

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE ENFERMAGEM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E SAÚDE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DO ÁCIDO GRAXO ÔMEGA 3  
EM MODELO DE TUMOR DE MAMA MURINO E MUCOSITE INDUZIDA POR 5-  
FLUOURACIL**

Belo Horizonte

2020

ALINE LUIZA AFONSO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DO ÁCIDO GRAXO ÔMEGA 3  
EM MODELO DE TUMOR DE MAMA MURINO E MUCOSITE INDUZIDA POR 5-  
FLUOURACIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde do Departamento de Nutrição, Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nutrição e Saúde

Linha de Pesquisa: Nutrição Clínica e Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Simone de Vasconcelos Generoso

Co-orientador: André Luiz Branco de Barros

ESCOLA DE ENFERMAGEM DA UFMG

2020

Souza, Aline Luiza Afonso de.

S0729a Avaliação dos Efeitos da Suplementação do Ácido Graxo ômega 3 em modelo de tumor de mama murino e mucosite induzida por 5-FU [manuscrito]. / Aline Luiza Afonso de Souza. - - Belo Horizonte: 2020.

71f.: il.

Orientador (a): Simone de Vasconcelos Generoso.

Coorientador (a): André Luis Branco de Barros.

Área de concentração: Nutrição.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem.

1. Mucosite. 2. Ácido alfa-Linoleico. 3. Ácidos Graxos Ômega-3. 4. Neoplasias da Mama. 5. Dissertação Acadêmica. I. Generoso, Simone de Vasconcelos. II. Barros, André Luis Branco de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem. IV. Título.

NLM: WB 425



FOLHA DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DO ÁCIDO GRAXO ÔMEGA 3 EM MODELO DE TUMOR DE MAMA MURINO E MUCOSITE INDUZIDA POR 5- FLUOURACIL**

**ALINE LUIZA AFONSO DE SOUZA**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em NUTRIÇÃO E SAÚDE, como requisito para obtenção do grau de Mestre em NUTRIÇÃO E SAÚDE, área de concentração NUTRIÇÃO E SAÚDE, linha de pesquisa Bioquímica e Imunologia Nutricional.

Aprovada em 19 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Profa. Dra. Simone de Vasconcelos Generoso - Orientador  
Escola de Enfermagem - UFMG

  
Prof(a). André Luis Branco de Barros  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
Prof(a). Adalene Versiani Matos Ferreira (Orientadora)  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
Prof(a). Ana Maria Caetano de Faria  
UFMG

Belo Horizonte, 19 de fevereiro de 2020.



  
Mateus Gomes Pedrosa  
Escola de Enfermagem / UFMG  
CRAPE 1663368 Matrícula 207519

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família, meus pais e irmãos que me apoiaram, à minha mãe, prima e tios que já lutaram contra o câncer, à todos os pacientes do Ambulatório Jenny Faria do Hospital das Clínicas e às pessoas que atendi neste período, que me aproximaram de uma nutrição mais humana.

É por vocês que estou aqui.

## AGRADECIMENTOS

Aos orientadores Simone Generoso e André Barros o meu muito obrigada pela paciência, pelos ensinamentos que foram muito além da ciência, pela sensibilidade em me dar a mão quando mais precisei, por me ensinar a caminhar sozinha quando foi necessário e pela disponibilidade de sempre: Vocês são o exemplo que quero seguir!

Ao Professor Valbert Cardoso por ter me recebido, pelas contribuições dadas e por estar sempre de portas abertas.

Aos colegas do Radioisótopos: Luisa, Sued, Janaína, Paula, Nara, Fernanda, Shirleide, Juliana, Renata, e professora Anna Eliza — pelas inúmeras contribuições dadas nos experimentos, colaborações, discussões científicas (e outras nem tanto), agradeço, sobretudo, pelos momentos de descontração mais que necessários.

À Maria Emília pelas discussões, contribuições e ensinamentos dados.

Aos alunos de Iniciação Científica: Isabel, Gustavo, Daniele e Sabrina – pelo auxílio nos mais diversos momentos.

À Adelaide e ao Batista pelo cuidado com os animais e pelo suporte sempre que necessário.

Ao Vanderli, pela ajuda oportuna em todos os momentos.

Aos colegas do grupo PENCE e ao grupo da professora Maria Isabel Correia, pelos ensinamentos nas reuniões, pelo apoio recebido e por sermos uma equipe da qual eu me orgulho de pertencer.

Ao LPC — Professor Geovanni Cassali, Diego e demais membros pela colaboração, discussões e contribuições dadas.

Ao Labin — Professora Jacqueline Alvarez, Paola, e demais meninas — pela contribuição generosa que foi muito além das análises.

Às amigas que ganhei no mestrado: Lizi, Lud e Izabella. Sou grata pelos momentos em que levantamos umas as outras. Que seja sempre assim!

Às amigas que não me abandonaram neste e em nenhum outro momento: Cris e Deh, pelo apoio de sempre.

Às tias Raquel e Taninha que tanto me auxiliaram nesta e em outras tantas jornadas.

Ao Renato pelo apoio, incentivo, carinho e compreensão em todos os momentos.

Aos meus pais e irmãos pelo carinho e apoio.

À CAPES, FAPEMIG e CNPQ pelo auxílio financeiro.

Nesta jornada conheci pessoas que sabem doar muito mais do que o seu conhecimento. Nem todas foram aqui mencionadas, mas saibam que não me esquecerei de nenhuma solidariedade a mim prestada. Sou grata por cada um que passou por mim neste período. Enfim, eu não estaria aqui sem o apoio de todos vocês, muito obrigada!

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”*

Cora Coralina



## RESUMO

O ômega 3 é um ácido graxo poliinsaturado utilizado como agente terapêutico no tratamento de diversas doenças. Evidências sugerem efeito anti-inflamatório com sua utilização. A escolha do tratamento eficiente que minimize os efeitos adversos do tratamento oncológico tem sido desafiadora para a prática clínica. Dessa forma, ele seria interessante na prevenção e / ou tratamento da mucosite, uma inflamação que acomete as mucosas da boca ao ânus, decorrente da utilização de quimioterápico e radioterápico. As consequências deste agravo vão desde a perda de peso, anorexia e odinofagia, ao aumento do risco de translocação bacteriana, em virtude do aumento da permeabilidade intestinal (PI). Tais complicações podem levar à interrupção do tratamento quimioterápico até que o paciente se restabeleça. Trabalhos anteriores do nosso grupos de pesquisa demonstraram que o ômega 3 foi capaz de atenuar a perda de peso e reduzir a PI pela regulação da apoptose de células intestinais. Entretanto, possíveis efeitos da suplementação do ômega 3 no tumor não foram investigados. O presente estudo avaliou o efeito deste composto na mucosite induzida por quimioterápico em modelo de tumor de mama murino. Para tanto, camundongos Balb/c foram divididos nos grupos controle (CTL), controle tumor (CTLTU), tumor ômega 3 (TUW3), tumor 5-fluouracil (TU5FU) e tumor 5-fluouracil ômega 3 (TU5FUW3). Nos animais dos grupos com tumor foi realizada a inoculação das células tumorais (dia 1) e, uma vez que os tumores já se encontravam palpáveis (dia10), os grupos TUW3 e TU5FUW3 iniciaram a suplementação com ômega 3 pela ração por 10 dias, enquanto os demais animais receberam ração controle. Ao final desse período, os animais dos grupos TU5FU e TU5FUW3 receberam injeção intraperitoneal de 5-FU (300mg/kg) para indução da mucosite, enquanto os demais animais receberam a injeção de solução salina. Após 72 horas, os animais foram eutanasiados para coleta de dados. A suplementação com ômega 3 não foi capaz de prevenir a perda de peso em decorrência da mucosite. Entretanto, os animais do grupo TU5FUW3 apresentaram redução da PI por meio da recuperação das junções firmes ZO-1 e ocludina, além da preservação da arquitetura dos vilos. Os animais do grupo CTLTU também apresentaram aumento da PI e redução da expressão das proteínas de junção, provavelmente pela liberação de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , conforme dosagem destas no baço. Nos animais suplementados com ômega 3 foi observado redução do tamanho do tumor e do número de metástases tumorais, além de redução da proliferação de células tumorais e

aumento da afinidade das células tumorais ao quimioterápico, levando à apoptose destas. Este processo de citotoxicidade seletiva foi observado pela redução da toxicidade hepática. Diante desses resultados, pode-se concluir que a suplementação de ômega 3, por período de dez dias, foi capaz de atenuar os efeitos da mucosite induzida por quimioterápico, sem causar prejuízo à sua atividade antitumoral.

**Palavras- Chave:** Mucosite, ácido alfa-linolênico, tumor mama murino 4-T1

## ABSTRACT

Omega 3 is a polyunsaturated fatty acid used as a therapeutic agent in the treatment of various diseases. It is widely accepted that its use can exert an anti-inflammatory effect. Thus, it would be interesting in the prevention and treatment of mucositis, which is described as an inflammation that affects mucosal membranes from the mouth to the anus, due to the use of chemotherapy and radiotherapy. Patients who suffer from this outcome, usually presents weight loss, anorexia and odynophagia, also there is an increased risk of bacterial translocation, due to the increase of the intestinal permeability (IP). Such complications can lead to the interruption of chemotherapy treatment until the patient is recovered. Previous work has shown that omega 3 was able to reduce weight loss and reduce IP by reducing intestinal cell apoptosis. However, the effects of omega 3 supplementation from the diet on the tumor remains unknown. This study aimed to investigate the effect of this compound on chemotherapy-induced mucositis in the murine breast tumor model. For that, BALB/ c mice were divided into the control (CTL), tumor control (CTLTU), omega 3 tumor (TUW3), 5-fluouracil tumor (TU5FU) and 5-fluouracil omega 3 tumor (TU5FUW3) groups. Tumor cells were inoculated (day 1) and, since they were already palpable (day 10), groups TUW3 and TU5FUW3 started receiving the chow supplemented with omega 3 for 10 days, while the other animals received control chow. At the end of this period, animals from groups TU5FU and TU5FUW3 received an intraperitoneal injection of 5-FU (300mg / kg) to induce mucositis, while the other animals received an injection of saline. After 72 hours, all animals were euthanized for data collection. Omega 3 supplementation was not able to prevent weight loss due to mucositis. However, animals from TU5FUW3 group showed a reduction in IP by recovering the tight-junctions ZO-1 and occludin, and by preventing the mucosal damage. Animals from CTLTU group also showed increased PI and reduced expression of tight-junction proteins, probably due to the release of cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , according to their dosage in the spleen. In addition, our results have demonstrated that animals supplemented with omega 3, have shown a reduction in the size of the tumor and the number of metastasis in lungs. We have found that the reduction was mediated through a reduction in the proliferation of tumor cells and also by an increased affinity of tumor cells to the chemotherapeutic drug, leading to their apoptosis. This selective cytotoxicity process leads to the reduction of liver toxicity. Given these results, we can conclude that omega 3 supplementation, for ten days, was

able to attenuate the effects of chemotherapy-induced mucositis, without causing damage to its antitumor activity.

**Keywords:** Mucositis, alfa-linolenic acid, murine breast tumor 4T1.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

Figura 1. Estrutura Molecular dos Ácidos Graxos Ômega 3 e 6 .....	20
Figura 2. Representação Esquemática do Metabolismo dos ômega 3 e 6.....	20
Figura 3. Representação Esquemática do Delineamento Experimental do Estudo.....	32
Figura 4. % de Variação Ponderal dos Animais em relação ao dia 1 (A) Média de Consumo de Ração (B).....	42
Figura 5. Permeabilidade Intestinal 72 horas após a indução da mucosite.....	43
Figura 6. Análise Histológica do Íleo.....	44
Figura 7. Escore de Mucosite (A) Razão vilos/crípta (B) Altura do vilos (C) Profundidade da crípta (D).....	45
Figura 8. Tamanho do Intestino.....	45
Figura 9. Análise de Junções Firmes – ZO-1 (A) Ocludina (B).....	46
Figura 10. Volume Relativo Tumoral.....	47
Figura 11. Variação de Volume Tumoral.....	47
Figura 12. Imuno-histoquímica: Marcador de proliferação celular CDC47 (A, B, C, D) Percentual de Células Positivas/ Campo.....	48
Figura 13. Metástases Pulmonares (A, B, C, D) Número de Metástases/ Grupo (E)...	49
Figura 14. Toxicidade Hepática (A, B, C, D, E).....	50
Figura 15. Dosagem das Citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10.....	51

### QUADROS

Quadro 1. Câncer e Utilização Lipídica.....	26
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes Utilizados na Manufatura da Ração Ofertada aos Animais.....	34
Tabela 2. Composição dos Ácidos Graxos nas Dietas Ofertadas.....	34
Tabela 3. Escores Histológicos- Graus de Mucosite.....	37
Tabela 4. Características Hepáticas.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

® Marca registrada

$\alpha$  Alfa

$\beta$  Beta

$\gamma$  Gama

$\kappa$  Kappa

$\mu$  Micro

°C Graus Celsius

$\mu\text{m}$  - Micrograma

mg - Miligrama

$\mu\text{L}$  - Microlitro

ml - Mililitro

cm - Centímetro

pg - Picograma

MBq - Megabecquerel

5-FU - 5- Fluouracil

4T1 - Linhagem de células do modelo tumoral adotado

PUFA - Ácidos Graxos Poliinsaturados

ARA - Ácido Araquidônico

EPA - Ácido Eicosapentaenóico

DHA - Ácido Docosahexaenóico

FADS1 - *Fatty Acid Desaturase 1*

FADS2 - *Fatty Acid Desaturase 2*

COX - Cicloxigenase

COX<sub>2</sub> - Cicloxigenase 2

LOX - Lipoxigenase

PGE<sub>2</sub> - Prostaglandinas de série dois

PGE<sub>3</sub> - Prostaglandinas série três

TX<sub>2</sub> - Tromboxanos de série dois

TX<sub>3</sub> - Tromboxanos de série 3

LT<sub>4</sub> - Leucotrienos de série quatro

LT<sub>5</sub> - Leucotrienos de série cinco

E<sub>1</sub> - Resolvinas E1  
D1 - Resolvinas D1  
IL-1 $\alpha$  – *Interleucin 1 alpha*  
IL-6 - *Interleucin 6*  
IL-10- *Interleucin 10*  
TNF- $\alpha$  - *Tumor Necrosis Factor*  
IL-1 $\beta$  - *Interleucin 1 beta*  
PPAR  $\gamma$  - *Peroxisome proliferator-activated receptor*  
NF- $\kappa$ B - *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*  
I- $\kappa$ b – *Inhibitor of Kappa B*  
TGF- $\beta$  – *Transforming Growth Factor beta*  
GPR-120 – Receptor de membrana de células que reconhece ômega 3  
FFA<sub>4</sub> - Ácido Graxo Livre  
AG - Ácido Graxo  
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio  
G2/M - Fases da proliferação celular  
BCL-2 - linfoma de células B tipo 2  
HER2 - *Human Epidermal growth factor Receptor 2*  
DNA - Ácido Desoxirribonucléico  
RNA - Ácido Ribonucleico  
mRNA - Ácido Ribonucleico Mensageiro  
MAP-K- *Mitogen Activated Protein Kinase* – *Proteína Quinase Ativada por Mitogênio*  
MMP – *Metaloproteinasis Matrix Protein* - Proteína Matriz Metaloproteinase  
PCR – Proteína C-Reativa  
ICB- Instituto de Ciências Biológicas  
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais  
FAFAR - Faculdade de Farmácia  
LPC - Laboratório de Patologia Comparada  
CEUA - Comitê de Ética de Uso Animal  
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal  
ARRIVE- *Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*  
CTL - Controle  
CTLTU - Controle Tumor  
TUW3 - Tumor Ômega 3



TU5FU - Tumor 5-Fluouracil  
TU5FUW3 - Tumor 5-Fluouracil ômega 3  
AIN-93G - *American Institute of Nutrition – 93 Growth*  
SEM - Erro Padrão da Média  
RPM - Rotação por Minuto  
DMEM - *Dulbecco's Modified Medium*  
CO<sub>2</sub> - Dióxido de Carbono  
IP – Intraperitoneal  
NaCl – Cloreto de Sódio  
DTPA - *Diethylenetriaminepentaacetic acid*  
<sup>99m</sup>Tc - Tecnécio  
PBS - *Phosphate Buffered Saline*  
HE - Hematoxilina e Eosina  
PCR - Real Time – *Polymerase Chain Reaction – Real Time*  
ZO-1 - *Zonula Ocludens*  
GAPDH - *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*  
VRT - Volume Relativo Tumoral  
IC - Índice de Crescimento  
PIF - Fator Indutor de Proteólise  
TJ - *Tight- Junctions*  
D1 - Dia 1  
D10 - Dia 10  
D17 - Dia 17  
D20 - Dia 20

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 ÔMEGA 3.....	19
2.1.1 Metabolismo dos Ácidos Graxos Ômega 3 e 6.....	19
2.1.2 PUFAS na Regulação da Inflamação.....	21
2.1.3 Ômega no Câncer.....	23
2.1.4 Ômega 3 e Mucosite.....	27
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Animais.....	31
4.1.1 Delineamento Experimental.....	31
4.2 Cultivo de Células Tumorais 4T1.....	32
4.3 Inoculação e Desenvolvimento Tumoral.....	33
4.4 Modelo de Mucosite Intestinal Induzido por 5-Fluouracil.....	33
4.5 Preparo da Ração.....	33
4.6 Eutanásia.....	35
4.7 Coleta de Dados e Análises Realizadas.....	36
4.7.1 Avaliação da Variação Ponderal e Consumo dos Animais.....	36
4.7.2 Determinação da Permeabilidade Intestinal (PI).....	36
4.7.3 Avaliação da Mucosite: Análises Histopatológicas e Morfométricas.....	37
4.7.3.1 Histopatologia.....	37
4.7.3.2 Avaliação do Escore Histológico.....	37
4.7.3.3 Determinação da Altura das Vilosidades e Profundidade das Criptas.....	38
4.7.3.4 Avaliação do Tamanho do Intestino.....	38
4.7.4 Avaliação das Proteínas de Junção pelo Método <i>real time</i> (qPCR).....	38
4.7.5 Avaliação do Volume Tumoral.....	38
4.7.6 Avaliação das Vias de Proliferação Celular – Imuno-histoquímica.....	39
4.7.7 Avaliação de Metástases Pulmonares.....	40
4.7.8 Avaliação da Hepatotxicidade e Metástases Hepáticas.....	40

4.7.9 Dosagem de Citocinas.....	40
4.7.10 Análise Estatística.....	41
5. RESULTADOS.....	42
5.1 Variação Ponderal e Consumo Alimentar.....	42
5.2 Permeabilidade Intestinal (PI).....	43
5.3 Avaliação da Mucosite: Análises Histopatológicas e Morfométricas.....	43
5.3.1 Tamanho do Intestino.....	45
5.4 Avaliação das Proteínas de junção pelo método <i>real time</i> (qPCR).....	46
5.5 Avaliação do Volume Relativo Tumoral.....	46
5.6 Avaliação das Vias de Proliferação Celular – Imuno-histoquímica.....	48
5.7 Avaliação de Metástases Pulmonares.....	49
5.8 Avaliação da Hepatotoxicidade e Metástases Hepáticas.....	49
5.9 Dosagem de Citocinas.....	51
6. DISCUSSÃO.....	52
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
8. REFERÊNCIAS.....	61
9. ANEXO I.....	71

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado ao conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos. No mundo, é a segunda principal causa de óbitos, sendo responsável pela morte de 9,6 milhões de pessoas por ano. No ano de 2018, mais de 582.000 brasileiros tiveram diagnóstico de câncer, sendo o câncer de mama responsável por cerca de 59.700 casos no país atingindo em sua maioria as mulheres<sup>(1)</sup>.

Dentre os principais agentes associados à etiologia do câncer de mama estão os fatores ambientais, como a inatividade física, a ingestão de bebidas alcoólicas, a reposição hormonal, a exposição à radiação ionizante, a ausência de amamentação e o excesso de gordura corporal. Todos estes fatores podem causar mutações em oncogenes, genes associados a este tipo de câncer<sup>(2)</sup>.

O tratamento do câncer de mama pode incluir, além da remoção cirúrgica do tumor, as terapias quimioterápica e radioterápica, além da imunoterapia e hormonioterapia<sup>(1)</sup>. A combinação destes tratamentos pode ser, em muitos casos, dolorosa e ocasionar várias reações adversas, dentre elas a mucosite<sup>(3)</sup>.

A fisiopatologia da mucosite é descrita como ulcerações na mucosa gastrointestinal, podendo atingir da boca ao ânus. Os sintomas clínicos mais comuns são odinofagia, disfagia e diarreia<sup>(4)</sup>. Além disso, as alterações na mucosa intestinal podem levar ao aumento da permeabilidade intestinal, favorecendo a ocorrência de translocação bacteriana. Situação que aumenta o risco de sepse e óbito<sup>(5)</sup>. Essas alterações interferem diretamente no estado nutricional, qualidade de vida e prognóstico do paciente, podendo levar à interrupção do tratamento até que se observe melhora dos sintomas<sup>(6)</sup>. Todos estes fatores estão diretamente ligados ao aumento do tempo de internação e, conseqüentemente, dos custos hospitalares<sup>(7)</sup>.

A escolha do tratamento eficiente que minimize os efeitos adversos do tratamento oncológico tem sido desafiadora para a prática clínica<sup>(8)</sup>. Até o momento, a alternativa mais eficaz para a prevenção da mucosite é a laserterapia. Entretanto, ela é direcionada apenas para a mucosite da cavidade oral. Na literatura há evidências de benefícios com a utilização de agentes imunomoduladores e anti-inflamatórios na mucosite intestinal. Porém, os dados ainda são inconclusivos, pois vários desses agentes têm demonstrado eficácia moderada<sup>(3,9,10)</sup>. Além disso, ainda há mecanismos a serem elucidados, sobretudo a respeito do efeito destes agentes associados a

quimioterápicos sobre as células tumorais e demais órgãos na presença do tumor<sup>(11-13)</sup>. Dessa forma, torna-se importante estabelecer novas propostas de tratamento e/ou prevenção dessa patologia<sup>(14,15)</sup>.

Estudo anterior conduzido pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que a suplementação com ômega 3 em animais submetidos à indução da mucosite por 5-fluoracil (5-FU) levou à redução da permeabilidade e apoptose das células intestinais, contribuindo para a melhora da mucosite<sup>(11)</sup>. Entretanto, neste trabalho, os animais não apresentavam tumor. É importante avaliar se a redução de apoptose encontrada nas células intestinais será observada nas células tumorais durante a suplementação com ômega 3. Dessa forma, o presente estudo visa elucidar os efeitos da suplementação do ácido graxo ômega 3 em modelo de mucosite induzida por 5-FU em camundongos BALB/c na presença de tumor de mama murino 4T1.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### Câncer

O câncer é definido como uma alteração nos mecanismos de proliferação e apoptose celular. Há mais de 100 tipos de câncer e subtipos de tumor que podem ser encontrados em órgãos distintos (16). As células tumorais possuem metabolismo diferente das demais células do organismo, e causam alterações em todo o organismo impactando tanto no prognóstico quanto na qualidade de vida dos pacientes(17).

As células neoplásicas têm metabolismo diferenciado e são ávidas por energia com o objetivo de sustentar sua rápida replicação. Durante muito tempo, acreditou-se que essas células alimentavam-se apenas de glicose, devido à sua capacidade de captação em condições de anaerobiose, descrição denominada “efeito *Warburg*” (18). O efeito *Warburg* é caracterizado por metabolização ineficiente da glicose, em processo denominado ciclo fútil, que leva ao alto gasto energético por células tumorais e à produção elevada de lactato, aumentando a acidez na região tumoral, que por sua vez, propicia a proliferação celular(18). No entanto, estudos mais recentes demonstram que a reprogramação metabólica destas células envolve diversos outros processos, desde a utilização e biossíntese de substratos como proteínas, ácidos nucléicos e lipídeos para manutenção da proliferação tumoral. Esses processos foram descritos dentre as *Hallmarks* do Câncer(16) como alguns dos mecanismos de proliferação tumoral. Diferentes tumores possuem diferentes formas de utilização dos substratos (17,19).

Em indivíduos saudáveis a lipogênese se dá em apenas algumas condições específicas, como na embriogênese, na fase de desenvolvimento fetal, ou em células sensíveis aos receptores hormonais. Neste último caso, a biossíntese de ácidos graxos ocorre pela regulação dos hormônios progesterona e estrógeno, durante o ciclo menstrual. Entretanto, Alguns tipos de tumor, dentre eles o de mama, possuem alterações no seu fenótipo e realizam síntese lipídica de maneira exacerbada, principalmente em seu estágio inicial de desenvolvimento, sendo estes denominados lipogênicos(20). Pela via da ácido graxo-sintase, o Acetil –coA é convertido a Malonil-coA, estes dois compostos são, então, acoplados ao domínio da proteína transportadora de acil para a enzima ácido-graxo sintase. Repetidas condensações dos grupos acetil geram ácido graxo de 16 carbonos, o palmitato. Este palmitato pode

ser convertido a outros ácidos graxos (AGs) saturados ou insaturados, a depender da atividade das enzimas dessaturase e alongase(20). As células tumorais utilizam estes ácidos graxos majoritariamente na forma saturada na composição de membranas, dentre outras funções(18).

Para os tumores lipogênicos este é um mecanismo que garante maior eficiência energética às células neoplásicas (21). Os ácidos graxos saturados na membrana celular são precursores do ácido araquidônico, que por sua vez, dá origem à liberação de eicosanóides pró-inflamatórios, propiciando a angiogênese. Além disso, podem ser utilizados como fonte energética, via  $\beta$ - oxidação(22). Na presença de ácidos graxos saturados na membrana das células tumorais, a sensibilidade ao estresse oxidativo induzido pelo quimioterápico é reduzida, um processo reconhecido como quimiorresistência(22). A lipogênese é portanto considerada uma importante *Hallmark* do câncer uma vez que propicia ao mesmo tempo mecanismos de proliferação e evasão tumoral, além de quimioresistência. Esta característica é considerada um marcador de tumores mais agressivos. Compreender portanto a utilização lipídica pelas células tumorais e sobretudo a diferenciação do metabolismo entre os diferentes lipídios é um dos objetivos deste trabalho.

## 2.1 Ômega 3

### 2.1.1 *Metabolismo dos Ácidos Graxos Ômega 3 e 6*

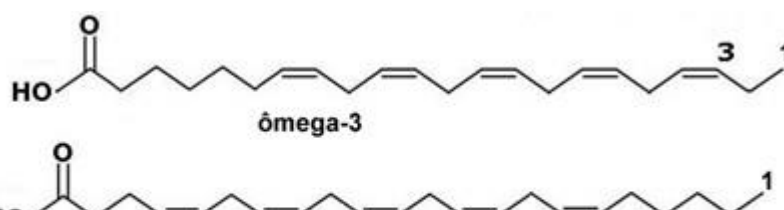
Os ácidos graxos ácido linoleico (ômega 6) e alfa linolênico (ômega 3) pertencem à categoria dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e são, dentre esses, os mais abundantemente na natureza. Eles são compostos por, aproximadamente, 20 carbonos, contendo uma ligação dupla no carbono de número 6 (20:6) ou 3 (20:3), contando a partir do grupo metil(43). Ambos ácidos graxos estão representados na Figura 1. Os ácidos graxos ômega 3 são sintetizados pelas plantas e por algumas algas, podendo ser encontrados nos peixes que se alimentam destas, além de algumas sementes e seus óleos. Por não serem sintetizados pelos animais, estes nutrientes são considerados essenciais pelos mamíferos, pois são importantes na manutenção de diversas funções fisiológicas, desde a composição de membranas lipídicas, até a regulação de processos inflamatórios. A maioria das plantas produz uma proporção maior de ômega 6 do que de ômega 3, o que acaba impactando nos níveis de ingestão desses ácidos graxos na população. Em países do ocidente, a

média do consumo é de 10g ácido graxo ômega 6 para 1 grama de ácido graxo ômega 3(44).

O metabolismo desses ácidos graxos, assim como de outros lipídeos, ocorre em sua maior parte no fígado. O ômega 6 é convertido, primeiramente, a ácido gama linolênico (18:3) pela delta 6 dessaturase e, em seguida, a alongase 5 o converte em ácido diomo gama linolênico (20:3). Esse por sua vez é, finalmente, convertido em ácido araquidônico (20:4, ARA) pela enzima 5-dessaturase(45).

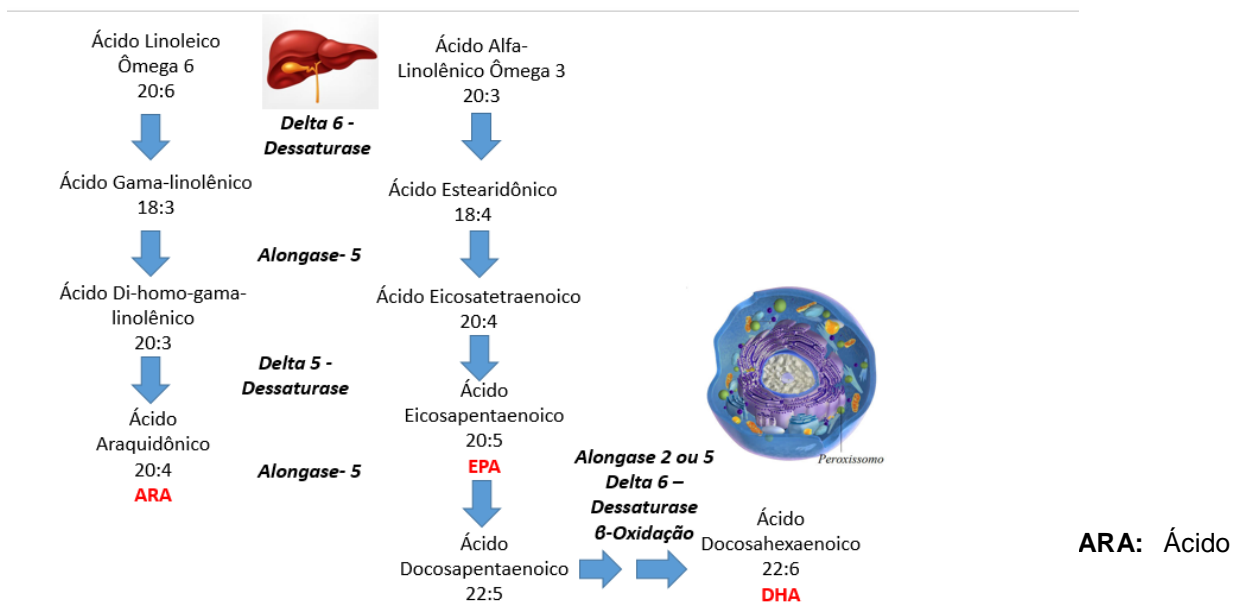
No ômega 3, a primeira dessaturação ocorre a partir do carbono de número 9, contando do grupo carboxila, transformando-o em ácido estearidônico (18:4) pela enzima delta 6. Em seguida, este será alongado pela enzima alongase a ácido eicosatetraenóico (20:4) e, posteriormente, dessaturado pela enzima delta 5 dessaturase, sendo convertido a ácido eicosapentaenóico (20:5, EPA). Para que o EPA seja convertido a ácido docosa-hexaenóico (22:6, DHA) deve haver adição de dois carbonos a esta cadeia, produzindo o ácido docosapentaenóico (22:5). Em seguida, outros dois carbonos são adicionados, dando origem ao 24:5. A próxima etapa envolve a dessaturação na posição delta 6 para formação do 24:6 e a translocação desse composto do retículo endoplasmático, onde ocorreram todos estes processos, para os peroxissomos, onde dois carbonos são removidos por beta-oxidação para, finalmente, obter-se o DHA. Esta última conversão tem se mostrado ineficiente nos humanos, dessa forma, faz-se necessária a ingestão do ácido graxo já na forma de DHA, a fim de garantir seus efeitos metabólicos de forma eficaz(44,46). Este processo está representado na Figura 2.

As enzimas delta-6 e delta-5 dessaturase são reguladas por fatores como o estado nutricional, hormônios e por *feedback* de inibição dos produtos finais(44). Ambos ácidos graxos competem pelas mesmas enzimas, sendo o ômega 3 o substrato preferencial destas. No entanto, sabemos que, por ser o ômega 6 o ácido graxo mais abundante na dieta dos ocidentais, as membranas fosfolipídicas, consequentemente, têm uma quantidade maior deste nutriente em sua composição. Além disso, polimorfismos nos genes decodificadores destas enzimas, os denominados ácido graxo dessaturase 2 e 1 (*fatty acid desaturase* FADS<sub>2</sub> e FADS<sub>1</sub>), podem alterar o metabolismo das enzimas, consequentemente aumentando ou reduzindo a quantidade de ácidos graxos ômega 3 ou 6 na membrana das células(44,47).





**Figura 1. Estrutura Molecular dos Ácidos Graxos ômega 3 e 6.**  
**Fonte:** Elaborado pela autora.



### 2.1.2 PUFAS na Regulação da Inflamação

Os ácidos graxos poliinsaturados têm importante papel na regulação da inflamação, seja via ativação enzimática, ou na regulação dos genes decodificadores destas enzimas. Células do sistema imune como mastócitos, neutrófilos, monócitos dentre outras, têm sua membrana fosfolipídica majoritariamente composta por ARA(48). Na presença de estímulo, como injúria, ocorre a ativação da enzima fosfolipase A2, liberando os ARA da membrana. Este será o principal substrato para a produção das enzimas cicloxigenase (COX), lipoxigenase (LOX) e citocromo P450, precursoras dos eicosanóides, uma família de mediadores inflamatórios(44). No processo inflamatório, as prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) são responsáveis pela vasodilatação, enquanto os tromboxanos (TX<sub>2</sub>) e os leucotrienos (LT<sub>4</sub>) envolvidos nos processos de quimiotaxia atraem os leucócitos e neutrófilos para a área de lesão, além de atrair moléculas de adesão, proteínas capazes de formar redes de interação, entre diferentes células (monócitos, leucócitos e células endoteliais)(49). O tipo de eicosanóide e a concentração destes regula a intensidade e duração da resposta

inflamatória(50). Na resolução da inflamação, o ômega 3 e seus ácidos derivados atuam em diversos mecanismos, alguns deles ainda não completamente esclarecidos(51). Os principais mecanismos descritos são:

- Via Competição enzimas delta 5 e 6 no metabolismo:

Quando em elevada concentração nas membranas das células do sistema imune, mediante estímulo, o EPA e o DHA são liberados atuando como substratos de mediadores anti-inflamatórios da série ímpar, sendo estes  $PGE_3$ ,  $LT_5$  e  $TX_3$  (52). Estes eicosanóides apresentam estrutura molecular diferenciada e são até 100 vezes menos potentes que os derivados de ARA. Esta característica é atribuída aos efeitos opostos daqueles derivados de ARA, atuando como mediadores anti-inflamatórios(46).

- Liberação de resolvinas, maresinas e protectinas:

Os ácidos graxos ômega 3 produzem diversas moléculas de sinalização denominados mediadores lipídicos especializados pró - resolvinas. Estas moléculas agem como agonistas que cessam o influxo de neutrófilos polimorfonucleares aumentando a capacidade de captação de células apoptóticas por macrófagos, um mecanismo denominado eferocitose, reduzindo o tempo de resolução da inflamação.

O EPA é capaz de produzir, pelas vias da COX e LOX, resolvinas de série E, enquanto o DHA pode produzir resolvinas de série D, além de protectinas e maresinas. As resolvinas E1, D1 e protectinas E1 são capazes de limitar a infiltração de neutrófilos polimorfonucleares, enquanto as resolvinas D1 inibem a produção de  $IL1-\beta$  e as protectinas D1 inibem a produção de  $TNF-\alpha$  e  $IL1-\beta$ (44,53,54).

- Via ativação da via PPAR- $\gamma$  :

Outra via de atuação anti-inflamatória dos compostos derivados de ômega 3 é a ativação da via do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- $\gamma$ ) por ácidos derivados do ômega 3. O PPAR- $\gamma$  é fator de transcrição anti-inflamatório, capaz de inibir a ativação do fator de transcrição NFk-B no núcleo celular, um dos principais reguladores do processo inflamatório. O NFk-B é o principal fator de transcrição envolvido na regulação de genes que codificam a liberação de citocinas pró-inflamatórias — moléculas de adesão e ativação da via da COX-2. A ativação deste ocorre via ativação de estímulos extracelulares, como endotoxinas, e, em seguida, ocorre a fosforilação de uma sub unidade inibitória (Ik-B) que então permite a

translocação do NFκ-B ao núcleo celular. A presença de EPA e DHA em células inflamatórias foi associada à redução da fosforilação do Iκ-B e à consequente redução da ativação por endotoxinas em macrófagos em cultura. Uma vez inativado o NFκ-B, ocorre redução na produção de citocinas pró-inflamatórias(46,55).

- Receptores de Membrana do tipo “G”:

Células que possuem o receptor do tipo GPR 120 ou FFA4 (*free fatty acid receptor 4*), como os macrófagos, podem ser ativadas tanto pelo EPA, quanto pelo DHA e estes são capazes de atuar na captação de neutrófilos apoptóticos, reduzindo a liberação do exsudato, proveniente da resposta inflamatória restabelecendo a homeostase. Estes receptores, quando presentes em outras células, podem alterar a sinalização celular e diversas outras funções em mecanismos ligados à saciedade e resistência insulínica(51).

Tais funções levam-nos a buscar uma maior compreensão de como estes mecanismos agiriam no câncer.

### 2.1.3 Ômega no Câncer

Muitos autores têm se empenhado em avaliar a relação entre o consumo de ômega 3, o câncer e suas complicações(20,23,32,37). Os ácidos graxos EPA e DHA estão envolvidos em processos como indução de apoptose em células neoplásicas, aumento da resposta das células tumorais aos agentes quimioterápicos pela citotoxicidade seletiva, além da redução da anorexia e caquexia(23,37). Dessa forma, compreender como estes mecanismos podem atuar como coadjuvantes no tratamento contra o câncer é de extrema importância.

No tumor de mama observou-se que os mesmos eicosanoides PGE<sub>2</sub> promotores da inflamação atuam na promoção da angiogênese. Nestas condições, a angiogênese é estimulada pela produção de prostaglandinas em células endoteliais do sistema linfático, promovendo a metástase tumoral. Este processo demonstra que a presença de ácidos graxos saturados na membrana tumoral potencializa a proliferação destas células, sendo o lipídeo, portanto, um substrato com funções além da obtenção de energia(20). Como a mama é um órgão no qual as células epiteliais estão imersas no tecido adiposo, a interação entre adipócitos e células tumorais é facilitada, podendo estimular a angiogênese e a proliferação celular, em virtude da

liberação de adipocinas e outras citocinas pró-inflamatórias. Este mecanismo explica a relação da prevalência de tumor de mama em mulheres obesas e os resultados obtidos em ensaios clínicos de suplementação de ômega 3(23–25).

Em ensaio clínico randomizado observou-se a relação entre o perfil de triglicerídeos do tecido adiposo e a magnitude do câncer. Baixos níveis de DHA e EPA no tecido adiposo mamário foram associados à maior incidência de tumor de mama multifocal, tipo de câncer de mama com vários tumores *in situ*. O perfil lipídico dos triglicerídeos no tecido adiposo, ao contrário da composição da membrana das células tumorais, foi responsável por modular tal resposta(26). Haja vista que a composição da dieta como um todo é o principal fator responsável na garantia de níveis séricos de ômega 3, o estímulo do consumo deste nutriente parece ser interessante em pacientes com câncer(27).

Diversos estudos têm demonstrado que os ácidos graxos DHA e EPA são capazes de inibir o crescimento de alguns tipos de células tumorais de câncer, incluindo o de mama(24,28–32), atuando em mecanismos de inibição e evasão tumoral, alterando características moleculares responsáveis pela malignidade do tumor(17). O efeito destes compostos seria não apenas antiproliferativo, prolongando o ciclo celular entre as fases G2 / M(33), como também pró-apoptótico, ativando vias como a procaspase-8 e caspase 3(34). Além disso, o ômega 3 é capaz de reduzir a expressão gênica de fatores como linfoma de células B tipo 2 (BCL-2)(32), e do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (Her2) — um receptor superexpresso em aproximadamente 20% dos tumores de mama(35). Ambos oncongenes dos tipos mais comuns de câncer de mama<sup>(1)</sup>.

Sabe-se que fatores pró-inflamatórios liberados pelo tumor, tais como a PGE<sub>2</sub>, IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , dentre outros, são mediadores da caquexia. Dentre as alterações causadas por ela, alterações na sinalização no sistema nervoso central levam à anorexia. Além disso, tais sinalizações celulares ativam fatores de transcrição responsáveis por ativar componentes da via ubiquitina-proteossoma e sistemas de autofagia. Este processo leva à proteólise e, conseqüente, à perda de massa muscular esquelética, levando à atrofia muscular e fraqueza(36). Nesse contexto, ensaios clínicos randomizados demonstraram que o ômega 3 foi capaz de atenuar os sintomas através da redução da liberação da PGE<sub>2</sub> e da liberação de fatores anti-inflamatórios, que atuam na resolução da inflamação, minimizando tais efeitos(37).

Lipídeos são altamente suscetíveis à degradação oxidativa por peroxidação, produzindo radicais livres como metabólitos. A sinalização celular mediada por estresse oxidativo está relacionada a diversos aspectos do câncer. Desde a progressão no ciclo celular de proliferação, sobrevivência ou apoptose, metabolismo energético, angiogênese e motilidade celular. Um dos mecanismos de ação do quimioterápico é aumentar de forma desproporcional a concentração citoplasmática de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando à liberação do citocromo C e ativação das vias de apoptose de células tumorais, além de levar à autofagia, outro mecanismo de morte celular(38). Estudos *in vitro* demonstraram que o EPA e DHA são capazes de atuar tanto nas vias de apoptose, quanto na regulação e promoção da autofagia(34,39). Outros estudos avaliaram que o ômega 3 foi capaz de reduzir a progressão do tumor de mama, atuando como estímulo para a apoptose e reduzindo a ação da citocina TNF-  $\alpha$ (40). Os mecanismos envolvidos na promoção da apoptose pelo ômega 3 ainda não estão completamente esclarecidos, mas sabe-se que são dose/tempo dependentes(23).

Apesar dos resultados promissores em ensaios clínicos e estudos *in vitro* e *in vivo*, ainda há muitas lacunas a despeito dos mecanismos que explicam a ação do ômega sobre as células cancerígenas, sobre outras células na presença do tumor e, sobretudo, associado a quimioterápicos, considerando a variedade de situações que podem ser encontradas na prática clínica. O quadro 1 traz de forma resumida os achados do ômega 3 no câncer. Dessa forma, faz-se necessário conhecer os efeitos da suplementação do ômega no tratamento quimioterápico bem como em seus efeitos adversos.

Funções	Mecanismos	Autor e ano
---------	------------	-------------

<b>Indução apoptose e autofagia células neoplásicas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promoção da expressão de fatores pró-apoptóticos pelo acúmulo de ROS;</li> <li>• Promoção da autofagia pelo acúmulo de ROS;</li> <li>• Redução da expressão de oncogenes.</li> </ul>	Fukui, 2013(34) Corsetto, 2011(32) Manna, 2010(31)
<b>Redução anorexia e caquexia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inibição da liberação de citocinas inflamatórias pelo tumor.</li> </ul>	Laviano, 2013(37) Sánchez-Lara, 2014(41) Yeung, 2015(30) Argilés, 2014(42)
<b>Síntese de lipídeos de novo em tumor de mama</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Captação de acetil coA e produção de ácido palmítico.</li> </ul>	Omabe, 2014(18) Baenke, 2013(20) Hanahan, 2011(17)
<b>Presença de ácidos graxos saturados em células tumorais reduz peroxidação lipídica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento de receptores de ácidos graxos na membrana de tumores lipogênicos e maior resistência à peroxidação lipídica promovida pelo quimioterápico.</li> </ul>	Rysman, 2010(22)
<b>Presença de ácidos graxos saturados em células tumorais promove angiogênese</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síntese de eicosanoides de série par promove angiogênese;</li> <li>• Liberação de adipocinas.</li> </ul>	Omabe, 2014(18) Baenke, 2013(20)
<b>Redução da expressão de fatores BCL-2 e HER-2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulação da expressão gênica destes oncogenes.</li> </ul>	Menéndez, 2006(35) Corsetto, 2011(32)

**Quadro 1. Câncer e Utilização Lipídica**

Fonte: Elaborado pela Autora.

#### 2.1.4 Ômega 3 e Mucosite

O tratamento do câncer pode envolver diversas etapas, desde a cirurgia de retirada de tumor às terapias denominadas adjuvantes ou neoadjuvantes. As terapias neoadjuvantes são aquelas realizadas antes da remoção cirúrgica do tumor, como medidas profiláticas e que visam minimizar o tumor além de reduzirem a mortalidade das pacientes. As terapias adjuvantes são aquelas realizadas como complementares a uma outra etapa do tratamento, podendo ser concomitante à hormonioterapia ou subsequente à cirurgia<sup>(1)</sup>.

Muitos dos primeiros quimioterápicos descobertos na década de 70 ainda são amplamente prescritos na atualidade(57,58). O mecanismo de ação dos quimioterápicos ocorre pela inibição de processos biossintéticos ou pela incorporação no DNA e RNA, inibindo sua função normal de replicação. O 5-FU é uma fluoropirimidina que age pelas duas vias. Ele incorpora fluoronucleotídeos em RNA e DNA e atua, concomitantemente, na inibição da enzima timidilato sintase, responsável pela síntese de nucleotídeos(59). Este mecanismo de citotoxicidade celular afeta não apenas as células tumorais, mas também outras células de rápida replicação, levando a uma série de complicações, sendo mais graves as que ocorrem no trato gastrointestinal, como a mucosite(60).

A mucosite é a inflamação que afeta as células do epitélio gastrointestinal. Ela pode causar dor ao deglutir, disfagia e vômito — reduzindo a ingestão calórica destes pacientes — além da diarreia, interferindo diretamente no estado nutricional, qualidade de vida e na piora do prognóstico desses indivíduos(61). Em casos em que ela se manifesta de forma mais grave, pode ser necessário interromper o tratamento até que se observe melhora nestes pacientes, comprometendo a eficácia do tratamento<sup>(5)</sup>. Ao contrário do que se pensava, ela não é um simples processo de ulceração causado diretamente pelos agentes antineoplásicos, mas sim, decorrente de uma série de processos biológicos. Compreender as etapas deste processo é imprescindível para o desenvolvimento de novas terapias adjuvantes que atuem nestes pontos-chave<sup>(6)</sup>. Embora seja um processo dinâmico, de forma didática, ela é dividida em cinco fases: iniciação; regulação; geração de mensagem; amplificação e sinalização; ulceração e recuperação.

- Na fase de iniciação há o dano do DNA que ocorre devido à exposição das células à radiação ou quimioterapia. A geração de ROS ocorre concomitantemente à ativação de outras vias inflamatórias. Estes agentes ativam a esfingomielinase e a ceramida sintase, moléculas mediadoras de apoptose que resultam na morte de células da submucosa endotelial. Além disso há a destruição dos fibroblastos, células responsáveis pela regeneração da fibronectina e apoptose de outras células no tecido epitelial(62).
- Nas fases de regulação e geração de mensagem, alguns fatores de transcrição como o NFκ-B são ativados, regulando diversos genes no endotélio, fibroblastos,

macrófagos e epitélio, resultando na produção de moléculas e proteínas efetoras, capazes de enviar “mensagens” tais quais citocinas pró-inflamatórias e enzimas<sup>(4)</sup>.

- Na fase de amplificação e sinalização ocorre o aumento da injúria tecidual, como uma sucessão aos eventos biológicos prévios. O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), além de ser um agente inflamatório local, age como um ativador do fator NFk-B e da esfingomielinase. A presença desta citocina garante que a mucosite seja um processo contínuo<sup>(6)</sup>.
- Na fase de ulceração tecidual, em virtude da sinalização via NFk-B, a transcrição de genes que codificam as proteínas quinase ativada por mitogênio (MAPK), COX<sub>2</sub> e moléculas de sinalização tirosina-quinase levam à ativação das proteínas matriz metaloproteinase (MMPs) 1 e 3 nas células do epitélio e lâmina própria, resultando na injúria tecidual<sup>(4)</sup>. Tal destruição da barreira física da mucosa viabiliza a translocação bacteriana. São observados, nesta fase, a presença de granulocitopenia e há um maior risco de ocorrência de sepse e bacteremia (63). Por último, na fase de recuperação da mucosa, a regeneração celular se dá no prazo médio de 72 horas. Tal processo ocorre em decorrência do balanço de estímulo de moléculas pró e anti-apoptóticas. A matriz extracelular envia sinalização para as células epiteliais para que migrem, proliferem e se diferenciem, a fim de recuperar a estrutura da mucosa<sup>(6)</sup>.

Até o momento não há alternativa eficaz para prevenção e/ou tratamento da mucosite. O uso de agentes anti-inflamatórios é proposto por guias de condutas médicas como possibilidade no controle deste efeito adverso<sup>(9,14)</sup>. Em trabalho anterior avaliamos que o ômega 3 foi capaz de minimizar a mucosite intestinal. Esse efeito já foi avaliado por outros autores, no entanto, não há trabalhos que avaliem este efeito na presença de tumor<sup>(11,64,65)</sup>.

Os parâmetros que avaliam o efeito anti-inflamatório do ômega 3 em pacientes em quimioterapia vão desde maior tolerância ao tratamento à melhora na qualidade de vida, melhora de marcadores inflamatórios, redução na perda de peso, redução da toxicidade do quimioterápico e aumento da taxa de sobrevivência<sup>(41,64,66)</sup>.

Ensaio randomizados observaram redução dos níveis de Proteína C-Reativa (PCR), um marcador inflamatório utilizado para predizer o prognóstico do paciente.



Além disso, também foi observada redução na razão plaquetas/linfócitos, neutrófilos/linfócitos, e manutenção do número de neutrófilos(41). Outros autores demonstraram que o DHA pode minimizar a neuropatia induzida por quimioterápico, viabilizando a recuperação neuronal(67).

Todos estes efeitos foram associados à produção de tromboxanos A<sub>2</sub> e prostaglandinas E<sub>3</sub> e leucotrienos LTB<sub>5</sub>, que são capazes de minimizar a liberação de citocinas pró inflamatórias por meio da regulação da expressão do NF - κB, parâmetro avaliado nestes estudos. Outros fatores como o alívio de dor e minimização da toxicidade do quimioterápico foram associados às resolvinas e maresinas de série D, capazes de neutralizar a liberação de quimiocinas e bloquear a neurotransmissão da dor por mecanismos de resolução especializada do processo inflamatório, como citado anteriormente(66).

### **3. OBJETIVOS**

#### *3.1 Objetivo Geral*

Avaliar os efeitos da suplementação do ácido graxo ômega 3 em modelo de tumor de mama murino 4T1 e mucosite induzida por 5-fluouracil.

#### *3.2 Objetivos Específicos*

- Avaliar se a suplementação com ômega 3 interfere no consumo alimentar e na variação ponderal dos animais;

- Avaliar os efeitos da suplementação com ômega 3 na permeabilidade e histologia intestinal e nas junções firmes;
- Avaliar os efeitos da suplementação com ômega 3 nas citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e IL-10 no baço e linfonodos mesentéricos;
- Avaliar os efeitos da suplementação com ômega 3 no volume tumoral e na proliferação das células tumorais;
- Avaliar os efeitos da suplementação com ômega 3 na metástase nos órgãos fígado e pulmão;
- Avaliar os efeitos do ômega 3 na toxicidade hepática causada pelo quimioterápico.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c, pesando entre 20 e 25 gramas, com idade entre 6-7 semanas, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG). Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia (FAFAR) em gaiolas plásticas, com controle da iluminação (ciclo de luz claro/escuro de 12 horas), ventilação, aquecedor durante o inverno, e acesso, *ad libitum*, a água e a ração.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG), sob o protocolo n° 158/2018 (ANEXO I) e está em conformidade com o guia recomendado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para o cuidado e uso de animais de laboratório(68). Além disso, todas as normas determinadas pelo guia *Animal Research: Reporting In Vivo Experiments-ARRIVE*(69) de experimentação animal foram respeitadas.

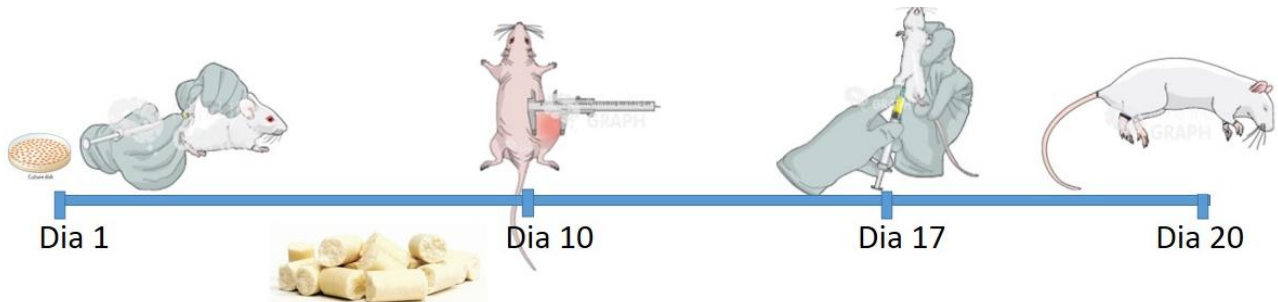
#### 4.1.1 Delineamento Experimental

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, com 5 animais cada:

- I. Grupo Controle – CTL:** Grupo controle; sem intervenção, alimentado com ração AIN-93G;
- II. Grupo Experimental – CTLTU:** Células tumorais 4T1 inoculadas, alimentado com ração AIN-93G;
- III. Grupo Experimental - TUW3:** Células tumorais 4T1 inoculadas, alimentado com ração AIN-93G suplementada com ômega 3;
- IV. Grupo Experimental TU5FU:** Células tumorais 4T1 inoculadas, mucosite induzida por 5-FU, alimentado com ração AIN-93G;
- V. Grupo Experimental TU5FUW3** Células tumorais 4T1 inoculadas, mucosite induzida por 5-FU, alimentado com ração AIN-93G suplementada com ômega 3.

Todos os animais foram mantidos em ambientação no biotério, com ração convencional e água *ad libitum*, por 7 dias, até a inoculação das células tumorais. Os animais dos grupos CTL TU, TUW3, TU5FU e TU5FUW3 receberam no flanco direito, injeção contendo células tumorais linhagem 4T1, conforme descrito no item 4.3 (D1). Durante os dias 1 a 10, todos os grupos experimentais receberam a ração denominada “Controle”, descrito no item 4.5. Após 10 dias (D10) da inoculação das células tumorais foi realizada a medição do tumor, em intervalos de 2 dias, com paquímetro, conforme descrito no item 4.3. Os animais dos grupos TUW3 e TU5FUW3 receberam a partir deste dia a ração denominada “Ômega 3”, descrito no item 4.5. Os demais animais permaneceram recebendo a ração “Controle” até o final do experimento. No décimo sétimo dia após a inoculação do tumor (D17), os animais dos grupos TU5FU e TU5FUW3 receberam injeção intraperitoneal de 5-Fluouracil para indução da

mucosite, conforme detalhado no item 4.4. Passados 03 dias da indução da mucosite (D20), todos os animais foram eutanasiados para coleta e análise de dados. Os procedimentos realizados neste dia estão apresentados no item 4.6. A representação esquemática do delineamento experimental consta na Figura 3.



**Figura 3. Representação esquemática do delineamento experimental do estudo.** Dia 1- Inoculação de células tumorais nos grupos correspondentes. Dia 10 – Início da medição dos tumores e tratamento com ração AIN 93-G ômega 3 nos grupos correspondentes. Dia 17- Indução de mucosite pelo quimioterápico 5-FU. Dia 20 – Eutanásia dos animais e coleta de dados.

**Fonte:** Elaborado pela Autora.

#### 4.2 Cultivo Células Tumorais 4T1

As células de tumor de mama murino 4T1 são células de tumor transplantável adquiridas da *Type Culture Collection* (ATCC) (Virgínia, EUA). Em nosso protocolo, elas foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) suplementado com soro fetal bovino a 10%, penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL, em câmara com 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade e 37°C. Após 3-5 dias de cultivo, as células foram tripsinizadas e a viabilidade celular avaliada após coloração com o corante azul de tripano, conforme modelo desenvolvido por Pulaski,2001(70).

#### 4.3 Inoculação e Desenvolvimento Tumoral

A concentração da suspensão das células 4T1 foi ajustada para 1 x10<sup>6</sup> células em alíquotas de 0,050mL. Em seguida, 0,050mL da suspensão foi inoculada no tecido subcutâneo do flanco direito dos animais dos grupos CTLTU, TUW3, TU5FU e TU5FUW3. Após 10 dias da inoculação, quando o tumor já se encontrava palpável, iniciou-se a medição deste com o auxílio de paquímetro marca Digimess® modelo 100.170. A medição ocorreu em intervalo de dois dias. O tempo total de inoculação

tumoral foi de 20 dias. Este protocolo foi validado em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa(71–73).

#### 4.4. Modelo de Mucosite Intestinal Induzida por 5-fluorouracil

O modelo de mucosite foi baseado no método já estabelecido em estudos anteriores do nosso grupo(11,74). Os animais dos grupos TU5FU e TU5FUW3 receberam, no 17º dia de tratamento, injeção intraperitoneal (IP) contendo 300 mg/Kg do fármaco 5-FU (Fauldfluor, Libbs®) para a indução da mucosite, enquanto os animais dos grupos CTL, CTL TU e TUW3 receberam o mesmo volume de solução salina (NaCl 99%). Após 72h da indução da mucosite os animais foram eutanasiados.

#### 4.5 Preparo da Ração

A ração foi desenvolvida conforme receita já padronizada em nosso grupo de pesquisa<sup>(11)</sup>. A ração controle foi preparada baseada na dieta *American Institute of Nutrition* AIN-93G(75). Já, para a ração ômega 3, utilizou-se a mesma composição da AIN-93G, exceto para os lipídeos, em que foi feita a substituição de 50% do óleo de soja por óleo de peixe. O óleo de peixe utilizado foi o da marca *Finest Nutrition*® contendo 900mg de ômega 3 por cápsula, sendo 647mg de EPA e 253mg de DHA. A descrição dos ingredientes utilizados na confecção das rações encontra-se na Tabela 1.

<b>Componentes da ração</b>	<b>Controle (g/Kg)</b>	<b>Ômega 3 (g/Kg)</b>
<b>Tert-butilhidroquinona (BHT)</b>	0,014g	0,014g
<b>Óleo de soja</b>	70g	35g
<b>Óleo de peixe (ômega 3)</b>	---	35g
<b>Bitartarato de colina</b>	2,5g	2,5g
<b>Sacarose</b>	100g	100g
<b>Cistina</b>	3g	3g
<b>Mistura de vitaminas</b>	10g	10g
<b>Mistura de minerais</b>	35g	35g

<b>Celulose</b>	50g	50g
<b>Maltodextrina</b>	132g	132g
<b>Caseína</b>	200g	200g
<b>Amido de milho</b>	397,5g	397,5g
<b>Água</b>	200ml	200ml

**Tabela 1. Ingredientes utilizados na manufatura da ração ofertada aos animais.**

Fonte: Adaptado de Generoso, *et al*, 2015<sup>(11)</sup>.

A composição lipídica das rações foi avaliada por cromatografia gasosa em estudo prévio<sup>(11)</sup>, e está descrita na Tabela 2. As dietas ofertadas foram consideradas isocalóricas.

<b>Teor lipídico</b>	<b>Ração controle</b>	<b>Ração ômega 3</b>
<b>Ácidos Graxos Totais</b>	97,91%	78,66%
<b>Ácidos Graxos Saturados</b>	15,69%	8,68%
<b>Ácidos Graxos poli-insaturados</b>	55,99%	54,40%
<b>Ômega 3</b>	4,14%	24,61%
<b>EPA</b>	0,00%	15,28%
<b>DHA</b>	0,00%	7,00%
<b>Ômega 6</b>	50,52%	26,54%

**Tabela 2. Composição dos ácidos graxos nas dietas ofertadas.**

Fonte: Adaptado de Generoso, *et al*, 2015<sup>(11)</sup>.

#### 4.6 Eutanásia

No dia da eutanásia os animais foram transferidos do biotério para a sala de experimentação animal e anestesiados intraperitonealmente com 0,0150mL de

solução contendo 0,2mL de Cetamina (Dopalen®) e 0,2mL Xilazina (Dopaser®) e 1,2 mL de Solução Salina (NaCl 2%) em cada animal.

Posteriormente, o sangue dos animais foi retirado da veia axilar com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, armazenado em tubos contendo 0,50mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Em seguida foram retirados tumor, pulmões, fígado, baço, intestino e linfonodos mesentéricos para análise.

## **4.7 Coleta de dados e análises realizadas**

### *4.7.1 Avaliação da Variação Ponderal e Consumo dos Animais*

O consumo alimentar foi avaliado por meio da diferença entre o peso da ração ofertada e a sobra, sendo considerados também os restos que estavam no interior da gaiola. As sobras da ração foram desprezadas diariamente. Utilizou-se a média de consumo do grupo (caixa com 5 animais) por dia e foram analisados os dados de consumo referente aos dias 1, 10, 17 e 20. Os animais e a ração foram pesados diariamente em balança semi-analítica *Shimadzu*® modelo BL3200H, sempre no mesmo horário.

Para definição do peso dos animais foram utilizados os valores calculados com base na variação ponderal em relação ao D1, considerando o peso deste dia igual a 1(100%). Foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\{[\text{Peso(g) D10 X 100}] / [\text{Peso (g) D1}]-100\} = \% \text{ variação ponderal dia 10}$$

$$\{[\text{Peso(g) D17 X 100}] / [\text{Peso (g) D1}]-100\} = \% \text{ variação ponderal dia 17}$$

$$\{[\text{Peso(g) D20 X 100}] / [\text{Peso (g) D1}]-100\} = \% \text{ variação ponderal dia 20}$$

#### 4.7.2 Determinação da Permeabilidade Intestinal (PI)

A permeabilidade intestinal foi determinada pela medida da radioatividade no sangue dos animais, após a administração oral do fármaco ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcado com Tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ). No 20º dia, alíquotas de 0,1 mL contendo 18,5 MBq de solução de DTPA marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  foram administradas, por gavagem, em todos os animais. Após 4 horas da administração, com os camundongos já anestesiados, 0,050 mL de sangue foram coletados por punção axilar para determinação da radioatividade(11,76).

O sangue foi contado no contador de radiação gama *Perkin Elmer Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter (Perkin Elmer Inc., Waltham, EUA)*. Os dados foram expressos em dose %, utilizando a seguinte equação(76):

$$\% \text{ dose no sangue} = [(\text{cpm do sangue X 100}) / \text{cpm da dose administrada}]$$

\* cpm = contagem por minuto.

#### 4.7.3 Avaliação da Mucosite: Análises Histopatológicas e Morfométricas

##### 4.7.3.1 Histopatologia

Após a eutanásia, o segmento intestinal correspondente ao íleo distal foi isolado, estendido com a camada serosa em contato com o papel de filtro e aberto longitudinalmente pela borda antimesentérica e o conteúdo luminal removido. Subsequentemente, o tecido foi lavado com PBS (tampão fosfato salina) até a remoção completa de fluidos. Em seguida foi enrolado, fixado em formol, tamponado a 4% em período mínimo de 24 horas. Os fragmentos foram encaminhados ao laboratório de patologia comparada (LPC, ICB-UFMG), incluídos em blocos de parafinas, cortados em secções de 4µm e, posteriormente, corados por Hematoxilina e Eosina (HE). As imagens fotográficas das lâminas foram realizadas em microscópio *Olympus® BX51* acoplado à câmera digital por meio do programa *SPOT Advanced®(77)*.



#### 4.7.3.2 Avaliação do Escore Histológico

As lâminas microscópicas processadas e coradas em HE foram avaliadas pelo patologista Prof. Dr. Geovanni Cassali Dantas (LPC-ICB,UFMG), a fim de classificar lesões da mucosa sendo avaliadas de acordo com o escore apresentado na Tabela 3, procedimento padronizado em nosso laboratório(78):

Grau Mucosite	Características Histológicas
<b>0</b>	Achados histológicos normais.
<b>1</b>	<b>Mucosa:</b> vilos encurtados, perda da arquitetura das criptas, infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. <b>Camada Muscular:</b> normal
<b>2</b>	<b>Mucosa:</b> vilos encurtados, necrose das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. <b>Camada Muscular:</b> normal
<b>3</b>	<b>Mucosa:</b> vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema. <b>Camada Muscular:</b> edema, vacuolização e infiltrado neutrófilos

**Tabela 3. Escores Histológicos- Graus Mucosite.**

**Fonte:** Adaptado de Soares, 2008(78).

#### 4.7.3.3 Determinação da Altura das Vilosidades e Profundidade das Criptas

A altura das vilosidades e profundidade das criptas foi mensurado da sua base ao seu ápice e os dados expressos em micrômetros utilizando programa ImageJ® (versão 1.47f, Wayne Rasband/National Institutes of Health, 5). Foram capturadas 10 imagens de cada lâmina na objetiva de 10X e avaliados um vilos e uma cripta de cada imagem, a fim de randomizar a análise(79). A partir destas medidas foram elaborados gráficos avaliando tais dados, além da razão vilosidade/cripta.

#### 4.7.3.4 Avaliação do Tamanho do Intestino

Imediatamente após a remoção do intestino dos animais foram obtidas as medidas de sua extensão em centímetros (cm), desde o duodeno ao íleo, a fim de

avaliar o encurtamento do intestino observado em modelo de mucosite outras inflamações intestinais(80).

#### 4.7.4 Avaliação das Proteínas de Junção pelo Método Real Time (qPCR)

As proteínas de junção zona ocludente-1 (ZO-1) e ocludina foram avaliadas através do método de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-PCR). O RNA total foi extraído de fragmentos do íleo utilizando o reagente Trizol®. A sequência de primers utilizados foi a seguinte: ZO-1- 5'CCAGCTTATGA AG GTTGTTTC3' e 5'TCCTCTCTTGCCAACTTTTCTC3', Ocludina- 5'ATGTCC GGCCGA TGCTCTC3' e 5'TTTGCTGCTCTTGGGTCTGT AT3'.

As análises foram padronizadas de acordo com a expressão de RNA mensageiro (mRNA) para o gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os valores foram expressos como a quantidade de gene amplificado em comparação ao grupo controle ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Os dados de PCR foram avaliados no programa StepOne® Software v2.2.2 (Applied Biosystems, CA, USA)(81).

#### 4.7.5 Avaliação do Volume Tumoral

As medidas do tamanho do tumor foram realizadas a partir do dia 10, a cada dois dias. O volume do tumor foi determinado pela medida do menor diâmetro e do maior diâmetro tumoral, que representam, respectivamente,  $d_1$  e  $d_2$ . As medidas foram realizadas com o auxílio de um paquímetro (Digimess®, modelo 100.170). O volume tumoral foi calculado utilizando a fórmula elipsoidal adaptada(82):

$$V = (d_1)^2 \times d_2 \times 0,5$$

Considerando a variabilidade da taxa de crescimento entre tumores de um mesmo grupo, no gráfico de Volume Tumoral (Figura 11), apresentamos o percentual (%) de crescimento do tumor do dia de medida em relação ao primeiro dia de medidas (D10), conforme a fórmula descrita abaixo:

$$\% \text{ crescimento tumoral DX: } [(DX*100)/D10]$$

No final do período experimental (D20), o volume relativo do tumor (VRT) em relação ao dia do início da medição (D10) foi mensurado a partir da seguinte equação(72):

$$VRT = \text{volume tumoral em D20} / \text{volume tumoral em D10}$$

A porcentagem de inibição do crescimento do tumor (IC) foi determinada mediante o emprego das seguintes fórmulas(72):

$$IC = [100 - (VRT \text{ grupo TUW3} / VRT \text{ do grupo CTLTU}) \times 100]$$

$$IC = [100 - (VRT \text{ grupo TU5FU} / VRT \text{ do grupo CTLTU}) \times 100]$$

$$IC = [100 - (VRT \text{ grupo TU5FUW3} / VRT \text{ do grupo CTLTU}) \times 100]$$

#### *4.7.6 Avaliação das Vias de Proliferação Celular – Imuno-histoquímica*

A análise imuno-histoquímica foi realizada em fragmentos tumorais com a finalidade de avaliar as vias de proliferação celular pelo marcador CDC47, anticorpo clone 47DC141, Neomarkers®, 1/ 300. Controles negativos foram utilizados em paralelos sem a utilização de anticorpos. A incubação com o anticorpo primário teve duração de 60 minutos e a atividade de peroxidase foi avaliada utilizando-se de diaminobenzidina (DAB- Dako®). O índice para expressão do marcador CDC47 foi obtido por meio da estimativa de porcentagem de células positivas por campo, utilizando-se de 2 campos para cada animal, em fotografias capturadas na objetiva de 10X(76).

#### *4.7.7 Avaliação de Metástases Pulmonares*

Os pulmões foram fixados em formol tamponado e, posteriormente, clivados de forma padronizada com os cortes feitos sempre nos mesmos lobos dos órgãos. Os fragmentos foram encaminhados ao laboratório de patologia comparada (LPC, ICB-UFMG), incluídos em blocos de parafinas, cortados em secções de 4µm e, posteriormente, corados por HE e avaliados pelo patologista Prof. Dr. Geovanni Cassali Dantas. Foram contados os focos metastáticos por fragmento(83).

#### *4.7.8 Avaliação da Hepatotoxicidade e Metástases Hepáticas*

Os fragmentos hepáticos foram fixados em formol tamponado e, posteriormente, clivados de forma padronizada com os cortes feitos sempre nos mesmos lobos dos órgãos. Os fragmentos foram encaminhados ao laboratório de

patologia comparada (LPC, ICB-UFMG), incluídos em blocos de parafinas, cortados em secções de 4µm e, posteriormente, corados por HE e avaliados pelo patologista Prof. Dr. Geovanni Cassali Dantas. Para caracterização da toxicidade hepática foram avaliadas características dos hepatócitos, tais como: vacuolização, presença de áreas metastáticas, grau de degeneração, presença de esteatose ou necrose hepáticas e presença de infiltrado inflamatório, de acordo com parâmetros esperados para este modelo tumoral associado ao uso de quimioterápico(71,72,84).

#### 4.7.9 Dosagem de Citocinas

Para avaliar a concentração das citocinas (IL-1β, TNF-α e IL-10), amostras de baço e linfonodos mesentéricos, previamente armazenados a -80°C, foram homogenizados com solução de extração de citocinas na proporção de 1 mL de solução para 100 mg de tecido, utilizando-se homogenizador de tecidos (Ultra- 25 Turrax, IKA® T10 basic). Em seguida, este homogenato foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 12.000 x rpm e o sobrenadante imediatamente coletado e armazenado a -80°C para posterior dosagem. A quantificação de citocinas foi realizada pelo método de ELISA sanduíche. Foi realizada diluição da amostra em 1:4 para as citocinas IL1-β e TNF-α e de 1:3 para a citocina IL-10(85). Os kits para as dosagens foram obtidos da R&D Systems® (DuoSet). Para a realização dos ensaios foram seguidas as instruções do fabricante. Os dados foram expressos em concentração pg/mL.

#### 4.7.10 Análise Estatística

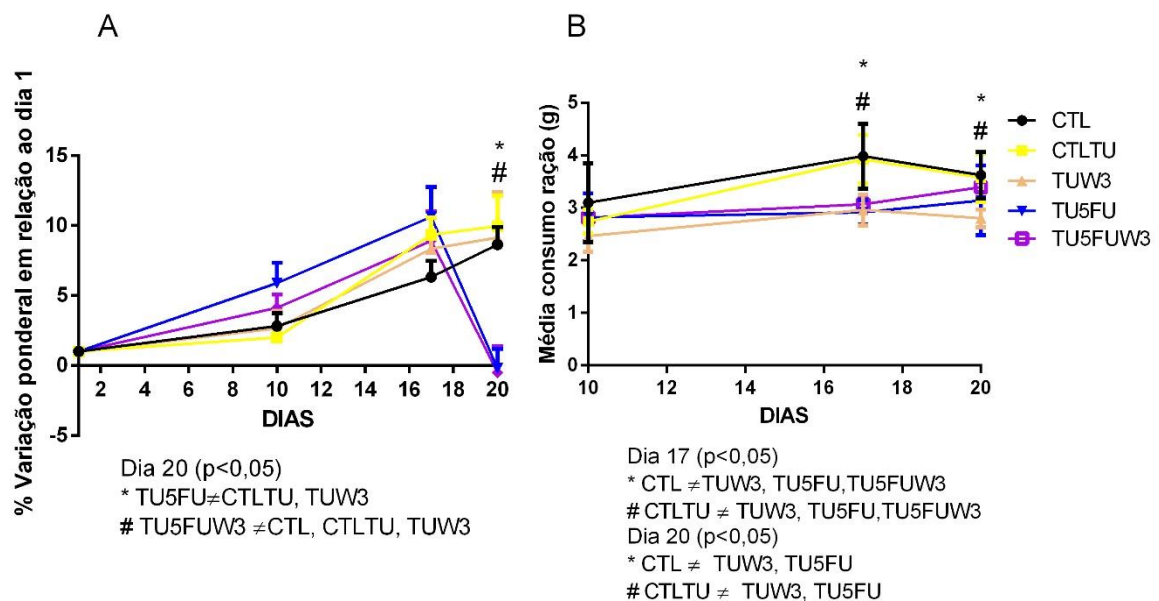
Os dados foram analisados no programa *GraphPad Prism® Version 6.01*. Os dados de consumo alimentar e grau de mucosite foram considerados como não-paramétricos, segundo o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Para estes foi utilizado o teste *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*. Para os demais dados, considerados paramétricos, segundo o teste de *Kolmogorov-Smirnov*, foi utilizado o pós-teste de *Neuman-Keuls* para análise ANOVA/One way de múltiplas comparações. Nos parâmetros Junções Firmes ZO-1 e análise da metástase pulmonar foi utilizado Teste T não pareado entre os grupos, em virtude do baixo tamanho da amostra. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores iguais a  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Variação Ponderal e Consumo Alimentar

Todos os animais apresentaram ganho de peso similar até o dia 17, data da indução da mucosite, sem diferença estatística entre os grupos ( $p>0,05$ ). Como é possível observar no gráfico, os animais dos grupos CTLTU, TUW3, TU5FU e TU5FUW3 apresentaram ganho de peso superior ao do grupo controle. Esse fato deve-se ao crescimento do tumor, que representava cerca de 5-10% do peso total destes animais (dados não apresentados). Após 72 horas da indução da mucosite, no dia 20, os animais do grupo TU5FU apresentaram redução significativa do peso ( $p<0,05$ ) em relação ao grupo CTLTU e TUW3. O grupo TU5FUW3 apresentou redução significativa do peso ( $p<0,05$ ) em relação aos grupos CTL, CTLTU e TUW3, sem diferença para o grupo TU5FU ( $p>0,05$ ) (Figura 4A).

No que diz respeito ao consumo alimentar (Figura 4B), no dia 17 os animais dos grupos TUW3, TU5FU e TU5FUW3 apresentaram redução significativa no consumo de ração ( $p<0,05$ ), quando comparados aos animais dos grupos CTL e CTLTU. Já no dia 20, apenas os animais dos grupos TUW3 e TU5FU apresentaram redução significativa no consumo de ração ( $p<0,05$ ) quando comparados aos animais dos grupos CTL e CTLTU.

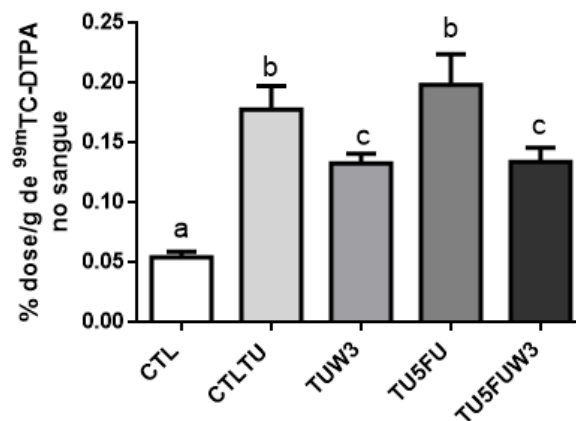


**Figura 4. (A) % de Variação ponderal dos animais em relação ao dia 1 (100%) nos dias 1, 10, 17 e 20. (B) Média de Consumo de Ração (g) nos dias 1, 10, 17 e 20. (n=10)** 3A: Dados expressos em média  $\pm$  SEM (ANOVA *One-Way* e pós-teste *Neuman-Keuls* para múltiplas comparações). 3B: Dados expressos em mediana. (*Kuskal-Wallis* pós-teste *Dunn* para múltiplas comparações). (A) O símbolo \* representa a diferença entre os grupos TU5FU e os grupos CTLTU e TUW3, o símbolo # a diferença entre os grupos TU5FUW3 e CTL, CTLTU e TUW3, no dia 20. (B) O símbolo \* representa a diferença

entre os grupos CTL e TUW3, TU5FU e TU5FUW3 e o símbolo # entre os grupos CTLTU e TUW3, TU5FU e TU5FUW3 no dia 17, no dia 20, \* CTL e TUW3 e TU5FU e # entre os grupos CTLTU TUW3 e TU5FU. Grupos: CTL- Controle, CTLTU- Controle Tumor, TUW3 – Tumor + ração ômega 3, TU5FU – Tumor + 5-FU, TU5FUW3 – Tumor+5FU+ ração ômega 3.

## 5.2 Permeabilidade Intestinal (PI)

A permeabilidade intestinal foi avaliada no 20° dia do experimento, 72 horas após a indução da mucosite (Figura 5). Estes dados mostraram que o grupo CTLTU apresentou maior PI quando comparado ao grupo CTL ( $p < 0,05$ ). Quando comparado com o controle, o grupo TU5FU também apresentou maior PI ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, observando os resultados dos grupos TUW3 e TU5FUW3, percebemos que o ômega 3 foi capaz de reverter parcialmente este aumento da PI provocado pelo tumor e pelo quimioterápico ( $p > 0,05$ ).

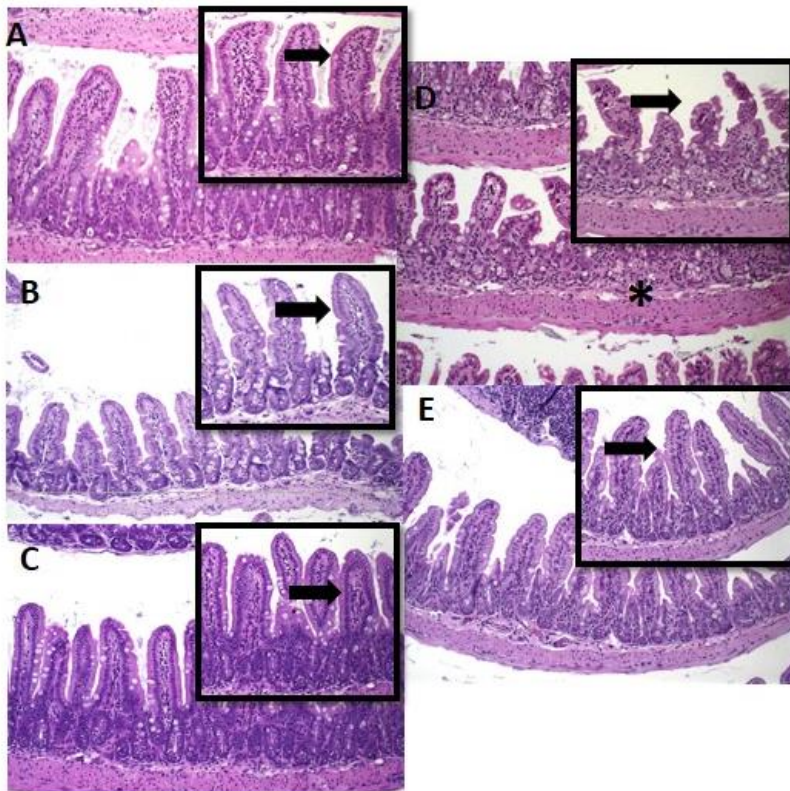


**Figura 5. Permeabilidade intestinal 72 horas após a indução da mucosite.**

Dados expressos em média  $\pm$  SEM (n=10). Letras diferentes indicam que há diferença estatística ( $p < 0,05$ ; ANOVA *One-Way* e pós-teste *Neuman-Keuls* para múltiplas comparações). Grupos: CTL- Controle, CTLTU- Controle Tumor, TUW3 – Tumor + ração ômega 3, TU5FU – Tumor + 5-FU, TU5FUW3 – Tumor+5FU+ ração ômega 3.

## 5.3 Avaliação da Mucosite: Análises Histopatológicas e Morfométricas

A figura 6 mostra a histologia do íleo nos diferentes grupos. Observa-se que não houve alteração nos aspectos morfológicos dos animais no grupo CTLTU comparado ao grupo CTL, (Figuras 6A, 6B respectivamente). Entretanto, o grupo TU5FU (Figura 6D) apresentou encurtamento das vilosidades, discreto infiltrado de células inflamatórias na camada basal, células achatadas e vacuolizadas quando comparado com o grupo controle. Já, os animais do grupo TU5FUW3 (Figura 6E), por sua vez, apresentaram melhora na arquitetura dos vilos, além da ausência de infiltrado inflamatório e de células vacuolizadas.

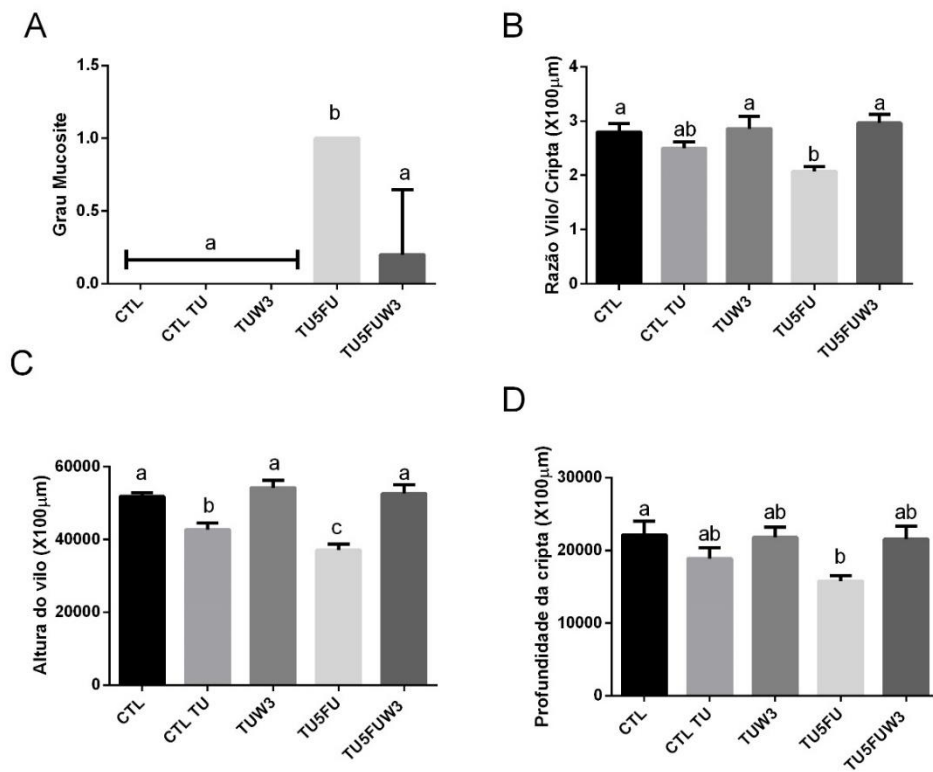


**Figura 6. Análise Histológica do íleo.** Aspectos normais para os grupos CTL (A), CTLTU(B), TUW3(C) E TU5FUW3 (E). As setas representam a altura das vilosidades, que se encontram encurtadas no grupo TU5FU (D), a estrela representa o infiltrado de células inflamatórias na camada basal. Coloração HE, aumento 10x. Grupos: CTL- Controle, CTLTU- Controle Tumor, TUW3 – Tumor + ração ômega 3, TU5FU – Tumor + 5-FU, TU5FUW3 – Tumor+5FU+ ração ômega 3.

A classificação de acordo com o escore histológico de Soares (Figura 7A) demonstrou que o grupo CTLTU apresentou o mesmo escore (pontuação zero) quando comparado ao grupo controle, indicando aspectos morfológicos normais. O grupo TU5FU apresentou escore 1, com presença de infiltrado de células inflamatórias na camada basal do epitélio e redução da altura dos vilos (Figura 7A). Por outro lado, os grupos TUW3 e TU5FUW3 apresentaram redução no escore ( $p < 0,05$ ), indicando que o ômega 3 foi capaz de atenuar os efeitos causados pelo 5-FU no intestino.

As análises morfométricas dos parâmetros razão vilo/cripta (Figura 7B), altura do vilo (Figura 7C) e profundidade das criptas (Figura 7D) confirmaram esses achados. O grupo CTLTU apresentou redução apenas no parâmetro altura do vilo ( $p < 0,05$ ), sem diferença estatística nos parâmetros razão vilo/cripta e profundidade da cripta ( $p > 0,05$ ). Já o grupo TU5FU apresentou redução significativa em todos estes parâmetros quando comparado ao grupo CTL ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, os grupos

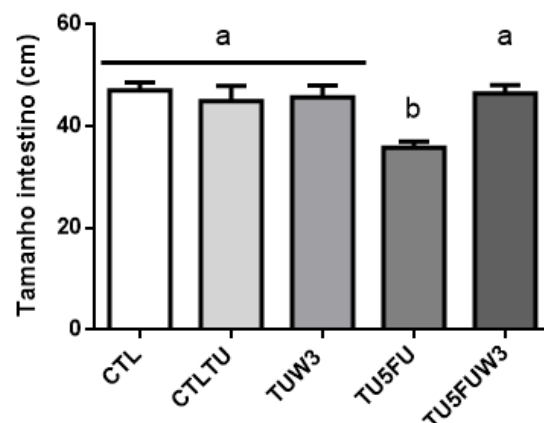
TUW3 e TU5FUW3 apresentaram recuperação nestes parâmetros ( $p < 0,05$ ), confirmando os achados anteriores.



**Figura 7. (A) Escore de Mucosite. (B) Razão Vilo / Cripta ( $\mu\text{m}$ ). (C) Altura do Vilo ( $\mu\text{m}$ ). (D) Profundidade da Cripta ( $\mu\text{m}$ ).** Dados expressos em média  $\pm$  SEM ( $n=10$ ). Letras diferentes indicam que há diferença estatística. 6A: (*Kruskal-Wallis* e pós-teste *Dunn* para múltiplas comparações). 7B, 7C e 7D: (*ANOVA One-Way* e pós-teste *Neuman-Keuls* para múltiplas comparações). Grupos: CTL- Controle, CTLTU- Controle Tumor, TUW3 – Tumor + ração ômega 3, TU5FU – Tumor + 5-FU, TU5FUW3 – Tumor+5FU+ ração ômega 3.

### 5.3.1 Tamanho do Intestino

O tamanho do intestino apresentou redução significativa ( $p < 0,05$ ) apenas no grupo TU5FU (Figura 8). Os demais grupos não apresentaram diferença estatística quando à medida total do intestino.



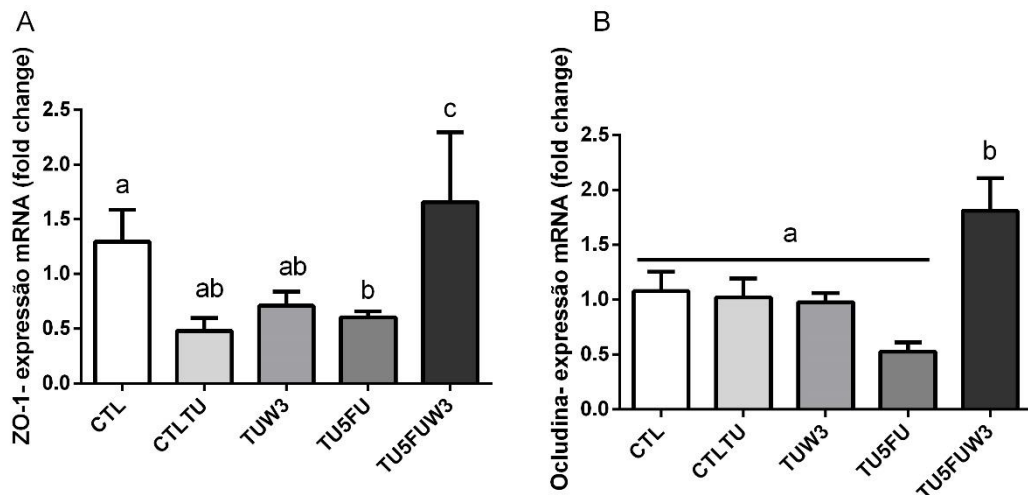


**Figura 8. Tamanho do intestino dos animais em centímetros.** Dados expressos em média±SEM (n=10). As letras diferentes representam diferença estatística (ANOVA One-Way e pós-teste *Neuman-Keuls* para múltiplas comparações).

Grupos: CTL- Controle, CTLTU- Controle Tumor, TUW3 – Tumor + ração ômega 3, TU5FU – Tumor + 5-FU, TU5FUW3 – Tumor+5FU+ ração ômega 3.

#### 5.4 Avaliação das Proteínas de Junção pelo Método real time(qPCR)

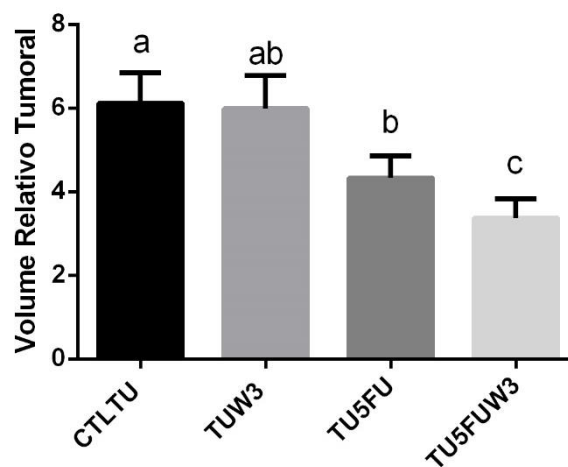
A análise da expressão de mRNA da proteína de junção ZO-1 (Figura 9A) mostrou que, quando comparada ao grupo CTL, os grupos CTLTU e TUW3 não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ). Já o grupo TU5FU apresentou expressão reduzida desta proteína de junção ( $p<0,05$ ). O grupo TU5FUW3 apresentou aumento significativo em relação aos demais grupos ( $p<0,05$ ). Já na análise de expressão de mRNA da proteína de junção ocludina (Figura 9B), os grupos CTL, CTLTU, TUW3 e TU5FU não apresentaram diferença estatística ( $p>0,05$ ), enquanto o grupo TU5FUW3 teve a expressão aumentada ( $p<0,05$ ).



**Figura 9. Análise de junções firmes: ZO-1 (A) e Occludina (B).** Dados expressos em média ± SEM (n=6). Letras diferentes indicam que há diferença estatística. A: (ZO-1 teste T não pareado, B: (ANOVA One-Way e pós-teste *Neuman-Keuls* para múltiplas comparações). Grupos: CTL- Controle, CTLTU- Controle Tumor, TUW3 – Tumor + ração ômega 3, TU5FU – Tumor + 5-FU, TU5FUW3 – Tumor+5FU+ ração ômega 3.

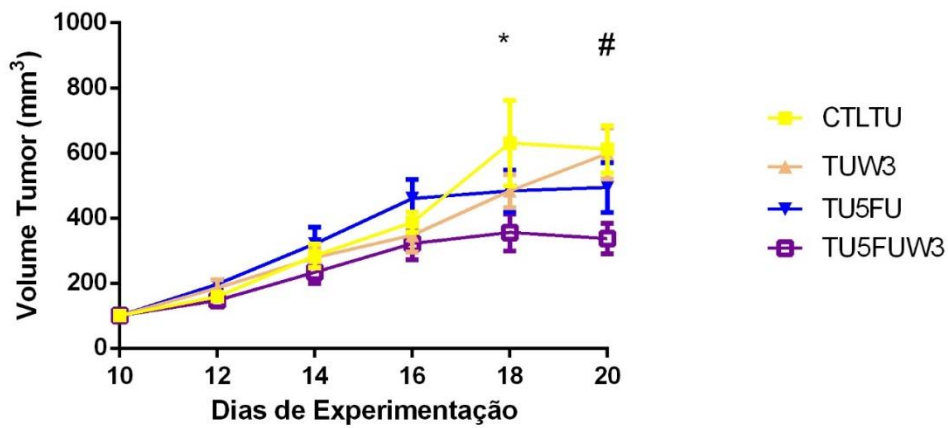
### 5.5 Avaliação do Volume Relativo Tumoral

O grupo TU5FU apresentou redução significativa do volume relativo tumoral quando comparado ao grupo CTLTU ( $p < 0,05$ ). O grupo TUW3 não apresentou diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Entretanto, o grupo TU5FUW3 apresentou importante redução no volume tumoral ( $p < 0,05$ ). O cálculo do percentual de inibição de crescimento realizado a partir do VRT demonstrou que os animais do grupo TUW3 apresentaram porcentagem de inibição de 2,12%, enquanto o grupo TU5FU foi de 19,23% e o maior percentual encontrado foi do grupo TU5FUW3, representado por 38,12%.



**Figura 10. Volume relativo tumoral –VRT – Diferença de volume calculada entre os dias 10 e 20.** Dados expressos em média  $\pm$  SEM (n=10). Letras diferentes indicam que há diferença estatística. (ANOVA *One-Way* e pós-teste *Tukey* para múltiplas comparações). Grupos: CTL- Controle, CTLTU- Controle Tumor, TUW3 – Tumor + ração ômega 3, TU5FU – Tumor + 5-FU, TU5FUW3 – Tumor+5FU+ ração ômega 3.

No dia 18, imediatamente após a indução da mucosite, apenas o grupo TU5FUW3 apresentou redução significativa do volume tumoral ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CTLTU. Já no dia 20, este mesmo grupo apresentou redução significativa quando comparado aos grupos CTLTU e TUW3 (Figura 11).

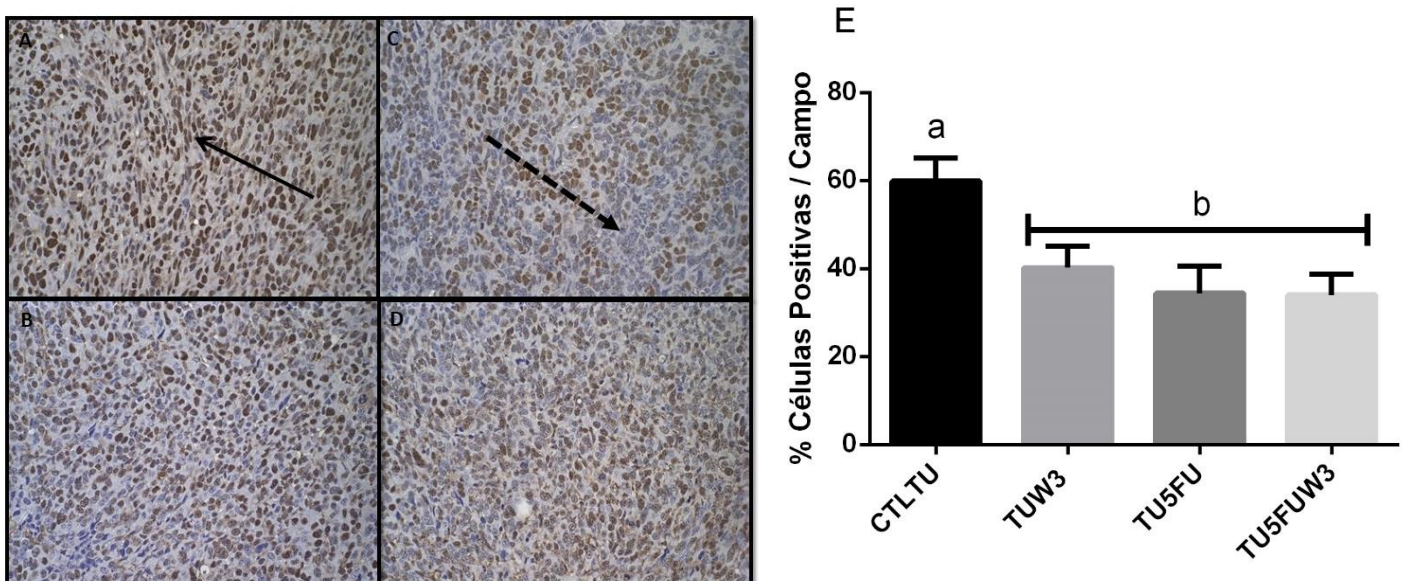


\*DIA 18  
 CTLTU  $\neq$  TU5FUW3  
 # DIA 20  
 CTL TU  $\neq$  TU5FUW3  
 TUW3  $\neq$  TU5FUW3

**Figura 11. Volume tumoral dias 10,12,14,16,18 e 20.** Dados expressos em média  $\pm$  SEM (n=10). Diferença representada por \* nos dias 18 e 20. ( $p < 0,05$ ; ANOVA *One-Way* e pós-teste *Neuman-Keuls* para múltiplas comparações). Grupos: CTL- Controle, CTLTU- Controle Tumor, TUW3 – Tumor + ração ômega 3, TU5FU – Tumor + 5-FU, TU5FUW3 – Tumor+5FU+ ração ômega 3.

### 5.6 Avaliação das Vias de Proliferação Celular Imuno-histoquímica

A avaliação de proliferação celular pelo marcador CDC47 mostrou que os grupos TUW3; TU5FU e TU5FUW3 apresentaram % de células positivas significativamente menor do que o grupo CTLTU ( $p < 0,05$ .) As imagens das figuras 12A, B, C e D são representativas da análise realizada.

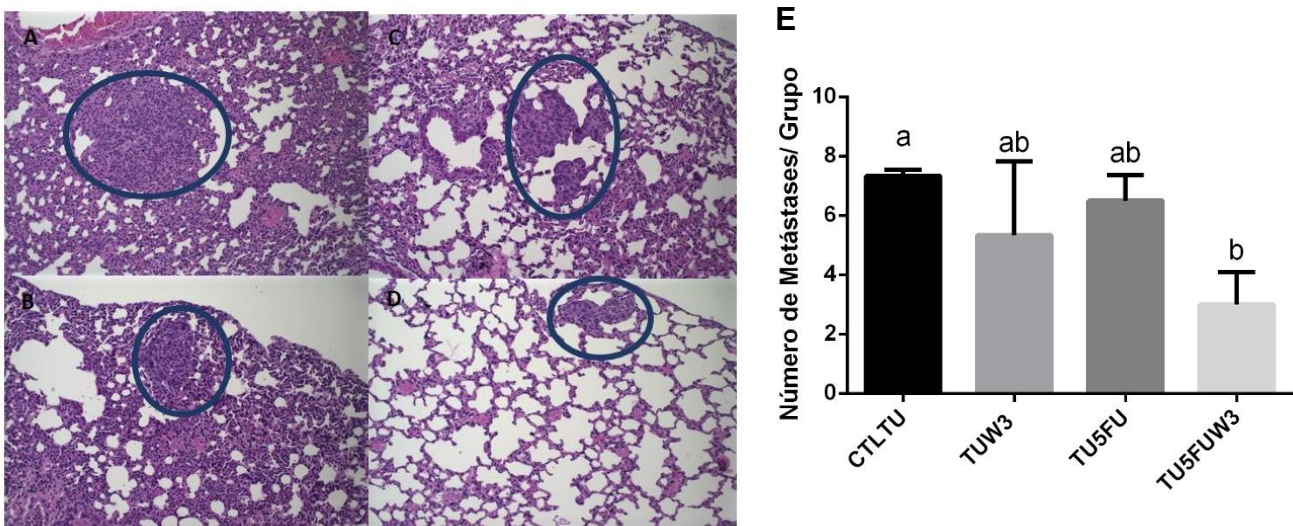


**Figura 12. Imuno-histoquímica: Marcador de proliferação celular CDC47.** Imagens (A) Grupo CTLTU, (B) Grupo TUW3, (C) grupo TU5FU e (D) grupo TU5FUW3. Coloração Hematoxilina de Harris- Células positivas coradas em marrom, representadas pela seta contínua e negativas apontadas

pela seta pontilhada,. Aumento 10X. 11E: % Células positivas por campo. Dados expressos em média  $\pm$  SEM (n=10). Letras diferentes indicam que há diferença estatística. ( $p < 0,05$ ; ANOVA *One-Way* e pós-teste *Neuman-Keuls* para múltiplas comparações). Grupos: CTL- Controle, CTLTU- Controle Tumor, TUW3 – Tumor + ração ômega 3, TU5FU – Tumor + 5-FU, TU5FUW3 – Tumor+5FU+ ração ômega 3.

### 5.7 Avaliação de Metástases Pulmonares

A contagem de metástases nos fragmentos do pulmão demonstrou que o grupo TU5FU não apresentou diferença estatística quando comparado aos demais grupos ( $p > 0,05$ ), assim como o grupo TUW3. No entanto, no grupo TU5FUW3 notamos redução significativa em relação ao grupo CTLTU ( $p < 0,05$ ) (Figura 13E). As imagens das figuras 13 A, B, C e D são representativas da análise realizada.

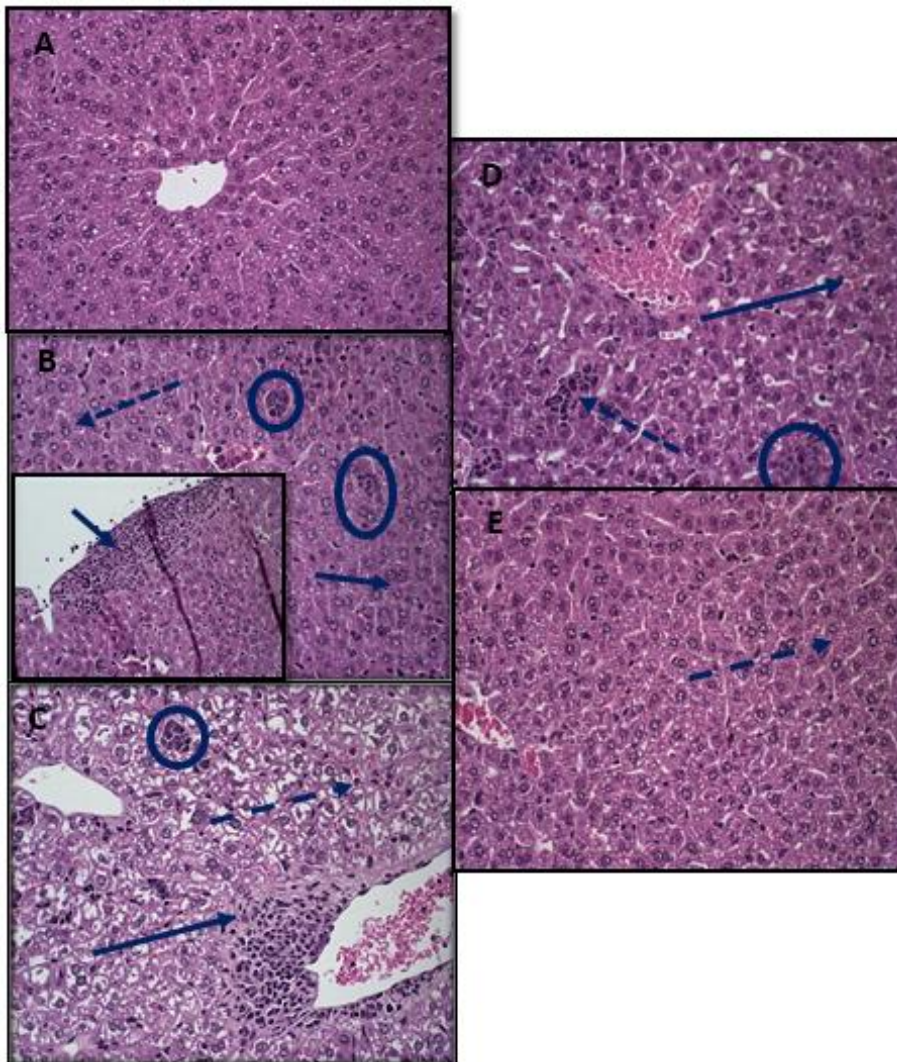


**Figura 13. Fotomicrografias do pulmão. (A) Grupo CTLTU, (B) Grupo TUW3, (C) grupo TU5FU e (D) grupo TU5FUW3. Coloração HE Aumento 10X. 12A, B, C e D: Áreas de metástase demarcadas por círculos. 12E: Número de metástases/grupo. Dados expressos em média  $\pm$  SEM (n=6). Letras diferentes indicam que há diferença estatística. (Teste t não pareado). Grupos: CTL- Controle, CTLTU- Controle Tumor, TUW3 – Tumor + ração ômega 3, TU5FU – Tumor + 5-FU, TU5FUW3 – Tumor+5FU+ ração ômega 3.**

### 5.8 Avaliação da Hepatotoxicidade e Metástases Hepáticas

Na análise das lâminas dos fragmentos hepáticos observou-se que o tecido hepático dos animais controle (Figura 14A) apresentaram células poligonais normais com núcleos redondos proeminentes e citoplasma eosinofílico. No grupo CTLTU (Figura 14B) observamos presença de aglomerados de células neoplásicas, presença de células inflamatórias na borda hepática e degeneração moderada de caráter

reversível, caracterizada por células arredondadas. O grupo TU5FU (Figura 14D) apresentou presença de intenso infiltrado inflamatório e degeneração difusa em várias áreas, com baixa contagem de células neoplásicas. As células do grupo TUW3 (Figura 14C) apresentaram maior grau de degeneração, com células vacuolizadas em degeneração hidrópica, anterior à esteatose hepática, com infiltrado inflamatório periportal característico de baixas doses de quimioterápico, sendo considerado de caráter leve. Os animais do grupo TU5FUW3 (Figura 13E) apresentaram baixa contagem de células neoplásicas e degeneração leve, sem presença de infiltrado inflamatório(84,86,87).



**Figura 14 – Fotomicrografias Hepáticas: (A): Grupo CTL, (B) Grupo CTLTU, (C) Grupo TUW3, (D) Grupo TU5FU e (E) Grupo TU5FUW3.** Os círculos indicam presença de células neoplásicas, as setas pontilhadas indicam áreas de degeneração hepática e as setas contínuas, presença infiltrado de células inflamatórias. Coloração HE Aumento 40X. Grupos: CTL- Controle, CTLTU- Controle Tumor, TUW3 – Tumor + ração ômega 3, TU5FU – Tumor + 5-FU, TU5FUW3 – Tumor+5FU+ ração ômega 3.

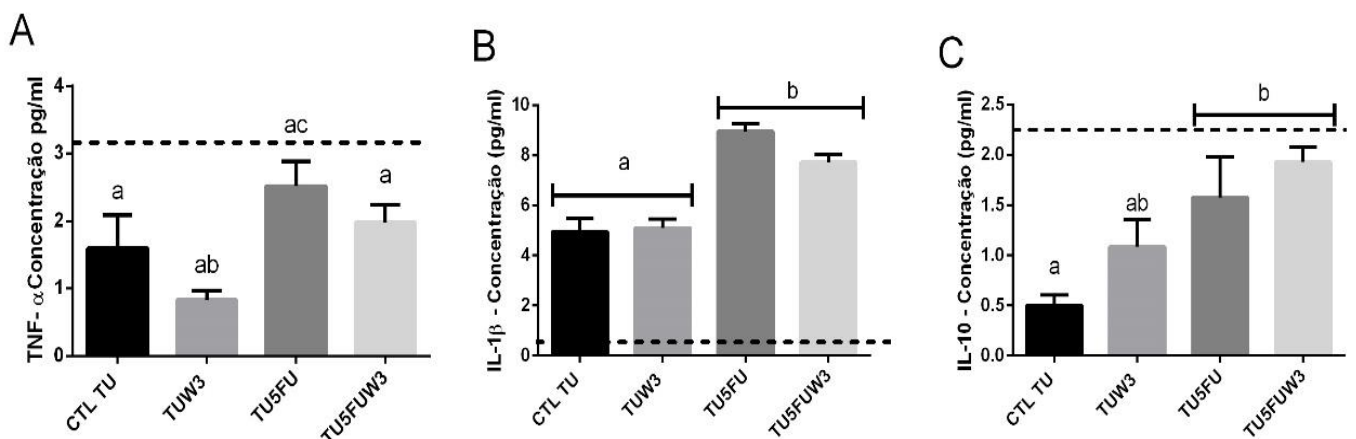
	CTL	CTLTU	TUW3	TU5FU	TU5FUW3
<b>Degeneração</b>	-	++	+++	++	++
<b>Inflamação</b>	-	++	+	++	-
<b>Presença de células neoplásicas</b>	-	++	+	-	-

**Tabela 4 . Características hepáticas.** CTL- Controle, CTLTU- Controle Tumor, TUW3 – Tumor, recebeu ração ômega 3, TU5FU – Tumor, recebeu quimioterápico, TU5FUW3 – Tumor, quimioterápico e ração ômega 3.

**Fonte:** Adaptado de Anisiewicz, 2018 e Silva, 2019(72,83).

### 5.9 Dosagem de Citocinas

Nos dados referentes a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  (Figura 15A), o grupo TUW3 apresentou redução da concentração quando comparado ao grupo CTLTU. Já o grupo TU5FU apresentou aumento significativo na concentração da citocina quando comparado com grupo TU5FUW3.. A concentração da citocina pró-inflamatória IL1 $\beta$  (Figura 15B) foi maior nos grupos TU5FU e TU5FUW3, quando comparada aos grupos CTLTU e TUW3 ( $p < 0,05$ ), que não apresentaram diferença estatística entre si ( $p > 0,05$ ). Da mesma forma, a citocina anti-inflamatória IL10 apresentou maior concentração nos grupos TU5FU e TU5FUW3 quando comparados ao grupo CTLTU ( $p < 0,05$ ), sem diferença estatística para o grupo TUW3 ( $p > 0,05$ ) (Figura 15C).



**Figura 15. Dosagem das citocinas TNF- $\alpha$  (A), IL1 $\beta$  (B), IL10 (C).** Dados expressos em média  $\pm$  SEM (n=11). Letras diferentes indicam que há diferença estatística. (ANOVA *One-Way* e pós-teste *Neuman-Keuls* para múltiplas comparações). Grupos: CTL- Controle, CTLTU- Controle Tumor, TUW3 – Tumor + ração ômega 3, TU5FU – Tumor + 5-FU, TU5FUW3 – Tumor+5FU+ ração ômega 3.

## 6. DISCUSSÃO

Apesar da mucosite ser amplamente discutida na literatura, trabalhos que associaram essa condição aos modelos de tumor são escassos. Este tipo de estudo é importante para compreender se as vias que são ativadas por substâncias ou nutrientes para a prevenção e tratamento da mucosite também interferem na atividade do tumor.

Em relação a utilização do ômega 3, alguns estudos têm avaliado seu efeito isolado *in vitro* e *in vivo* sobre células tumorais(71,88–90), enquanto outros autores avaliaram a suplementação do ômega 3 associado a diferentes quimioterápicos(64,91). Trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito da suplementação do ômega3 na mucosite induzida por 5-FU. Os resultados mostraram que o ômega 3 foi capaz de reduzir a perda de peso e a permeabilidade intestinal causados pelo quimioterápico, além de promover a redução da apoptose dos enterócitos<sup>(11)</sup>. Entretanto, não foi possível avaliar se a mesma via que reduziu a apoptose de células intestinais levaria à redução da apoptose de células tumorais. Diante desta necessidade, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos da suplementação de ômega 3 na mucosite no modelo de tumor de mama murino 4T1. Este modelo tumoral é considerado vantajoso em relação a outros modelos de tumor murino, devido às suas características muito similares ao tumor de mama humano. Por ser altamente invasivo, ele tem a capacidade de gerar metástases de forma espontânea em linfonodos, fígado e pulmão(70,73).

Nossos resultados demonstraram que os animais dos grupos TU5FUW3 e TUW3 apresentaram redução no consumo de ração nos dias 17 e 20, enquanto a perda de peso foi observada para os animais dos grupos TU5FU e TU5FUW3 apenas no dia 20. Tais dados corroboram com outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa, bem como evidências na literatura, as quais demonstraram que animais submetidos

à indução da mucosite apresentaram perda de peso significativa após 72 horas da administração do quimioterápico(11,78).

Entretanto, diferente do esperado, não observamos efeito do ômega 3 na minimização da perda de peso(11,88). Isso pode ter ocorrido devido ao fato do peso dos animais ter sido mascarado pelo tumor, que correspondeu a até 10% do peso total (dados não apresentados). Dessa forma, este dado torna-se pouco sensível. Além disso, trabalhos que observaram redução na perda de peso pela suplementação com ômega 3 demonstraram que este efeito é dose-dependente(92,93). Os animais dos grupos tratados com a ração ômega 3 apresentaram redução no consumo nos dias 17 e 20, provavelmente devido à alteração do cheiro e palatabilidade da ração quando suplementada com ômega 3. Outros estudos experimentais realizaram a suplementação de ômega 3 por gavagem(31,94). Este método garante que os animais recebam a dose desejada do suplemento. Entretanto, ao realizarmos a tentativa de administrar desta forma, os animais não apresentaram boa tolerância ao óleo. Em muitos casos, regurgitaram o mesmo, além de terem reduzido muito o consumo de ração. Assim, optamos suplementar o ômega 3 na ração, como realizado no estudo anterior<sup>(11)</sup>.

É importante considerar que, além do quimioterápico, as alterações metabólicas causadas pelo tumor, como a caquexia, também contribuem para a perda de peso dos animais. A liberação do fator indutor de proteólise (PIF) e de citocinas inflamatórias pelo tumor promovem o aumento da proteólise, redução de síntese proteica, redução do transporte e utilização de aminoácidos e aumento da oxidação de aminoácidos de cadeia ramificada, levando à perda de massa muscular(36). Paralelamente, a ineficiência de utilização energética leva à termogênese, promovendo a perda de tecido adiposo(36). Um outro fator associado é a mal absorção de nutrientes decorrente da apoptose das vilosidades intestinais (95). Por último, alterações no padrão de mediadores hipotalâmicos alteram o paladar e levam à anorexia(36,42).

As alterações na mucosa intestinal provocadas pelo quimioterápico podem levar ao aumento da PI, provocando modificações morfológicas como encurtamento do intestino e dos vilos, menor profundidade da cripta e presença de infiltrado inflamatório na camada basal do intestino<sup>(4)</sup>. Curiosamente, o grupo CTLTU apresentou elevada PI, da mesma forma que os animais do grupo TU5FU. Apesar da diferença no escore da mucosite, que foi mais acentuada no grupo TU5FU, nos



parâmetros morfométricos os animais dos grupos CTLTU e TU5FU foram estatisticamente semelhantes às do grupo TU5FU, com redução na altura do vilos e profundidade da cripta. Tais alterações morfológicas no período de 72 horas após a indução da mucosite já foram observadas em diversos trabalhos com modelo de mucosite induzida por quimioterápico(4,11,13,78,95). No entanto, não é de nosso conhecimento trabalhos que tenham encontrado tais alterações em modelos tumorais que não sejam de câncer no intestino, sem a presença de quimioterápico.

Os grupos TU5FUW3 e TUW3, por sua vez, apresentaram redução na PI. Entretanto, não apresentaram alteração na morfometria, indicando recuperação parcial na arquitetura dos vilos, não sendo observado presença de infiltrado inflamatório nestes animais. A recuperação de vilosidades pela ação do ômega 3 já foi observada em trabalho anterior em nosso grupo de pesquisa<sup>(11)</sup>. Podemos concluir através de nossos dados que este mecanismo permanece eficiente na presença do tumor.

Dentre as alterações sistêmicas causadas no organismo pela presença do tumor, a liberação de mediadores inflamatórios parece ser um dos mecanismos responsáveis pelo aumento da PI e da alteração na arquitetura intestinal, além da liberação de ROS. O aumento na concentração sérica de citocinas pró-inflamatórias gera desequilíbrio na homeostase intestinal. Dessa forma, quando há ineficiência no processo de resolução da inflamação, na ausência de mediadores anti-inflamatórios, ocorre a apoptose de enterócitos, que leva à perda da arquitetura do vilos(96).

O método de avaliação da permeabilidade intestinal por <sup>99m</sup>Tc- DTPA avalia a permeabilidade paracelular, ou seja, entre os enterócitos. Em condições fisiológicas normais, a molécula <sup>99m</sup>Tc-DTPA não consegue alcançar a corrente sanguínea, devido à sua elevada hidrofília. De uma forma geral, apenas moléculas de caráter lipofílico conseguem chegar até a corrente sanguínea. Entretanto, na ocorrência de rupturas do epitélio intestinal e/ou afrouxamento das junções com consequente aumento da PI, o fármaco radiomarcado permeia pelo espaçamento das *tight junctions* (TJ) e pode ser identificado no sangue(95). Partindo deste pressuposto, levantamos a hipótese de que somente a presença do tumor, com a liberação dos mediadores inflamatórios e aumento na liberação de ROS, teria levado ao aumento da permeabilidade intestinal pelo afrouxamento das TJ. Enquanto a suplementação com o ômega 3 teria atuado melhorando a expressão de proteínas de junção, como sugerido por outros autores(97–99).

Nossos resultados demonstraram que a expressão mRNA da proteína de junção ZO-1, foi reduzida nos grupos CTLTU, TUW3 e TU5FU. O grupo TU5FUW3 apresentou maior expressão gênica da ZO-1. Para o marcador ocludina, não observamos diferença na expressão gênica da proteína entre os grupos CTL, CTLTU, TUW3 e TU5FU. Somente o grupo TU5FUW3 apresentou aumento na expressão desta.

Outros autores já observaram redução da expressão de proteínas de junção em modelos de inflamação intestinal e mucosite(85,100). Fasano e colaboradores(101), observaram exacerbada expressão da zonulina em diversas situações de estímulos inflamatórios, dentre elas, no câncer de mama, levando ao afrouxamento das TJ.

Atualmente, sabemos que diversos fatores são capazes de ativar a liberação da zonulina(101,102), que por meio de cascata de sinalização promove o enfraquecimento de filamentos de actina e miosina e, conseqüentemente, o afrouxamento das proteínas de junção ZO-1 e ocludina, consideradas elementos chave do complexo de junções firmes(103). Alguns autores demonstraram que o DHA, ácido graxo derivado do ômega 3, é capaz de modular a expressão destas proteínas de junção, melhorando a PI(104–106). No que diz respeito à regulação do aumento da expressão destas proteínas, promovendo a recuperação da PI, o mecanismo parece estar associado aos fatores anti-inflamatórios do ômega 3 capazes de atuar na resolução da inflamação por meio das maresinas e resolvinas. Compostos estes derivados do ômega 3 que atuam na promoção da captação de debris inflamatórios por macrófagos e no bloqueio de estresse oxidativo, minimizando da produção de ROS(53,106).

Estes resultados nos levam a crer que, nos animais que possuíam apenas o tumor, houve afrouxamento das TJ com conseqüente aumento da PI, sem alteração na arquitetura dos vilos. Já na presença do quimioterápico houve alteração das TJ e arquitetura dos vilos, ocorrendo apoptose dos enterócitos.

A ação do ômega 3 sobre a apoptose de células do epitélio intestinal ainda não está completamente elucidada, no entanto, a incorporação de tais ácidos graxos à membrana dos enterócitos promove a liberação de mediadores anti-inflamatórios, que podem estar associados aos efeitos de recuperação do epitélio intestinal como parte dos processos de resolução da inflamação(53,107). Dessa forma, acreditamos que as citocinas liberadas pelo tumor contribuíram para a redução da expressão gênica das

proteínas de junção, de forma similar à ação causada pelo quimioterápico. Além disso, é possível inferir que um dos mecanismos pelo qual o ômega 3 atuou na recuperação da arquitetura dos vilos e prevenção do aumento da PI foi pela via da estimulação da produção das proteínas de junção ZO-1 e ocludina.

Diante destes resultados, realizamos dosagem das citocinas IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  e da anti-inflamatória IL-10 nos linfonodos mesentéricos e no baço. Nenhuma das citocinas dosadas no linfonodo mesentérico apresentou diferença estatística nas análises realizadas (dados não apresentados). Nas análises do baço, a citocina TNF- $\alpha$  apresentou maior expressão nos grupos TU5FU e TU5FUW3. Para a citocina IL1- $\beta$ , os grupos CTLTU e TUW3 não apresentaram diferença estatística entre si, divergindo dos grupos TU5FU e TU5FUW3.

Tais dados corroboram com outros estudos que avaliaram a expressão destas citocinas em pacientes com câncer de mama(96,108). A concentração da citocina IL-10 foi maior nos grupos TU5FU e TU5FUW3, seguida pelo grupo TUW3. Estes achados nos levam a crer que a dose de ômega 3 não foi suficiente para reduzir a expressão destas citocinas inflamatórias, tampouco para aumentar a concentração da IL-10 de forma significativa.

Diversos autores já relataram a participação das citocinas IL-6, IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , dentre outras, no processo de desenvolvimento da mucosite(100,109). No entanto, estes mesmos autores atentam para o *timing* de dosagem das mesmas, bem como o local, a diluição do tecido e outros fatores que podem interferir nos resultados(110,111).

Em nosso trabalho optamos por realizar a dosagem das citocinas no baço para avaliação da concentração sérica e no linfonodo mesentérico e, também, para avaliação da concentração das mesmas no íleo. Essa escolha se deu pois, em tentativas anteriores, a concentração de citocinas foi considerada baixa no fragmento do íleo, não podendo ser feita a leitura. Além disso, apesar do conhecimento da participação de citocinas TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-6 na progressão do câncer de mama(96) não observamos relato da dosagem destas citocinas em modelo de tumor de mama murino 4T1. Diferentes linhagens de células tumorais podem apresentar diferentes expressões de citocinas, o que pode explicar a ausência destes achados em nossas análises.

Todas as circunstâncias nos levam a crer que a análise das citocinas da forma como foi realizada é uma limitação do nosso estudo. Os efeitos do ômega 3 como

agente anti-inflamatório já são bem esclarecidos, mas, novamente, a avaliação destes efeitos é dose-dependente. Para compreender se houve incorporação do ômega 3 nas células tumorais, a fim de modular este ou outros efeitos, avaliamos as características do tumor.

A despeito dos efeitos da suplementação do ômega 3 no tumor, nossos resultados demonstraram que o grupo TU5FUW3 apresentou redução significativa no tamanho final do tumor. Além disso, este grupo apresentou maior fator de inibição tumoral, quando comparado ao grupo CTLTU. De forma interessante, quando avaliamos o número de metástases no pulmão, e a proliferação celular no tumor, os grupos TU5FU, TUW3 e TU5FUW3 apresentaram menores valores de metástase e menores valores de proliferação celular. Em trabalhos anteriores, com apenas uma dose de quimioterápico não observamos redução nas metástases(72), no entanto, constatamos que o ômega 3 associado ao quimioterápico intensificou o efeito deste, como constatado em outros estudos que associaram compostos como o EPA e DHA às moléculas do fármaco(71,112,113). Os resultados da imuno-histoquímica no tumor, demonstraram que o ômega 3 foi capaz de reduzir a proliferação das células tumorais de forma independente do quimioterápico.

Alguns autores avaliaram que, dentre os mecanismos de participação do ômega 3 na redução do tumor, estão a redução da proliferação celular e a ativação de fatores de apoptose(23,34). Chung e colaboradores(40) observaram que o ômega 3 foi capaz de minimizar a progressão tumoral pela via da redução da liberação de citocinas pelos adipócitos em animais obesos. Em outro trabalho, a suplementação de EPA e DHA em células de tumor pancreático humano foi capaz de promover o acúmulo de ROS no interior celular, além da indução da via da caspase-8, uma via de apoptose. Ambos processos levaram as células tumorais à morte(34).

Outros autores observaram que estes compostos podem exercer efeito antiproliferativo, prolongando o ciclo celular entre as fases G2 / M(33). Colas e colaboradores observaram que o ômega 3 é capaz de sensibilizar células tumorais ao quimioterápico e reduzir a vascularização do tumor, minimizando a angiogênese(114).O processo de angiogênese é mediado pelos eicosanoides PGE<sub>2</sub>. A elevada concentração de ácidos graxos saturados na membrana celular tumoral promove a produção de prostaglandinas em células endoteliais do sistema linfático, promovendo a metástase tumoral.

A suplementação com ômega 3 se mostrou capaz de reduzir a liberação destas moléculas, minimizando a angiogênese e a progressão tumoral(20). Além disso, outros trabalhos também observaram que a incorporação do ácido graxo ômega 3 na membrana tumoral é capaz de reduzir a quimioresistência a alguns tipos de fármacos(71,114).

Nossos resultados demonstraram que a suplementação de ômega 3 melhorou o efeito do quimioterápico, corroborando outros estudos(64,112). Acreditamos que estes processos ocorreram nas células dos grupos TUW3 e TU5FUW3. No entanto, análises como as de concentração de ROS e Caspase-3 trariam dados complementares para confirmação desta hipótese.

Apesar dos resultados promissores, ainda há um receio sobre a recomendação do uso de ômega 3 associado a quimioterápicos, além da dificuldade de se estabelecer uma dose que seja eficaz e segura, sem causar prejuízos ao indivíduo(115).

Como já abordado anteriormente, a ocorrência de efeitos adversos decorrentes do tratamento anticâncer é um sério limitador para a eficácia da terapia. Nesse sentido é importante estudar os efeitos deletérios decorrentes da terapia associada ao ômega 3, sendo o fígado o maior alvo dessa toxicidade(84,86). A fim de avaliar estes efeitos no fígado, realizamos análises histológicas de fragmentos hepáticos.

Nossos resultados demonstraram que todos os animais com tumor apresentaram degeneração hepática reversível, sendo esta aumentada no grupo TUW3. Por outro lado, a acentuada presença de infiltrado inflamatório, observada nos grupos CTLTU e TU5FU, mostrou-se reduzida no grupo TUW3 e ausente no grupo TU5FUW3.

Este mesmo efeito foi observado nos focos metastáticos hepáticos, ausente nos grupos TU5FU e TU5FUW3 e reduzido no grupo TUW3. As complicações e metástases hepáticas no câncer de mama são bastante comuns no desenvolvimento da doença e já foram descritas por outros autores que utilizaram este modelo tumoral(73,86). Além disso, o uso de quimioterápicos leva à inflamação aguda hepática que, a depender do tempo de tratamento, causa degenerações que podem evoluir para esteatose, fibrose e, conseqüentemente, à insuficiência hepática(84,87).

Muitos dos mecanismos estudados na suplementação do ômega 3 em modelos tumorais foram observados em estudos *in vitro* ou modelos de enxerto tumoral. Além disso, os autores avaliaram estes efeitos de forma isolada(90,116–119). Nosso

modelo experimental é inovador ao trazer todos estes resultados reunidos, demonstrando que tal dose de suplementação do ômega 3 através do óleo de peixe foi capaz de promover tais benefícios aos animais sem causar toxicidade. Entretanto, não avaliamos aspectos tais como a incorporação de lipídeos pela membrana celular, bem como a liberação de espécies reativas de oxigênio pelo tumor ou pelos enterócitos.

Os dados a respeito da ação anti-inflamatória do ômega 3 foram pouco conclusivos, sendo necessário novas análises em outros órgãos, como intestino e dosagem sérica de citocinas. A divergência na concentração dos compostos derivados de ômega 3 nos estudos é um fator limitante para que se chegue a uma dose considerada recomendável. Dada a diversidade de combinação de fármacos e de mutações gênicas tumorais encontrados na prática clínica, os achados deste estudo se aplicam apenas a este modelo, não sendo possível confirmar tais efeitos em outros tipos de quimioterápico ou tumores.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O ômega 3 se mostrou, neste estudo, capaz de atenuar os efeitos adversos do quimioterápico sem causar prejuízo à sua atividade antitumoral. A dose de ômega 3 por 10 dias reduziu o aumento da PI por meio da recuperação das TJ reduziu o tamanho do tumor e suas metástases pela via de redução da proliferação de células tumorais, além de ter minimizado a toxicidade hepática e aumentado a afinidade das células tumorais ao quimioterápico. Além disso, observamos importantes efeitos, tais como o aumento da PI em modelo tumoral e afrouxamento das junções nestes animais.

Mais estudos são necessários para que se chegue a um consenso a respeito da suplementação de ômega 3 em indivíduos com câncer em tratamento quimioterápico. No entanto, nossos dados elucidam diversos mecanismos observados nestes indivíduos, facilitando o desenvolvimento de novos trabalhos.

## 8. REFERÊNCIAS

1. INCA- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. BRASIL. A situação do câncer de mama no Brasil : A situação do câncer de mama no Brasil : Síntese de dados dos sistemas. 2019.
2. World Cancer Research Fund International. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. In: American Institute for Cancer Research. 2007. p. 37–9.
3. Ranna V, Cheng KKF, Castillo DA, Porcello L, Vaddi A, Lalla R V., et al. Development of the MASCC/ISOO clinical practice guidelines for mucositis: an overview of the methods. *Support Care Cancer*. 2019;27(10):3933–48.
4. Sonis ST. Pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(1):277–84.
5. Ariyawardana A, Cheng KKF, Kandwal A, Tilly V, Al-Azri AR, Galiti D, et al. Systematic review of anti-inflammatory agents for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer*. 2019;27(10):3985–95.
6. Sonis ST. A biological approach to mucositis. *J Support Oncol [Internet]*. 2004;2(1):21–32; discussion 35-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15330370>
7. Elting LS, Chang YC. Costs of Oral Complications of Cancer Therapies: Estimates and a Blueprint for Future Study. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2019;2019(53):116–23.
8. Rauh S, Arnold D, Braga S, Curca R, Eckert R, Fröbe A, et al. Challenge of implementing clinical practice guidelines. Getting ESMO's guidelines even closer to the bedside: Introducing the ESMO Practising Oncologists' checklists and knowledge and practice questions. *ESMO Open*. 2018;3(5):1–4.
9. Noam Yarom, Allan Hovan, Paolo Bossi AA, Jensen SB, Gobbo M, Sacca-Hazboun H, Kandwal A, Majorana A, et al. Systematic review of natural and miscellaneous agents for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines—part 1: vitamins, minerals, and nutritional supplements. *Support Care Cancer*. 2019;27(10):3997–4010.
10. Yehuda Zadik<sup>1 2</sup>, Arany<sup>3</sup> & PR, Fregnani<sup>4</sup> & ER, Bossi<sup>5</sup> & P, Antunes<sup>6</sup> & HS, &, et al. Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer*. 2019;27(10):3969–83.
11. Generoso S de V, Rodrigues NM, Trindade LM, Paiva NC, Cardoso VN, Carneiro CM, et al. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. *Lipids Health Dis [Internet]*.



- 2015;14(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-015-0052-z>
12. Cechinel-Zanchett CC, Boeing T, Somensi LB, Steimbach VMB, Campos A, Krueger C de MA, et al. Flavonoid-rich fraction of *Bauhinia forficata* Link leaves prevents the intestinal toxic effects of irinotecan chemotherapy in IEC-6 cells and in mice. *Phyther Res*. 2019;33(1):90–106.
  13. Corso CR, Stipp MC, Adami ER, da Silva LM, Mariott M, de Andrade SF, et al. *Salvia lachnostachys* Benth has antitumor and chemopreventive effects against solid Ehrlich carcinoma. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04931-3>
  14. Gibson RJ, Keefe DMK, Lalla R V., Bateman E, Blijlevens N, Fijlstra M, et al. Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer*. 2013;21(1):313–26.
  15. Lalla R V., Bowen J, Barasch A, Elting L, Epstein J, Keefe DM, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 2014;120(10):1453–61.
  16. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review Douglas. *Cell*. 2000;100(7):57–70.
  17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
  18. Omabe M, Ezeani M, Omabe KN. Lipid metabolism and cancer progression: The missing target in metastatic cancer treatment. *J Appl Biomed* [Internet]. 2015;13(1):47–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jab.2014.09.004>
  19. Keenan MM, Chi JT. Alternative fuels for cancer cells. *Cancer J (United States)*. 2015;21(2):49–55.
  20. Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A. Hooked on fat: The role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *DMM Dis Model Mech*. 2013;6(6):1353–63.
  21. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(10):763–77.
  22. Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res*. 2010;70(20):8117–26.
  23. D’Eliseo D, Velotti F. Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. *J Clin Med*. 2016;5(2):15.
  24. Chénais B, Blanckaert V. The Janus Face of Lipids in Human Breast Cancer: How Polyunsaturated Fatty Acids Affect Tumor Cell Hallmarks. *Int J Breast Cancer*. 2012;2012:1–8.
  25. Delort L, Rossary A, Farges MC, Vasson MP, Caldefie-Chézet F. Leptin,

- adipocytes and breast cancer: Focus on inflammation and anti-tumor immunity. *Life Sci.* 2015;140:37–48.
26. Ouldamer L, Goupille C, Vilde A, Arbion F, Body G, Chevalier S, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids of marine origin and multifocality in human breast cancer. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(1):4–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0147148>
  27. Zora Djuric, Ph.D, Jianwei Ren, M.D., Patrick R. Brown, Jennifer S. Ellsworth RD, M.S, and Ananda Sen PD. Lifestyle Factors Associated with Serum N-3 Fatty Acid Levels in Breast Cancer Patients. NIH Public Access. 2011;46(4):564–74.
  28. Mandal CC, Ghosh-Choudhury T, Dey N, Choudhury GG, Ghosh-Choudhury N. miR-21 is targeted by omega-3 polyunsaturated fatty acid to regulate breast tumor CSF-1 expression. *Carcinogenesis*. 2012;33(10):1897–908.
  29. Nikolakopoulou Z, Nteliopoulos G, Michael-Titus AT, Parkinson EK. Omega-3 polyunsaturated fatty acids selectively inhibit growth in neoplastic oral keratinocytes by differentially activating ERK1/2. *Carcinogenesis*. 2013;34(12):2716–25.
  30. Yeung CY, Chan WT, Jiang C Bin, Cheng ML, Liu CY, Chang SW, et al. Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model. *PLoS One*. 2015;10(9):1–16.
  31. Manna S, Janarthan M, Ghosh B, Rana B, Rana A, Chatterjee M. Fish oil regulates cell proliferation, protect DNA damages and decrease HER-2/neu and c-Myc protein expression in rat mammary carcinogenesis. *Clin Nutr* [Internet]. 2010;29(4):531–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2009.12.012>
  32. Corsetto PA, Montorfano G, Zava S, Jovenitti IE, Cremona A, Rizzo AM. Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2011;10(1):73. Available from: <http://www.lipidworld.com/content/10/1/73>
  33. Barascu A, Besson P, Le Floch O, Bougnoux P, Jourdan ML. CDK1-cyclin B1 mediates the inhibition of proliferation induced by omega-3 fatty acids in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(2):196–208.
  34. Fukui M, Kang KS, Okada K, Zhu BT. EPA, an omega-3 fatty acid, induces apoptosis in human pancreatic cancer cells: Role of ROS accumulation, caspase-8 activation, and autophagy induction. *J Cell Biochem*. 2013;114(1):192–203.
  35. Javier A. Menéndez, Alejandro Vazquez-Martin, Santiago Roperio RC and RL. HER2 (erbB- 2)- targeted effects of the omega- 3 polyunsaturated fatty acid. Alfa- linolenic acid (ALA 18 3n- 3) in breast cancer cells: The fat features of the Mediterranean Diet as an anti-HER2 cocktail. *Clin Transl Oncol*. 2006;2(I 1).
  36. Baracos VE, Martin L, Korc M, Guttridge DC, Fearon KCH. Cancer-associated cachexia. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018;4:1–18. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.105>

37. Laviano A, Rianda S, Molino A, Fanelli FR. Omega-3 fatty acids in cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013;16(2):156–61.
38. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*. 2010;44(5):479–96.
39. Bonofiglio D, Lanzino M, Giordano C, Catalano S, Andò S. Omega-3 DHA and EPA Conjugates Trigger Autophagy Through PPAR $\gamma$  Activation in Human Breast Cancer Cells [Internet]. Vol. 8, *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*. Elsevier Inc.; 2016. 291–305 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802937-4.00016-8>
40. Chung H, Lee YS, Mayoral R, Oh DY, Siu JT, Webster NJ, et al. Omega-3 fatty acids reduce obesity-induced tumor progression independent of GPR120 in a mouse model of postmenopausal breast cancer. *Oncogene*. 2015;34(27):3504–13.
41. Sánchez-Lara K, Turcott JG, Juárez-Hernández E, Nuñez-Valencia C, Villanueva G, Guevara P, et al. Effects of an oral nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid on nutritional and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer: RANDOMISED trial. *Clin Nutr*. 2014;33(6):1017–23.
42. Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: Understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2014;14(11):754–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3829>
43. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2015;1851(4):469–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.08.010>
44. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes : from molecules to man. 2017;(July):1–11.
45. Calder PC. n  $\times$  3 Polyunsaturated fatty acids , inflammation , and inflammatory. 2006;83(February).
46. Calder PC. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes : nutrition or pharmacology ? 2012;
47. Burdge GC, Calder PC. Dietary  $\alpha$ -linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective. *Nutr Res Rev*. 2006;19(1):26–52.
48. Calder PC. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2007;77(5–6):327–35.
49. E. Patterson, R.Wall,G. F. Fitzgerald RPR and CS. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *J Nutr Metab*. 2012;4(11):1554–65.
50. Eltweri AM, Thomas AL, Metcalfe M, Calder PC, Dennison AR, Bowrey DJ.

- Potential applications of fish oils rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in the management of gastrointestinal cancer. *Clin Nutr* [Internet]. 2017;36(1):65–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2016.01.007>
51. Im DS. Functions of omega-3 fatty acids and FFA4 (GPR120) in macrophages. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2016;785:36–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.094>
  52. Patterson WL, Georgel PT. Breaking the cycle: the role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in inflammation-driven cancers. *Biochem Cell Biol*. 2014;92(5):321–8.
  53. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014;510(7503):92–101.
  54. Ishihara T, Yoshida M, Arita M. Omega-3 fatty acid-derived mediators that control inflammation and tissue homeostasis. *Int Immunol*. 2019;31(9):559–67.
  55. Hwang DH, Kim JA, Lee JY. Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid [Internet]. Vol. 785, *European Journal of Pharmacology*. Elsevier; 2016. 24–35 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.04.024>
  56. Fuentes NR, Kim E, Fan YY, Chapkin RS. Omega-3 fatty acids, membrane remodeling and cancer prevention. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2018;64(May):79–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.04.001>
  57. Guichard N, Guillarme D, Bonnabry P, Fleury-Souverain S. Antineoplastic drugs and their analysis: A state of the art review. *Analyst*. 2017;142(13):2273–321.
  58. Ministério da Saúde. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama - Ministério da Saúde. Brasil. 2018;
  59. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):330–8.
  60. Davila M, Bresalier RS. Gastrointestinal complications of oncologic therapy. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2008;5(12):682–96.
  61. Vera-Llonch M, Oster G, Hagiwara M, Sonis S. Oral mucositis in patients undergoing radiation treatment for head and neck carcinoma: Risk factors and clinical consequences. *Cancer*. 2006;106(2):329–36.
  62. Sonis ST, Peterson RL, Edwards LJ, Lucey CA, Wang L, Mason L, et al. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol*. 2000;36(4):373–81.
  63. Gibson RJ, Keefe DM, Clarke JM, Register GO, Thompson FM, Goland GJ, et al. The effect of keratinocyte growth factor on tumour growth and small intestinal mucositis after chemotherapy in the rat with breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002;50(1):53–8.

64. Morland SL, Martins KJB, Mazurak VC. N-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation During Cancer Chemotherapy. *J Nutr Intermed Metab* [Internet]. 2016;5:107–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnim.2016.05.001>
65. Machonn C, Thezenas S, Dupuy AM, Assenat E, Michel F, Mas E, et al. Immunonutrition before and during radiochemotherapy: Improvement of inflammatory parameters in head and neck cancer patients. *Support Care Cancer*. 2012;20(12):3129–35.
66. Gorjao R, dos Santos CMM, Serdan TDA, Diniz VLS, Alba-Loureiro TC, Cury-Boaventura MF, et al. New insights on the regulation of cancer cachexia by N-3 polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Ther*. 2019;196:117–34.
67. Ghoreishi Z, Esfahani A, Djazayeri A, Djalali M, Golestan B, Ayromlou H, et al. Omega-3 fatty acids are protective against paclitaxel-induced peripheral neuropathy: A randomized double-blind placebo controlled trial. *BMC Cancer*. 2012;12:1–8.
68. Ministério da Ciência, Tecnologia I e C (MCTIC). CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. 2016;
69. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. The ARRIVE guidelines A nimal R esearch : R eporting I n V ivo E xperiments.
70. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Curr Protoc Immunol*. 2001;1–16.
71. Fernandes RS, Silva JO, Mussi S V., Lopes SCA, Leite EA, Cassali GD, et al. Nanostructured Lipid Carrier Co-loaded with Doxorubicin and Docosahexaenoic Acid as a Theranostic Agent: Evaluation of Biodistribution and Antitumor Activity in Experimental Model. *Mol Imaging Biol*. 2018;20(3):437–47.
72. de Oliveira Silva J, Fernandes RS, Ramos Oda CM, Ferreira TH, Machado Botelho AF, Martins Melo M, et al. Folate-coated, long-circulating and pH-sensitive liposomes enhance doxorubicin antitumor effect in a breast cancer animal model. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019;118(July):109323. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109323>
73. DuPré SA, Redelman D, Hunter KW. The mouse mammary carcinoma 4T1: Characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int J Exp Pathol*. 2007;88(5):351–60.
74. Soares PMG, Mota JM, Souza EP, Justino PFC, Franco AX, Cunha FQ, et al. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. *Cytokine* [Internet]. 2013;61(1):46–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.10.003>
75. Reeves PG. 23 Reeves et al, 1993 American Institute of Nutrition. 1939;1939–51.
76. Barros PAV de, Generoso S de V, Andrade MER, da Gama MAS, Lopes FCF, de Sales e Souza ÉL, et al. Effect of Conjugated Linoleic Acid-enriched Butter

- After 24 hours of Intestinal Mucositis Induction. *Nutr Cancer* [Internet]. 2017;69(1):168–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2016.1225100>
77. P.C.Y. Woo, W.F.NG, H.C.H Leung, H.W.TSOI KY. Clarithromycin attenuates cyclophosphamide-induced mucositis in mice. *Pharmacol Res.* 2000;41(5):527–32.
  78. Soares PMG, Mota JM, Gomes AS, Oliveira RB, Assreuy AMS, Brito GAC, et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;63(1):91–8.
  79. Pereira VBM, Melo AT, Assis-Júnior EM, Wong DVT, Brito GAC, Almeida PRC, et al. A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;77(2):323–32.
  80. Ferreira TM, Leonel AJ, Melo MA, Santos RRG, Cara DC, Cardoso VN, et al. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. *Lipids.* 2012;47(7):669–78.
  81. Aparecida P, Barros V De, Emília M, Andrade R, Vasconcelos S De, Eustáquio S, et al. Biomedicine & Pharmacotherapy Conjugated linoleic acid prevents damage caused by intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in an experimental model. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2018;103(April):1567–76. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.133>
  82. Jensen MM, Jørgensen JT, Binderup T, Kjær A. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. *BMC Med Imaging.* 2008;8:1–9.
  83. Anisiewicz A, Pawlik A, Filip-Psurska B, Turlej E, Dzimira S, Milczarek M, et al. Unfavorable effect of calcitriol and its low-calcemic analogs on metastasis of 4T1 mouse mammary gland cancer. *Int J Oncol.* 2018;52(1):103–26.
  84. El-sayyad HI, Ismail MF, Shalaby FM, Abou-el-magd RF, Gaur RL. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. 2009;5(5):466–73.
  85. Andrade MER, Barros PAV de, Menta PL dos R, Costa GMF, Miranda SEM, Leocádio PCL, et al. Arginine supplementation reduces colonic injury, inflammation and oxidative stress of DSS-induced colitis in mice. *J Funct Foods* [Internet]. 2019;52(November 2018):360–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.019>
  86. Diamond JR, Finlayson CA, Borges VF. Hepatic complications of breast cancer. *Lancet Oncol* [Internet]. 2009;10(6):615–21. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70029-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70029-4)
  87. Ary-pancreas HB, Robinson PJA. The effects of cancer chemotherapy on liver imaging. 2009;1752–62.

88. Schiessel DL, Yamazaki RK, Kryczyk M, Coelho I, Yamaguchi AA, Pequeto DCT, et al.  $\alpha$ -Linolenic Fatty Acid Supplementation Decreases Tumor Growth and Cachexia Parameters in Walker 256 Tumor-Bearing Rats. *Nutr Cancer*. 2015;67(5):839–46.
89. Liang P, Henning SM, Guan J, Grogan T, Elashoff D, Olefsky JM, et al. Role of host GPR120 in mediating dietary omega-3 fatty acid inhibition of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2019;111(1):52–9.
90. Li J, Gu Z, Pan Y, Wang S, Chen H, Zhang H, et al. Dietary supplementation of  $\alpha$ -linolenic acid induced conversion of n-3 LCPUFAs and reduced prostate cancer growth in a mouse model. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):1–9.
91. Freitas RDS, Campos MM. Protective Effects of Omega-3 Fatty Acids in Cancer-Related Complications. *Nutrients*. 2019;11(5):1–23.
92. Busquets S, Marmonti E, Oliva F, Simoes E, Luna D, Mathisen JS, et al. Omega-3 and omega-3/curcumin-enriched fruit juices decrease tumour growth and reduce muscle wasting in tumour-bearing mice. *JCSM Rapid Commun*. 2018;1(1):1–10.
93. Hajjaji N, Couet C, Besson P, Bougnoux P. DHA effect on chemotherapy-induced body weight loss: An exploratory study in a rodent model of mammary tumors. *Nutr Cancer*. 2012;64(7):1000–7.
94. Burger B, Kühn CMC, Candreva T, Cardoso R da S, Silva JR, Castelucci BG, et al. Oral administration of EPA-rich oil impairs collagen reorganization due to elevated production of IL-10 during skin wound healing in mice. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–13.
95. Andrade MER, Araújo RS, de Barros PAV, Soares ADN, Abrantes FA, Generoso S de V, et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. *Clin Nutr [Internet]*. 2015;34(6):1080–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2015.01.012>
96. Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, Morales-Montor J. The role of cytokines in breast cancer development and progression. *J Interf Cytokine Res*. 2015;35(1):1–16.
97. Ghadiri M, Mamlouk M, Spicer P, Jarolimek W, Grau GER, Young PM, et al. Effect of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on airway epithelial cells' tight junction. *Pulm Pharmacol Ther [Internet]*. 2016;40:30–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pupt.2016.07.004>
98. Landy J, Ronde E, English N, Clark SK, Hart AL, Knight SC, et al. Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22(11):3117–26.
99. Jiang WG, Bryce RP, Horrobin DF, Mansel RE. Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;244(2):414–20.
100. Li HL, Lu L, Wang XS, Qin LY, Wang P, Qiu SP, et al. Alteration of gut microbiota and inflammatory cytokine/chemokine profiles in 5-fluorouracil

- induced intestinal mucositis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7(OCT):1–14.
101. Fasano A. Intestinal Permeability and Its Regulation by Zonulin : Diagnostic and Therapeutic Implications. *Clin Gastroenterol Hepatol [Internet].* 2012;10(10):1096–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2012.08.012>
  102. Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Wells JM, Roy NC. Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components. *J Nutr.* 2011;141(5):769–76.
  103. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Clemente MG, Tripathi A, Sapone A, et al. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol.* 2006;41(4):408–19.
  104. Beguin P, Errachid A, Larondelle Y, Schneider YJ. Effect of polyunsaturated fatty acids on tight junctions in a model of the human intestinal epithelium under normal and inflammatory conditions. *Food Funct.* 2013;4(6):923–31.
  105. Zhao J, Shi P, Sun Y, Sun J, Dong JN, Wang HG, et al. DHA protects against experimental colitis in IL-10-deficient mice associated with the modulation of intestinal epithelial barrier function. *Br J Nutr.* 2015;114(2):181–8.
  106. Vargas-Robles H, Castro-Ochoa KF, Citalán-Madrid AF, Schnoor M. Beneficial effects of nutritional supplements on intestinal epithelial barrier functions in experimental colitis models in vivo. *World J Gastroenterol.* 2019;25(30):4181–98.
  107. Kimura I, Ichimura A, Ohue-Kitano R, Igarashi M. Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2019;100(1):171–210.
  108. Vergara D, Simeone P, Damato M, Maffia M, Lanuti P, Trerotola M. The Cancer Microbiota: EMT and Inflammation as Shared Molecular Mechanisms Associated with Plasticity and Progression. *J Oncol.* 2019;2019:1–16.
  109. Sultani M, Stringer AM, Bowen JM, Gibson RJ. Anti-Inflammatory Cytokines: Important Immunoregulatory Factors Contributing to Chemotherapy-Induced Gastrointestinal Mucositis. *Chemother Res Pract.* 2012;2012:1–11.
  110. Ong ZY, Gibson RJ, Bowen JM, Stringer AM, Darby JM, Logan RM, et al. Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Radiat Oncol.* 2010;5(1):1–8.
  111. Meirovitz A, Kuten M, Billan S, Abdah-Bortnyak R, Sharon A, Peretz T, et al. Cytokines levels, Severity of acute mucositis and the need of PEG tube installation during chemo-radiation for head and neck cancer - a prospective pilot study. *Radiat Oncol.* 2010;5(1):2–8.
  112. Tan YZ, Huang WG, Chen FY, Li J, Zhou JY, Wang LJ, et al. n-3 Polyunsaturated fatty acids enhance the antitumor effect of 5-fluorouracil by inhibiting bcl-2 and mutant-p53. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2013;115(12):1483–91.
  113. Calviello G, Di Nicuolo F, Serini S, Piccioni E, Boninsegna A, Maggiano N, et



- al. Docosahexaenoic acid enhances the susceptibility of human colorectal cancer cells to 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;55(1):12–20.
114. Colas S, Mahéo K, Denis F, Goupille C, Hoinard C, Champeroux P, et al. Sensitization by dietary docosahexaenoic acid of rat mammary carcinoma to anthracycline: A role for tumor vascularization. *Clin Cancer Res.* 2006;12(19):5879–86.
115. Nabavi SF, Bilotto S, Russo GL, Orhan IE, Habtemariam S, Daglia M, et al. Omega 3 polyunsaturated fatty acids and cancer: lessons learned from clinical trials. *Cancer Metastasis Rev.* 2015;359–80.
116. Volpato M, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids as adjuvant therapy of colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2018;37(2–3):545–55.
117. Schiessel DL, Yamazaki RK, Kryczyk M, Coelho I, Yamaguchi AA, Pequito DCT, et al.  $\alpha$ -Linolenic Fatty Acid Supplementation Decreases Tumor Growth and Cachexia Parameters in Walker 256 Tumor-Bearing Rats. *Nutr Cancer.* 2015;67(5):839–46.
118. Manni A, Richie JP, Xu H, Washington S, Aliaga C, Bruggeman R, et al. Influence of omega-3 fatty acids on Tamoxifen-induced suppression of rat mammary carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2014;134(7):1549–57.
119. Wang W, Yang J, Nimiya Y, Lee KSS, Sanidad K, Qi W, et al.  $\omega$ -3 Polyunsaturated fatty acids and their cytochrome P450-derived metabolites suppress colorectal tumor development in mice. *J Nutr Biochem [Internet].* 2017;48:29–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.06.006>