pequena quantidade encontra-se disponível na forma de ácidos graxos livres *in vivo* (ARAB, 2003)

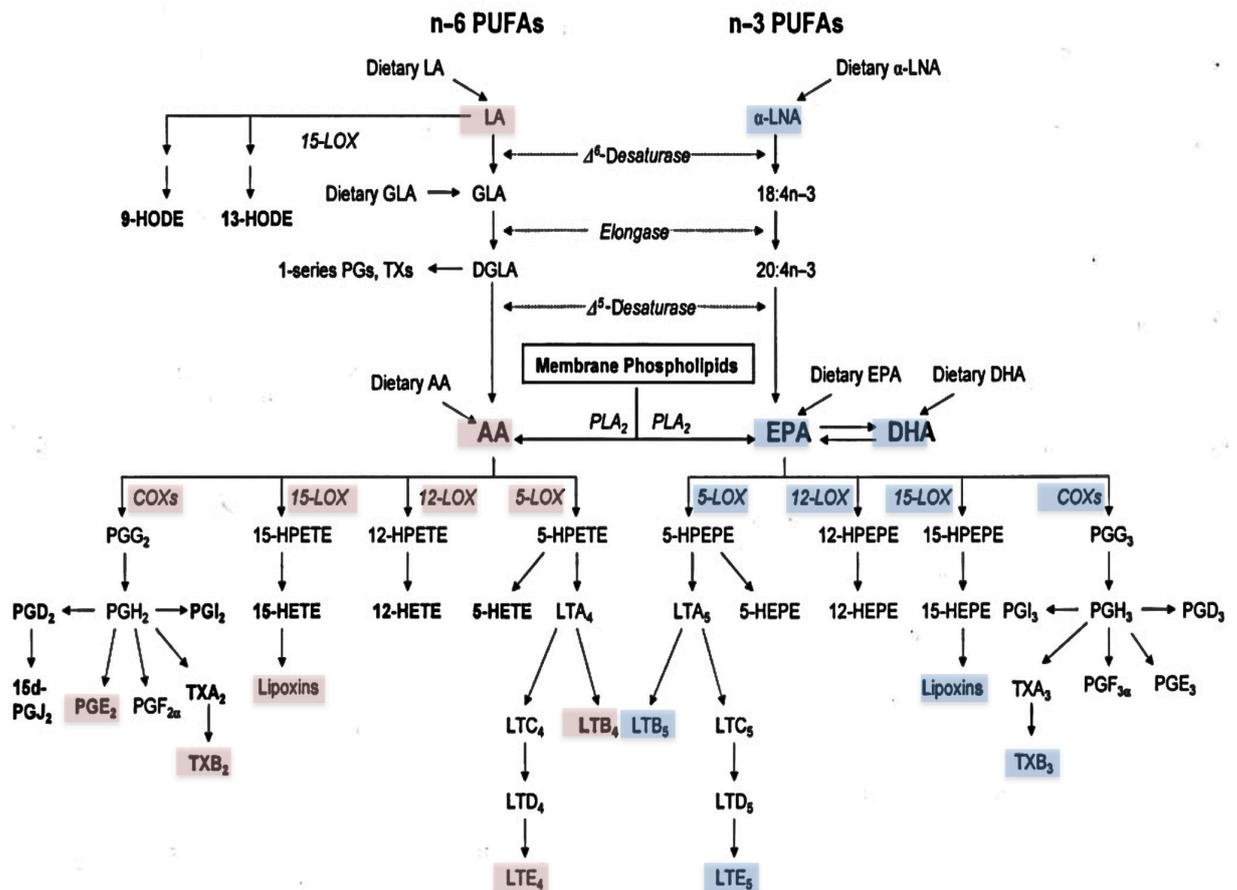
Em indivíduos saudáveis a incorporação do EPA no interior de membranas de leucócitos e nos fosfolipídios plasmáticos é geralmente descrita após 4, 8, ou ainda 12 semanas de intervenção (YAQOOB *et al.*, 2000). De acordo com revisão de Van der Meij *et al.* (2011), em pacientes com câncer, de uma maneira geral a suplementação oral de 1,5 a 3g de EPA (combinado ou não com DHA) aumenta a concentração média de EPA nos fosfolipídios plasmáticos de  $\leq 2,0\%$  para 2,5 a 6,5% do total de ácidos graxos.

Uma das funções mais importantes dos ácidos graxos poliinsaturados está relacionada à sua conversão enzimática em eicosanoides (Figura 6). Os eicosanóides são produtos da COX e LOX e os ácidos graxos de 20 carbonos são os seus precursores. Possuem meia-vida curta, são biologicamente ativos e tem uma grande variedade de funções. Eles modulam a resposta imunológica e inflamatória e desempenham um papel crítico na agregação plaquetária, crescimento e diferenciação celular. Os ácidos graxos precursores para a formação de eicosanóides são o ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico (Dihomo- $\gamma$ -linolenic acid – DGLA, 20:3 n-6), o AA (20:4 n-6) e o EPA (20:5 n-3) (LARSSON *et al.*, 2004). A produção de eicosanóides inicia-se com a liberação dos ácidos graxos AA e EPA dos fosfolipídios de membrana pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub> ou fosfolipase C, que são

ativadas por estímulos inflamatórios. Posteriormente, os ácidos graxos AA e EPA servem como substratos para as enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), lipoxigenases (5-LOX, 12-LOX e 15-LOX) ou monooxigenases do citocromo P450. As ciclooxigenases dão origem às prostaglandinas e tromboxanos, enquanto as lipoxigenases produzem leucotrienos, ácidos graxos hidroxieicosatetraenóico e hidroperoxieicosatetraenóico (HETE e HPETE, respectivamente) e lipoxinas. A oxidação de ácidos graxos poliinsaturados mediada pelas enzimas monooxigenases do citocromo P450 gera ácidos graxos hidroxilados, di-hidroxilados e epóxidos (LARSSON *et al.*, 2004).

A proporção relativa de ácidos graxos poli-insaturados na membrana celular, assim como o tipo de célula, são fatores primários na regulação de eicosanóides que serão gerados (LARSSON *et al.*, 2004). Como o AA é o principal ácido graxo poli-insaturado na membrana celular, a maioria dos eicosanóides produzidos serão os prostanóides da série-2 (prostaglandinas e tromboxanos) e os leucotrienos da série-4. Embora o AA seja preferencialmente metabolizado pela via das ciclooxigenases, os ácidos graxos n-3, especialmente o EPA, inibem competitivamente a atividade das ciclooxigenases (YATES *et al.* 2014). Assim, a ingestão aumentada de óleo de peixe, rico EPA e DHA, resulta na diminuição de AA na membrana plasmática. Consequentemente, sua disponibilidade e turnover pela ciclooxigenases estão diminuídos, resultando na menor formação de derivados de AA, aumentando a formação de eicosanóides da série par derivados do EPA. A grande importância deste fato se dá, não pela alteração na concentração de tais compostos, mas sim pela diferença em suas atividades biológicas. A capacidade dos AG n3 em competir com AG n-6 na produção de eicosanóides constitui sua propriedade antiinflamatória mais estudada (CALDER, 2013b).

Em geral os eicosanóides derivados do AA apresentam efeitos pró-inflamatórios e têm sido associados à carcinogênese. Por outro lado, os eicosanóides originados do EPA, como prostaglandina E<sub>3</sub> (PGE<sub>3</sub>), leucotrieno B<sub>5</sub> (LTB<sub>5</sub>) e o tromboxano 3 (TXB<sub>3</sub>), têm potencial inflamatório e imunossupressor significativamente menor do que aqueles sintetizados a partir do AA (CALDER, 2015). Por exemplo, o LTB<sub>5</sub> é 10 a 30 vezes menos potente como um quimiotático de neutrófilo que o LTB<sub>4</sub> derivado do AA (YATES *et al.*, 2014).



**Figura 6.** Conversão enzimática dos ácidos graxos n-3 e n-6 em eicosanóides envolvidos na inflamação e carcinogênese. LA - ácido linoléico (18:2 n-6); ALA - ácido α-linolênico (18:3 n-3); GLA - ácido α-linolênico (18:3 n-6); DGLA - ácido dihomo-γ-linolênico (20:03 n-6); AA - ácido araquidônico (20:4 n-6); EPA - ácido eicosapentaenóico (20:5 n-3); DHA - ÁCIDO docosahexaenóico (22: 6 n-3) PLA2 - fosfolipase A2; LOX - lipoxigenase; COX - ciclooxigenase; 5, 12, 15-HETE – 5, 12, 15 ácido (s)-hidroxieicosatetraenóico; LT- leucotrienos; HEPE - ácido hidroxieicosapentaenóico; HPETE - ácido hidroperoxieicosatetraenóico; TX - tromboxano; HPEPE- ácido hidroperoxieicosapentaenóico; PG - prostaglandina.

Fonte: Adaptado de Larsson *et al.*, 2004

O EPA e DHA também atuam como substrato para a síntese de outros mediadores inflamatórios incluindo as resolvinas, protectinas e maresinas (KIM *et al.*, 2010; CALDER 2013b, 2015). Esses mediadores lipídicos são liberados durante a comunicação célula-célula na fase de resolução inflamatória, via biossíntese transcelular e participam do controle endógeno da inflamação. Seus efeitos biológicos têm sido examinados em culturas de células e modelos animais, sendo observado inibição da migração endotelial de neutrófilos pelas resolvinas E1, D1 e protectina D1, impedindo assim a infiltração de neutrófilos em sítios de inflamação. A resolvina D1 inibiu a produção de IL-1β e a protectina D1 inibiu a produção de TNF-α e IL1-β (CALDER, 2015).

Além de seus efeitos antiinflamatórios mediados pela menor produção de eicosanoides pró-inflamatórios, os AG n-3 também agem controlando o processo inflamatório por modular a expressão de moléculas de adesão, tais como selectinas e moléculas de adesão vascular 1 (VCAM-1), que participam nas interações dos neutrófilos com o endotélio vascular (YATES *et al.*, 2014; CALDER, 2013b, 2015).

Estudos em animais e humanos saudáveis revisados por Kim *et al.* (2010) e Calder (2015), demonstraram que a suplementação com EPA e DHA inibe a produção e reduz os níveis circulantes de citocinas próinflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-6. Alguns estudos em animais também demonstraram que esses ácidos graxos podem modular positivamente a produção da citocina antiinflamatória IL-10. Em pacientes com câncer, suplementados com EPA e DHA, estudos clínicos tem demonstrado redução nos níveis séricos de citocinas próinflamatórias e PGE<sub>2</sub> (MONTOVANI *et al.*, 2006; FINOCCHIARO *et al.*, 2012; FABER *et al.*, 2013, SÁNCHEZ-LARA *et al.*, 2014), enquanto outros estudos, como os realizados por Persson *et al.* (2005), Read *et al.* (2007) e Taylor *et al.* (2010) não observaram diferença. Os mecanismos proposto para modulação observada nestes estudos incluem a regulação da expressão de genes que ativam receptores nucleares ativados por proliferador de peroxissomos (PPAR), os quais funcionam como fatores de transcrição gênica. Quando ativados os PPARs podem se ligar diretamente a outros fatores de transcrição, como o fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), e inibir a transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória, incluindo citocinas, moléculas de adesão e outros mediadores com importante potencial inflamatório (CALDER, 2015)

Células Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias e os ácidos graxos n-3, em situações inflamatórias, podem orientar este fenótipo para o fenótipo Th2, considerado anti-inflamatório (KIM *et al.*, 2010). Estudos *in vitro*, em animais e humanos saudáveis têm demonstrado que o EPA e o DHA podem inibir a proliferação de células T e diminuir a produção de IL-2, uma importante citocina produzida pelas células Th1 (CALDER, 2013b, 2014). Efeitos funcionais dos Ag n-3 nas células T têm sido associados com mudanças na estrutura da membrana celular. Uma vez incorporados na membrana, as moléculas altamente insaturadas dos AG n-3 podem afetar a estrutura caracteristicamente rígida de *rafts* lipídicos, inibindo a ativação de receptores a eles associados (SHAIKH *et al.*, 2012; CALDER, 2014). Os *rafts* lipídicos são microdomínios de membrana relacionados ao início e

propagação de eventos de sinalização celular. Vários receptores imunológicos são encontrados nos rafts lipídicos e a integridade estrutural desses microdomínios é fundamental para que a sinalização via receptores ocorra (SHAIKH *et al.*, 2012; CALDER, 2014).

Os mecanismos pelos quais os AG n-3 exercem efeitos anti-inflamatórios são interligados e segundo Calder (2013a), estudos em seres humanos tem sugerido uma dose (via oral) limite variando entre 1,35 a 2,7 g de EPA/dia para se observar um efeito anti-inflamatório.

Nos últimos dez anos, vários estudos de coorte prospectivos (THIEBAUT *et al.*, 2009; BRASK *et al.*, 2010; MURFF *et al.*, 2011) e caso-controle (WITT *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009; CHAJÈS *et al.*, 2012) foram realizados para examinar a associação entre o consumo de peixe ou suplementos de óleo de peixe e risco de câncer de mama. Apesar dos resultados serem controversos, esses estudos sugerem que o aumento da ingestão de ácidos graxos n-3, pode estar associado à redução da incidência de câncer de mama. A conclusão de uma metanálise (ZHENG *et al.*, 2013) envolvendo 21 estudos de coorte prospectivos corrobora estes resultados.

Estudos experimentais têm consistentemente observado que os AG n-3 podem suprimir a formação e o desenvolvimento do câncer de mama *in vitro* e *in vivo* (Tabela 3).

**Tabela 3. Estudos experimentais que avaliaram os efeitos dos ácidos graxos EPA e DHA no crescimento de células de câncer de mama**

Referência	Dose	Efeito	Possível mecanismo
Rose <i>et al.</i> (1995)	40- 80 g de EPA por Kg de dieta	Reduziu o crescimento tumoral	Redução de eicosanoides derivados do AA <sup>1</sup>
Chambrier <i>et al.</i> (2002)	50 µM de EPA	Aumentou PPARγ <sup>2</sup> em nível de RNAm	Não avaliado
Senzaki <i>et al.</i> (2003)	95 g de EPA por kg de dieta	Reduziu a taxa de proliferação de células KPL-1 e metástases	Não Avaliado
Chamras <i>et al.</i> (2006)	100 µM de EPA	Inibiu o crescimento de células MCF-7	Não Avaliado
Sauer <i>et al.</i> (2006)	42 g de EPA por kg de dieta	Suprimiu a proliferação de células MCF-7 xenográficas em ratos	Não Avaliado
Menendez <i>et al.</i> (2006)	120 µM de DHA	Diminuiu a viabilidade de células, aumentou a atividade citotóxica de taxanes	Diminuiu a expressão de Her-2/neu <sup>4</sup>
Rogers <i>et al.</i> (2010)	100 µM de DHA	Diminuiu a proliferação de células MDA-MB-231, aumentaram inibidores de EGFR <sup>3</sup>	Alterou a fosforilação e localização EGFR
Kang <i>et al.</i> (2010)	3 - 100 µM de DHA	Reduziu viabilidade de células MCF-7 e síntese de DHA	Aumentou a peroxidação lipídica, ativação de caspase 8
Blanckaert <i>et al.</i> (2010)	20 - 100 µM de DHA	Inibiu proliferação de células MDA-MB-231	Aumentou atividade caspase-3
Ravacci <i>et al.</i> (2013)	100 µM de DHA	Disrupção de <i>rafts</i> lipídicos, induziu apoptose em células HER-2 +	Diminuiu atividade de Akt <sup>5</sup>

<sup>1</sup>AA, ácido aráquidônico; PPARγ<sup>2</sup>, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama; <sup>3</sup>EGFR, Receptor do fator de crescimento epidérmico, <sup>4</sup>HER-2/NEU, receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano, <sup>5</sup>Akt, proteína quinase B, <sup>6</sup> **FONTE:** Adaptado de Liu *et al.* 2014.

No contexto do tratamento do câncer de mama, estudos tem demonstrado que os ácidos graxos EPA e DHA tem a habilidade de aumentar a eficácia dos tratamentos antineoplásicos (BOUGNOUX *et al.*, 1999; MENENDEZ *et al.*, 2005; COLAS *et al.* 2006; WANG *et al.*, 2007). Em 1999, Bougnoux *et al.* realizaram um estudo prospectivo para avaliar a associação entre a concentração de ácidos graxos no tecido mamário e resposta a quimioterapia em 56 pacientes com câncer de mama. Estes autores observaram que os níveis de ácidos graxos n-3 no tecido mamário foi maior no grupo de pacientes que apresentaram resposta parcial ou completa a quimioterapia quando comparadas com as pacientes que não apresentaram resposta ao tratamento ou apresentaram progressão do tumor. Dentre os ácidos graxos n-3 avaliados, somente o DHA foi significativamente associado à resposta ao tratamento quimioterápico, demonstrando que este ácido graxo pode potencializar os efeitos citotóxicos dos agentes utilizados durante a quimioterapia. Usando cultura de linhas de células de câncer de mama, Menendez *et al.* (2005) e Wang *et al.* (2007) demonstraram resultados semelhantes. Estudos em animais realizados por Colas *et al.* (2004, 2005 e 2006) observaram resultados semelhantes tanto em quimioterapia quanto em radioterapia. Porém, estes autores verificaram que a adição concomitante de  $\alpha$ -tocoferol aboliu o efeito do DHA.

Bougnoux *et al.* (2009) investigou a segurança e a eficácia da suplementação oral de DHA em pacientes com câncer de mama metastático durante a quimioterapia e concluiu que a suplementação de DHA durante o tratamento quimioterápico pode melhorar o prognóstico de pacientes com câncer de mama metastático. De acordo com a revisão de literatura realizada por Bougnoux *et al.* (2010), os ácidos graxos n-3 podem melhorar a eficácia dos tratamentos oncológicos e o prognóstico de pacientes com câncer de mama sem adicional toxicidade.

**JUSTIFICATIVA**

---

### 3 JUSTIFICATIVA

---

O diagnóstico de câncer motiva os sobreviventes a modificar seu estilo de vida, incluindo exercícios e hábitos alimentares saudáveis (DEMARK-WAHNEFRIED *et al.*, 2005). Estudo realizado por Velentzis *et al.* (2011) observou que o consumo de suplementos foi altamente prevalente no pré-diagnóstico e aumentou de 58% para 62% após o diagnóstico de câncer de mama. Suplementos ricos em EPA e DHA, como óleo de fígado de bacalhau ou óleo de peixe, estavam entre os suplementos mais consumidos e que apresentaram aumento significativo após o diagnóstico. O desejo de ser curada, de evitar a progressão da doença, de “manter ou melhorar a saúde” em preparação para o tratamento oncológico são algumas das principais razões para o consumo de suplementos após o diagnóstico de câncer.

Conforme o referencial teórico abordado neste trabalho, apesar de resultados ainda inconsistentes, pacientes com câncer de mama podem apresentar função imune prejudicada, o que favoreceria a progressão do câncer. Também existe uma estreita relação entre câncer e inflamação, onde pacientes com câncer de mama apresentam elevada expressão de COX-2, altos níveis séricos de PGE<sub>2</sub> e citocinas pró-inflamatórias associados a um pior prognóstico. Por outro lado, estudos tem demonstrado que os ácidos graxos EPA e DHA apresentam propriedades imunomoduladoras e antiinflamatórias, sendo utilizados na prevenção e tratamento de diferentes patologias, incluindo o câncer. Contudo, os resultados ainda são contraditórios, necessitando de novos estudos.

Desta forma, justifica-se investigar se a suplementação com ácidos graxos EPA e DHA, em pacientes recém diagnosticadas com câncer de mama, modula a resposta imunológica e/ou inflamatória, o que seria uma maneira de modular fisiologicamente as funções do sistema imunitário pela suplementação nutricional e não medicamentosa em pacientes portadoras de câncer de mama.

***OBJETIVOS***

---

## 4. OBJETIVOS

---

### 4.1 Objetivo geral

Investigar o efeito da suplementação com EPA e DHA, nas subpopulações de linfócitos T, nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, proteína C-reativa e Prostaglandina E<sub>2</sub> em pacientes recém-diagnosticadas com câncer de mama,

### 4.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar o estado nutricional antes e após a intervenção dietética;
- ✓ Avaliar se a suplementação com ácido graxo n-3 modifica as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, a razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-6, proteína C-reativa e PGE<sub>2</sub> nestas pacientes;
- ✓ Investigar o efeito da suplementação com ácido graxo n-3 nos seguintes parâmetros bioquímicos: hemograma, colesterol total e frações, triglicerídeos, glicemia e albumina sérica;
- ✓ Estimar o perfil dos ácidos graxos consumidos pelas pacientes portadoras de câncer de mama antes e durante a suplementação dietética;
- ✓ Examinar o perfil dos ácidos graxos dos fosfolipídios plasmáticos das pacientes antes e durante a suplementação dietética como parâmetro de adesão e incorporação lipídica.

## ***MÉTODOS***

---

## **5. MÉTODOS**

---

### **5.1 Tipo de estudo**

Foi realizado um estudo de intervenção duplo cego, randomizado, controlado com placebo em pacientes recém-diagnosticadas com câncer de mama, atendidas nos Serviços de Mastologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e do Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF).

### **5.2 Aspectos éticos**

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília (projeto n° 072/09 - Anexo 2) e pelo Comitê de Ética da Secretaria de Saúde (projeto n° 383/2011- Anexo 2), conforme Resolução n° 196 e n° 251 do Conselho Nacional de Saúde.

Todas as participantes receberam informações detalhadas sobre os objetivos e a metodologia desta pesquisa, para posteriormente assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 3). Uma cópia desse documento foi entregue a paciente e outra foi adicionada à sua ficha de acompanhamento do estudo.

Este estudo foi submetido na base Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (REBEC) , requerimento número 1538.

### **5.3 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram selecionadas para o estudo pacientes que tinham idade entre 18 e 70 anos, que apresentaram imagem mamográfica com classificação a partir de BI-RADS 4C ou com diagnóstico confirmado por biópsia para câncer de mama, virgens de tratamento e com indicação cirúrgica como intervenção primária.

Como critérios de exclusão foram considerados presença de metástase ou recidiva, uso de marca-passo, doenças concomitantes que contraindicassem o uso do suplemento, doenças hematológicas ou outras alterações sanguíneas que repercutissem nos resultados laboratoriais, indicação de quimioterapia

neoadjuvante, impossibilidade de comunicação verbal e, do estudo de composição corporal, pacientes impossibilitadas de serem pesadas adequadamente ou que apresentassem edema importante de extremidades.

#### **5.4 Randomização**

A randomização 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 feito por terceira pessoa, sem envolvimento direto com a pesquisa, proveniente do Laboratório de Bioquímica da Nutrição que forneceu o suplemento já mascarado para a equipe da pesquisa. A sequência da randomização foi mantida em segredo desde a seleção do primeiro paciente até o encerramento da coleta de dados. As pacientes foram randomizadas para um dos dois grupos de intervenção: grupo óleo de peixe (GO) ou placebo (GP). Para auxiliar no cegamento os frascos de plástico que foram usados para acondicionamento das cápsulas foram tratados, colocando cápsulas de óleo de peixe e mantendo-as por 24 horas para conferir o odor característico à embalagem. Após este período, as cápsulas de óleo de peixe eram retiradas e no seu lugar, as cápsulas placebo eram colocadas.

#### **5.5 Intervenção Nutricional**

Pacientes do GO receberam diariamente 2 g de concentrado de óleo de peixe (MaxOmega®), divididas em 2 duas cápsulas de 1 g, consumidas junto às grandes refeições. As cápsulas foram fornecidas em frascos plásticos contendo 30 cápsulas por vez, identificadas apenas com a sequência de número das pacientes. O suplemento oferecido possuía 470 mg de EPA, 390 mg de DHA e um total de 1810 mg de ácido graxo n-3 por dia, de acordo com a informação técnica do produto fornecida pela empresa fabricante (Equateq Ltda). Por análise laboratorial, realizada em nosso laboratório, confirmou-se o conteúdo destes ácidos graxos conforme descrito pelo fabricante. As cápsulas de óleo de peixe também continham 0,32% (w/w) de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), como antioxidante. As pacientes do GP receberam 2g por dia de óleo mineral de mesma coloração que o suplemento, também divididas em 2 cápsulas de 1g e ingeridas no mesmo padrão de orientação. Todas as

pacientes receberam suplementação por 4 semanas durante o período anterior ao tratamento cirúrgico.



**Figura 7.** Frasco de armazenamento das cápsulas de óleo de peixe e óleo mineral (placebo) de mesmo aspecto, cor e tamanho.

A adesão ao tratamento foi promovida pelo contato telefônico com as pacientes e foi monitorada pela contagem das cápsulas devolvidas a cada encontro quinzenal e análise do perfil dos ácidos graxos dos fosfolípidios plasmáticos antes do início e ao final da intervenção.

## 5.6 Instrumentos e variáveis coletadas

Após a assinatura do TCLE, as pacientes eram agendadas para coleta de sangue em jejum no laboratório do HUB. Ao término da coleta estas eram encaminhadas ao ambulatório do HUB onde respondiam um questionário de avaliação socioeconômica cultural (Anexo 4), eram submetidas a avaliação antropométrica e a análise da composição corporal por meio de bioimpedância elétrica. Após as avaliações era oferecido um lanche para as pacientes.

A coleta de sangue e as avaliações foram realizadas antes e após 4 semanas de suplementação.

História clínica das pacientes foi obtida a partir de pesquisa em prontuários e de entrevista direta com as pacientes.

### 5.6.1 Variáveis antropométricas, composição corporal e ângulo de fase

#### 5.6.1.1 Peso e altura

O peso corporal e a altura foram aferidos em balança mecânica Filizola<sup>®</sup>, com capacidade de 200 kg, precisão de 100 g e estadiômetro de metal acoplado à balança, com 200 cm e precisão de 1 mm, utilizando técnica padronizada (LOHMAN *et al.*, 1998).

#### 5.6.1.2 Índice de massa corporal (IMC)

O IMC foi obtido pela divisão do peso (Kg) pelo quadrado da altura (m) e o resultado classificado de acordo com os pontos de corte recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998).

#### 5.6.1.3 Análise de impedância bioelétrica e ângulo de fase padronizado

A análise de impedância bioelétrica foi realizada com instrumento BIA Quantum II (RJL Systems), com frequência de 50 kHz, segundo técnica padronizada (KYLE *et al.*, 2004). Para realização do exame, foi solicitado: jejum de no mínimo quatro horas, evitar atividade física nas últimas doze horas e evitar consumir bebidas alcoólicas nas últimas 48 horas. Antes de iniciar o exame as pacientes esvaziavam a bexiga e ficavam em repouso por 5 a 10 minutos.

As medidas foram realizadas com a paciente deitada, na posição supina, com os braços e pernas aduzidas a 45 graus a partir do corpo e sem contato com qualquer estrutura de metal da maca hospitalar. Imediatamente, antes da colocação dos eletrodos, as áreas de contato foram limpas com álcool. Após este procedimento foi colocado dois eletrodos distais sobre a superfície dorsal da mão e do pé, próximos das articulações falange-metacarpo e falange-metatarso, respectivamente, e de dois eletrodos sobre a proeminência do pulso e entre o maléolo medial e lateral do tornozelo. O aparelho era ligado e eram registrados os valores de resistência (R) e reactância (Xc). Esse procedimento repetia-se por três vezes, sendo utilizada para

o registro e posterior análise, a média das três medições. Os valores foram anotados em formulário específico, para posterior cálculo do ângulo de fase (AF).

A partir do resultado de resistência (R) e de reactância (Xc), fornecidos pelo aparelho de bioimpedância, foi calculado o percentual de gordura corporal, o percentual de massa magra utilizando-se o software Body composition 2.1 RJL Systems<sup>®</sup>.

O AF foi obtido a partir da relação arco-tangente da reactância/resistência x  $180/\pi$ . Para transformar o resultado de radiano para graus ( $^{\circ}$ ), multiplicou-se o resultado obtido por  $180/\pi$  ou aproximadamente 57,3. Sua padronização foi realizada segundo Barbosa-Silva *et al.* (2005), sendo o valor do ângulo de fase padronizado (AFP) calculado por meio da equação: [(AF observado – AF médio para sexo e idade) / desvio padrão do AF para sexo e idade], onde um AFP < -1,65 d.p foi considerado desnutrição.

### 5.6.2 Consumo alimentar

Para avaliar o consumo alimentar recente, foram realizados 4 recordatórios de 24 horas (R24 h) baseados no método de múltiplas passagens (“Five-steps) proposto pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (CONWAY *et al.*, 2003) (Anexo 5). Foram realizados dois R24 h no início e dois ao final do período de suplementação.

Para fins deste estudo foram considerados os valores de consumo de energia total, carboidratos, proteínas, lipídios totais, colesterol, ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Foram também estimados os consumos individuais de alguns ácidos graxos poli-insaturados como o  $\alpha$ -linoleico (18:2 n-6), o linolênico (18:3 n-3), o araquidônico (20:4 n-6) o eicosapentaenoico (20:5 n-3) e docosaexaenóico (22:6 n-3).

O cálculo nutricional foi realizado no programa NUTWIN<sup>®</sup> (UNIFESP, 2005).

### 5.6.3 Variáveis Bioquímicas

Aproximadamente 25 ml de sangue foram coletados por flebotomia em vacutainers® identificados com informações sobre a participante como nome, número e data da coleta. Uma parte do sangue (8 ml) foi coletada sem anticoagulante e utilizada pelo laboratório de análises clínicas do HUB para as seguintes análises: Glicose sérica utilizando o método da Hexoquinase, Hemograma completo pelo sistema automatizado CELL-DYN 3500 com conferência em lâmina, Colesterol Total por meio de método enzimático segundo Trinder (1969) utilizando kit Colesterol COD-ANA da Labtest®, Colesterol HDL e Triglicerídeos segundo Jung, Biggs e Moorehead (1975) utilizando os kits colesterol HDL e triglicérides GPO-ANA da Labtest®, Albumina sérica dosada segundo metodologia de verde bromocresol usando o kit Albumina DOLES® e Proteína C-reativa (ultra sensível) pela técnica de Nefelometria.

O restante do sangue, contendo anticoagulante (EDTA), foi utilizado para fenotipagem da população de linfócitos, para posterior cálculo da razão CD8:CD4, dosagem de citocinas, prostaglandina E<sub>2</sub> e análise de ácidos graxos.

#### *5.6.4 Fenotipagem da população de linfócitos*

As células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) foram separadas por gradiente de densidade com Histopaque® - 1077 (Sigma- Aldrich), segundo protocolo do fabricante.

Inicialmente, o sangue foi centrifugado em temperatura ambiente por 10 minutos a 600 x g para separação do plasma. Em seguida, foram feitas alíquotas em microtubos estéreis de 1ml e 500 µL para posterior análise dos ácidos graxos, citocinas e prostaglandina E<sub>2</sub>, respectivamente. Estas foram armazenadas em freezer a -80° C até o momento das análises.

Para a separação das células foram utilizados 7,5 ml de Histopaque® em temperatura ambiente, para aproximadamente 15 ml de sangue total. Após centrifugação a 400 x g por 30 minutos em temperatura ambiente, foram formadas 4 fases: soro, células mononucleadas, Histopaque® e hemácias. As células monucleadas foram aspiradas e ressuspendidas em aproximadamente 10 ml de PBS (*Phosphate buffered saline solutions*). Após centrifugação a 250 x g por 10 minutos, em temperatura de 4° C, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 5 mL de PBS para nova lavagem. Ao término da segunda

lavagem, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 10 ml de meio de cultura (RPMI completo com 10% de soro fetal bovino - SFB). Depois de homogeneizada a amostra foi incubada por um período de 1 a 2 horas em temperatura de 37°C para aderência dos monócitos no fundo da garrafa de cultura. Após este período, o meio foi centrifugado a 350 x g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 500 µl de SFB puro e 500 µl de SFB com 20% de Dimetil sulfóxido (*Dimethyl sulfoxide*-DMSO) e congelado rapidamente a -80 °C.

Em análise posterior, foi realizada a marcação dos *clusters* CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Após descongelamento, a amostra foi lavada por 3 vezes e na última centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensionado em 1 ml de PBS Wash. Em seguida, as células foram quantificadas em *Trypan Blue* (diluição 10X) e o volume ajustado para se ter 5x10<sup>5</sup> células por poço da placa utilizada para marcação (em duplicata) dos *clusters* CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e controle sem marcação. Após o plaqueamento das células a placa foi centrifugada a 350 x g por 5 minutos à temperatura de 25°C. Em seguida, as células foram marcadas utilizando os marcadores de superfície PE mouse anti-human CD4 e CD8 (BD Biosciences, USA) na concentrações de 1:100 (1 µl de marcador para 99 µl de PBS Azida). A placa foi incubada protegida da luz, em geladeira, por 30 minutos. Ao término do período de incubação a placa foi lavada, o sobrenadante descartado e adicionado aos poços 500 µl de PBS Wash e a solução transferida para os tubos de citômetro para posterior leitura.

O citômetro de fluxo utilizado para leitura foi o FACSCalibur (BD Biosciences, San José, CA, USA). Foram adquiridos 20.000 eventos de cada amostra e as informações foram analisadas utilizando o software "FlowJo", versão 10.0 (Treestar Inc-USA).

#### 5.6.5 Dosagem de citocinas

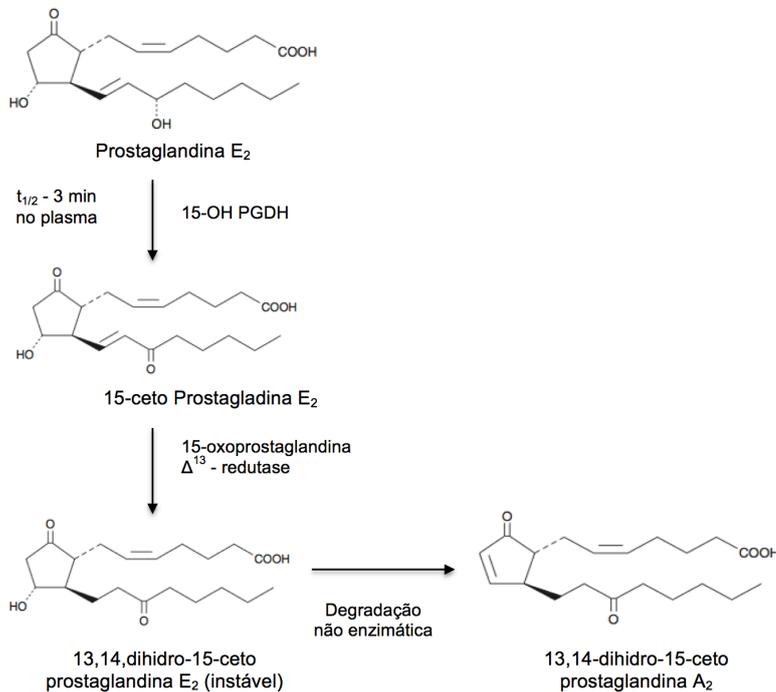
A quantificação das citocinas presentes no plasma das pacientes foi realizada pelo método de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA), utilizando os kits comerciais de IL-6, IL-1 beta e TNF alfa (eBIOSCIENCE, San Diego, USA) conforme as instruções do fabricante. Resumidamente as etapas foram as seguintes:

Inicialmente, as placas de captura com 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos específicos para cada citocina (100 µl/poço) na concentração indicada pelo fabricante. Esta etapa de sensibilização foi realizada “overnight” a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem (1 x PBS + 0,05% de Tween-20), deixando a solução por 1 minuto durante cada etapa de lavagem. Os poços foram bloqueados com 200 µl/poço de diluente de ensaio e as placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas por 5 vezes e então, incubadas “overnight” a 4°C com 100 µl/poço das amostras e 100 µl/poço dos padrões correspondentes a cada citocina. Novo ciclo de lavagem foi processado, seguindo-se a adição de 100 µl/poço do anticorpo de detecção conjugado com biotina, diluído segundo orientação do fabricante. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora. Seguindo novas lavagens, as placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente com 100 µl/poço de conjugado formado por estreptavidina marcada com peroxidase. Após sete lavagens foi adicionado 100 µl/poço do substrato tetrametilbenzina (TMB) e as placa incubadas por mais 15 minutos em temperatura ambiente. Para bloquear a reação foi utilizado 50 µl/poço de 2NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Após parar a reação, as placas foram lidas a 450nm de absorbâncias no leitor Spectramax M3 (Dispositivos Moleculares, San Jose, CA). As concentrações das citocinas séricas foram determinadas em pg/ml, utilizando as curvas-padrões previamente estabelecidas com quantidades conhecidas das citocinas: IL-6 (2 pg/ml – 200 pg/ml); IL-1 beta (4pg/ml – 500 pg/ml) e TNF alfa (4 pg/ml – 500 pg/ml).

#### 5.6.6 Dosagem de Prostaglandina E2 e Metabólitos

*In vivo* a PGE<sub>2</sub> é rapidamente convertida no seu metabólito 13,14-di-hidro-15-ceto (Figura 8) com mais de 90% da PGE<sub>2</sub> circulante eliminada por uma única passagem através dos pulmões (GILES & LEFF, 1988). Este metabolito não é quimicamente estável e é degradado em prostaglandina A<sub>2</sub>, por isso, o sangue, a urina ou outras amostras de animais ou seres humanos, muitas vezes contêm muito pouco PGE<sub>2</sub> intacta, e a mensuração dos metabólitos é necessário para fornecer uma estimativa confiável da produção real de PGE<sub>2</sub>. Assim, neste estudo a quantificação de prostaglandina E<sub>2</sub> e metabólitos foi realizada através do método ELISA por competição utilizando o kit comercial Prostaglandin E Metabolite EIA Kit

(Cayman Chemical Company, USA) que converte o 13,14 –di-hidro-15-ceto PGE<sub>2</sub> e 13,14-di-hidro-15-ceto PGA<sub>2</sub> em um único derivado estável que pode ser facilmente quantificado.



**Figura 8.** Metabolismo da Prostaglandina E<sub>2</sub>

Este ensaio baseia-se na competição entre o metabólito da prostaglandina E livre na amostra (MPGE) e um metabólito da prostaglandina E conjugado à acetilcolinesterase (marcador). O marcador liga-se ao anticorpo anti-IgG da placa pré-sensibilizada e após a adição do reagente de Ellman (composto por acetilcolina e ácido 5,5'-ditio-bis) a acetilcolina é degradada pela acetilcolinesterase produzindo tiocolina. A reação não enzimática da tiocolina com o ácido 5,5'-ditio-bis forma o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (Figura 9) que apresenta uma cor amarela distinta e tem uma forte absorbância a 412 nm. A intensidade desta cor, determinada espectotometricamente é proporcional à quantidade de marcador e é inversamente proporcional a concentração de MPGE livre na amostra. Assim, quanto maior a absorbância menor a quantidade de prostaglandina presente na amostra.

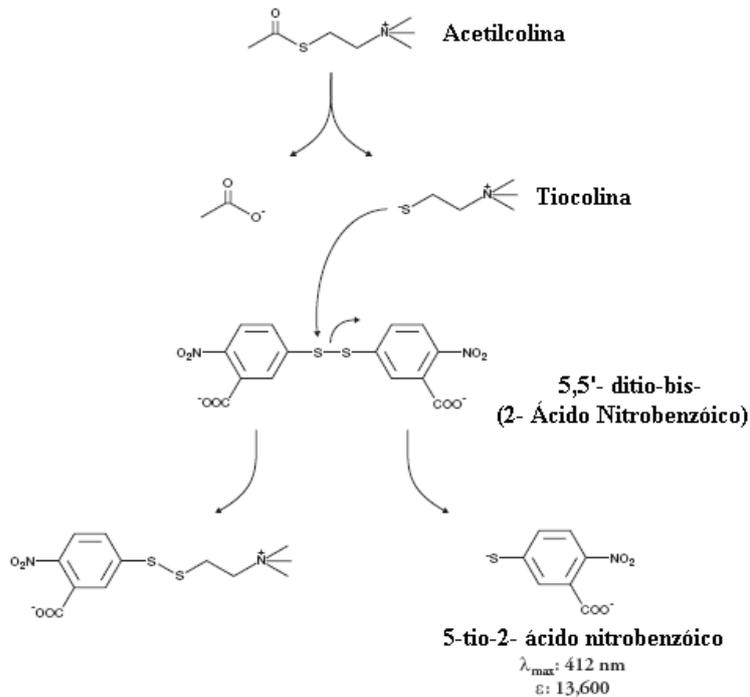


Figura 9. Reação catalizada pela acetilcolinesterase

Antes da realização do experimento as amostras foram purificadas pelo método de precipitação por acetona e posterior acidificação e extração com acetato de etila. Após a purificação as amostras foram derivatizadas durante a noite para assegurar que todos os metabólitos da PGE2 fossem derivados completamente.

O desenho da placa foi composto por dois poços brancos, dois de ligação não específica, dois de ligação máxima, dois de atividade total e uma curva padrão de oito pontos duplicados. Após a colocação das amostras e reagentes nos poços a placa foi selada e incubada durante 18 horas à temperatura ambiente. Ao término do período de incubação e lavagem da placa foi adicionado marcador aos poços de atividade total e reagente de Ellman aos demais poços. A placa foi novamente selada e incubada na ausência da luz em agitador por 90 minutos. A leitura da placa foi realizada no leitor Spectramax 190 em um comprimento de onda de 412 nm. A quantificação foi feita através de curvas-padrão, sendo o resultado convertido a pg/ml.

### 5.6.7 Análise de ácidos graxos do fosfolipídio do sangue

A extração dos ácidos graxos no plasma sanguíneo foi realizada de acordo com Folch, Less, Stanley (1957). A extração dos lipídios totais séricos, a partir de 1 ml da amostra, foi feita com 5 ml de solução clorofórmio-metanol 2:1 e a partir do total de lipídios extraídos, a fração fosfolipídica foi separada por cromatografia de camada delgada (CCD), com sistema de solventes: hexano: éter dietílico: ácido acético (80:20:2 v/v/v) de acordo com a metodologia de Christie (2003).

As bandas de fosfolipídios foram identificadas sob luz ultravioleta de acordo com o  $R_f$  (*retention front*) proposto por Henderson e Tocher (1992) para este sistema de solventes e os ácidos graxos dos fosfolipídios foram esterificados por metilação ácida segundo Christie (1987).

Após a esterificação, a amostra foi analisada por cromatografia gasosa, sendo utilizado o volume de injeção de 1 µl 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 100 m comprimento x 0,25mm de diâmetro interno (Supelco SP2560, Bellefonte, PA, EUA). A coluna de 100 metros foi utilizada por ser recomendada para a separação de isômeros trans (RATNAYAKE, 2004). O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio e os gases responsáveis pela manutenção da chama foi o oxigênio e o nitrogênio.

O detector do cromatógrafo é 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/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.

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises descritivas foram apresentados como percentuais, médias e desvio padrão. Os resultados basais foram analisados utilizando os testes Qui-quadro para as variáveis categóricas e Mann Whitney para as variáveis contínuas. Para verificar diferenças intra grupo, de acordo com a normalidade, foram utilizados os testes t-student pareado ou o teste de Wilcoxon. As diferenças entre grupos foram verificadas utilizando os testes t-student não pareado, Mann Whitney e Anova não paramétrica de dois fatores com medidas repetidas com grupo (óleo de peixe e placebo) como fator entre-indivíduos e tempo como fator intra-indivíduos (BRUNNER *et al.*, 2000; ROSA, 2001). Todos os testes foram bicaudais e o nível de significância foi valores de  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas usando o programa Microsoft Office Excell® 2011, o pacote estatístico SPSS para Mac versão 21.0 e o software Graphpad e Prism versão 5.0.

## ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 6.1. Artigo

Efeito da suplementação com óleo de peixe nas subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+, razão CD4+/CD8+, citocinas pró-inflamatórias e prostaglandina E<sub>2</sub> em pacientes portadoras de câncer de mama: estudo piloto randomizado duplo cego.

#### RESUMO

**Objetivo:** Este estudo teve como objetivo Investigar o efeito da suplementação com óleo de peixe, em pacientes recém diagnosticadas com câncer de mama, nas subpopulações de linfócitos, citocinas pró-inflamatórias, proteína C-reativa e Prostaglandina E<sub>2</sub>. **Metodologia:** Estudo de intervenção, randomizado, placebo controlado, duplo-cego, conduzido em pacientes com diagnóstico de câncer de mama, distribuídas em dois grupos (grupo óleo de peixe – GO e grupo placebo – GP). As pacientes do GO receberam diariamente 2 g de concentrado de óleo de peixe contendo 1,8 g de ácidos graxos n-3. O grupo placebo recebeu 2 cápsulas de 1 g 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 antropometria, composição corporal, consumo dietético e amostras sanguíneas para fenotipagem de linfócitos, exames laboratoriais (glicemia de jejum, albumina sérica, perfil lipídico), análise do perfil de ácidos graxos séricos e marcadores inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , proteína C-reativa e prostaglandina E<sub>2</sub>). A análise estatística foi realizada utilizando testes paramétricos e não paramétricos para comparar os resultados dos dois grupos. **Resultados:** O GO foi constituído de 18 pacientes e o GP 19. No início do estudo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto aos parâmetros socioeconômicos, antropométricos e clinicopatológicos. A maioria das pacientes apresentou carcinoma ductal infiltrante e 55,6% e 57,9% do GO e GP, respectivamente, apresentaram tumor HER2 negativo. Após a intervenção, no GO houve aumento significativo da quantidade de EPA (p=0,004), DHA (p=0,007) e total de ácidos graxos n3 (p=0,004) no fosfolípido plasmático. Observou-se redução da razão n6/n3 (p=0,002). No GO observou-se manutenção tanto da percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico como dos níveis séricos da proteína C-reativa, enquanto no GP houve redução da percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico e aumento da proteína C-reativa. Não houve mudanças significativas nos níveis séricos das citocinas pro-inflamatórias e da prostaglandina E<sub>2</sub>. **Conclusão:** A suplementação de 1,8g de ácidos graxos n-3 em pacientes recém-diagnosticadas com câncer de mama, durante 4 semanas, promoveu mudança significativa na composição dos ácidos graxos plasmáticos, manteve a percentagem das células T CD4<sup>+</sup> e os níveis séricos de PCR, sugestivo da sua ação benéfica no sistema imunológico.

**Palavras-chave:** câncer de mama, ácidos graxos n-3, óleo de peixe, imunonutrição, citocinas, ácido eicosapentaenóico (EPA).

## ABSTRACT

**Background:** This study aimed to investigate in patients with newly diagnosed breast cancer the effects of fish oil supplementation in lymphocytes subpopulation, proinflammatory cytokines, C-reactive protein (CRP) and prostaglandin E<sub>2</sub>. **Methodology:** A randomized, placebo controlled, double-blind clinical trial was conducted in patients diagnosed with breast cancer, divided into two groups (fish oil group - GO and placebo group - GP). The GO patients received 2 g/ day of fish oil concentrate containing 1.8g of n-3 fatty acids. The placebo group received two capsules/ day of 1 g of mineral oil with similar appearance to fish oil. All patients were supplemented for four weeks during the period prior to surgical treatment. Before and at the end of supplementation, we collected anthropometric, body composition and dietary intake data and blood samples for lymphocyte phenotyping, laboratory tests (fasting glucose, serum albumin, lipid profile), serum fatty acids analysis and inflammatory markers (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CRP and prostaglandin E<sub>2</sub>). Statistical analysis was performed using parametric and non-parametric tests to compare the results of both groups. Results: GO consisted of 18 patients and the GP 19. At baseline no significant differences were observed between the groups in terms of socioeconomic, anthropometric and clinicopathological parameters. Most of the patients had infiltrating ductal carcinoma and 55.6% and 57.9% of GO and GP, respectively, had negative HER2 tumor. After the intervention there was a significant increase in the amount of EPA ( $p = 0.004$ ), DHA ( $p = 0.007$ ) and the total of n3 fatty acids ( $p = 0.004$ ) in plasma phospholipid of the GO patients. There was a reduction in the n6/ n3 ratio ( $p = 0.002$ ). In GP patients there was a reduction in the percentage of peripheral blood CD4+ T lymphocytes counts and increased plasma C-reactive protein concentration. In GO patients The proportion of peripheral blood CD4 + T lymphocytes and serum of CRP levels were maintained. There were no significant changes in serum levels of proinflammatory cytokines and prostaglandin E<sub>2</sub>. **Conclusion:** Supplementation of treatment naïve breast cancer patients with 1.8 g/ day of n-3 fatty acids for 4 weeks caused a significant change in the composition of plasma fatty acids, kept the frequency of CD4+ T cells and serum CRP, suggestive of a beneficial effect of the supplement on patient's immune system.

Keywords: breast cancer, n-3 fatty acids, fish oil, immunonutrition, cytokines, eicosapentaenoic acid (EPA).

## Introdução

O câncer de mama é apontado como a neoplasia mais comum entre as mulheres em todo o mundo, atingindo 23% de todos os cânceres femininos (WCRF, 2007). Estima-se que a incidência mundial de câncer de mama feminino irá atingir cerca de 3,2 milhões de novos casos por ano até 2050 (HORTOBAGYI *et al* 2005). Esses números refletem a magnitude da incidência do câncer de mama e a necessidade urgente de medidas preventivas e terapêuticas.

A resposta imune (RI), principalmente a resposta mediada por células, desempenha importante papel na imunoedição tumoral (DUNN *et al.* 2004; BUI *et al.*, 2007). Células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> são os principais tipos de linfócitos envolvidos na RI mediada por células. É estabelecido que uma efetiva resposta imune anti-tumor requer o envolvimento de ambos os tipos de linfócitos, visto que as células T CD4<sup>+</sup> são críticas para geração de células T citotóxicas tumor-específicas assim como para a expansão de células T de memória (DUNN *et al.* 2004; SCHREIBER, *et al.*, 2011).

Tem sido demonstrado que pacientes com câncer de mama apresentam função imune mediada por células alterada quando comparadas com controles saudáveis (McCLUSKEY *et al.*, 1983). Em pacientes recém-dianosticadas, observaram-se menores frequências de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (McCLUSKEY *et al.*, 1983; WANG *et al.*, 2012) no sangue periférico dessas pacientes. Por outro lado, há estudos que observaram resultados contrários aos citados anteriormente (MURTA *et al.*, 2000; CAMPBELL *et al.*, 2005) ou ainda aqueles que não evidenciaram diferença entre pacientes e controles (WHITFORD *et al.*, 1992). Com relação à razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> tem sido demonstrado uma variação conforme o estadiamento clínico, sendo normal nos estadiamentos iniciais e reduzida na fase avançada da doença (McCLUSKEY *et al.*, 1983; SEVCÍKOVÁ *et al.*, 1992). Também tem sido observada redução na produção de citocinas Th1 e Th2 (CAMPBELL *et al.*, 2005).

Pacientes portadoras de câncer de mama, ainda nos estágios iniciais, apresentam níveis séricos aumentados das citocinas pro-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6 (LYON *et al.*, 2008; GOLDBERG *et al.*, 2010) e de PGE2 (FAWZY *et al.*, 2013) quando comparados com controles saudáveis. Níveis séricos aumentados dessas citocinas, assim como de PGE2, favorecem a sobrevivência do tumor por vários

mecanismos incluindo inibição de apoptose, indução da proliferação celular, aumento da motilidade e migração de células, estímulo da angiogênese e modulação das funções de diferentes populações de células do SI (ESQUIVEL-VALAZQUÉZ *et al.*, 2015). Estudos clínicos tem demonstrado redução nos níveis séricos de citocinas pro-inflamatórias e PGE<sub>2</sub> em pacientes com câncer suplementados com ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (MONTOVANI *et al.*, 2006; FINOCCHIARO *et al.*, 2012; FABER *et al.*, 2013, SÁNCHEZ-LARA *et al.*, 2014), enquanto outros estudos, como os realizados por Persson *et al.* (2005), Read *et al.* (2007) e Taylor *et al.* (2010) não observaram diferença.

Estudos experimentais têm observado que os ácidos graxos n-3 podem suprimir a formação e o desenvolvimento do câncer de mama (Menendez *et al.*, 2005; COLAS *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Em células de câncer de mama Menendez *et al.* (2005) e Wang *et al.* (2007) demonstraram que o DHA aumenta a sensibilidade dessas células para uma variedade de quimioterápicos. Em animais, resultados semelhantes foram observados tanto em quimioterapia quanto em radioterapia (COLAS *et al.*, 2005, 2006). Bougnoux *et al.* (2009) investigou a segurança e a eficácia da suplementação oral de DHA em pacientes com câncer de mama metastático durante a quimioterapia e concluiu que a suplementação de DHA durante o tratamento quimioterápico pode melhorar o prognóstico de pacientes com câncer de mama metastático.

Na literatura encontramos apenas um estudo que avaliou os efeitos da suplementação oral com óleo de peixe nas proporções de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de pacientes com câncer (GOGOS *et al.*, 1998). Sob nosso conhecimento, não há estudos randomizados duplo cego que tenham avaliado os efeitos da suplementação com óleo de peixe na resposta imune de pacientes recém diagnosticadas com câncer de mama, o que possibilita uma avaliação imunológica mais efetiva, sem os confundidores associados às terapias antineoplásicas. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar em pacientes recém diagnosticadas com câncer de mama os efeitos da suplementação com óleo de peixe, rico em ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, na razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, nos níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL1- $\beta$ , proteína C-reativa e Prostaglandina E<sub>2</sub>.

## **Materiais e métodos**

### *Tipo de estudo e população*

Foi conduzido um estudo randomizado, controlado, duplo cego, entre o período de fevereiro de 2012 e março de 2013, onde portadoras de câncer de mama atendidas nos Serviços de Mastologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e do Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF) foram convidadas a participar do estudo. Pacientes tinham idade entre 18 e 70 anos, apresentavam imagem mamográfica com classificação a partir do Breast Imaging-Reporting and Data System (BI-RADS) 4C ou diagnóstico positivo para câncer de mama, virgens de tratamento e com indicação cirúrgica como intervenção primária. Foram excluídas do estudo pacientes com doença metastática ou recidiva, doenças concomitantes que contraindicasse o uso do suplemento, doenças hematológicas ou outras alterações sanguíneas que repercutissem nos parâmetros laboratoriais estudados, com indicação de quimioterapia neoadjuvante, portadoras de marcapasso e, do estudo de composição corporal, aquelas impossibilitadas de serem pesadas adequadamente ou que apresentassem edema de extremidade importante.

### *Desenho do estudo*

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília (projeto n° 072/09) e Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde do Distrito Federal (projeto n° 383/2011) conforme Resolução n° 196 e n° 251 do Conselho Nacional de Saúde. O Termo de Consentimento Livre e esclarecido foi obtido de todas as pacientes antes de iniciar os procedimentos do estudo. As pacientes foram randomizadas para dois grupos de intervenção: grupo óleo de peixe (GO) ou placebo (GP). A randomização 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 feito por um técnico de laboratório, sem envolvimento direto com a pesquisa. A sequência da randomização foi mantida em segredo para as pacientes e equipe do projeto desde a seleção do primeiro paciente ao encerramento da coleta de dados

Antes e ao final da suplementação foi realizada coleta de sangue para as análises laboratoriais, avaliação antropométrica e análise da composição corporal por meio de bioimpedância elétrica. Para análise do consumo dietético foram realizados por telefone quatro recordatórios de 24 horas, sendo dois no início e dois ao final da suplementação.

### *Intervenção nutricional*

Pacientes do GO receberam diariamente 2 g de concentrado de óleo de peixe (MaxOmega®), divididas em 2 duas cápsulas de 1g, consumidas junto às grandes refeições. As cápsulas foram fornecidas em frascos plásticos contendo 30 cápsulas por vez, identificadas apenas com a sequência de número das pacientes. O suplemento oferecido possuía 470 mg de EPA, 390 mg de DHA e um total de 1810 mg de ácido graxo n-3 por dia, de acordo com a informação técnica do produto fornecida pela empresa fabricante. A análise laboratorial em nosso laboratório confirmou o conteúdo destes ácidos graxos (dados não apresentados). As cápsulas de óleo de peixe também continham 0,32% (w/w) de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) como antioxidante. Pacientes do GP receberam 2 g por dia de óleo mineral de mesma coloração do suplemento, também divididas em 2 cápsulas de 1 g e ingeridas nos mesmo critérios. Ao invés de mascarar o odor característico do óleo de peixe, neste estudo os frascos plásticos para as cápsulas de óleo mineral foram previamente tratados com cápsulas de óleo de peixe. Este procedimento acrescentou um aroma de óleo de peixe nos frascos de óleo mineral. Todas as pacientes receberam suplementação por 4 semanas durante o período anterior ao tratamento cirúrgico.

A adesão ao tratamento foi promovida pelo contato telefônico regular com as pacientes e foi monitorada pela contagem das cápsulas devolvidas a cada encontro quinzenal e análise do perfil dos ácidos graxos dos fosfolipídios plasmáticos antes do início e ao final da intervenção.

### *Estado nutricional e consumo dietético*

Para a avaliação antropométrica o peso e altura foram aferidos em balança Toledo digital, com capacidade de 200 Kg, precisão de 100 gramas e estadiômetro

de metal acoplado à balança, com 200 cm e precisão de 1 mm, utilizando técnica padronizada (LOHMAN *et al.*, 1998). O indicador de estado nutricional índice de massa corporal (IMC) foi obtido pela divisão do peso (Kg) pelo quadrado da altura (m) e o resultado classificado de acordo com os pontos de corte recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998).

A análise de impedância bioelétrica foi realizada com instrumento BIA Quantum II (RJL Systems), com frequência de 50 Khz, segundo técnica padronizada (KYLE *et al.*, 2004). O ângulo de fase (AF) foi obtido a partir da relação arcotangente da reactância/resistência  $\times 180/\pi$ . Para transformar o resultado de radiano para graus ( $^{\circ}$ ), multiplicou-se o resultado obtido por  $180/\pi$  ou aproximadamente 57,3. A padronização do AF foi realizada segundo Barbosa-Silva *et al.* (2005).

O consumo alimentar foi avaliado por meio de recordatório de 24 horas utilizando o método de múltiplas passagens proposto pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA) (CONWAY *et al.*, 2003).

#### *Coleta e preparo do sangue*

Amostras de sangue, em jejum de aproximadamente 12 horas, foram coletadas por flebotomia em *vacutainers*® por profissionais capacitados. Dos 25 ml de sangue coletados, 8 ml foram utilizados pelo laboratório de análises clínicas do HUB para as seguintes análises: glicose sérica (método da Hexoquinase), hemograma completo (sistema automatizado CELL-DYN 3500 com conferência em lâmina), colesterol total (Kit Colesterol COD-ANA da Labtest®), colesterol HDL (Kit Colesterol HDL da Labtest®), triglicerídeos (Kit Triglicerídeos GPO-ANA da Labtest®), albumina sérica (Kit Albumina da DOLES®) e proteína C-reativa ultrasensível (técnica de nefelometria). O restante do sangue, coletado em tubos com EDTA, foi utilizado para fenotipagem da população de linfócitos, dosagem de citocinas, prostaglandina E<sub>2</sub> e análise de ácidos graxos.

Para separação do plasma, o sangue foi centrifugado a 600 x g por 10 minutos a temperatura aproximada de 4° C, e alíquotas de 1 ml e 500 µl de plasma foram armazenadas a -80° C até o momento das análises

#### *Fenotipagem de linfócitos*

As células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) foram separadas por gradiente de densidade com Histopaque<sup>®</sup> - 1077 (Sigma- Aldrich), segundo protocolo do fabricante.

Linfócitos foram suspensos em solução salina tamponada com fosfato a uma concentração de  $5 \times 10^5$  células/poços. Para a determinação da percentagem de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram utilizados os marcadores de superfície PE mouse anti-human CD4 e CD8 (BD Biosciences, USA).

As análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com CellQuest (BD Biosciences, USA). Foram adquiridos 20.000 eventos de cada amostra e os resultados foram analisadas utilizando o software Flowjo, versão 10.0 (Treestar Inc-USA).

#### *Citocinas proinflamatórias*

A quantificação das citocinas presentes no plasma das pacientes foi realizada pelo método de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), utilizando os kits comerciais de IL-6, IL-1 beta e TNF alfa (eBIOSCIENCE, San Diego, USA). Os protocolos utilizados seguiram as instruções do fabricante. As concentrações das citocinas séricas foram determinadas em pg/ml, utilizando as curvas-padrões previamente estabelecidas com quantidades conhecidas das citocinas: IL-6 (2 pg/ml – 200 pg/ml); IL-1 beta (4pg/ml – 500 pg/ml) e TNF alfa (4 pg/ml – 500 pg/ml).

#### *Prostaglandina E<sub>2</sub> e metabólitos*

A quantificação de prostaglandina E<sub>2</sub> e metabólitos foi realizada através do método ELISA por competição utilizando o kit comercial Prostaglandin E Metabolite EIA Kit (Cayman Chemical Company, USA) e os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

#### *Perfil dos Ácidos graxos plasmáticos*

A extração de lipídios totais séricos foi realizada de acordo com Folch, Less, Stanley (1957). Os fosfolipídios foram separados por cromatografia em camada delgada (CCD), com sistema de solventes: hexano: éter dietílico: ácido acético

(80:20:2 v/v/v) de acordo com a metodologia de Christie (2003). Os ácidos graxos dos fosfolipídios foram esterificados por metilação ácida segundo Christie (1987) e analisados por cromatografia a gás (modelo GC 17 A – Shimadzu), sendo a separação feita em coluna capilar flexível de sílica com dimensão de 100 mm comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno (Supelco SP2560, Bellefonte, PA, EUA). Os ácidos graxos foram identificados pelo tempo de retenção de padrões externos de ácidos graxos (Sigma<sup>®</sup>). Os resultados foram expressos em percentual de área de detecção do ácido graxo em relação à área total dos ácidos graxos identificados nos cromatogramas.

### *Análise estatística*

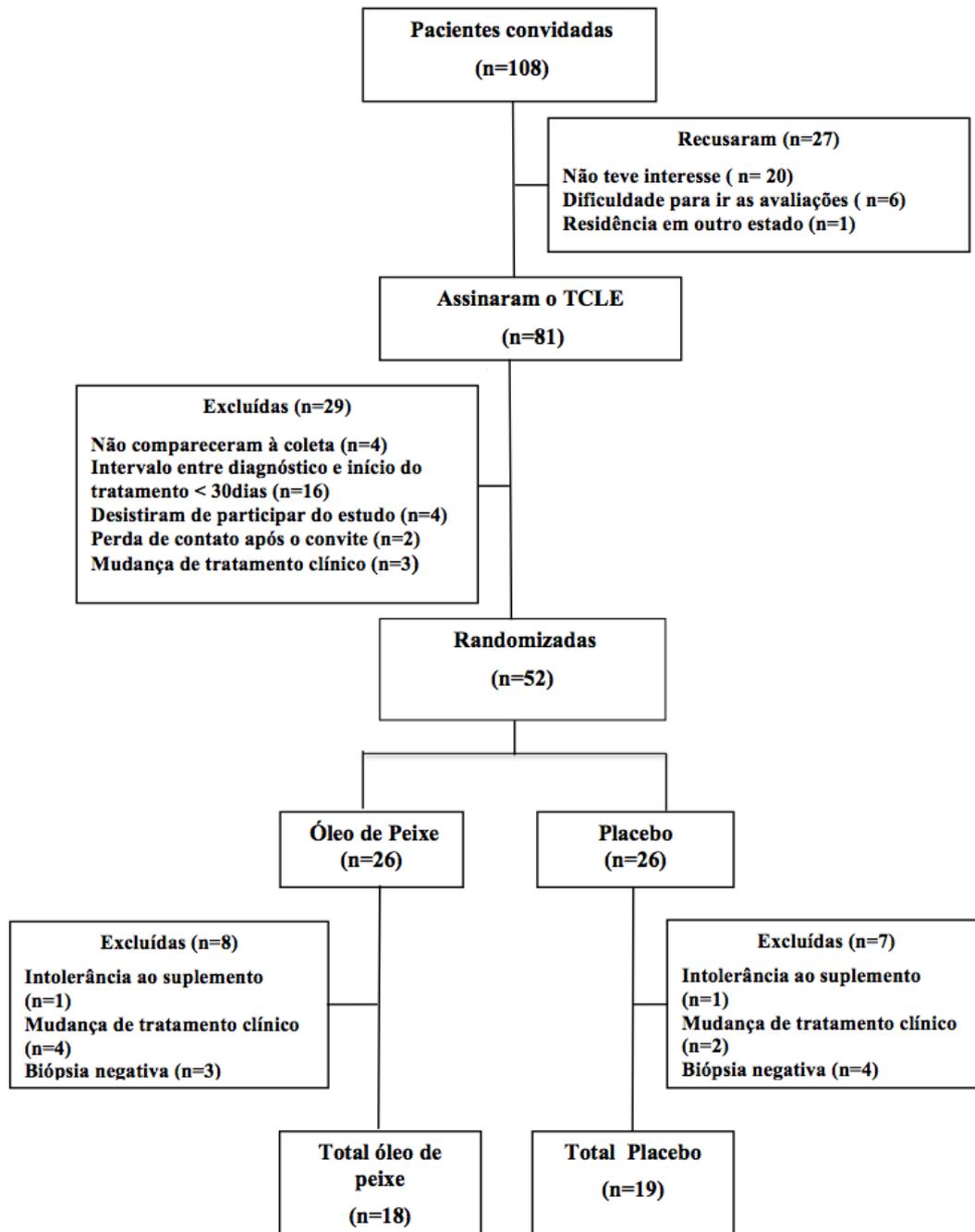
Os resultados das análises descritivas foram apresentados como percentuais, médias e desvio padrão. Os resultados basais foram analisados utilizando os testes Qui-quadro para as variáveis categóricas e Mann Whitney para as variáveis contínuas. Para verificar diferenças intra grupo, de acordo com a normalidade, foram utilizados os testes t-student pareado ou o teste de Wilcoxon. As diferenças entre grupos foram verificadas utilizando os testes t-student não pareado, Mann Whitney e Anova não paramétrica de dois fatores com medidas repetidas com grupo (óleo de peixe e placebo) como fator entre-indivíduos e tempo como fator intra-indivíduos (BRUNNER *et al.*, 2000; ROSA, 2001). Todos os testes foram bicaudais e o nível de significância foi valores de  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas usando o programa Microsoft Office Excell<sup>®</sup> 2011, o pacote estatístico SPSS para Mac versão 21.0 e o software Graphpad e Prism versão 5.0.

## **Resultados**

### *População do estudo*

Cento e oito pacientes foram convidadas a participar do estudo (Figura 1). Destas, 81 (75%) aceitaram o convite. Vinte e nove pacientes não foram incluídas devido ao não comparecimento para coleta de dados (n=4), apresentar um intervalo menor que 30 dias entre o diagnóstico e o procedimento cirúrgico (n=16), desistência de participar do estudo (n=4), perda de contato após a assinatura do

TCLE (n=2) e por mudança no tratamento clínico (n=3). Assim, 52 pacientes foram randomizadas. Após o início da suplementação 8 pacientes descontinuaram (2 por intolerância ao suplemento e 6 por mudança no tratamento clínico) e 7 apresentaram resultado de biópsia negativo para câncer de mama. Desta forma, 37 pacientes completaram o estudo, onde 18 receberam suplementação com óleo peixe e 19 placebo.



**Figura 1.** Fluxograma da seleção e randomização das pacientes

### Características iniciais

As características sócio-demográficas e clinicopatológicas das pacientes no início do estudo podem ser observadas na tabela 1. Não houve diferença significativa entre os grupos GO e GP com relação a essas variáveis.

**Tabela 1.** Características sócio-demográficas e clinicopatológicas das pacientes com randomizadas de acordo com o grupo de estudo

	Grupos		<i>p</i> <sup>1</sup>
	Óleo de Peixe (n = 18)	Placebo (n = 19)	
<b>Idade (anos)*</b>	48 ± 9	53 ± 7	0,107
<b>Menopausa % (n)</b>			
Não	50,0 (9)	26,3 (5)	0,138
Sim	50,0 (9)	73,7 (14)	
<b>Tipo Histopatológico % (n)</b>			
CDIS <sup>2</sup>	22,2 (4)	5,3 (1)	0,444
CDI <sup>3</sup>	50,0 (9)	73,7 (14)	
CDI + CDIS	5,6 (1)	5,3 (1)	
Sem informação	22,2 (4)	15,8 (3)	
<b>Classificação TNM<sup>4</sup> % (n)</b>			
0 - II	66,7 (12)	47,4 (9)	0,531
III - IV	27,8 (5)	42,1 (8)	
s/ informação	5,6 (1)	10,5 (2)	
<b>RE<sup>5</sup> % (n)</b>			
RE+	77,8 (14)	68,4 (13)	1,000
RE-	11,1 (2)	15,8 (3)	
Sem informação	11,1 (2)	15,8 (3)	
<b>RP<sup>6</sup> % (n)</b>			
RP+	66,7 (12)	52,6 (10)	0,720
RP-	22,2 (4)	31,6 (6)	
Sem informação	11,1 (2)	15,8 (3)	
<b>HER2<sup>7</sup> % (n)</b>			
HER2+	33,3 (6)	26,3 (5)	1,000
HER2-	55,6 (10)	57,9 (11)	
s/ informação	11,1 (2)	15,8 (3)	

\* Média ± desvio padrão,<sup>1</sup> Teste Mann-Whitney para idade e qui-quadrado para as demais variáveis,<sup>2</sup>CDIS, carcinoma ductal *in situ*; <sup>3</sup>CDI, carcinoma ductal infiltrante; <sup>4</sup>TNM, tumor, nódulo, metástase; <sup>5</sup>RE, receptor de estrogênio; <sup>6</sup>RP, receptor de progesterona; <sup>7</sup>HER2, receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2.

No GP observou-se um maior percentual de mulheres em menopausa. Tanto no GO como no GP a maioria das pacientes apresentou carcinoma ductal infiltrante, estadiamento clínico 0/I/II, receptores positivos para estrogênio (RE) e progesterona (RP) e negativo para receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2).

De acordo com a classificação do IMC, no GO 27% das mulheres apresentavam-se eutróficas, 38 % em sobrepeso e 33% em obesidade. No GP esses valores foram 26%, 47% e 26% respectivamente. A mediana do ângulo fase padronizado (AFP) foi -0,66 (IIQ= -1,29; -0,25) no grupo óleo de peixe e -1,22 (IIQ= -1,65; -0,65) no grupo placebo, sendo a diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,032$ ).

Entre as variáveis do consumo dietético, no momento basal, não observou-se diferença significativa entre os grupos com relação aos nutrientes analisados. O consumo diário dos ácidos graxos EPA e DHA apresentou-se baixo nos dois grupos, sendo a mediana do EPA e do DHA no óleo de peixe 0,005 g/dia (IIQ= 0,000; 0,007) e 0,020 g/dia (IIQ= 0,002; 0,052), respectivamente, e no grupo placebo 0,005g/dia (IIQ= 0,000; 0,010) e 0,025 g/dia (IIQ= 0,010; 0,030), respectivamente, sem diferença entre os grupos.

A composição basal dos ácidos graxos dos fosfolípidios plasmáticos pode ser visualizada na tabela 3. O GO apresentou percentagem significativamente menor de ácido oleico ( $p=0,027$ ) e uma maior razão 18.0/18.1 ( $p=0,022$ ) quando comparado com o GP. O percentual dos demais ácidos graxos analisados foi semelhante nos grupos estudados.

Não houve diferença significativa entre os grupos com relação à percentagem e razão dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no sangue periférico, níveis séricos de citocinas pro-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL1-  $\beta$ ), prostaglandina E<sub>2</sub> e proteína C-reativa. Com exceção dos valores dos monócitos, que foi significativamente menor no GO em comparação ao GP, mediana igual a 6,30 % (IIQ= 3,85; 7,27) e 7,50% (IIQ= 6,60; 8,50), respectivamente ( $p=0,013$ ), os demais parâmetros do hemograma, assim como os exames de glicose sérica, colesterol total e frações, albumina sérica também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos GO e GP no início do estudo.

**TABELA 2: Indicadores do estado nutricional e consumo dietético no início e ao final da suplementação em pacientes com câncer de mama de acordo com os grupos de estudo.**

	Grupo óleo de peixe (n=18)			$P^2$	Grupo placebo (n=19)			$P^2$	$P^3$
	Inicial Mediana (IIQ) <sup>1</sup>	Final Mediana (IIQ)	Intra grupo		Inicial Mediana (IIQ)	Final Mediana (IIQ)	Intra grupo		
<b>Estado Nutricional</b>									
Peso (kg)	67,35 (62,00; 74,10)	67,55 (62,80; 77,65)	0,078	66,60 (57,7; 73,2)	67,55 (57,55; 71,75)	0,776	0,079		
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>3</sup>	27,02 (23,77; 32,02)	27,15 (23,63; 32,56)	0,078	26,66 (24,91; 30,24)	26,33 (24,84; 29,65)	0,723	0,101		
Massa magra (kg)	45,50 (39,62; 38,92)	41,05 (45,07; 43,27)	0,170	45,50 (34,80; 44,00)	40,40 (34,85; 43,80)	0,660	0,406		
Massa gorda (kg)	26,30 (19,57; 33,02)	26,80 (21,90; 34,60)	0,029	26,50 (21,60; 30,20)	24,30 (22,10; 29,80)	0,977	0,101		
% de gordura corporal	37,70 (28,17; 44,97)	38,10 (33,20; 46,00)	0,149	38,90 (37,00; 43,80)	39,40 (35,9; 42,05)	0,820	0,298		
AFP <sup>5</sup>	-0,66 (-1,29; -0,25)	-0,72 (-1,19; 0,11)	0,513	-1,22 (-1,65; -0,65)	-1,14 (-1,63; -0,78)	0,394	0,492		
<b>Consumo</b>									
Energia (kcal)	1451 (1052; 1755)	1226 (1011; 1629)	0,124	1162 (991; 1500)	1289 (1186; 1480)	0,520	0,038		
Kcal/kg	21 (16; 27)	17 (14; 24)	0,173	20 (14; 22)	20 (16; 23)	0,877	0,259		
Carboidratos (g)	172 (128; 260)	155 (118; 235)	0,148	14 (133; 186)	171 (118; 226)	0,557	0,200		
Proteínas (g)	64 (48; 80)	47 (42; 60)	0,124	51 (44; 68)	62 (47; 81)	0,184	0,010		
Lipídios	45 (34; 66)	42 (37; 51)	0,124	42 (33; 53)	38 (27; 53)	0,546	0,686		
<b>Ácidos graxos (g)</b>									
Saturados	11,11 (7,62; 15,79)	9,4 (8,10; 13,52)	0,163	8,99 (7,55; 13,41)	9,46 (6,77; 13,56)	0,936	0,536		
Monoinsaturados	11,69 (9,11; 19,31)	10,93 (7,53; 13,78)	0,039	10,51 (8,66; 14,77)	9,45 (6,98; 15,0)	0,673	0,747		
Poliinsaturados	9,45 (7,42; 11,57)	8,16 (7,22; 10,68)	0,163	9,00 (7,11; 10,63)	8,00 (6,56; 10,05)	0,376	0,752		
16:0 (palmítico)	6,34 (4,69; 9,76)	5,38 (3,94; 7,02)	0,013	5,37 (4,58; 7,68)	5,23 (3,96; 7,53)	0,809	0,449		
18:0 (esteárico)	2,68 (1,95; 4,66)	2,46 (1,57; 3,48)	0,019	2,14 (1,81; 3,33)	2,22 (1,64; 3,85)	1,000	0,489		
18:1n-9 (oleico)	10,76 (8,47; 17,80)	10,12 (7,06; 12,74)	0,049	9,52 (7,79; 13,69)	8,59 (6,39; 14,69)	0,629	0,838		
18:2 n-6 (linoleico)	7,88 (6,93; 9,96)	7,05 (6,33; 9,71)	0,177	7,95 (6,12; 9,37)	7,06 (5,6; 8,58)	0,243	0,842		
18:3 (linolênico)	0,96 (0,76; 1,17)	0,87 (0,79; 1,19)	0,981	0,86 (0,65; 0,86)	0,83 (0,57; 0,97)	0,794	0,776		
20:4n-6 (Araquidônico)	0,10 (0,47; 0,17)	0,07 (0,54; 0,11)	0,163	0,09 (0,05; 0,12)	0,09 (0,06; 0,192)	0,162	0,165		
20:5n-3 (EPA) <sup>6</sup>	0,005 (0,000; 0,007)	0,005 (0,000; 0,010)	0,633	0,005 (0,000; 0,010)	0,005 (0,000; 0,015)	0,395	0,334		
22:6n-3 (DHA) <sup>7</sup>	0,020 (0,002; 0,052)	0,020 (0,005; 0,032)	0,162	0,025 (0,010; 0,030)	0,015 (0,000; 0,065)	0,139	0,295		
Total AG n-3	1,04 (0,76; 1,31)	0,89 (0,82; 1,2)	0,850	0,89 (0,68; 1,10)	0,86 (0,65; 1,04)	0,831	0,711		
Total AG n-6	8,37 (7,13; 10,23)	7,20 (6,40; 9,77)	0,201	8,05 (6,22; 9,43)	7,08 (5,29; 8,42)	0,163	0,850		
Razão n-6/n-3	8,33 (5,87; 9,76)	7,87 (7,44; 8,82)	0,723	8,37 (7,33; 10,1)	7,27 (6,71; 10,55)	0,381	0,175		
Razão 18:0/18:1	0,23 (0,21; 0,28)	0,23 (0,20; 0,27)	0,554	0,25 (0,23; 0,27)	0,26 (0,22; 0,28)	0,469	0,387		

<sup>1</sup> IIQ, intervalos interquartis; <sup>2</sup> Diferenças intra grupo segundo teste não paramétrico de Wilcoxon; <sup>3</sup> Teste da interação da anova não-paramétrica de dois fatores com medidas repetidas para verificar a significância da diferença entre os grupos óleo de peixe e óleo mineral; <sup>4</sup> IMC, índice de massa corporal; <sup>5</sup> AFP, ângulo de fase padronizado; <sup>6</sup> EPA, ácido eicosapentaenoico; <sup>7</sup> DHA, ácido docosahexaenoico;

**TABELA 3: Perfil dos ácidos graxos no sangue e parâmetros bioquímicos no início e ao final da suplementação em pacientes com câncer de mama de acordo com os grupos de estudo.**

	Grupo óleo de peixe (n=18)		P <sup>2</sup>	Grupo óleo mineral (n=19)		P <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
	Inicial Mediana (IIQ) <sup>1</sup>	Final Mediana (IIQ)	Intra grupo	Inicial Mediana (IIQ)	Final Mediana (IIQ)	Intra grupo	Entre grupos
<b>AG no sangue</b>							
16:0 (palmítico)	29,90 (24,61; 35,12)	30,42 (23,69; 34,78)	0,356	25,01 (22,16; 31,36)	25,74 (22,76; 29,64)	0,717	0,824
18:0 (esteárico)	16,81 (15,31; 17,42)	17,45 (15,79; 18,62)	0,356	15,33 (13,77; 18,51)	15,99 (12,97; 17,16)	0,841	0,409
18:1n-9 (oleico)	4,32 (3,59; 5,26)	4,44 (3,72; 5,88)	0,943	5,29 (4,55; 6,52)	5,11 (4,46; 6,53)	0,629	0,525
20:4n-6 (araquidônico)	8,81 (7,35; 10,98)	8,23 (6,04; 10,28)	0,124	10,05 (7,95; 14,02)	11,17 (8,59; 12,64)	0,984	0,284
20:5n-3 (EPA) <sup>4</sup>	0,49 (0,11; 0,81)	1,52 (0,91; 2,13)	0,004	0,35 (0,00; 0,82)	0,56 (0,00; 1,23)	0,293	0,034
22:6n-3 (DHA) <sup>5</sup>	2,55 (1,94; 3,68)	4,60 (3,46; 6,22)	0,007	3,14 (2,18; 5,07)	3,88 (2,08; 4,92)	0,904	0,000
Total AG n-3	3,32 (2,47; 4,93)	6,51 (4,30; 8,72)	0,004	3,73 (2,69; 5,95)	4,11 (2,90; 5,90)	0,952	0,005
Total AG n-6	25,01 (19,16; 30,22)	23,06 (19,15; 29,52)	0,554	31,6 (22,6; 32,44)	30,07 (24,11; 33,99)	0,702	0,246
Razão n-6:n-3	7,78 (5,36; 9,77)	3,86 (3,03; 4,72)	0,002	7,00 (4,58; 11,11)	6,87 (4,43; 8,82)	0,904	0,012
Razão 18:0/18:1	3,84 (2,93; 5,23)	3,98 (2,85; 5,50)	0,653	3,03 (2,08; 3,44)	2,91 (2,28; 3,59)	0,920	0,811
<b>Bioquímicos</b>							
Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> )	4,75 (4,57; 5,10)	4,70 (4,50; 4,90)	0,254	4,70 (4,40; 5,20)	4,70 (4,45; 4,90)	0,493	0,941
Hemoglobina (g/dl)	14,0 (12,85; 15,25)	13,70 (13,00; 14,70)	0,069	14,00 (13,10; 14,90)	13,80 (13,05; 14,40)	0,623	0,426
Hematócrito (%)	41,75 (38,32; 45,72)	41,10 (39,10; 43,60)	0,139	42,20 (38,60; 44,00)	41,60 (39,05; 43,60)	0,877	0,785
Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	6405 (5342; 7950)	6910 (5105; 7750)	0,795	5220 (4150; 6700)	5780 (5265; 6590)	0,653	0,521
Linfócitos (%)	31,40 (28,92; 36,32)	31,90 (26,70; 40,70)	0,266	35,70 (28,30; 38,40)	30,10 (28,05; 36,45)	0,177	0,388
Monócitos (%)	6,30 (3,85; 7,27)	6,60 (5,00; 7,60)	0,507	7,50 (6,60; 8,50)	6,70 (6,50; 8,70)	0,330	0,277
Plaquetas (mil/mm <sup>3</sup> )	281,00 (215,25; 307,75)	259,00 (220,00; 291,00)	0,523	246,00 (193,00; 282,00)	241,00 (212,00; 278,50)	0,492	0,456
Albumina (g/dl)	4,40 (4,15; 4,50)	4,20 (4,10; 4,47)	0,153	4,30 (4,20; 4,50)	4,30 (4,07; 4,42)	0,319	0,818
Glicose (ml/dl)	95,00 (87,00; 103,25)	91,00 (83,25; 101,50)	0,351	90,00 (84,00; 98,00)	92,50 (84,75; 98,25)	0,410	0,126
Colesterol total (mg/dl)	218,00 (194,5; 258,50)	217,00 (194,50; 254,50)	0,758	211,00 (196,00; 247,00)	208,50 (183,50; 241,50)	0,185	0,414
HDL (mg/dl)	45,00 (39,50; 50,25)	44,00 (38,00; 48,50)	0,476	46,00 (41,00; 50,00)	47,00 (40,50; 54,75)	0,905	0,689
LDL (mg/dl)	141,00 (118,75; 176,75)	146,00 (122,00; 176,00)	0,518	145,00 (121,00; 169,00)	140,50 (112,00; 157,25)	0,138	0,182
VLDL (mg/dl)	32,50 (18,00; 40,00)	29,00 (20,00; 38,00)	0,442	25,00 (15,00; 33,00)	21,00 (16,25; 29,50)	0,663	0,840
Triglicerídeos (mg/dl)	160,00 (90,75; 199,50)	146,00 (98,00; 191,50)	0,421	125,00 (75,00; 165,00)	105,00 (80,00; 146,75)	0,679	0,887

<sup>1</sup> IIQ, intervalos interquartis; <sup>2</sup>Diferenças intra grupo segundo teste não paramétrico de Wilcoxon; <sup>3</sup>Teste da interação da anova não-paramétrica de dois fatores com medidas repetidas para verificar a significância da diferença entre os grupos óleo de peixe e óleo mineral; <sup>4</sup> EPA, ácido eicosapentaenoico; <sup>5</sup>DHA, ácido docosahexaenóico.

## Tolerabilidade

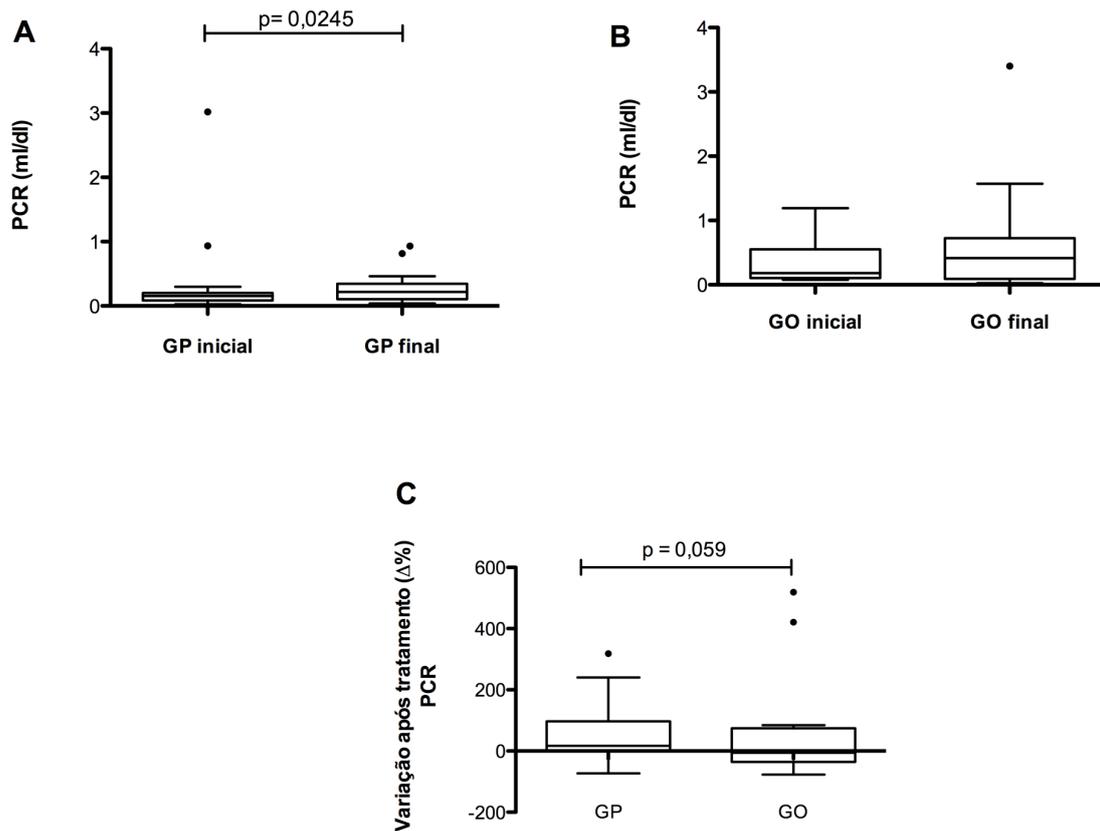
Dentre as pacientes que concluíram o estudo, 55% e 47 % das pacientes do GO e GP, respectivamente, relataram efeitos colaterais, como enjoos, náuseas, eructações frequentes, aumento da frequência intestinal, pirose e plenitude gástrica. Contudo, não observou-se diferença entre os grupos quanto à presença ou ausência de sintomas ( $p = 0,616$ ). Apesar dos efeitos colaterais relatados, 92% e 93% das cápsulas prescritas foram consumidas no GO e no GP, respectivamente, o que foi considerado boa adesão ao tratamento.

Ao final da suplementação, as pacientes do grupo GO apresentaram ganho significativo de massa gorda ( $p=0,029$ ), porém, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos com relação aos parâmetros antropométricos analisados. O consumo de macro nutrientes não apresentou diferença intra grupos, tanto no GP, quanto no GO, porém, observou-se diferença entre os grupos com relação ao consumo de energia (kcal) ( $p=0,038$ ) e proteínas (g) ( $p=0,010$ ). O consumo dos ácidos graxos monoinsaturados, palmítico, esteárico e oleico reduziu significativamente no GO, porém, não houve diferença entre os grupos. O Consumo alimentar de EPA, DHA e o total de AG n-3 nos dois grupos estudados não demonstrou diferença intra e entre os grupos após a suplementação (Tabela 2).

No GO houve aumento significativo nos níveis séricos de EPA ( $p=0,004$ ), DHA ( $p=0,007$ ), total de ácido graxo n-3 ( $p=0,004$ ) e da razão n-6:n-3 ( $p=0,002$ ), sendo a diferença significativa entre os grupos ( $p=0,034$ ,  $p<0,001$ ,  $p=0,005$  e  $p=0,012$ , respectivamente) (Tabela 3).

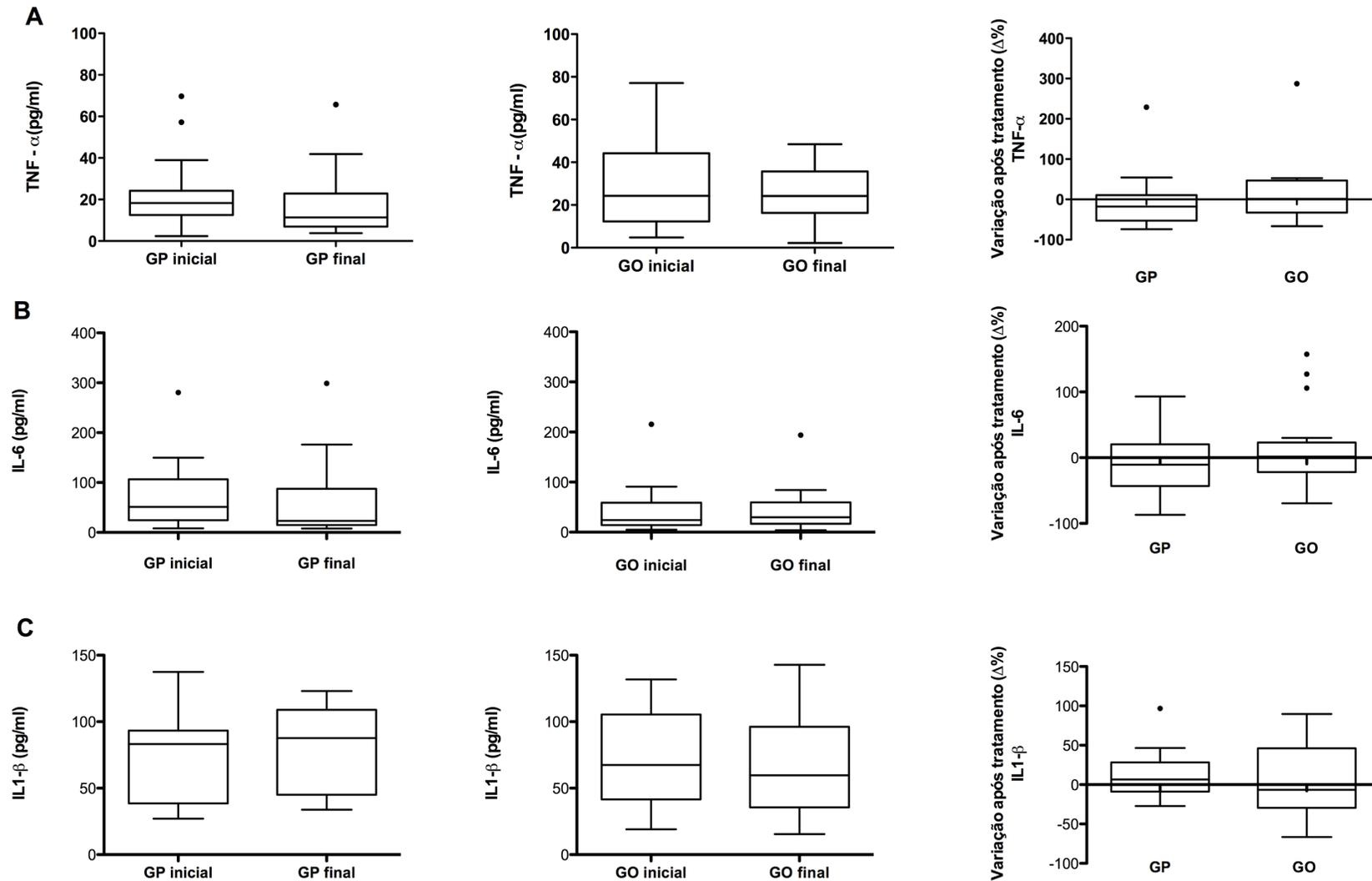
Com relação à resposta de fase aguda, nenhuma mudança significativa foi observada no GO, enquanto no GP houve aumento significativo da proteína C-reativa ( $p=0,0245$ ). A variação após o tratamento ( $\Delta\%$ ), dentro do limite da significância, foi diferente entre os grupos (Figura 2).

Tanto no GP como no GO não observou-se mudanças significativas nos níveis séricos das citocinas próinflamatórias avaliadas (Figura 3).

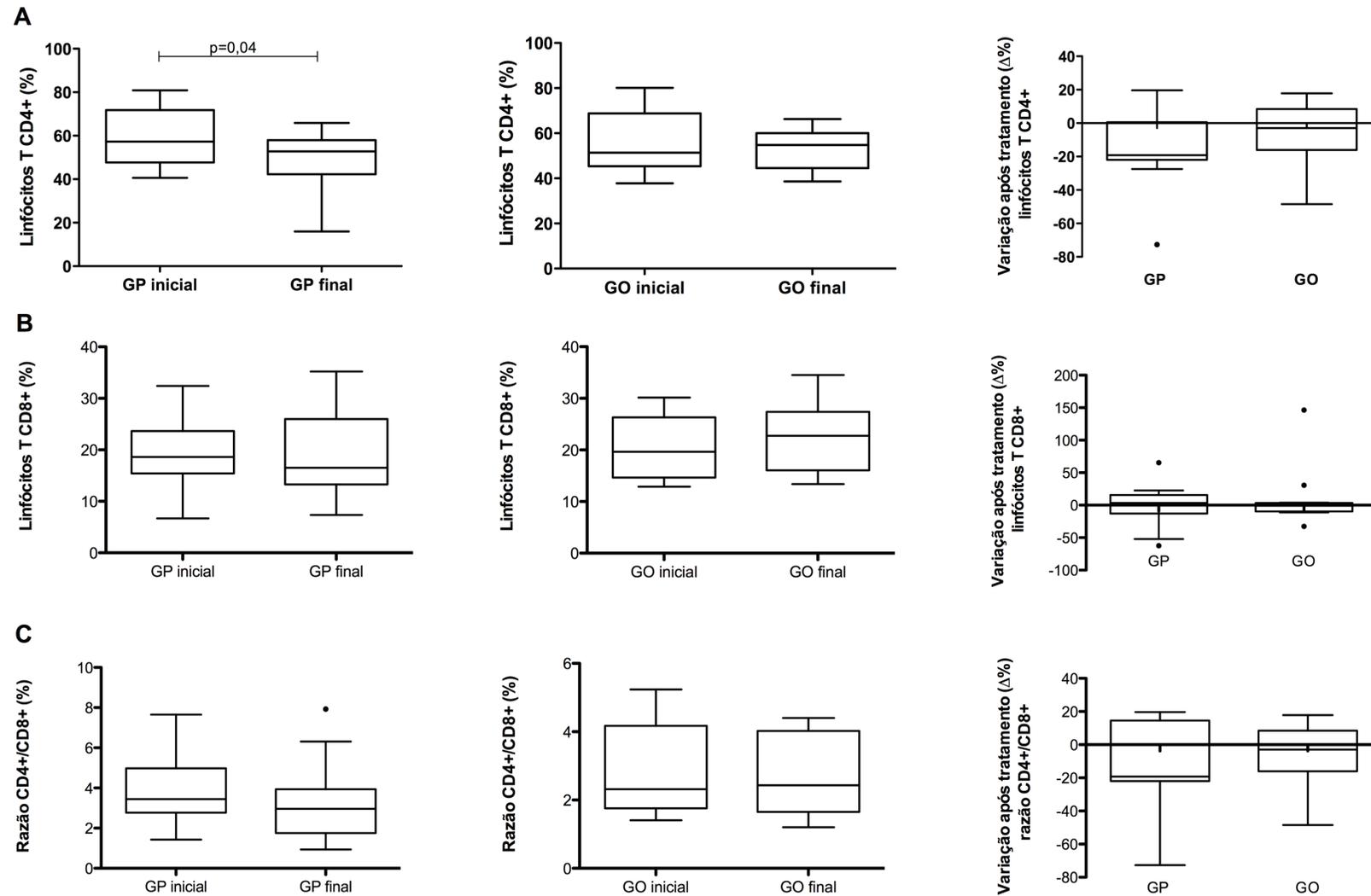


**Figura 2. Variação após tratamento ( $\Delta\%$ ) da proteína C-reativa de acordo com os grupos de estudo.** GP = grupo placebo, GO = grupo óleo de peixe. **(A)**  $n=16$ , no GP inicial o outlier de valor igual a 3,02 foi apontado no gráfico, mas excluído da análise estatística, valor de  $p$  para o teste de Wilcoxon; **(B)**  $n=15$ , no GO final o outlier foi apontado no gráfico, mas excluído da análise estatística. **(C)** GP  $n=15$  e GO  $n=15$ , valores de  $p$  para teste Mann Whitney.

Com relação a imunidade adaptativa, no GP observou-se redução da percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico ( $p=0,041$ ). Porém, não houve diferença entre os grupos quanto a variação após o tratamento ( $\Delta\%$ ) (figura 4). No GO, as percentagens das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> não sofreram mudanças significativas após a suplementação e a razão T CD4/CD8<sup>+</sup> não modificou (Figura 4).



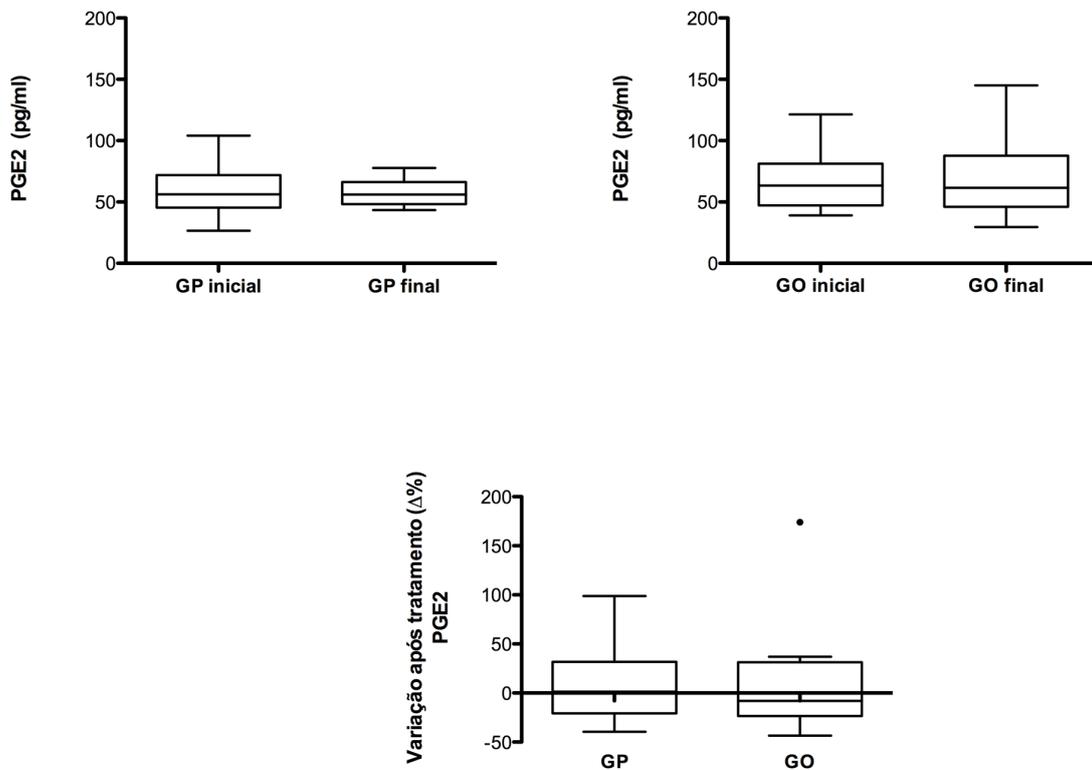
**Figura 3. Variação após tratamento ( $\Delta\%$ ) das citocinas pró-inflamatórias de acordo com os grupos de estudo.** GP = grupo placebo, GO = grupo óleo de peixe. **(A)** Fator de necrose tumoral, GP n=14, GO n=12; **(B)** Interleucina-6, GP n=16, GO n=18; **(C)** Interleucina-1beta, GP n=17 e GO n=15. Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores máximos e mínimos.



**Figura 4. Variação após tratamento ( $\Delta\%$ ) das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, de acordo com os grupos de estudo. GP = grupo placebo, GO = grupo óleo de peixe. (A) Linfócitos T CD4<sup>+</sup>, GP n= 12, GO n=15; valor de p para teste t-student (B) Linfócitos T CD8<sup>+</sup>, GP n=14, GO n=13; (C) Razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, GP n=12 e GO n=15. Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores máximos e mínimos.**

Os níveis séricos de prostaglandina E<sub>2</sub>, nos dois grupos estudados não sofreram mudanças significativas após o período de suplementação (Figura 5).

Semelhante aos resultados basais, parâmetros bioquímicos como glicose sérica, colesterol total e frações, hemograma completo e albumina sérica não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 3).



**Figura 5. Variação após tratamento ( $\Delta\%$ ) da prostaglandina E<sub>2</sub> de acordo com os grupos de estudo.** GP = grupo placebo, GO = grupo óleo de peixe. GP n=14 e GO n=16. Os dados estão representados em medianas, quartis superiores e inferiores, valores máximos e mínimos.

## Discussão

De nosso conhecimento, este é o primeiro estudo randomizado, controlado, duplo cego que investigou os efeitos da suplementação com óleo de peixe, nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, razão CD4/CD8, nos níveis sérios de citocinas pro-inflamatórias, proteína C-reativa e prostaglandina E<sub>2</sub>, em pacientes recém diagnosticadas com câncer de mama.

Para ter efeito imunomodulador os ácidos graxos n-3 devem ser incorporados nas membranas leucocitárias (CALDER, 2008). Em indivíduos saudáveis a incorporação do EPA no interior de membranas de leucócitos e nos fosfolipídios plasmáticos é geralmente descrita após 4, 8, ou ainda 12 semanas de intervenção (YAQOOB et al, 2000). De acordo com revisão de Van der Meij *et al.* (2011), em pacientes com câncer, de uma maneira geral a suplementação oral de 1,5 a 3 g de EPA (combinado ou não com DHA) aumenta a concentração média de EPA nos fosfolipídios plasmáticos de  $\leq 2,0\%$  para 2,5 a 6,5% do total de ácidos graxos. Neste estudo, após 4 semanas de suplementação, no GO os níveis plasmáticos de EPA e DHA aumentaram de 0,49% para 1,52% e de 2,55% para 4,60% respectivamente, sendo a diferença significativa intra e entre grupos. A mediana da variação após o tratamento ( $\Delta\%$ ) do EPA foi 119,29% e do DHA foi 58,82%. Essas informações confirmam a adesão dos pacientes ao tratamento e a incorporação dos ácidos graxos suplementados.

Os resultados deste estudo sugerem que a suplementação com EPA e DHA, modulou a resposta inflamatória dependente de proteína C-reativa. Enquanto nas pacientes suplementadas com EPA e DHA observou-se uma menor variabilidade e manutenção dos níveis séricos dessa proteína após o tratamento, nas pacientes do GP houve aumento dos níveis séricos de proteína C-reativa, sendo a diferença entre a variação percentual ( $\Delta\%$ ) das pacientes tratadas com óleo de peixe e das tratadas com placebo marginalmente maior no grupo que recebeu placebo ( $p=0,059$ ). Resultados semelhantes têm sido demonstrados em pacientes com câncer colorretal (SILVA *et al.*, 2012; MOCELLIN *et al.*, 2013). Esse resultado é relevante, haja vista que níveis elevados da PCR têm sido associados com um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama.

Verificou-se também um possível efeito da suplementação com EPA e DHA na imunidade adaptativa, visto que pacientes suplementadas com óleo de peixe apresentaram menor variabilidade, e mantiveram a percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> semelhante no período prévio e após a suplementação, enquanto pacientes do GP apresentaram redução significativa na subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Entretanto, não houve diferença entre os grupos na comparação da variação percentual ( $\Delta\%$ ) entre as pacientes tratadas com placebo ou com óleo de peixe. A manutenção do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em valores mais próximos ao normal é de fundamental importância, pois eles são necessários para ativação dos linfócitos T

CD8<sup>+</sup> que são responsáveis pela defesa contra microorganismos e células tumorais. Também deve-se considerar que a manutenção do equilíbrio da resposta imune adaptativa anterior aos tratamentos antineoplásicos, pode auxiliar para uma melhor resposta ao tratamento. A cirurgia representa a base do tratamento do câncer de mama. Porém, esta envolve manipulação física do tumor e de sua rede vascular, podendo induzir a passagem de células tumorais para a circulação, tornando este procedimento um momento de risco para desenvolvimento de metástase (BOOMSMA *et al.*, 2010). Assim, uma resposta imune equilibrada poderá contribuir para reduzir o risco de metástase após a cirurgia, e, também, para uma melhor resposta a possíveis intercorrências relacionadas a mesma. Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram em pacientes com câncer de mama os efeitos da suplementação oral de EPA e DHA nesses parâmetros imunes e inflamatórios, o que dificulta a comparação dos resultados aqui apresentados.

Não foram observadas mudanças significativas nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias após o período de suplementação. Resultados semelhantes, em pacientes com diferentes tipos de câncer e tratamentos antineoplásicos, foram demonstrados por Persson *et al.* (2005), Taylor *et al.* (2010), Gomèz-Candela (2011), Mocellin *et al.* (2013), Faber *et al.* (2013). Faber *et al.* observaram incorporação de EPA e DHA após 7 dias de suplementação, mas, não houve mudanças significativas nas citocinas pró-inflamatórias avaliadas. Por outro lado, ao contrário dos resultados aqui apresentados, Faber *et al.* observaram redução nos níveis séricos de prostaglandina E<sub>2</sub>. Taylor *et al.* (2010) e Gomèz-Candela (2011), além de não observarem redução das citocinas pró-inflamatórias, verificaram uma tendência de aumento nos níveis séricos de IL-6 após a suplementação com EPA e DHA. Mocellin *et al.* (2013), em pacientes com câncer colorretal, observou redução dos níveis séricos de PCR, porém nenhuma mudança foi verificada nos níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6.

As possíveis razões para a falta de resultados significativos em relação às citocinas pró-inflamatórias e PGE<sub>2</sub> são a dose utilizada, o curto período de suplementação, o tamanho da amostra que podem ter sido insuficientes, além do uso de  $\alpha$ -tocoferol nas cápsulas de óleo de peixe, que pode ter diminuído o possível efeito do suplemento (Chajès *et al.*, 1995; Colas *et al.*, 2005). A dose de 1,8 g de EPA e DHA por quatro semanas de intervenção podem ser insuficientes para atingir os efeitos imunomodulares do EPA e DHA em pacientes com câncer de mama. De

acordo com Mocelim *et al.* (2015), quando a suplementação é realizada durante um período curto, altas doses de ácidos graxos n-3 são requeridas para se ter um efeito antiinflamatório. A falta de poder estatístico devido ao pequeno tamanho da amostra é um problema frequente em estudos de intervenção com EPA e DHA. Pastore *et al.* (2014), com o propósito de investigar os efeitos da suplementação com 2,2 g de EPA em pacientes com diferentes tipos câncer submetidos à quimioterapia, randomizou 35 pacientes para o grupo EPA e 34 para o grupo controle. Porém, devido à perda de seguimento, apenas 18 e 25 pacientes foram analisados nos grupos EPA e controle, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Taylor *et al.* (2010), onde 31 pacientes com câncer foram randomizados para receber suplementação e apenas 17 foram analisados devido a perda de seguimento.

Quanto à presença do  $\alpha$ -tocoferol, Chajès *et al.* (1995) demonstraram que os ácidos graxos EPA e DHA foram efetivos em reduzir o crescimento de células de câncer de mama, entretanto a presença de vitamina E restaurou completamente o crescimento celular. Resultado semelhante foi realizado por Germain *et al.* (1998). Estudo *in vivo* realizado por Colas *et al.* (2005) demonstrou que a adição de prooxidantes em dietas suplementadas com óleo de peixe aumentavam a sensibilização de tumores mamários à quimioterapia, enquanto a adição de  $\alpha$ -tocoferol suprimia a resposta tumoral. Estudo realizado por Xiong *et al.* (2012) demonstrou que o  $\alpha$ -tocoferol antagoniza diretamente as ações anticancer do DHA.

Um dos pontos fortes do presente estudo é seu desenho prospectivo, randomizado, controlado e duplo cego. Quanto ao cegamento do estudo, um importante aspecto a ser considerado, além da aparência e o odor idênticos das cápsulas de óleo de peixe e do óleo mineral, características importantes para uma boa adesão ao tratamento, é a composição do placebo utilizado. Neste estudo utilizou-se como placebo o óleo mineral que não é absorvido pelo organismo, não incorrendo, desta forma, nos possíveis fatores de confundimento gerados por óleos contendo n-6 ou n-9 no grupo controle. Além disso, a dose de 2 g/dia de óleo mineral, como esperado, não apresentou nenhum efeito laxativo. Placebos contendo óleo de soja em substituição ao óleo de peixe já foram utilizadas (FURUKAWA *et al.* 1999; LIANG *et al.* 2008; ZHU *et al.* 2012), porém, acredita-se que por seu alto teor em ácido graxo n-6 este não seja adequado para avaliar desfechos de inflamação por direcionar para um estado mais inflamatório. Muitos estudos usam suplementos

industrializados aromatizados artificialmente, como fonte de ácidos graxos n-3 com a intenção de mascarar o sabor, mas que normalmente contém outros nutrientes que podem ser potenciais confundidores. Semelhante ao estudo de Taylor *et al.* (2010), 92% das cápsulas prescritas foram consumidas, o que foi considerado boa adesão ao tratamento e isso também fortalece os resultados encontrados. O motivo dessa boa adesão pode ser devido à suplementação ter ocorrido em uma fase inicial da doença e na ausência de efeitos colaterais da quimioterapia e da radioterapia. Outro ponto forte, consiste no fato de que a análise do consumo dietético e perfil dos ácidos graxos plasmáticos foram realizados no início e fim da intervenção, possibilitando um melhor monitoramento da eficácia da suplementação. Como um último ponto forte a ser citado, temos o fato de que todas as participantes do estudo eram virgens de tratamento, evitando assim os fatores confundidores relacionados aos tratamentos oncológicos.

Como limitação do estudo temos a discrepância entre o número de pacientes convidadas (n=108) e o número de pacientes analisadas (n= 37). Vinte cinco por cento das pacientes convidadas recusaram participar do estudo. Esta alta taxa de recusa pode ser devido ao convite ter sido realizado imediatamente após o recebimento do diagnóstico de câncer, estando as pacientes emocionalmente abaladas, assustadas com a gravidade da doença e comprometidas com a realização de vários exames complementares ao diagnóstico e pré-cirúrgicos. Estes mesmos motivos podem ter levado 10% das pacientes que assinaram o TCLE a não comparecerem à coleta e a desistirem do estudo. A antecipação da cirurgia devido a gravidade da doença e mudanças no tratamento clínico durante o estudo também foram fatores limitantes do tamanho da amostra analisada, como detalhado na figura 1.

A suplementação de 1,8 g de ácidos graxos n-3 em pacientes recém diagnosticadas com câncer de mama, durante 4 semanas, promoveu mudança significativa na composição dos ácidos graxos plasmáticos, manteve a percentagem das células T CD4<sup>+</sup> e os níveis séricos de PCR, sugestivo da sua ação benéfica no sistema imunológico. Estudos considerando os subtipos moleculares e estadiamento clínico da doença são necessários para confirmação dos resultados apresentados.

## Referências

BARBOSA-SILVA, M. C.; BARROS, A. J. D.; WANG, J.; HEYMSFIELD, S. B.; PIERSON, R. N. Bioelectrical impedance analysis: population reference values for phase angle by age and sex. **Am J Clin.** v. 82, p. 49-52, 2005.

BOOMSMA, M. F.; GARSSSEN, B.; SLOT E.; BERBEE, M.; BERKHOF, J.; MEEZENBROEK, E. J.; SLIEKER, W. *et al.* Breast cancer surgery-induced immunomodulation. **J Surg Oncol.** v.102, n. 6, p. 640-648, 2010.

BOUGNOUX P.; HAJJAJI N.; FERRASSON M. N.; GIRAUDEAU B.; COUET C.; LE FLOCH O. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. **Br J Cancer.** v.101, n. 12, p. 1978-1985, 2009.

BRUNNER, E.; LANGER, F.; Nonparametric Analysis of Ordered Categorical Data in Designs with Longitudinal Observations and Small Sample Sizes. **Biometrical Journal.** v. 42, n. 6, p. 663- 675, 2000.

BUI, J. D.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? **Curr Opin Immunol.** v. 19, n. 2, p. 203-208, 2007.

CAMPBELL, M. J.; SCOTT, J.; MAECKER, H. T.; PARK, J. W.; ESSERMAN, L. J. Immune dysfunction and micrometastases in women with breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** v.91, n.2, p. 163-71, 2005.

COLAS, S.; GERMAIN, E.; ARAB, K.; MAHEO, K.; GOUPILLE, C.; BOUGNOUX, P. Alpha-tocopherol suppresses mammary tumor sensitivity to anthracyclines in fish oil-fed rats. **Nutr Cancer.** v. 51, n. 2, p. 178-183, 2005.

COLAS S.; MAHÉO, K.; DENIS, F.; GOUPILLE, C.; HOINARD, C.; CHAMPEROUX P.; BOUGNOUX, P. *et al.* Sensitization by dietary docosahexaenoic acid of rat mammary carcinoma to anthracycline: a role for tumor vascularization. **Clin Cancer Res.** v. 12, n. 19, p. 5879-5886, 2006.

CONWAY, J. M.; INGWERSEN, L. A.; BINYARD, B. T.; MOSHFEGH, A. J. Effectiveness of the US Department of Agriculture 5-step multiple-pass method in assessing food intake in obese and nonobese women. **Am J Clin Nutr.** v. 77, n. 5, p. 1171-1178, 2003.

CHAJÈS, V.; SATTTLER, W.; STRANZL, A.; KOSTNER, G.M. Influence of n-3 fatty acids on the growth of human breast cancer cells in vitro: relationship to peroxides

and vitamin-E. **Breast Cancer Res Treat.** v. 34, n. 3, p. 199-212, 1995.  
CHRISTIE W. W. **Method for separation of simple lipid classes.** In: Lipid Analyses. p. 105-135, England, 2003.

DUNN, G. P.; OLD, L. H.; SCHREIBER, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. **Immunity.** v. 21, n. 2, p. 137-148, 2004.

ESQUIVEL-VELÁZQUEZ, M.; OSTOA-SALOMA, P.; PALACIOS-ARREOLA, M. I.; NAVA-CASTRO, K. E.; CASTRO, J. I.; MORALES-MONTOR, J. The role of cytokines in breast cancer development and progression. **J Interferon Cytokine Res.** V. 35, n. 1, p. 1-16, 2015.

FABER, J.; BERKHOUT, M.; FIEDLER, U.; AVLAR, M.; WITTEMAN, B.J.; VOS A. P. *et al.* Rapid EPA and DHA incorporation and reduced PGE2 levels after one week intervention with a medical food in cancer patients receiving radiotherapy, a randomized trial. **Clin Nutr.** v. 32, n. 3, p. 338-345, 2013.

FAWZY, M. S.; ALY, N. M.; SHALABY, S. M.; EL-SAWY, W. H.; ABDUL-MAKSOUND R. S. Cyclooxygenase-2 169C>G and 8473T>C gene polymorphisms and prostaglandin E2 level in breast cancer: a case-control study. **Gene.** v. 527, n. 2, p. 601-605, 2013.

FINOCCHIARO, C.; SEGRE, O.; FADDA, M.; MONGE, T.; SCIGLIANO, M.; SCHENA, M. *et al.* Effect of n-3 fatty acids on patients with advanced lung cancer: a double-blind, placebo-controlled study. **Br J Nutr.** v. 108, n. 2, p. 327-333. 2012.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S.; A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol Chem.** v. 226, p. 497-509, 1957.

FURUKAWA, K.; TASHIRO, T.; YAMAMORI, H.; TAKAGI, K.; MORISHIMA, Y.; SUGIURA, T. *et al.* Effects of soybean oil emulsion and eicosapentaenoic acid on stress response and immune function after a severely stressful operation. **Annals Surg.** v. 229, n. 2, p. 255- 261, 1999.

GERMAIN, E.; CHAJÈS, V.; COGNAULT, S.; LHUILLERY, C.; BOUGNOUX P. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. **Int J Cancer.** v. 75, n. 4, p. 578-583, 1998.

GOLDBERG, J. E.; SCHWERTFEGER K .L. Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics. **Curr Drug Targets.** v. 11, n. 9, p. 1133-1146, 2010.

GOGOS, C. A.; GINOPOULOS, P.; SALSA B.; APOSTOLIDOU, E.; ZOUMBOS N. C.; KALFARENTZOS F. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids plus vitamin E restore immunodeficiency and prolong survival for severely ill patients with generalized malignancy: a randomized control trial. **Cancer**. v. 82, n. 2, p. 395-402, 1998.

GÓMEZ-CANDELA, C.; VILLARINO, S. M.; HARRISBERGER, A.; LORIA, K.V.; BERMEJO, L. M.; ZAMORA, A. P. Efficacy evaluation of an oral powder supplement enriched with eicosapentaenoic acid in cancer patients. **Nutr Hosp**. v.26, n. 6, p. 1385-1393, 2011.

KYLE, U. G.; BOSAEUS, I.; DE LORENZO, A. D.; DEURENBERG, P.; ELIA, M.; GOMEZ, M. J.; *et al.* Bioelectrical impedance analysis-part II: Utilização in clinical practice. **Clin Nutr**. v. 23, n.6, p. 1430-1453, 2004.

LIANG, B.; WANG, S.; YE, Y. J.; YANG, X. D.; WANG, Y. L. *et al.* Impact of postoperative omega-3 fatty acid-supplemented parenteral nutrition on clinical outcomes and immunomodulations in colorectal cancer patients. **World J Gastroenterol WJG**. v. 14, n. 15, p. 2434-2439, 2008.

LOHMAN, T. G.; ROCHE, A.; MARTOREL, R. **Anthropometric standardization reference manual**. Human Kinetics, Champaign. 1998

LYON, D. E.; MCCAIN, N. L.; WALTER, J.; SCHUBERT, C. Cytokine comparisons between women with breast cancer and women with a negative breast biopsy. **Nurs Res**. v. 57, n. 1, p. 51-58, 2008.

MANTOVANI, G.; MACCIÒ, A.; MADEDDU, C.; GRAMIGNANO, G.; LUSSO, M. R.; SERPE R.; MASSA E.; ASTARA G.; DEIANA L. A phase II study with antioxidants, both in the diet and supplemented, pharmaconutritional support, progestagen, and anti-cyclooxygenase-2 showing efficacy and safety in patients with cancer-related anorexia/cachexia and oxidative stress. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v. 15 n. 5, p.1030-1034, 2006.

McCLUSKEY, D. R.; ROY, A. D.; ABRAM, W. P; MARTIN, W. M. T lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with benign and malignant breast disease. **Br J Cancer**. v. 47, p. 307-379, 1983.

MENENDEZ, J. A.; LUPU, R.; COLOMER, R. Exogenous supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) synergistically enhances taxane cytotoxicity and downregulates Her-2/neu (c-erbB-2) oncogene expression in human breast cancer cells. **Eur J Cancer Prev**. v. 14, n. 3.,

p. 263-270, 2005.

MOCELLIN, M. C.; PASTORE, S. J. A.; CAMARGO, C. Q.; FABRE, M. E.; GEVAERD, S.; NALIWAIKO, K. *et al.* Fish oil decreases C-reactive protein/albumin ratio improving nutritional prognosis and plasma fatty acid profile in colorectal cancer patients. **Lipids**. v. 48, n. 9, 879-888, 2013.

MURTA, E. F.; DE ANDRADE, J. M.; FALCÃO, R. P.; BIGHETTI, S. Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. **Tumori**. v. 86, n. 5, p. 403-407, 2000.

PASTORE, C. A.; ORLANDI, S. P.; GONZALEZ M. C. Introduction of an omega-3 enriched oral supplementation for cancer patients close to the first chemotherapy: may it be a factor for poor compliance? **Nutr Cancer**. v. 66, n. 8, p. 1285-1292, 2014.

PERSSON, C.; GLIMELIUS, B.; RÖNNELID, J.; NYGREN, P. Impact of fish oil and melatonin on cachexia in patients with advanced gastrointestinal cancer: a randomized pilot study. **Nutrition**. v. 21, n. 2, p. 170-178, 2005.

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

ROSA, P. **Análise não-paramétrica de dados ordinais com medidas repetidas**. 2001. Dissertação (Mestrado) - Instituto de matemática e estatística-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SÁNCHEZ-LARA, K.; TURCOTT, J. G.; JUÁREZ-HERNÁNDEZ, E.; NUÑEZ-VALENCIA, C.; VILLANUEVA, G.; GUEVARA, P. *et al.* Effects of an oral nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid on nutritional and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer: randomised trial. **Clin Nutr**. v. 33, n. 6, p. 1017-1023, 2014

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**. v. 331, n. 6024, p. 1565-1570, 2011.

SEVCÍKOVÁ, L.; HUNÁKOVÁ, L.; CHORVÁTH, B.; TURZOVÁ, M.; BOLJESÍKOVÁ, E. T-lymphocyte subsets (CD4/CD8 ratio) in breast cancer patients. **Neoplasma**. v. 39, n. 4, p. 219-222, 1992.

SILVA, J. A.; TRINDADE, E. B.; FABRE, M. E.; MENEGOTTO, V. M. *et al.* Fish oil

supplement alters markers of inflammatory and nutritional status in colorectal cancer patients. **Nutr Cancer**. v. 64, n. 2, p. 267-273, 2012.

TAYLOR, L. A.; PLETSCHEN, L.; ARENDS, J.; UNGER, C.; MASSING, U. Marine phospholipids-a promising new dietary approach to tumor-associated weight loss. **Support Care Cancer**. v. 18, n. 2, p.159-1570, 2010.

VAN DER MEIJ, B. S.; VAN BOKHORST-DE VAN DER SCHUEREN, M. A.; LANGIUS, J. A.; BROUWER, I. A.; VAN LEEUWEN, P. A. n-3 PUFAs in cancer, surgery, and critical care: a systematic review on clinical effects, incorporation, and washout of oral or enteral compared with parenteral supplementation. **Am J Clin Nutr**. v. 94, n. 5, p. 1248-1265, 2011.

WANG, Z.; BUTT, K.; WANG, L.; LIU, H. The effect of seal oil on paclitaxel induced cytotoxicity and apoptosis in breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. **Nutr Cancer**. v. 58, n. 2, p. 230-238. 2007.

WANG, Z. K.; YANG, B.; LIU, H.; HU, Y.; YANG, J. L.; WU, L. L.; ZHOU, Z.H.; JIAO, S. C. Regulatory T cells increase in breast cancer and in stage IV breast cancer. **Cancer Immunol Immunother**. v. 61, n. 6, p. 911-916, 2012.

WCRF-World Cancer Research Fund. **Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: A Global Perspective**. American Institute of Cancer Research. Washington, DC. 2007. 517p.

WHITFORD, P.; ALAM, S. M.; GEORGE, W. D.; CAMPBELL, A. M. Flow cytometric analysis of tumour-draining lymph nodes in breast cancer patients. **Eur J Cancer**. v. 28, n, 2/3, p. 350-356, 1992.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. 1998.

XIONG, A.; YU, W.; TIWARY, R.; SANDERS, B. G.; KLINE, K. Distinct roles of different forms of vitamin E in DHA-induced apoptosis in triple-negative breast cancer cells. **Mol Nutr Food Res**. v.56, n. 6, p. 923-934, 2012.

YAQOOB, P.; PALA, H. S.; CORTINA-BORJA, M.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER P. C. Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. **Eur J Clin Invest**. v. 30, n. 3, p. 260-274, 2000.

ZHU, M. W.; TANG, D. N.; HOU, J.; WEI, J. M.; HUA, B.; SUN, J. H. *et al.* Impact of fish oil enriched total parenteral nutrition on elderly patients after colorectal cancer surgery. **Chinese Med J.** v.125, n. 2, p. 178-181, 2012.

## **CONCLUSÃO**

---

## 7. CONCLUSÃO

---

No presente estudo concluímos que a suplementação com 1,8g de ácidos graxos n-3 (EPA E DHA) em pacientes recém diagnosticadas com câncer de mama, durante 4 semanas:

- Não modificou os parâmetros nutricionais e bioquímicos avaliados
- Não modificou os níveis séricos das citocinas próinflamatórias avaliadas e da PGE<sub>2</sub>
- Promoveu mudança significativa na composição dos ácidos graxos plasmáticos
- Manteve os níveis séricos de PCR
- Manteve a percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>

## ***REFERÊNCIAS***

---

## 8. REFERÊNCIAS

---

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **IMUNOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**: células e tecidos do sistema imunológico adquirido. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores Prognósticos no câncer de mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 48, n.1, p. 113-131.2002.

ALLIN, K. H.; NORDESTGAARD, B.; FLYGER, H.; BOJESEN, S. E. Elevated pre-treatment levels of plasma C-reactive protein are associated with poor prognosis after breast cancer: a cohort study. **Breast Cancer Research**. v. 13, n. 3, p. 1-13, 2011.

AMENDOLA, L. C; VIEIRA, R. Contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Rev. Bras. Cancerol**. v. 51, n.4, p. 325-330, 2005.

ARAB, L. Biomarkers of nutritional exposure and nutritional status. **Journal of Nutritional**, v.133, p. 925-932, 2003.

BACHELOT, T.; RAY-COQUARD, I.; MENETRIER-CAUX, C.; RASTKHA, M.; DUC, A.; BLAY J. Y. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. **Br J Cancer**. v.88, n. 11, p. 1721-1726, 2003.

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

BALKWILL F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? **Cytokine Growth Factor Rev**. v.13, n. 2; 135-1341, 2002.

BARBOSA-SILVA M. C.; BARROS A. J. D.; WANG J.; HEYMSFIELD S. B.; PIERSON R. N. Bioelectrical impedance analysis: population reference values for phase angle by age and sex. **Am J Clin**. v. 82, p. 49-52, 2005.

BARROS A.C. Genética e epigenética: bases moleculares da formação do câncer de mama. **Rev Brasileira Mastologia**. v. 20, n. 1, p. 48-54, 2010.

BASU S.; NACHAT-KAPPES R.; CALDEFIE-CHÉZET.; VASSON M. P. Eicosanoids and adipokines in breast cancer: from molecular mechanisms to clinical considerations. **Antioxid Redox Signal**. v. 18, n. 3, p. 323-360, 2013.

BOOMSMA M. F.; GARSSEN, B.; SLOT, E.; BERBEE, M.; BERKHOF, J.; MEEZENBROEK, E. J.; SLIEKER, W. *et al.* Breast cancer surgery-induced immunomodulation. **J Surg Oncol**. v. 102, n.6, p. 640-648, 2010.

BOUGNOUX, P.; GERMAIN, E.; CHAJÈS, V.; HUBERT, B.; LHUILLERY, C.; LE, F. O.; BODY, G.; CALAIS, G. Cytotoxic drugs efficacy correlates with adipose tissue docosahexaenoic acid level in locally advanced breast carcinoma. **Br J Cancer**. v. 79, n. 11, p. 1765-9, 1999.

BOUGNOUX, P.; HAJJAJI, N.; FERRASSON, M. N.; GIRAUDEAU, B.; COUET, C.; LE, F. O. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. **Br J Cancer**. v.101, n. 12, p. 1978-1985, 2009.

BOUGNOUX, P.; HAJJAJI, N.; MAHEO, K.; COUET, C.; CHEVALIER, S. Fatty acids and breast cancer: Sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. **Prog Lipid Res**. v. 49, n. 1, p.76-86, 2010.

BOZCUK, H.; USLU, G.; SAMUR, M.; YILDIZ, M.; OZBEN T.; OZDOĞAN, M.; ARTAÇ, M.; ALTUNBAŞ, H.; AKAN, I.; SAVAŞ, B. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6, and fasting serum insulin correlate with clinical outcome in metastatic breast cancer patients treated with chemotherapy. **Cytokine**. v. 7, n. 27, p. 58-65, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. **Cadernos de Atenção Básica Nº 13** – Controle dos cânceres de colo de útero e da mama. Brasília, 2013. 124p.

BRASKY, T. M.; LAMPE, J. W.; POTTER, J. D.; PATTERSON, R. E.; WHITE E. Specialty supplements and breast cancer risk in the VITamins And Lifestyle (VITAL) Cohort. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v.19, n. 7, p. 1696-708, 2010.

BRUNNER E.; LANGER F.; Nonparametric Analysis of Ordered Categorical Data in Designs with Longitudinal Observations and Small Sample Sizes. **Biometrical Journal**. v. 42, n. 6, p. 663-675, 2000.

BUI J. D.; SCHREIBER R. D.; Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? **Curr Opin Immunol.** v. 19, n. 2, p. 203-208, 2007.

CALDER P. C. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. **J Nutr.** v. 142, n. 3, p. 592S-599S, 2012.

CALDER P.C. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.** v. 79, n. 3-5, p. 101-108, 2008.

CALDER P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: Nutrition or pharmacology? **Br J Clin Pharmacol.** v. 75, n. 3, p. 645-662, 2013a.

CALDER P.C. n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. **Proc Nutr Soc.** v. 72, n. 3, p. 326-336, 2013b.

CALDER P.C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochim Biophys Acta.** v. 1851, n. 4, p. 469-484, 2014.

CAMPBELL, M. J.; SCOTT, J.; MAECKER, H. T.; PARK, J. W.; ESSERMAN, L. J. Immune dysfunction and micrometastases in women with breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** v.91, n.2, p. 163-171, 2005.

CARTER S. K. Single and combination nonhormonal chemotherapy in breast cancer. **Cancer.** v. 30, n. 6, p. 1543-1555, 1972.

CHAJÈS, V.; SATTLER, W.; STRANZL, A.; KOSTNER G. M. Influence of n-3 fatty acids on the growth of human breast cancer cells in vitro: relationship to peroxides and vitamin-E. **Breast Cancer Res Treat.** v. 34, n. 3, p. 199-212, 1995.

CHAJÈS, V.; TORRES-MEJÍA, G.; BIESSY, C.; ORTEGA-OLVERA C.; ANGELES-LLERENAS A.; FERRARI P. *et al.*  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 Polyunsaturated fatty acid intakes and the risk of breast cancer in Mexican women: impact of obesity status. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 21, n. 2, p. 319-26, 2012.

CHEN E.P.; SMYTH E.M. COX-2 and PGE2-dependent immunomodulation in breast cancer. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** v. 96, n.1-4, p. 14-20, 2011.

CHILTON, F. H.; RUDEL, L. L.; PARKS, J. S.; ARM, J. P.; SEEDS, M. C. Mechanisms by which botanical lipids effect inflammatory disorders. **Am J Clin Nutr.** v. 87, n. 2, p. 498s-503s, 2008.

CHRISTIE W. W. **Method for separation of simple lipid classes.** In: Lipid Analyses. p. 105-135, England, 2003.

CHRISTIE W. W. **HPTLC and lipids.** A practical guide. 2a ed. 1987.

COLAS S.; PAON L.; DENIS F.; PRAT M.; LOUISOT P.; HOINARD C.; LE FLOCH O. Enhanced radiosensitivity of rat autochthonous mammary tumors by dietary docosahexaenoic acid. **Int J Cancer.** v. 109, n. 3, p. 449-454, 2004.

COLAS, S.; GERMAIN, E.; ARAB, K.; MAHEO, K.; GOUPILLE, C.; BOUGNOUX P. Alpha-tocopherol suppresses mammary tumor sensitivity to anthracyclines in fish oil-fed rats. **Nutr Cancer.** v. 51, n. 2, p. 178-183, 2005.

COLAS, S.; MAHÉO, K.; DENIS, F.; GOUPILLE, C.; HOINARD, C.; CHAMPEROUX P.; BOUGNOUX P. *et al.* Sensitization by dietary docosahexaenoic acid of rat mammary carcinoma to anthracycline: a role for tumor vascularization. **Clin Cancer Res.** v. 12, n. 19, p. 5879-5886, 2006.

CONWAY J. M.; INGWERSEN L. A.; BINYARD B. T.; MOSHFEGH A. J. Effectiveness of the US Department of Agriculture 5-step multiple-pass method in assessing food intake in obese and nonobese women. **Am J Clin Nutr.** v. 77, n. 5, p. 1171-1178, 2003.

CURI, R.; PONPEIA, C.; MIJASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura – os ácidos graxos.** Editora Manole. Barueri – SP, 2002.

DE CICCIO, M.; BORTOLUSSI, R.; FANTIN, D., FRACASSO, A.; FABIANI F., SANTANTONIO, C. Supportive therapy of elderly cancer patients. **Crit Ver Oncol Hematol.** v. 42, p. 189-211, 2002.

DEMARK-WAHNEFRIED, W.; AZIZ N. M.; ROWLAND, J. H.; PINTO, B. M. Riding the crest of the teachable moment: promoting long-term health after the diagnosis of cancer. **J Clin Oncol.** v. 23, n. 24, p. 5814-5830, 2005.

DETHLEFSEN, C.; HØJFELDT, G.; HOJMAN, P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** v.138, n.3, p. 657-664,

2013.

DUNN, G. P.; BRUCE, A. T.; IKEDA, H.; OLD L. J.; SCHEIBER, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol.** v. 3, n. 11, p. 991-998, 2002.

DUNN, G. P.; OLD, L. H.; SCHREIBER, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. **Immunity.** v. 21, n. 2, p. 137-48, 2004.

EKMEKTZOGLU, K. A; XANTHOS, T.; GERMAN, V.; ZOGRAFOS, C. G.; Breast cancer: From the earliest times through to the end of the 20th century. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** v. 145, n. 1, p. 3-8, 2009.

ESQUIVEL-VELÁZQUEZ, M.; OSTOA-SALOMA, P.; PALACIOS-ARREOLA, M. I.; NAVA-CASTRO, K. E.; CASTRO, J. I.; MORALES-MONTOR, J. The role of cytokines in breast cancer development and progression. **J Interferon Cytokine Res.** v. 35, n. 1, p. 1-16, 2015.

FABER, J.; BERKHOUT, M.; FIEDLER, U.; AVLAR, M.; WITTEMAN, B. J.; VOS, A. P. *et al.* Rapid EPA and DHA incorporation and reduced PGE2 levels after one week intervention with a medical food in cancer patients receiving radiotherapy, a randomized trial. **Clin Nutr.** v. 32, n. 3, p. 338-345, 2013.

FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S.; BROWN H. A.; GLASS, C. K.; MERRILL, A. H.; MURPHY, R. C.; RAETZ, C.R. *et al.* A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research.** v. 46: p. 839-861, 2005.

FAWZY, M. S.; ALY, N. M.; SHALABY, S. M.; EL-SAWY, W. H.; ABDUL-MAKSOU, R. S. Cyclooxygenase-2 169C>G and 8473T>C gene polymorphisms and prostaglandin E2 level in breast cancer: a case-control study. **Gene.** v. 527, n. 2, p. 601-605, 2013.

FINOCCHIARO, C.; SEGRE, O.; FADDA, M.; MONGE, T.; SCIGLIANO, M.; SCHENA, M. *et al.* Effect of n-3 fatty acids on patients with advanced lung cancer: a double-blind, placebo-controlled study. **Br J Nutr.** v. 108, n. 2, p. 327-333. 2012.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S.; A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol Chem.** v. 226, p. 497-509, 1957.

FURUKAWA, K.; TASHIRO, T.; YAMAMORI, H.; TAKAGI, K.; MORISHIMA, Y.;

SUGIURA, T. et al. Effects of soybean oil emulsion and eicosapentaenoic acid on stress response and immune function after a severely stressful operation. **Annals Surg.** v. 229, n. 2, p. 255- 261, 1999.

GOEDERT, J. J.; PFEIFFER, R.; ZHU, M.; YANG, X. R; GARCIA-CLOSAS, M.; LISSOWSKA, J.; KOPP, W. C. Peripheral blood immunologic phenotype of population-based breast cancer cases and matched controls. **Eur J Clin Invest.** v. 42, n. 5, p. 572-574 2012.

GOGOS, C. A.; GINOPOULOS, P.; SALSA, B.; APOSTOLIDOU, E.; ZOUMBOS, N. C.; KALFARENTZOS, F. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids plus vitamin E restore immunodeficiency and prolong survival for severely ill patients with generalized malignancy: a randomized control trial. **Cancer.** v. 82, n. 2, p. 395-402, 1998

GOLDBERG, J. E.; SCHWERTFEGER, K. L. Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics. **Curr Drug Targets.** v. 11, n. 9, p. 1133-1146, 2010.

GOMES, R.; SKABA, M. M.; VIEIRA, R. J.; Reinventando a vida: proposta para uma abordagem sócio-antropológica do câncer de mama feminina. **Cad. Saúde Pública.** v. 18, n. 1, p. 197-204, 2002.

GÓMEZ-CANDELA, C.; VILLARINO, S. M.; HARRISBERGER, A.; LORIA, K. V.; BERMEJO, L. M.; ZAMORA, A. P. Efficacy evaluation of an oral powder supplement enriched with eicosapentaenoic acid in cancer patients. **Nutr Hosp.** v.26, n. 6, p. 1385-1393, 2011.

GOSWAMI, B.; MITTAL, P.; GUPTA, N. Correlation of levels of IL-6 with tumor burden and receptor status in patients of locally advanced carcinoma breast. **Indian J Clin Biochem.** v. 28, n. 1, p. 90-94, 2013.

GERMAIN, E.; CHAJÈS, V.; COGNAULT, S.; LHUILLERY, C.; BOUGNOUX, P. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. **Int J Cancer.** v. 75, n. 4, p. 578-583, 1998.

HAMED, E. A.; ZAKHARY, M. M.; MAXIMOUS, D. W. Apoptosis, angiogenesis, inflammation, and oxidative stress: basic interactions in patients with early and metastatic breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol.** v.138, n. 6, p. 999–1009, 2012.

HARDMAN, D. E. Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy. **J Nutr.** v. 132, p. 3508S-12S, 2004.

HARRIS, R. E.; CASTO, B. C.; HARRIS, Z. M. Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. **World J Clin Oncol.** v.5, n. 4, p. 677-692, 2014.

HARRIS, S. G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends Immunol.** v. 23, n. 3, p. 144-150, 2002.

HEIKKILÄ K.; EBRAHIM, S.; LAWLOR D. A. A systematic review of the association between circulating concentrations of C reactive protein and cancer. **J Epidemiol Community Health.** v. 6, n. 9, p. 824-33, 2007.

HENDERSON, J. R.; TOCHER, D. R. **Thin-layer chromatography.** In: Hamilton R.J; Hamilton S. Lipid analysis: a practical approach. Manchester: IRL PRESS; 1992. p. 65-111.

HORTOBAGYI, G. N.; DE LA GARZA, S. J.; PRITCHARD, K.; AMADORI, D.; HAIDINGER R.; HUDIS C. A. *et al.* The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. **Clin Breast Cancer.** v. 6, n. 5, p. 391-401, 2005

INCA – Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. **Controle do câncer de mama – Documento de consenso.** Rio de Janeiro, Brasil , 2004 a.

INCA – Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. **TNM: Classificação de tumores malignos.** 6ª ed. Rio de Janeiro, Brasil , 2004 b.

INCA – Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. **Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: Brasil, 2014. 254p.

JIA, Y.; XU, L.; LIN, Q.; ZHU, M.; DING, L.; WU, K.; LU, Y. Levels of lymphocyte subsets in peripheral blood prior treatment are associated with aggressive breast cancer phenotypes or subtypes. **Med Oncol.** v. 31, n. 6, p. 981, 2014.

JIANG, X. P.; YANG, D.C.; ELLIOTT R. L.; HEAD J. F. Reduction in serum IL-6 after vaccination of breast cancer patients with tumour-associated antigens is related to estrogen receptor status. **Cytokine.** v. 12, n. 5, p. 458-65, 2000.

JUNG D. H.; BIGGS H. G.; MOOREHEAD, W. R. Colorimetry of serum cholesterol with use of ferric acetate/uranyl acetate and ferrous sulfate/sulfuric acid reagents. **Clin Chem.** v. 21, n. 10, p1526–1530, 1975.

KALINSKI, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. **J Immunol.** v. 188, n. 1, p. 21-28, 2012.

KAVR, I.; PECHT, M.; TRAININ, N.; GREENSTEIN, A.; BRAF, Z. T. lymphocyte subsets and function in the peripheral blood of patients with urological cancer. **Oncology.** v. 49, n. 2, p. 108-13, 1992.

KIM, J.; LIM, S. Y; SHIN, A.; SUNG, M. K.; RO, J.; KANG, H. S. *et al.* Fatty fish and fish omega-3 fatty acid intakes decrease the breast cancer risk: a case-control study. **BMC Cancer.** v. 9, n. 216, 2009.

KIM, W.; KHAN, N. A.; McMURRAY, D. N.; PRIOR I. A.; WANG N.; CHAPKIN R. S. Regulatory activity of polyunsaturated fatty acids in T-cell signaling. **Prog Lipid Res.** v. 49, n. 3, p. 250-261, 2010.

KYLE, U. G.; BOSAEUS, I.; DE LORENZO, A. D.; DEURENBERG, P.; ELIA M.; GOMEZ, M.J.; *et al.* Bioelectrical impedance analysis-part II: Utilização in clinical practice. **Clin Nutr.** v. 23, n.6, p. 1430-1453, 2004.

LARSSON, SC.; KUMLIN, M.; SUNDEBERG-INGELMAN, M.; WOLK, A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. **Am J Clin Nutr.** v. 79, p. 935-45, 2004.

LEE, W. J.; CHANG, K. J.; LEE, C. S.; CHEN, K. M. Selective depression of T-lymphocyte subsets in gastric cancer patients: an implication of immunotherapy. **J Surg Oncol.** v. 455, n. 3, p. 165-169, 1994.

LIANG, B.; WANG, S.; YE, Y. J.; YANG, X. D.; WANG YL.; QU, J. *et al.* Impact of postoperative omega-3 fatty acid-supplemented parenteral nutrition on clinical outcomes and immunomodulations in colorectal cancer patients. **World J Gastroenterol WJG.** v. 14, n. 15, p. 2434-2439, 2008.

LIU, J.; MA, D.W. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of breast cancer. **Nutrients.** v. 6, n. 11, p. 5184-5223, 2014.

LOHMAN, T.G.; ROCHE, A.; MARTOREL R. Anthropometric standardization reference manual. Human Kinetics, Champaign. 1998.

LV, M.; XIAOPING, X.; CAIA, H.; LI, D.; WANG, J.; FU, X.; YU, F. *et al.* Cytokines as prognostic tool in breast cancer. **Front Biosci.** v. 1, n. 17, p. 2515-2526, 2011.

LYON, D. E.; MCCAIN, N. L.; WALTER, J.; SCHUBERT, C. Cytokine comparisons between women with breast cancer and women with a negative breast biopsy. **Nurs Res.** v. 57, n. 1, p. 51-58, 2008.

McCLUSKEY, D. R.; ROY, A. D.; ABRAM, W. P.; MARTIN W. M. T lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with benign and malignant breast disease. **Br J Cancer.** v. 47, p. 307-309, 1983.

MALHOTRA, G. K; ZHAO, X.; BAND, H.; BAND, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biol Ther.** v. 15, n. 10, p. 955-960, 2010.

MANTOVANI, G.; MACCIÒ, A.; MADEDDU, C.; GRAMIGNANO, G.; LUSSO MR.; SERPE, R.; MASSA, E.; ASTARA, G.; DEIANA, L. A phase II study with antioxidants, both in the diet and supplemented, pharmaconutritional support, progestagen, and anti-cyclooxygenase-2 showing efficacy and safety in patients with cancer-related anorexia/cachexia and oxidative stress. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 15 n. 5, p.1030-1034, 2006.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature.** v. 454, n. 7203, p. 436-444, 2008.

MENENDEZ, J. A.; LUPU, R.; COLOMER, R. Exogenous supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) synergistically enhances taxane cytotoxicity and downregulates Her-2/neu (c-erbB-2) oncogene expression in human breast cancer cells. **Eur J Cancer Prev.** v. 14, n. 3., p. 263-270, 2005.

MENKE, C. H. **Rotinas em Mastologia:** Epidemiologia, fatores de risco e aconselhamento genético. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Artemed, 2007a.

MENKE, C. H. **Rotinas em Mastologia:** Estadiamento clínico e seguimento. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Artemed, 2007b.

MILES, D. W.; HAPPERFIELD, L. C.; NAYLOR, M. S.; BOBROW, L. G.; RUBENS, R. D.; BALKWILL, F. R. Expression of tumor necrosis factor (TNF alpha) and its receptors in benign and malignant breast tissue. **Int J Cancer.** V. 56, n. 6, p. 777-82.

MOCELLIN, M. C.; PASTORE, S. J. A.; CAMARGO, C. Q.; FABRE, M. E.; GEVAERD, S.; NALIWAIKO, K. *et al.* Fish oil decreases C-reactive protein/albumin ratio improving nutritional prognosis and plasma fatty acid profile in colorectal cancer patients. **Lipids**. v. 48, n. 9, 879-888, 2013.

MORA, L. D.; História do tratamento cirúrgico do cancro de mama – empirismo e ciência. **Revista Portuguesa de Cirurgia**. v. 27, p. 41-58, 2013.

MURFF, H. J.; SHU, X. O.; LI, H.; YANG, G.; WU, X.; CAI, H.; WEN, W. Dietary polyunsaturated fatty acids and breast cancer risk in Chinese women: a prospective cohort study. **Int J Cancer**. v.128, n. 6, p.1434-1441, 2011.

MURTA, E. F.; DE ANDRADE, J. M.; FALCÃO, R. P.; BIGHETTI, S. Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. **Tumori**. v. 86, n. 5, p. 403-407, 2000.

NISHIMURA, T.; IWAKABE, K.; SEKIMOTO, M. *et al.* Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. **J Exp Med**. v. 190, n.5, p. 617-627, 1999.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Relatório Mundial sobre doenças crônicas não transmissíveis 2010. Genebra: Suíça, 2011.

PAPADOPOULOU, E.; TRIPSIANIS, G.; ANAGNOSTOPOULOS, K.; TENTES, I.; KAKOLYRIS, S.; GALAZIOS, G. Significance of serum tumor necrosis factor-alpha and its combination with HER-2 codon 655 polymorphism in the diagnosis and prognosis of breast cancer. **Int J Biol Markers**. v.25, n. 3, p. 126-135, 2010.

PASTORE, C.A.; ORLANDI, S.P.; GONZALEZ, M.C. Introduction of an omega-3 enriched oral supplementation for cancer patients close to the first chemotherapy: may it be a factor for poor compliance? **Nutr Cancer**. v. 66, n. 8, p. 1285-1292, 2014.

PERSSON, C.; GLIMELIUS, B.; RÖNNELID, J.; NYGREN, P. Impact of fish oil and melatonin on cachexia in patients with advanced gastrointestinal cancer: a randomized pilot study. **Nutrition**. v. 21, n. 2, p. 170-178, 2005.

PIERCE, B. L.; BALLARD-BARBASH, R.; BERNSTEIN, L.; BAUMGARTNER, R. N.; NEUHouser, M.L.; WENER, M.H. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. **J Clin Oncol**. v. 27, n. 21, p. 3437-3444, 2009

POCKAJ, B. A.; BASU, G. D.; PATHANGEY, L. B.; GRAY, R. J.; HERMANDEZ, J. L.; GENDLER, S. J. *et al.* Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E<sub>2</sub> secretion in patients with breast cancer. **Ann Surg Oncol.** v. 11, p. 328-339, 2004.

PORTA, C.; LARGHI, P.; RIMOLDI, M.; TOTARO, M. G.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI A. *et al.* Cellular and molecular pathway linking inflammation and cancer. **Immunology.** v. 214, p. 761-77, 2009.

PREMKUMAR, V. G.; YUVARAJ, S.; VIJAYASARATHY, K.; GANGADARAN, S.G.; SACHDANANDAM, P. Serum cytokine levels of interleukin-1beta, -6, -8, tumour necrosis factor-alpha and vascular endothelial growth factor in breast cancer patients treated with tamoxifen and supplemented with co-enzyme Q(10), riboflavin and niacin. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** v. 100, n. 6, p. 387-391, 2007.

RATINAYAKE, W. M.; GALI, C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: A background review paper. **Ann Nutr Metab.** v. 55, p. 8-43, 2009.

RATNAYAKE, W. M. Overview of methods for the determination of trans fatty acids by gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography, silver-ion liquid chromatography, and gas chromatography/mass spectrometry. **J AOAC Int.** v. 87, n. 2, p. 523-539, 2004.

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

READER, J.; HOLT, D.; FULTON, A. Prostaglandin E<sub>2</sub> EP receptors as therapeutic targets in breast cancer. **Cancer Metastasis Rev.** v. 30, p. 449-463, 2011.

REY-FERRO, M.; CASTAÑO, R.; OROZCO, O.; SERNA, A.; MORENO, A. Nutritional and immunologic evaluation of patients with gastric cancer before and after surgery. **Nutrition.** v.13, n. 10, p. 878-881, 1997.

ROSA, P. **Análise não-paramétrica de dados ordinais com medidas repetidas.** 2001. Dissertação (Mestrado) - Instituto de matemática e estatística-Universidade de São Paulo, 2001.

RISTIMÄKI, A.; SIVULA, A.; LUNDIN, J.; LUNDIN, M.; SALMINEN T.; HAGLLUND C. *et al.* Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. **Cancer Research**. v. 62, n. 3, p. 632-635, 2002.

SALEH, F.; RENO, W.; IBRAHIM, G.; BEHBEHANI, A.; DASHTI, H.; ASFAR S. The first pilot study on characteristics and practice patterns of Kuwaiti breast cancer patients. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**. v. 27, n. 1, p. 61-75, 2008.

SALGADO, R.; JUNIUS, S.; BENOY, I.; VAN, DAM P.; VERMEULEN, P.; VAN MARCK, E.; HUGET, P.; DIRIX, L.Y. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. **Int J Cancer**. v. 103, n. 5, p. 642-646, 2003.

SÁNCHEZ-LARA, K.; TURCOTT, J. G.; JUÁREZ-HERNÁNDEZ, E.; NUÑEZ-VALENCIA, C.; VILLANUEVA, G.; GUEVARA, P. *et al.* Effects of an oral nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid on nutritional and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer: randomised trial. **Clin Nutr**. v. 33, n. 6, p. 1017-1023, 2014.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**. v. 331, n. 6024, p. 1565-70, 2011.

SCHRÖDER, W.; VERING, A.; STEGMÜLLER, M.; STROHMEIER, R. Lymphocyte subsets in patients with ovarian and breast cancer. **Eur J Gynaecol Oncol**. v. 18, n. 6, p. 474-477, 1997.

SCHULTZ, D. R.; ARNOLD, P. I. Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. **Semin Arthritis Rheum**. v. 20, p. 129-147, 1990.

SEVCÍKOVÁ, L.; HUNÁKOVÁ, L.; CHORVÁTH, B.; TURZOVÁ, M.; BOLJESÍKOVÁ, E. T-lymphocyte subsets (CD4/CD8 ratio) in breast cancer patients. **Neoplasma**. v. 39, n. 4, p. 219-222, 1992.

SHAIKH, S. R.; JOLLY, C. A.; CHAPKIN, R. S. n-3 Polyunsaturated fatty acids exert immunomodulatory effects on lymphocytes by targeting plasma membrane molecular organization. **Mol Aspects Med**. v.33, n. 1, p. 46-54, 2012.

SHANKARAN, V.; IKEDA, H.; BRUCE, A.T.; WHITE, J. M.; SWANSON, P. E.; OLD L. P.; SCHREIBER, R. R. IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**. v. 410, n. 6832, p. 1107-

1111, 2001.

SHEEN-CHEN, S. M.; CHEN, W. J.; ENG, H. L.; CHOU, F. F. Serum concentration of tumor necrosis factor in patients with breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** v.43, n. 3, p. 211-215, 1997.

SILVA, J. A.; TRINDADE, E. B.; FABRE, M. E.; MENEGOTTO, V.M. *et al.* Fish oil supplement alters markers of inflammatory and nutritional status in colorectal cancer patients. **Nutr Cancer.** v. 64, n. 2, p. 267- 273, 2012.

STRAUSBERG, R. L. Tumor microenvironments, the immune system and cancer survival. **Genome Biol.** v. 6, n. 3, p. 211-221.4, 2005.

TAYLOR, L. A.; PLETSCHEN, L.; ARENDS, J.; UNGER, C.; MASSING, U. Marine phospholipids--a promising new dietary approach to tumor-associated weight loss. **Support Care Cancer.** v. 18, n. 2, p.159-1570, 2010.

THIÉBAUT, A. C.; CHAJÈS, V.; GERBER, M.; BOUTRON-RUAULT, M. C.; JOULIN, V.; LENOIR, G. Dietary intakes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of breast cancer. **Int J Cancer.** v.124, n 4, p. 924-931, 2009.

TRINDER, R. Determination of glucose in the blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry.** V. 6, p. 24-27, 1969.

TRIPSIANIS, G.; PAPADOPOULOU, E.; ANAGNOSTOPOULOS, K.; BOTAITIS, S.; KATOTOMICHELAKIS, M. Coexpression of IL-6 and TNF- $\alpha$ : prognostic significance on breast cancer outcome. **Neoplasma.** v. 61, n. 2, p. 205-12, 2014.

TRIPSIANIS, G.; PAPADOPOULOU, E.; BOTAITIS, S.; ANAGNOSTOPOULOS, K. *et al.* Diagnostic and prognostic significance of serum IL-6 levels in breast cancer. **JP Journal of Biostatistics.** v. 1, n.2, p. 58-77, 2012.

VAN DER MEIJ, B. S.; VAN BOKHORST-DE VAN DER SCHUEREN, M. A.; LANGIUS J. A.; BROUWER I. A.; VAN LEEUWEN P. A. n-3 PUFAs in cancer, surgery, and critical care: a systematic review on clinical effects, incorporation, and washout of oral or enteral compared with parenteral supplementation. **Am J Clin Nutr.** v.94, n. 5, p. 1248-65, 2011.

VARGAS, A.; LÓPEZ, M.; LILO, C.; VARGAS, M. J.; El papito de Edwin Smith y su trascendencia médica y odontológica. **REV MED CHILE**. v. 140, p. 1357- 1362, 2012.

VELENTZIS, L. S.; KESHTGAR M. R.; WOODSIDE, J. V.; LEATHEM, A. J.; TITCOMB, A.; PERKINS, K. A. *et al.* Significant changes in dietary intake and supplement use after breast cancer diagnosis in a UK multicentre study. **Breast Cancer Res Treat**. v. 28, n. 2, p. 473-482, 2011.

VENDRAMINI-COSTA, D.B.; CARVALHO, J.E.; Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. **Curr Pharm Des**. v.18, n. 26, p. 3831-3852, 2012.

VERA-RAMIREZ, L.; RAMIREZ-TORTOSA, M. C.; SANCHEZ-RODOVIRA, P. *et al.* Impacto of diet on breast câncer risk: A review of experimental and observational studies. **Crit Rev Food Sci Nutr**. v.53, n.1, p. 49-75, 2013.

XIONG, A.; YU, W.; TIWARY, R.; SANDERS, B.G.; KLINE, K. Distinct roles of different forms of vitamin E in DHA-induced apoptosis in triple-negative breast cancer cells. **Mol Nutr Food Res**. v. 56, n. 6, p. 923-934, 2012.

XU, J.; ZHANG, Y. RBC and T lymphocyte subsets in patients with bladder carcinoma: immunological study. **Zhonghua Wai Ke Za Zhi**. v. 37, n. 2, p.113-116, 1999.

WALTER, M.; LIANG, S.; GHOSH, S.; HORNSBY, P.J.; LI, R. Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. **Oncogene**. v. 28, n. 30, p. 2745-2755, 2009.

WANG, Z.; BUTT, K.; WANG, L.; LIU H. The effect of seal oil on paclitaxel induced cytotoxicity and apoptosis in breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. **Nutr Cancer**. v. 58, n. 2, p. 230-8. 2007.

WANG, Z. K.; YANG, B.; LIU, H.; HU, Y.; YANG, J. L.; WU, L. L.; ZHOU, Z. H.; JIAO S. C. Regulatory T cells increase in breast cancer and in stage IV breast cancer. **Cancer Immunol Immunother**. v. 61, n. 6, p. 911-916, 2012.

WCRF- World Cancer Research Fund. **Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: A Global Perspective**. American Institute of Cancer Research. Washington, DC. 2007. 517p.

WHITFORD, P.; ALAM, S. M.; GEORGE, W. D.; CAMPBELL, A. M. Flow cytometric analysis of tumour-draining lymph nodes in breast cancer patients. **Eur J Cancer**. V. 28, n, 2/3, p. 350-356, 1992.

WITT, P. M.; CHRISTENSEN, J. H.; SCHMIDT, E. B.; DETHLEFSEN, C.; TJØNNELAND, A.; OVERVAD, K.; et al. Marine n-3 polyunsaturated fatty acids in adipose tissue and breast cancer risk: a case-cohort study from Denmark. **Cancer Causes Control**. v. 20, n. 9, p. 1715-1721, 2009.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. 1998.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Physical status: the use and interpretation of anthropometry**. Geneva, 1985.

YAQOUB, P.; PALA, H. S.; CORTINA-BORJA, M.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER P.C. Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. **Eur J Clin Invest**. v. 30, n. 3, p. 260-274, 2000.

YATES, C. M.; CALDER, P.C.; RAINGER E. G. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. **Pharmacol Ther**. v.141, n. 3, p. 272-282, 2014.

ZHENG, J. S.; HU, X. J.; ZHAO, Y. M.; YANG, J.; LI, D. 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**. v. 27, n.346, p. 3706, 2013.

ZHU, M. W.; TANG, D. N.; HOU, J.; WEI, J. M.; HUA, B.; SUN J. H. *et al*. Impact of fish oil enriched total parenteral nutrition on elderly patients after colorectal cancer surgery. **Chinese Med J**. v.125, n. 2, p. 178-181, 2012.

ZINGG, J. M.; AZZI, A. Non-antioxidant activities of vitamin E. **Curr Med Chem**. v. 11, n. 9, p. 1113-1133, 2004.

***ANEXOS***

---

***ANEXO 1***

---

**Classificação BI-RADS**  
**(Breast Imaging Reporting and Data System)**

<b>Categoria</b>	<b>Interpretação</b>	<b>Risco de Câncer</b>	<b>Conduta</b>
<b>BI-RADS 0</b>	Necessidade de complementação	–	Exames adicionais
<b>BI-RADS 1</b>	Mamografia normal	0,05%	Controle anual a partir dos 40 anos
<b>BI-RADS 2</b>	Achados benignos	0,05%	Controle anual a partir dos 40 anos
<b>BI-RADS 3</b>	Achados provavelmente benignos	2 a 3%	Repetir em 6 meses
<b>BI-RADS 4</b>	Achados suspeitos para malignidade		
<b>(A, B, C)</b>	A – Baixa suspeita	5% (2 a 10%)	Biópsia
	B – Intermediária suspeita	25% (11 a 40%)	Biópsia
	C – Moderada suspeita	70% (41 a 74%)	Biópsia
<b>BI-RADS 5</b>	Achados altamente suspeitos para malignidade	95%	Biópsia
<b>BI-RADS 6</b>	Malignidade já comprovada	100%	

Fonte: Adaptado de Menke *et al.* (2007)

### Classificação de tumores de mama

Classificação Clínica (cTNM)	
<b>cT</b>	Tumor primário
<b>Tx</b>	Tumor primário não pode ser avaliado
<b>T0</b>	Não há evidência de tumor primário
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
	Doença de Paget da papila sem tumor associado
<b>T1</b>	Tumor menor ou igual a 2 cm
	T1mic Carcinoma microinvasor
	T1a Tumor maior que 0,1 cm e menor ou igual a 0,5 cm
	T1b Tumor maior que 0,5 e menor ou igual a 1 cm
	T1c Tumor maior que 1 cm e menor ou igual a 2 cm
<b>T2</b>	Tumor maior que 2 cm e menor ou igual a 5 cm
<b>T3</b>	Tumor maior que 5 cm
<b>T4</b>	Tumor de qualquer tamanho com extensão para
	T4a Parece torácica
	T4b Edema ou ulceração da pele
	T4c 4a + 4b
	T4d Carcino inflamatório
<b>cN</b>	<b>Linfonodos Regionais</b>
<b>Nx</b>	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
<b>N0</b>	Ausência de metástase para linfonodos regionais
<b>N1</b>	Metástases para linfonodos axilares ipsilaterais móveis
<b>N2</b>	
	N2a Metástase para linfonodos axilares coalescentes ou aderidos a estruturas adjacentes
	N2b Metástase clinicamente aparente na mama interna na ausência de metástase axilar
<b>N3</b>	
	N3a Metástase para linfonodo infraclavicular
	N3b Metástase para linfonodo da mama interna e axila
	N3c Metástase para linfonodo supraclavicular
<b>cM</b>	Metástase a distância
	Mx Metástase a distância não pode ser avaliada
	M0 Ausência de metástase à distância
	M1 Presença de metástase à distância

FONTE: INCA (2004)

**Classificação clínica do câncer de mama  
grupamento por estágio**

<b>Estádio 0</b>	<b>Tis</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>Estádio I</b>	T1	N0	M0
<b>Estádio II a</b>	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
<b>Estádio IIb</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>Estádio III a</b>	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1-N2	M0
<b>Estádio III b</b>	T4	Qualquer N	M0
<b>Estádio III c</b>	Qualquer T	N3	M0
<b>Estádio IV</b>	Qualquer T	Qualquer N	M1

FONTE: INCA (2004)

## ***ANEXO 2***

---



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 estrado 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 estrado 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

**PROCOLO 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

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES  
 Comitê de Ética em Pesquisa  
 Fone/Fax: 3325-4955 - e-mail: cepesedf@saude.df.gov.br  
 SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP: 70.710-907  
 BRASÍLIA - PATRIMÔNIO CULTURAL DA HUMANIDADE



## 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.

Brasília, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



Projeto ONCONUT



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

<b>Código identificador</b>						
<b>PROJETO ONCONUT ( FICHA 1)</b>						
<b>AValiação Socioeconômica e Cultural</b>						
<p>Endereço completo: _____          _____</p> <p>CEP: _____ - _____ Bairro: _____</p> <p>Cidade: _____</p> <p>Data da entrevista: ____/____/____</p> <p>Entrevistadores: a) _____          b) _____</p> <p><i>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".</i></p>						
<p>1. Nome completo: _____          _____</p> <p>Registro HUB: _____</p> <p>Telefone residencial: _____</p> <p>Telefone comercial (ou de recados): _____</p> <p>Celular: _____</p> <p>Endereço eletrônico: _____</p>						
<p>2. Quantas pessoas residem, de forma permanente, no seu domicílio?</p> <p><i>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.</i> _____</p>						
<p>3. Qual a sua data de nascimento?          ____/____/____</p>						

Projeto ONCONUT

<p><b>4. Qual o seu estado civil?</b>  <b>ENTREVISTADOR: Leia as opções 1 a 4.</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> Casada (inclui união consensual)</li> <li>2. <input type="checkbox"/> Desquitada, divorciada ou separada</li> <li>3. <input type="checkbox"/> Viúva</li> <li>4. <input type="checkbox"/> Solteira</li> <li>5. <input type="checkbox"/> não sabe/não respondeu</li> </ol>	
<p><b>5. Até que série a senhora estudou?</b> _____</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>0. <input type="checkbox"/> menos de um ano</li> <li>1. _____ anos e _____ meses</li> </ol> <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> <ol style="list-style-type: none"> <li>0. <input type="checkbox"/> Não</li> <li>1. <input type="checkbox"/> Sim.</li> </ol>	
<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> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. R\$ _____</li> <li>2. <input type="checkbox"/> A família não tem renda</li> <li>3. <input type="checkbox"/> Não sabe/ Não respondeu</li> </ol>	
<b>DOENÇAS E TRATAMENTOS REFERIDOS</b>	
<p><b>Algum profissional de saúde disse que a Sra tem:</b></p>	
<p><b>8. Pressão alta?</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>0. <input type="checkbox"/> Não</li> <li>1. <input type="checkbox"/> Sim, toma medicação? qual? _____</li> <li>2. <input type="checkbox"/> Não lembra/não sabe</li> </ol>	
<p><b>9. Colesterol alto?</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>0. <input type="checkbox"/> Não</li> <li>1. <input type="checkbox"/> Sim, toma medicação? qual? _____</li> <li>2. <input type="checkbox"/> Não lembra/não sabe</li> </ol>	
<p><b>10. Alto nível de açúcar no sangue?</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>0. <input type="checkbox"/> Não</li> <li>1. <input type="checkbox"/> Sim, toma medicação? qual? _____</li> <li>2. <input type="checkbox"/> Não lembra/não sabe</li> </ol>	
<p><b>11. A Sra tem outra doença que precise de medicação constante?</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>0. <input type="checkbox"/> Não</li> <li>1. <input type="checkbox"/> Sim, qual: _____</li> <li>2. Medicamento, qual(is): _____</li> </ol> <p><b>ENTREVISTADOR: Anote a doença e a medicação específica.</b></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> <ol style="list-style-type: none"> <li>0. <input type="checkbox"/> Não</li> <li>1. <input type="checkbox"/> Sim, qual e por quanto tempo? _____</li> <li>2. <input type="checkbox"/> Não lembra/não sabe</li> </ol>	

Projeto ONCONUT

<p><b>4. Qual o seu estado civil?</b>  <b>ENTREVISTADOR: Leia as opções 1 a 4.</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> Casada (inclui união consensual)</li> <li>2. <input type="checkbox"/> Desquitada, divorciada ou separada</li> <li>3. <input type="checkbox"/> Viúva</li> <li>4. <input type="checkbox"/> Solteira</li> <li>5. <input type="checkbox"/> não sabe/não respondeu</li> </ol>	
<p><b>5. Até que série a senhora estudou?</b> _____</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>0. <input type="checkbox"/> menos de um ano</li> <li>1. _____ anos e _____ meses</li> </ol> <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> <ol style="list-style-type: none"> <li>0. <input type="checkbox"/> Não</li> <li>1. <input type="checkbox"/> Sim.</li> </ol>	
<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> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. R\$ _____</li> <li>2. <input type="checkbox"/> A família não tem renda</li> <li>3. <input type="checkbox"/> Não sabe/ Não respondeu</li> </ol>	
<b>DOENÇAS E TRATAMENTOS REFERIDOS</b>	
<p><b>Alguns profissionais de saúde disse que a Sra tem:</b></p>	
<p><b>8. Pressão alta?</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>0. <input type="checkbox"/> Não</li> <li>1. <input type="checkbox"/> Sim, toma medicação? qual? _____</li> <li>2. <input type="checkbox"/> Não lembra/não sabe</li> </ol>	
<p><b>9. Colesterol alto?</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>0. <input type="checkbox"/> Não</li> <li>1. <input type="checkbox"/> Sim, toma medicação? qual? _____</li> <li>2. <input type="checkbox"/> Não lembra/não sabe</li> </ol>	
<p><b>10. Alto nível de açúcar no sangue?</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>0. <input type="checkbox"/> Não</li> <li>1. <input type="checkbox"/> Sim, toma medicação? qual? _____</li> <li>2. <input type="checkbox"/> Não lembra/não sabe</li> </ol>	
<p><b>11. A Sra tem outra doença que precise de medicação constante?</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>0. <input type="checkbox"/> Não</li> <li>1. <input type="checkbox"/> Sim, qual: _____</li> <li>2. Medicamento, qual(is): _____</li> </ol> <p><b>ENTREVISTADOR: Anote a doença e a medicação específica.</b></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> <ol style="list-style-type: none"> <li>0. <input type="checkbox"/> Não</li> <li>1. <input type="checkbox"/> Sim, qual e por quanto tempo? _____</li> <li>2. <input type="checkbox"/> Não lembra/não sabe</li> </ol>	

Projeto ONCONUT

<b>21. Hormonal?</b> 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>  <b>23.</b> _____, _____ 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>  <b>24.</b> _____, _____ 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>  <b>25. O seu peso se manteve constante no último ano?</b>          0. <input type="checkbox"/> Não          1. <input type="checkbox"/> Sim, qual o peso? _____, _____ kilogramas (<i>pular para 27</i>)          2. <input type="checkbox"/> Não lembro/não sei</p> <p><b>26. Se modificou, qual foi a mudança?</b>          1. <input type="checkbox"/> Ganho _____, _____ kilogramas          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>  <b>27.</b> _____ centímetros</p> <p><i>ENTREVISTADOR: Se houver alguma intercorrência que tenha impossibilitado a medida da circunferência da cintura, descreva-a aqui:</i>          _____          _____</p>	
<p><b>BIA</b></p> <p><b>28. Resistência:</b> _____ média: _____</p> <p><b>29. Reactância:</b> _____ média: _____</p> <p><b>30. Ângulo de fase:</b> _____</p>	
<b>FINALIZAR A ENTREVISTA – fazer o <i>check-list</i></b>	

***ANEXO 5***

---



Projeto ONCO-NUT

46. Qual o óleo utilizado para cocção: _____	
47. Quantidade de óleo consumido por mês: _____ latas/frascos	
48. Quantas pessoas almoçam diariamente: _____ adultos _____ crianças  Quantas pessoas jantam diariamente: _____ adultos _____ crianças	
49. Tem hábito de adicionar algum tipo de óleo ao prato de comida? a) 1. <input type="checkbox"/> Sim      2. <input type="checkbox"/> Não  b) Quantidade: _____  <i>ENTREVISTADOR: Pergunte por óleo de soja, azeite, óleo de gergelim, maionese, molho pronto, etc.</i>	
50. Faz reutilização do óleo usado para outras refeições: 1. <input type="checkbox"/> Sim      2. <input type="checkbox"/> Não	
51. Quantos copos americanos de água bebe por dia: 1. _____ 2. Não sabe informar  <i>ENTREVISTADOR: NÃO Leia a segunda opção.</i>	
52. Tem hábito de consumir peixe: 1. <input type="checkbox"/> Sim      2. <input type="checkbox"/> Não  <i>ENTREVISTADOR: Incluir peixes enlatados como bonito, atum, sardinha, anchova, aliche, etc.</i>	
53. Quantas vezes por mês: _____	
54. Qual o tipo de peixe mais consumido: _____	