

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

NICOLLE CAMILLA RODRIGUES DA SILVA

**INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DE LIPÍDEOS DA DIETA
NO DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA MAMÁRIO
MURINO 4T1**

Belo Horizonte

2014

NICOLLE CAMILLA RODRIGUES DA SILVA

**INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DE LIPÍDEOS DA DIETA NO
DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA MAMÁRIO MURINO 4T1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Área de concentração: Nutrição, Alimentação e Saúde

Orientador: Prof. Valbert Nascimento Cardoso

Co-orientadora: Profa Dirce Ribeiro de Oliveira

Belo Horizonte

2014

Silva, Nicolle Camilla Rodrigues da.

S586i Influência da composição de lipídeos da dieta no desenvolvimento do carcinoma mamário murino 4T1 / Nicolle Camilla Rodrigues da Silva. – 2014.
81 f. : il.

Orientador: Valbert Nascimento Cardoso

Co-orientadora: Dirce Ribeiro de Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Mamas - Câncer – Prevenção - Teses. 2. Mamas - Câncer – Tratamento. - Teses. 3. Lipídeos da dieta - Teses. 4. Ácidos graxos poli-insaturados n-6 e n-3 – Teses. 5. Modelo 4T1. I. Cardoso, Valbert Nascimento. II. Oliveira, Dirce Ribeiro de III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 612.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS -PPGCA

NICOLLE CAMILLA RODRIGUES DA SILVA

**INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DE LIPÍDEOS DA DIETA NO
DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA MAMÁRIO MURINO 4T1**

APROVADA EM 15 DE ABRIL DE 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

**Profa. Dra. DIRCE RIBEIRO DE OLIVEIRA
(Coorientadora)**

Prof. Dr. ÊNIO FERREIRA

Profa. Dra. JACQUELINE APARECIDA TAKAHASHI

**Prof. Dr. VALBERT NASCIMENTO CARDOSO
(Orientador e Presidente da Comissão)**

A Deus, pois nEle vivemos, nos movemos e existimos. E aos meus amados pais, Camillo (in memoriam) e Maria Lúcia, pela dedicação e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Autor e Consumador da minha fé, Jesus Cristo, Deus incomparável, que me disse: “Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar” (Josué 1:9). Hoje meu coração transborda de alegria, totalmente grata sou “Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que atua em nós” (Efésios 3.20). A Ele seja toda honra e toda glória, pelos séculos dos séculos. "Pois Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas" (Rm 11.36).

Ao meu orientador, professor Valbert Nascimento, pela oportunidade e orientação. Meus sinceros agradecimentos!

À minha co-orientadora, professora Dirce Ribeiro, por todas as oportunidades ao longo desses anos, incentivo, apoio, cobrança, ensinamentos, dedicação e amizade. Enfim, quero agradecer imensamente pelas palavras de ânimo e encorajamento, e compreensão nos momentos difíceis. Muito obrigada!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pela contribuição em minha formação científica.

Ao professor Geovanni Cassali do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela colaboração, disponibilidade, e principalmente pelo ensinamento e contribuição, os quais foram imprescindíveis para a concretização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Patologia Comparada, que tive o privilégio de conhecer e conviver, e em especial ao Diego, Cris, Lili e Lidianne, por todo apoio, disponibilidade, contribuição e ajuda na realização deste trabalho. Serei sempre grata por tudo que me ensinaram!

À professora Silvia Passos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela colaboração e ao Celso, pela disponibilidade, contribuição e ajuda nas análises.

À professora Míriam Lopez e a Ana Cândida do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela colaboração e auxílio.

Às técnicas Gi e Mirna, pela contribuição e ajuda, sempre com tanta paciência e prestatividade!

A todos do Laboratório de Amebíase, professora Cidinha, Lu, Joãzinho, Edna, Frederico, Thaisa, Joice, Ariane e Mayana pela disponibilidade em todo tempo e por tantos anos de amizade!

Às minhas alunas de iniciação científica, Laís e Yasmim, que me ajudaram demais. Agradeço pela dedicação, comprometimento e todo apoio. Vocês se tornaram verdadeiras amigas.

A todos os meus amigos dos clubinhos da UFMG, por todo amor, carinho e comunhão ao longo desses anos, aprendi demais com todos vocês.

Às minhas amigas mais que especiais, Anna, Ca, Elaine, Nez, Pa e Sita, que apesar da distância, são mais que presentes. Sou infinitamente grata a Deus por vocês fazerem parte da minha vida.

Ao meu tio Zé e sua família, por todo apoio, ajuda e amor. Serei eternamente grata por tudo que fizeram e fazem por mim!

À minha família, a base de tudo na minha vida, que sempre enxerga em mim muito além do que eu posso ver, e acredita, mesmo quando ousa a duvidar. Ao meu pai (In memoriam), que me ensinou tanto... O seu amor foi fundamental para o meu crescimento. A minha mãe, exemplo de força e determinação; se sou o que sou e estou onde estou hoje, foi porque sempre fez tudo por mim, cuidou de mim, me

amou com todas as suas forças e dedicou-se inteiramente a mim. E ao meu irmão por todo carinho e amor.

Ao Bruno, meu bem precioso, por tanto amor, paciência, carinho, cuidado, força, incentivo e companheirismo em todos os momentos!

E a todos meus irmãos em Cristo, pelo suporte e amor em todo tempo e em todas as circunstâncias, vocês são verdadeiramente a expressão do amor de Deus!

“Não temas, porque Eu sou contigo; não te assombres, porque Eu sou o teu Deus; Eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a minha destra fiel”.

(Isaías 41.10)

RESUMO

Os lipídeos da dieta têm demonstrado influenciar o desenvolvimento do câncer da mama em vários estágios do processo cancerígeno. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito de diferentes óleos, contendo baixa relação n-6/n-3, no desenvolvimento neoplásico e na disseminação metastática do carcinoma mamário murino 4T1. Camundongos BALB/c fêmeas foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos com 14 animais cada, alimentados com dieta semi-sintética AIN-93G contendo 4g/100g de óleo de soja (Controle), óleo de canola (Canola), óleo de peixe (Peixe) ou óleo de linhaça (Linhaça). Os animais foram alimentados *ad libitum* por 50 dias, sendo que, no 30º dia sete animais de cada grupo foram inoculados com células 4T1 ($2,5 \times 10^6$) e denominados: Controle 4T1, Canola 4T1, Peixe 4T1 e Linhaça 4T1. Peso corporal foi registrado semanalmente. Colesterol e triglicerídeos foram determinados por ensaio enzimático. O fracionamento das lipoproteínas séricas foi realizado pelo sistema de Fast Protein Liquid Chromatography. A quantificação de lipídeos hepáticos e cecais foi feita conforme descrito por Folch e colaboradores. A avaliação da peroxidação lipídica baseou-se na dosagem da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para análise histológica do tumor primário e metástases, as amostras foram coletadas, fixadas e destinadas para cortes e coloração com Hematoxilina & Eosina, e para produção de lâminas para imuno-histoquímica para identificação de CDC47. Foram realizadas análises bioquímicas para avaliação do processo inflamatório, por meio das dosagens das enzimas N-Acetil-β-D-Glicosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO), angiogênicos, através dos níveis de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e hemoglobina (Hb), e a participação da citocina TNF-α. Não houve alteração do peso corporal dos animais ao longo do período experimental. Os animais do grupo Controle 4T1 tiveram redução de colesterol carregado nas lipoproteínas e maior excreção fecal de lipídeos totais, colesterol e triglicerídeos comparado ao grupo Controle. O grupo Linhaça 4T1 apresentou aumento de colesterol e de triglicerídeos circulantes em relação aos grupos Linhaça e Controle 4T1 e diminuição do conteúdo de lipídeos hepáticos comparado ao grupo Linhaça. Da mesma forma, o grupo Peixe 4T1 apresentou maiores níveis de triglicerídeos circulantes em relação ao grupo Peixe, porém mostrou menor conteúdo de triglicerídeos no fígado em relação aos demais grupos

com tumor. O grupo Canola 4T1 teve menores níveis hepáticos de TBARS. Não houve alteração no crescimento do tumor e número metástases entre os grupos avaliados. Em relação à proliferação celular, o grupo Canola 4T1 teve maior expressão da proteína CDC47 em relação ao grupo Controle 4T1. O grupo Peixe 4T1 apresentou aumento de MPO e redução de NAG no sítio tumoral. Não foi observada alteração significativa na concentração de Hb, porém, houve aumento de VEGF no grupo Peixe 4T1 em relação aos demais grupos. Ademais não houve alteração de TNF- α no sítio tumoral. O presente estudo demonstrou que os diferentes óleos, não modificaram o crescimento do tumor e metástases, mas exercem efeitos distintos sobre o metabolismo lipídico, processos angiogênicos e inflamatórios, e na proliferação celular em modelo de carcinoma mamário murino 4T1.

Palavras-chave: Câncer de mama, lipídeos da dieta; ácidos graxos poli-insaturados n-6 e n-3; modelo 4T1.

ABSTRACT

Dietary lipids have been shown to influence breast cancer development at several stages in the carcinogenic process. Thus, the aim of this study was to investigate the effect oils, containing low n-6/n-3 ratio, in tumor development and metastatic dissemination of 4T1 murine mammary carcinoma. BALB/c mice were randomly divided into four groups of 14 animals each fed semisynthetic AIN-93G diet containing 4g/100g soybean oil (Control), canola oil (Canola), fish oil (Fish) or flaxseed oil (linseed). The animals were fed *ad libitum* for 50 days, and on the 30th day seven animals in each group were inoculated with 4T1 cells (2.5×10^6) and named: Control 4T1, Canola 4T1, Fish 4T1 and Flaxseed 4T1. Body weight was recorded weekly. Cholesterol and triglycerides were determined by enzymatic assay. Fractionation of serum lipoproteins was performed by Fast Protein Liquid Chromatography system. Quantification of hepatic lipids and cecal was performed as described by Folch *et al.* Assessment of lipid peroxidation was based on the determination of concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). For histological analysis of the primary tumor and metastases, samples were collected, fixed and intended for cutting and staining with hematoxylin & eosin, and for blades for immunohistochemistry to identify CDC47. Further biochemical analyzes for assessing inflammation were conducted by plasma levels of the enzymes N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) and myeloperoxidase (MPO), angiogenic, through the levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and hemoglobin (Hb), and the participation of the cytokine TNF- α . There was no change in body weight of the animals during the experimental period. The animals in the Control 4T1 group decreased adduced lipoprotein cholesterol and increased fecal excretion of total lipids, cholesterol and triglycerides compared to Control group. The Flaxseed 4T1 group had increased cholesterol and triglycerides circulating in relation to Linseed and Control 4T1 groups and decreased lipid content in the liver compared to Flaxseed group. Likewise, the Fish 4T1 group had higher levels of circulating triglycerides in relation to Fish group, but had lower triglyceride content in the liver compared to the other groups with tumor. Canola 4T1 group had lower hepatic levels of TBARS. No change in tumor growth and metastasis number among the groups. In relation to cell proliferation, Canola 4T1 group had higher expression of CDC47 protein compared to Control 4T1 group. The Fish 4T1 group showed increased MPO

and NAG reduction in tumor site. No significant change was observed in the Hb concentration, however, increased by VEGF in Fish 4T1 group compared to other groups. Furthermore there was no change of TNF- α in the tumor site. This present study that showed different oils did not alter tumor growth and the number of metastases, but exert distinct effects on lipid metabolism, inflammatory and angiogenic processes effects, and cellular proliferation in murine mammary carcinoma 4T1 model.

Keywords: Breast cancer, dietary lipids, polyunsaturated fatty acids n-6 and n-3; model 4T1.

LISTRA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Incidência mundial de câncer de mama/ 100.000 mulheres no ano de 2012	24
Figura 2 - Vias metabólicas dos ácidos graxos n-6 e n-3.....	32
Figura 3 - Representação esquemática do delineamento experimental.....	40
Figura 4 – Evolução do peso corporal dos grupos sem tumor e com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos.....	51
Figura 5 - Distribuição de colesterol nas frações de lipoproteínas circulantes dos animais dos grupos sem tumor e com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos.....	53
Figura 6 - Teor de colesterol nas frações de lipoproteínas dos animais dos grupos sem tumor e com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos... ..	53
Figura 7 – Peroxidação lipídica hepática avaliada através da dosagem de TBARS. ..	56
Figura 8 - Curva de crescimento do carcinoma mamário murino 4T1 em grupos alimentados com dietas à base de diferentes óleos.....	56
Figura 9 - Fotomicrografias do carcinoma mamário murino 4T1.....	58
Figura 10 - Fotomicrografia do carcinoma mamário murinho 4T1, expressão imuno-histoquímica por CDC47.	60
Figura 11 - Análise dos níveis de MPO (A) e NAG (B) no tumor dos animais dos grupos alimentados com dietas à base de diferentes óleos.....	61

Figura 12 - Marcadores angiogênicos no tumor dos animais dos grupos alimentados com dietas à base de diferentes óleos.....62

Figura 13 - Níveis de TNF- α no tumor dos animais dos grupos alimentados com dietas à base de diferentes óleos.....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas oferecidas aos animais experimentais, caracterizadas pelas diferentes fontes lipídicas, elaboradas conforme AIN-93, com modificações por 100g.....	38
Tabela 2 - Composição de ácidos graxos (%) dos óleos de soja, canola, peixe e linhaça utilizados nas dietas.....	50
Tabela 3 - Níveis de colesterol e triglicerídeos no soro dos animais dos grupos sem tumor 4T1 e com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos.....	52
Tabela 4 - Conteúdo de lipídeos totais, colesterol e triglicerídeos no fígado dos animais dos grupos sem tumor 4T1 e com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos.....	54
Tabela 5 - Conteúdo de lipídeos totais, colesterol e triglicerídeos no ceco dos animais dos grupos sem tumor 4T1 e com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos.....	55
Tabela 6 - Índice de proliferação celular (%) a partir da expressão de CDC47 nos grupos com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARA	-	Ácido araquidônico
AGS	-	Ácidos graxos saturados
ALA	-	Alfa-linolênico
COX	-	Ciclooxigenase
DHA	-	Ácido docosahexaenóico
EPA	-	Ácido eicosapentaenico
FPLC	-	Fast Protein Liquid Chromatography
HE	-	Hematoxilina - Eosina
IGF-1	-	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	-	Interleucina-1
IL-6	-	Interleucina-6
INCA	-	Instituto Nacional de Câncer
MDA	-	Malondialdeído
MMP	-	Metaloproteinase matricial
MPO	-	Mieloperoxidase
MUFAS	-	Ácidos graxos monoinsaturados
n-3	-	Ômega 3
n-6	-	Ômega 6
NAG	-	N-Acetil-β-D-Glicosaminidase
NO	-	Oxido nítrico
PUFAS	-	Ácidos graxos poli-insaturados
TBARS	-	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF-β	-	Fator de Transformação do Crescimento- beta
TNF-α	-	Fator de Necrose Tumoral alfa
VEGF	-	Fator de crescimento vascular endotelial
WHO	-	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.2 Objetivo Geral	22
1.2.1 Objetivos Específicos	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1 Câncer de mama.....	24
2.1.1 Angiogênese	25
2.1.2 Resposta imune do hospedeiro na presença do tumor maligno.....	27
2.2 Lipídeos da dieta	30
2.2.1 Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6	30
2.3 Lipídeos dietéticos x câncer de mama	33
2.4 Modelos experimentais.....	35
2.4.1 Modelo experimental carcinoma mamário 4T1.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Aspectos éticos	37
3.2 Animais.....	37
3.3 Dietas	37
3.3.1 Fonte dos óleos.....	38
3.4 Tumor Experimental de células 4T1	38
3.5 Delineamento Experimental	39
3.7 Avaliação do crescimento tumoral.....	40
3.8 Necropsia dos animais e coleta de materiais	41
3.9 Análise de ácidos graxos.....	41
3.9.1 Hidrólise e metilação de lipídeos.....	41
3.10 Avaliação do metabolismo lipídico	42
3.10.1 Determinação das concentrações de colesterol total sérico.....	42
3.10.2 Determinação das concentrações de triglicerídeos sérico	43
3.10.3 Separação de lipoproteínas e determinação de colesterol, triglicerídeos e proteínas nas frações.....	43
3.10.4 Quantificação dos níveis de lipídeos hepáticos.....	44
3.10.5 Quantificação dos níveis de lipídeos cecais.....	44
3.11 Avaliação da peroxidação lipídica- TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).....	45

3.12	Análise de histopatologia em hematoxilina e eosina	46
3.13	Imuno-histoquímica para identificação do anticorpo CDC47	46
3.13.1	Análise de proliferação celular	46
3.14	Extração de hemoglobina	47
3.15	Dosagem da atividade enzimática: Mieloperoxidase (MPO) e de <i>N</i> -Acetil- β - <i>D</i> -Glicosaminidase (NAG)	47
3.16	Quantificação de VEGF e TNF- α	48
3.17	Análise estatística	49
4	RESULTADOS	50
4.1	Determinação do perfil de ácidos graxos nos óleos	50
4.2	Parâmetros de crescimento.....	51
4.3	Metabolismo lipídico	52
4.4	Peroxidação lipídica	55
4.5	Avaliação do crescimento tumoral.....	56
4.6	Análise morfológica do tumor primário e metástases	57
4.7	Avaliação do índice de proliferação celular por CDC47	59
4.8	Infiltração de macrófagos e neutrófilos nos tumores	61
4.9	Concentração de hemoglobina, VEGF e TNF α nos tumores	61
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO A	80

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e entre as mulheres é o mais comum, representando, nos países ocidentais, uma das principais causas de morte. As estatísticas indicam o aumento de sua frequência tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento (WHO, 2013).

A maioria das mortes por câncer de mama resulta da doença metastática descontrolada. Embora o câncer de mama possa espalhar-se para outras partes do corpo dentro de três anos, após o diagnóstico inicial, em cerca de 10 a 15% dos casos, as metástases tendem a ocorrer mais tardiamente, 10 anos ou mais após a detecção do tumor primário. As terapias incluindo cirurgia, terapia hormonal, quimioterapia, radiação e combinações seletivas não têm sido completamente efetivas no tratamento do câncer de mama metastático (ALI *et al.*, 2003).

Os principais fatores de risco para desenvolvimento de câncer de mama estão relacionados com idade avançada, à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, nuliparidade, anticoncepcionais orais), história familiar e pessoal, hábitos de vida e influências ambientais (RIUL e SILVA, 2011; INCA, 2014). Dentre eles, os fatores dietéticos podem ser modificadores importantes no risco dessa neoplasia.

Estudos prévios têm evidenciado que dietas ricas em PUFAS n-3 podem reduzir a taxa de crescimento tumoral e metástases em vários modelos experimentais (CAVE, 1991; CAVE, 1997; CHO *et al.*, 2010; HARDMAN e ION, 2008; ROSE *et al.*, 1995; ROSE *et al.*, 1996; TAPIERO *et al.*, 2002). No entanto, ainda não tem sido documentado o efeito da dieta com quantidades recomendadas de lipídeos e baixa relação de PUFAS n-6/n-3 no desenvolvimento e na disseminação metastática do carcinoma mamário, somente tem sido descrito a importância dessa relação no risco de desenvolver vários tipos de câncer, entre eles o câncer de mama (KANG e LIU, 2013; DE LORGERIL e SALEN, 2012).

Modelos experimentais são ferramentas úteis para se avaliar os efeitos de determinados fármacos e/ou nutrientes sobre o desenvolvimento neoplásico, sendo

um desses modelos o carcinoma mamário 4T1. A linhagem celular do tumor mamário 4T1 em camundongo é um dos poucos modelos de câncer de mama com capacidade de metastatizar de forma eficiente para sítios distante, semelhante à espécie humana. Estas características semelhantes, como a disseminação espontânea em curto período, permitem estudos direcionados a terapias para o câncer em estadio avançado (CARVALHO *et al.*, 2011).

São poucos os trabalhos na literatura que estudaram a influência da modificação do teor de lipídeos da dieta em modelo de carcinoma mamário 4T1. Kim *et al.* (2011) mostraram que o excesso de gordura na dieta (45 ou 60% do total de calorias) aumenta o crescimento do tumor mamário 4T1, número de metástases e diminui a taxa de sobrevivência de camundongos resistentes à obesidade.

No trabalho de De Lorenzo *et al.* (2011), a restrição calórica (déficit de 40% de kcal/semana) reduziu o crescimento e o número total de metástases dos tumores 4T1, diminuiu a proliferação celular e a angiogênese, aumentou a apoptose, reduziu os níveis de insulina, leptina, IGF-1 e de proteína ligadora de IGF-1 tipo 3 e aumentou os níveis de adiponectina nos tumores. Além disso, é descrito que assim como a restrição calórica, a modulação do perfil de ácidos graxos na dieta pode ter efeito anti-inflamatório muito potente (JOLLY, 2005).

Com base no exposto, acredita-se que o consumo de diferentes óleos da dieta, com baixa relação n-6/n-3, reduza o desenvolvimento neoplásico ao inibir os processos inflamatório, angiogênico e proliferativo no carcinoma mamário murino 4T1.

1.2 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de diferentes óleos, contendo baixa relação n-6/n-3, no desenvolvimento neoplásico e na disseminação metastática do carcinoma mamário murino 4T1.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Analisar o perfil de ácidos graxos dos óleos utilizados na composição das dietas;
- Avaliar os parâmetros de crescimento, determinados pela evolução do peso corporal e consumo alimentar, dos animais sem tumor e com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos durante o período experimental;
- Avaliar o metabolismo lipídico dos animais sem tumor e com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos, pela mensuração de colesterol total sérico e frações, triglicérido sérico, além do conteúdo de lipídeos hepático e cecal;
- Avaliar a peroxidação lipídica hepática dos animais sem tumor e com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos, por meio da dosagem de TBARS;
- Caracterizar o crescimento do tumor em animais alimentados com dietas à base de diferentes óleos;
- Realizar análise histopatológica para caracterização do tumor primário e pesquisa de metástases nos pulmões, rins, fígado, baço e coração, e imuno-histoquímica para avaliação da proliferação celular por CDC47 no tumor dos animais alimentados com dietas à base de diferentes óleos;

- Avaliar o processo inflamatório, por meio das dosagens de NAG e MPO, angiogênicos, através dos níveis de VEGF e hemoglobina, e a participação da citocina TNF- α nas amostras de tumor dos animais alimentados com dietas à base de diferentes óleos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer de mama

O câncer da mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos, sendo o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo (WHO, 2013; INCA, 2014). As taxas de incidência variam quase quatro vezes entre as regiões do mundo (**Figura 1**), provavelmente devido a diferentes exposições aos vários agentes ambientais e variáveis, além de estilos de vida desiguais. É classificado como quinta causa de morte por câncer em geral, sendo que em 2012 foram mais de 522 mil mortes (WHO, 2012). No Brasil, para o ano de 2014, são esperados aproximadamente 57 mil novos casos, sendo a incidência somente no estado de Minas Gerais de 5 210 por 100 mil habitantes (INCA, 2014).

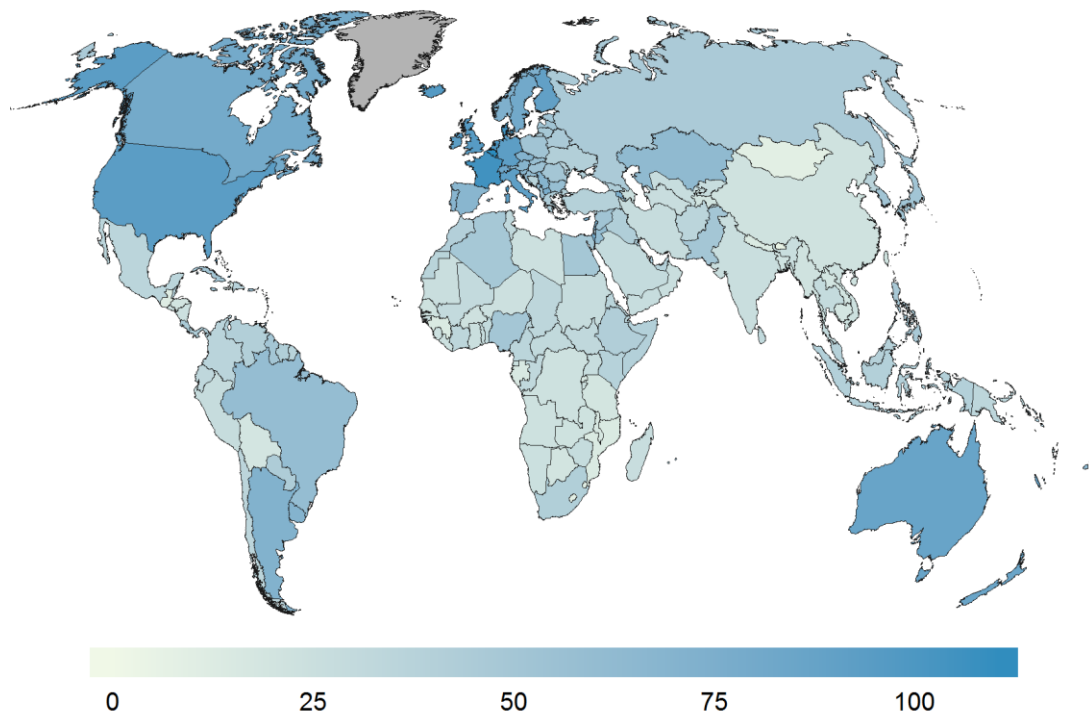


Figura 1 - Incidência mundial de câncer de mama em 2012. Estimativa da taxa de incidência padronizada para idade /100.000 mulheres. (Fonte: GLOBOCAN, 2012)

O câncer de mama é constituído por neoplasias que possuem história natural diversa, associado a características histológicas e biológicas distintas, e resposta variável às terapias convencionais, devido ao fato de ser doença altamente heterogênea (WEIGELT *et al.*, 2010). Caracteriza-se pelo acúmulo de diversas alterações genéticas e epigenéticas, expressão de marcadores tumorais, oncogenes, modificação em reguladores chaves do ciclo celular, presença de células tronco tumorais e/ou células progenitoras, entre outras (WEIGELT *et al.*, 2010; ZANETTI *et al.*, 2011). As neoplasias mamárias frequentemente se originam no epitélio glandular, e posteriormente as células adquirem características invasivas, infiltram-se no estroma, podendo invadir vasos linfáticos e/ou sanguíneos (ZANETTI *et al.*, 2011). Ao infiltrarem-se nos vasos sanguíneos da glândula mamária, as células neoplásicas podem mover-se na corrente sanguínea e colonizar órgãos distantes, dando origem às metástases. Os órgãos em que mais frequentemente ocorrem metástases são ossos, pulmão e fígado (ANGULO *et al.*, 2013).

A maior parte das mortes por esse tipo de câncer é resultado da doença metastática descontrolada. Ainda que possa espalhar-se para outras partes do corpo dentro de três anos após o diagnóstico inicial em cerca de 10 a 15% dos casos, as metástases tendem a ocorrer mais tardiamente, 10 anos ou mais após a detecção do tumor primário. As terapias incluindo cirurgia, terapia hormonal, quimioterapia, radiação e combinações seletivas não têm sido completamente efetivas no tratamento do câncer de mama metastático (ALI *et al.*, 2003).

2.1.1 Angiogênese

A angiogênese ou neovascularização é o processo pelo qual novos vasos sanguíneos são gerados a partir de capilares já existentes e que participa em diversos processos fisiológicos e patológicos incluindo o crescimento tumoral e de metástases (GONZALEZ *et al.*, 2000; GARCIA e KANDEL, 2012). É considerada mecanismo de múltiplos passos controlado por fatores ativadores e inibidores, que se desenvolve quando algum estímulo induz a mudança das células endoteliais de estado de quiescência para fenótipo de replicação e invasão (GONZALEZ *et al.*, 2000). Representa processo fundamental para o desenvolvimento tumoral em

virtude de fornecer aporte nutricional às células neoplásicas proliferantes e estabelecer condições favoráveis à disseminação metastática, sendo citada como fator prognóstico independente de grande importância na sobrevida global e tempo livre da doença (LOPES-COSTA *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2007).

Quando os tumores sólidos atingem volume de 1 a 2 mm², seu crescimento passa a ser diretamente dependente da angiogênese. O processo de progressão de célula normal para a malignidade envolve, dentre diversos mecanismos, a capacidade de estimular a angiogênese, por meio do aumento da secreção de fatores angiogênicos e diminuição dos inibidores (SOUZA *et al.*, 2007).

As células neoplásicas possuem a capacidade de produzir fatores angiogênicos que progressivamente ultrapassam a capacidade antiangiogênica de algumas células do sistema imunitário (GRAÇA *et al.*, 2004). Tem sido caracterizada ampla variedade de fatores de crescimento e citocinas como estimuladores deste processo, como os fatores de crescimento fibroblástico, de crescimento vascular endotelial (VEGF) e de crescimento celular endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF) (SOUZA *et al.*, 2007). O VEGF, no entanto, é considerado o mais importante na angiogênese das neoplasias (GRAÇA *et al.*, 2004).

O VEGF foi descoberto em 1989 e é responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, iniciando a angiogênese. Atua em várias etapas do processo angiogênico, como mitogênese de células endoteliais, mediação da atividade e secreção de enzimas proteolíticas, inibição da apoptose e modulação da migração de células endoteliais, entre outras (FERRARA, 2005). Assim sendo, a determinação dos níveis de VEGF no tumor têm sido utilizado como índice de atividade angiogênese (BELO *et al.*, 2004).

A supressão da angiogênese anormal torna-se estratégia terapêutica importante no tratamento do câncer (CAO *et al.*, 2002), visto que se destaca como fator determinante no crescimento das neoplasias.

A mensuração quantitativa da angiogênese também pode ser obtida pela dosagem do conteúdo de hemoglobina (OVIEDO-SOCARRÁS *et al.*, 2014) sendo uma técnica

bem estabelecida do índice vascular em vários tecidos (TEIXEIRA *et al.*, 1999; BELO *et al.*, 2004). Dessa forma, a medição simultânea do teor de hemoglobina total e VEGF podem ajudar na interpretação das medições de oxigenações vasculares, uma vez que pode identificar tumores com vascularização insuficiente (BROWN *et al.*, 2009).

2.1.2 Resposta imune do hospedeiro na presença do tumor maligno

Em parte, a sobrevivência das células tumorais depende da capacidade de síntese de microcirculação na região tumoral, por meio de fatores angiogênicos. A progressão do tumor envolve alterações genéticas, como perda de função dos genes supressores de tumor e ativação de oncogenes que favorecem a tumorigênese, resultando no desequilíbrio da proliferação celular (WAITZBERG *et al.*, 2011). Além disso, a presença de tumor provoca resposta inflamatória sistêmica, que pode levar a anorexia, alterações metabólicas e neuroendócrinas (SILVA *et al.*, 2012).

Vários mediadores participam ativamente da resposta inflamatória, dentre eles encontram-se os mediadores lipídicos (tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos) que participam do processo de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, e as citocinas, interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que induzem efeitos locais como expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, facilitando migração de leucócitos, e efeitos sistêmicos (GARÓFOLO e PETRILLI, 2006).

Entre os efeitos sistêmicos observados em pacientes com câncer são descritos alterações no metabolismo de nutrientes, como aumento de triglicerídeos circulantes, apesar da maior utilização de ácidos graxos. As concentrações plasmáticas de glicerol apresentam-se elevadas, devido ao aumento da lipólise e lipogênese. Embora não existam evidências da diminuição dos níveis da enzima lipase lipoproteica no tecido adiposo, sabe-se que existe aumento de duas vezes dos níveis de mRNA para lipase hormônio sensível, o que sugere aumento na regulação na hidrólise do triacilglicerol (THOMPSON *et al.*, 1993).

Os mecanismos gerais relacionados ao processo de carcinogênese envolvem secreção de citocinas, hormônios reguladores e contra-reguladores. Entre as principais citocinas que participam desse processo, destacam-se TNF- α e as IL-1 e IL-6. O TNF- α é uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias, atua no início da resposta imune regulando a cascata de citocinas durante a resposta inflamatória, estando envolvido em eventos locais e sistêmicos (MAKHATADZE, 1998). É peptídeo secretado por macrófagos ativos, cuja secreção é estimulada pela hipóxia tecidual e tem se mostrado potente estimulador da angiogênese em ensaios *in vivo* (LOPES-COSTA *et al.*, 2007).

O TNF- α age como promotor tumoral endógeno, pois aumenta os níveis de reguladores positivos do ciclo celular. Pode ainda favorecer o dano ao DNA por aumento da síntese de óxido nítrico (NO), bem como promover o remodelamento tumoral por estimular a atividade dos fibroblastos e macrófagos, a mobilidade celular e invasão tumoral pela indução da metaloproteinase de matriz (MMP) (LOCH-NECKEL *et al.*, 2008).

Especificamente no câncer de mama, estudos em modelos animais mostraram que TNF- α exerce atividade pré-cancerosa, causada por meio de um conjunto diversificado de mecanismos (HAMAGUCHI *et al.*, 2011; WARREN *et al.*, 2009). Outros estudos têm mostrado que o TNF- α foi altamente expresso em tumores de mama, e que a incidência de expressão dessa citocina foi significativamente aumentada em estádios avançados (SORIA *et al.*, 2011). Além disso, em virtude de suas ações inflamatórias como indutor de quimiocinas inflamatórias, o TNF- α ocasionou indiretamente elevada presença de subpopulações de leucócitos pró-tumoral em tumores (BEN-BARUCH, 2012).

Estudos têm demonstrando importância crescente da atuação de células do sistema imune e seus produtos no tecido neoplásico. Características do infiltrado inflamatório que adentra o tumor interferem no seu desenvolvimento e progressão (ONUICHIC e CHAMMAS, 2012). O reconhecimento de antígenos tumorais envolve vários tipos celulares e moléculas do sistema imunológico. Em tecidos neoplásicos são encontrados células da imunidade inata, como macrófagos, neutrófilos, células,

células dendríticas e as células *Natural Killer*, e células da imunidade adaptativa (linfócitos T e B) (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010).

Entre as células componentes do sistema imune que infiltram o tumor, a participação de macrófagos tem ganhado importância e complexidade crescentes. Os macrófagos teciduais são derivados de monócitos circulantes, liberam citocinas que agem em células alvo e induzem o recrutamento protetor dos leucócitos. Os macrófagos são importantes intermediadores celulares potenciais da resposta antitumoral. Entretanto, embora possam destruir células neoplásicas, estão envolvidos em processos de inflamação crônica e associados à progressão tumoral e metástase (COUSSENS e WERB, 2002).

Outras células do sistema imunológico que também afetam tumorigênese são os neutrófilos. Eles são a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos, células efetoras primárias na inflamação aguda e células alvo de tumor (SOUTO *et al.*, 2011). Os neutrófilos podem desempenhar ambas as funções de promoção do tumor e tumoricida, dependendo do seu estado de diferenciação (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010).

No câncer de mama, os macrófagos podem constituir até 50% da massa de células (OBEID *et al.*, 2013). Vários estudos clínicos têm demonstrado correlação entre o prognóstico do câncer de mama e o número de macrófagos na massa tumoral (OBEID *et al.*, 2013). Em relatório, Bingle *et al.* (2002) mostraram aumento da densidade de macrófagos associada a pior prognóstico em mais de 80% dos casos de câncer de mama. Da mesma forma, a hipóxia no microambiente tumoral estimula os macrófagos a produzirem mais VEGF e suprimir as respostas imunes de células T, assim, aumentam a evasão de células tumorais e, finalmente, metástases (OBEID *et al.*, 2013). Além disso, tem sido sugerido possível papel das células do câncer de mama induzindo neutrófilos pró-tumorais a produzir oncostatina M. A oncostatina M, posteriormente, interage com células tumorais para induzir a expressão do VEGF, alimentando assim a angiogênese tumoral (HOUGHTON, 2010).

2.2 Lipídeos da dieta

Os lipídeos da dieta têm sido propostos por desempenhar papel fundamental na etiologia do cancer da mama. Evidências demonstram que a quantidade e/ou o subtipo de gordura pode influenciar o processo de carcinogênese (MAKAREM *et al.*, 2013), visto que diferentes tipos de ácidos graxos têm sido relacionados por desempenharem papéis distintos em relação a essa doença (CIBEIRA e GUARAGNA, 2006).

Os lipídeos dietéticos são compostos de matriz complexa de ácidos graxos, com propriedades químicas e biofísicas únicas que fundamentam seu impacto sobre a saúde e doença. Os ácidos graxos são classificados em ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos monoinsaturados (MUFAS) e ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS). Dentre os PUFAS, existem duas classes principais: os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (n-3) e ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 (n-6) (MACLENNAN e MA, 2010).

Alguns óleos vegetais, especialmente os óleos de canola e linhaça, e o óleo de peixe têm se destacado por apresentarem varios efeitos benéficos para o organismo, uma vez que eles são importantes fontes de PUFAS. O óleo de canola contém baixos níveis de AGS, e altos níveis de MUFAS, especialmente ácido oleico e PUFAS, com destaque para os ácidos graxos poli-insaturados n-3 (CHO *et al.*, 2010). O óleo de linhaça, por sua vez tem baixo conteúdo de AGS, moderado em MUFA e é rico em PUFAS, especialmente ácidos graxos n-3. É usado mais como suplemento nutricional, uma vez que não é alimento consumido tradicionalmente na maior parte do mundo (KONTOGIANNI *et al.*, 2013). Já o óleo de peixe, em geral, é mistura de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), pertencentes à família n-3 (MACLENNAN e MA, 2010).

2.2.1 Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6

Os ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6 são ácidos graxos essenciais, imprescindíveis ao organismo, que não podem ser sintetizados pelo mesmo e que,

logo, devem ser oferecidos na alimentação. Os principais ácidos graxos da família n-3 são o alfa-linolênico (ALA) (C18:3 $\Delta^{9,12,15}$ – 18 carbonos e 3 insaturações), o EPA (C20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$ – 20 carbonos e 5 insaturações) e DHA (C22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ – 22 carbonos e 6 insaturações). Já os ácidos graxos da família n-6 mais importantes são o linoleico (LA) (C18:2 $\Delta^{9,12}$ – dezoito carbono e 2 insaturações) e o araquidônico (ARA) (C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$ – 20 carbonos e 4 insaturações) (MACLENNAN e MA, 2010).

A importância dos ácidos graxos n-6 é conhecida desde os meados de 1930. Em contrapartida, os ácidos graxos n-3, apenas após o ano de 1980, tiveram a sua necessidade associada à prevenção, principalmente, de distúrbios neurológicos e visuais (CARMO e CORREIA, 2009). São metabolicamente diferentes e possuem funções fisiológicas opostas, logo o equilíbrio nutricional é essencial para se conseguir a homeostasia e desenvolvimento normal do organismo. Os ácidos graxos n-6 estão presente de forma considerável nos óleos vegetais como óleo de girassol, milho, soja, algodão, entre outros. Já os ácidos graxos n-3 são encontrados em quantidades consideráveis em sementes oleaginosas como canola, soja e linhaça, além do óleo de peixe (PERINI *et al.*, 2010).

Alto teor de n-6 na dieta favorece formação elevada de eicosanóides a partir do AA. As cicloxigenases (COX-1 e COX-2) e a lipoxigenase catalisam a transformação do AA em prostaglandinas e tromboxanos da série 2 e leucotrienos da série 4, que participam de inúmeros processos inflamatórios no organismo (KANG e LIU, 2013). A ingestão, por sua vez, de ácidos graxos poli-insaturados n-3 que são metabolizados a eicosanóides da série ímpar, gera efeitos anti-inflamatórios (**Figura 2**) (SURETTE, 2008).

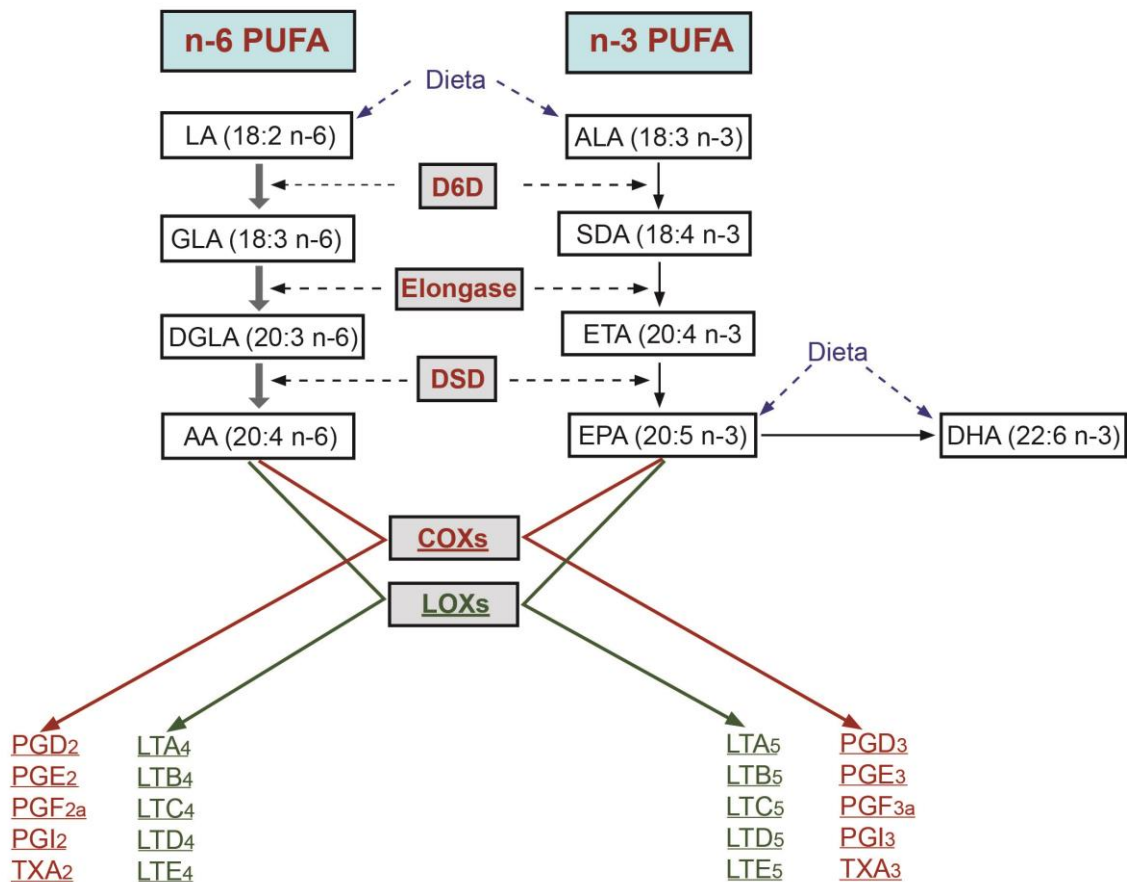


Figura 2 - Vias metabólicas dos ácidos graxos n-6 e n-3. Dessaturase (D6D) Cicloxigenases (COXs), lipoxigenases (LOXs) prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT), tromboxanos (TX). (Adaptado de KANG e LIU, 2013).

Acredita-se que antes do advento da industrialização, as pessoas consumiam na dieta uma razão de n-6/n-3 em torno de 1:1 a 2:1, devido à ingestão abundante de vegetais e de alimentos de origem marinha, contendo ácidos graxos poli-insaturados n-3. Com a industrialização e consequente mudança dos hábitos alimentares, caracterizada por aumento no consumo de óleos refinados e redução da ingestão de frutas e verduras, houve aumento do consumo de ácidos graxos poli-insaturados n-6, e nas últimas décadas, tem-se determinado, em diversos países, que a ingestão média de ácidos graxos tem sido de razões n-6/n-3 que estão entre 10:1 a 20:1, ocorrendo registros de até 50:1 (SIMOPOULOS, 2004).

Há relatos de que a razão de ácidos graxos n-6 e n-3 na dieta assume grande importância na nutrição humana, resultando na recomendação de 2 a 4:1, respectivamente, para a população em geral (RIEDIGER *et al.*, 2008).

Os ácidos graxos n-3 têm sido amplamente utilizados na prevenção e no tratamento do câncer, sendo os mecanismos propostos pelos quais eles podem modificar o processo de carcinogênese: supressão da biossíntese dos eicosanoides derivados do ácido araquidônico, o que resulta em alteração da resposta imunológica às células tumorais e modulação da inflamação; impacto na proliferação celular, apoptose, disseminação de metástases e angiogênese; influência na atividade do fator de transcrição nuclear, expressão gênica e nas vias de transdução de sinais, levando a mudanças no metabolismo celular, crescimento e diferenciação das células; alteração no metabolismo do estrogênio, o que gera menor estímulo ao crescimento das células hormônio dependente; aumento ou diminuição da produção de radicais livres; e envolvimento em mecanismos diretamente relacionados à sensibilidade à insulina e à fluidez das membranas, embora esses mecanismos tenham sido menos estudados até o momento (CARMO e CORREIA, 2009).

2.3 Lipídeos dietéticos x câncer de mama

O teor de lipídeos da dieta pode aumentar o risco de desenvolvimento do câncer de mama. Estudos epidemiológicos têm mostrado que dieta rica em gordura (independentemente do tipo de gordura) pode induzir obesidade em humanos e roedores (BUETTNER *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2005) e aumentar o risco de desenvolver câncer de mama em mulheres na pós-menopausa (CARMICHAEL, 2006).

Os mecanismos postulados pelos quais as gorduras alimentares podem exercer efeitos moduladores sobre a iniciação e progressão do câncer, embora não totalmente compreendido, incluem o seu impacto sobre o estresse oxidativo, alteração do metabolismo hormonal, modulação de transdução de sinalização celular e regulação da expressão gênica (MAKAREM *et al.*, 2013).

Poucos trabalhos na literatura estudaram a influência da modificação do teor de lipídeos da dieta em modelo de carcinoma mamário 4T1. O trabalho de Kim *et al.* (2011) mostrou que o excesso de gordura na dieta (45 ou 60% do total de calorias) aumenta o crescimento do tumor mamário 4T1, a metástase de células e a mortalidade em camundongos resistentes à obesidade. Houve aumento da expressão de proteínas envolvidas na regulação da progressão do ciclo celular, aumento na infiltração de células do sistema imune e na angiogênese dos tecidos tumorais, aumento da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM), além de aumento nos níveis séricos de citocinas inflamatórias em comparação com animais alimentados com dieta controle (10% das calorias). Os autores sugeriram que o elevado consumo de gordura na dieta poderia aumentar a progressão do câncer de mama, mesmo em indivíduos com peso corporal saudável e que a substituição da gordura da dieta por carboidratos poderia retardar a progressão da doença, reduzindo a mortalidade.

De Lorenzo *et al.* (2011) descreveram que a restrição calórica (déficit de 40% de kcal/semana) reduziu o crescimento e o número total de metástases dos tumores 4T1, diminuiu a proliferação e a angiogênese, aumentou a apoptose, reduziu os níveis de insulina, leptina, IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina) e de proteína ligadora de IGF-1 tipo 3 e aumentou os níveis de adiponectina nos tumores. Os tumores de camundongos com restrição calórica apresentaram menores níveis de TGF- β (fator de crescimento transformante *beta*), menor deposição intratumoral de colágeno IV e reduzida invasividade devido à diminuição na secreção de metaloproteinase-9 de matriz. Os autores sugeriram que alterações metabólicas e de sinalização induzidas pela restrição calórica poderiam afetar o estroma e as células tumorais, resultando em um microambiente que pudesse impedir a proliferação de tumores da mama e de suas metástases.

Diante disso, a restrição calórica como a modulação do perfil de ácidos graxos na dieta pode ter efeito anti-inflamatório potente (JOLLY, 2005). A COX-2 é induzida em diversos tipos celulares por estímulos pró-inflamatórios, e tem múltiplos efeitos que podem favorecer a tumorigênese. A regulação positiva de COX-2 e o consequente aumento dos eicosanoides da série par estão envolvidos na carcinogênese da mama, promoção da angiogênese, invasão tumoral e metástase.

Por outro lado, os ácidos graxos poli-insaturados da família n-3, especialmente ácido ALA, EPA e DHA têm efeito anti-inflamatório que suprimem os níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-6 (PAYVANDI *et al.*, 2004).

Desta forma, estudos têm mostrado que o consumo de dieta enriquecida com esses ácidos graxos confere efeitos cardiovasculares benéficos e colabora com a prevenção e o tratamento de cânceres humanos (TAPIERO *et al.*, 2002; CHO *et al.*, 2010; MACLENNAN e MA, 2010). Dentre os mecanismos propostos, é descrito maior susceptibilidade a danos peroxidativos, levando, dessa forma, à morte celular (MACLENNAN e MA, 2010). A peroxidação lipídica, que induz a apoptose (HARDMAN *et al.*, 2002), é outro mecanismo potencial pelo qual esses ácidos graxos suprimem a proliferação celular em tumores, além de síntese de mediadores lipídicos potentes, que regularia a inflamação (CALDER, 2009).

2.4 Modelos experimentais

Para o estudo do câncer de mama, têm sido amplamente utilizados modelos experimentais. São ferramentas úteis para se avaliar os efeitos de determinados fármacos e/ou nutrientes sobre o desenvolvimento neoplásico. O estudo de neoplasias em modelos animais facilita a avaliação e melhor compreensão da biologia dos tumores, ao mesmo tempo em que constitui instrumento apropriado para a investigação de efeitos anti-inflamatório, anti-angiogênico e antiproliferativo de substâncias com potencial antineoplásico.

2.4.1 Modelo experimental carcinoma mamário 4T1

A linhagem celular do tumor mamário 4T1 em camundongo é dos poucos modelos de câncer de mama com capacidade de metastatizar de forma eficiente para sítios que acometem a espécie humana. Trata-se de um tumor altamente invasivo, pouco imunogênico e com características metastáticas que acometem diversos órgãos, incluindo pulmões, fígado, ossos e cérebro. Metástases pulmonares, ósseas e cerebrais são observadas após cerca de duas semanas de inoculação subcutânea das células neoplásicas (PULASKI e OSTRAND-ROSENBERG, 2001).

Morfologicamente, o carcinoma mamário 4T1 apresenta proliferação epitelial maligna em arranjo sólido, caracterizado pela proliferação de células pleomórficas e elevado índice mitótico. São descritos diferentes estudos terapêuticos com utilização desse modelo na caracterização de eventos celulares e moleculares durante a progressão neoplásica, sugerindo sua utilização como modelo experimental de grande relevância clínica para o estudo da doença em seres humanos (PULASKI e OSTRAND-ROSENBERG, 2001; BALIGA *et al.*, 2005).

Trabalhos realizados por Carvalho *et al.* (2011) mostraram que o perfil fenotípico do carcinoma mamário murino 4T1 em camundongos Balb/c apresenta positividade para o receptor de estrógeno, elevado índice de marcação para o anticorpo CDC47 e citoqueratina AE1/AE3 e negatividade para receptor de progesterona e fator de crescimento epidérmico humano (Her-2). São observadas metástases no fígado e no pulmão, sendo que o animal com maior tempo de sobrevivência (37 dias) também apresentou focos metastáticos no coração. Os resultados obtidos retificaram os dados da literatura que demonstram que a linhagem das células tumorais 4T1 é indicada como modelo experimental para o estudo do câncer de mama na mulher. Estas características semelhantes, como a disseminação espontânea em curto período, permitem melhor estudo direcionado a terapias para o câncer em estadios avançados (CARVALHO *et al.*, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este trabalho foi realizado de acordo com os princípios éticos para uso de animais em experimentação e após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) sob o número de protocolo 126/2012 (**ANEXO A**).

3.2 Animais

Foram utilizados 56 camundongos fêmeas Balb/c, com 6 a 7 semanas de idade, pesando aproximadamente 20 g, fornecidos pelo Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciência Biológicas em gaiolas apropriadas, divididos em grupos de 7 animais, com controle artificial de ciclos de luminosidade (12 horas de luz/12 horas de escuro). Ração e água foram fornecidas aos animais *ad libitum*.

3.3 Dietas

As dietas foram preparadas segundo o padrão do *American Institute of Nutrition* (AIN-93) descrito por Reeves *et al.* (1993). A dieta do grupo controle foi formulada usando-se óleo de soja. As demais dietas foram elaboradas utilizando-se óleo de canola, óleo de peixe ou óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja, por estes óleos conterem diferentes proporções de PUFAS n-6 e n-3 (MARTIN *et al.*, 2006). A composição final das dietas está sumarizada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição das dietas oferecidas aos animais experimentais, caracterizadas pelas diferentes fontes lipídicas, elaboradas conforme AIN-93, com modificações por 100g

INGREDIENTES	GRUPO CONTROLE	GRUPO CANOLA	GRUPO PEIXE	GRUPO LINHAÇA
<i>Caseína</i>	14,00	14,00	14,00	14,00
<i>Amido de milho</i>	46,57	46,57	46,57	46,57
<i>Sacarose</i>	10,00	10,00	10,00	10,00
<i>Maltodextrina</i>	15,50	15,50	15,50	15,50
Óleo				
Soja	4,00	-	-	-
Canola	-	4,00	-	-
Peixe	-	-	4,00	-
Linhaça	-	-	-	4,00
<i>Celulose</i>	5,00	5,00	5,00	5,00
<i>Mistura mineral</i>	3,50	3,50	3,50	3,50
<i>Mistura vitamínica</i>	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>Bitartarato de colina</i>	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>BHT</i>	0,008	0,008	0,008	0,008
<i>Metionina</i>	0,18	0,18	0,18	0,18

Fonte: (REEVES *et al.*,1993)

Os ingredientes foram misturados, posteriormente acrescentou-se água filtrada para formar os pellets ofertados aos animais.

3.3.1 Fonte dos óleos

Os óleos utilizados para a formulação das dietas foram obtidos do Mercado Central de Belo Horizonte (Belo Horizonte - Minas Gerais).

3.4 Tumor Experimental de células 4T1

As células neoplásicas 4T1 foram cedidas pelo Laboratório de Farmacologia de Substâncias Antitumorais do Departamento de Farmacologia ICB/UFMG.

As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's essential médium) suplementadas com soro fetal bovino (FCS) a 10%, penicilina a 100 µg/mL e estreptomicina a 100 µg/mL, mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

Para a obtenção do carcinoma mamário sólido de células 4T1 inoculou-se 2,5x10⁶ células/50µL no tecido subcutâneo do flanco esquerdo dos animais (PULASKI e ROSENBERG, 1998).

3.5 Delineamento Experimental

Inicialmente os animais foram distribuídos de forma homogênea quanto ao peso corporal em quatro grupos, Controle, Canola, Peixe e Linhaça, com 14 animais cada e alimentados durante 30 dias com as dietas correspondentes sob as mesmas condições. No 30º dia, sete animais de cada grupo foram inoculados com células 4T1 (2,5 x 10⁶) e reagrupados:

Grupo 1: Controle (alimentados com dieta contendo 4% de óleo de soja)

Grupo 2: Canola (alimentados com dieta contendo 4% de óleo de canola)

Grupo 3: Peixe (alimentados com dieta contendo 4% de óleo de peixe)

Grupo 4: Linhaça (alimentados com dieta contendo 4% de óleo de linhaça)

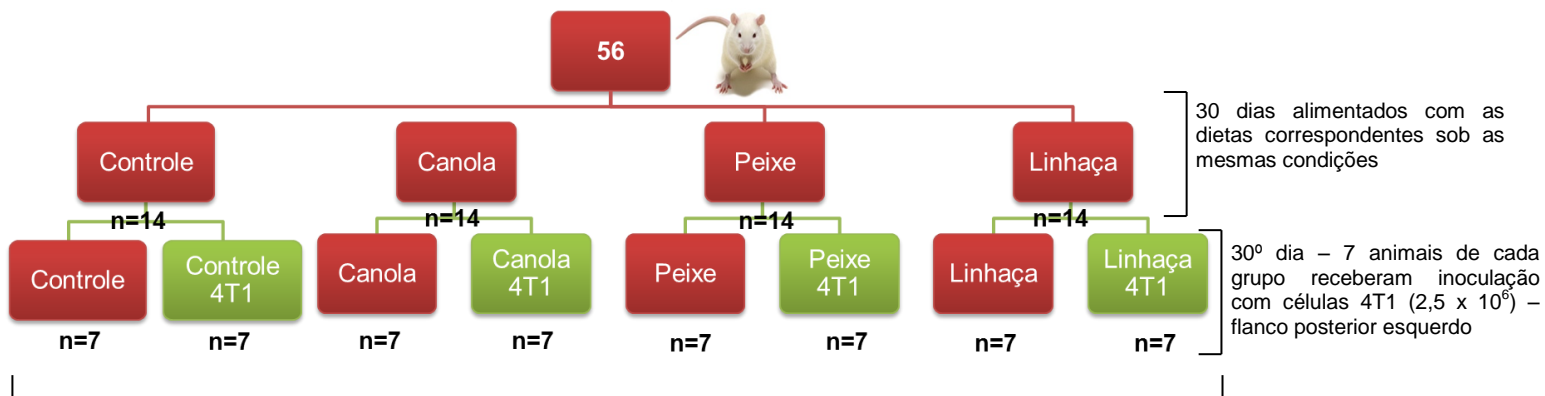
Grupo 5: Controle 4T1 (alimentados com dieta contendo 4% de óleo de soja e inoculados com células do carcinoma mamário murino 4T1).

Grupo 6: Canola 4T1 (alimentados com dieta contendo 4% de óleo de canola e inoculados com células do carcinoma mamário murino 4T1).

Grupo 7: Peixe 4T1 (alimentados com dieta contendo 4% de óleo de peixe e inoculados com células do carcinoma mamário murino 4T1).

Grupo 8: Linhaça 4T1 (alimentados com dieta contendo 4% de óleo de linhaça e inoculados com células do carcinoma mamário murino 4T1).

Após a inoculação os camundongos continuaram a receber a respectiva dieta até o final do experimento, que teve duração de 50 dias. (**Figura 3**).



Todo período experimental os animais foram alimentados com as dietas correspondentes sob as mesmas condições e 50º dia eutanasiados

Figura 3 - Representação esquemática do delineamento experimental

3.6 Evolução ponderal e ingestão alimentar

O peso corporal e a ingestão alimentar foram registrados semanalmente por gravimetria. Para determinação da ingestão alimentar, quantificou-se a dieta ofertada, a sobra de dieta na parte superior da gaiola e o resto de dieta contida no fundo da gaiola (obtido por peneiração da maravalha). A diferença entre a quantidade de dieta ofertada e a soma da sobra e o resto forneceu o consumo semanal de dieta. Obteve-se a estimativa de ingestão alimentar semanal por animal, pela divisão entre o consumo semanal de cada gaiola pelo número de animais presentes nela.

3.7 Avaliação do crescimento tumoral

Para a avaliação do desenvolvimento neoplásico foram realizadas mensurações da massa tumoral (em duas medidas), mediante o uso de um paquímetro após a inoculação do tumor, com repetições em um intervalo de 48 e 48 horas entre o período após inoculação e eutanásia dos animais. Ao final do experimento o volume foi calculado utilizando a fórmula:

$$\text{Volume}_{\text{tumor}} (\text{mm}^3) = (\text{comprimento} \times \text{altura}^2) \div (2) \quad (\text{FULZELE } et \text{ al.}, 2006)$$

3.8 Necropsia dos animais e coleta de materiais

Ao final do experimento, após jejum de 12h, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico 50 mg/kg e exanguinados pelo plexo inguinal, sendo coletadas amostras de sangue.

As amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas por 3000 RPM durante 5 minutos e o soro foi armazenado a -20 °C para as dosagens metabólicas. O tumor primário e o fígado foram removidos e pesados, sendo parte armazenada em freezer a -70 °C até o momento do uso, e outra parte foi conservada em formol tamponado 10% para análises histológicas.

Além disso, foram coletados rins, pulmões, coração e baço e conservados em formol tamponado 10% para análises histológicas, e conteúdo cecal, armazenado em freezer a -70 °C até o momento das análises bioquímicas.

3.9 Análise de ácidos graxos

A determinação do perfil de ácidos graxos foi realizada em colaboração com a professora Jacqueline Takahashi do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, do Departamento de Química da UFMG.

3.9.1 Hidrólise e metilação de lipídeos

Dissolveu-se, em tubo criogênico de 2 mL, aproximadamente 10 mg do óleo extraído das amostras em 100 µL de uma solução de etanol (95%)/hidróxido de potássio 1 mol/L (5%). Após agitação em vórtex por 10 segundos, o óleo foi hidrolisado em um forno de microondas doméstico (Panasonic Piccolo), à potência de 80 W (Potência 2), durante 5 minutos. Após resfriamento, adicionaram-se 400 µL de ácido clorídrico a 20%, uma ponta de espátula de NaCl (~20 mg) e 600 µL de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 10 segundos e repouso por 5 minutos,

uma alíquota de 300 μL da camada orgânica foi retirada, colocada em tubos de microcentrífuga e seco por evaporação, obtendo-se assim os ácidos graxos livres. (adaptado de W. W. Christie, *Gas Chromatography and Lipids*, 1989, Pergamon Press). Os ácidos graxos livres foram metilados com 100 μL de BF_3 /metanol (14%) e aquecidos durante 10 minutos em banho de água a 60 $^\circ\text{C}$. Após diluição com 400 μL de metanol, foram analisados por cromatografia a gás (CARVALHO *et al.*, 2010).

As análises foram realizadas em Cromatógrafo a Gás HP7820A (Agilent) equipado com detector por ionização de chamas. Utilizou-se uma coluna INNOWAX (HP) 15 m x 0,25 mm x 0,20 μm com gradiente de temperatura: 100 $^\circ\text{C}$, 0 min, 7 $^\circ\text{C}/\text{min}$ até 240 $^\circ\text{C}$; injetor (split de 1/30) a 250 $^\circ\text{C}$ e detector a 260 $^\circ\text{C}$. Hidrogênio como gás de arraste (3 mL/min) e volume de injeção de 1 μL . Programa de aquisição de dados EZChrom Elite Compact (Agilent). A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos metilados SUPELCO37.

3.10 Avaliação do metabolismo lipídico

3.10.1 Determinação das concentrações de colesterol total sérico

As concentrações de colesterol foram mensuradas de acordo com o método de colesterol oxidase (ALLAIN *et al.*, 1974) utilizando-se kit comercial (Labtest, Brasil). O método consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase produzindo colesterol livre. Este, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina produz quinoneimina, composto róseo-avermelhado, com absorção máxima de 500 nm.

As concentrações de colesterol no soro foram determinadas por ensaio em microplaca de 96 poços, de acordo com Fazio *et al.* (1997). Vinte microlitros de amostra foram diluídas em água deionizada (1:25), afim de que as leituras de absorbância fossem adequadas à variação linear do teste. Em seguida, 100 μL de soro diluído foram pipetados em microplaca de 96 poços, sendo adicionados 100 μL

de reagente de colesterol total. Após período de incubação de 15 minutos a 37 °C a absorbância foi lida a 492 nm em leitor de microplaca.

3.10.2 Determinação das concentrações de triglicerídeos sérico

As concentrações de triglicerídeos séricos foram medidas segundo o método enzimático colorimétrico descrito por Fossatti e Principe (1982), utilizando kit comercial (Labtest, Brasil). O método consiste na hidrólise dos triglicerídeos do soro pela lipase lipoprotéica produzindo glicerol livre. Esse é fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre ação da glicerol fosfato, o qual, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob ação da peroxidase, em presença de reagente fenólico (4-clorofenol), e 4-aminoantipirina, produz quinoneimina, composto róseo avermelhado, com máximo de absorção a 500 nm.

Dessa forma, 20 µL de soro foram diluídos em água deionizada, na concentração de (1:25). Posteriormente, 100 µL dessa solução, foram pipetados em microplaca de 96 poços e 100 µL do reagente específico acrescentados. Após período de incubação de 15 minutos a 37 °C, a absorbância foi lida a 492 nm em leitor de microplaca.

3.10.3 Separação de lipoproteínas e determinação de colesterol, triglicerídeos e proteínas nas frações

O fracionamento das lipoproteínas séricas foi realizado pelo método de cromatografia de filtração em gel em sistema de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) modelo 600 da Waters, usando-se coluna de Superose 6 10/30 da Pharmacia. Em síntese, uma alíquota de 100 µL de soro de cada dois ou três animais, após filtrada em membrana de 0,45 µm, foi injetada na coluna e separada com tampão contendo NaCl 0,15 M, Na₂HPO₄ 0,01 M e EDTA 0,1 mM, pH 7,5, a um fluxo de 0,25 mL/minuto.

Os níveis de colesterol e triglicerídeos nas frações foram determinados da seguinte forma: 100 µL de cada fração separada anteriormente por FPLC foram retirados e misturados na proporção 1:1 com o reagente específico em microplacas de 96

poços. Após período de incubação de 20 minutos a 37 °C, a absorbância a 492 nm foi lida em leitor de microplaca.

3.10.4 Quantificação dos níveis de lipídeos hepáticos

Os lipídeos totais hepáticos foram extraídos com o uso de solventes orgânicos de acordo com o método de Folch *et al.* (1957). Em resumo, foram pesados 100 mg de fígado em tubos de vidro previamente identificados e posteriormente triturados com 1900 µL de solução contendo clorofórmio: metanol (2:1) usando-se homogeneizador de tecidos por 3 minutos na velocidade 10. Após a adição de 400 µL de metanol, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante foi transferido para novos tubos de vidro com peso conhecido. Em seguida, acrescentaram-se 800 µL de clorofórmio, 640 µL de solução de NaCl a 0,73% e as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm, sendo desprezada a fase superior. A parede interior de cada tubo foi lavada três vezes com 600 µL de solução de Folch (solução de 3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl a 0,29%) e os lipídeos extraídos foram secos em estufa *overnight* a 37 °C. Os tubos foram pesados e a quantidade de lipídeos extraída foi dada pela diferença dos tubos de vidro antes e depois do processo de secagem em estufa. Para a dosagem do colesterol total e triglicerídeo hepáticos, as amostras foram ressuspensas em 500 µL de isopropanol e homogeneizadas até a completa solubilização dos lipídeos. As dosagens e a curva padrão foram feitas em microplacas de 96 poços como descrito acima para o colesterol total e triglicerídeo séricos.

3.10.5 Quantificação dos níveis de lipídeos cecais

A determinação do perfil lipídico cecal foi feita mediante a extração destes por solvente orgânico, conforme descrito por Folch *et al.* (1957). Pesaram-se 25 mg de fezes em *ependorf* de 2mL previamente identificados e posteriormente triturou-se com 475 µL de solução contendo clorofórmio: metanol (2:1) usando-se homogeneizador de tecidos por 3 minutos na velocidade 10. Após a adição de 100

μL de metanol, os eppendorf foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante foi transferido para tubos de vidro com peso conhecido. Em seguida, acrescentaram-se 200 μL de clorofórmio, 160 μL de solução de NaCl a 0,73% e as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm, sendo desprezada a fase superior. A parede interior de cada tubo foi lavada três vezes com 600 μL de solução de Folch (solução de 3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl a 0,29%) e os lipídeos extraídos foram secos em estufa *overnight* a 37 °C. Após verificar que os tubos estavam totalmente secos, eles foram pesados e a quantidade de lipídeos extraída foi dada pela diferença dos tubos de vidro antes e depois de secos. A quantificação dos níveis de colesterol e triglicérido cecal foi determinada da mesma forma como descritos anteriormente para amostras de fígado.

3.11 Avaliação da peroxidação lipídica- TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

A peroxidação lipídica do tecido hepático foi determinada por meio da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo, o malondialdeído, a principal substância formada. Em resumo, pesaram-se 100 mg do tecido em tubo de ensaio, depois acrescentou-se 1mL de PBS 1x e homogeneizou-se no agitador por aproximadamente 1 minuto (BUEGE e AUST, 1978). O homogenato foi centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos, obtendo-se o sobrenadante. Uma alíquota de 250 μL do sobrenadante de fígado foi misturada a 500 μL da solução de ácido tricloroacético 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico 0,38% (p/v) e HCl a 0.25N. A mistura foi aquecida em banho-maria fervente por um período de 15 minutos. Após resfriamento em água corrente, 750 μL de butanol foram adicionados aos tubos para extração do cromóforo. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, 200 μL do sobrenadante foram colocados em microplacas em duplicata e a leitura foi feita a 535 nm (BUEGE e AUST, 1978). A concentração de proteína no sobrenadante foi medida pelo método de Bradford (1976). O resultado do ensaio foi expresso em micromoles de malondialdeído (MDA) por mg de proteína.

3.12 Análise de histopatologia em hematoxilina e eosina

As amostras foram fixadas pelo período de 24 horas em formol a 10% tamponado, processados e incluídas em parafina. Cortes seriais de 4 µm obtidos dos blocos de parafina foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para a identificação e confirmação das neoplasias e análise dos órgãos para a detecção de possíveis metástases.

3.13 Imuno-histoquímica para identificação do anticorpo CDC47

Para a análise imuno-histoquímica, cortes seriais de 4 µm foram obtidos a partir dos blocos de parafina, transferidos para lâminas gelatinizadas, e posteriormente desparafinizados e reidratados. A recuperação antigênica foi realizada em solução pH 6,0 – *Antigen retrieval solution* pH 6,0 (DAKO, Carpinteria) em banho-maria a 98 °C por 20 minutos. O bloqueio da peroxidase foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3% diluído em álcool metílico e bloqueio proteico em solução *protein block* (Dako, Carpinteria). O anticorpo primário CDC47 (clone 47DC14, Neomarkers, Freemont, 1:300) foi diluído em solução própria – *Antybody diluent with background reducing components* (Dako, Carpinteria) e aplicados sobre os cortes para incubação em câmara úmida por 60 minutos em temperatura ambiente. A amplificação de sinal nas reações imuno-histoquímicas foi realizada empregando-se o sistema baseado em polímero *HRP Advance* (Dako-citomation, Carpinteria) e a revelação com solução cromogênica de 3,3' diaminobenzidina (DAB) líquida (Dako, Carpinteria, EUA). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris, com posterior montagem utilizando meio específico. O controle positivo foi realizado na própria secção do tecido na camada basal da epiderme.

3.13.1 Análise de proliferação celular

As lâminas, coradas pela técnica de imuno-histoquímica, foram inicialmente visualizadas sob aumento 100x para identificar regiões intrateciduals de maior densidade de imunomarcção nuclear positiva (“*hot spots*”). Cinco fotomicrografias

de alta resolução destas áreas foram obtidas no aumento de 40x e foram contadas 500 células neoplásicas, e em seguida foi contabilizado a porcentagem de células com imunomarcção nuclear positiva em cada caso.

3.14 Extração de hemoglobina

A vascularização do carcinoma mamário murinho 4T1 foi avaliada por meio da quantidade de hemoglobina (Hb) detectada no tecido utilizando o método de Drabkin (DRABKIN e AUSTIN, 1932). Os fragmentos de tumores foram homogeneizados com Ultra - Turrax, (Schlappmuhler, Usingen, Alemanha) em 2 mL de reagente de Drabkin (Labtest, São Paulo, Brasil), e centrifugado a 28490 rpm durante 40 min. Os sobrenadantes foram filtrados através de um filtro 0,22 microns (Millipore, Danvers, MA, EUA). A concentração de hemoglobina nas amostras foi determinada espectrofotometricamente por medição da absorbância a 540 nm utilizando um leitor de placas de ELISA e comparados com uma curva padrão de hemoglobina. Os resultados obtidos são expressos em concentração de hemoglobina (μg) por (mg) de peso úmido de tecido.

3.15 Dosagem da atividade enzimática: Mieloperoxidase (MPO) e de N-Acetil- β -D-Glicosaminidase (NAG)

A infiltração neutrofílica nos tumores foi medido por ensaio da atividade da mieloperoxidase (MPO), como anteriormente descrito (MARQUES *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Os tumores foram pesados e homogeneizados em tampão de pH 4,7 (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, 0,015 M NaEDTA), centrifugou-se a 28490 rpm durante 40 min. Os sedimentos foram então re-suspensos em tampão Na₂PO₄ 0,05 M (pH 5,4), contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% (HTAB) seguido por três ciclos de congelamento-descongelamento, utilizando nitrogênio líquido. A atividade de MPO no sobrenadante das amostras foi determinada por medição da alteração na absorbância (densidade óptica; OD) a 450 nm, utilizando-se tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,3 mM). A reação foi terminada pela adição de 50 μL de H₂SO₄ (4M).

Os resultados foram expressos como em densidade óptica (OD) por grama de tecido úmido.

A infiltração de células mononucleares no tumor foi quantificada através da medição dos níveis da enzima lisossomal N-acetilglucosaminidase (NAG) presente em níveis elevados no macrófago ativado (MARQUES *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Os tumores foram homogeneizados em solução de NaCl a 0,9% (w/v) contendo 0,1% v / v de Triton X-100 (Promega, Madison, WI, EUA) e centrifugadas (28490 rpm, 10 min a 4 °C). Amostras (100 µL) do sobrenadante resultante foram incubada durante 10 min com 100 µL de *p*-nitrofenil-*N*-acetil-beta-*D*-glucosaminidase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) preparado em tampão citrato/fosfato (0,1 M de ácido cítrico, Na₂HPO₄ 0,1 M; pH 4,5) para se obter uma concentração final de 2.24 mM. A reação foi paralisada pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6). A hidrólise do substrato foi determinada por medição da absorção a 400 nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica (OD) por grama de tecido úmido.

3.16 Quantificação de VEGF e TNF- α

O processo angiogênico e inflamatório no tumor foram avaliados por meio das dosagens das citocinas VEGF e TNF- α , respectivamente. Fragmentos de tumores foram pesados e homogeneizados em PBS (1 mL por 100 mg de tecido) a pH 7,4 contendo 0,05% de Tween e centrifugado a 28490 rpm durante 30 min. As citocinas VEGF e TNF- α no sobrenadante foram dosadas em 50 µL do sobrenadante utilizando kits de imunensaio (R&D Systems, EUA) e seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, diluições de sobrenadantes livres de células foram adicionadas em duplicata a placas de ELISA revestidas com um anticorpo monoclonal murino específico contra a citocina, seguido pela adição de um segundo anticorpo policlonal conjugado a peroxidase contra a citocina. Após lavagem para remover qualquer reagente anticorpo-enzima não ligado, uma solução de substrato (50 µL de uma solução a 1:1 de peróxido de hidrogênio e 10 mg/mL tetrametilbenzidina em DMSO) foi adicionada aos poços. O desenvolvimento da cor foi parado, após 20 minutos de incubação, com ácido sulfúrico 2 N (50 µL) e a

intensidade da cor foi medida a 540 nm em espectrofotômetro (E max - Molecular Devices). Padrões foram de 0,5- \log_{10} diluições de citocinas recombinantes de murinos a partir de 7,5 pg mL^{-1} até 1000 pg mL^{-1} (100 μL). Os resultados foram expressos como pg de citocinas por mg de tecido úmido.

3.17 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software de estatística GraphPad Prism v. 5.0. Para avaliação da normalidade os testes passaram pelo teste Kolmogorov-Smirnov normality test. Os resultados que apresentaram distribuição normal foram submetidos aos testes Teste t não pareado ou Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste Student-Newman-Kewls (SNK). Para os resultados não paramétricos foram utilizados os testes Kruskal- Wallis e Mann-Whitney. Possíveis correlações foram avaliadas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. Associações e concordâncias foram consideradas significativas quando a probabilidade de significância do teste p-valor apresentou-se menor que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação do perfil de ácidos graxos nos óleos

Os óleos utilizados nas dietas foram analisados por cromatografia a gás para determinação da composição de ácidos graxos. A Tabela 2 apresenta a porcentagem de cada ácido graxo em relação ao total dos ácidos graxos identificados nos óleos.

Tabela 2 - Composição de ácidos graxos (%) dos óleos de soja, canola, peixe e linhaça utilizados nas dietas

ÓLEOS	AGS							MUFAS		PUFAS				Outros	Total			
	12:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	20:0	24:0	16:1	18:1	n-6	n-3	18:2			18:3	20:5	22:6
Soja				12,1		4,3	0,4		0,1	26,8	48,9	5,2					2,0	100,0
Canola				5,0		2,1	1,5		0,3	61,3	17,3	8,1					4,4	100,0
Peixe	0,2	8,2	0,6	19,0	0,7	3,7	1,4	1,3	11,2	15,2	1,3	0,7	12,4	7,4			16,8	100,0
Linhaça			0,3	7,9		6,1	0,5		0,2	28,2	15,6	36,9					4,3	100,0

Os óleos de soja, canola, peixe e linhaça foram adicionados às dietas na concentração de 4% (**Tabela 1**), contendo 1,9 g, 0,7 g, 0,05 g e 0,6 g de ácidos graxos poli-insaturados n-6 e 0,2 g, 0,3 g, 0,8 g e 1,4g de PUFAS n-3, respectivamente. A menor relação n-6/n-3, foi encontrada no óleo de peixe (1:16) quando comparado aos demais óleos analisados, soja (9:1), canola (2:1) e linhaça (1:2). Além disso, o óleo de peixe utilizado apresentou 16% de ácidos graxos não identificados em sua composição.

4.2 Parâmetros de crescimento

Não foram observadas diferenças significativas no peso corporal dos animais alimentados com dietas à base de diferentes óleos. A inoculação com células 4T1 também não alterou o peso corporal dos camundongos. (**Figura 4**). Os animais consumiram em média $28,3 \pm 0,2$ g de dieta/semana, com a mesma densidade energética (3,80 kcal/g dieta).

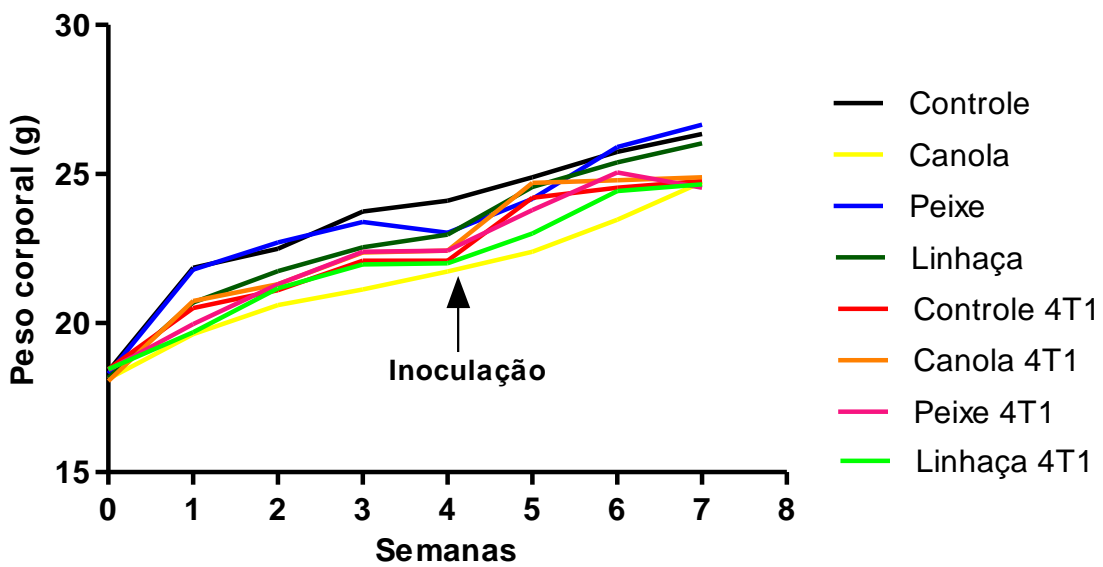


Figura 4 – Evolução do peso corporal dos grupos sem tumor e com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos. O peso foi mensurado semanalmente por gravimetria, n = 7.

4.3 Metabolismo lipídico

A Tabela 3 apresenta os níveis séricos de colesterol e triglicerídeos dos oito grupos ao final do experimento.

Tabela 3 – Níveis de colesterol e triglicerídeos no soro dos animais dos grupos sem tumor 4T1 e com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos

Grupos	Colesterol (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
Controle	192,6 ± 18,8	114,0 ± 13,3
Canola	164,7 ± 9,0	103,8 ± 10,9
Peixe	177,7 ± 9,9	100,1 ± 8,5
Linhaça	188,2 ± 13,9	117,8 ± 6,7
Controle 4T1	170,6 ± 9,9	133,0 ± 11,6
Canola 4T1	176,5 ± 13,1	163,3 ± 25,2
Peixe 4T1	177,7 ± 6,3	186,5 ± 7,0 *
Linhaça 4T1	209,5 ± 7,6 +	206,4 ± 14,5 * +

Valores expressos em média ± erro padrão da média, n=7. * quando comparado à mesma dieta entre os diferentes grupos sem tumor e com tumor 4T1. + quando comparado ao grupo Controle 4T1. Resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

Os níveis de colesterol circulante aumentaram no grupo Linhaça 4T1 quando comparado ao grupo Controle 4T1. O grupo Linhaça 4T1 também apresentou maior concentração sérica de triglicerídeos que os grupos Linhaça e Controle 4T1. Da mesma forma, a quantidade de triglicerídeos no soro dos animais do grupo Peixe 4T1 foi maior que no grupo alimentado com a mesma dieta.

A Figura 5 apresenta a distribuição de colesterol nas frações de lipoproteínas circulantes dos animais dos grupos sem tumor e com tumor alimentados com dietas à base de diferentes óleos. Nota-se que todos os grupos apresentaram a mesma distribuição de colesterol no perfil de lipoproteínas circulante, exceto o grupo Controle 4T1, em que houve alteração, caracterizada por redução significativa do conteúdo de colesterol nas frações de lipoproteínas em relação ao grupo Controle (Figura 6).

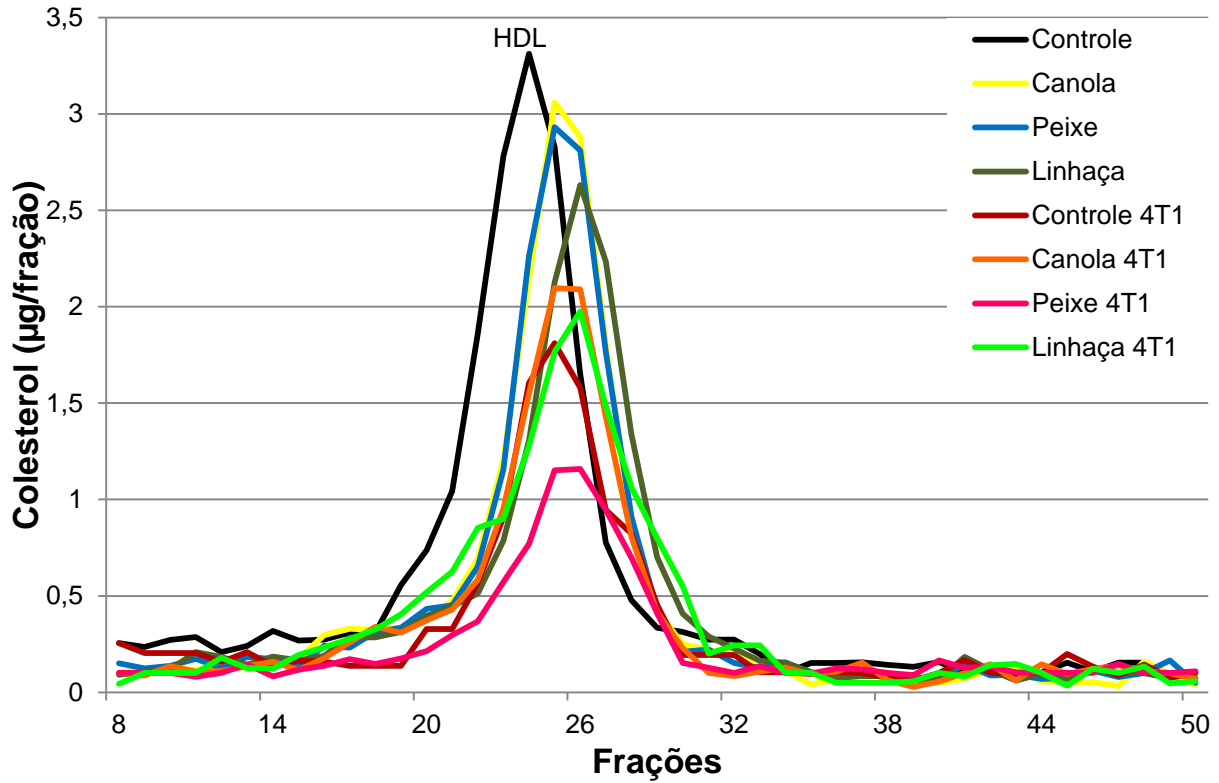


Figura 5 - Distribuição de colesterol nas frações de lipoproteínas circulantes dos animais dos grupos sem tumor e com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos.

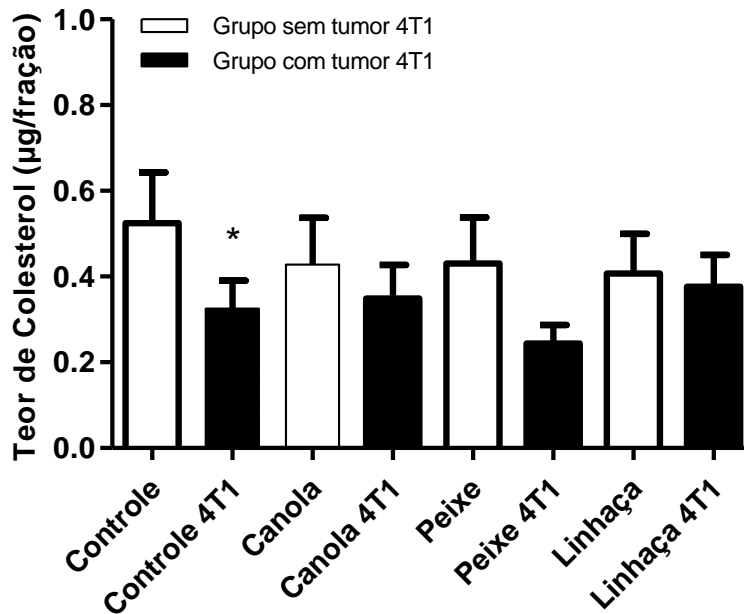


Figura 6 - Teor de colesterol nas frações de lipoproteínas dos animais dos grupos sem tumor e com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos. As barras representam média \pm erro padrão da média, $n=7$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle.

A Tabela 4 apresenta o conteúdo lipídico no fígado de todos os animais dos grupos avaliados. Observa-se que o grupo Linhaça 4T1 teve redução do conteúdo de lipídios totais, colesterol e triglicerídeos em comparação ao grupo Linhaça. Além disso, o grupo Linhaça apresentou maior concentração de triglicerídeos hepáticos em relação aos demais grupos sem tumor.

Houve redução nos níveis de triglicerídeos hepático no grupo Peixe 4T1 em relação a todos dos grupos com tumor (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Conteúdo de lipídeos totais, colesterol e triglicerídeos no fígado dos animais dos grupos sem tumor 4T1 e com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos

Grupos	Lipídeos totais (mg/g tecido)	Colesterol (mg/g tecido)	Triglicerídeos (mg/g tecido)
Controle	64,7 ± 2,7	3,6 ± 0,2	27,2 ± 2,9
Canola	55,4 ± 9,9	3,3 ± 0,8	22,1 ± 5,3
Peixe	57,4 ± 6,9	4,1 ± 0,9	21,9 ± 3,9
Linhaça	68,6 ± 5,5	4,7 ± 0,6	39,5 ± 4,4 +
Controle 4T1	61,3 ± 2,9	3,2 ± 0,4	23,1 ± 1,9
Canola 4T1	61,3 ± 4,5	4,3 ± 0,7	24,6 ± 2,4
Peixe 4T1	49,3 ± 3,5	2,5 ± 0,3	11,7 ± 2,2 #
Linhaça 4T1	52,9 ± 2,5 *	3,4 ± 0,2 *	23,1 ± 2,1 *

Valores expressos em média ± erro padrão da média, n=7. * quando comparado a mesma dieta entre os diferentes grupos sem tumor e com tumor 4T1. + comparado a todos do grupo sem tumor 4T1. # comparado a todos do grupo com tumor 4T1. Resultados considerados significativos quando p<0,05.

O conteúdo de lipídeos cecais é apresentado na Tabela 5. Nota-se que o grupo Peixe teve maior excreção cecal de lipídeos totais quando comparado ao grupo Controle. O grupo Controle 4T1 também teve maior excreção de lipídeos totais, triglicerídeos e colesterol em relação ao grupo Controle.

Tabela 5 – Conteúdo de lipídeos totais, colesterol e triglicerídeos no ceco dos animais dos grupos sem tumor 4T1 e com tumor 4T1 alimentados com dietas à base de diferentes óleos

Grupos	Lipídeos totais (mg/g tecido)	Colesterol (mg/g tecido)	Triglicerídeos (mg/g tecido)
Controle	12,5 ± 2,8	1,2 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Canola	24,6 ± 9,5	2,0 ± 0,6	1,2 ± 0,4
Peixe	41,7 ± 10,1 +	1,5 ± 0,1	2,3 ± 0,7
Linhaça	16,4 ± 4,3	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,2
Controle 4T1	33,7 ± 5,3 *	2,7 ± 0,5 *	2,4 ± 0,7 *
Canola 4T1	23,5 ± 4,9	2,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1
Peixe 4T1	30,5 ± 6,7	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,3
Linhaça 4T1	34,4 ± 7,9	1,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1

Valores expressos em média ± erro padrão da média, n=7. * quando comparado à mesma dieta entre os diferentes grupos sem tumor e com tumor 4T1. + em relação ao grupo Controle. Resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

4.4 Peroxidação lipídica

O grupo Canola 4T1 apresentou menor produção hepática de TBARS que o grupo Canola e os demais grupos com tumor. Por outro lado, a quantidade de TBARS foi maior no grupo Linhaça 4T1 quando comparado ao grupo alimentado com a mesma dieta e sem tumor (**Figura 7**).

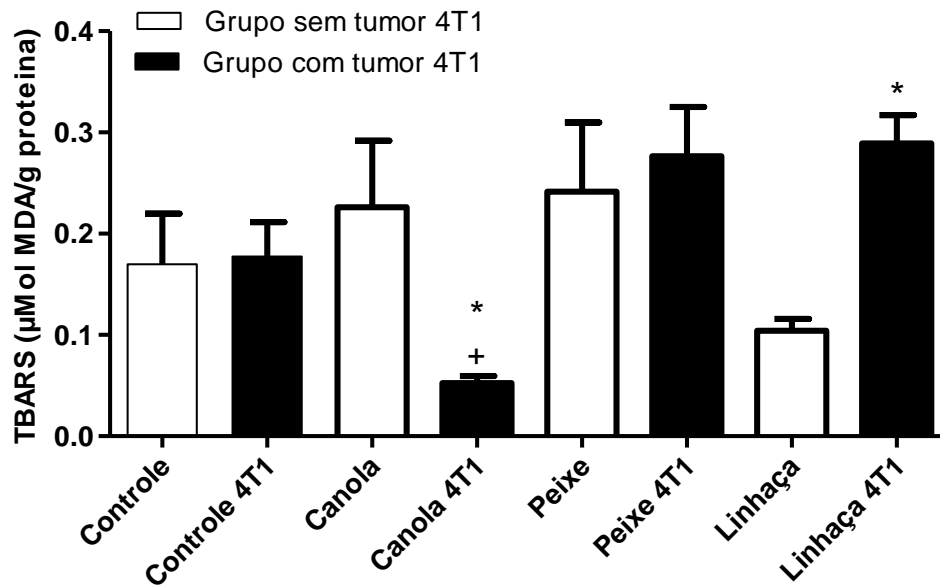


Figura 7 – Peroxidação lipídica hepática avaliada através da dosagem de TBARS. As barras representam média \pm erro padrão da média, $n=7$. *comparado com a mesma dieta. + comparado aos demais grupos com tumor 4T1. Resultados considerados significativos quando $p<0,05$.

4.5 Avaliação do crescimento tumoral

Não houve alteração no crescimento do tumor dos animais alimentados com dietas à base de diferentes óleos (**Figura 8**).

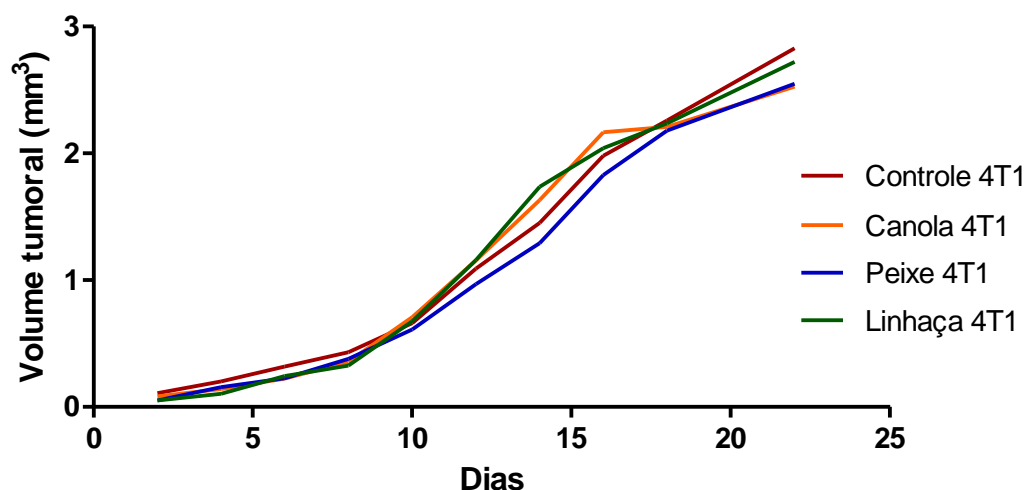


Figura 8 - Curva de crescimento do carcinoma mamário murino 4T1 em grupos alimentados com dietas à base de diferentes óleos. Valores expressos em média \pm erro padrão da média: Controle 4T1 ($1,13 \pm 0,95$); Canola 4T1 ($1,12 \pm 0,94$); Peixe 4T1 ($1,02 \pm 0,90$); Linhaça 4T1

O peso do tumor, expresso como média \pm erro padrão da média, foi de $0,88 \pm 0,36$; $0,87 \pm 0,09$; $0,77 \pm 0,10$; $0,96 \pm 0,10$, nos grupos Controle 4T1, Canola 4T1, Peixe 4T1 e Linhaça 4T1, respectivamente, também não apresentou diferença significativa.

4.6 Análise morfológica do tumor primário e metástases

As análises dos cortes histológicos do tumor primário revelaram neoformação que se estendia desde a epiderme, que por vezes mostrava-se ulcerada, até os planos musculares mais profundos (**Figura 9A**). As células neoplásicas apresentaram arranjo em manto, com padrão sólido e exibiram citoplasma moderado, de limites pouco definidos, com núcleos exibindo acentuado grau de pleomorfismo, de aspecto vacuolar com cromatina finamente agregada e com um ou mais nucléolos evidentes. Anisocitose, anisocariose e anisonucleose foram acentuadas e mitoses atípicas foram observadas com frequência (**Figura 9B**). O estroma era escasso e fibroso. Foram observadas extensas áreas de necrose central, multifocais a coalescentes, que por vezes se estendiam até a epiderme. O infiltrado inflamatório era acentuado composto por mononucleares e polimorfonucleares, com distribuição peritumoral e intratumoral, com padrão mais acentuado quando associado à ulceração ou necrose.

Na análise dos órgãos para pesquisa de metástase (fígado, coração, rins, pulmões e baço), foram identificadas metástases pulmonares em alguns animais de cada grupo, sendo dois animais nos grupos Controle 4T1 e Canola 4T1, e um animal nos grupos Peixe 4T1 e Linhaça 4T1. As metástases apresentaram as mesmas características morfológicas dos tumores primários e mostraram-se associadas a infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear (**Figura 9 C, D**). Nos outros órgãos foram identificadas alterações inespecíficas, distribuídas aleatoriamente entre todos os grupos, com e sem tumor 4T1, como degeneração hepática macrovacuolar e microvacuolar, em distintos graus de severidade. Ainda, foi observada intensa atividade hematopoiética extramedular esplênica e hepática (dados não mostrados).

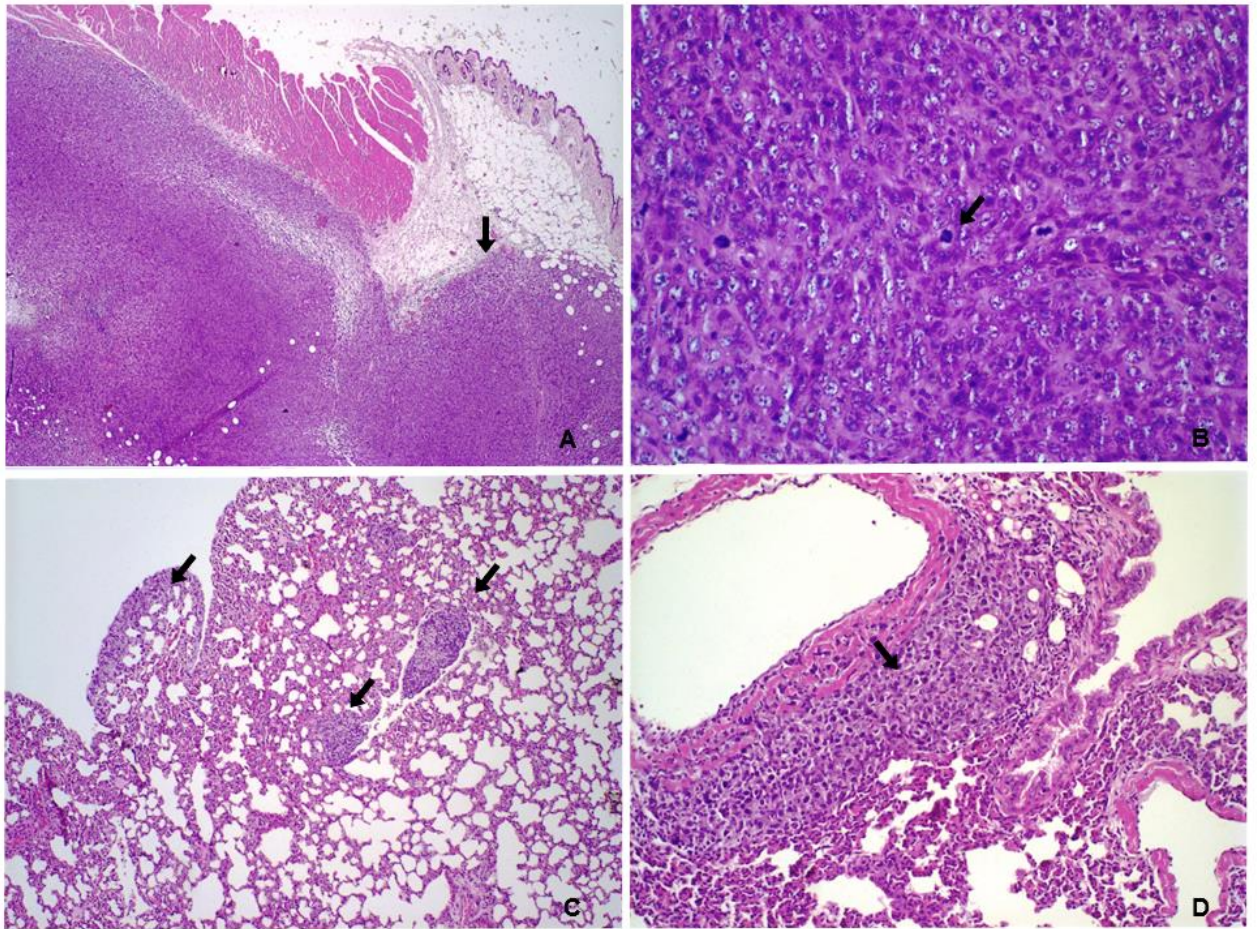


Figura 9 - Fotomicrografias do carcinoma mamário murino 4T1. A: Fotomicrografia do tumor primário mostrando o padrão de distribuição do crescimento neoplásico (seta). HE, aumento 50X; B: Detalhe do tumor primário exibindo mitoses atípicas (seta). HE, aumento 400X; C: Fotomicrografia de pulmão exibindo áreas focais de metástase (setas). HE, aumento 100X; D: Detalhe das células neoplásicas metastáticas no parênquima pulmonar (seta). HE, aumento 200X.

4.7 Avaliação do índice de proliferação celular por CDC47

A avaliação do índice de proliferação celular foi estabelecida por imuno-histoquímica para o anticorpo CDC47, com base na porcentagem de imunomarcação nuclear positiva das células neoplásicas para o anticorpo CDC47 em relação ao número de células com imunomarcação nuclear negativa. Houve maior índice de proliferação celular no grupo Canola 4T1 quando comparado ao grupo Controle 4T1 (**Tabela 6** e **Figura 10 A, B**). Na avaliação dos outros grupos em relação ao grupo Controle 4T1 não foram observadas diferenças estatísticas (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Índice de proliferação celular (%) a partir da expressão de CDC47 dos animais dos grupos com tumor alimentados com dietas à base de diferentes óleos

Grupos	CDC47
Controle 4T1	62,5 ± 1,9
Canola 4T1	68,74 ± 1,2 *
Peixe 4T1	65,9 ± 1,3
Linhaça 4T1	64,48 ± 1,5

Valores expressos em média ± erro padrão da média, n=7. * p< 0,05 em relação ao Controle 4T1

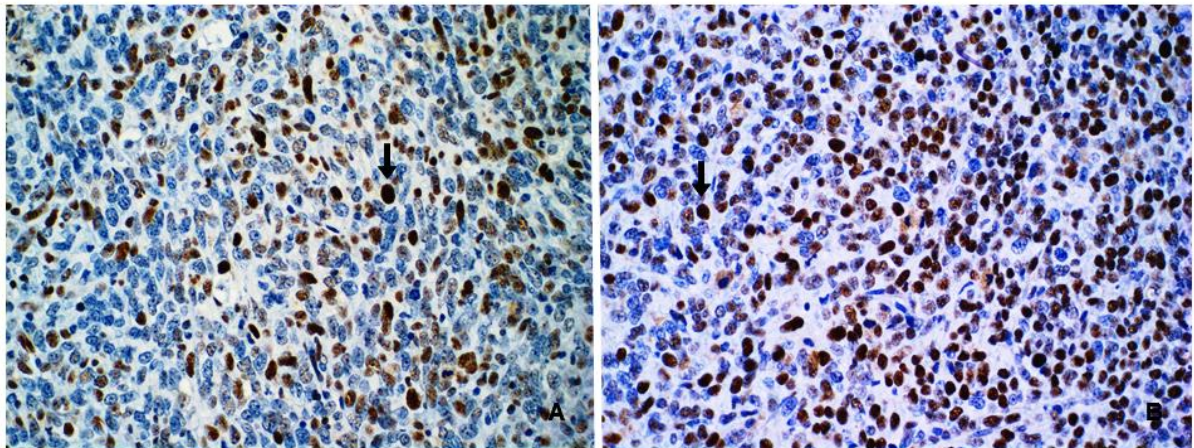


Figura 10 - Fotomicrografia do carcinoma mamário murinho 4T1, expressão imunohistoquímica por CDC47 no núcleo das células neoplásicas (setas). A e B: Fotomicrografias exibindo o perfil de imunomarcagem nuclear entre animais dos grupos Controle 4T1 (A) e grupo Canola 4T1 (B). O grupo Controle 4T1 (A) apresenta maior índice de proliferação quando comparado ao grupo Canola 4T1 (B). Imuno-histoquímica, DAB, contracoloração com Hematoxilina de Harris, 400X.

4.8 Infiltração de macrófagos e neutrófilos nos tumores

O acúmulo de neutrófilos e macrófagos no sítio tumoral foi determinado a partir da medida da atividade de MPO e NAG, respectivamente. Os dados revelaram aumento de neutrófilos nos tumores dos animais do grupo Peixe 4T1 quando comparado aos animais dos demais grupos e redução de macrófagos em relação aos animais dos grupos Canola 4T1 e Linhaça 4T1 (**Figura 11**).

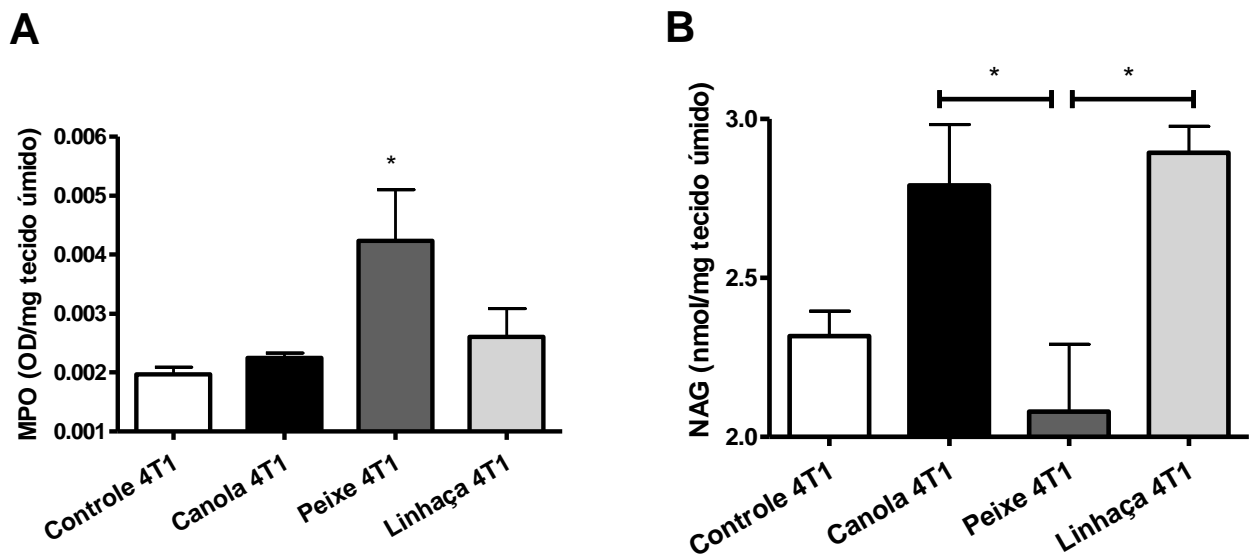


Figura 11 - Análise dos níveis de MPO (A) e NAG (B) no tumor dos animais dos grupos alimentados com dietas à base de diferentes óleos. As barras representam média \pm erro padrão da média, n=7. *p<0,05.

4.9 Concentração de hemoglobina, VEGF e TNF α nos tumores

A angiogênese foi analisada pelos parâmetros conteúdo de hemoglobina e níveis de VEGF. Não foi observada alteração significativa na concentração de hemoglobina entre os grupos. Porém, houve aumento de VEGF no grupo Peixe 4T1 em relação aos demais grupos (**Figura 12**).

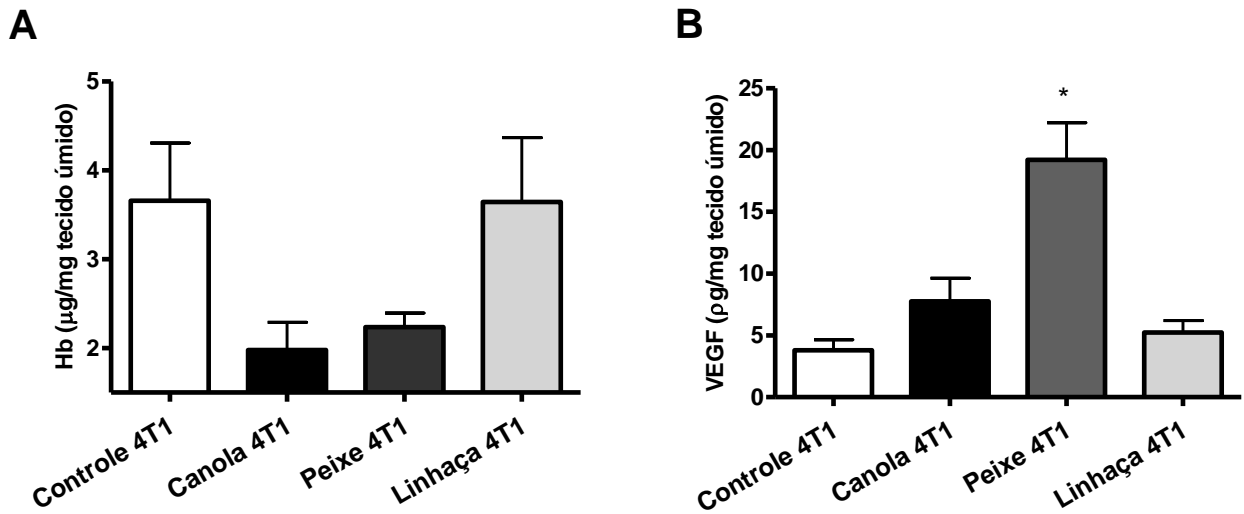


Figura 12 - Marcadores angiogênicos no tumor dos animais dos grupos alimentados com dietas à base de diferentes óleos. (A) Dosagem de Hb e (B) Dosagem de VEGF. As barras representam média \pm erro padrão da média, n=7. *p<0,05.

A figura 13 apresenta as concentrações de TNF- α no sítio tumoral. Não foi observada alteração significativa entre os diferentes grupos.

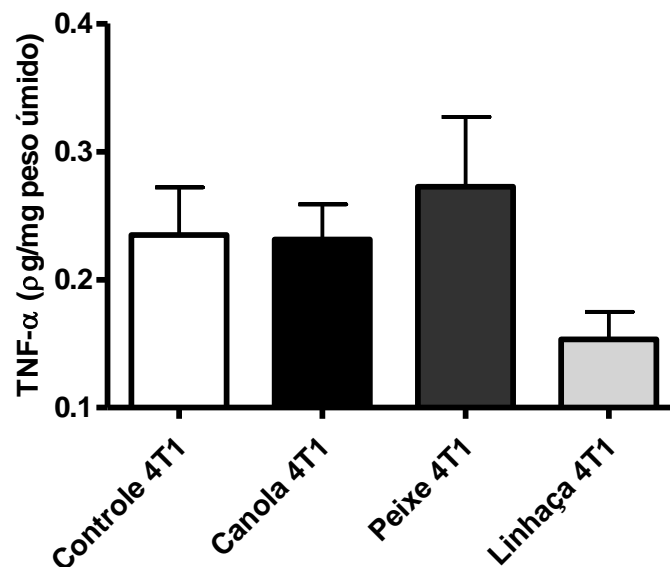


Figura 13 - Níveis de TNF- α no tumor dos animais dos grupos alimentados com dietas à base de diferentes óleos. As barras representam média \pm erro padrão da média, n=7.

5 DISCUSSÃO

Os lipídeos da dieta podem modificar a progressão e agressividade do câncer de mama por meio de diferentes mecanismos que podem influenciar a expressão genética, modulação da inflamação, proliferação celular, angiogênese e metástases (AZORDEGAN *et al.*, 2013). Diversos estudos mostram efeitos benéficos dos ácidos graxos poli-insaturados n-3 na progressão do tumor. Alguns mecanismos incluem supressão de AA derivado da biossíntese de eicosanoides, o que resulta em redução da proliferação de células tumorais, potencial metastático, modulação da inflamação, apoptose, e modulação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (KANG e LIU, 2013; MACLENNAN e MA, 2010; ROSA *et al.*, 2012; WENDEL e HELLER, 2009). Por outro lado, os ácidos graxos poli-insaturados n-6 são descritos como promotores de proliferação celular (MACLENNAN e MA, 2010).

Neste estudo utilizamos diferentes óleos que apresentaram proporções de PUFAS n-6/n-3 distintas para a elaboração de dietas, com o intuito de avaliarmos os efeitos dessa relação no desenvolvimento do carcinoma mamário murino 4T1. O óleo de peixe apresentou menor relação n-6/n-3, pois este óleo contém não só os ácidos graxos precursores (ácido linoléico n-6 e ácido alfa-linolênico n-3), mas também os produtos do metabolismo de n-3, EPA (20:5) e DHA (22:6) (BORSONELO *et al.*, 2013).

O consumo de dietas elaboradas com os diferentes óleos não influenciou o peso corporal dos animais, o que era esperado, visto que essas dietas apresentavam o mesmo valor calórico e foram consumidas em quantidades semelhantes. Em estudo para avaliar o efeito quimiopreventivo de diferentes óleos em ratos Wistar com lesões pré-cancerosas do cólon, Rosa *et al.* (2012), ofertaram dietas com 4% de óleo de soja, peixe ou linhaça durante 9 semanas. Os autores verificaram que não houve alteração do ganho de peso dos animais com os diferentes tratamentos. Resultado semelhante também foi encontrado por Borsonelo *et al.* (2013) utilizando 11% de óleo de soja, peixe ou linhaça na dieta durante 30 dias em experimento com ratas da linhagem Wistar.

O presente estudo também avaliou o efeito de diferentes fontes dietéticas sobre o metabolismo lipídico dos animais experimentais. Os animais com tumor sem intervenção tiveram alterações no metabolismo lipídico, caracterizada por redução de colesterol carregado nas lipoproteínas e maior excreção fecal de lipídeos totais, colesterol e triglicerídeos. A alimentação dos animais do grupo Linhaça 4T1 causou aumento de colesterol e triglicerídeos circulantes e diminuição do conteúdo de lipídeos totais hepáticos e do grupo Peixe 4T1 resultou em aumento dos níveis de triglicerídeos circulantes e redução do conteúdo de triglicerídeos no fígado em relação aos demais grupos com tumor.

As células cancerosas reprogramam suas vias metabólicas para atender suas demandas anormais para proliferação e sobrevivência. Dentre as principais alterações metabólicas induzidas pelas neoplasias malignas, destacam-se a depleção dos depósitos lipídicos, o incremento da lipólise e principalmente o aumento da lipogênese (KUEMMERLE *et al.*, 2011; ZHANG e DU, 2012). A maioria dos tecidos normais usam lipídeos exógenos adquiridos da dieta para a síntese de novos lipídeos estruturais, enquanto que a síntese de novo de ácidos graxos é normalmente suprimida. Em contraste, a lipogênese é normalmente aumentada em células tumorais, o que leva ao acúmulo desses ácidos graxos no organismo (ROMERO-GARCIA *et al.*, 2011). As células do câncer de mama (e muitos outros tipos de células cancerosas) sintetizam 95% de ácidos graxos endogenamente, apesar de quão abundantes sejam extracelularmente. Além disso, as células tumorais parecem ser altamente dependentes da lipogênese para a sua proliferação e sobrevivência (ZHANG e DU, 2012).

Os PUFAS n-3 podem aumentar a atividade metabólica do fígado, por estimular a β -oxidação, inibindo a síntese de ácidos graxos e de triglicerídeos, levando, dessa forma, à redução do acúmulo hepático de lipídeos (GAÍVA *et al.*, 2003), podendo justificar o resultado encontrado no grupo Peixe 4T1. O óleo de linhaça, embora rico em ALA, tem conversão limitada para EPA e DHA em humanos, produzindo apenas 5,0% e 0,5%, respectivamente (ZHENG *et al.*, 2013). Outros autores encontraram que ratos alimentados com dietas contendo 4% de óleo de peixe apresentaram diminuição na concentração de colesterol total, HDL e triglicerídeos séricos comparados com os grupos alimentados com dietas contendo a mesma quantidade

de óleo de linhaça, oliva e soja. Os resultados mostraram que o grupo alimentado com dieta contendo menor relação de n-6/n-3 apresentou maior redução de lipídeos no soro (ROSA *et al.*, 2010).

Em humanos, a lipoproteína de baixa densidade (LDL) é a principal transportadora de colesterol para todos os tecidos, carreando 2/3 do colesterol total (FIRESTONE, 1994). Nos roedores, a lipoproteína de alta densidade (HDL) é a principal lipoproteína que transporta e distribui o colesterol para os tecidos, ao invés da LDL como ocorre no homem (GROENER *et al.*, 1989). Vários tipos de células neoplásicas possuem maior captação de LDL, sendo documentado diminuição de LDL plasmática em pacientes com câncer e aumento do número de receptores para LDL (LDL-R) em células tumorais. A alta necessidade de colesterol-LDL, pelas células malignas, está relacionada ao rápido crescimento e divisão celular (CRUZ *et al.*, 2013; LEON *et al.*, 2010; FIRESTONE, 1993). Nosso trabalho mostrou que animais do grupo Controle 4T1 tiveram redução do colesterol transportado em HDL em relação ao grupo Controle, sugerindo maior captação hepática desta lipoproteína ou podendo também ser justificado pela maior excreção fecal de colesterol.

A peroxidação lipídica é definida como cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de radicais livres sobre lipídeos de membranas celulares. A maior classe de biomoléculas susceptíveis ao dano oxidativo por espécies reativas de oxigênio (EROS) são os PUFAS (KOLANJIAPPAN *et al.*, 2003). No presente trabalho, animais do grupo Canola 4T1 e Linhaça tiveram menores níveis hepáticos de TBARS. O maior conteúdo de MUFAS encontrado no óleo de canola parece ter sido fator protetor para a peroxidação lipídica hepática em animais com tumor. Por outro lado, o consumo de óleo de linhaça, embora rico em ácidos graxos n-3 mais propensos à peroxidação, foi benéfico em animais sem tumor.

O presente estudo mostrou que dietas à base de diferentes óleos com baixa relação n-6/n-3 não foram capazes de alterar o crescimento do tumor, assim como o número de metástases. Alguns estudos têm mostrado redução do tumor primário e número de metástases em modelos animais de câncer de mama, porém utilizando elevada quantidade de lipídeos na dieta (CHO *et al.*, 2010; ROSE *et al.*, 1995; TAPIERO *et al.*, 2002), chegando até 20%, aumento de cinco vezes mais que o valor

recomendado para roedores (CHEN *et al.*, 2006; HUBBARD *et al.*, 1998). Dessa forma, extrapolando para humanos, seria inviável uma recomendação de lipídeos com aumento na mesma proporção.

A proliferação anormal de células resultante da desregulação do ciclo celular desempenha papel fundamental na tumorigênese. A descrição quantitativa da proliferação de células de tumores pode ser usada para prever o comportamento biológico de uma neoplasia em particular (BACCHI e GOWN, 1993; GAMBICHLER *et al.*, 2008). No presente trabalho, animais do grupo Canola 4T1 tiveram maior índice de proliferação celular quando comparados ao grupo Controle 4T1, contudo este resultado não implicou em maior crescimento do tumor ou aumento do número de metástases. Por outro lado, Cho *et al.* (2010) observaram que o óleo de canola inibiu a proliferação de células cancerígenas tanto *in vitro* como *in vivo*, porém esse efeito foi mediante a associação desse óleo com tamoxifeno e cerulenina, drogas antineoplásicas.

As células inflamatórias têm efeitos potentes sobre o desenvolvimento do tumor. No início do processo neoplásico, estas células são promotores poderosos, produzindo ambiente atraente para o crescimento do tumor, facilitando e promovendo a instabilidade genômica e a angiogênese. Posteriormente, no processo de tumorigênese, as células neoplásicas também desviam os mecanismos inflamatórios, com o intuito de favorecer a disseminação neoplásica e a metástase. No entanto, o recrutamento de células inflamatórias pode também ter efeito negativo para o desenvolvimento dos tumores, representando tentativa por parte do organismo de suprimir o crescimento tumoral (COUSSENS e WERB, 2002). Dessa forma, acreditamos que o aumento de MPO, marcador indireto da infiltração de neutrófilos (MARQUES *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2005), no sítio tumoral do grupo Peixe 4T1 possa constituir mecanismo antitumoral do óleo de peixe, na tentativa de inibir o desenvolvimento do tumor (LEIFLER *et al.*, 2013). Além disso, existe limiar crítico na intensidade da inflamação peritumoral, abaixo do qual as células inflamatórias suportam o crescimento do tumor através da degradação da matriz extracelular e promovendo a angiogênese. Entretanto, acima desse limite, o efeito antitumoral das células inflamatórias agudas deve tornar a sua atividade pró-tumoral irrelevante (SOUTO *et al.*, 2011).

No sítio tumoral, macrófagos ativados são recrutados e cooptados pelas células alteradas, sofrendo diminuição de sua função imune e exacerbação de sua função trófica (ONUICHIC e CHAMMAS, 2010). Densidades elevadas de macrófagos no tecido neoplásico foram relacionadas a pior prognóstico, pois os macrófagos são envolvidos em processos de inflamação crônica e parecem estar associados à progressão tumoral e metástase (COUSSENS e WERB, 2002). Em nosso trabalho, animais do grupo Peixe 4T1 apresentaram redução de NAG no tumor em relação aos grupos Canola 4T1 e Linhaça 4T1, e isso se correlaciona com menor presença de macrófagos, visto que a atividade de NAG é aumentada em macrófagos ativados que migram para o sítio tumoral (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010). Dessa forma, o óleo de peixe estaria atuando na supressão de macrófagos no sítio tumoral.

O crescimento dos tumores requer aumento do fornecimento de sangue intratumoral, que é desencadeado por hipóxia tumoral, sendo um dos mecanismos de promoção da angiogênese (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010). Por outro lado, a hipóxia prolongada do tecido tumoral também pode induzir a necrose, sendo regiões necróticas características de tumores sólidos (BROWN, 2007). Várias moléculas têm mostrado desempenhar importante papel na angiogênese, entre elas o VEGF, que causa a dilatação dos vasos sanguíneos, proliferação celular e migração de células endoteliais (KANG e LIU, 2013). O VEGF é abundantemente produzido por células tumorais em hipóxia, células endoteliais, macrófagos ativados e outras células do sistema imune (BROWN *et al.*, 1997). Neste estudo, o grupo Peixe 4T1 apresentou aumento dos níveis de VEGF. Apesar disso, não houve modificação do conteúdo de hemoglobina (índice vascular) no tecido tumoral desse grupo e dos demais grupos avaliados, sugerindo-se que o aumento de VEGF estaria relacionado a possível aumento da hipóxia tecidual no sítio tumoral dos animais do grupo Peixe 4T1, como tentativa de suprimir o desenvolvimento do tumor.

O TNF- α é a citocina pró-inflamatória mais importante envolvida no crescimento, diferenciação, função celular, e a sobrevivência de muitas células. É produzido por diversos tipos de células, incluindo macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, queratinócitos e as células tumorais, e, tem sido implicada no desenvolvimento e progressão do tumor (YANG *et al.*, 2011). Alguns trabalhos tem mostrado possível atuação dos metabólitos dos PUFAS n-3 na regulação da produção de TNF- α em

tumores e processos patológicos de angiogênese (CONNOR *et al.*, 2007; WEYLANDT *et al.*, 2011). No entanto, no presente trabalho, a concentração de TNF- α no sítio tumoral não diferiu entre os grupos.

6 CONCLUSÃO

A partir do que foi explanado e discutido no presente trabalho, podemos concluir que a baixa relação de PUFAS n-3 presente no óleo de canola, embora não tenha ocasionado redução do crescimento do tumor e metástases, levou a menor peroxidação lipídica no fígado e aumento da proliferação celular no tumor dos animais alimentados com esse óleo. O óleo de linhaça, por sua vez, também não foi capaz de reduzir o crescimento do tumor e metástases, mas ocasionou redução de triglicerídeos e aumento da peroxidação lipídica no fígado, além de aumento de triglicerídeos e colesterol circulantes. Por outro lado, o óleo de peixe, mesmo não tendo alterado o crescimento do tumor e metástases, foi capaz de reduzir triglicerídeos no fígado, além de aumentar a atividade de MPO, relacionado à infiltração de neutrófilos, e reduzir NAG, marcador de macrófagos, no sítio tumoral. Além disso, induziu o aumento de VEGF nos tumores, que hipotetizamos ser devido a aumento da hipóxia tumoral nesse grupo.

Diante disso, o consumo de dietas à base de diferentes óleos, com baixa relação n-6/n-3, apesar de não terem alterado o crescimento do tumor e reduzido o número de metástases, exerce efeitos distintos sobre o metabolismo lipídico, processos angiogênicos e inflamatórios, e na proliferação celular em modelo de carcinoma mamário murino 4T1.

REFERÊNCIAS

ALI, S. M.; HARVEY, H. A.; LIPTON, A. Metastatic breast cancer: overview of treatment. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 415, p. S132-S137, oct. 2003.

ALLAIN, C. C. *et al.* Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clin Chem.**, v. 20, n. 4, p. 470-475, apr. 1974.

ÂNGULO, M. M. *et al.* Câncer de mama. **Medicine.**, v. 11, n. 27, p. 1629-40. 2013.

AZORDEGAN, N. *et al.* Carcinogenesis alters fatty acid profile in breast tissue. **Mol Cell Biochem.**, v. 374, n. 1-2, p. 223-32, feb. 2013.

BACCHI, C. E.; GOWN, A. M. Detection of cell proliferation in tissue sections. **Braz J Med Biol Res.**, v. 26, n. 7, p. 677-87, jul. 1993.

BALIGA, M. S.; MELETH, S.; KATIYAR, S. K. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells in vitro and in vivo systems. **Clin. Cancer. Res.**, v. 11, n. 5, p.1918-1927, mar. 2005.

BELO, A. V. *et al.* Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. **Life Sci.**, v. 74, n. 23, p. 2827-37, apr, 2004.

BEN-BARUCH, A. The tumor-promoting flow of cells into, within and out of the tumor site: regulation by the inflammatory axis of TNF α and chemokines. **Cancer Microenviron.**, v. 5, n. 2, p.151-164. aug. 2012.

BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **J Pathol.**, v.196, n. 3, p. 254-265, mar. 2002.

BORSONELO, E. C.; VIEIRA, L.; GALDURÓZ, J. C. The influence of the polyunsaturated fatty acids on body weight and anxiolytic-like behavior in female rats. **Nutr Neurosci.**, v. 16, n.1, p. 2-5, jan. 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, n.1, p. 248-264, may. 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer.** Rio de Janeiro: INCA, 2014. p. 34-35.

BROWN, J. M. Tumor hypoxia in cancer therapy. **Methods. Enzymol.**, v. 435, p. 297-321. 2007.

BROWN, J. Q. *et al.* Quantitative optical spectroscopy: a robust tool for direct measurement of breast cancer vascular oxygenation and total hemoglobin content in vivo. **Cancer Res.**, v.69, n.7, p. 2919-2926, apr. 2009.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods. Enzymol.**, v. 52, p. 302-10, 1978.

BUETTNER, R.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L.C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity.**, v.15, p.798-808, apr. 2007.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale. **Biochimie**, v. 91, n. 6, p. 791-795., jun. 2009.

CAO, Y.; CAO, R.; BRÅKENHJELM, E. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. **J. Nutr. Biochem.**, v.13, p.380-390, jul. 2002.

CARMICHAEL, A. R. Obesity and prognosis of breast cancer. **Obes. Rev.**, v.7, n.4, p. 333-340, nov. 2006.

CARMO, M. C. N. S.; CORREIA, M. I. T. D. A Importância dos Ácidos Graxos Ômega-3 no Câncer. **Rev. bras. cancerol.**, v. 55, n. 3, p. 279-287, abr. 2009.

CARVALHO, L. F. *et al.* Perfil imuno-histoquímico do carcinoma mamário murino 4T1. In: 13º Simpósio Mineiro de Oncologia, 2011, Belo Horizonte. **Âmbito Hospitalar**, 2011. p. 22-22.

CARVALHO, S. A.; COELHO, J. V.; TAKAHASHI, J. A. Screening filamentous tropical fungi for their nutritional potential as sources of crude proteins, lipids and minerals. **Food Sci Technol Int.**, v. 16, n. 4, p. 315-320, aug. 2010.

CAVE JR, W. T. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in rodent models of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 46. n. 2-3, p. 239-246, nov-dec.1997.

CAVE, W. T. "Dietary n-3 (omega-3) polyunsaturated fatty acid effects on animal tumorigenesis. **The FASEB journal.**, v. 5, n. 8, p. 2160-2166. 1991.

CHEN J.; WANG. L.; THOMPSON, L. U. Flaxseed and its components reduce metastasis after surgical excision of solid human breast tumor in nude mice. **Cancer Lett.**, v. 234, n. 2, p. 168-75, mar. 2006.

CHO, K. *et al.* Canola oil inhibits breast cancer cell growth in cultures and in vivo and acts synergistically with chemotherapeutic drugs. **Lipids**, v. 45, n. 9, p. 777-784, set. 2010.

CIBEIRA, G. H; GUARAGNA, R. M. Lipídio: fator de risco e prevenção do câncer de mama. **Rev. nutr.**, v. 19, n. 1, p. 65-75, fev. 2006.

CONNOR, K. M. *et al.* Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. **Nat Med.**, v. 13. n.7, p. 868-73, jul. 2007.

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

CRUZ, P. M. *et al.* The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: a review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. **Front Pharmacol.**, v. 4, n.119. p. 1-18, sep. 2013.

DE LORENZO, M. S. *et al.* Caloric restriction reduces growth of mammary tumors and metastases. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 9, p.1381-7, sep. 2011.

DE LORGERIL M.; SALEN, P. New insights into the health effects of dietary saturated and omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. **BMC Med.**, v. 10, n. 50, may. 2012.

DRABKIN, D. L.; AUSTIN, J. H. Spectrophotometric studies I. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. **J. Biol. Chem.**, v. 98, n. 2, p. 719-733, aug.1932.

FAZIO, S. *et al.* Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein e null macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, n.9, p. 4647-4652. apr. 1997.

FERRARA, N. VEGF as a therapeutic target in cancer. **Oncology**, v. 69, n. Suppl. 3, p. 11-16, nov. 2005.

FIRESTONE, R. A. Low-density lipoprotein as a vehicle for targeting antitumor compounds to cancer cells. **Bioconjug. Chem.**, v.5, n.2, p.105-113, mar. 1994.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 226, n.1, p 497-509, may.1957.

FOSSATI, P; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 2077-2080, oct. 1982.

FULZELE, S. V. *et al.* Inhalation delivery and anti-tumor activity of celecoxib in human orthotopic non-small cell lung cancer xenograft model. **Pharm Res.**, v. 23, n. 9, p.2094-106, sep. 2006.

GAÍVA, M. H. *et al.* Diets rich in polyunsaturated fatty acids: effect on hepatic metabolism in rats. **Nutrition.**, v. 19, n. 2, p. 144-9, feb. 2003.

GAMBICHLER, T. *et al.* Expression of proliferation markers and cell cycle regulators in T cell lymphoproliferative skin disorders. **J Dermatol Sci.**, v. 49, n. 2, p. 125-32, feb. 2008.

GARCIA, A.; KANDEL, J. J. Notch: a key regulator of tumor angiogenesis and metastasis. **Histol Histopathol.**, v. 27, n. 2, p. 151, fev. 2012.

GAROFOLO, A.; PETRILLI, A. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.19, n.5, p.611-621, sep/oct. 2006.

GONZÁLEZ, R. P. *et al.* Método para o estudo in vivo da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 15, n. 3, p. 00-00, 2000.

GRAÇA, B. *et al.* Angiogénese e cancro: da biopatologia à terapêutica. **Acta med. Port.**, v. 17, n. 1, p. 76-93, 2004.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell.**, v.140, n.6, p.883–899, mar. 2010.

GROENER, J. E. M.; VAN GENT, T.; VAN TOL, A. Effect of lipid transfer protein on plasma lipids, apolipoproteins and metabolism of HDL cholesteryl ester in the rat. **Biochim Biophys Acta**, v.1002, n.1, p. 93-100, mar.1989.

HAMAGUCHI, T. *et al.* TNF inhibitor suppresses bone metastasis in a breast cancer cell line. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 407, n. 3, p. 525-530, apr. 2011.

HARDMAN W. E.; ION, G. Suppression of implanted MDA-MB 231 human breast cancer growth in nude mice by dietary walnut. **Nutr Cancer.**, v. 60, n. 5, p. 666-74, 2008.

HARDMAN, W.E.; MUNOZ, J. J.R.; CAMERON, I.L. Role of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in omega 3 fatty acids induced suppression of breast cancer xenograft growth in mice. **Cancer Cell Int.**, v. 2, n. 1, p. 10, jul. 2002.

HOUGHTON, A. M. The paradox of tumor-associated neutrophils: fueling tumor growth with cytotoxic substances. **Cell Cycle.**, v. 9, n. 9, p.1732-1737, may. 2010.

HUBBARD, N. E.; LIM, D.; ERICKSON, K. L. Alteration of murine mammary tumorigenesis by dietary enrichment with n-3 fatty acids in fish oil. **Cancer Lett.**, v. 124, n.1, p.1-7, feb.1998.

JOLLY, C. A. Diet manipulation and prevention of aging, cancer and autoimmune disease. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, v. 8,n.4, p.382-7, jul. 2005.

KANG, J. X.; LIU, A. The role of the tissue omega-6/omega-3 fatty acid ratio in regulating tumor angiogenesis. **Cancer Metastasis Rev**, v.32, p.201-210, jun. 2013.

KIM, E.J. *et al.* Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant Balb/c mice. **Breast. Cancer. Res.** v.13, n.4, p.R78, aug. 2011.

KOLANJIAPPAN, K.; RAMACHANDRAN, C. R; MANOHARAN, S. Biochemical changes in tumor tissues of oral cancer patients. **Clin Biochem.**, v. 36, n.1, p. 61-65, feb. 2003.

KONTOGIANNI, M. D. *et al.* Flaxseed oil does not affect inflammatory markers and lipid profile compared to olive oil, in young, healthy, normal weight adults. **Metabolism**, v. 62, n. 5, p. 686-693, may. 2013.

KUEMMERLE, N.B. *et al.* Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation. **Mol Cancer Ther.**, v.10, n.3, p. 427-36, mar. 2011.

LEIFLER, K. S. *et al.* Inflammation induced by MMP-9 enhances tumor regression of experimental breast cancer. **J Immunol.**, v. 190, n. 8, p. 4420-30, apr. 2013.

LEON, C. G. *et al.* Alterations in cholesterol regulation contribute to the production of intratumoral androgens during progression to castration-resistant prostate cancer in a mouse xenograft model. **Prostate.**, v. 70, n.4, p. 390-400, mar. 2010.

LI, Z.; BOWERMAN, S.; HEBER, D. Health ramifications of the obesity epidemic. **Surg. Clin. North.Am.**, v.85, n.4 p. 681-701, aug. 2005.

LOCH-NECKEL, G. *et al.* Inflamação e câncer: Discutindo a patogênese e o tratamento dos gliomas. **Biosaúde**, v. 10, n. 1, p. 69-86, 2008.

LOPES-COSTA, P. V. *et al* Efeitos do raloxifeno sobre a angiogênese do carcinoma de mama de mulheres menopausadas. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 29, n.7, p.337-341, jul. 2007.

MACLENNAN, M; MA, D. W. Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 12, n. 5, p. 211, 2010.

MAKAHATADZE, N.J. Tumor necrosis factor locus: genetic organization and biological implications. **Hum. Immunol.**, v. 59, n. 9, p. 571-579, sep. 1998.

MAKAREM, N. *et al.* Dietary Fat in Breast Cancer Survival. **Annu Rev Nut.**, v. 33, may. 2013.

MARQUES, S.M. *et al.* Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. **Microvasc Res.**, v. 82, n. 3, p. 246-252, nov. 2011.

MARTIN, C. A. *et al.* Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Rev. Nutr. Campinas.**, v. 19, n. 6, p. 761-770, nov./dez. 2006.

MENDES, J, B. *et al.* Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 83, n. 2, p. 408-415, apr. 2007.

OBEID, E. *et al.* The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). **Int J Oncol.**, v. 43, n. 1, p.5-12, jul. 2013.

ONUCHIC, A. C; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 1, 2012.

OVIEDO-SOCARRÁS, T., *et al.* Diabetes alters inflammation, angiogenesis, and fibrogenesis in intraperitoneal implants in rats. **Microvasc Res.**, v. 93, p. 23-29, may, 2014.

PAYVANDI, F. *et al.* Immunomodulatory drugs inhibit expression of cyclooxygenase-2 from TNF α , IL-1 β and LPS-estimated human PBMC in a partially IL-10-dependent manner. **Cell. Immunol.**, v. 230, n.2, p. 81-88, aug. 2004.

PERINI, J. Â. D. L. *et al.* Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: metabolism in mammals and immune response. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23, n. 6, p. 1075-1086, nov./dez.2010.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. **Curr. Protoc. Immunol.**, v. 20, p. 20.2. 1-20.2. 16, may. 2001.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, v.123, n.11, p.1939-51, nov. 1993.

RIEDIGER, N. D. *et al.* Low n-6:n-3 fatty acid ratio, with fish- or flaxseed oil, in a high fat diet improves plasma lipids and beneficially alters tissue fatty acid composition in mice. **Eur. J. Nutr.**, v. 47, n.3, p.153-60, apr. 2008.

RIUL, S. S.; SILVA, P. A. Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 64, p. 1016-21, 2011.

ROMERO-GARCIA, S. *et al.* Tumor cell metabolism: an integral view. **Cancer Biol Ther.**, v. 12, n.11, p. 939–948, dec. 2011.

ROSA, D. D. *et al.* Fish oil improves the lipid profile and reduces inflammatory cytokines in Wistar rats with precancerous colon lesions. **Nutr Cancer.**, v. 64, n. 4, p. 569-79, apr. 2012.

ROSE, D.P. *et al.* Influence of diets containing eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid on growth and metastasis of breast cancer cells in nude mice. **J Natl Cancer Inst.**, v. 87, n. 8, p. 587-92, apr 1995.

ROSE, D.P.; CONNOLLY, J.M.; COLEMAN, M. Effect of omega-3 fatty acids on the progression of metastases after the surgical excision of human breast cancer cell solid tumors growing in nude mice. **Clin Cancer Res.**, v. 2, n.10, p.1751-1756, oct. 1996.

SILVA, A. C.; ALVES, R. C; PINHEIRO, L. S. As implicações da caquexia no câncer. **E-Scientia**, Belo Horizonte, v.5, n.2, p.49-56, dez. 2012. Disponível em: <www.unibh.br/revistas/escientia>. Acesso em 13 de fevereiro.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-6/Omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. **Food Rev Inter.**, v. 20, n.1, p. 77-90, 2004.

SORIA, G., *et al.* Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNF α & IL-1 β with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition. **BMC cancer.**, v.11, n.1, p. 130, apr. 2011.

SOUTO, J. C.; VILA, L.; BRÚ, A. Polymorphonuclear neutrophils and cancer: intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. **Med Res Rev.**, v. 31, n. 3, p. 311-63, may. 2011.

SOUZA, G. F. M.; FREITAS, R. A.; MIRANDA, J. L. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio. **Cienc. Odontol. Bras.**, v.10, p. 12-18, 2007.

SURETTE, M. E. The science behind dietary omega-3 fatty acids. **Can. Med. Assoc. J.** v. 178, n. 2, p. 177-180, jan. 2008.

TAPIERO, H. *et al.* Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomed Pharmacother.**, v. 56, n.5, p. 215-22, jul. 2002.

TEIXEIRA, A. S. *et al.* Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice. **Life Sci.**, v. 78, n. 14, p. 1637-1645, feb. 2006.

TEIXEIRA, A. S., *et al.* Aminoguanidine prevents impaired healing and deficient angiogenesis in diabetic rats. **Inflammation.**, v. 23, n. 6, p. 569-581, dec. 1999.

THOMPSON, M. P.; COOPER, S. T; PARRY, B. R; TUCKEY, J. A. Increased expression of the mRNA for hormone-sensitive lipase in adipose tissue of cancer patients. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1180, p. 236-242, jan.1993.

WAITZBERG, D.; NARDI, L.; HORIE, L. Desnutrição em câncer. **Revista Onco.**, v.8, n.2, p.34, out./Nov.2011.

WARREN, M. A. *et al.* Tumor necrosis factor deficiency inhibits mammary tumorigenesis and a tumor necrosis factor neutralizing antibody decreases mammary tumor growth in neu/erbB2 transgenic mice. **Mol Cancer Ther.**, v. 8, n.9, p. 2655-2663, sep.2009.

WEIGELT, B.; GEYER F. C.; REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: how special are they? **Mol Oncol.**, v. 4, n. 3, p.192-208, Jun. 2010.

WENDEL, M.; HELLER, A. R. Anticancer actions of omega-3 fatty acids--current state and future perspectives. **Anticancer Agents Med Chem.**, v. 9, n. 4, p. 457-70, may. 2009.

WEYLANDT, K. *et al.* Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF- α . Carcinogenesis. **Carcinogenesis.**, v. 32, n. 6, p. 897-903, jun. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Breast cancer**: prevention and control. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html>>. Acesso em 13 de fev. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **GLOBOCAN 2012** Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Disponível em:

<http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em 13 de fev. 2014.

YANG, Y. *et al.* TNF-alpha polymorphisms and breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 129, n. 2, p. 513-9, sep. 2011.

ZANETTI, J. S.; OLIVEIRA, L. R.; RIBEIRO-SILVA, A. Câncer de mama: de perfis moleculares a células tronco. **RUVRD**, Três Corações, v. 9, n. 1, p. 277-292, jan./jul. 2011.

ZHANG, F.; DU, G. Dysregulated lipid metabolism in cancer. **World J Biol Chem**, v. 3, n. 8, p. 167-174, aug. 2012.

ZHENG, J.S. *et al.* Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. **BMJ.**, v. 27, n. 346, p. f3706, jun. 2013.

ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 126 / 2012, relativo ao projeto intitulado “Influência da composição de lipídeos da dieta no desenvolvimento do carcinoma mamário murino 4T1”, que tem como responsável DIRCE RIBEIRO DE OLIVEIRA, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 11/06/2012. Este certificado espira-se em 11/06/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 126 / 2012, related to the Project entitled “Lipid composition and the development of 4T1 murine mammary carcinoma”, under the supervision of DIRCE RIBEIRO DE OLIVEIRA, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/06/2012. This certificates expires in 11/06/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 11/06/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005

31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil

Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592

www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

