

MICHEL CARLOS MOCELLIN

**SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO DE PEIXE EM CÂNCER
COLORRETAL: EFEITOS SOBRE A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA, O ESTADO NUTRICIONAL, O PERFIL DE
ÁCIDOS GRAXOS PLASMÁTICOS E A TOLERÂNCIA À
QUIMIOTERAPIA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina em cumprimento a requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nutrição, linha de pesquisa Estudo Dietético e Bioquímico relacionado com o estado nutricional, sob a orientação do Professor Doutor Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade.

Florianópolis
2012

Mocellin, Michel Carlos

Suplementação de óleo de peixe em câncer colorretal: [dissertação] : Efeitos sobre a resposta inflamatória, o estado nutricional, o perfil de ácidos graxos plasmáticos e a tolerância à quimioterapia / Michel Carlos Mocellin ; orientador, Erasmo Benicio Santos de Moraes Trindade - Florianópolis, SC, 2012.

130 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

Inclui referências

1. Nutrição. 2. Câncer colorretal. 3. Óleo de peixe. 4. Marcadores inflamatórios. 5. Perfil de ácidos graxos plasmáticos. I. Trindade, Erasmo Benicio Santos de Moraes. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de PósGraduação em Nutrição. III. Título.

Folha de aprovação

*Dedico esta dissertação aos **meus pais**, exemplos de força e dedicação,
base da minha educação, que semearam e cuidaram com atenção e
carinho meu crescimento pessoal e profissional;*

*Aos **mestres** que souberam ensinar e guiar a direção correta para que
esse crescimento seja possível e que continue indeterminadamente;*

*Aos **pacientes**, motivo maior de toda a atividade científica;*

Àqueles que nos inspiram e fazem sempre querer continuar e melhorar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A DEUS por mais essa conquista, guiada pelos seus ensinamentos e proteção.

Ao Professor Erasmo Benicio Santos de Moraes Trindade, pela orientação, apoio, dedicação, esforço, pelos conselhos, pela cobrança, pelo incentivo a busca permanente de conhecimento, e acima de tudo, pela amizade que se construiu nesse período.

Ao professor Everson Araújo Nunes, pela significativa contribuição dada a este estudo; por disponibilizar seus conhecimentos, tempo, laboratório e materiais para que fosse possível a realização das análises dos desfechos principais.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Nutrição – UFSC, por propiciar ambientes ricos em sabedoria; por estimular a construção do conhecimento; e pela confiança depositada.

As nutricionistas, Juliana de Aguiar Pastore e Silva, Maria Emilia de Souza Fabre e Scheila Gevaerd pela contribuição no recrutamento dos pacientes e por permitir a convivência profissional: importante estímulo e exemplo.

As assistentes sociais, Adriana Góes Ulyssea, Maria Luiza Juruá Kappel, Fabiola Coral e Rosane Varella, pela importante contribuição na identificação dos pacientes elegíveis ao estudo.

Aos demais profissionais do CEPON, em especial, a Ana Claudia Mariano Nascimento pelo acolhimento e colaboração prestada.

Ao Professor David Gonzalez pelo auxílio e orientação estatística.

A mestranda Turma 2011, Carolina Quadros Camargo pelo importante trabalho na análise do perfil de ácidos graxos e pela colaboração na determinação das citocinas plasmáticas.

A também mestranda Turma 2011 Paula Fernanda de Oliveira pela ajuda na determinação das citocinas plasmáticas.

Aos Professores Luiz Claudio Fernandes e Kátia Naliwaiko – UFPR, por disponibilizar material e mão-de-obra para a análise do perfil de ácidos graxos.

Aos membros do Grupo de Estudos em Nutrição Clínica e Aplicada pelas sugestões e contribuições dadas a este estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de uma bolsa de estudos, com a qual foi possível dedicação exclusiva ao mestrado.

À empresa Phytomare® e ao professor César Damian pela doação das cápsulas de óleo de peixe.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina – FAPESC, por acreditar na relevância da proposta e assim financiá-la.

A coordenação do Programa de Pós-Graduação em Nutrição pelo auxílio prestado durante o mestrado.

Ao Laboratório Médico Santa Luzia (instituição e funcionários), em especial a Dra. Yara Medeiros, e aos funcionários Marcos Tavares de Albuquerque e a Nina ReikoTouboute por acreditar neste estudo e viabilizar a coleta de material biológico quando das limitações de nossos recursos financeiros.

Aos meus familiares que sempre me deram amor e força, valorizando meus potenciais.

As minhas “coleguinhas” (mestradas turma 2010) pelo apoio, pela convivência, pelas horas de estudo conjunto e pelos agradáveis momentos que compartilhamos nesta jornada.

A todos os meus amigos e amigas que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

A Débora Demartini e a Carine Pazza, pela amizade incondicional e preciosa.

A Lara Matté, pelo apoio, incentivo, atenção e carinho, quando dos momentos de aflição.

Aos pacientes que participaram desta pesquisa, pois sem eles nenhuma dessas páginas estaria completa.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desta dissertação de Mestrado.

“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco; à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida.”

[Goethe]

RESUMO

Células e mediadores inflamatórios são componentes essenciais do microambiente tumoral. A inflamação no câncer é sustentada pela produção de citocinas e quimiocinas pelas células imunes, tumorais e do estroma a partir da ativação de fatores de transcrição nestas mesmas células em resposta a estímulos de iniciação e promoção tumoral, ou ainda, de controle da progressão da doença (químico e/ou radioterapia). As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α apresentam papel bem definido na inflamação e seus valores estão elevados no câncer colorretal (CCR) quando comparados a indivíduos saudáveis. Entretanto, não se possui clareza quanto ao provável papel que a IL-17A possa exercer na inflamação relacionada ao câncer. Valores de PCR também encontram-se elevados no CCR, e se associam positivamente a malignidade da doença e a pior prognóstico clínico. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 (AGPI n-3), em especial os ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) encontrados no óleo de peixe, podem modular a inflamação relacionada ao câncer através da produção de metabólitos lipídicos derivados destes, que apresentam atividade pró-resolução da inflamação. Sendo assim, este ensaio clínico prospectivo, controlado e randomizado foi conduzido com o objetivo de verificar se existem alterações sobre a produção de mediadores inflamatórios, o perfil de ácidos graxos plasmáticos e indicadores do estado nutricional, com a suplementação de 2 g/dia de óleo de peixe durante nove semanas no câncer colorretal. Também pretendeu-se avaliar os efeitos da suplementação sobre a toxicidade a quimioterapia. Onze pacientes adultos com diagnóstico histopatológico de câncer colorretal atendidos no Centro de Pesquisas Oncológicas de Florianópolis, CEPON-SC, e com indicação de tratamento quimioterápico, foram randomizados para dois grupos: a) GS - suplementado diariamente com 2 g/dia de óleo de peixe encapsulado durante nove semanas (n=6), ou, b) GC - controle sem placebo (n=5). Citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-17A) foram avaliadas por ELISA; PCR pelo método turbidimétrico; albumina pelo método colorimétrico verde de bromocresol; ácidos graxos plasmáticos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC); e indicadores do estado nutricional, por antropometria. Toxicidade a quimioterapia foi relatada em entrevista. Todos os desfechos foram avaliados no dia anterior a primeira quimioterapia e nove semanas depois. TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-17A, assim como o balanço pró/anti-inflamatório e albumina sérica, não tiveram alterações significativa entres os momentos e os grupos de

estudo ($P > 0,05$). PCR apresentou comportamento inverso nos grupos, reduzindo significativamente seus valores no GS, ao passo que se elevaram no GC (GS vs GC no 9 Semanas, $p=0,045$). Relação PCR/albumina indicou um aumento no risco de complicações inflamatórias e nutricionais no GC (de baixo e médio para alto risco) enquanto que permaneceu baixo no GS. Proporção plasmática de EPA e DHA aumentaram 1,8 e 1,4 vezes, respectivamente, enquanto que AA reduziu aproximadamente 0,6 vezes com a suplementação (Basal vs 9 Semana, $p < 0,05$). Indivíduos do GS tenderam a ganhar ou preservar seu peso durante a quimioterapia. A suplementação pareceu não exercer influência sobre os relatos clínicos de toxicidade à quimioterapia. Estes resultados evidenciam que 2 g/dia de óleo de peixe durante nove semanas exercem efeitos positivos sobre a resposta inflamatória sistêmica e o estado nutricional durante a quimioterapia.

Palavras-chave: Citocinas; Perfil de ácidos graxos plasmáticos; Óleo de peixe; Estado nutricional.; Câncer colorretal.

ABSTRACT

Cells and inflammatory mediators are essential components of the tumor microenvironment. The inflammation in cancer is supported by the production of cytokines and chemokines by immune, tumor and stroma cells, starting the activation of transcription factors in these same cells in response to stimulus of tumor initiation and promotion, or even control of disease progression (chemo and / or radiotherapy). The cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α have well-defined role in inflammation, and its values are elevated in colorectal cancer (CRC) compared to healthy subjects. However, one does not have clarity on the likely role that IL-17A may play in inflammation-related cancer. CRP levels also are high in CRC, and are positively associated with malignancy of the disease and worse clinical prognosis. Fatty acids polyunsaturated n-3 (n-3 PUFA), especially the fatty acids eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) found in fish oil, can modulate cancer-related inflammation via the production of lipid metabolites derived therefrom which present activity pro-resolution of inflammation. Therefore, this prospective, controlled and randomized clinical trial was conducted in order to check whether there are changes on the production of inflammatory mediators, the plasma fatty acid profile and nutritional status indicators, with the supplementation of 2 g/day of fish oil for nine weeks in colorectal cancer patients. We also intended to evaluate the effects of supplementation on chemotherapy toxicity. Eleven adult patients with histological diagnosis of colorectal cancer treated at the Oncology Research Center of Florianópolis, CEPON-SC, and with indication of chemotherapy were randomized to two groups: a) SG - supplemented daily with 2 g/day of encapsulated fish oil for nine weeks (n = 6), or b) CG - control without placebo (n = 5). Cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-10 and IL-17A) was assessed by ELISA; CRP by the turbidimetric method; albumin by colorimetric bromocresol green; plasmatic fatty acids by high performance liquid chromatography (HPLC); and indicators of nutritional status by anthropometry. Chemotherapy toxicity was reported in an interview. All outcomes were evaluated the day before the first chemotherapy and nine weeks later. TNF- α , IL-1 β , IL-10 and IL-17A, pro/anti-inflammatory balance and serum albumin had no significant change as between the times and the study groups ($P > 0.05$). CRP showed opposite behavior in groups, significantly reducing their values in SG, while increased in CG (SG vs CG in 9 Weeks, $p = 0.045$). CRP/albumin ratio indicated an increased risk of inflammatory and nutritional complication in CG (low

and moderate to high risk) whereas it remained low in SG. Plasma proportion of EPA and DHA increased 1.8 and 1.4 fold, respectively, whereas AA reduced approximately 0.6 times with supplementation (9 Weeks vs Basal, $p < 0.05$). Individuals of SG tended to gain or maintain weight during chemotherapy. The fish oil supplementation did not seem to influence the clinical reports of toxicity to chemotherapy. These results indicate that 2 g/day of fish oil for nine weeks exert positive effects on systemic inflammatory response and nutritional status during chemotherapy in patients with colorectal cancer.

Key-words: Cytokines; Plasmatic fatty acids profile; Fish oil; Nutritional status; Colorectal cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modalidades de tratamento do câncer colorretal	32
Figura 2 – Relação entre inflamação e câncer.....	36
Figura 3 – Papel das principais citocinas no microambiente tumoral .	41
Figura 4 – Esquematização da via de biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados EPA e DHA	43
Figura 5 – Alteração na concentração plasmática segundo tipo de ácido graxo n-3 suplementado.	45
Figura 6 – Esquema da síntese de eicosanóides derivados de AA, EPA e DHA	50
Figura 7 – Fluxograma do estudo	63
Figura 8 – Fluxograma do recrutamento dos pacientes no estudo	93
Figura 9 – Índice da relação PCR/Albumina nos momentos Basal e 9 Semanas de acordo com os grupos de estudo – GS (n=6) vs GC (n=5).....	97
Figura 10 – Média das proporções dos diferentes ácidos graxos presentes no plasma dos indivíduos randomizados (n=11)	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos indivíduos portadores de câncer colorretal elegíveis para o estudo atendidos no Centro de Pesquisa Oncológicas de Florianópolis no período entre julho de 2011 a março de 2012	94
Tabela 2 – Características basais dos participantes avaliados (n=11) de acordo com os grupos de estudo para que foram randomizados	95
Tabela 3 – Valores dos marcadores de inflamação e do balanço inflamatório nos momentos Basal e 9 Semanas de acordo com os grupos de estudo - GS vs GC (n=11).....	96
Tabela 4 – Comportamento dos indicadores do estado nutricional nos momentos Basal e 9 Semanas de acordo com os grupos de estudo – GS vs GC (n=11)	99

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Características metodológicas dos estudos encontrados na busca sistemática da literatura. Parte 1	53
Quadro 2 – Características metodológicas dos estudos encontrados na busca sistemática da literatura. Parte 2	54
Quadro 3 – Composição de ácidos graxos do suplemento de óleo de peixe	61
Quadro 4 – Variáveis, suas características e indicadores para o modelo de análise	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5-FU – 5-Fluorouracil
5-FU/LV – 5-fluorouracil/leucovorin
AA – Ácido Araquidônico
AG – Ácido(s) graxo(s)
AGPI – Ácidos graxos poli-insaturados
AI – Ingestão adequada
ALA – Ácido alfa-linolênico
Cap – Cápsula(s)
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCR – Câncer Colorretal
CD(s) – Células dendrítica(s)
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
CEPON – Centro de Pesquisas Oncológicas
CHO – Carboidrato
COX – Ciclo-oxigenase
DCB – Dobra Cutânea Bicipital
DCSE – Dobra Cutânea Subescapular
DCSI – Dobra Cutânea Suprailíaca
DCT – Dobra Cutânea Tricipital
DHA – Ácido Docosahexaenóico
DNA - Ácido desoxirribonucléico
DRI's – *Dietary Reference Intake*
EGF - *Epidermal Growth Factor* (Fator de crescimento epidérmico)
EPA – Ácido Eicosapentaenóico
FAP – Polipose adenomatosa familiar
FOLFOX – 5-fluorouracil/leucovorin/oxaliplatina
GC – Grupo controle
GM-CSF – *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (Fator estimulante de colônias de macrófagos granulócitos)
GORD - Gordura
GS – Grupo suplementado
HIF1 α – *hypoxia-inducible factor 1 alpha* (Fator induzido por hipóxia-1 α)
HPLC – *High-performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alta performance)
HMGB – *High-mobility group protein* (Grupo de proteínas de alta mobilidade)
IFL – Irinotecano/5-fluorouracil/leucovorin

INF – Interferon
IL – Interleucina
IMC – Índice de Massa Corpórea
INCA – Instituto Nacional do Câncer
IPIN – Índice de Prognóstico Nutricional e Inflamatório
LT – Leucotrieno
LV – Leucovorin
LOX – lipoxigenase
MMP - *Matrix Metalloproteinase*
NA – Não aplicável
RNA – Ácido ribonucléico
NF-κB – *Nuclear Factor - Kappa B* (Fator de transcrição nuclear kappa B)
PA – Peso atual
PCR – Proteína C-reativa
PG - Prostaglandina
PGE – Prostaglandina E
PPAR - *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* (Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas)
PPGN – Programa de Pós-Graduação em Nutrição
PTN - Proteína
PUFA – *Polyunsaturated Fatty Acids* (Ácidos graxos poli-insaturados)
STAT - *signal transducer and activator of transcription* (Sinal de tradução e ativação de transcrição)
Suplem – Suplementação
TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TGF – *transforming growth factor* (Fator de crescimento transformador)
TNF – Fator de Necrose Tumoral
T_{reg} – Células T reguladoras
UL – Limite máximo de ingestão segura
EUA – Estados Unidos da América
VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de crescimento vascular endotelial)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1	CÂNCER COLORRETAL	29
2.1.1	Dados epidemiológicos.....	29
2.1.2	Screening e tratamento	30
2.1.3	A inflamação no câncer	34
2.2	SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS N-3	42
2.2.1	Aspectos bioquímicos e metabólicos	42
2.2.2	Consumo de AGPI n-3 e recomendações dietéticas.....	48
2.2.3	Implicações dos AGPI n-3 sobre a inflamação e o câncer	48
3	OBJETIVOS	57
3.1	OBJETIVO GERAL	57
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
4	POPULAÇÃO E MÉTODOS	59
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	59
4.2	AMOSTRA DE ESTUDO	59
4.3	GRUPOS DE ESTUDO	60
4.4	CARACTERIZAÇÃO DO SUPLEMENTO NUTRICIONAL DE ÓLEO DE PEIXE	60
4.5	DESENHO DO ESTUDO	61
4.6	INSTRUMENTOS E TÉCNICAS DE COLETA DE DADOS ...	62
4.6.1	Caracterização dos indivíduos	62
4.6.2	Coleta e preparo do material biológico	64
4.6.3	Avaliação dos marcadores inflamatórios	64
4.6.3.1	Citocinas plasmáticas	64
4.6.3.2	Proteína C-reativa	65
4.6.3.3	Albumina	66
4.6.4	Relação proteína C-reativa/albumina	66
4.6.5	Determinação da composição de ácidos graxos plasmáticos ..	66
4.6.5.1	Extração lipídica	66
4.6.5.2	Saponificação dos extratos lipídicos	67
4.6.5.3	Derivatização dos extratos lipídicos.....	67
4.6.5.4	Análise de ácidos graxos por HPLC	68
4.6.6	Avaliação do estado nutricional	68
4.6.6.1	Antropometria.....	68
4.6.6.2	Indicadores do estado nutricional	69
4.6.6.2.1	Índice de massa corpórea - IMC.....	69
4.6.6.2.2	Percentual de perda de peso.....	69
4.6.6.3	Composição corporal	69
4.6.7	Avaliação da toxicidade à quimioterapia	69
4.6.8	Quantificação da ingestão alimentar	70

4.7	MODELO DE ANÁLISE	71
4.8	TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	73
4.9	ASPECTOS ÉTICOS	73
5	RESULTADOS.....	75
5.1	MANUSCRITO.....	75
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
	REFERÊNCIAS	103
	APÊNDICE A – Formulários para registro dos dados.....	119
	APÊNDICE B - Formulário para registro da ingestão das cápsulas	125
	APÊNDICE C - Guia de solicitação de exames para pesquisa clínica	127
	APÊNDICE D - Termo de consentimento livre e esclarecido	129

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o termo comum usado para representar todos os tumores malignos. Tumor, por sua vez, sinônimo de neoplasma, é uma massa anormal de tecido, cujo crescimento ultrapassa e não é coordenado com o dos tecidos normais, persistindo da mesma maneira excessiva após a interrupção dos estímulos que deram origem a mudança (WILLIS, 1952).

Não obstante, a terminologia câncer colorretal (CCR) é usada para representar o grupo de tumores malignos que se desenvolvem na porção terminal do trato gastrointestinal, abrangendo a região anatômica que se estende do ceco e apêndice vermiforme até os limites distais do reto (SOBIN; WITTEKIND, 2002).

Seu processo de carcinogênese é atribuído ao acúmulo de múltiplas mutações somáticas que envolvem a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais, os quais são responsáveis pelo desenvolvimento de um adenoma de potencial maligno crescente a partir de uma célula colônica normal (chamados de pólipos adenomatosos), e posteriormente, um carcinoma invasivo (FEARON; VOGELSTEIN, 1990). Sua iniciação pode estar envolvida com fatores genéticos hereditários e ambientais, e cerca de um quarto de todos os casos de CCR podem ter origem a partir de doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn e a colite ulcerativa (HISAMUDDIN; YANG, 2006).

O surgimento de células tumorais em sítios de inflamação foi descrito pela primeira vez em 1863 por Rudolf Virchow, o qual observou que os tumores sempre estavam fixados em locais de inflamação crônica (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Todavia, não só o câncer pode estar inserido em um macroambiente inflamatório, mas como o próprio tumor representa um microambiente com características de inflamação (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010). Estas características incluem a presença de células e mediadores inflamatórios, remodelação tecidual, e angiogênese (BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005).

No processo de carcinogênese, fatores de transcrição nuclear são ativados e células inflamatórias recrutadas, e em resposta produzem e secretam citocinas pró-inflamatórias resultando na instalação de um microambiente inflamatório associado ao tecido tumoral (MANTOVANI et al., 2008). Além disso, o próprio tratamento da doença, ao utilizar agentes terapêuticos nocivos ou técnicas altamente invasivas, resulta em um estado caracterizado pela migração e ativação

de leucócitos e reações orgânicas sinalizadas pela produção de quimiocinas e citocinas, estimulando uma resposta inflamatória local e sistêmica e, desta forma, contribuindo com a inflamação relacionada ao câncer (SCHWENK, 2000; HAGEMANN; BALKWILL; LAWRENCE, 2007).

São várias as consequências de uma resposta inflamatória exacerbada, dentre as quais citam-se: crescimento e sobrevivência do câncer; invasão, migração e metástases de células tumorais; resposta alterada a hormônios e agentes quimioterápicos e; depleção do estado nutricional. Como resultado final tem-se um pior prognóstico clínico do paciente (MANTOVANI et al., 2008).

Mediante isto, tem crescido o interesse por agentes farmacológicos ou dietéticos capazes de modular a inflamação. Vários estudos clínicos demonstraram que ingestão de ácidos graxos poli-insaturados da família n-3 (AGPI n-3), especialmente os ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), foram capazes de modificar reações autoimunes e inflamatórias suprimindo a transformação neoplásica, a angiogênese e o crescimento de células tumorais (HARDMAN, 2004).

EPA e DHA, encontrados principalmente no óleo de peixe dietético, são rapidamente incorporados aos fosfolipídios de membrana de células imunitárias e tumorais sugerindo potenciais alterações nas suas funções em virtude da modificação na composição da membrana (SIMOPOULOS, 2002). Evidências apontam a ingestão de AGPI n-3 para melhorar a eficácia de quimioterápicos (CHA; MECKLING; STEWART, 2002; DeGRAFFENRIED et al., 2003; JORDAN; STEIN, 2003), modular a produção de citocinas inflamatórias (ZHU et al., 2012; MATSUDA et al., 2006; BRAGA et al., 2002), e promover o ganho de peso em pacientes com caquexia do câncer (MOSES et al., 2004).

Entretanto, os estudos que apontam para os efeitos positivos sobre a inflamação no câncer colorretal utilizaram doses > 2 g/dia de AGPI n-3 como protocolo de suplementação e muitas vezes como constituintes de formulações líquidas acrescidas de outras substâncias com potencial atividade imunomoduladora como o RNA e a arginina. Ainda, estudos com os mesmos objetivos que utilizaram óleo de peixe isolado como intervenção são escassos, da mesma forma que estudos que avaliaram os efeitos desta suplementação em indivíduos em quimioterapia e/ou sobre a produção de IL-17A. Entende-se, portanto, que há uma necessidade de estudos que avaliem a ação de uma suplementação de óleo de peixe isolado fonte de AGPI n-3, em humanos portadores de neoplasia colorretal durante o tratamento quimioterápico.

Desta forma as problemáticas que surgem e orientam este estudo são: a) a suplementação de 2 g/dia de óleo de peixe isolado contendo aproximadamente 600 mg de AGPI n-3 durante nove semanas altera marcadores de inflamação, o perfil de ácidos graxos plasmáticos e o estado nutricional de indivíduos portadores de câncer colorretal em quimioterapia?; e, b) o mesmo protocolo de suplementação exerce influência sobre os sinais e sintomas relacionados a toxicidade à quimioterapia?

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER COLORRETAL

2.1.1 Dados epidemiológicos

Os dados do mais recente estudo sobre as estatísticas do câncer a nível mundial, realizado pela compilação das estatísticas nacionais de registros de câncer no ano de 2008, chamado de projeto GLOBOCAN 2008, atribuem ao câncer colorretal a terceira posição no ranking dos tipos de câncer mais incidentes nos homens e nas mulheres, correspondendo por cerca de 1,2 milhões (10%) dos casos de câncer registrados naquele ano (FERLAY et al., 2010).

A incidência do CCR tem aumentando em alguns países onde o risco foi historicamente baixo (Japão). Os maiores aumentos estão na Ásia (Japão, Kuwait, Israel) e Europa Oriental (República Tcheca, Eslováquia, Eslovénia). As taxas entre os homens na República Tcheca, Eslováquia e Japão não só superou as taxas observadas em países desenvolvidos de alto risco (Estados Unidos, Canadá e Austrália), mas como, continuam a aumentar (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

O cenário atual mostra a estabilização das taxas de incidência na maioria dos países ocidentais do norte europeu, com ressalvas, ao aumento expressivo que tem sido observado na Espanha, que pode estar relacionado com o aumento da prevalência da obesidade naquele país; a diminuição da incidência do CCR nos Estados Unidos, refletindo parcialmente o aumento na detecção e remoção de lesões pré-cancerosas; e o aumento em vários países asiáticos e orientais da Europa, podendo refletir as alterações nos fatores de risco para o CCR que estão associados com a “ocidentalização” e a elevada prevalência de obesidade e do hábito de fumar. Em contraste com as tendências de incidência, as taxas de mortalidade por este tipo de câncer têm diminuído em um grande número de países em todo o mundo e são provavelmente atribuídas ao *screening* e/ou tratamentos mais eficazes. No entanto, aumento nas taxas de mortalidade continua a ocorrer em países que possuem recursos mais limitados, como o México, Brasil, Romênia e Rússia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

Dados de incidência e mortalidade de CCR na população brasileira estão disponíveis somente até o ano de 2005. Para minimizar o atraso na estatística do registro nacional de câncer, o INCA (Instituto Nacional do Câncer) publica a cada dois anos uma estimativa do número

de casos esperados para as regiões, estados e suas respectivas capitais. Sendo assim, se esperava para o período de 2010/2011 28.110 novos casos de CCR, assim distribuídos para a Região Sul: total = 6.150 novos casos; Rio Grande do Sul = 3.130 novos casos; Santa Catarina = 960 novos casos; e Paraná = 2.060 novos casos. Para a cidade de Florianópolis se estimou a incidência de 100 novos casos nesse período (BRASIL, 2009). Já para o biênio 2012/2013, a prospecção aponta aumento de aproximadamente 7% na incidência nacional para este tipo de câncer, totalizando 30.140 novos casos (14.180 em homens e 15.960 em mulheres). Deste total, se esperam 850 novos casos para o estado de Santa Catarina, sendo 80 destes para a capital Florianópolis (BRASIL, 2011).

As taxas de incidência sugerem que o risco de CCR aumenta com a idade (91% dos casos são diagnosticados em indivíduos com faixa etária maior ou igual a 50 anos) (FERLAY et al., 2010). Outros estudos mostram que fatores modificáveis como obesidade, sedentarismo, dieta rica em carne vermelha ou processada, elevado consumo de álcool, tabagismo e baixa ingestão de frutas e legumes aumentam as chances de desenvolvimento deste tipo de câncer. Fatores hereditários que incluem história pessoal ou familiar de CCR e/ou pólipos, história pessoal de doença inflamatória crônica do intestino, e certas doenças genéticas hereditárias (por exemplo, síndrome de Lynch, e a polipose adenomatosa familiar [FAP]) também são fatores de risco (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

Por outro lado, o consumo de alimentos fontes de cálcio e de níveis mais altos de vitamina D parece desempenhar efeito protetor contra o CCR. Estudos sugerem que o uso regular de anti-inflamatórios, como aspirina e terapia hormonal na menopausa também reduzem o risco (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

2.1.2 Screening e Tratamento

O CCR em estágio inicial normalmente não apresenta sintomas, por isso, a triagem é geralmente necessária para a detecção precoce. Doença em estágio avançado pode causar sangramento retal, sangue nas fezes, mudança no hábito intestinal, cólicas e dor no abdome inferior. Em alguns casos, a perda de sangue a partir do câncer leva a anemia, fazendo com que os sintomas tais como fraqueza e fadiga excessiva também apareçam e estejam relacionadas com o CCR (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

O *screening* pode prevenir o CCR através da detecção e remoção de lesões pré-cancerosas. A seleção pode também detectar câncer em fase precoce. A recomendação atual para o *screening* na maioria dos países é para que se inicie aos 50 anos para homens e mulheres que estão em risco médio de desenvolver este tipo de câncer. Pessoas com maior risco devem começar a fazer exames em uma idade mais jovem e pode precisar ser testado com mais frequência (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

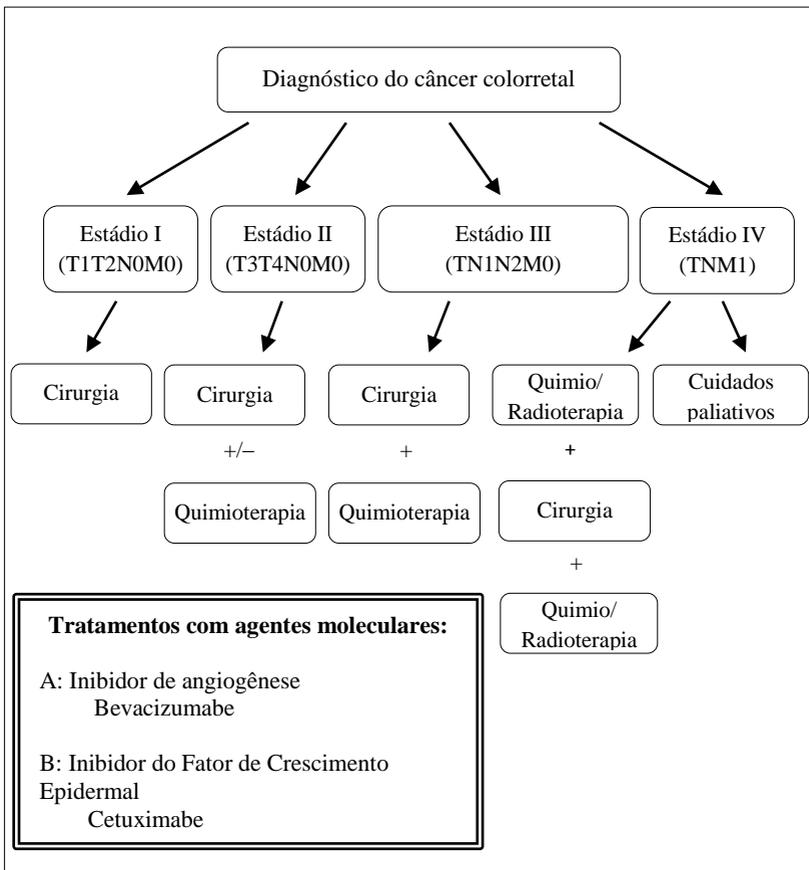
São vários os métodos aceitos para o *screening* do CCR, incluindo o teste de sangue oculto nas fezes, a sigmoidoscopia flexível, o contraste duplo enema e a colonoscopia. Para a triagem, a colonoscopia se mostra mais sensível à detecção de alterações tumorais na mucosa intestinal, mas por exigir a presença de um examinador qualificado, do alto custo, e da menor comodidade para o paciente, o uso deste método se mostra inviável em países com poucos recursos e, portanto, o teste de sangue oculto nas fezes, que é barato e fácil de realizar, é uma opção de *screening* mais prático (CENTER et al., 2009).

Uma vez diagnosticado, o CCR é classificado em estádios, considerando critérios universais, os quais dizem respeito sobre a extensão da infiltração tumoral e da disseminação para linfonodos e outros órgãos (SOBIN; WITTEKIND, 2002). Dependendo da localização intestinal, do estágio da doença e da saúde geral do paciente, vários tipos de tratamento podem ser utilizados, individuais ou combinados (Figura 1).

A ressecção total do tumor é o tratamento primário, retirando a parte do intestino afetada e os linfonodos próximos a esta região. Após o tratamento cirúrgico, a radioterapia associada ou não à quimioterapia é utilizada para diminuir a possibilidade de recidiva (BRASIL, 2003).

Tanto a radio quanto a quimioterapia pode ser administrada com o objetivo de destruir qualquer célula tumoral que possa ter permanecido no organismo após o tratamento cirúrgico, bem como controlar o crescimento tumoral. Adicionalmente, a quimioterapia também pode ser empregada com o intuito de aliviar os sintomas ocasionados pela doença (BRASIL, 2003).

O primeiro agente quimioterápico antineoplásico utilizado no tratamento do adenocarcinoma colorretal foi o 5-fluorouracil (5-FU), o qual foi utilizado por mais de 40 anos como terapia padrão. Nos anos 80 este mesmo quimioterápico passou a ser combinado com ácido fólico – denominado de leucovorin (LV) que age como modulador bioquímico, melhorando a sobrevida dos pacientes quando comparado com a monoterapia de 5-FU. No final dos anos 90, foi introduzido um novo

Figura 1 - Modalidades de tratamento do câncer colorretal.

Abreviações: T, tumor; N, linfonodo; M, metástase. T1: invasão tumoral até a submucosa; T2: invasão tumoral através da submucosa até a muscular própria; T3: crescimento tumoral através da muscular própria, alcançando as camadas mais externas do cólon ou reto, não peritonizados; T4: o câncer invade outros órgãos ou tecidos próximos. N0: sem câncer nos gânglios linfáticos; N1: as células cancerosas são encontradas em 1 a 3 linfonodos próximos; N2: as células cancerosas são encontradas em quatro ou mais linfonodos regionais. M0: ausência de metástase à distância; M1: o câncer se espalhou para órgãos distantes ou conjunto de linfonodos distantes. Fatores de alto risco de doença em estágio II compreendem idade, tumor diferenciado, perfuração / oclusão, T4, e gânglios linfáticos examinados abaixo de 12.

Fonte: Traduzido de Cai, Dupertuis e Pichard (2012).

fármaco no mercado, denominado irinotecano, indicado inicialmente como monoterapia para o tratamento do câncer colorretal refratário à terapia com 5-FU/LV ou recidivado. Posteriormente, esse fármaco foi associado ao esquema 5-FU/LV, sendo criado então um novo esquema quimioterápico, conhecido como IFL (irinotecano/5-fluorouracil/leucovorin). A nova terapia apresentou melhora nas taxas de resposta objetiva, na sobrevida livre de progressão e na sobrevida mediana que foi de 14,8 meses. Na mesma época surgiu a oxaliplatina (um agente com mecanismo de ação semelhante aos derivados da platina), que foi associada ao esquema de 5-FU/LV infusional (FOLFOX), prolongando a sobrevida mediana para 16,2 meses. Mais recentemente, houve a descoberta de fármacos derivados da biotecnologia (cetuximabe e o bevacizumabe), designados de anticorpos monoclonais, que são capazes de reconhecer e ligar-se a antígenos tumorais específicos (alvos) e desencadear respostas imunológicas, poupando células normais e provocando efeitos menos tóxicos que a quimioterapia tradicional (TONON; SECOLI; CAPONERO, 2007).

Não obstante, a evolução natural da doença neoplásica, assim como os métodos terapêuticos adotados no tratamento do câncer, impactam sobre o consumo alimentar e conseqüentemente sobre o estado nutricional destes pacientes, resultando mais comumente em desnutrição; menor tolerância ao tratamento e às infecções oportunistas; pior prognóstico, refletido no aumento da morbimortalidade; e diminuição da qualidade de vida. Deste modo, a terapia nutricional orientada de forma adequada surge como um adjuvante no tratamento do câncer, provendo energia e nutrientes suficientes para a manutenção da homeostase corporal e prevenindo a ocorrência dos fatores associados à má nutrição (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2010).

Alguns nutrientes em específico podem promover uma série de desfechos positivos no tratamento do câncer. O ácido eicosapentaenóico (EPA), por exemplo, foi demonstrado para potencializar os efeitos de alguns fármacos quimioterápicos antineoplásico e da radiação ionizante (HARDMAN, 2004). Outros, como ácidos graxos da família n-6 e saturados, ao participarem de reações orgânicas geram metabólitos ativos que estimulam o crescimento tumoral, podendo interferir de forma negativa na terapêutica.

Nesse complexo universo de ação/interação entre nutriente-doença, a direção do efeito (positivo, nulo ou negativo) que os nutrientes exercem sobre o câncer e seu tratamento depende em grande parte da sua dosagem. Normalmente, para apresentar influência sobre algum aspecto celular em curto prazo se faz necessária uma quantidade maior

que a encontrada na constituição normal dos alimentos. Sendo assim, na prática clínica atual, tem-se adotado o uso de suplementos de nutrientes isolados ou combinados que concentram tais nutrientes de interesse com evidências científicas de eficácia.

2.1.3 A inflamação no câncer

A inflamação é um mecanismo normal de defesa do organismo a infecções e outras desordens. Ao se tornar excessiva, pode gerar danos irreparáveis ao tecido do hospedeiro, resultando em doenças agudas e crônicas (CALDER, 2008). Algumas características inerentes à inflamação estão presentes também no câncer. Esta relação pode ser vista pela presença de células e mediadores inflamatórios no tecido tumoral, remodelação tecidual e angiogênese (BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005).

Até 20% de todos os cânceres surgem em associação com a inflamação crônica e a maioria, senão todos, dos tumores sólidos contêm infiltrado inflamatório. Células do sistema imune têm um amplo impacto na iniciação, crescimento e progressão tumoral e muitos desses efeitos são mediados por citocinas pró-inflamatórias (GRIVENNIKOV; KARIN, 2011).

Mantovani et al. (2008) explicam a conexão entre inflamação e câncer considerando duas vias: extrínseca e intrínseca. A primeira surge de condições infecciosas ou inflamatórias que podem promover o desenvolvimento de câncer, como a doença inflamatória intestinal, que aumenta o risco de câncer colorretal. As prováveis explicações para o desenvolvimento tumoral a partir de uma infecção ou inflamação incluem: regeneração tecidual contínua encontrada na resposta inflamatória, proporcionando maiores chances de ocorrência de mutações, e então de proliferação dessas células mutadas; a criação de uma microrregião mutagênica, através da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelas células imunes recrutadas; e promoção de angiogênese, classicamente presente no processo inflamatório e fundamental para o desenvolvimento tumoral (COUSSENS; WERB, 2002). A segunda surge de alterações genéticas que causam câncer e inflamação, dentre as quais citam-se: ativação de vários tipos de oncogenes por mutação; rearranjo ou amplificação cromossomal e; inativação de genes supressores tumorais. As células já transformadas produzem mediadores inflamatórios que acabam resultando na

instalação de um microambiente inflamatório (MANTOVANI et al., 2008; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

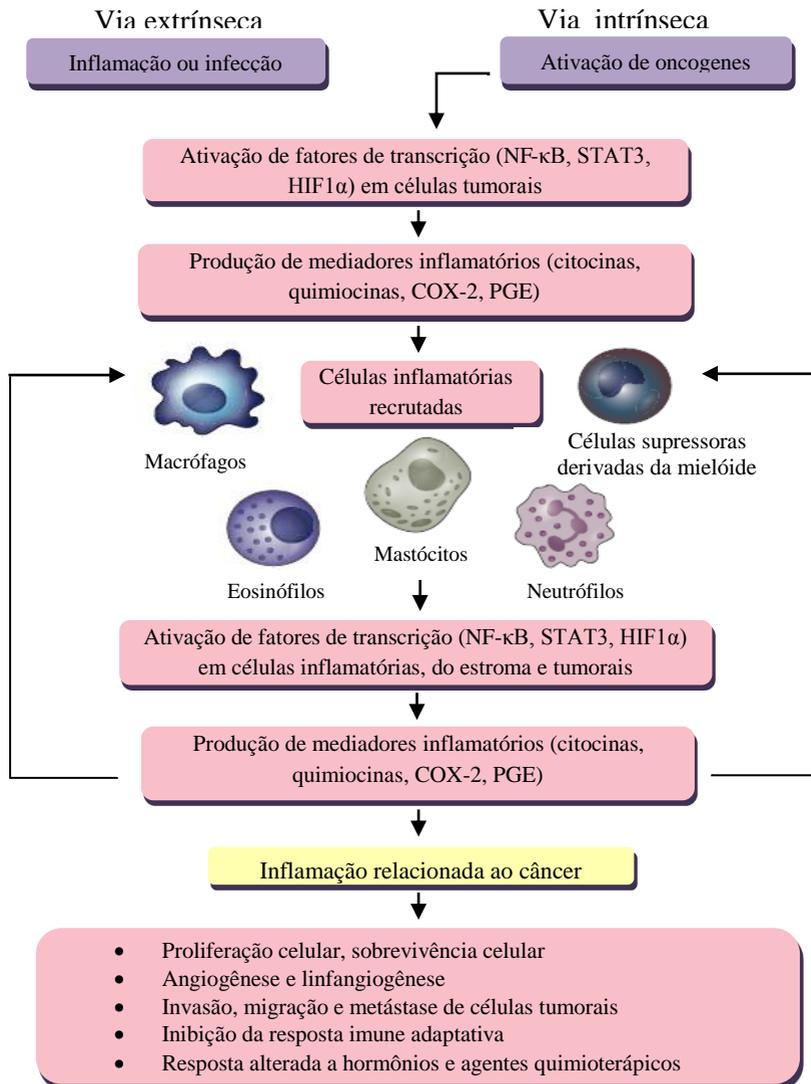
As duas vias convergem, resultando em ativação de fatores de transcrição, como o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), sinal de tradução e ativação de transcrição 3 (STAT3) e o fator induzido por hipóxia-1 α (HIF1 α) em células tumorais. Estes fatores de transcrição coordenam a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, assim como a produção da ciclo-oxigenase-2 (COX-2). Os mediadores inflamatórios, em conjunto, recrutam e ativam leucócitos, mastócitos, macrófagos e eosinófilos. As citocinas produzidas pelas células tumorais ativam nas células imunitárias recrutadas e do estroma os mesmos fatores de transcrição previamente ativados em células tumorais. Como resultado tem-se a produção de mais mediadores inflamatórios e concretização do microambiente inflamatório relacionado ao câncer (MANTOVANI et al., 2008) (Figura 2).

Por outro lado, danos causados às células cancerosas pelo emprego de agentes terapêuticos (radio e/ou quimioterapia) estimulam a liberação de moléculas sinalizadoras, como exemplo, o grupo de proteínas de alta mobilidade 1 (HMGB1), quimiocinas e citocinas a partir de células necróticas e apoptóticas. As proteínas HMGB1 estimulam o recrutamento quimiotático de monócitos, células T e células dendríticas (CD) para o tecido tumoral afetado; induz a apresentação de antígenos por CD e a geração de células T antígeno-específico; além de estimular a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas CD e/ou macrófagos ativados, contribuindo desta forma, com a inflamação associada ao tumor. (HAGEMANN; BALKWILL; LAWRENCE, 2007).

Logo, a inflamação no câncer estimula respostas pró-tumorais como: proliferação e sobrevivência de células cancerosas; angiogênese e linfangiogênese; invasão, migração e metástase; inibição da resposta imune adaptativa; além de resultar em resposta alterada a hormônios e a agentes quimioterápicos (MANTOVANI et al., 2008).

A infiltração de neutrófilos no tecido tumoral constitui a primeira linha de defesa contra lesão ou infecção. Quando as reações contra patógenos/antígenos tornam-se excessivas ou inapropriadas podem contribuir para o crescimento e propagação do câncer e para a imunossupressão associada ao desenvolvimento da doença (CHIN; PARKOS, 2007).

O NF- κ B é a chave que coordena a inflamação. Trata-se de um fator de transcrição onipresente em todos os tipos de células e no cito-

Figura 2- Relação entre inflamação e câncer.

Abreviações: NF- κ B, fator de transcrição nuclear kappa B; STAT3, sinal de tradução e ativação de transcrição 3; HIF1 α , fator induzido por hipóxia-1 α ; COX-2, ciclo-oxigenase-2; PGE, prostaglandina E.

Fonte: Traduzido e adaptado de Mantovani et al. (2008).

plasma, na forma “*resting stage*”. Sua atividade é regulada por outros fatores de transcrição tais como STAT3, p53, PPAR- γ e beta-catenina. Por muitas razões NF- κ B e produtos de genes regulados por ele desempenham um papel crucial na tumorigênese: 1) quase todos os produtos de genes ligados à inflamação são regulados pela ativação de NF- κ B (por exemplo, TNF, IL-1, IL-6, quimiocinas, COX-2, 5-LOX, PCR); 2) NF- κ B é ativado em resposta ao tabaco, o *stress*, agentes dietéticos, obesidade, álcool, agentes infecciosos, radiação e os estímulos ambientais, que juntos respondem por até 95% de todos os cânceres; 3) NF- κ B tem sido associado com a transformação de células normais em células com potencial cancerígeno; 4) NF- κ B é constitutivamente ativo nas células tumorais; 5) NF- κ B também tem sido associado com a sobrevivência das células-tronco cancerosas (células progenitoras que foram adquirindo potenciais de autorrenovação); 6) NF- κ B regula a expressão da maioria dos produtos de genes antiapoptóticos associado com a sobrevivência do tumor; 7) NF- κ B regula também a produção de genes ligados à proliferação de tumores, como c-myc, ciclina D1 e COX-2. Além disso, a maioria dos fatores de crescimento (por exemplo, EGF, TNF, IL-6) ligada à proliferação de tumores ativam NF- κ B, ou são regulados por este fator de transcrição; 8) NF- κ B controla a expressão de genes relacionados com angiogênese, invasão e metástase de câncer (por exemplo, MMP, moléculas de adesão e VEGF); 9) enquanto a maioria dos agentes cancerígenos ativam NF- κ B, a maioria dos agentes quimiopreventivos foram comprovados como supressores da ativação deste fator de transcrição (KARIN, 2006; AGGARWAL; GEHLOT, 2009).

Os mediadores e as células inflamatórias estão envolvidos na migração, invasão e metástase de células malignas, não apenas nos estágios iniciais da oncogênese (MANTOVANI et al., 2008).

A prostaglandina E₂, derivada da COX-2, pode promover a iniciação e a progressão do tumor por estimular a proliferação celular, angiogênese, migração celular e invasão, enquanto inibe apoptose (CHAPKIN; MCMURRAY; LUPTON, 2007).

A capacidade invasiva de células malignas aumenta na presença de citocinas inflamatórias como TNF, IL-1 e IL-6, possivelmente, pela regulação positiva na expressão de receptores de quimiocinas estimulada por estas citocinas (BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005). Os receptores de quimiocinas e seus ligantes dirigem o movimento de células durante a inflamação, o câncer e a manutenção da homeostase dos tecidos, pois a presença destes receptores afeta a motilidade e o poder de invasão e de sobrevivência

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

TNF, produzido por células malignas, células mielóides e outras células presentes no microambiente tumoral, atua principalmente através do receptor TNF-1 de forma autócrina e parácrina. Ações autócrinas do TNF documentadas na literatura incluem danos genéticos às células malignas ou células com potencial maligno, aumentando a sobrevivência de células malignas e induzindo transição epitelial-mesenquimal. TNF também induz a expressão de TNF suplementares, bem como o aumento da produção de outras citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas nas células malignas. Esta combinação de citocinas e quimiocinas também age sobre, e é produzida por, células mielóides no microambiente do tumor e pode contribuir para a manutenção do fenótipo e ações do tumor associadas aos macrófagos, os quais podem estimular o remodelamento da matriz extracelular e causar diferenciação das células progenitoras mielóides endoteliais, contribuindo para a angiogênese. Estas ações de TNF, e citocinas e/ou quimiocinas relacionadas ao TNF, também podem contribuir para a imunossupressão linfocitária local. O resultado final é maior crescimento do tumor primário, a propagação metastática facilitada e regulação da extensão e do fenótipo da infiltração de leucócitos, bem como, contribuição na angiogênese. O TNF também tem sido implicado na produção de derrame pleural e resistência à quimioterapia (BALKWILL, 2009).

IL-1 β é outra citocina que conforme já descrito, é regulada por NF- κ B. Parece ter forte associação com o crescimento e a progressão de carcinoma gástrico humano (KAI et al., 2005), câncer colorretal (MIKI et al., 2004), câncer esofágico (DEANS et al., 2006) e câncer de ovário (PUNNONEN et al., 1991). Os possíveis mecanismos envolvidos incluem a indução da expressão de genes metastáticos, tais como MMP, e a estimulação da produção de proteínas e fatores de crescimento angiogênicos pelas células do infiltrado, como VEGF, IL-8, IL-6, TNF- α e TGF β (LEWIS et al., 2006).

A IL-10 é classicamente tida em imunologia como uma citocina com potencial anti-inflamatório. Secretada constitutivamente por algumas células tumorais, e independentemente das razões para sua secreção, a IL-10 parece ter duas principais funções dentro do microambiente tumoral: (1) aumentar a atividade das células “natural killer” com consequente morte das células tumorais, acompanhada da liberação de antígeno e, possivelmente, apresentação destes pelas

células apresentadoras de antígenos; e (2) inibir a maturação das células apresentadoras de antígenos com conseqüente manutenção da capacidade de absorção de antígenos e promover a polarização de macrófagos para um fenótipo M2, que leva à angiogênese, remodelação e reparação tecidual. IL-10 inibe o recrutamento e ativação de mediadores imunes adaptativos mantendo um estado inflamatório crônico no microambiente tumoral (MOCELLIN et al, 2003).

Os primeiros relatos de pesquisas envolvendo IL-17 na literatura científica constam a partir de 1995. Trata-se de uma família de seis citocinas: IL-17A - F. Os membros dessa família melhores caracterizados até o momento são as IL-17A, E e F. A IL-17A é expressa principalmente por células T CD4⁺ ativadas. Tem função essencial de recrutamento de neutrófilos (químioatratante) (KAWAGUCHI et al., 2004). Também induz a produção de outras citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas como a IL-6, IL-8 e fator estimulante de colônias de macrófagos granulócitos (GM-CSF), por células do tecido residente e do sistema imune inato, como fibroblastos, células epiteliais e neutrófilos (REYNOLDS; ANGKASEKWINAI; DONG, 2010). Com relação ao câncer, o seu papel é ainda pouco entendido. IL-17, como uma citocina pleiotrópica, pode suprimir ou promover o crescimento do tumor, uma vez que foi demonstrado que estimulou o crescimento tumoral através da indução de vascularização ou aumento da inflamação, porém, outros estudos revelaram também funções opostas para esta citocina em tumores humanos. Parece que IL-17 pode desempenhar papéis distintos no câncer, dependendo da imunogenicidade do tumor, o estágio de desenvolvimento, e o impacto da inflamação e angiogênese na patogênese do tumor (HUS; MACIAQ; ROLINSKI, 2010).

Contudo, estudos mais recentes têm apontado IL-17 como uma citocina pró-inflamatória e pró-tumorigênica. Meng et al. (2012) observaram que concentrações de IL-17 encontram-se elevadas no câncer gástrico comparados a indivíduos saudáveis, associando-se com o estágio clínico do tumor. Também constataram que está envolvida com a progressão do câncer por promover angiogênese no ambiente tumoral. Não só o mesmo foi observado em um estudo experimental com câncer de próstata, mas como também se encontrou evidências de que IL-17 está envolvida com a formação do adenocarcinoma prostático (ZHANG et al., 2012). Outros estudos realizados como modelo experimental apontam IL-17 como promotora da carcinogênese colorretal (WU et al., 2009; CHAE et al., 2010).

As células cancerosas coexistem com células do sistema imunológico: macrófagos associados ao tumor, células T-reguladoras (Treg), células dendríticas e células mielóides supressoras. Macrófagos M2 e Treg são as principais fontes de citocinas anti-inflamatórias, IL-4, IL10, IL13 e fator transformador de crescimento- β (TGF β), que suprimem a imunidade anticâncer mediada por células natural killer, células T citotóxica CD8⁺ e citocinas pró-inflamatórias (IL-2 e interferon- γ [IFN- γ]), uma vez que inibem a ativação destas células e a produção das respectivas citocinas. Simultaneamente, as células cancerosas ativam células imunitárias e as usam de forma exploratória para o seu crescimento e desenvolvimento, por meio da produção de citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) que promovem diretamente o crescimento das células tumorais, em um ambiente imunossuprimido (SERUGA et al., 2008) (Figura 3).

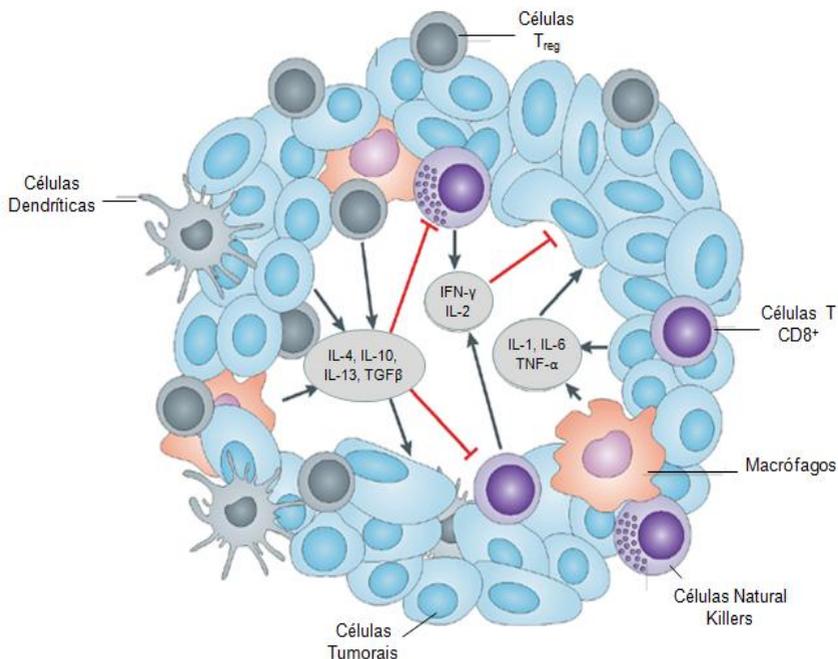
Ao comparar os níveis séricos das citocinas pro-inflamatórias de indivíduos com CCR com um controle saudável, Szkaradkiewicz et al. (2009) observaram que as interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α encontravam-se em média 12, 7, 5 e 3 vezes, respectivamente, mais elevadas no grupo com doença, e que os valores deste grupo se assemelham, e até mesmo em alguns casos, são maiores que os níveis encontrados em portadores de Doença de Crohn e colite ulcerativa (doenças inflamatórias). Estes achados evidenciam a existência de um processo inflamatório crônico e permanente no CCR.

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

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

Estudo em pacientes com câncer colorretal indicou que aqueles com concentrações aumentadas de PCR sérica têm um pior prognóstico comparados com aqueles em que a concentração não se encontra elevada. Concentração sérica de PCR aumentada também foi associada

Figura 3 - Papel das principais citocinas no microambiente tumoral.



(A) IL-1, IL-6 e TNF- α , produzidas e secretadas pelas células tumorais agem sobre si e sobre células inflamatórias (macrófagos) em um ambiente imunossuprimido estimulando a proliferação das células tumorais. (B) IFN- γ e IL-2 produzidas e secretadas por células Natural Killer (NK) e células T CD8⁺ inibem a produção de IL-1, IL-6 e TNF- α pelas células tumorais. Representam a força imunitária anticâncer (C) As citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10, IL-13 e TGF β produzidas e secretadas por células T_{reg}, células tumorais e macrófagos inibem a produção de IFN- γ e IL-2 pelas células NK e T CD8⁺, inibindo consequentemente a imunidade anticâncer.

Fonte: Traduzido e adaptado de Seruga et al. (2008).

aos tumores de grande tamanho, metástases de fígado ou linfonodos e estágios avançados segundo *Durke's stage* (CHUNG; CHANG, 2003).

Otake et al. (2009) demonstraram que esta associação está presente mesmo quando se controla possíveis fatores de confusão, como hábito tabágico e obesidade. O aumento de PCR associa-se, também, com maior frequência de invasão tumoral local e risco aumentando de

recorrência em pacientes com câncer colorretal (NOZOE, et al., 1998). Segundo Shiu et al. (2008), PCR de 0,5 mg/dL no pré-operatório é fator independente de prognóstico favorável, sendo que o aumento dos valores de PCR está associado à baixa sobrevida. A partir do pós-operatório os níveis declinam lentamente. Koike et al. (2008) concluíram que PCR pode ser um potente indicador de prognóstico e terapêutico que provê valiosas informações para determinar a necessidade de quimioterapia adjuvante nos estágio II do câncer colorretal.

2.2 SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS n-3

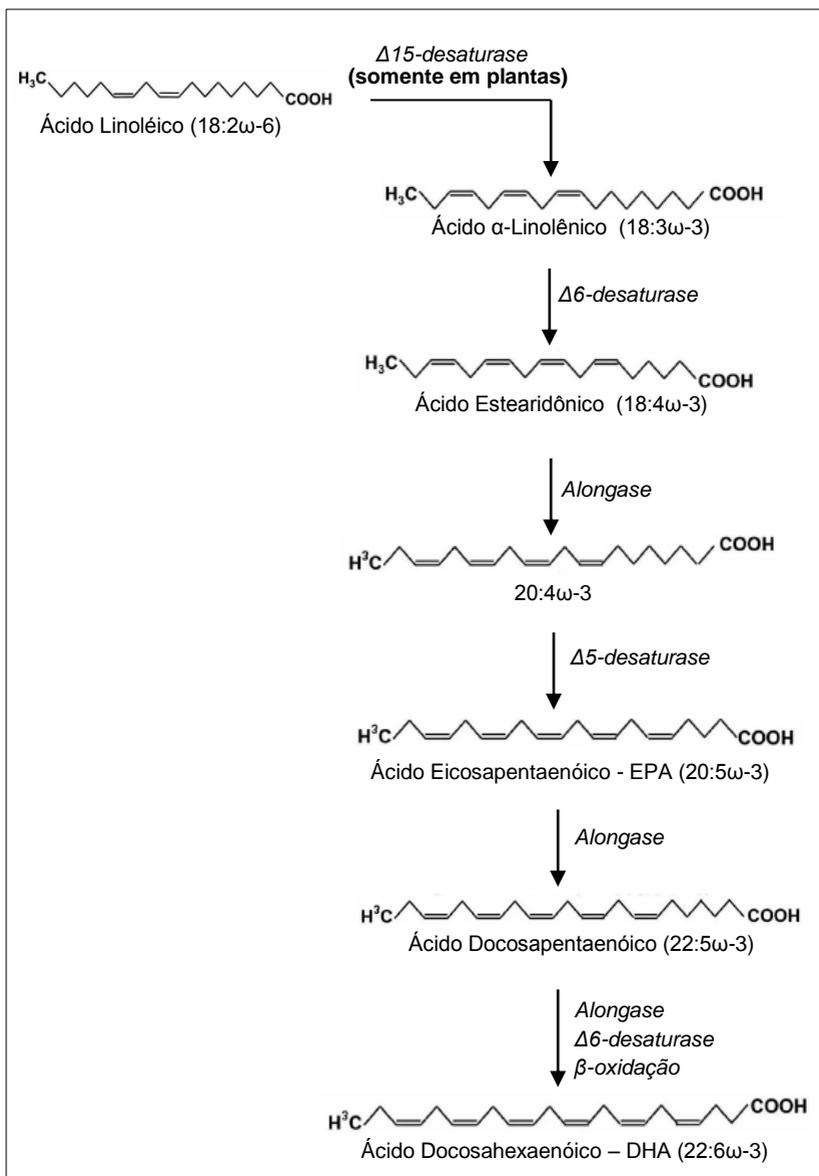
2.2.1 Aspectos bioquímicos e metabólicos

Ômega-3 (n-3) é o nome dado a uma família de ácidos graxos poli-insaturados, na qual a primeira insaturação encontra-se no carbono três. Quando formado por dezoito carbonos e três insaturações é denominado ácido alfa-linolênico (ALA) [18:3 n-3], com vinte carbonos e cinco insaturações, de eicosapentaenóico (EPA) [20:5 n-3] e com vinte e dois carbonos e seis insaturações, de docosahexaenóico (DHA) [22:6 n-3] (HARDMAN, 2004).

Apenas as plantas sintetizam o ácido graxo n-3 alfa-linolênico (ALA), uma vez que o organismo de mamíferos não possui as enzimas desaturases capazes de incluir uma dupla ligação antes do carbono cinco, e por isso, ele é considerado essencial (ROYNETTE et al., 2004). Pode ser abundantemente encontrado no óleo de linhaça, e em menor quantidade nos óleos de canola e soja, além de vegetais de folha verde escura (CALDER; DECKELBAUM, 2008).

Os seres humanos têm um mecanismo enzimático que converte ALA em ácidos graxos n-3 de cadeia longa com maior bioatividade (EPA e DHA). A interconversão ocorre no retículo endoplasmático das células hepáticas e envolve duas famílias de enzimas: alongases, que adicionam duas unidades de carbono; e desaturases, que inserem duplas ligações na molécula do ácido graxo (BURDGE; CALDER, 2005) (Figura 4).

Figura 4 - Esquematização da via de biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados EPA e DHA.



Fonte: Traduzido e adaptado de Burdge e Calder (2005).

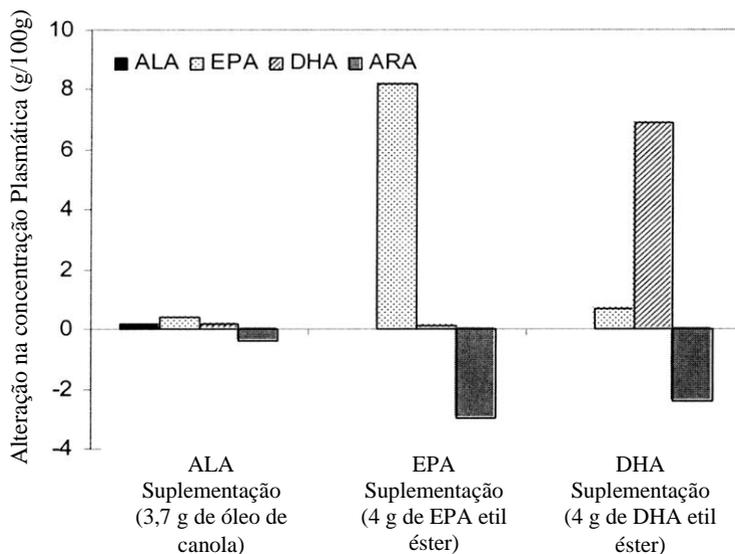
Em contrapartida, o DHA pode ser substrato para retroconversão metabólica a EPA por meio de uma reação de β -oxidação. O percentual de DHA que pode ser retroconvertido a EPA é de cerca de 1,4% em humanos com consumo normal de DHA, aumentando para 12% em indivíduos com consumo crônico (CONQUER; HOLUB, 1997; STARK; HOLUB, 2004).

A interconversão de ácidos graxos a partir de ALA é limitada e pode variar em subgrupos populacionais (BURDGE; CALDER, 2005). Tabagismo, consumo de álcool, Diabetes Mellitus, *stress*, ingestão elevada de gordura *trans*, senescência e a ingestão insuficiente de energia, proteína, zinco, magnésio, cobre e das vitaminas B₃, B₆ e C influenciam de forma negativa o processo de interconversão de ácidos graxos no organismo humano por reduzirem a atividade das enzimas desaturases (MARTIN et al., 2006).

Estudos em humanos apontam que apenas uma pequena quantidade de ALA é convertida em EPA e DHA. Chiu et al. (2008) sugerem que cerca de 2 a 10% do total de ALA ingerido passa por esse processo e é biotransformado em EPA e DHA. Goyens et al. (2005) encontraram uma conversão de aproximadamente 7% de ALA para EPA e de apenas 0,013% para DHA. Hussein et al. (2005) encontraram percentuais de conversão ainda mais baixos: 0,3% para EPA e < 0,01% para DHA. Artemburn, Hall e Oken (2006) sugerem que a conversão de ALA em EPA varia de 0,3 a 8% nos homens, e em DHA, < 4%, e, muitas vezes, é indetectável no sexo masculino. Eles ainda afirmam que esse processo é mais eficaz nas mulheres: até 21% é convertido em EPA e até 9% é convertido em DHA. Emken et al. (1994) mostraram que uma dieta rica em ácido linoléico reduz a eficácia do processo de conversão de ALA em ácidos graxos n-3 de cadeia longa em 40% e uma redução na acumulação em fosfolipídios de 70%. Em virtude desta baixa conversão, que chega a ser insignificante, Cockbain, Toogood e Casco (2012) classificam EPA e DHA como ácidos graxos “essenciais”.

Desta forma, a maneira mais segura e eficaz de elevar os níveis de ácidos graxos n-3 de cadeia longa EPA e DHA em fosfolipídios plasmáticos e de membrana é através da sua ingestão de alimentos fontes ou por meio de suplementos dietéticos, como pode-se observar no gráfico apresentado a seguir (Figura 5).

Figura 5 - Alteração na concentração plasmática segundo tipo de ácido graxo n-3 suplementado.



Abreviações: ALA, ácido alfa-linolênico; DHA, ácidos docosahexaenóico; EPA, ácidos eicosapentaenóico.

Fonte: Adaptado de Artemburn, Hall e Oken (2006).

EPA e DHA são produzidos primariamente pelas algas. Logo, peixes e frutos do mar que se alimentam de algas são ricos em EPA e DHA, assim como produtos derivados de sua extração lipídica (ARTEMBURN; HALL; OKEN, 2006). É importante considerar que diferentes tipos de peixes contêm quantidades diferentes destes ácidos graxos e podem conter diferentes proporções de EPA:DHA. Isso se deve a inúmeros fatores que incluem as características metabólicas do peixe, a sua alimentação, a temperatura da água em que vivem, e a estação do ano. De forma geral, os peixes gordurosos (salmão, cavala, atum, arenque, sardinha) contêm mais AGPI n-3 que os peixes magros (bacalhau). Por exemplo, uma porção de bacalhau pode fornecer cerca de 0,2 a 0,3 g de ácidos graxos n-3 de cadeia longa. Em contraste, uma porção de salmão ou cavala, poderia fornecer de 1,5 a 3,5 g destes mesmos ácidos graxos (CALDER, 2012).

O óleo de peixe obtido da carne de peixes gordurosos ou do fígado de peixes magros é rico em EPA e DHA, compreendendo até 30% dos ácidos graxos presentes. Um grama de óleo de peixe encapsulado pode fornecer 0,6 g de EPA mais DHA. No entanto, a variabilidade das proporções relativas de ácidos graxos n-3 de cada tipo de peixe são refletidas também no óleo de peixe derivado. Como exemplo, o óleo de fígado de bacalhau é mais rico em EPA, enquanto que o óleo de atum, em DHA. Existem ainda, fórmulas disponíveis de EPA e/ou DHA isolados e concentrados (CALDER, 2012).

Após os processos de digestão e absorção os ácidos graxos poli-insaturados n-3 constituem componentes básicos estruturais de triglicérides, fosfolipídios e ésteres de colesterol. Apenas uma pequena quantidade encontra-se disponível na forma de ácidos graxos livres *in vivo*. O destino final é definido de acordo com a necessidade orgânica: armazenamento de energia (estoque em adipócitos); unidades estruturais de membranas; ou, produção de eicosanóides (ARAB, 2003)¹.

A quantificação/medição deste tipo de ácidos graxos pode ser feita como ácidos graxos livres no soro; componentes de circulação de triglicérides; componentes de membrana de eritrócitos, fosfolipídios ou ésteres de colesterol, ou de tecido adiposo de vários locais (ARAB, 2003). O que determina o biomarcador a ser utilizado é o período (curto, médio ou longo-prazo) da ingestão dietética que se pretender medir (CANTWELL, 2000).

Os marcadores de curto prazo são os níveis séricos ou plasmáticos de ácidos graxos isolados ou constituintes de triglicérides, que podem refletir o consumo de ácidos graxos da última refeição; ou ainda, de ésteres de colesterol ou fosfolipídios, que reflete o consumo dos últimos dias. De médio prazo, membranas de eritrócitos fornecem estimativas da ingestão nos últimos 120 dias (tempo que corresponde à meia-vida destas células). Tecido adiposo é o meio preferido para a medição de ácidos graxos como um reflexo de longo prazo (~2,5 anos), desde que o indivíduo não tenha passado por uma perda de peso grave nesse período (CANTWELL, 2000; ARAB, 2003).

¹ Artemburn, Hall e Oken (2006) afirmam que a eficiência no armazenamento de ácidos graxos n-3 é limitada, implicando na necessidade de um fornecimento contínuo através da dieta ou de suplementos para a manutenção dos níveis constantes.

A incorporação em membranas se dá de forma dose-dependente, e parece atingir o pico após 3 semanas da administração diária de ácidos graxos n-3 (COCKBAIN; TOOGOOD; CASCO, 2012). Gibney e Hunter (1993) encontraram um grau de incorporação máximo de EPA no plasma, plaquetas, linfócitos, neutrófilos e monócitos em 2 semanas após início da suplementação diária com 1,2 a 2,4 g de EPA em oito voluntários saudáveis. Read et al. (2007) ao suplementar pacientes com CRC avançado em quimioterapia com uma fórmula líquida oral contendo 2,18 g de EPA e 0,92 g de DHA durante nove semanas observaram o pico de incorporação em fosfolipídios plasmáticos na terceira semana após a suplementação diária (0,53% e 2,6% de EPA e DHA no momento basal para 5,3% e 7,04%, respectivamente, ao final da terceira semana), se mantendo constantes até o final do estudo. Hillier et al. (1991) forneceu óleo de peixe (3,2 g de EPA e 2,2 g de DHA por dia) a 11 pacientes com doença inflamatória intestinal ativa e coletou amostras de biópsia de cólon nas semanas 3, 6 e 12. Os resultados encontrados mostraram um aumento de 7 vezes o conteúdo de EPA na mucosa intestinal ao final da terceira semana de suplementação, enquanto que o conteúdo de DHA havia dobrado. Os níveis foram mantidos, sem aumentos, até o final do período de estudo. Yaqoob et al. (2000) observaram pico de incorporação de EPA e DHA em fosfolipídios plasmáticos após quatro semanas de suplementação com 9 g/dia de óleo de peixe encapsulado contendo 2,1 g de EPA e 1,1 g de DHA durante 12 semanas em voluntários saudáveis (n = 40). Ao repetir as análises do perfil de ácidos graxos em fosfolipídios plasmáticos oito semanas após o término da suplementação, observaram uma queda radical (7,2 vezes) na concentração de EPA (3,6% na semana 12 para 0,5% na semana 20). A concentração de DHA também apresentou queda, porém em menor proporção (1,4 vezes: 4,9% na semana 12 para 3,6% na semana 20). Esses resultados confirmam o baixo acúmulo desses ácidos graxos, especialmente de EPA, implicando num consumo contínuo para manutenção dos níveis.

Bonatto et al. (2012) verificaram aumento de 1,6 vezes na concentração de EPA em células polimorfonucleares de pacientes portadores de câncer em quimioterapia suplementados com 2 g/dia de óleo de peixe (0,3 g de EPA e 0,4 g de DHA por dia) durante 8 semanas, enquanto que a concentração de DHA duplicou. Popovic et al. (2009) observaram aumento significativo na concentração de EPA em fosfolipídios plasmáticos de 13 pacientes com icterícia obstrutiva (causa primária obstrução das vias biliares) após sete dias de suplementação diária com 5 g de óleo de peixe encapsulado contendo 0,9 g de EPA e

0,6 g de DHA (0,18% para 0,55%). No entanto, a concentração de DHA não apresentou aumento expressivo (2,22% para 2,53%).

2.2.2 Consumo de AGPI n-3 e recomendações dietéticas

O consumo de peixes gordurosos entre as populações ocidentais é tipicamente baixo, o que implica em baixo consumo também de EPA e DHA. Segundo o *Scientific Advisory Committee on Nutrition* (2004), a média de ingestão de ácidos graxos n-3 de cadeia longa entre os adultos do norte europeu, Europa oriental, da América do Norte e Austrália estava estimada em 0,15 a 0,25 g/dia. Populações, como os japoneses, que consomem peixes oleosos em maiores quantidades e com maior regularidade do que as populações ocidentais têm maior consumo de ácidos graxos n-3 de cadeia longa.

De acordo com as *Dietary References Intakes* (DRI's), a quantidade que corresponde à Ingestão Adequada (AI) de ácidos graxos poli-insaturados n-3 para adultos saudáveis é de 1,6 e 1,1 g/dia para homens e mulheres respectivamente. Deste total, aproximadamente 10% deve ser de EPA e DHA (cerca de 0,06 a 0,12% do total de energia consumida) e o restante de ácido alfa-linolênico (ALA). Não existe limite máximo (UL) estabelecido (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005). Ainda, tomando como referência o balanço do consumo n-6:n-3 (ácido linoléico: ácido α -linolênico), recomenda-se uma razão de 5:1 a 10:1 (FAO/WHO, 1994). A *World Health Organization* (WHO, 2003) orienta o consumo regular de peixes duas vezes por semana para a prevenção de doenças crônicas, prevendo que cada refeição forneça uma quantidade estimada de 200 a 500 mg de EPA e DHA somados.

2.2.3 Implicações dos AGPI n-3 sobre a inflamação e o câncer

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

Os ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3 (DHA, EPA e ALA) competem entre si e com outro ácido graxo poli-insaturado da família ômega-6 (AA) pela sua incorporação em fosfolipídios de

membrana. A proporção relativa destes ácidos graxos representa o seu padrão de consumo dietético, e determina, após clivagem pela enzima fosfolipase, a disponibilidade dele como substrato para as vias enzimáticas da COX-2 e da 5-LOX e, conseqüentemente, determina o equilíbrio entre os eicosanóides. A membrana fosfolipídica normalmente contém maiores níveis de AA do que de EPA e/ou DHA. Os ácidos graxos de 20 carbonos são mobilizados da membrana celular pela ação das fosfolipases A2 e C e, subseqüentemente, metabolizados pela COX ou LOX. O AA é metabolizado em prostaglandinas (PGE₂) e tramboxanos de série 2, e leucotrienos de série 4 (LTB₄). A metabolização de EPA gera eicosanóides derivados da COX que recebem o sufixo “3” e os da LOX, o sufixo “5” (DUPERTUIS; MEGUID; PICHARD, 2007) (Figura 6).

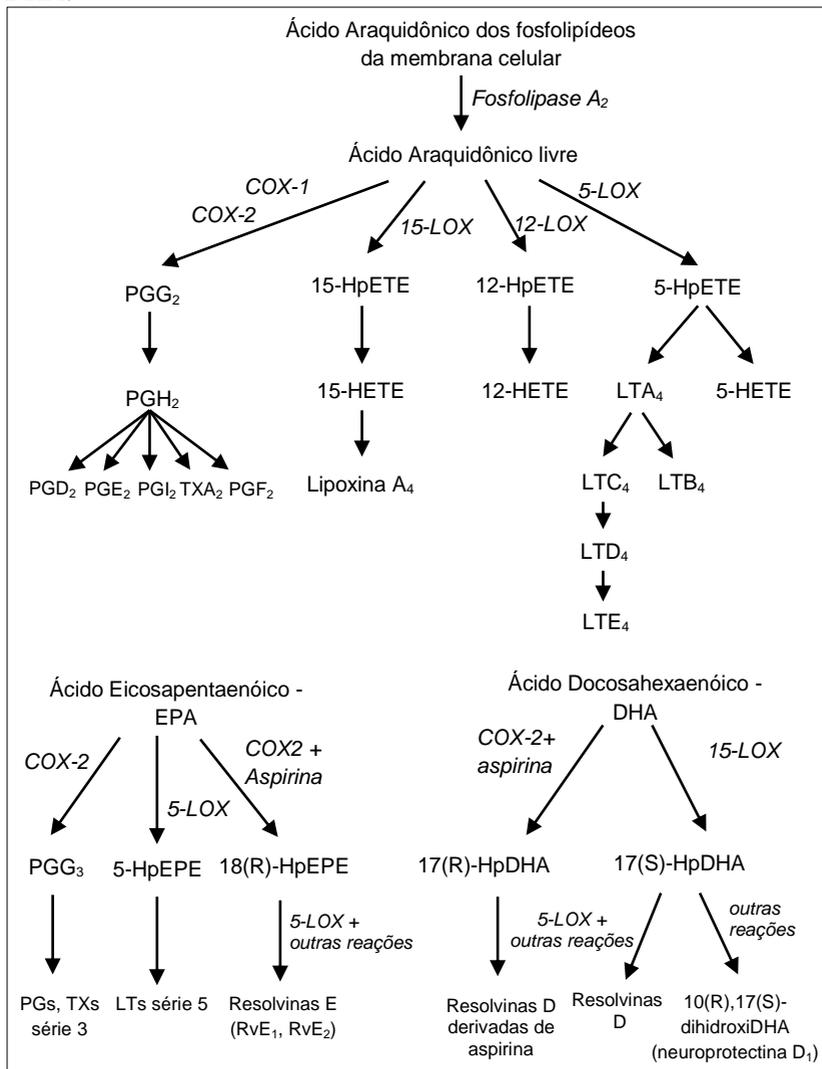
As séries pares geradas tendem a ser pró-inflamatória e proliferativa em muitos tecidos. As séries ímpares produzidas pela mobilização de EPA e/ou DHA – que são preferencialmente utilizados pelas enzimas COX e LOX – tendem a promover menor inflamação e proliferação, sendo menos favoráveis ao desenvolvimento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

Estudos têm descrito novos grupos de mediadores lipídicos: as resolvinas, protectinas e as lipoxinas. Estas são consideradas moléculas endógenas pró-resolução, pois promovem absorção e eliminação de micro-organismos e células apoptóticas pelos macrófagos nos locais de inflamação. Resolvinas e protectinas são biossintetizadas a partir de ácidos graxos n-3 de cadeia longa (EPA e DHA), e lipoxina a partir de AA (SERHAN; CHIANG; VAN DIKE, 2008). Os neutrófilos dentro do exsudato podem mudar seu fenótipo para gerar mediadores de proteção derivados de ácidos graxos a fim de promover resolução e retorno da homeostase (SERHAN, 2009).

Os mediadores formados a partir de EPA são gerados por uma série de reações envolvendo COX-2 e LOX5 e são denominados de resolvinas-E. Estes mediadores parecem exercer potente ação anti-inflamatória em neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células T (CALDER, 2008; SEKI; TANI; ARITA, 2009).

Os mediadores derivados de DHA são denominados resolvinas D e são produzidos por vias similares. Apresentam potente ação de inibição da infiltração por neutrófilos (SERHAN; CHIANG; VAN DIKE, 2008). Estes achados tornam o DHA tão importante quanto o

Figura 6 - Esquema da síntese de eicosanóides derivados de AA, EPA e DHA.



Abreviações: COX, ciclo-oxigenase; HETE, Ácido hidroxieicosatetraenóico; HpETE, ácido hidroxiperoxieicosatetraenóico; HpEPE, ácido hidroxiperoxieicosapentaenóico; HpDHA, ácido hidroxiperoxidocosahexaenóico; LOX, lipoxigenase; LT, leucotrieno; PG, prostaglandina; TX, tramboxano.

Fonte: Adaptado de Calder, 2009.

EPA na modulação da resposta inflamatória (CALDER, 2008). O DHA é, ainda, convertido em outra molécula chamada protectina. Estas são distinguidas pela presença de três dupla ligação conjugadas. Possuem potente bioatividade no bloqueio da ativação de neutrófilos e na redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (SERHAN; CHIANG; VAN DIKE, 2008; SERHAN, 2009). A combinação de moléculas pró-resolução e antagonistas das vias COX e LOX parece ser uma boa estratégia para a recuperação e restauração do controle da inflamação (SERHAN; CHIANG; VAN DIKE, 2008).

Mediadores da resposta inflamatória derivados dos ácidos graxos EPA e DHA também podem interferir na apoptose celular via NF- κ B. Quando ativado, este fator de transcrição bloqueia a morte celular e apoptose, sendo frequentemente regulado em células cancerígenas, resultando em células que são resistentes às drogas quimioterápicas ou à radiação ionizante e não morrem em resposta ao dano genético que tenha ocorrido (KARIN, 2006). Estudos sugerem efeitos diretos dos AGPI n-3 e de seus mediadores sobre a expressão genética através da inibição da ativação de NF- κ B (NOVAK et al., 2003).

O EPA tem mostrado inibir a inflamação *in vivo* e tem sido associado com ganho de peso, melhor resposta à terapia, menores complicações e frequente aumento da sobrevida em vários pacientes com câncer (ELIA, et al., 2006; JHO, et al., 2004). A ingestão dietética de ácidos graxos n-3 tem sido também, associada com a supressão de transformação neoplásica, angiogênese e crescimento de células tumorais (SIMOPOULOS, 2002). Estudos experimentais com cultura de células e em animais tem demonstrado a habilidade dos ácidos graxos n-3 de diminuir a citotoxicidade de alguns fármacos anticâncer. Na terapêutica do câncer de cólon, a combinação de emulsão de ômega-3 com 5-FU resultou em efeito inibitório aditivo na linhagem de células Caco-2 (JORDAN; STEIN, 2003).

Bonato (2008) investigou a ação dos AGPI n-3 sobre o sistema imunitário inato de pacientes oncológicos submetidos a quimioterapia. Dos dezenove pacientes que receberam suplementação de 2 g/dia de óleo de peixe encapsulado durante 8 semanas, dez apresentavam localização da doença no cólon e/ou reto. Não houve diferença estatística no peso dos pacientes com e sem suplemento; no entanto, dos 19 indivíduos suplementados, 12 apresentaram ganho de peso e 2 mantiveram.

Foi realizada uma busca sistemática da literatura publicada até junho de 2012 objetivando encontrar estudos clínicos, realizados em

humanos, *in vivo* e com amostra de estudo formada apenas por indivíduos com CCR, que fornecem evidências sobre os efeitos da suplementação de AGPI n-3, inclusive de óleo de peixe, em marcadores de inflamação. A estratégia de busca foi criada combinando todos os termos relativos e sinônimos para AGPI n-3, óleo de peixe, câncer colorretal e marcadores de inflamação na língua inglesa, portuguesa e espanhola nas seguintes bases de dados: MEDLINE (via PubMed; National Library of Medicine, Bethesda, Maryland), Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde - BIREME (via BVS; Biblioteca Virtual em Saúde, São Paulo, Brazil), EBSCOhost (EBSCO Information Services, Birmingham, US), SCIVERSE Hub (Elsevier, Oxford, United Kingdom), ISI Web of science (Institute for Scientific Information, Philadelphia, Pennsylvania).

A estratégia de busca resultou na seleção de 7 estudos, cujas características metodológicas encontram-se descritas nos quadros 1 e 2.

Os marcadores de inflamação avaliados foram: IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α e IFN- γ no estudo de Purasiri et al. (1994); produção *ex-vivo* de IL-6 por células polimorfonucleares no estudo de Braga et al. (2002); produção de IL-4 e IFN- γ por células T CD4⁺ no estudo de Matsuda et al. (2006); : interleucinas 1 β , 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, eotaxina, GM-CSF e RANTES no estudo de Read et al. (2007); níveis séricos de IL-6 e TNF- α no estudo de Liang et al. (2008); concentrações plasmáticas de IL-1 β , IL-6, TNF- α no estudo e Silva et al. (2012); e concentrações plasmáticas de IL-6 e TNF- α no estudo de Zhu et al. (2012). Níveis plasmáticos de PCR foram avaliados no estudo de Read et al.(2007) e de Silva et al. (2012)

Em quatro dos seis estudos controlados foi observada diferença estatística nos níveis de citocinas avaliadas entre os grupos suplementados com ácidos graxos n-3 e seus respectivos controles: todas as citocinas avaliadas por Purasiri et al. (1994), Braga et al. (2002) e Zhu et al. (2012) apresentaram valores significativamente menores ao final do período de suplementação com AGPI n-3 quando comparado aos grupos controles/convencionais. No estudo de Matsuda et al. (2006) observou-se diferença estatística apenas na proporção de IFN- γ no momento 8 e 14 dias após o término da suplementação diária com uma fórmula líquida contendo arginina, RNA e AGPI n-3 (momentos correspondente ao pós- operatório). Neste estudo, os valores de IFN- γ foram menores que aqueles encontrados no grupo controle nos mesmos momentos.

Quadro 1 – Características metodológicas dos estudos encontrados na busca sistemática da literatura. Parte 1.

Estudo (País)	Tipo de estudo	Nº de participantes	Tipo de pacientes	Tratamento
Purasiri et al., 1994 (Inglaterra)	Estudo de fase tipo II	30	CCR clinicamente localizado ou avançado	Ressecção cirúrgica ou seguimento clínico
Braga et al., 2002 (Itália)	Prospectivo, randomizado, placebo controlado	200	CCR clinicamente localizado	Ressecção cirúrgica
Matsuda et al., 2006 (Japão)	Randomizado	36	CCR clinicamente localizado	Ressecção cirúrgica
Read et al., 2007 (Austrália)	Estudo de fase II	23	CCR avançado (TNM IV)	Quimioterapia
Liang et al., 2008 (China)	Prospectivo, duplo-cego, randomizado e controlado	41	CCR clinicamente localizado (TNM I-III)	Ressecção cirúrgica
Silva et al., 2012 (Brasil)	Randomizado	23	CCR	Quimioterapia
Zhu et al., 2012 (China)	Prospectivo, duplo-cego, randomizado e controlado	57	CCR clinicamente localizado (TNM II-III)	Ressecção cirúrgica

Abreviações: CCR, Câncer Colorretal; TNM, classificação do estágio do tumor.

Fonte: Do autor

Quadro 2 – Características metodológicas dos estudos encontrados na busca sistemática da literatura. Parte 2.

Estudo (País)	Fórmula de suplementação	Duração/momento da suplementação	Via de administração	Desfechos inflamatórios avaliados
Purasiri et al., 1994 (Inglaterra)	AG essenciais encapsulados (20 mg de DHA, 132mg de EPA/cap) – 4 a 8 cap/dia	6 meses durante o seguimento clínico	Oral	IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α e IFN- γ
Braga et al., 2002 (Itália)	Impact® (12,5 g/L de arginina + 3,3 g/L de AG n-3) – 1 L/dia	13 dias no perioperatório ou 5 dias no pré-operatório	Oral (pré-operatório) ou enteral (pós-operatório)	IL-6
Matsuda et al., 2006 (Japão)	Impact® (12,8 g/L de arginina + 1,9 g/L de RNA + 4 g/L de AG n-3) – 750 mL/dia	5 dias no pré-operatório	Oral	IL-4 e IFN- γ
Read et al., 2007 (Austrália)	ProSure™ (4,5 g/L de EPA + 1,9 g/L de DHA) – 480 mL/dia	9 semanas durante a quimioterapia	Oral	IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, eotaxina, GM-CSF, RANTES e PCR
Liang et al., 2008 (China)	Omegaven® (com óleo de peixe, razão n-6:n-3 = 3:1) – 0,2 g/kg/dia	7 dias no pós-operatório	Parenteral	IL-6 e TNF- α
Silva et al., 2012 (Brasil)	Óleo de peixe encapsulado (150 mg de EPA + DHA/cap) – 4 cap/dia	9 semanas a partir do início da quimioterapia	Oral	IL-1 β , IL-6, TNF- α , PCR e albumina,
Zhu et al., 2012 (China)	Omegaven® (com óleo de peixe – 0,2 g/kg/dia	7 dias no pós-operatório	Parenteral	IL-6 e TNF- α

Abreviações: AG, ácidos graxos; RNA, ácido ribonucléico; cap, cápsulas.

Fonte: Do autor

No estudo bem delineado de Liang et al. (2008), as concentrações de IL-6 e TNF- α aumentaram com a realização do procedimento cirúrgico em ambos os grupos. No entanto, oito dias posteriores à intervenção cirúrgica os níveis destas citocinas tiveram queda acentuada no grupo suplementado com AGPI n-3, enquanto que no grupo controle os níveis de TNF- α continuaram aumentando e os de IL-6 caíram de maneira menos expressiva. Apesar disso, não houve diferença estatística entre os grupos.

Silva et al. (2012) ao suplementar 2 g de óleo de peixe encapsulado durante 9 semanas concomitante ao tratamento quimioterápico não observou diferença nos níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α entre os grupos de estudo. Todavia, níveis séricos de PCR foram expressivamente menores no grupo que recebeu o óleo de peixe (média de 3,4 mg/L no grupo suplementado vs. 13,0 mg/L no grupo controle, $p=0,09$).

Read et al. (2007) ao suplementar 480 mL/dia de uma fórmula líquida contendo 4,5 g/L de EPA + 1,9 g/L de DHA durante 9 semanas observou diferença estatística apenas para eotaxina, RANTES e GM-CSF. Eotaxina, uma citocina pró-inflamatória, aumentou significativamente até a semana 3 permanecendo inalterada até a semana 9. RANTES também aumentou expressivamente até a semana 3. Já os níveis de GM-CSF oscilaram, reduzindo significativamente seus valores do basal para a semana 3, retornando a aumentar na semana 9, porém em níveis menores que os basais. Níveis de PCR aumentaram com a intervenção quimioterápica (média de 18,2 mg/L no basal para 33,1 mg/L na semana 3; $p=0,004$) no entanto reduziram significativamente no final do estudo (média de 78,4 mg/L na semana 3 para 19,4 mg/L na semana 9; $p=0,02$).

Observa-se portanto, grandes diferenças metodológicas entre os estudos, o que dificulta a comparação entre eles, e isso talvez, possa explicar a divergência nos resultados encontrados para um mesmo marcador. Salienta-se também que apenas um estudo (READ et al., 2007) avaliou o comportamento de citocina com atividade anti-inflamatória (IL-10); que nenhum deles avaliou IL-17A; e que em dois deles (BRAGA et al., 2002; MATSUDA et al., 2006) a fórmula de intervenção era acrescida de substâncias com potencial atividade imunomoduladora (RNA e arginina) além de AGPI n-3.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se existem alterações nos marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-17A, PCR e albumina), no perfil de ácidos graxos plasmáticos e no estado nutricional de indivíduos adultos portadores de câncer colorretal em tratamento quimioterápico suplementados com 2 g/dia de óleo de peixe.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o comportamento dos marcadores de inflamação (citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-17A e TNF- α ; citocina anti-inflamatória IL-10 e as proteínas hepáticas de fase aguda PCR e albumina) antes e após a suplementação de 2 g/dia de óleo de peixe durante nove semanas, em relação àqueles não suplementados;
- Determinar o perfil de ácidos graxos plasmáticos nos grupos de estudo, nos momentos pré e pós-suplementação de 2 g/dia de óleo de peixe;
- Avaliar o risco de complicações nutricionais e inflamatórias por meio do índice da relação PCR/albumina nos grupos e nos momentos do estudo;
- Verificar o comportamento de indicadores antropométricos e do estado nutricional nos grupos e nos momentos do estudo;
- Avaliar a tolerância a quimioterapia nos momentos e grupos do estudo;
- Quantificar a ingestão dietética habitual dos indivíduos participantes do estudo.

4 POPULAÇÃO E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Ensaio clínico randomizado, prospectivo e controlado².

4.2 AMOSTRA DE ESTUDO

A amostra de conveniência foi constituída por indivíduos de ambos os sexos com diagnóstico de adenocarcinoma de colón e/ou reto, assistidos e recrutados entre julho de 2011 a março de 2012 no Centro de Pesquisas Oncológicas de Florianópolis – CEPON, Santa Catarina, Brasil³.

Os critérios para elegibilidade adotados foram: idade >19 anos; diagnóstico histopatológico de CCR; e indicação de tratamento quimioterápico. Não foram incluídos aqueles: em tratamento paliativo ou em uso de estatina ou fármacos anti-inflamatórios; com alergia a peixes e derivados; sem condições de ingestão via oral; submetidos anteriormente à quimioterapia; portadores de doenças autoimunes ou cuja patogenia envolva um processo inflamatório; ou, que fizeram uso de suplementos contendo óleo de peixe ou AGPI n-3 por um período prolongado (> 90 dias), seis meses antes ao início do estudo.

A triagem dos indivíduos aptos foi realizada pela equipe médica e pela equipe de assistência social da instituição. Os indivíduos eram então encaminhados ao serviço de nutrição clínica, onde eram convidados a participar mediante prévia apresentação do estudo. Busca diária nos registros de pacientes de “primeira vez” a iniciar quimiotera-

² Ensaio Clínico Randomizado com registro na Plataforma ClinicalTrialGov sob identificação NCT01575340.

³ O Centro de Pesquisas Oncológicas – CEPON de Florianópolis é o órgão central de referência na prevenção e tratamento do câncer no estado de Santa Catarina. Seus serviços de alta complexidade são destinados basicamente aos pacientes do Sistema Único de Saúde provenientes da grande Florianópolis e do interior do estado. Possui característica de Hospital-Dia e concentra serviços terapêuticos de radioterapia e quimioterapia, médico, nutricional, psicológico, farmacêutico, social, entre outros.

pia presencial ou domiciliar também foi realizada para identificar aqueles indivíduos aptos.

4.3 GRUPOS DE ESTUDO

Os indivíduos foram alocados randomicamente em dois grupos de estudo assim definidos: 1) Grupo suplementado (GS) cujos componentes ingeriram 2 g de óleo de peixe encapsulado diariamente por nove semanas; ou, 2) Grupo Controle (GC), sem ingestão de placebo.

A randomização foi definida de acordo com uma ferramenta desenvolvida para Microsoft Office Excel[®]. A ferramenta utilizava a linguagem de programação VB e designava o indivíduo para um dos grupos de acordo com a multiplicação do número do prontuário do indivíduo no CEPON por um número randômico entre 0 e 1 gerado pelo Microsoft Office Excel[®], que era modificado para cada seleção. Para o direcionamento, adotou-se resultados ímpares como pertencentes ao grupo suplementado, e pares, ao grupo não-suplementado. A fim de equilibrar a distribuição, o segundo indivíduo de cada par era direcionado ao grupo oposto.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO SUPLEMENTO NUTRICIONAL DE ÓLEO DE PEIXE

O suplemento de óleo de peixe foi oferecido pelo pesquisador na forma de cápsulas gelatinosas na proporção de 500 mg/cápsula (Omega 3, PHITOMARE[®], Governador Celso Ramos, SC, Brasil). As cápsulas continham óleo de peixe extraído de salmão, cavalinha e sardinha, além de gelatina e glicerina.

A composição de ácidos graxos do suplemento encontra-se no quadro 3.

O produto é certificado como suplemento nutricional de acordo com a Portaria N° 19, de 16 de março de 1995 (BRASIL, 1995) e registrado no Ministério da Saúde, na categoria de alimento, sob o registro 6.2358.0006.001-4.

Quadro 3 - Composição de ácidos graxos do suplemento de óleo de peixe.

Composição	Quantidade/g
Gordura Total (g)	1,0
Gordura Saturada (mg)	320
Gordura Monoinsaturada (mg)	260
Gordura Poli-insaturada (mg)	400
<i>AGPI n-3 (mg)</i>	300
EPA (mg)	180
DHA (mg)	120
Colesterol (mg)	2

Fonte: Rótulo do produto Omega 3, PHYTOMARE®.

4.5 DESENHO DO ESTUDO

O estudo iniciou em um momento isolado, onde os indivíduos aptos foram identificados e convidados a participar deste ensaio clínico. Aqueles que concordaram, informaram seu consentimento e então foram randomizados em um dos grupos de estudos conforme técnica já descrita.

Após a identificação, o estudo dividiu-se em dois momentos: a) BASAL, e b) 9 SEMANAS. No Basal, caracterizado temporalmente como o dia da primeira quimioterapia oral ou injetável, foram realizadas as primeiras coletas de sangue, de dados antropométricos e da ingestão alimentar (formulários de registros dos dados encontram-se no Apêndice A). Os indivíduos alocados para o Grupo Suplementado (GS) receberam as cápsulas de óleo de peixe e as orientações de consumo, bem como um formulário de registro diário da ingestão do suplemento (Apêndice B) e instruções para seu preenchimento, iniciando neste exato momento o período de suplementação. No momento 9 Semanas, após aproximadamente 63 dias de seguimento, foram repetidas as coletas de sangue e de dados antropométricos, além de uma nova quantificação da ingestão alimentar. Nesse momento, o grupo suplementado cessou a ingestão das cápsulas de óleo de peixe e no primeiro retorno ao CEPON

após este período, tinham que apresentar ao pesquisador o registro de ingestão e o frasco de armazenamento das cápsulas (Figura 7).

Para as coletas de material biológico, os indivíduos receberam as guias de solicitação de exames (Apêndice C) e foram instruídos a comparecer ao Laboratório Santa Luzia® (Rua Dom Joaquim, 660, Centro - Florianópolis SC) estando em jejum alimentar por um período prévio de aproximadamente 8 horas.

Os indivíduos suplementados foram orientados a ingerir as cápsulas de forma dose-fracionada (2 cap/2 cap), cerca de 30 minutos antes das refeições principais, acompanhado de ingestão líquida.

Dados da ingestão alimentar foram coletados em quatro momentos: um no BASAL, dois entre BASAL e 9 SEMANAS (num intervalo de aproximadamente 15 a 21 dias entre eles), e um último no 9 SEMANAS. Salienta-se que somente a terceira e a quarta avaliação dietética ficaram sujeitas a influências dos efeitos colaterais da quimioterapia.

O pesquisador manteve contato presencial com os indivíduos em avaliação quando eles se dirigiam ao CEPON para tratamento quimioterápico ou consulta médica, ou via ligação telefônica durante todo o período de seguimento, visando suporte assistencial adequado, quando necessário.

4.6 INSTRUMENTOS E TÉCNICAS DE COLETA DE DADOS

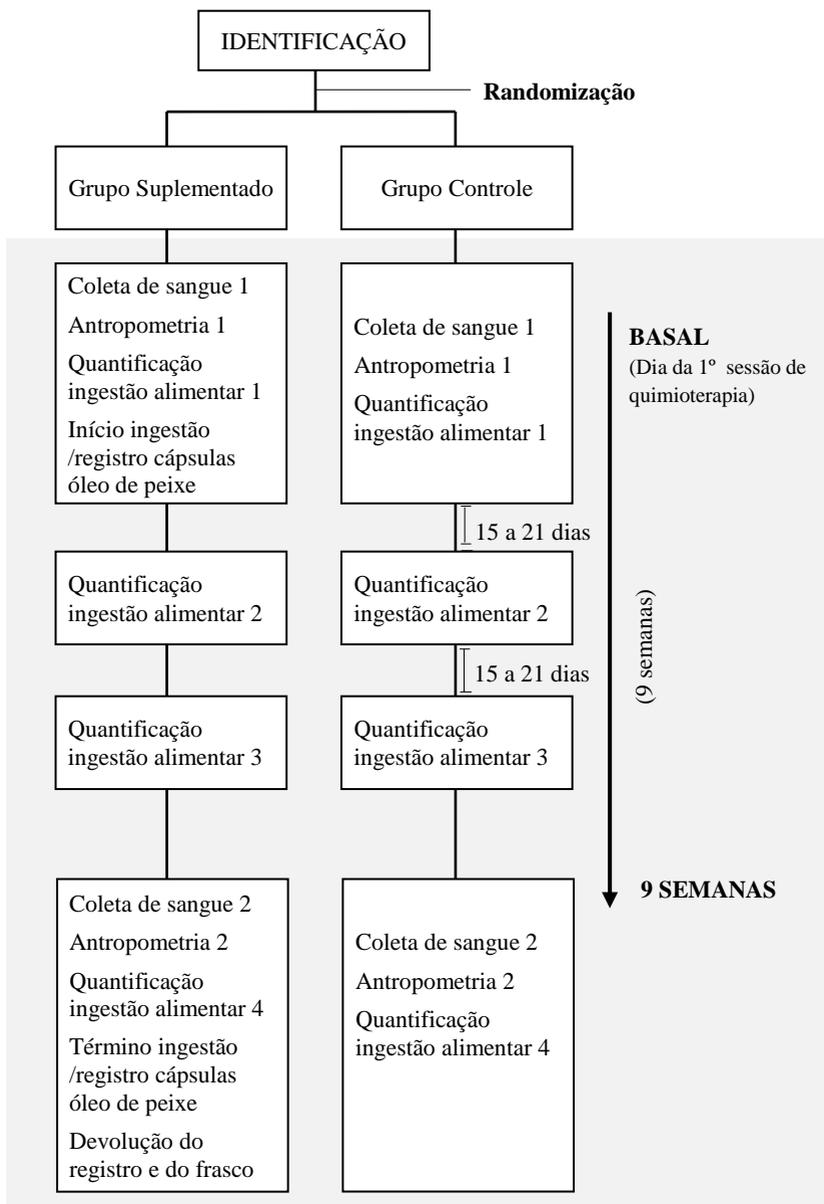
4.6.1 Caracterização dos indivíduos

Os indivíduos participantes foram caracterizados quanto à:

- 1) dados pessoais: nome completo, sexo, data de nascimento, procedência, endereço residencial, telefone e número do prontuário;
- 2) dados clínicos: localização do tumor, estadiamento, fármacos utilizados, protocolo quimioterápico e comorbidades associadas;
- 3) hábito tabágico e número de cigarros/dia (se fumante);
- 4) avaliação subjetiva dos sinais e sintomas apresentado pelo indivíduo e autoavaliação da sua capacidade funcional.

As informações referentes a “dados pessoais” e “dados clínicos” foram coletadas do prontuário interno do paciente no CEPON; as demais foram obtidas por meio de entrevista direta. Todas as informações foram registradas em formulário próprio (Apêndice A).

Figura 7 – Fluxograma do estudo.



Fonte: Do autor.

4.6.2 Coleta e preparo do material biológico

Aproximadamente 15 mL de sangue foram coletados por profissional capacitado na região cubital do antebraço de cada paciente nos momentos Basal e 9 Semanas, utilizando 3 tubos do tipo *vacutainer* com capacidade para até 10 mL, contendo heparina sódica (anticoagulante) ou gel separador.

Os tubos de sangue com anticoagulante (2 tubos) foram acondicionados em caixa térmica sob uma temperatura inferior a 15 °C e transportadas até o Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas, Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para serem processadas para a determinação de citocinas e do perfil de ácidos graxos plasmáticos. Foram centrifugadas no próprio tudo de coleta a 1800 rpm por 7 minutos a uma temperatura aproximada de 4 °C para separação do plasma. Alíquotas de 500 µL de plasma foram transferidas para quatro criotubos devidamente identificados e armazenados a - 80°C.

O tubo de sangue restante, com gel separador, ficou retido no laboratório de análises médicas para a determinação de PCR e albumina. O sangue ficou em repouso em temperatura ambiente por cerca de 30 min até a completa coagulação. Após, foi centrifugado por um período de 10 a 15 minutos à 4700-5100 rpm para a separação do soro.

4.6.3 Avaliação dos marcadores inflamatórios

4.6.3.1 Citocinas plasmáticas

As alíquotas de plasma foram descongeladas em temperatura ambiente ao final do estudo e agitadas em homogeneizador.

Kits específicos para TNF- α , IL-1 β e IL-10 humano da marca BD OptEIA™ – BD Biosciences (San Jose, Califórnia, EUA) e IL-17A humano da marca eBioscience® (San Diego, Califórnia, EUA), foram utilizados. O teste utilizou um anticorpo monoclonal específico para cada citocina revestido sobre placas individuais de 96 poços. Padrões e as amostras foram adicionados aos poços, e qualquer TNF- α , IL-1 β , IL-10 ou IL-17A se ligou ao seu respectivo anticorpo imobilizado. Os poços foram lavados e um conjugado de *streptavidin-horseradish peroxidase* misturado a um anticorpo biotilado anticitocina humana foi adicionado produzindo uma espécie de “sanduíche” (anticorpo-

antígeno-anticorpo). Os poços foram novamente lavados e, uma solução de substrato TMB adicionada, produzindo uma cor azul na proporção direta com a quantidade de TNF, IL-1 β , IL-10 ou IL-17A presentes na amostra inicial. As absorbâncias dos poços foram lidas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 450 nm, com correção a 570 nm, em até 30 min após a parada da reação. Todos os padrões e as amostras foram analisados em duplicata.

Os limiares mínimos de detecção dos kits utilizados foram: 2 pg/mL para TNF- α e IL-10; e 0,8 pg/mL para IL-1 β . Sensibilidade do teste de IL-17A era de 4 pg/mL.

Para o cálculo das concentrações, foram obtidas as médias das leituras ópticas de cada padrão e amostra. Em seguida, foi subtraída a média da leitura óptica do padrão “zero” de cada média dos demais padrões e das amostras. Gráficos tipo “log-log” foram construídos em planilha do Microsoft Office Excel[®] de acordo com as médias dos padrões de cada kit, cujas concentrações de citocinas eram conhecidas. Procurou-se o melhor ajuste da linha de tendência através dos pontos padrão, considerando o valor de r . Para a determinação das concentrações foram introduzidas as médias das absorbâncias de cada amostra na sua respectiva equação da reta. Os resultados foram expressos em pg/mL.

O balanço pró/anti-inflamatório foi determinado pela razão das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) pela anti-inflamatória (IL-10).

4.6.3.2 Proteína C-Reativa

As concentrações séricas de PCR foram determinadas pelo método turbidimétrico (PELTOLA; VALMARI, 1985). O reagente continha partículas de látex de poliestireno recobertas de anticorpos anti-PCR humana. O princípio do teste baseia-se na reação entre PCR da amostra do paciente com as partículas de látex sensibilizadas provocando uma aglutinação destas e gerando por consequência, uma turbidez cuja intensidade foi verificada através de leitura em um espectrofotômetro (ADVIA[®] Chemistry Systems - Siemens Medical Solutions Diagnosis, NY, USA) em comprimento de onda de 540 nm. Resultados foram expressos em mg/L. Valores de referência para normalidade: < 5,0 mg/L (recomendação do Laboratório Médico Santa Luzia).

4.6.3.3 Albumina

Albumina sérica foi determinada quantitativamente pelo método colorimétrico de verde de bromocresol (DOUMAS; WATSON; BIGGS, 1971). Adicionou-se 10 µL de soro em 2 mL do reagente de cor (solução de verde de bromocresol, tampão succinato 0,1 M e surfactante não iônico 35%) com pH ácido. Na reação a cor do indicador sofre alteração, passando de verde-amarelado para azul-esverdeado. A concentração foi determinada através da leitura em espectrofotômetro (ADVIA[®] Chemistry Systems - Siemens Medical Solutions Diagnosis, NY, USA) em comprimento de onda de 630 nm. O resultado foi expresso em g/dL. Faixa de referência para normalidade: 3,2 a 4,8 g/dL (recomendação do Laboratório Médico Santa Luzia).

4.6.4 Relação proteína C-reativa/albumina

A relação PCR/Albumina representa um indicador simplificado do Índice de Prognóstico Nutricional e Inflamatório – IPIN, originalmente criado por Ingenbleek e Carpentier (1985). Os valores classificatórios dos graus de risco de complicações adotados foram: sem risco: < 0,4; baixo risco: 0,4-1,2; médio risco: 1,2-2,0; alto risco: > 2,0 (CORREIA et al., 2002).

4.6.5 Determinação da composição de ácidos graxos plasmáticos

Alíquotas de plasma congeladas foram transportadas sob condições adequadas de refrigeração até o Laboratório de Metabolismo Celular (Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná) para a determinação do perfil de ácidos graxos plasmático, de acordo com as técnicas descritas a seguir.

4.6.5.1 Extração lipídica

Foi utilizada uma adaptação da metodologia descrita por Folch et al (1957).

As amostras de plasma descongeladas foram ressuspensas em água e adicionado clorofórmio na mesma proporção. Após centrifugação

de 2 min a 450 g o infranadante foi transferido para outro tubo e acrescido de uma solução de clorofórmio:metanol (1:1, v:v) e novamente centrifugado. O infranadante foi então coletado e acrescido de 0,5 mL de metanol e 1 mL de clorofórmio, e então, agitados em vórtex e posteriormente centrifugados a 1500 g por 2 minutos a 4 °C. A fase inferior foi transferida para outro tubo, e com a fase superior foi realizada nova extração com 0,5 mL de metanol e 1 mL de clorofórmio. Ao total de fases inferiores coletado das 2 extrações foi adicionado 1 mL da solução de clorofórmio:metanol:água, na proporção de 3:47:48 (solvente de Folch). Cada amostra foi agitada e centrifugada e, após o descarte da fase superior (hidrometanólica), a fase orgânica foi evaporada com nitrogênio gasoso.

4.6.5.2 Saponificação dos extratos lipídicos

Os extratos lipídicos obtidos do plasma foram ressuspensos em 100 µL de metanol e saponificados com 2,0 mL de uma solução alcalina em metanol (hidróxido de sódio 1M em metanol a 90%), a 37 °C por 2 horas, em banho-maria com agitação (HAMILTON et al., 1992; NISHIYAMA-NARUKE et al, 1998). A solução alcalina foi então acidificada até aproximadamente pH 3,0, com ácido clorídrico 1 M. Os ácidos graxos em solução foram extraídos 3 vezes com 2,0 mL de hexano. O solvente foi evaporado em nitrogênio gasoso e as amostras então guardadas protegidas da luz, a -20°C, até a derivatização com BMMC.

4.6.5.3 Derivatização dos ácidos graxos

A reação de derivatização foi baseada no método descrito por Abushufa, Reed e Weinkove (1994). O reagente 1 foi preparado adicionando-se 10 mg de BMMC em 10 mL de acetonitrila. O reagente 2 foi preparado adicionando-se 26,5 mg de 18-crown-6 e 100 mg de carbonato de potássio em 5 mL de acetonitrila. O reagente 2 foi sonicado por 30 minutos e outros 5 mL de acetonitrila foram adicionados. O sobrenadante foi separado do precipitado e a solução foi estocada a 4-8 °C. As amostras contendo ácidos graxos a serem derivatizados foram reconstituídas em 100 mL de acetonitrila e homogeneizadas em vórtex. Após 30 segundos, foram adicionados 100 µL do reagente 1, e 100 µL do reagente 2. As amostras foram

novamente homogeneizadas, mantidas a 60 °C por 15 minutos, e em seguida transferidos para frascos apropriados para injeção.

Para a análise dos ácidos graxos derivatizados através do detector de fluorescência, foram realizadas injeções de volumes que variaram de 10 a 50 µL dos derivados diluídos. O fluxo foi de 1,0 mL/minuto, à temperatura controlada de 23 °C. Os compostos foram detectados fluorimetricamente com excitação a 325 nm e emissão a 398 nm. Quanto à fase móvel, foi realizado gradiente binário com acetonitrila e água, iniciando com a proporção de 77:23% (acetonitrila:água) e finalizando com 90:10, em um total de 55 minutos.

4.6.5.4 Análise de ácidos graxos por HPLC

Após extração lipídica, saponificação dos extratos e derivatização dos ácidos graxos obtidos, as amostras foram injetadas em um sistema HPLC – Varian modelo LC-10A e detector de fluorescência (325 nm de excitação e 395 nm de emissão). A coluna analítica utilizada para a separação dos ácidos graxos derivatizados foi C-8 de fase reversa (25 cm × 4,6 mm i.d., 5 µm de partícula), com um fluxo de 1 mL/min de acetonitrila/água (73:23, vol/vol). A mistura de padrões de ácidos graxos foi obtida da empresa Sigma-Aldrich.

4.6.6 Avaliação do estado nutricional

4.6.6.1 Antropometria

Peso atual, peso usual, estatura, e dobras cutâneas tricipital, bicipital, subescapular e suprailíaca foram aferidas e mensuradas por profissional padronizado, seguindo técnicas propostas por Lohman e colaboradores (1988).

O peso atual foi mensurado em balança eletrônica de plataforma com capacidade máxima de 150 kg e escala de 100 g, da marca Toledo[®] (Empresa Toledo do Brasil, São Bernardo do Campo, SP, Brasil). A altura foi aferida utilizando-se estadiômetro acoplado à balança com comprimento máximo de 2 m e escala de 1 cm. Espessura das dobras cutâneas foram medidas com compasso Lange Skinfold Caliper[®] (Beta Technology Incorporated, Santa Cruz, Califórnia, EUA), em duplicata,

sendo calculada a média aritmética quando da divergência das aferições. Peso usual foi obtido pelo relato do paciente.

4.6.6.2 Indicadores do estado nutricional

4.6.6.2.1 *Índice de massa corpórea - IMC*

Razão entre o peso do indivíduo e a sua altura ao quadrado. O resultado é apresentado em kg/m^2 e confrontado com valores de referência para a classificação do estado nutricional, propostos pela *World Health Organization* (2008).

4.6.6.2.2 *Percentual de perda de peso*

Resultado da divisão entre ΔP (diferença entre o peso atual e o peso usual) e o peso usual, multiplicado por 100, para ser expresso em percentual. Sua classificação é relacionada com o tempo de perda (DETSKY et al., 1987).

4.6.6.3 Composição corporal

Percentual de gordura corporal foi estimado pela equação de Siri (1961) a partir do cálculo de densidade corpórea, determinada pelo método de Durnin & Womersley (1974) utilizando o somatório das quatro dobras cutâneas (tricipital, bicipital, subescapular e suprailíaca).

4.6.7 Avaliação da toxicidade à quimioterapia

A toxicidade à quimioterapia foi avaliada segundo relatos de sinais e sintomas relacionados aos possíveis efeitos colaterais da quimioterapia, coletados em entrevistas realizadas nos momentos basal e 9 semanas. Os indivíduos foram interrogados quanto a presença e intensidade dos sinais e sintomas listados no formulário de coleta de dados (Apêndice A), nos últimos 7 dias.

Cada sinal/sintoma recebeu uma classificação crescente do grau de intensidade: 0 (presença/intensidade nula) a 10 (máxima intensidade já sentida).

4.6.8 Quantificação da ingestão alimentar

O consumo dietético atual dos indivíduos foi estimado através da aplicação de quatro Recordatórios de 24 Horas. Os indivíduos foram encorajados a relatar, com o máximo de detalhes (tipo, forma de preparo, ingredientes, quantidades em medidas caseiras), todos os alimentos e bebidas consumidos no dia anterior, em cada refeição. Ao final da entrevista, o pesquisador procedia a revisão dos alimentos e das quantidades relatadas e registradas com o entrevistado (GUENTHER et al., 1996).

Para a transformação das medidas caseiras em gramaturas de alimentos, foi utilizada a tabela de equivalências de Pinheiro et al. (2002). Para a análise estimada do quantitativo de nutrientes (carboidratos; proteínas; gorduras total, saturada, monoinsaturadas e poli-insaturadas; fibra alimentar; vitamina D, cálcio, e ácidos graxos n-3 e n-6) foram utilizados a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (NEPA/UNICAMP, 2006) e o software de nutrição DietWin Clínico 2008 (BRUBINS Comércio de Alimentos e Supercongelados Ltda., Porta Alegre, Brasil). As preparações sem registro na tabela TACO foram desmembradas em ingredientes e quantidades/porção de acordo com o Manual de Receitas e Medidas Caseiras para Cálculos de Inquéritos Alimentares (FISBERG; VILLAR, 2002). Os alimentos e bebidas relatados que não constam na tabela TACO, foram analisados utilizando o banco de dados do programa⁴ ou então substituídos por um alimento de características semelhantes.

Foi calculada a média/mediana dos quatro recordatórios para representar a medida estimada do consumo habitual dos indivíduos, minimizando desta forma, as diferenças intraindividuais de variabilidade no consumo de alimentos.

4.7 MODELO DE ANÁLISE

No quadro 4 estão descritas as variáveis e suas dimensões (indicadores) utilizadas nas análises propostas.

As variáveis sexo, idade, localização do tumor, estadiamento clínico, hábito tabágico, peso, IMC e perda de peso nos últimos 6 meses foram utilizadas para a caracterização dos participantes do estudo.

Variáveis politômicas foram transformadas em dicotômicas, sem que houvesse um julgamento inapropriado (Ex: hábito tabágico) ou quando da existência de categorias com frequência nula (Ex: estadiamento clínico).

A variável “Ingestão de óleo de peixe” foi considerada a exposição, e as demais variáveis dependentes, que não foram utilizadas para caracterização dos participantes, os desfechos.

⁴ A tabela de composição de alimentos DietWin é uma compilação média dos valores encontrados nas tabelas: **TABELA BRASILEIRA** – BRASILFOODS – USP; **IBGE**; **USDA**; CENEXA - Fundación para la promoción de la educación y la investigación em diabetes y enfermedades de la nutrición. **Tabla de composición química de alimento**. 2. ed. 1995.; **ALEMÃ** - **Die grosse gu nährwert tabelle**, edición revisada, 1998 (versión en español); FAVIER, JEAN CLAUDE, et al. **Repertório geral dos alimentos** - Tabela de composição. 2. ed., Rev. e Amp. SP: Roca, 1999; **ALIMENTOS REGIONAIS BRASILEIROS**, 1. ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2002; FIBRAS - ENDEZ, M.H.M. et al. **Tabela de composição de alimentos**. RJ: EDUFF, 1995; **ÁCIDOS GRAXOS** - STOLPHER BLOCK, A.; SHILLS, M. (Eds). **Nutrition Fact Manuel**: a quick reference. USA, 1996; informação nutricional do fabricante dos produtos.

Quadro 4 - Variáveis, suas características e indicadores para o modelo de análise.

Variável	Indicadores	Classificação teórica
Sexo	Masculino Feminino	Independente, qualitativa nominal dicotômica
Idade	Anos	Independente, quantitativa discreta
Localização do tumor	Cólon Reto	Independente, qualitativa nominal, dicotômica
Estadiamento Clínico (TNM)	III IV	Independente qualitativa ordinal, dicotômica
Ressecção tumoral nos últimos 4 meses	Sim Não	Independente, qualitativa nominal dicotômica
Hábito tabágico	Nunca-fumante Ex-fumante	Independente qualitativa nominal dicotômica
Ingestão alimentar	g de CHO, PTN, GORD totais e frações	Independente quantitativa contínua
Perda de peso nos últimos 6 meses	%	Dependente quantitativa discreta
Ingestão de óleo de peixe	Sim Não	Dependente, qualitativa nominal dicotômica
Peso	kg	Dependente quantitativa contínua
IMC	kg/m ²	Dependente quantitativa contínua
Gordura corporal	%	Dependente quantitativa contínua
Massa magra	kg	Dependente quantitativa contínua
Albumina	g/dL	Dependente quantitativa contínua
PCR	mg/L	Dependente quantitativa contínua
IL-1 β ; IL-10; IL-17A; TNF- α	pg/mL	Dependente quantitativa contínua
Relação PCR/albumina	Sem risco = <0,4 Baixo risco 0,4-1,2 Médio risco 1,2-2,0 Alto risco > 2,0	Dependente qualitativa ordinal politômica
Perfil de ácidos graxos plasmáticos	% de AA, EPA, DHA, AG oléico, palmítico, razão n-6:n-3	Dependente quantitativa contínua
Sinais e sintomas clínicos	0 – 10 (graus de intensidade)	Dependente quantitativa discreta

Abreviações: AA, ácido araquidônico; AG, ácido graxo; CHO, carboidrato; DHA, ácido Docosahexaenóico; EPA, ácido eicosapentaenóico; GORD, gordura; PTN, proteína.

Fonte: Do autor.

4.8 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados coletados foram organizados e digitalizados com dupla-entrada em planilhas do Microsoft Office Excel[®] versão 2010 por um único pesquisador. Médias das variáveis foram comparadas ao final do processo para a verificação da concordância dos dados.

Para os análises estatísticas as variáveis sexo, idade, localização tumoral, estadiamento clínico, ressecção tumoral nos últimos 6 meses, hábito tabágico, altura, proporção de perda de peso nos últimos seis meses e ingestão alimentar foram utilizadas para a caracterização da amostra. A variável ingestão de óleo de peixe (sim/não) representou a exposição e, peso corpóreo, IMC, percentual de gordura corporal, citocinas plasmáticas, PCR, albumina, perfil de AG plasmáticos, relação PCR/Albumina e sinais e sintomas clínicos relacionados aos efeitos colaterais da quimioterapia foram as variáveis de desfechos (Quadro 4).

A normalidade da distribuição dos dados foi testada pelo teste Shapiro Wilk considerando como independentes os grupos de exposição e os momentos do estudo.

As variáveis cuja distribuição dos dados apresentou simetria foram apresentadas sob a forma de média e desvio padrão, caso contrário, em mediana e intervalo interquartil.

Teste de Qui quadrado Exato de Fisher foi aplicado para testar as diferenças entre as variáveis dicotômicas no momento basal entre os grupos de tratamento. Test t de student ou de Mann Whitney foi utilizado para comparar desfechos contínuos intergrupos se distribuição simétrica ou assimétrica, respectivamente. Test T pareado foi aplicado para detectar diferenças intragrupo nos momentos basal e final quando variável de desfecho apresentou-se simétrica, ou teste de Wilcoxon, se variável desfecho assimétrica.

Validade externa foi testada utilizando as variáveis idade, sexo, estadiamento clínico e localização tumoral.

Todas as análises foram realizadas no programa estatístico STATA[®] versão 11.0 para Windows, licenciado para o PPGN.

Valores do *P* foram considerados significativos quando $< 0,05$.

4.9 ASPECTOS ÉTICOS

Este ensaio clínico faz parte de um temático intitulado “Relação entre a suplementação de n-3 PUFA com a resposta inflamatória (PCR e citocinas) e o estado nutricional em pacientes com câncer colorretal”

aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisa Oncológicas de Florianópolis com o parecer nº 005/2009.

As propostas do presente estudo foram aprovadas pelo mesmo CEP sob a forma de emendas de continuidade (protocolo nº 058/2010) e estavam de acordo com a Resolução CNS 196/96 (BRASIL, 1996), bem como, a declaração de Helsinki (1964) (RICKHAN, 1964).

Todos os participantes do estudo informaram seu consentimento de participação através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice D) após a sua leitura conjunta e elucidação de possíveis dúvidas recorrentes.

5 RESULTADOS

5.1 MANUSCRITO

Suplementação de óleo de peixe durante a quimioterapia melhora a relação proteína C-reativa/albumina e o perfil de ácidos graxos plasmáticos de indivíduos portadores de câncer colorretal

Título Curto

Suplementação de óleo de peixe em câncer colorretal

Palavras-chave: Óleo de peixe, Ácidos graxos poli-insaturados n-3, Câncer colorretal, citocinas, Perfil de ácidos graxos plasmáticos

Financiamentos

Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina: financiamento das avaliações de marcadores inflamatórios
Programa de Pós-Graduação em Nutrição/UFSC - Programa de Bolsas Demanda Social / Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES): concessão de bolsa de estudo ao autor principal

Resumo

Estudos prévios mostram que ácidos graxos poli-insaturados n-3 (AGPI n-3) possuem diversos efeitos anticâncer, especialmente atribuídos a sua capacidade de modular uma série de respostas gênicas e imunes. Nesse contexto, este ensaio clínico randomizado, prospectivo e controlado foi conduzido com o objetivo de verificar se a suplementação de 2 g/dia de óleo de peixe durante nove semanas altera a produção de marcadores inflamatórios, o perfil de ácidos graxos plasmáticos, indicadores do estado nutricional e a tolerância à quimioterapia de indivíduos portadores de câncer colorretal (CCR). Onze indivíduos adultos portadores de CCR em quimioterapia foram randomizados para dois grupos: (a) suplementado (GS) diariamente com 2 g/dia de óleo de peixe encapsulado (fornecendo 600 mg/dia de EPA + DHA) durante nove semanas (n=6), ou, (b) controle (GC) (n=5). Todos os desfechos foram avaliados no dia anterior a primeira quimioterapia e nove semanas depois. TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-17A, assim como o balanço pró/anti-inflamatório (relação TNF- α /IL-10 e IL-1 β /IL10) e albumina

sérica, não tiveram alterações significativas entre os momentos e os grupos de estudo ($P > 0,05$). Proteína C-reativa (PCR) apresentou comportamento inverso nos grupos, reduzindo significativamente seus valores no GS ($p < 0,05$). Relação PCR/albumina indicou um aumento significativo no risco de complicações nutricionais e inflamatórias no GC (de baixo a médio para alto risco), enquanto que no GS, o risco se manteve baixo. As proporções plasmáticas de EPA e de DHA aumentaram 1,8 e 1,4 vezes, respectivamente, enquanto que a de AA reduziu aproximadamente 0,6 vezes com a suplementação (Basal vs 9 Semanas, $p < 0,05$). Indivíduos do GS ganharam 1,2 kg (mediana) enquanto que o GC perdeu -0,5 kg durante as nove semanas de quimioterapia ($p > 0,05$). A suplementação pareceu não exercer efeitos importantes sobre as queixas de toxicidade à quimioterapia. Estes resultados demonstram que 2 g/dia de óleo de peixe durante nove semanas de quimioterapia melhora os valores de PCR, bem como a relação PCR/albumina, o perfil de ácidos graxos plasmáticos e previne a perda de peso durante o tratamento.

Introdução

Estudos têm sugerido que ácidos graxos poli-insaturados da família n-3 (AGPI n-3), especialmente os ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), encontrados no óleo de peixe, podem ter inúmeras aplicações no tratamento antineoplásico. Além de inibir a progressão de vários tipos de câncer (1,2), incluindo o colorretal (3,4), de melhorar a sensibilidade das células tumorais a várias drogas anticâncer (5,6) e à terapia radioativa (7), os AGPI n-3 foram associados também ao ganho de peso em pacientes com caquexia relacionada ao câncer (8, 9) e a inúmeros efeitos imunomodulatórios (10,11).

A oferta diária de AGPI n-3, independentemente da via, resulta em uma seletividade na incorporação destes ácidos graxos em constituintes lipídicos sanguíneos e em membranas de células imunes, tumorais e de tecidos, em detrimento aos AGPI n-6 ou a qualquer outro ácido graxo de menor número de insaturações. Isso implica em alterações de uma variedade de funções biológicas relacionadas à membrana celular, tais como fluidez, expressão de receptores, transdução de sinal, interação celular, atividade enzimática associada à membrana e em especial, a produção de eicosanóides (12).

A associação da “super expressão” da via enzimática da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) em células tumorais do câncer de cólon ao

desequilíbrio na ingestão dietética da relação n-6:n-3, principalmente na dieta ocidental, têm favorecido a manutenção de um estado inflamatório crônico, sustentado pela produção de prostaglandinas (PGs) de sufixo par, especialmente a PGE₂, com características pró-inflamatórias e pró-tumorigênese (13). A correção do balanço n-6:n3, feito por meio da ingestão de alimentos fontes de AGPI n-3 como peixes gordurosos ou pela suplementação com ácidos graxos isolados, direciona a produção de eicosanóides pela COX-2 para uma série ímpar, como a PGE₃, com atividades antitumorigênica e menor potencial inflamatório (14, 15). Além disso, os AGPI n-3 podem interferir na transdução gênica de fatores de transcrição, como o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) e os receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPAR), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α) e consequentemente, a resposta inflamatória coordenada por estas, caracterizada por valores elevados de PCR e redução das concentrações de albumina plasmática (16).

Valores de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α), assim como da citocina contraregulatória (IL-10) encontram-se elevados no câncer colorretal (CCR) evidenciando a presença de um estado inflamatório ativo e permanente (17). Valores elevados de PCR, sintetizada primariamente pelos hepatócitos em resposta a inflamação, associam-se com o estágio e a malignidade da doença, e indicam piores prognósticos (18).

Pelo processo inflamatório, que se mantém exacerbado no câncer, aliado aos efeitos colaterais resultantes da toxicidade a quimioterapia, uma série de desfechos clínicos, em especial os relacionados ao estado nutricional, podem ser prejudicados. Desta forma, estratégias que possam reduzir a inflamação e suas consequências e/ou, que possam prevenir alterações negativas do estado nutricional, como a utilização de AGPI n-3, podem prover importantes benefícios para o paciente durante o tratamento.

Assim, o objetivo deste estudo foi verificar se a suplementação de 2 g/dia de óleo de peixe durante nove semanas em pacientes portadores de câncer colorretal em quimioterapia altera desfechos de inflamação e do estado nutricional, o perfil de ácidos graxos plasmáticos e a tolerância a quimioterapia. Hipotetiza-se que a ingestão do suplemento fonte de AGPI n-3 promova modificações positivas nos parâmetros analisados.

Participantes do estudo e Métodos

Participantes do estudo

Participaram deste ensaio clínico randomizado, prospectivo e controlado, indivíduos ambulatoriais portadores de câncer de colón e/ou reto assistidos no Centro de Pesquisas Oncológicas de Florianópolis, SC, Brasil no período de julho de 2011 a março de 2012. Os critérios para elegibilidade adotados foram: idade >19 anos; diagnóstico histopatológico de carcinoma colorretal e indicação de tratamento quimioterápico. Não foram incluídos aqueles em tratamento paliativo ou em uso de estatina ou fármacos anti-inflamatórios; com alergia a peixes e derivados; sem condições de ingestão via oral; submetidos anteriormente à quimioterapia; portadores de doenças autoimunes ou cuja patogenia esteja relacionada a um processo inflamatório; e, os que fizeram uso de suplementos contendo óleo de peixe ou AGPI n-3 por um período prolongado (> 120 dias) seis meses antes ao início do estudo.

A amostra de conveniência não-probabilística foi definida pela saturação temporal.

Desenho do estudo

Os indivíduos elegíveis foram alocados randomicamente em dois grupos de tratamento: Grupo Suplementado (GS) e Grupo Controle (GC).

Os participantes do GS foram orientados a ingerir quatro cápsulas/dia de óleo de peixe (2 g/dia), adicional a ingestão dietética habitual, durante nove semanas. Foram orientados a proceder a ingestão das cápsulas de forma dose-fracionada, aproximadamente 20 a 30 min antes de duas refeições principais e acompanhada de líquido, além de fazer o registro de ingestão dessas em formulário específico disponibilizado. A suplementação iniciou no primeiro dia da quimioterapia.

A randomização foi realizada com o auxílio de uma ferramenta desenvolvida para o Microsoft Office Excel[®], a qual utilizava a linguagem de programação VB e designava o indivíduo para um dos grupos de acordo com a multiplicação do número do prontuário do paciente na Instituição por um número randômico entre 0 e 1 gerado pelo Excel[®], que era modificado para cada seleção. Foi adotado para o direcionamento, resultados ímpares como pertencentes ao GS, e pares, para o GC. Para manter a proporcionalidade de participantes nos grupos de estudo, o segundo indivíduo de cada par era designado para o grupo

contrário ao primeiro, independente do direcionamento da ferramenta utilizada para a randomização.

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Instituição e esteve de acordo com a Declaração de Helsinki (1964) (19). Todos os participantes concordaram em participar do estudo, assinando um termo de consentimento livre e esclarecido.

Este ensaio clínico foi registrado na Plataforma TrialGov com o número NCT01575340.

Suplemento dietético

O suplemento de óleo de peixe foi oferecido na forma de cápsulas gelatinosas na proporção de 500 mg/cápsula (Omega 3, Phytomare[®], Governador Celso Ramos, SC, Brasil) extraído de salmão, cavalinha e sardinha, além de gelatina e glicerina. Cada cápsula continha 150 mg de ácidos graxos poli-insaturados n-3 (90 mg de EPA e 60 mg de DHA), 130 mg de gordura monoinsaturada e 160 mg de gordura saturada.

Protocolo de coleta e preparo do material biológico

Amostras sanguíneas (15 mL), em jejum de aproximadamente 8 horas, foram coletadas em dois momentos: no dia anterior à primeira quimioterapia (Basal); e 9 semanas depois (9 Semanas). A punção venosa foi realizada na região cubital do antebraço por um profissional capacitado. O material foi coletado em tubos à vácuo contendo anticoagulante (heparina sódica) para a determinação de citocinas e do perfil de ácidos graxos plasmáticos, e gel separador para a determinação sérica de PCR e albumina.

Para a separação, a amostra contendo anticoagulante foi centrifugada a 1800 rpm por 7 minutos a temperatura aproximada de 4° C, e alíquotas de plasma (500 µL) armazenadas a -80°C. A amostra em gel separador foi deixada a temperatura ambiente por cerca de 30 min para a completa coagulação, depois, centrifugada a 4700-5100 rpm durante 10 a 15 minutos para a extração do soro, o qual seguiu para a dosagem de PCR e albumina.

Protocolo de avaliação dos marcadores de inflamação

Ao final do estudo as alíquotas de plasma foram descongeladas a temperatura ambiente, homogeneizadas e imediatamente submetidas à determinação de citocinas (IL-1 β , IL-10, IL-17A e TNF- α) pelo teste *solid phase sandwich* ELISA (BD OptEIA[™], BD Biosciences, San

Jose, CA; ou eBioscience, San Diego, CA, EUA), conforme protocolos descritos pelos fabricantes. Os limiares mínimos de detecção dos kits utilizados foram: 2 pg/mL para TNF- α e IL-10; e 0,8 pg/mL para IL-1 β . Sensibilidade do teste de IL-17A era de 4 pg/mL. Concentrações foram expressas em pg/mL.

O nível sérico de PCR foi quantificado pelo método turbidimétrico (20) e o de albumina, pelo método colorimétrico de verde de bromocresol (21). Concentrações foram expressas em mg/L e em g/dL, respectivamente.

Relação PCR/albumina

O índice da relação PCR/Albumina fornece uma previsão do prognóstico nutricional e inflamatório do paciente. Foi calculado a partir da relação dos valores séricos de PCR e albumina. As faixas de classificação de risco adotadas foram: sem risco: < 0,4; baixo risco: 0,4-1,2; médio risco: 1,2-2,0; alto risco: > 2,0 (22).

Extração e determinação de ácidos graxos plasmáticos

Ácidos graxos plasmáticos constituintes de fosfolipídios, triacilgliceróis, ésteres de colesterol, e AG livres, foram extraídos utilizando clorofórmio:metanol (2:1, vol:vol). Os extratos lipídicos foram suspensos em metanol e o pH da solução ajustado a ≥ 12 com 5 mol/L NaOH. A solução aquosa foi acidificada com ácido clorídrico (pH ≤ 3) e submetida a uma nova extração lipídica por hexano, seguida de evaporação por N₂ gasoso 37°C. Os ácidos graxos foram derivatizados com 4-bromometil-7-cumarina e acetonitrila e posteriormente, separados num cromatógrafo líquido Varian pro-Star (SpectraLab Scientific Inc., Ontario, Canada) de alta eficiência usando uma coluna octadecilssilica (25 cm x 4,6 mm i.d.; tamanho de partícula 5 μ m). Derivados de ácidos graxos foram detectados por fluorescência (325 nm de excitação; 398 nm de emissão) e os dados integrados e analisados pela estação de trabalho LCPro-Star 6,0.

Avaliação do estado nutricional e ingestão alimentar

Dados antropométricos foram aferidos por profissional padronizado nos momentos Basal e 9 Semanas. Peso e altura foram aferidos com o auxílio de Balança eletrônica de plataforma com estadiômetro vertical acoplado, marca Toledo® (Empresa Toledo do Brasil, São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Peso usual foi autorrelatado pelo participante. Dobras cutâneas tricipital, bicipital, subescapular e suprailíaca foram aferidas com compasso Lange Skinfold

Caliper[®] (Beta Technology Incorporated, Santa Cruz, Califórnia, EUA). Todas as medidas antropométricas foram aferidas seguindo técnicas padrão (23).

O indicador do estado nutricional índice de massa corpórea (IMC) foi obtido pela relação do peso (kg) pelo quadrado da altura (m). Os pontos de corte para classificação adotados foram propostos pela *World Wealth Organization* (24). O percentual de perda de peso foi calculado pela razão entre a diferença de peso nos últimos seis meses ao início do estudo e o peso basal do indivíduo (25). Percentual de gordura corporal foi estimado a partir do somatório das quatro dobras cutâneas aferidas (26).

Dados de ingestão alimentar foram coletados por um mesmo profissional através da aplicação de quatro recordatórios 24 horas durante o período de estudo, com intervalo mínimo de 15 dias entre um e outro, iniciando com a aplicação de um recordatório 24 horas no momento pré-quimioterapia (Basal). Os indivíduos foram encorajados a relatar, com o máximo de detalhes (tipo, forma de preparo, ingredientes, quantidades em medidas caseiras), todos os alimentos e bebidas consumidos no dia anterior, em cada refeição. Ao final da entrevista, o pesquisador procedeu a revisão dos alimentos e das quantidades relatadas e registradas com o entrevistado (27). A análise foi realizada no programa DietWin Clínico 2008 (BRUBINS Comércio de Alimentos e Supercongelados Ltda., Porto Alegre, Brasil) utilizando a Tabela Brasileira de Composição Química de Alimentos (28) ou o banco de dados próprio do software. Para a transformação de medidas caseiras relatadas em gramas de alimentos foi utilizada tabela de equivalências (29). Os quatro recordatórios forneceram uma única medida (média ou mediana) de ingestão/indivíduo.

Estilo de vida, dados clínicos e outros dados

Hábito tabágico, ressecção cirúrgica, frequência de consumo de peixe e os sinais e sintomas clínicos relacionados a doença e/ou a toxicidade ao tratamento foram coletados em entrevista direta. Dados referentes à data de nascimento, localização do tumor e estadiamento clínico foram obtidos do prontuário do paciente.

Análise estatística

Para as análises, a ingestão de óleo de peixe foi considerada a variável de exposição. Concentrações de IL-1 β , IL-10, IL-17A, TNF- α , PCR e albumina, relação PCR/albumina e perfil de ácidos graxos plasmáticos foram os desfechos primários avaliados. Desfechos

secundários incluíram peso corpóreo, IMC, percentual de gordura corporal e sinais e sintomas clínicos relacionados a doença e/ou a toxicidade ao tratamento quimioterápico.

A simetria dos dados foi testada pela aplicação do teste de Shapiro Wilk considerando como independentes os grupos de exposição e os momentos do estudo.

Os testes *t de student* ou Mann-Whitney foram utilizados para testar as diferenças entre os grupos nos momentos do estudo. Test *t* pareado ou de Wilcoxon para dados pareados, foram empregados para testar as diferenças entre os diferentes momentos nos grupos de tratamento. Teste Qui² Exato de Fisher foi utilizado para testar diferenças de variáveis dicotômicas de caracterização.

Validade externa foi testada utilizando as variáveis idade, sexo, estadiamento clínico e localização tumoral.

Para a apresentação, todos os dados foram sumarizados em duas medidas de dispersão: média e desvio padrão – \bar{x} (*DP*), se distribuição simétrica; ou, mediana e intervalo interquartil – \tilde{x} [*IQR*], se distribuição assimétrica.

Todas as análises foram efetuadas no programa STATA 11.0, versão para Windows, licenciado para o Programa de Pós-Graduação em Nutrição – UFSC, considerando valor de $p < 0,05$ para significância estatística.

Resultados

Cinquenta e sete novos casos de CCR foram identificados no CEPON entre o período de julho de 2011 a março de 2012. Do total, oito indivíduos não foram considerados elegíveis de acordo com os critérios de inclusão. Doze indivíduos potencialmente elegíveis não foram identificados antes do início da quimioterapia. Sendo assim, trinta e sete indivíduos foram convidados a fazer parte deste ensaio clínico. O percentual de recusa foi de 62%. Dos quatorze indivíduos que aceitaram participar do estudo, três deles foram internados para a realização da primeira quimioterapia, e portanto não poderiam se dirigir ao laboratório de análises clínicas para a primeira coleta de sangue. Por fim, onze indivíduos (22% da população elegível) foram randomizados para os dois grupos de tratamento, conforme demonstrado na figura 8. Nenhum indivíduo randomizado desistiu ou foi retirado do estudo.

As características de idade, sexo, localização e estágio do tumor dos indivíduos elegíveis perdidos ($n=38$) não foram significativamente diferentes do grupo avaliado ($n=11$) (Tabela 1).

Características dos Participantes do Estudo

As características basais dos onze participantes randomizados mostram que os grupos de estudo eram comparáveis. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos para as variáveis de caracterização (Tabela 2).

Nove indivíduos (82%) foram submetidos à ressecção tumoral nos últimos quatro meses precedentes a sua inclusão no estudo; três (27%), apresentavam invasão tumoral a outros órgãos ou estruturas (T4); sete (64%) apresentavam metástase em 1 a 3 linfonodos regionais (N1); e dois (18%), metástase à distância (M1). Nenhum indivíduo foi classificado como desnutrido, apesar de três apresentarem perda de peso maior que 10% após a ressecção tumoral. Sete (64%) possuíam excesso de peso, sendo três obesos ($IMC \geq 30$ kg/m²). Todos os pacientes designados para o grupo suplementado (GS) cumpriram com no mínimo 90% do protocolo de suplementação.

Os fármacos quimioterápicos utilizados de forma isolada ou combinada para o tratamento desses pacientes foram: Xeloda (n=5), oxaliplatina (n=6), 5-Fluorouracil (n=6) e Leucovorin (n=6). As sessões de quimioterapia por infusão eram realizadas a cada 15 ou 21 dias. Já a quimioterapia domiciliar, caracterizada pela ingestão do fármaco quimioterápico sob a forma de drágeas/comprimidos, era realizada diariamente.

Marcadores inflamatórios e relação PCR/Albumina

Concentrações plasmáticas das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-17A, assim como o balanço pró/anti-inflamatório (razão IL-1 β e TNF- α /IL-10), foram semelhantes nos momentos e nos grupos de estudo, sem diferença estatística observada entre eles (Tabela 3).

Albumina sérica também não apresentou diferença significativa nos momentos entre os grupos, apesar de seus valores apresentarem uma redução no GC ao final do estudo (9 Semanas – Basal = $-0,32 \pm 0,26$ g/L, $P = 0,051$). Em contraste, níveis séricos de PCR foram significativamente reduzidos no GS (9 Semanas – Basal = $-8,8 \pm 13,5$ mg/L, $P = 0,028$) a medida que se elevou no GC (9 Semanas – Basal = $27,4 \pm 30,2$ mg/L, $P = 0,043$), apresentando diferença significativa entre os grupos no momento 9 Semanas ($P = 0,045$) (Tabela 3).

O índice da relação PCR/Albumina apresentada na figura 9 mostra comportamento inverso nos grupos de estudo. Enquanto que no grupo sem suplementação (GC) os indivíduos passaram das categorias de classificação de baixo e médio risco, para alto risco de complicações,

no grupo que ingeriu óleo de peixe durante nove semanas, todos os indivíduos foram concentrados na categoria de baixo risco.

Perfil dos Ácidos Graxos Plasmáticos

A análise do perfil de ácidos graxos no momento basal demonstrou maiores concentrações plasmática dos ácidos graxos poli-insaturados n-3 EPA e DHA, também de ácido graxo poli-insaturado n-6 AA, e do ácido graxo saturado Palmítico no grupo suplementado quando comparado ao controle. Entretanto nenhuma diferença significativa foi detectada ($P > 0,05$). Com a suplementação diária de 600 mg de AGPI n-3, os níveis plasmáticos de EPA e DHA aumentaram em média 1,8 e 1,4 vezes, respectivamente, apresentando diferença estatisticamente significativa (momento basal vs 9 semanas: $P < 0,05$). AA n-6 plasmático também sofreu alterações com a suplementação de óleo de peixe, reduzindo significativamente (de 29,4 para 17,41%) sua concentração (momento basal vs 9 semanas: $P = 0,028$). Diferença significativa também foi observada entre os grupos de tratamento para proporção plasmática de EPA e DHA no momento 9 semanas ($P < 0,05$). Os ácidos graxos monoinsaturado Oléico e saturado Palmítico apresentaram comportamento inverso nos grupos de tratamento, sem diferença estatística significativa (Figura 10).

A razão de ácidos graxos n-6:n-3 plasmática passou de 8,1:1 para 8,7:1 no grupo controle ($P > 0,05$) e de 10,2:1 para 4,6:1 no grupo suplementado ($P = 0,116$). Ao compararmos a razão n-6:n-3 entre os grupos de tratamento observamos diferença significativa apenas para o momento 9 semanas ($P = 0,010$).

Estado nutricional e indicadores clínicos

Considerando os momentos e os grupos de estudo, não foram observadas mudanças significativas no peso, percentual de gordura corpórea e IMC (Tabela 4). Entretanto, ao realizar uma análise individual do comportamento desses indicadores observamos que 3 (60%) indivíduos no GC perderam peso durante o tratamento, enquanto que no GS, apenas 1 (17%) (Qui² Exato de Fisher, $P = 0,24$). Na análise por grupo, os indivíduos do GC reduziram -0,5 kg (IQR -1,1; 1,4 kg) enquanto que os do GS aumentaram 1,2 kg (IQR 0,4; 1,3 kg), de importância clínica, mas sem diferença estatística.

Toxicidade a quimioterapia foi apresentada por nove indivíduos (3 indivíduos do GC e 5 do GS). As principais queixas relatadas foram: xerostomia (n= 3), disgeusia (n= 4), náusea (n=4), perda de apetite (n=3)

e diarreia (n=4). Todavia, parece não haver influência da suplementação de óleo de peixe sobre estes desfechos (dados não apresentados).

Discussão

O interesse pela modulação da resposta imune e inflamatória no câncer colorretal com a utilização de ácidos graxos poli-insaturados n-3 tem crescido nos últimos anos com a publicação de vários estudos (30-35). No entanto, todos eles apresentam desenhos metodológicos diferentes, o que dificulta a comparação entre eles e conseqüentemente, uma conclusão sobre as evidências apresentadas. As dosagens de AGPI n-3 isolados ou combinados a outros nutrientes variaram de 0,6 g (34, 36) a 3,3 g/dia (30), e o tempo de suplementação, de cinco dias (31) a seis meses (36). A maioria deles avaliou o suposto efeito imunomodulador dos AGPI n-3 sobre procedimentos de intervenção cirúrgica (30, 31, 33, 35, 36), enquanto que em quimioterapia, apenas dois estudos foram encontrados (32, 34).

Efeito modulador de AGPI n-3 evidenciado por alterações na produção de citocinas foi observado em quatro estudos controlados (30, 31, 35, 36). Nestes a produção de citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α e IFN- γ) foi estatisticamente menor no grupo que recebeu suplementação com AGPI n-3 quando comparado aos seus respectivos grupos controles. No entanto, no único estudo com características metodológicas semelhantes ao nosso (34), não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos de estudo para os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Neste estudo, 23 indivíduos com CCR em quimioterapia foram randomizados para dois grupos, em que 10 indivíduos receberam 2 g/dia de óleo de peixe encapsulado durante nove semanas.

Todos os achados de nosso estudo são condizentes com os encontrados por Silva et al. (2012) (34). Não detectamos diferenças para IL-1 β e TNF- α entre os grupos com ou sem suplementação de 2 g/dia de óleo de peixe durante nove semanas. Da mesma forma, Read et al. (2007) (32) não encontraram diferenças significativas nos níveis das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 após a suplementação de 480 mL/dia de uma emulsão líquida contendo 2,18 g de EPA e 0,92 g de DHA em indivíduos com CCR avançado em quimioterapia. Em contrapartida, constatamos importante diferença no comportamento de PCR sérica, sendo observada redução da concentração dessa proteína de fase aguda no grupo suplementado e aumento no grupo controle. Da mesma forma, observamos uma alteração significativa na relação PCR/Albumina, de relevância clínica,

indicando um aumento no risco de complicações nutricionais ou inflamatórias durante o tratamento no grupo sem suplementação, e uma redução expressiva deste risco naqueles que receberam 600 mg/dia de AGPI n-3.

Níveis elevados de PCR têm sido associados com o CCR (37-39). Seu padrão de produção hepática se altera de acordo com a presença de processo inflamatório ativo, apesar de não ser marcador específico de inflamação. Valores aumentados de PCR sérica representam um indicador independente de pior prognóstico clínico e baixa sobrevida neste tipo de paciente (18, 40).

O papel de IL-17A na inflamação relacionada ao câncer ainda não é bem esclarecido. Estudos recentes com modelo animal (41, 42) têm mostrado que a IL-17A pode promover o desenvolvimento de câncer intestinal, exercendo potencial atividade pró-inflamatória (43). Entretanto, não foram encontrados estudos que avaliassem o comportamento dessa citocina no CCR, o que torna este, o primeiro estudo a fornecer dados do perfil de IL-17A no CCR. Logo, não foi possível a sua comparação.

O excesso de peso no início do tratamento quimioterápico aponta para uma realidade observada em outros estudos recentes com pacientes portadores de câncer (32, 34, 44). Considerando a possível toxicidade quimioterápica, representada na maioria das vezes pela anorexia, náusea, vômito e diarreia, e pelas implicações metabólicas da inflamação ativa exacerbada, um excesso de peso num momento inicial, poderia ser tido como um fator protetor contra a síndrome da caquexia no câncer. No estudo de Sánches et al. (2012) (44) 63% dos 191 pacientes submetidos à quimioterapia apresentaram perda de peso durante o tratamento. Em nosso estudo, este percentual foi de apenas 36%. Constatamos também um ganho mediano de 1,2 kg no grupo que recebeu suplementação diária de óleo de peixe e uma redução mediana de -0,5 kg no grupo sem suplementação, apesar de não haver diferença estatística significativa. Estes achados clínicos vão ao encontro do estudo de Read et al. (2007) (32) e de Silva et al. (2012) (34), evidenciando um possível efeito protetor do óleo de peixe durante a quimioterapia contra a perda de peso induzida.

Os dados da cromatografia líquida de alta performance demonstraram que 2 g/dia de óleo de peixe (360 mg/dia de EPA e 240 mg/dia de DHA) durante nove semanas foi suficiente para alterar a composição de ácidos graxos dos constituintes lipídicos do plasma. O aumento em 1,8 vezes da proporção de EPA, de 1,4 vezes a de DHA, e a redução de 0,6 vezes de AA, evidenciam a preferência na incorporação

pelos ácidos graxos de maior número de insaturações, fato este também observado em outros estudos (10, 32), e que talvez seja ponto chave para as ações dos AGPI n-3 sobre a inflamação e o sistema imunitário.

Para mensurar o impacto que a suplementação de 600 mg/dia de AGPI n-3 representou no perfil dietético desses indivíduos basta considerar uma redução de 50% na razão n-6:n-3 da ingestão dietética, repercutindo em igual forma, na composição de ácidos graxos dos elementos gordurosos do plasma.

Indivíduos recebendo quimioterapia muitas vezes apresentam efeitos colaterais relacionados à toxicidade do fármaco quimioterápico. Os sinais e sintomas mais comuns associados a eles são diarreia, náusea, vômito, redução do apetite, aumento da sensibilidade ao tato, xerostomia, disgeusia, dentre outros, que impactam diretamente na ingestão alimentar, interferindo negativamente no prognóstico do paciente. Estratégias que associam o uso de medicamentos com aconselhamento nutricional adequado para o controle de tais sintomas têm resultado em melhores desfechos clínicos (45) e por isso, devem ser implementados precocemente durante o tratamento para a prevenção destes sintomas indesejáveis.

Como pontos fortes de nosso estudo citamos: a comparabilidade dos grupos de estudo; a validade externa, o que valida a extrapolação dos dados aqui encontrados para a população pacientes portadores de CCR elegíveis atendidos no CEPON no período de julho de 2011 a março de 2012; o uso de uma fórmula veículo de ácidos graxos poli-insaturados n-3 potencialmente eficaz, de fácil acesso e de baixo custo; e a originalidade da proposta ao avaliar o comportamento da interleucina-17A.

Considerando as características da fórmula de óleo de peixe ofertada foi considerado inviável o cegamento da amostra de estudo, haja vista que uma fórmula placebo encapsulada por ingestão via oral com as mesmas características sensoriais do óleo de peixe é até então desconhecida. Fórmulas placebo contendo óleo vegetal de soja em substituição ao óleo de peixe já foram utilizados em estudos duplo-cego (36, 38). Entretanto, nesses estudos as fórmulas eram oferecidas na forma de emulsão líquida administradas via parenteral. Outro ponto importante recai sobre a composição de ácidos graxos do placebo. Acredita-se que fórmulas-placebo que têm o teor de AGPI n-3 total ou parcialmente substituídos por AGPI n-6, não sejam adequadas em estudos com objetivo de avaliar desfechos de inflamação, e portanto, não devam ser considerados placebo. Isto por que AGPI n-6, especialmente AA, pode direcionar para um estado mais inflamatório,

pela produção de eicosanóides pró-inflamatórios. Desta forma, por essas razões, o desenvolvimento de uma fórmula-placebo adequada para o óleo de peixe representa um desafio, que deve ser encorajado e implementado em pesquisa futuras.

Em conclusão, a suplementação de 600 mg de EPA + DHA oriundos da ingestão diária de 2 g/dia de óleo de peixe durante nove semanas por indivíduos portadores de CCR em quimioterapia não foi capaz de promover alteração na produção de citocinas pró e/ou anti-inflamatórias, e consequentemente, não alterou o balanço inflamatório quando avaliado por estes marcadores. Entretanto, houve significativa alteração da composição de ácidos graxos plasmáticos, fato que pode estar relacionado a redução significativa na produção de PCR no grupo suplementado, apontando para um importante decréscimo no risco de complicações inflamatórias e nutricionais durante o tratamento, e prevenindo a perda de peso associada à evolução da doença e à quimioterapia. Por estes últimos motivos, este protocolo de suplementação representa um potencial adjuvante no tratamento do câncer colorretal.

Referências

1. Connolly JM, Coleman M, Rose DP. Effects of dietary fatty acids on DU145 human prostate cancer cell growth in athymic nude mice. *Nutr Cancer*. 1997;29:114-19.
2. Connolly JM, Gilhooly EM, Rose DP. Effects of reduced dietary linoleic acid intake, alone or combined with an algae source of docosahexaenoic acid on MDA-MB-231 breast cancer cell growth and apoptosis in nude mice. *Nutr Cancer*. 1999;35:44-49.
3. Calder PC, Davis J, Yaqoob P, Pala H, Thies F, Newsholme EA. Dietary fish oil suppresses human colon tumor growth in athymic mice. *Clin Sci*. 1998;94:303-11.
4. Chen ZY, Istfan NW. Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2000;63:301-8.
5. Jordan A, Stein J. Effect of an omega-3 fatty acid containing lipid emulsion alone and in combination with 5-fluorouracil (5-FU) on growth of the colon cancer cell line Caco-2. *Eur J Nutr*. 2003;42:324-31.
6. DeGraffenried L A, Friedrichs WE, Fulcher L, Fernandes G, Silva JM, Peralba JM, et al. Eicosapentaenoic acid restores tamoxifen

- sensitivity in breast cancer cells with high Akt activity. *Ann Oncol.* 2003;14:969-70.
7. Feng Z, Hu W, Marnett LJ, Tang M. Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. *Mutat Res.* 2006;601:125-36.
 8. Moses AW, Slater C, Preston T, Barber MD, Fearon KH. Reduced total energy expenditure and physical activity in cachexia patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids. *Br J Cancer.* 2004;90:996-1002.
 9. Colomer R, Moreno-Nogueira JM, García-Luna PP, García-Peris P, García-de-Lorenzo A, Zarazaga A, et al. n-3 fatty acids, cancer and cachexia: a systematic review of the literature. *British Journal of Nutrition.* 2007;97:823-31.
 10. Bonatto SR, Oliveira HP, Nunes EA, Pequito D, Iagher F, Coelho I, et al. Fish oil supplementation improves neutrophil function during cancer chemotherapy. *Lipids.* 2012;47:383-89.
 11. Cury-Boaventura MF, Torrinhas RS, Godoy AB, Curi R, Waitzberg DL. Human leukocyte death after a preoperative infusion of medium/long-chain triglyceride and fish oil parenteral emulsions: a randomized study in gastrointestinal cancer patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2012;26 [Epub ahead of print].
 12. Cockbain AJ, Toogood GJ, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Gut.* 2012;61:135-49.
 13. Janakiram NB, Mohammed A, Rao CV. Role of lipoxins, resolvins, and other bioactive lipids in colon and pancreatic cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2011;30:507-23.
 14. Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011;25:547-54.
 15. Yang E, Chan D, Felix E, Cartwright C, Menter DG, Madden T, et al. Formation and antiproliferative effect of prostaglandin E₃ from eicosapentaenoic acid in human lung cancer cells *J Lipid Res.* 2004;45:1030-39.
 16. Chapkin RS, Kim W, Lupton JR, McMurray DN. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009;81:187-91.
 17. Szkaradkiewicz A, Marciniak R, Chudzicka-Strugała I, Wasilewska A, Drews M, Majewski P, Karpiński T, et al.

- Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2009;57:291-294.
18. Chung YC, Chang YF. Serum C-reactive protein correlates with survival in colorectal cancer patients but is not an independent prognostic indicator. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2003;15:369-73.
 19. Rickham PP. Human experimentation. Code of ethics of the World Medical Association. Declaration of Helsinki. *Br Med J*. 1964;2:0-177.
 20. Peltola H, Valmari P. Serum C-reactive protein as detector of pretreated childhood bacterial meningitis. *Neurology*. 1985;35:251-3.
 21. Dumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta*. 1971;31:87-96.
 22. Corrêa CR, Angelili AO, Camargo NR, Barbosa L, Burini RC. Comparação entre a relação PCR/albumina e o índice prognóstico inflamatório nutricional (IPIN). *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2002;38:183-190.
 23. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign: Human Kinetics; 1988.
 24. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva: WHO; 1998.
 25. Detsky AS, McLaughlin JR, Baker JP, Johnston N, Whittaker S, Mendelson RA, Jeejeebhoy KN. What is Subjective Global Assessment of Nutritional Status?. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 1987;11:8-13.
 26. Durnin JV; Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *British Journal of Nutrition*. 1974;32:77-97.
 27. Guenther PM. The multi-pass approach for 24-hr recalls in the continuing survey of food intakes by individuals. *FASEB J*. 1996;10: A198.
 28. Núcleo de estudos e pesquisas em alimentação. Universidade Estadual de Campinas. Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA-UNICAMP. 2nd ed. Campinas: NEPA-UNICAMP; 2006.

29. Pinheiro AB; Lacerda EL; Benzecry EH; Gomes MC; Costa VM. Tabela para avaliação do consume alimentar em medidas caseiras. 4th ed. São Paulo:Atheneu; 2002.
30. Braga M, Gianotti L, Vignali A, Carlo VD. Preoperative oral arginine and fatty acid supplementation improves the immunometabolic host response and outcome after colorectal resection for cancer. *Surgery*. 2002;132:805-814.
31. Matsuda A, Furukawa K, Takasaki H, Suzuki H, Kan H, Tsuruta H. et al. Preoperative oral immune-enhancing nutritional supplementation corrects Th1/Th2 imbalance in patients undergoing elective surgery for colorectal cancer. *Diseases of the Colon e Rectum*. 2006;49:507-516.
32. Read JA, Beale PJ, Volker DH, Smith N, Childs A, Clarke SJ. Nutrition intervention using an eicosapenatenoic acid (EPA)-containing supplement in patients with advanced colorectal cancer. Effects on nutritional and inflammatory status: a phase II trial. *Support Care Cancer*. 2007; 15:301-307.
33. Liang B, Wang S, Ye YJ, Yang XD, 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*. 2008;21:2434-2439.
34. Silva JA, Trindade EB, Fabre ME, Mengotto VM, Gevaerd S, Buss ZS. et al. Fish oil supplement alters markers of inflammatory and nutritional status in colorectal cancer patients. *Nutrition and Cancer*. 2012;64:267-273.
35. Zhu MW, Tang DN, Hou J, Wei JM, Hua B, Sun JH. et al. Impact of fish oil enriched total parenteral nutrition on elderly patients after colorectal cancer surgery. *Chin Med J*. 2012;125:178-181.
36. Purasiri P, Murray A, Richardson S, Heys SD, Horrobin D, Eremin O. Modulation of cytokine in vivo by dietary essential fatty acids in patients with colorectal cancer. *Clinical Science*. 1994;87:711-717.
37. Erlinger TP, Platz EA, Rifai N, Helzlsouer KJ. C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer. *JAMA*. 2004;291:585-90.
38. Gunter MJ, Stolzenberg-Solomon R, Cross AJ, Leitzmann MF, Weinstein S, Wood RJ. et al. A prospective study of serum C-reactive protein and colorectal cancer risk in men. *Cancer Res*. 2006;66:2483-7.
39. Il'yasova D, Colbert LH, Harris TB, Newman AB, Bauer DC, Satterfield S. et al. Circulating levels of inflammatory markers and

- cancer risk in the health aging and body composition cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:2413-8.
40. Shiu YC, Lin JK, Huang CJ, Jiang JK, Wang LW, Huang HC, et al. Is C-reactive protein a prognostic factor of colorectal cancer?. *Dis Colon Rectum.* 2008;51:443-9.
 41. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med.* 2009;15:1016-22.
 42. Chae WJ, Gibson TF, Zelterman D, Hao L, Henegariu O, Bothwell AL. Ablation of IL-17A abrogates progression of spontaneous intestinal tumorigenesis. *PNAS.* 2010;107:5540-44.
 43. Chae WJ, Bothwell AL. IL-17 and intestinal tumorigenesis. *Drugs Discovery Today: Disease Mechanisms.* 2011;8:e79-e83.
 44. Sánchez LK, Ugalde ME, Motola KD, Green D. Gastrointestinal symptoms and weight loss in cancer patients receiving chemotherapy. *Br J Nutr.* 2012;12:1
 45. Dintinjana RD, Guina T, Krznarić Z, Radić M, Dintinjana M. Effects of nutritional support in patients with colorectal cancer during chemotherapy. *Coll Antropol.* 2008;32:737-40.

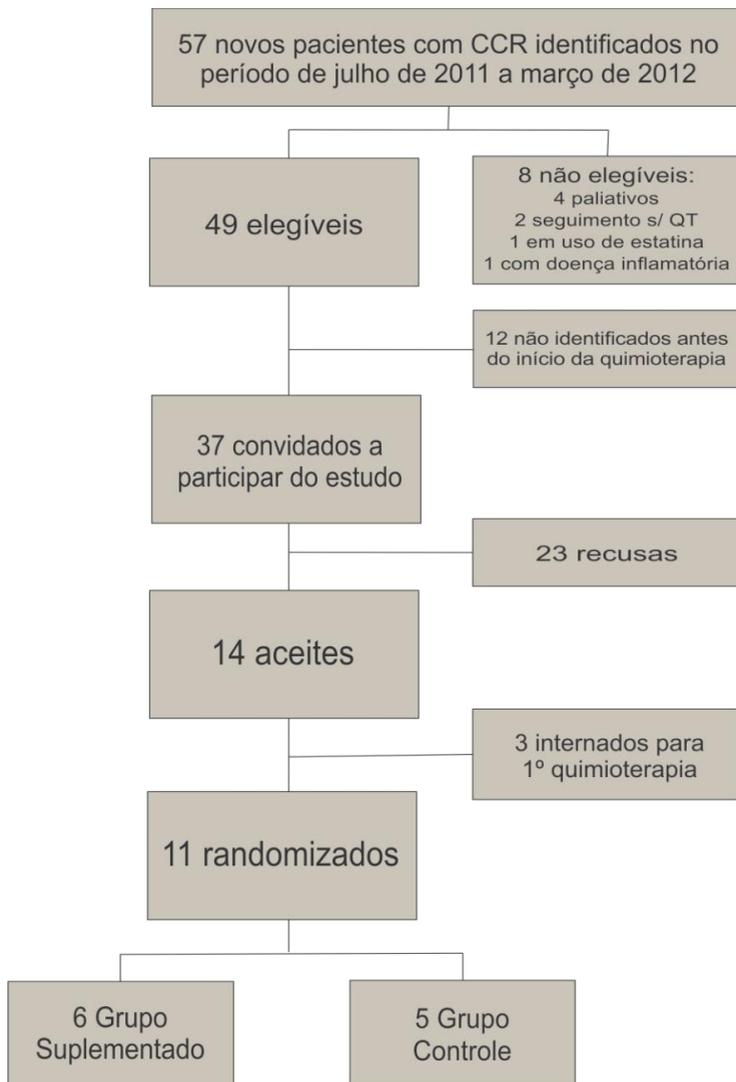
Figura 8 – Fluxograma do recrutamento dos pacientes no estudo.

Tabela 1: Características dos indivíduos portadores de câncer colorretal elegíveis para o estudo atendidos no Centro de Pesquisa Oncológicas de Florianópolis no período entre julho de 2011 a março de 2012.

Características	Grupos		Valor p
	Grupo perdido (n=38)	Grupo avaliado (n=11)	
Idade (anos)	58,5 (\pm 10,2)	54,5 (\pm 9,8)	0,25 ^a
Sexo (n)			
Masculino	20	6	0,74 ^b
Feminino	18	5	
Localização do tumor (n)			
Cólon	24	6	0,73 ^b
Reto	14	5	
Classificação TNM (n)			
II	7	0	0,17 ^b
III	19	9	
IV	10	2	

^a Teste *t*

^b Teste de Qui²

Valores de média (\pm DP) ou mediana [IQR].

Tabela 2 – Características basais dos participantes avaliados (n=11) de acordo com os grupos de estudo para que foram randomizados

Características	Grupos de estudo		Valor p ^a
	Grupo Controle (n=5)	Grupo Suplementado (n=6)	
Idade (anos)	53,6 (± 12,9)	55,2 (± 7,7)	0,80
Sexo Masculino (n)	3	3	1,00 ^b
Fumo (n)			1,00 ^b
Ex-fumante	2	3	
Nunca fumante	3	3	
Localização do tumor (n)			0,58 ^b
Cólon	2	4	
Reto	3	2	
Classificação TNM (n)			1,00 ^b
III	4	5	
IV	1	1	
Ressecção tumoral nos últimos 4 meses (n)	4	5	1,00 ^b
Consumo de peixe (n)			0,57 ^b
≥ 1x/semana	2	4	
< 1 x/semana	3	2	
Perda de peso nos últimos 6 meses (%)	1,8 [-1,0; 10,5]	7,6 [1,4; 9,2]	0,72 ^c
Ingestão alimentar			
Energia (kcal)	2706 (±764)	2312 (±663)	0,60
Carboidrato (g)	296,61 (±103,71)	328,18 (±107,27)	0,63
Proteína (g)	84,08 [79,93; 101,1]	86,75 [64,81; 95,96]	0,86 ^c
Gordura total (g) ^d	47,18 [44,16; 75,34]	56,04 [49,91; 66,35]	0,36 ^c
Saturada (g)	15,00 [14,41; 25,68]	18,06 [16,03; 26,84]	0,27 ^c
Monoinsaturada (g)	14,99 [9,76; 18,37]	17,14 [13,79; 19,46]	0,36 ^c
Poli-insaturada (g)	9,26 [7,91; 12,36]	9,55 [7,33; 10,91]	1,00 ^c
n-3 (g)	0,63 [0,57; 0,72]	0,52 [0,41; 1,80]	0,86 ^c
n-6 (g)	5,92 [5,49; 7,61]	5,09 [4,53; 7,89]	0,58 ^c
Razão n6:n3 (x:1)	9,72 (±1,70)	9,46 (±4,17)	0,90

^a Dados referentes ao Test t, a menos que especificado.

^b Teste Qui² Exato de Fisher.

^c Test de Mann-Whitney

Valores de média (± DP) ou mediana [IQR].

Tabela 3 – Valores dos marcadores de inflamação e do balanço inflamatório nos momentos Basal e 9 Semanas de acordo com os grupos de estudo - GS vs GC (n=11)

Marcadores inflamatórios	Grupos de tratamento		Valor p ^a
	Grupo Controle (n=5)	Grupo Suplementado (n=6)	
TNF- α (pg/ml)			
Basal	2,479 (\pm 0,002)	2,486 (\pm 0,009)	0,213
9 Semanas	2,481 (\pm 0,009)	2,476 (\pm 0,005)	0,406
Valor p	0,853 ^d	0,120 ^c	
IL-1 β (pg/ml)			
Basal	1,564 (\pm 0,002)	1,570 (\pm 0,013)	0,279
9 Semanas	1,567 (\pm 0,006)	1,568 (\pm 0,009)	0,925
Valor p	0,309 ^d	0,688 ^d	
IL-10 (pg/ml)			
Basal	2,321 (\pm 0,083)	2,288 (\pm 0,081)	0,543
9 Semanas	2,301 (\pm 0,065)	2,351 (\pm 0,060)	0,249
Valor p	0,310 ^c	0,127 ^c	
IL-17A (pg/ml)			
Basal	2,344 (\pm 0,004)	2,349 (\pm 0,007)	0,276
9 Semanas	2,348 (\pm 0,006)	2,348 (\pm 0,006)	0,821
Valor p	0,442 ^c	0,858 ^c	
Razão IL-1 β /IL-10			
Basal	0,67 (\pm 0,02)	0,69 (\pm 0,02)	0,412
9 Semanas	0,68 (\pm 0,02)	0,67 (\pm 0,02)	0,252
Valor p	0,204 ^c	0,089 ^c	
Razão TNF- α /IL-10			
Basal	1,07 (\pm 0,04)	1,08 (\pm 0,04)	0,567
9 Semanas	1,08 (\pm 0,03)	1,06 (\pm 0,03)	0,324
Valor p	0,300 ^c	0,186 ^c	
PCR (mg/L)			
Basal	4,85 [1,01; 6,33]	3,39 [1,49; 18,24]	0,715 ^b
9 Semanas	18,14 [12,16; 35,51]	1,46 [1,20; 2,71]	0,045 ^b
Valor p	0,043 ^d	0,028 ^d	
Albumina (g/L)			
Basal	4,34 (\pm 0,29)	4,23 (\pm 0,25)	0,527
9 Semanas	4,02 (\pm 0,24)	4,27 (\pm 0,24)	0,125
Valor p	0,051 ^c	0,771 ^c	

^a Test t não pareado ao menos que especificado

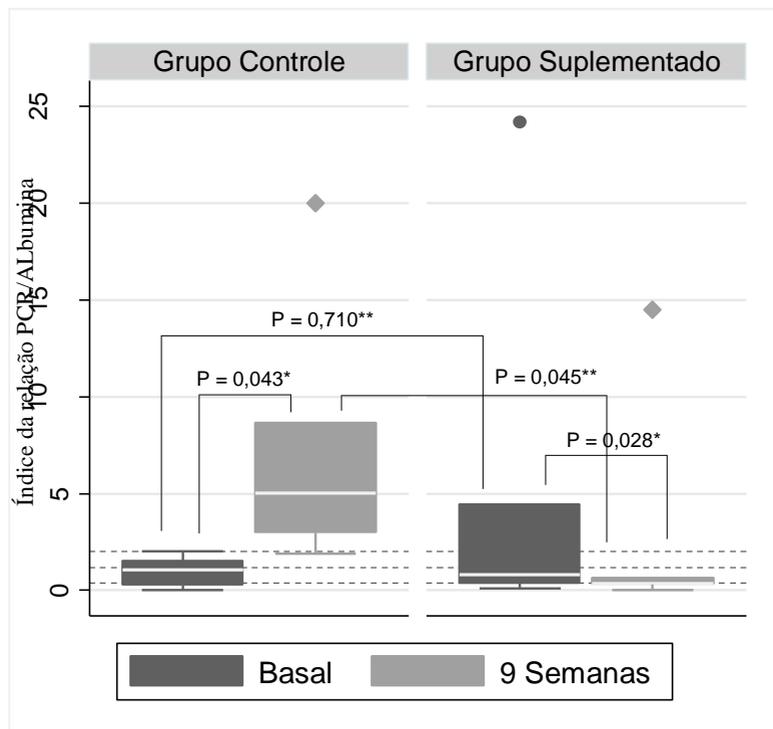
^b Test de Mann-Whitney

^c Test t pareado

^d Test de Wilcoxon para dados pareados

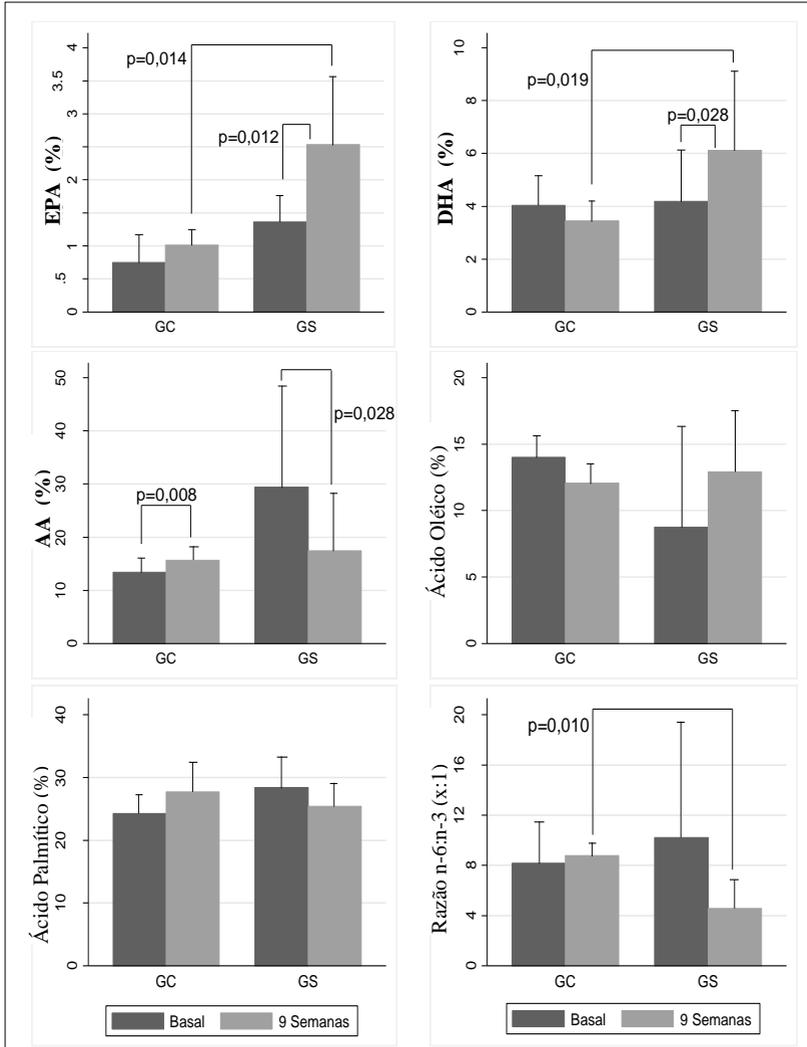
Valores de média (\pm DP) ou mediana [IQR].

Figura 9 – Índice da relação PCR/Albumina nos momentos Basal e 9 Semanas de acordo com os grupos de estudo – GS (n=6) vs GC (n=5).



* Teste de Wilcoxon para dados pareados; ** Teste de Mann-Whitney.

Figura 10 – Média das proporções dos diferentes ácidos graxos presentes no plasma dos indivíduos randomizados (n=11).



Abreviações: GC, Grupo Controle; GS, Grupo Suplementado; EPA, Ácido Eicosapentaenóico; DHA, Ácido Docosahexaenóico; AA, Ácido Araquidônico. Total n3: somatório % de EPA, DHA e Ácido α -linolênico. Total n6: somatório das % de AA e AG Linoléico. Testes aplicados: EPA, AA, AG Palmítico e Oléico: Test *t* pareado e Teste *t* não pareado. DHA e razão n6:n3: Test de Wilcoxon para dados pareados e Test de Mann-Whitney. Diferenças foram testadas entre momentos de um mesmo grupo e de grupos diferentes para todas as variáveis. $p > 0,05$, não apresentados.

Tabela 4 – Comportamento dos indicadores do estado nutricional nos momentos Basal e 9 Semanas de acordo com os grupos de estudo - GS vs GC (n=11)

Indicadores	Grupos de tratamento		Valor p
	Grupo Controle (n=5)	Grupo Suplementado (n=6)	
Peso (kg)			
Basal	68,1 (\pm 12,1)	72,3 (\pm 12,3)	0,58 ^a
9 Semanas	68,0 (\pm 12,1)	72,7 (\pm 10,0)	0,50 ^a
Valor p	0,97 ^c	0,77 ^c	
IMC (kg/m ²)			
Basal	26,4 (\pm 3,7)	28,6 (\pm 6,3)	0,54 ^a
9 Semanas	26,5 (\pm 3,4)	28,7 (\pm 5,2)	0,44 ^a
Valor p	0,93 ^c	0,86 ^c	
Gordura corporal (%)			
Basal	27,0 [16,7; 34,1]	32,8 [16,8; 39,5]	0,41 ^b
9 Semanas	25,9 [15,7; 38,3]	34,8 [16,4; 38,8]	0,46 ^b
Valor p	0,69 ^d	0,35 ^d	
Massa magra (kg)			
Basal	50,4 (\pm 12,5)	50,5 (\pm 9,4)	0,99 ^a
9 Semanas	50,2 (\pm 13,8)	50,5 (\pm 9,0)	0,96 ^a
Valor p	0,79 ^c	0,99 ^c	
Diferença de peso (kg)	-0,5 [-1,1; 1,4]	1,2 [0,4;1,3]	0,72 ^b
Diferença de massa magra (kg)	-0,4 [-1,5; -0,4]	0,2 [-0,7; 1,3]	0,58 ^b

^a Test t não pareado

^b Test de Mann-Whitney

^c Test t pareado

^d Test de Wilcoxon para dados pareados

Valores de média (\pm DP) ou mediana [IQR].

Diferença de peso: 9 Semanas – Basal (kg)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- a) Não verificamos alterações significativas nos níveis plasmáticos das citocinas avaliadas (IL-1 β , IL-10, IL-17A e TNF- α) entre os grupos nos momentos do estudo.
- b) A proteína de fase aguda, PCR, se mostrou sensível à suplementação, reduzindo significativamente sua concentração plasmática no grupo suplementado, enquanto que se elevou no sem suplementação, evidenciando possível alteração na resposta hepática relacionada à inflamação durante o tratamento e o curso da doença, resultante do óleo de peixe.
- c) 2 g/dia de óleo de peixe exerceu um efeito protetor contra a perda de peso induzida pelo tratamento quimioterápico e pelas implicações metabólicas de uma resposta inflamatória exacerbada, de importância clínica, haja vista que influencia o estado geral de saúde do paciente, interferindo diretamente no seguimento e na resposta à terapêutica. Da mesma forma, a intervenção impediu aumento no risco de complicações nutricionais e inflamatórias avaliadas pela relação PCR/albumina, podendo predizer uma melhor evolução clínica.
- d) O protocolo de suplementação realizado nesse estudo mostrou eficácia em alterar a composição de constituintes lipídicos do plasma, mas talvez, não seja capaz de alterar a composição da membrana de células imunes, tumorais e do estroma, as quais são as responsáveis diretamente pela manutenção do processo inflamatório existente no câncer. Desta forma, sugere-se a execução de estudos com o mesmo protocolo de suplementação que avaliem não somente o grau de incorporação de AGPI n-3 em constituintes lipídicos do plasma, mas também, em fosfolipídios de membrana de células tumorais, do estroma e imunitárias.
- e) Nenhum paciente desistiu do estudo, tão pouco atribuiu à intervenção algum relato de efeito colateral.
- f) O risco de viés nesse tipo de estudo, em que o paciente é o único responsável pela execução do protocolo de intervenção, é alto. No entanto, os resultados referentes ao perfil de ácidos graxos no plasma nos garante que os indivíduos randomizados para o grupo suplementado realmente cumpriram com o protocolo de suplementação orientado. Isso também foi controlado pelo registro diário do consumo e da contagem das

cápsulas ao final do período, onde foi constatado que nenhum paciente ingeriu menos que 90% do total de cápsulas previstas para serem ingeridas no período de nove semanas.

- g) Os indivíduos participantes deste estudo possuíam um diagnóstico de câncer recente e a partir de então, passaram a conviver com as incertezas do prognóstico, muitas vezes abalados emocionalmente, passaram a colocar em prática todas as recomendações científicas possíveis, e em algumas situações, do senso comum, com o intuito de perseguir uma cura para a doença. Alguns passaram a ter um maior grau de cuidados com a sua saúde, aderindo as orientações que lhe pareciam pertinentes. Todavia, a falta de conhecimentos sobre o nosso objeto de estudo e o receio limitou a participação de muitos neste ensaio clínico.
- h) O tamanho da amostra pode ter interferido nos resultados. Apesar disso, a amostra estudada, apresentou boa validade externa.
- i) Por fim, a suplementação de 2 g/dia de óleo de peixe em pacientes portadores de câncer colorretal em quimioterapia durante nove semanas melhorou o perfil de ácidos graxos plasmáticos, implicando em uma redução dos valores séricos de PCR, acompanhado pela melhora na relação PCR/albumina, e exercendo potencial atividade de prevenção contra a perda de peso, e por isso, deve ser encorajado pelos profissionais.

REFERÊNCIAS

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

AGGARWAL, B.B.; GEHLOT, P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients?. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 351-369, aug. 2009.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Global Cancer Facts & Figures**. 2. ed. Atlanta: American Cancer Society, 2011. Disponível em: <<http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/index>>. Acesso em: 02 jun. 2012.

_____. **Global Cancer Facts & Figures 2012**. Atlanta: American Cancer Society, 2012. Disponível em: <<http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/index>>. Acesso em: 05 jun. 2012.

ARAB, L. Biomarkers of Fat and Fatty Acid Intake. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 3, p. 925S-932S, mar. 2003.

ARTEMBURN, L.M.; HALL, E.B.; OKEN, H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 1467S-1476S, 2006.

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

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

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

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 361-71, 2009.

BRAGA, M. et al. Preoperative oral arginine and n-3 fatty acid supplementation improves the immunometabolic host response and outcome after colorectal resection for cancer. **Surgerly**, v. 132, n. 5, p. 805-814, nov. 2002.

BRASIL, Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. 1996. Disponível em <<http://conselho.saude.gov.br/docs/Reso196.doc>>. Acesso em 05 nov. 2010.

_____, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2010**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009. 98 p.

_____, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 118 p.

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

_____. Portaria nº 19, de 15 de março de 1995. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 16 mar. 1995. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/19_95.htm>. Acesso em: 05 jul. 2011.

BONATTO, S.J.R. **Efeito da suplementação com óleo de peixe, durante 8 semanas, sobre o sistema imunitário inato de pacientes, pós-remoção tumoral e efeito in vitro do óleo de peixe sobre as células tumorais**. Curitiba, 2008. 115f. Tese. Doutorado em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná.

BONATTO, S.J.R. et al. Fish oil supplementation improves neutrophil function during cancer chemotherapy. **Lipids**, v. 47, n. 4, p. 383-389, apr. 2012.

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

CALDER, P.C. et al. Dietary fish oil suppresses human colon tumor growth in athymic mice. **Clinical Science**, v. 94, n. 3, p. 303-311, mar. 1998.

CAI, F.; DUPERTUIS, Y.M.; PICHARD, C. Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation on colorectal cancer risk and treatments. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 15, n. 2, p. 99-106, mar. 2012.

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

CALDER, P.C. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acid. **The Journal of Nutrition**, v. 142, n. 3, p. 592S-599S, mar. 2012.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. **Biochimie**, v. 91, p. 791-795, 2009.

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

CANTWELL, M.M. Assessment of individual fatty acid intake. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, p. 187-191, 2000.

CENTER, M.M. et al. Worldwide variations in colorectal cancer. **CA: A Cancer Journal of Clinicians**, v. 59, n. 6, p. 366-378, nov/dez. 2009.

CHAE, W.J.; BOTHWELL, A.L. IL-17 and intestinal tumorigenesis. **Drugs Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 8, n. 3-4, p. e79-e83, 2011.

CHAE, W.J. et al. Ablation of IL-17A abrogates progression of spontaneous intestinal tumorigenesis. **PNAS**, v. 107, n. 12, p. 5540-5544, mar. 2010.

CHAPKIN, R.S. et al. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 81, n. 1-2, p. 187-191, aug./set., 2009.

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

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

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

CHIU, C.C. et al. The effects of omega-3 fatty acids monotherapy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a preliminary randomized double-blind placebo-controlled study. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1538-44, aug. 2008.

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

COLOMER, R. n-3 fatty acids, cancer and cachexia: a systematic review of the literature. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 5, p. 823-831, may. 2007.

CONNOLLY, J.M.; COLEMAN, M.; ROSE, D.P. Effects of dietary fatty acids on DU145 human prostate cancer cell growth in athymic nude mice. **Nutrition and Cancer**, v. 29, n. 2, p. 114-119, 1997.

CONNOLLY, J.M.; GILHOOLY, E.M.; ROSE, D.P. Effects of reduced dietary linoleic acid intake, alone or combined with an algae source of docosahexaenoic acid on MDA-MB-231 breast cancer cell growth and apoptosis in nude mice. **Nutrition and Cancer**, v. 35, n. 1, p. 44-49, 1999.

CONQUER, J.A.; HOLUB, B.J. Dietary docosahexaenoic acid as a source of eicosapentaenoic acid in vegetarians and omnivores. **Lipids**, v.32, n. 3, p. 341-345, 1997.

COCKBAIN, A.J.; TOOGOOD, G.J.; HULL, M.A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. **Gut**, v. 61, n. 1, p. 135-149, jan. 2012.

CORRÊA, C.R. et al. Comparação entre a relação PCR/albumina e o índice prognóstico inflamatório nutricional (IPIN). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 183-190, 2002.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

CURY-BOAVENTURA, M.F. et al. Human leukocyte death after a preoperative infusion of medium/long-chain triglyceride and fish oil parenteral emulsions: a randomized study in gastrointestinal cancer patients. **JPEN Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 26, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22282868>>. Acesso em 01 jul. 2012.

DEANS, D.A. et al. Elevated tumour interleukin-1beta is associated with systemic inflammation: A marker of reduced survival in gastro-oesophageal cancer. **British Journal of Cancer**, v. 95, p. 1568-75, 2006.

DeGRAFFENRIED, L.A. et al. Eicosapentaenoic acid restores tamoxifen sensitivity in breast cancer cells with high Akt activity. **Annals of Oncology**, v. 14, p. 969-970, 2003.

DETSKY, A.S. et al. What is Subjective Global Assessment of Nutritional Status?. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 8-13, jan./feb. 1987.

DINTINJANA, R.D. et al. Effects of nutritional support in patients with colorectal cancer during chemotherapy. **Collegium Antropologicum**, v. 32, n. 3, p. 737-740, sep. 2008.

DOUMAS, B.T.; WATSON, W.A.; BIGGS, H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clinica Chimica Acta**, v. 31, n. 1, p. 87-96, jan. 1971.

DURNIN, J.V.G.A.; WOMERSLEY, J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. **British Journal of Nutrition**, v. 32, p. 77-97, 1974.

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

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

EMKEN, E.A.; ADLOF, R.O.; GULLEY, R.M. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1213, n. 3, p. 277-288, aug. 1994.

ERLINGER, T.P. et al. C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer. **JAMA**, v. 291, n. 5, p. 585-590, fev. 2004.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis, **Cell**, v. 61, p. 759-767, jun. 1990.

FENG, Z. et al. Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. **Mutation Research**, v. 601, n. 1-2, p. 125-136, oct. 2006.

FERLAY, J. et al . **GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10** [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 05 fev. 2011.

FISBERG, R.M.; VILLAR, B.S. **Manual de receitas e medidas caseiras para cálculo de inquéritos alimentares**. 1 ed. São Paulo: Signus, 2002.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. Simple method for the isolation and purification total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. General conclusions and recommendations of the consultation. In: _____. **Fats and Oils in Human Nutrition**, Rome:FAO, 1994. p. 3-7.

GIBNEY, M.J.; HUNTER, B. The effects of short- and long-term supplementation with fish oil on the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into cells of the immune system in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 255-259, apr. 1993.

GOYENS, P.L. et al. Compartmental modeling to quantify alpha-linolenic acid conversion after longer term intake of multiple tracer boluses. **The Journal of Lipid Research**, v. 46, p. 1474-83, jul. 2005.

GRIVENNIKOV, S.; KARIN, M. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, p. i104-i108, 2011.

GUENTHER, P.M. The multi-pass approach for 24-hr recalls in the continuing survey of food intakes by individuals. **FASEB J**, v. 10, p. A198, 1996.

GUNTER, M.J. et al. A prospective study of serum C-reactive protein and colorectal cancer risk in men. **Cancer Research**, v. 66, n. 4, p. 2483-2487, fev 2006.

HAGEMANN, T.; BALKWILL, F.; LAWRENCE, T. Inflammation and Cancer: A Double-Edged Sword. **Cancer Cell**, v. 12, n. 4, p. 300-301, oct. 2007.

HAMILTON, S. et al. **Lipid analysis – a practical approach**, Chapter 2. IRL Press at Oxford University Press, p.54, 1992.

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

HILLIER, K. et al. Incorporation of fatty acids from fish oil and olive oil into colonic mucosal lipids and effects upon eicosanoid synthesis in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 32, p. 1151-1155, 1991.

HISAMUDDIN, I.M.; YANG, V.W. Molecular genetics of colorectal cancer: an overview. **Currents Colorectal Cancer Reports**, v. 2, n. 2, p. 53-59, apr. 2006.

HULL, M.A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology**, v. 25, n. 4-5, p. 547-554, aug. 2011.

HUS, I.; MACIAQ, E.; ROLINSKI, J. [The role of Th17 cells in anti-cancer immunity]. **Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej**, v. 25, n. 64, p. 244-250, 2010.

HUSSEIN, N. et al. Long-chain conversion of [13C] linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. **The Journal of Lipid Ressearch**, v. 46, p. 269- 280, feb. 2005.

IL'YASOVA, D. et al. Circulating levels of inflammatory markers and cancer risk in the health aging and body composition cohort. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 10, p. 2413-2418, oct. 2005.

INGENBLEEK, Y.; CARPENTIER, Y.A. A prognostic inflammatory and nutritional index scoring critically ill patients. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, n. 55, p. 91-101, 1985.

INSTITUTE OF MEDICINE. Food and Nutrition Board. **Dietary Reference Intakes: for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids**. IOM, 2005.1331p.

JANAKIRAM, N.B.; MOHAMMED, A.; RAO, C.V. Role of lipoxins, resolvins, and other bioactive lipids in colon and pancreatic cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 30, n. 3-4, p. 507-523, dec. 2011.

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

JORDAN, A.; STEIN, J. Effect of an omega-3 fatty acid containing lipid emulsion alone and in combination with 5-fluoracil (5-FU) on

growth of colon cancer cell line Caco2. **European Journal of Nutrition**, v. 42, p. 324-331, 2003.

KAI, H. et al. Involvement of proinflammatory cytokines IL-1beta and IL-6 in progression of human gastric carcinoma. **Anticancer Research**, v. 25, p. 709-13, 2005.

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

KAWAGUCHI, M. et al. IL-17 cytokine family. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 6, p. 1265-1273, dec. 2004.

KOIKE, Y. et al. Preoperative C-reactive as a prognostic and therapeutic marker for colorectal cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 98, n. 7, p. 540-544, 2008.

LEWIS, A.M. et al. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. **Journal of Translational Medicine**, v. 4, n. 48, p. 1-12, 2006.

LIANG, B. et al. Impact of postoperative omega-3 fatty acid-supplemented parenteral nutrition on clinical outcomes and immunomodulations in colorectal cancer patients. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 15, p. 2434-2439, apr. 2008.

LOHMAN, T.G.; ROCHE, A.F.; MARTORELL, R. **Anthropometric standardization reference manual**. Champaign: Human Kinetics, 1988.

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

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

MARTIN, C.A. et al. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 6, p. 761-770, nov./dez. 2006.

MATSUDA, A. et al. Preoperative oral immune-enhancing nutritional supplementation corrects Th1/Th2 imbalance in patients undergoing elective surgery for colorectal cancer. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 49, n. 4, p. 507-516, apr. 2006.

MENG, X.Y. et al. Expression of interleukin-17 and its clinical significance in gastric cancer patients. **Medical Oncology**, jun, 2012. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/a5r874437717x70h/fulltext.pdf>>. Acesso em 12 jul. 2012.

MIKI, C. et al. C-reactive protein as a prognostic variable that reflects uncontrolled up-regulation of the IL-1-IL-6 network system in colorectal carcinoma. **Digestive Diseases Sciences**, v. 49, p. 970–976, 2004.

MOCELLIN, S. et al. The dual role of IL-10. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 1, p. 36-43, 2003.

MOSES, A.W. et al. Reduced total energy expenditure and physical activity in cachexia patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids. **British Journal of Cancer**, v. 90, p. 996–1002, 2004.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Nutrition in care cancer**, NCI, 2010. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/supportivecare/nutrition/Patient/page1>>. Acesso em 08 ago. 2011.

NISHIYAMA-NARUKE, A. et al. HPLC determination of underivatized fatty acids saponified at 37°C analysis of fatty acids in oils and tissues. **Analytical Letters**, v. 31, n. 14, p. 2565-2576, 1998.

NOVAK, T.E. et al., NF-kappa B inhibition by omega-3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. **American Journal of Physiology**, v. 283, p. 84-89, 2003.

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

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. **Tabela brasileira de composição de alimentos** / NEPA-UNICAMP. 2. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006.

ONUCHIC, A.C.; CHAMMAS, R. Câncer e microambiente tumoral. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 89, n. 1, p. 21-31, jan./mar. 2010.

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

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

PELTOLA, H.; VALMARI, P. Serum C-reactive protein as detector of pretreated childhood bacterial meningitis. *Neurology*, v. 35, p. 251-253, 1985.

PINHEIRO, A.B.V. et al. **Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 75p.

POPOVIC, T. et al. Effects of n-3 Fatty Acids Supplementation on Plasma Phospholipids Fatty Acid Composition in Patients with Obstructive Jaundice- a Pilot Study. **Journal of Clinical and Biochemistry Nutrition**, v. 45, n. 3, p. 370-375, nov. 2009.

PUNNONEN, J. et al. Production of interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha in patients with benign or malignant ovarian tumours. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 117, p. 587-92, 1991.

PURASIRI, P. et al. Modulation of cytokine production in vivo by dietary essential fatty acids in patients with colorectal cancer. **Clinical Science**, v. 87, p. 711-717, 1994.

READ, J.A. et al. 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, p. 301-307, 2007.

REYNOLDS, J.M.; ANGKASEKWINAI, P; DONG, C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. **Cytokine Growth Factor Review**, v. 21, n. 6, p. 413-423, 2010.

RICKHAM, P.P. Human experimentation. Code of ethics of the World Medical Association. Declaration of Helsinki. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5402, p. 0-177, jul. 1964.

ROSA, D.D. et al. Fish oil improves the lipid profile and reduces inflammatory cytokines in Wistar rats with precancerous colon lesions. , v. 64, n. 4, p. 569-579, 2012.

ROYNETTE, C.E. et al. n-3 polyunsaturated acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutrition**, v. 23, p.139-151, 2004.

SÁNCHEZ, L.K. et al. Gastrointestinal symptoms and weight loss in cancer patients receiving chemotherapy. **The British Journal of Nutrition**, v. 12, p. 1-4, jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22691288>>. Acesso em 01 jul. 2012.

SCHWENK, W. et al. Inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections – results of a prospective randomized trial. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 385, p. 2–9, 2000.

SCIENTIFIC ADVISORY COMMITTEE ON NUTRITION; Committee on Toxicity. **Advice on fish consumption: benefits and risks**. London: TSO; 2004. Disponível em: <http://www.sacn.gov.uk/reports/reports/advice_on_fish_consumption_benefits_and_risks.html>. Acesso em: 10 mai. 2012.

SEKI, H.; TANI, Y.; ARITA, M. Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. **International Journal of Cancer**, v. 103, p.642-646, 2009.

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

SERHAN, C.N. System approach to inflammation resolution: identification: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Journal of Thrombosis and Homeostasis**, v. 7, p. 44-48, 2009.

SERHAN, C.N.; YACOUBIAN, S.; YANG, R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. **Annual Review of Pathology**, v. 3, p. 279-312, 2008.

SERUGA, B. et al. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, p. 887-899, nov. 2008.

SHIU, Y.C. et al. Is C-reactive protein a prognostic factor of colorectal cancer?. **Disease of the Colon and Rectum**, v. 51, p. 443-449, 2008.

SILVA, J.A.P. et al. Fish oil supplement alters markers of inflammatory and nutritional status in colorectal cancer patients. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 2, p. 267-273, fev. 2012.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids in inflammation an autoimmune diseases. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, p. 495-505, 2002.

SIRI, W.E. Body composition from fluid spaces and density: analyses of methods. In BROZEK, J.; HENSCHERL, A. (eds.). **Techniques for measuring body composition**. Washington. National Academy of Science, 1961.

SOBIN, L.H.; WITTEKIND, C. **TNM Classification of Malignant Tumours**. 6 ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2002.

STARK, K.D.; HOLUB, B.J. Differential eicosapentaenoic acid elevations and altered cardiovascular disease risk factor responses after supplementation with docosahexaenoic acid in postmenopausal women receiving and not receiving hormone replacement therapy. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 765-773, may. 2004.

SZKARADKIEWICZ, A. et al. Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. **Archivum**

Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz), v. 57, p. 291-294, 2009.

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

TONON, L.M.; SECOLLI, S.R.; CAPONERO, R. Câncer colorretal: uma revisão da abordagem terapêutica com bevacizumabe. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 2, p173-182, 2007.

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

ZHANG, Q. et al. Interleukin-17 promotes formation and growth of prostate adenocarcinoma in mouse models. **Cancer Res**, v. 72, n. 10, p. 2589-99, may. 2012.

ZHU, M. et al. Impact of fish oil enriched total parenteral nutrition on elderly patients after colorectal cancer surgery. **Chinese Medical Journal**, v. 125, n. 2, p. 178-181, 2012.

YANG, E. et al. Formation and antiproliferative effect of prostaglandin E₃ from eicosapentaenoic acid in human lung cancer cells. **Journal of Lipid Research**, v. 45, n. 6, p 1030-1039, jun. 2004.

YAQOOB, P. et al. Encapsulated fish oil enriched in a-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 30, n. 3, p. 260-274, mar. 2000.

WILLIS, R.A. **The spread of tumors in the human body**. London: Butterworth & Co., 1952. 447p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **BMI classification**. Geneva, Switzerland: WHO, [2008]. Disponível em: <http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html>. Acesso em: 08 abr. 2012.

_____. Technical Report, n°. 916. **Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Disease**. Geneva, Switzerland: WHO, 2003.

WU, S.G. et al. A human colonic comensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. **Nature Medicine**, v. 15, n. 9, p. 1016-1022, sep. 2009.

APÊNDICE A – Formulários para registro dos dados**I – IDENTIFICAÇÃO**

Nº prontuário CEPON: _____ Nº identificação na pesquisa: _____

Suplementação: Sim ___ Não___

Nome:	
Sexo:	Data de nascimento:
Telefones:	
E-mail:	
Procedência/Endereço	

Diagnóstico/Localização: _____

Estadiamento: _____

Comorbidades: _____

Fármaco QT: _____

Fármacos utilizados: _____

Tabagista: Sim ___ Não___ Nº cigarros/dia: _____

II – AVALIAÇÃO SUBJETIVA:*De 0 a 10 como se sente em relação a:*

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

Capacidade funcional física (+ de duas semanas):

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

III – AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA:

Altura:	P. Atual:	IMC:
Classificação IMC:		
P. Usual:	%PP:	Tempo PP:
Classificação Perda de Peso:		
CB:	CB%:	Classificação CB%:
DCT:	DCT%:	Classificação DCT%:
DCB:	DCSE:	DCSI:
∑DC:	% Gordura:	
Classificação % gordura:		

VI – AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Nº pront. CEPON: _____

Nº de id na pesquisa: _____

Marcador	Valor	Dentro/acima/abaixo da referência
IL-1		
IL-10		
IL-17		
TNF- α		
PCR		
Albumina		

Complemento: preencher após a conclusão dos quatro instrumentos

→ Ingestão alimentar:

Média de kcal total de macronutrientes: _____

Média de consumo de ômega-3 (g e % kcal da dieta): _____

Média de consumo de ômega-6 (g e % kcal da dieta): _____

Relação n-6/n-3 (g): _____

I – IDENTIFICAÇÃO:

[9 Semanas]

Nº prontuário CEPON: _____ Nº identificação na pesquisa: _____

Suplementação: Sim ___ Não ___

Diagnóstico/Localização: _____

Estadiamento: _____

Comorbidades: _____

Fármaco QT: _____

Fármacos utilizados: _____

Tabagista: Sim ___ Não ___ Nº cigarros/dia: _____

II – AVALIAÇÃO SUBJETIVA:*De 0 a 10 como se sente em relação a:*

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

Capacidade funcional física (+ de duas semanas):

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

III – AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA:

Altura: _____	P. Atual: _____	IMC: _____
Classificação IMC: _____		
P. Usual: _____	%PP: _____	Tempo PP: _____
Classificação Perda de Peso: _____		
CB: _____	CB%: _____	Classificação CB%: _____
DCT: _____	DCT%: _____	Classificação DCT%: _____
DCB: _____	DCSE: _____	DCSI: _____
∑DC: _____	% Gordura: _____	
Classificação % gordura: _____		

VI – AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Marcador	Valor	Dentro/acima/abaixo da referência
IL-1		
IL-10		
IL-17		
TNF- α		
PCR		
Albumina		

APÊNDICE B: Formulário para registro de ingestão das cápsulas

Lembre-se de consumir quatro (4) cápsulas por dia, 15 a 20 minutos antes das refeições.

Devem ser consumidas todos os dias até completar 9 semanas.

Em caso de problemas com o consumo entrar em contato com o nutricionista pelo telefone (48) 9173-9994 ou e-mail:

michel.moicellin@hotmail.com

Marque com um X nos quadradinhos o número de cápsulas ingeridas naquele dia.

Semana 1

Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
--	--	--	--	--

Semana 2

Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
--	--	--	--	--

Semana 3

Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
--	--	--	--	--

Semana 4

Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Dia _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
--	--	--	--	--

APÊNDICE C – Guia de solicitação de exames para pesquisa clínica**Identificação do Cliente:**

Nome: _____

Convênio:

FAPESC – nº 20.179/2010-0
1702 – FUNPESQUISA

Exames Solicitados:**Material: SANGUE****06086** – Proteína C Reativa**01124** – Proteínas Totais e Frações**14983** – Coleta de Material Solicitado**Orientações ao Cliente :**

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

Solicitante:

_____ / ____ / _____
 Carimbo e Assinatura Data

APÊNDICE D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), através do professor em caráter de dedicação exclusiva Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade e colaboradores estão desenvolvendo, com a parceria entre a Universidade Federal de Santa Catarina e o Centro de Pesquisas Oncológicas uma pesquisa intitulada: **Relação entre a Suplementação de óleo de peixe com o Estado Nutricional e a Resposta Inflamatória em Pacientes com Câncer colorretal.**

A pesquisa acontecerá no Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON) localizado na Rodovia Admar Gonzaga SC 404 Km, situado no bairro Itacorubi no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina.

Serão convidados a participar indivíduos com neoplasia colorretal em tratamento quimioterápico no CEPON. Participarão indivíduos de ambos os sexos com idade no intervalo de dezoito a sessenta anos que não façam uso de nutrição enteral e não se encontrem em tratamento paliativo.

O objetivo do presente estudo é: Avaliar o efeito da suplementação de óleo de peixe na resposta inflamatória e no estado nutricional de pacientes com câncer colorretal. Para avaliação dos sujeitos portadores de neoplasia colorretal será necessário aferição de: peso, estatura, circunferência da cintura e dobras cutâneas; além de coleta de amostra de sangue para avaliação bioquímica laboratorial e de informações sobre seu consumo alimentar. Metade dos pacientes será orientado a ingerir suplemento nutricional de óleo de peixe, na quantidade de 2,0 gramas por dia, sendo 450mg de ácidos graxos poliinsaturados da família omega-3 [360mg de ácido eicosapentaenóico (EPA) e 240mg de ácido docosahexaenóico (DHA)] durante nove semanas. Todas as avaliações serão realizadas no momento do aceite em participar da pesquisa e após nove semanas.

Os indivíduos que por livre arbítrio recusarem a suplementação de óleo de peixe e/ou da avaliação dos indicadores inflamatórios, solicito a utilização dos dados contidos nos prontuários. Reafirmo o compromisso ético da inviolabilidade destas informações.

O estudo não prevê risco, uma vez que os procedimentos de avaliação nutricional não são invasivos, a suplementação de ácidos graxos Omega-3 de cadeia longa na quantidade de 1,8g não apresenta risco e o exame laboratorial faz parte da rotina do processo de avaliação da terapêutica.

O estudo não prevê custos aos sujeitos. Uma vez que os

procedimentos serão realizados na própria instituição onde realizam tratamento da enfermidade e as cápsulas (para quem fizer uso) serão fornecidas pelo pesquisador.

Os indivíduos serão avaliados apenas por profissionais (médicos, nutricionistas, enfermeiros) devidamente treinados e vinculados as instituições parceiras. Haverá contatos telefônicos com os pacientes uma vez por semana, a fim de acompanhar as variáveis do período.

Este estudo justifica-se, pois se acredita que estratégias terapêuticas para atenuar a resposta inflamatória aguda exacerbada sejam elas medicamentosas ou nutricionais, devem ser exploradas na tentativa de melhorar da saúde e qualidade de vida de pacientes com câncer. Assim, baseado na indicação de efeito positivo da suplementação de óleo de peixe em pacientes com câncer colorretal, e na ausência desta pratica nos serviços de nutrição local, propõe-se este estudo de natureza longitudinal.

Se você estiver de acordo em participar do estudo, garantimos que as informações fornecidas serão confidenciais e só serão utilizadas neste trabalho com a finalidade de gerar conhecimento em saúde.

Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato com o pesquisador responsável: Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade pelo telefone: (48) 96156587 ou (48) 96028107 ou e-mail: erasmotrindade@ccs.ufsc.br.

Eu
portador do RG: Fone para
contato:..... fui esclarecido sobre a pesquisa:
Relação entre a Suplementação de óleo de peixe com o Estado Nutricional e a Resposta Inflamatória em Pacientes com Câncer colorretal e concordo que estes dados sejam utilizados na realização da mesma.

(sujeito da pesquisa)

Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade
(pesquisador principal)

Florianópolis.....