

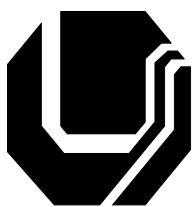
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA

EFEITO MODULADOR DO ÔMEGA-3
SOBRE A MUTAGENICIDADE E CARCINOGENICIDADE DA
DOXORRUBICINA EM CELULAS SOMÁTICAS DE
Drosophila melanogaster

Aluna: Rosiane Gomes da Silva

UBERLÂNDIA-MG

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA**

**EFEITO MODULADOR DO ÔMEGA-3
SOBRE A MUTAGENICIDADE E CARCINOGENICIDADE DA
DOXORRUBICINA EM CELULAS SOMÁTICAS DE
*Drosophila melanogaster***

Aluna: Rosiane Gomes da Silva

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética).

UBERLÂNDIA-MG

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

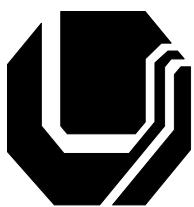
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586e Silva, Rosiane Gomes da, 1984-
Efeito modulador do ômega-3 sobre a mutagenicidade e carcinogenicidade da Doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster* [manuscrito] / Rosiane Gomes da Silva. - 2011.
78 f. : il.

Orientador: Júlio César Nepomuceno.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Mutagênese – Teses. 2. *Drosophila melanogaster* - Teses. 3. Doxorrubicina – Teses. I. Nepomuceno, Júlio César. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título

CDU: 575.224.4

PALAVRAS-CHAVE: Ômega-3, antimutagênico, antitumoral, SMART, *wts*.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA**

**EFEITO MODULADOR DO ÔMEGA-3
SOBRE A GENOTOXICIDADE E CARCINOGENICIDADE DA
DOXORRUBICINA EM CELULAS SOMÁTICAS
DE *Drosophila melanogaster***

Aluna: Rosiane Gomes da Silva

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Examinadores: Prof^a. Dra. Lúcia Regina Ribeiro
Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Data da Defesa: 26 / 07 / 2011

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

"O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto."

Thomas Huxley

Dedico este trabalho a todos que amo.
Em especial à minha mãe, **Maria Divina**
da Silva, e ao meu esposo, **Luiz**
Gonçalves de Oliveira Jr., pelo apoio e
incentivo que me motiva seguir sempre
em frente.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À DEUS

Pelo maravilhoso Dom da Vida!

Por fortalecer meu espírito não permitindo que eu desista dos meus ideais!

À MINHA MÃE

Por me fazer sentir mais forte do que realmente sou!

Por me amar incondicionalmente!

Por abrir mão dos seus sonhos para que os meus fossem realizados!

AO PROF. JÚLIO CÉSAR NEPOMUCENO

Mais do que te agradecer, quero lhe parabenizar por ser esse profissional
Brilhante!

Sou honrada por ter você como orientador, pois se consegui chegar até aqui,
devo isso a você!

Obrigada pela amizade e por acreditar em mim!

AO LUIZ Jr.

Pelos conselhos motivadores e incessantes!

Por ser meu amigo de todas as horas! Pela sua cumplicidade e companheirismo!
E acima de tudo... Por me amar!
Esteja Sempre Comigo!
Te Amo!

AGRADECIMENTOS

Aos membros da Banca Examinadora pela atenção com que leram este trabalho e pelas valiosas sugestões.

Ao **Prof. Dr. Ulrich Graf** do Instituto de Toxicologia da Universidade de Zurich, Suíça, e a **Universidade Indiana-USA**, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*.

Aos **Professores** do curso de Pós-graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia pelos valiosos ensinamentos.

À minha amiga, colega de mestrado e de laboratório, **Priscila Capelari**, pela sua amizade e dedicação nos momentos estressantes e de muito trabalho vividos durante essa jornada. Sua amizade guardarei por toda Vida!

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pelos momentos de trabalho e alegria que compartilhamos ao longo do curso, em especial ao **Renato Pereira Silva, Débora Cristina Oliveira Nunes, Galber Rodrigues Araújo, Letícia Eulálio Castanheira, Carla Cristina Neves Mamede e Liandra Freitas Marquez Bernardes**.

Aos meus colegas do Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas: **Adriane, Hélio, Mozar**, pela agradável convivência; especialmente à **Nayane, Jayson (Sidão), Rosiane Saturino e Bethânia** pela amizade, apoio e colaboração.

Aos meus irmãos e seus familiares: **Valmir, Maria Aparecida, Valdomiro, Neuton, Delma e Rosiene** pelas palavras de conforto e incentivo que me motivaram seguir em frente, e por constituírem a base da minha vida que é a nossa família.

À madrinha **Sulmair** e ao meu irmão e padrinho **Glewton** pelo carinho e pelas refeições maravilhosas!

Ao meu irmão **Nelson** pelas nossas conversas, pelo carinho, disposição e por fazer os meus dias mais tranquilos.

Aos meus **sobrinhos** por promoverem momentos de distração e alegria.

Aos meus sogros **Maria Luzia e Luiz**, pelo carinho, presteza e por ter me acolhido como uma filha.

Ao **Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM** por ceder o Laboratório de Citogenética e Mutagênese para realização deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho e que não foram citados.

O meu muitíssimo **OBRIGADA!**

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM - Patos de Minas, MG.

Recebemos o apoio financeiro dos seguintes órgãos:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.
- Universidade Federal de Uberlândia – UFU.
- Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM.

Sumário

	Páginas
Apresentação.....	01
Capítulo I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	03
1. GENÉTICA E CÂNCER.....	04
2. DIETA E QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER.....	06
3. RADICAIS LIVRES.....	10
4. AGENTES QUÍMICOS.....	12
4.1. Ácidos graxos poliinsaturados: Ômega-3 (ω -3).....	12
4.1.2. O papel do Ômega-3 na luta contra o câncer.....	17
4.2. Doxorrubicina (DXR).....	20
5. SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) - Teste para detecção de mutação e recombinação somáticas.....	23
5.1. Linhagens e marcadores.....	24
5.2. Cruzamentos.....	26
6. Warts (Wts) - Teste para detecção de clones de tumor epitelial em <i>Drosophila melanogaster</i>	28
6.1. Cruzamentos.....	30
7. REFERÊNCIAS.....	30
Capítulo II – EFEITO MODULADOR DO ÔMEGA-3 SOBRE A MUTAGENICIDADE E CARCINOGENICIDADE DA DOXORRUBICINA EM CELULAS SOMÁTICAS DE <i>Drosophila melanogaster</i>	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
2.1. Compostos Químicos.....	48
2.2. SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) - Teste para detecção de mutação e recombinação somáticas.....	48
2.3. Warts (Wts) - Teste para detecção de clones de tumor epitelial em <i>Drosophila melanogaster</i>	50

3. RESULTADOS.....	51
3.1. SMART.....	51
3.2. Warts (Wts.....	52
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	53
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

Lista de Figuras

	Páginas
Capítulo I	
Figura 1: Etapas da carcinogênese.....	06
Figura 2: Formação de radicais livres (espécies reativas do oxigênio) e mecanismos antioxidantes biológicos.....	12
Figura 3: Ácidos graxos ômega-3 e ômega-6.....	13
Figura 4: Estrutura química do ácido oléico, o principal ácido graxo da série ômega 9.....	13
Figura 5: Metabolismo dos AGPI n-3 e n-6 e seus supostos efeitos em tumores. Os AGPI podem atuar como precursores de diferentes eicosanóides, incluindo leucotrienos (LT), prostaglandinas (PG) e tromboxanas (TX).....	15
Figura 6: Fórmula estrutural da doxorrubicina.....	20
Figura 7. Casal de <i>Drosophila melanogaster</i>	23
Figura 8: Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, dos pêlos da asa de <i>Drosophila melanogaster</i> (pêlos múltiplos).....	25
Figura 9: Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, dos pêlos da asa de <i>Drosophila melanogaster</i> (pêlos flare).....	25
Figura 10: Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, da asa de <i>Drosophila melanogaster</i> , (A) Borda lisa = formato da asa do descendente MH. (B) Borda serrilhada = formato da asa do descendente BH.....	27
Figura 11: Esquema representativo dos Cruzamentos no teste SMART. Cruzamento Padrão – ST utilizando fêmeas virgens flr/TM3, cruzadas com machos <i>mwh/mwh</i>	27
Figura 12: Esquema representativo dos Cruzamentos no teste SMART. Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação (HB) cruzando fêmeas virgens ORR e machos <i>mwh/mwh</i>	28
Figura 13: (a) e (b) Tumor no tórax. (c) Tumor na perna. (d) Tumor na asa.....	29

Lista de Tabelas

	Páginas
Capítulo I	
Tabela 1: Genes supressores de tumores (GST) relacionados como causas de câncer e síndromes herdadas.....	05
Tabela 2: Relação entre proto-oncogene, tipo de lesão e tipo de câncer.....	05
Tabela 3: Principais compostos funcionais com ação quimiopreventiva.....	09
Capítulo II	
Tabela 1: Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes “MH” de <i>Drosophila melanogaster</i> , do Cruzamento Padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de Ômega-3 (ω -3) isoladas e associadas a DXR (0,15 mg/ml).....	52
Tabela 2: Frequências de clones de tumor observados em <i>Drosophila melanogaster</i> , heterozigota para o gene supressor de tumor <i>wts</i> , tratada com diferentes concentrações de ω -3 isoladas e associadas a DXR (0,125 mg/ml).....	53

Lista de Abreviações

- AA** - ácido araquidônico
- AGPI** - ácidos graxos poliinsaturados
- ALA** - ácido alfa-linolênico
- CDC2** - célula ciclo dependente do complexo 2
- COX** - cicloxigenases
- DHA** - ácido docosahexaenóico
- DNA** - ácido desoxirribonucléico
- DXR** - doxorrubicina
- GST** - gene supressor de tumor
- HB** - *High bioactivation*
- EFA** - *Essential Fats Acids*
- EPA** - ácido eicosapentaenóico
- ERN** - espécies reativas de nitrogênio
- ERO** - espécies reativas de nitrogênio
- ERNO** - espécies reativas de oxigênio
- ERRO** - espécies reativas de nitrogênio
- H₂O₂** - peróxido de hidrogênio
- HeLa** - Henrietta Lacks (linhagem de células cancerosa)
- LA** - ácido linoléico
- LOX** - lipoxigenases
- LT** - leucotrienos
- NO^{*}** - óxido nítrico
- NO⁺** - cátion nitrosonium
- O₂^{*}** - superóxido
- OH^{*}** - hidroxila
- ONOO⁻** - peroxinitrito
- ORR** - *oregon R*
- PG** - prostaglandinas
- PIFE** - fator indutor de proteólise
- PUFA** - *Polyunsaturated Fatty Acids*
- MH** - trans-heterozigoto marcados

mwh - *multiple wing hairs*

SMART - Somatic Mutation and Recombination Test

ST - *Standard Cross*

TM3 Bd^S - *Third Multiple3 Beadle Serrate*

TX - tromboxanas

Wts - *warts*

ω-3, ω-6 e ω-9 - ômega-3, ômega-6 e ômega-9

APRESENTAÇÃO

O ômega-3 (ω -3) é um ácido graxo poliinsaturado (PUFA – Polyunsaturated Fatty Acids) também conhecido como “óleo essencial” por não ser sintetizado pelo organismo, tanto no homem como nos outros animais; por esta razão, tem que ser ingerido na dieta. Os principais representantes são ácido alfa-linolênico (ALA) de cadeia curta que é metabolizado em ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) ambos de cadeia longa.

O ALA é encontrado principalmente em alimentos vegetais, incluindo óleos como o de linhaça, canola (MARQUES, 2008), soja e nozes (CITADIN *et al.*, 2008). O EPA e o DHA são sintetizados por minúsculos organismos vegetais marinhos, os fitoplânctons, mas são encontrados em peixes marinhos de águas frias e profundas, salmão, sardinha, cavala, arenque, bacalhau, anchova, que se alimentam de fitoplânctons, e também em certos frutos do mar, a exemplo de lagostas e camarões.

Os ácidos do tipo ω -3 são componentes essenciais de membranas celulares e estão envolvidos em diversos processos metabólicos, principalmente mecanismos de defesa antiinflamatórios, de crescimento e de multiplicação celular. Na composição celular podem atuar determinando a fluidez da membrana, a formação de receptores, capacidade de ligação das proteínas com receptores e ativação de vias metabólicas.

Os benefícios nutricionais e medicinais do ω -3 têm sido discutidos em muitos artigos e conferências. Dentre os efeitos fisiológicos em humanos estão redução de fatores de riscos associados a doenças cardiovasculares, psoríase, depressão, Alzheimer, diabetes, artrite e câncer.

Vários estudos epidemiológicos evidenciaram que grupos de pessoas que consomem dietas ricas em ácidos graxos ω -3 podem ter uma menor prevalência de alguns tipos de câncer como o câncer de cólon, próstata, mama e ovário e ainda reduzir o índice de metástases.

A literatura cita vários mecanismos de ação dos PUFA ω -3 contra células neoplásicas e também a importância da suplementação na dieta para uma boa quimioprevenção. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar as

atividades antimutagênicas e antitumorais de diferentes concentrações de ω-3 sobre o efeito mutagênico e carcinogênico do quimioterápico doxorrubicina (DXR 0,125 mg/mL), por meio dos testes SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) e *wts* (Warts - Teste para detecção de tumor epitelial), ambos em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

Este trabalho será apresentado sob a forma de capítulos. No Capítulo I são abordados assuntos como o processo carcinogênico, o papel dos quimiopreventivos na regressão do câncer e formação de radicais livres. Como o ômega-3 possui papel central neste trabalho é descrito com detalhes: definição, conceitos, aplicações, benefícios do consumo do ácido graxo. Os testes SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) e Warts (teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*) também foram descritos e usados neste estudo para investigação dos possíveis efeitos do ômega-3 em organismos experimentais.

O Capítulo II consiste no manuscrito intitulado “EFEITO MODULADOR DO ÔMEGA-3 SOBRE A MUTAGENICIDADE E CARCINOGENICIDADE DA DOXORRUBICINA EM CELULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*”, que será enviado para publicação no “**Journal of Biomedical Science**”.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. GENÉTICA E CÂNCER

O corpo humano é formado por milhões de células que se reproduzem através de um processo chamado divisão celular. Em condições normais, esse processo é ordenado e controlado, responsável pela formação, crescimento e regeneração dos tecidos saudáveis do corpo (FERNANDES e MELLO, 2008).

Diversas situações podem perturbar o comportamento normal das células, tais como: agentes ambientais (poluentes como alcatrão, tabagismo, raios ultravioletas, alimentação); agentes biológicos (infecção por vírus oncogênico, exemplo, o papiloma vírus que predispõe para o câncer de colo do útero); ou mesmo predisposições genéticas (quando um gene danificado que confere alta suscetibilidade ao câncer é passado para diversas gerações) (FERNANDES e MELLO, 2008; GATES e FINK, 2008; NAOUM, 2008).

A mudança no comportamento das células é chamada de carcinogênese (Figura 1) (FERNANDES e MELLO, 2008). A carcinogênese resulta de múltiplas etapas de desenvolvimento e pode envolver dezenas, até centenas, de genes, por meio de mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, amplificações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos (DANTAS *et al.*, 2009).

De forma simplificada, as etapas da carcinogênese são: iniciação, quando as células estão expostas a um agente carcinogênico; promoção, quando as células “anormais” persistem e iniciam uma etapa pré-neoplásica; progressão, fase final da tumorigênese, quando ocorre crescimento celular descontrolado (BATISTA, 2010).

Os principais controles genéticos são aqueles que atuam na regulação da proliferação celular, tais como os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes são genes responsáveis pela proliferação celular ordenada, os genes supressores de tumor são genes que atuam mantendo essa proliferação sob controle, restringindo o crescimento celular e diminuindo a probabilidade de uma célula se tornar cancerosa (LOURO *et al.*, 2002). As mutações nesses genes podem acarretar vários tipos de câncer. Como podem ser observados nas Tabelas 1e 2.

Tabela 1: Genes supressores de tumores (GST) relacionados como causas de câncer e síndromes herdadas. *Fonte:* NAOUM, 2008.

GST	Tumor Primário	Síndrome Herdada
APC	Colo-retal	Polipose adenomatosa familiar
BRCA-1	Mama	Câncer de mama familiar
NF-1	Neurofibroma	Neurofibromatose tipo-2
NF-2	Meningiomas	Neurofibromatose tipo-2
p16 (MTS1)	Melanoma	Melanoma familiar
p53	Sarcomas, linfomas, etc.	Câncer de ovário e glândula adrenal

Tabela 2: Relação entre proto-oncogene, tipo de lesão e tipo de câncer. *Fonte:* NAOUM, 2008.

Proto-oncogene	Lesão não proto-oncogene	Neoplasia
Abl	Translocação	Leucemia mielóide crônica
bcl-2	Translocação	Linfoma de célula-B
CYCD-1	Translocação	Câncer de mama
Myc	Translocação	Linfoma de Burkitt
gip	Mutação de ponto	Câncer de ovário e glândula adrenal
K-ras	Mutação de ponto	Leucemias agudas, Câncer de tireóide e melanoma
myc	Amplificação	Câncer de pulmão, mama e cervix
L-myc	Amplificação	Câncer de pulmão
N-myc	Amplificação	Neuroblastoma

As mutações podem acarretar múltiplos efeitos que, na grande maioria, são resultados maléficos como, malformações congênitas, envelhecimento celular e orgânico, teratogênese e cânceres (SILVA *et al.*, 2003).

O câncer é considerado uma das maiores causas de morte no mundo (DANTAS *et al.*, 2009), definido como uma doença multicausal crônica (GARÓFOLO *et al.*, 2004) consequente de uma série de mutações especiais que se acumulam em uma célula, a qual atribui alta habilidade de proliferação celular, diminuição da suscetibilidade a apoptose ou aumento da taxa geral de mutação

da célula (SUZUKI, 2002) e ainda ganho da capacidade de invadir novos tecidos adjacentes ou de sofrer metástases para tecidos distantes (RIBEIRO, 2003).

Quase todo câncer é genético, pois é causado por danos aos genes que controlam a célula ou o crescimento celular. Geralmente, esse dano é devido a influências externas, ou “carcinógenos”, que danificam os nossos genes ao longo da vida (GATES e FINK, 2008).

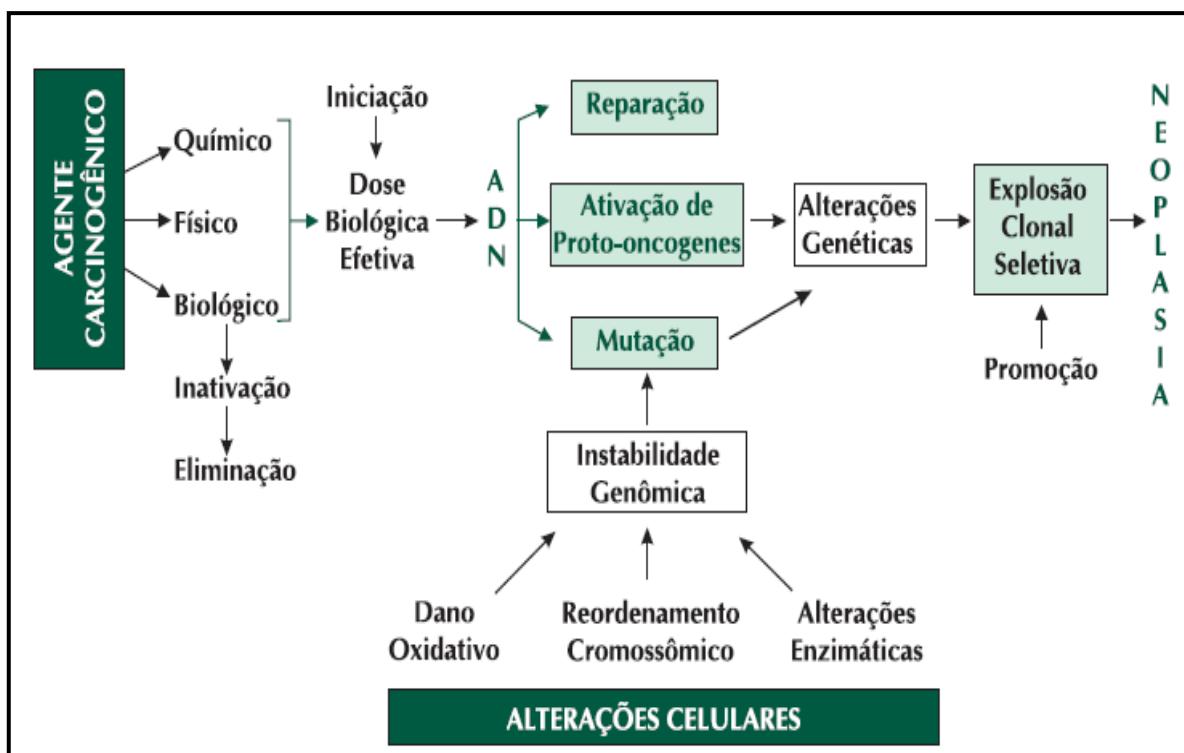


Figura 1: Etapas da carcinogênese. Fonte :INCA/MS, 2008.

2. DIETA E QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER

A luta contra o câncer é um dos maiores desafios da humanidade. Diante deste problema, diferentes estudos têm reavaliado os efeitos benéficos dos alimentos para a prevenção do câncer, pois, estima-se que 30-40% dos tumores podem ser evitados com um estilo de vida saudável e dieta correta (DIVISI *et al.*, 2006).

O processo de desenvolvimento de um câncer é chamado de carcinogênese. A carcinogênese geralmente é um processo lento, o que permite oferecer uma ampla janela terapêutica para bloquear o desenvolvimento de um

tumor (BÉLIVEAU e GINGRAS, 2007). Segundo Gama (2010), vários agentes farmacológicos são descritos na literatura por possuir ação quimiopreventiva, como exemplo ele cita as vitaminas, hormônios, anti-hormônios, anti-inflamatórios, dentre outros. Contudo diversos estudos epidemiológicos ou com animais já demonstraram a relação direta entre dieta e câncer de pulmão, cólon, mama, próstata, estômago, bexiga entre outros (KUROIWA-TRZMIELINA, 2007).

Para Asha *et al.* (2010) uma estratégia promissora para a manutenção do estado redox das células é a utilização de substâncias naturais, facilmente disponíveis a partir de vegetais, frutas, ervas e especiarias. Várias substâncias presentes nestes alimentos já foram identificadas como potencial quimiopreventivo, capazes de intervir na carcinogênese. De tal modo que a prevenção primária do câncer com base na alimentação possa trazer bons resultados na redução da incidência desta doença (OLIVEIRA, 2007).

Servan-Schreiber (2008) afirma que os alimentos são capazes de desintoxicar o corpo de numerosos cancerígenos, mesmo que certos legumes ou frutas não orgânicos estejam contaminados de pesticidas, o efeito positivo das moléculas anticâncer pode superar o efeito negativo dos cancerígenos.

Como foi dito, os alimentos que possuem propriedades anticâncer são chamados de quimiopreventivos. Os quimiopreventivos podem ser definidos como uma forma de prevenir a doença pelo uso de agentes químicos naturais ou sintéticos que possuem propriedades de reverter ou suprimir a passagem de lesões pré-malignas para carcinomas invasores (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Um bom quimiopreventivo deve apresentar reduzidos efeitos colaterais e baixa toxicidade, além de neutralizar as células. Estes agentes terapêuticos são classificados de acordo com estágio da carcinogênese em que atuam (EDRINGER, 2007), sendo, de forma geral, classificados como agentes bloqueadores quando bloqueiam o efeito inicial dos agentes carcinogênicos sobre seus sítios-alvo, ou supressores tidos como inibidores da evolução e propagação de um processo neoplásico já induzido (FUGANTI *et al.*, 2003).

Os processos de quimioprevenção podem ser divididos em três fases: a quimioprevenção primária ou a prevenção inicial do câncer em indivíduos saudáveis, mas de alto risco; a secundária, é a prevenção do câncer em indivíduos com pré-malignidade; e a terceira, é a prevenção de segundos tumores

primários ou de recorrências com cura presumida de um câncer tratado previamente (GAMA, 2010).

Os agentes quimiopreventivos encontrados nos alimentos funcionais (Tabela 3) podem surtir efeitos em qualquer uma das etapas clássicas da carcinogênese (iniciação, promoção, progressão) (BATISTA, 2010), objetivando um potente efeito preventivo, com múltiplos mecanismos de ação, bloqueando a carcinogênese (PADILHA e PINHEIRO, 2004).

Segundo Oliveira (2007) alguns constituintes da dieta como a curcumina, o licopeno, os polifenóis, as isoflavonas e o β -caroteno apresentam atividade contra diferentes tipos de câncer em órgãos como mama, próstata, pulmão, cólon, estômago, fígado e rim. Sendo que os principais mecanismos de ação para essas substâncias são: prevenção de danos oxidativos ao DNA pela ação antioxidante, promoção de reparos no DNA, indução de apoptose e da resposta imunológica, redução da produção do fator de crescimento semelhante à insulina que é responsável pela proliferação de algumas linhagens de células tumorais, entre outros.

De acordo com Arm *et al.* (2009) alguns compostos naturais já foram associados em tratamentos quimioterápicos e apresentaram, como resultado, a potencialização do quimioterápico e/ou a diminuição dos efeitos colaterais, comuns devido a toxicidade presente nas drogas. Um exemplo é o resveratrol, um polifenol presente nas cascas e sementes de uva, com importante atividade antioxidante. Outro exemplo são os ácidos graxos polinsaturados ômega-3 (ácidos linoléico e seus derivados), potentes antiinflamatórios.

As moléculas anticâncer presentes em uma alimentação adequada, aumentam a vulnerabilidade das células pré-cancerosas, devido à baixa diversidade genética e ausência de um adequado suprimento de sangue, diferentemente de tumores maduros (BÉLIVEAU e GINGRAS, 2007). Assim, a alimentação desempenha um papel fundamental na prevenção e patobiologia do câncer (COMBA *et al.*, 2010).

Tabela 3: Principais compostos funcionais com ação quimiopreventiva. *Fonte:* CARDOSO e OLIVEIRA, 2008.

Compostos Funcionais	Quimioprevenção	Alimentos
Isoflavonas	Ação estrogênica (reduz sintomas da menopausa) e anti-câncer.	Soja e derivados.
Proteínas de soja	Redução dos níveis de colesterol	Soja e derivados.
Ácidos graxos ômega-3 (EPA e DHA)	Redução do LDL - colesterol; ação antiinflamatória. Indispensável para o desenvolvimento do cérebro e retina de recém nascidos.	Peixes marinhos como sardinha, salmão, atum, anchova, arenque, etc.
Ácido α- linolênico	Estimula o sistema imunológico e tem ação antiinflamatória.	Óleos de linhaça, colza, soja; nozes e amêndoas.
Catequinas	Reducem a incidência de certos tipos de câncer, reduzem o colesterol e estimulam o sistema imunológico.	Chá verde, cerejas, amoras, framboesas, mirtilo, uva roxa, vinho tinto.
Licopeno	Antioxidante, reduz níveis de colesterol e o risco de certos tipos de câncer como de próstata.	Tomate e derivados, goiaba vermelha, pimentão vermelho, melancia.
Luteína e Zeaxantina	Antioxidantes; protegem contra degeneração macular.	Folhas verdes (luteína) Pequi e milho (zeaxantina).
Indóis e Isotiocianatos	Indutores de enzimas protetoras contra o câncer, principalmente de mama.	Couve flor, repolho, brócolis, couve de bruxelas, rabanete, mostarda.
Flavonóides	Atividade anti-câncer, vasodilatadora, antiinflamatória e antioxidante	Soja, frutas cítricas, tomate, pimentão, alcachofra, cereja.
Fibras solúveis e insolúveis	Reducem risco de câncer de cólon, melhora o funcionamento intestinal. As solúveis podem ajudar no controle da glicemia e no tratamento da obesidade, pois dão maior saciedade.	Cereais integrais como aveia, centeio, cevada, farelo de trigo, etc, leguminosas como soja, feijão, ervilha, etc, hortaliças com talos e frutas com casca.
Prebióticos - Fruto oligossacarídeos, inulina	Ativam a microflora intestinal, favorecendo o bom funcionamento do intestino.	Extraídos de vegetais como raiz de chicória e batata yacon.
Sulfetos alílicos (alilsulfetos)	Reducem colesterol, pressão sanguínea, melhoram o sistema imunológico e reduzem risco de câncer gástrico	Alho e cebola.
Lignanas	Inibição de tumores hormônio-dependentes.	Linhaça, noz moscada.
Tanino	Antioxidante, anti-séptico, vaso-constritor.	Maçã, sorgo, manjericão, manjerona, sálvia, uva, caju, soja, etc.
Estanóis e esteróis vegetais	Reducem risco de doenças cardiovasculares	Extraídos de óleos vegetais como soja e de madeira.
Probióticos - Bifidobacterias e Lactobacilos	Favorecem as funções gastrointestinais, reduzindo o risco de constipação e câncer de cólon.	Leites fermentados, iogurtes e outros produtos lácteos fermentados.

3. RADICAIS LIVRES

Um radical livre é uma estrutura química que possui um elétron desemparelhado, que o torna muito instável e altamente reativo e com uma enorme capacidade para combinar-se inespecificamente com diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivados de cada uma delas (SALVADOR e HENRIQUES, 2004).

A principal fonte de radical livre em sistemas biológicos é a molécula de oxigênio, que, no entanto, é fundamental para o metabolismo celular e para a produção de energia (HIDRATA *et al.*, 2004).

São exemplos de radicais livres o ânion superóxido (O_2^*), o radical hidroxila ($^{\cdot}OH$) e o óxido nítrico (NO^*). Existem outros compostos igualmente reativos aos radicais livres, mas que não possuem elétrons não-pareados na última camada e, portanto são classificados como espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) que incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o cátion nitrosonium (NO^+) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (DROGE, 2002).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana (BIANCHI e ANTUNES, 1999). São produzidos por modificações químicas de proteínas, lipídios, carboidratos e nucleotídeos, resultando em uma variedade de consequências biológicas como lesão tecidual, mutação, carcinogênese, comprometimento do sistema imunológico, doenças e morte celular (SANTOS e CRUZ, 2001). Estão, ainda, envolvidos nos processos de fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (BARREIROS *et al.*, 2006).

O excesso destas substâncias apresenta efeitos prejudiciais como a peroxidação dos lipídios de membrana e danos ao DNA (BARREIROS *et al.*, 2006), produzindo alterações diretas em uma fita ou na dupla fita de DNA, oxidando as bases pirimidinas, purinas, e desoxirriboses, levando à mutagênese (ROSA e COIMBRA, 2009).

ERO promove o estresse oxidativo nas células que desregula o sistema de defesa celular do corpo, levando à instabilidade genômica e câncer. Além disso, o estresse oxidativo pode ser resultado de uma série de fontes

endógenas, incluindo a produção de radicais livres de oxigênio por fosforilação oxidativa mitocondrial. As mitocôndrias são importante fonte de ERO, pois elas são grandes consumidores de oxigênio molecular nas células (ASHA *et al.*, 2010).

Os antioxidantes são substâncias que, mesmos em pequenas quantidades, são capazes de retardar ou inibir processos oxidativos, como a lipoperoxidação (VELLOSA *et al.*, 2007). Este processo oxidativo ocorre em ácidos graxos poliinsturados e é iniciada por um radical OH^{*} que captura um átomo de hidrogênio de um carbono metíleno da cadeia polialquil do ácido graxo (VANCINI *et al.*, 2005) alterando a estrutura e a permeabilidade de membranas celulares, acarretando, consequentemente, a perda da seletividade das trocas iônicas e liberação do conteúdo das organelas culminando com um morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A geração de radicais livres *in vivo* é um fenômeno constante, impossível de ser totalmente prevenido, apesar de existir vários mecanismos de controle formados por antioxidantes fisiológicos que podem competir com substratos oxidáveis e inibir ou atrasar o processo de oxidação (Figura 2). Dentro deste mecanismo de defesa destacam-se algumas enzimas como a superóxido dismutase, a catalase, a glutationa peroxidase e a glutationa redutase, e algumas substâncias não enzimáticas, como a glutationa, as vitaminas C e E, os flavonóides, o β-caroteno e o ácido α-lipóico (ROSA e COIMBRA, 2009). A expressão dessas enzimas protege as células dos danos oxidativos e pode impedir a mutagênese e câncer (ASHA *et al.*, 2010).

No tratamento do câncer ocorre a formação de substâncias como peróxidos lipídicos e radicais livres. Esse processo não é desejável, mas é necessário para que ocorra o controle e a erradicação do tumor, pois podem suprimir a expressão do gene supressor de tumor Bcl-2, ativar as caspases e encurtar telômeros e, assim, induzir a apoptose de células tumorais (SANTOS e CRUZ, 2001). A radiação ionizante, antraciclinas, bleomicina e citocinas são importantes agentes anti-câncer que produzem radicais livres (MILNER, 2002).

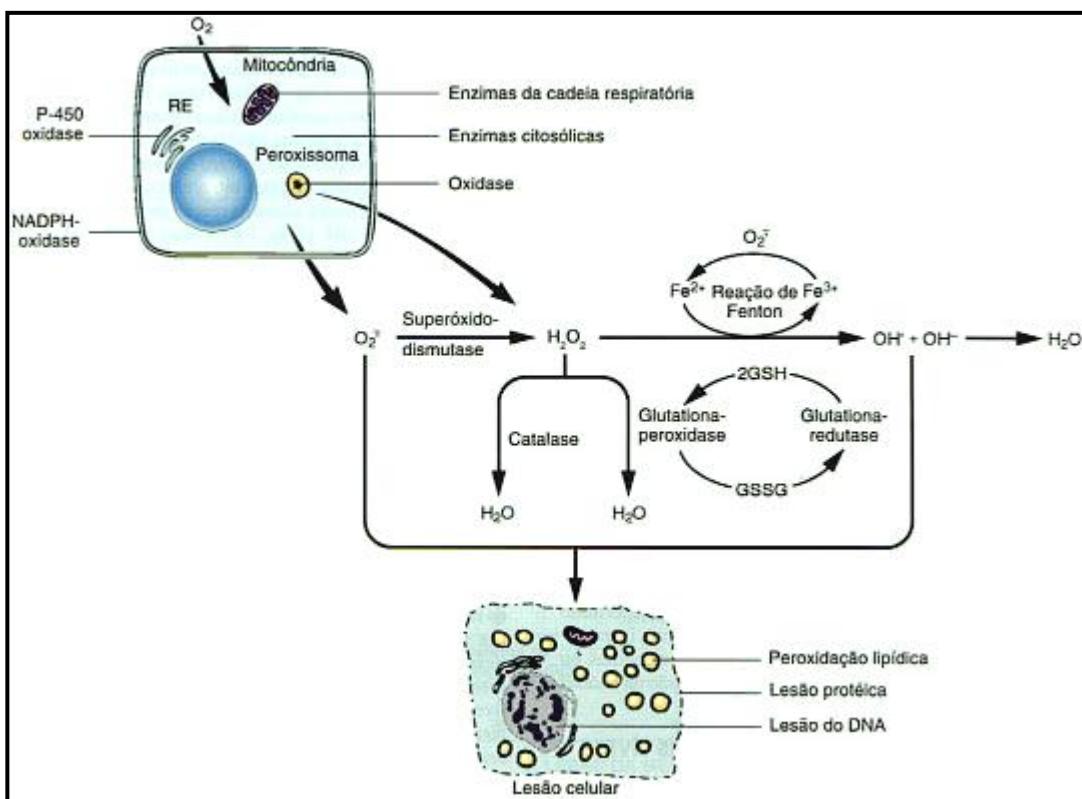


Figura 2: Formação de radicais livres (espécies reativas do oxigênio) e mecanismos biológicos.

Fonte:<http://sistemanervoso.com/pagina.php?secao=11&materia_id=216&materiaver=1&imprimir=1>

4. AGENTES QUÍMICOS

4.1. Ácidos graxos poliinsaturados: Ômega-3 (ω -3)

Até o início do século XX os ácidos graxos eram vistos como fonte eficiente de armazenar energia sintetizada a partir das proteínas e dos carboidratos. Desde então vários estudos apontaram a dieta pobre em ácidos graxos associados a síndromes que podem levar a morte (CARMO e CORREIA, 2009).

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA – *Polyunsaturated Fatty Acids*) são lipídeos indispensáveis para a saúde do organismo. Por isso, também são conhecidos como “óleos essenciais” (MARQUES, 2008). Essencial porque

não pode ser sintetizado pelo organismo, tanto no homem como nos outros animais e, por esta razão, tem que ser ingerido na dieta. Um exemplo de óleos essenciais são os ácidos graxos poliinsaturados da família Ômega (GARÓFOLO e PETRILLI, 2006).

A nomenclatura ÔMEGA é definida segundo a numeração do carbono associado à primeira dupla ligação (3° , 6° e 9°) a partir do radical metila (Figuras 3. e 4). Esta classificação implica em características estruturais e funcionais destes ácidos graxos (NESTLÉ, 2004).

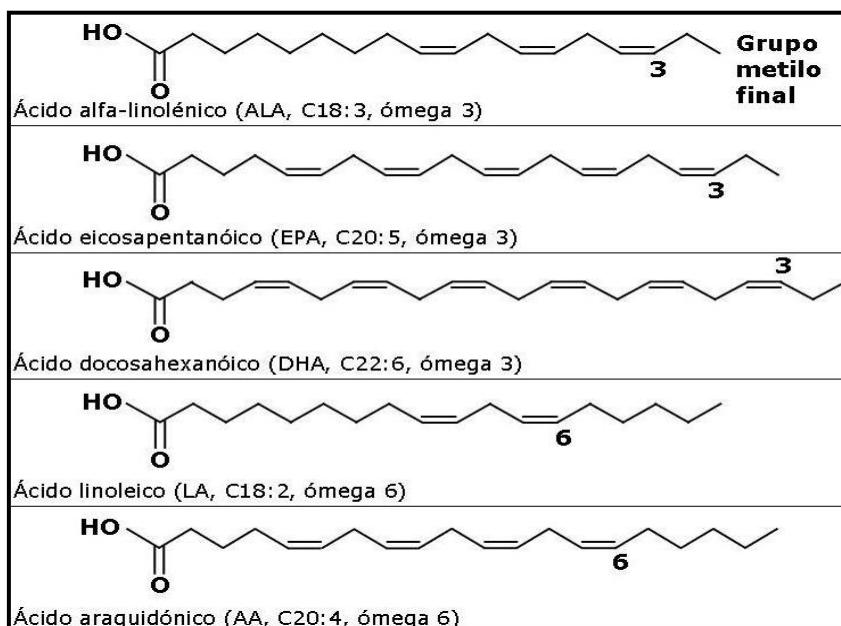


Figura 3: Ácidos graxos ômega-3 e ômega-6. Fonte: FOOD TODAY, 2008.

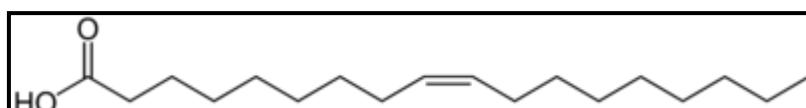


Figura 4: Estrutura química do ácido oléico, o principal ácido graxo da série ômega 9. Fonte: FOOD TODAY, 2008.

Os ácidos graxos do tipo ômega-9 são ácidos oléicos classificados como monoinsaturados (BEVILACQUA *et al*, 2007) obtidos a partir da canola, oliva, abacate e frutos oleaginosos (castanhas, nozes e amêndoas) (ALMEIDA, 2007) e ainda de gordura animal (FAGUNDES, 2002). Não são considerados essenciais porque tantos os humanos como outros mamíferos são capazes de sintetizar o ômega-9 a partir da gordura insaturada contida no próprio corpo

(CAMPOS, 2009). É amplamente conhecido por sua ação antitrombótica, por inibir a agregação plaquetária e reduzir os níveis de colesterol total e da fração LDL, sem alterar a fração da HDL (BEVILACQUA *et al.*, 2007). A função de maior importância do ômega-9 é a habilidade em substituir os ácidos graxos ômega-3 e 6, quando estiverem ausentes no organismo. Contudo, o ômega-9 não é um substituto ideal, pois a ausência destes ácidos essenciais pode causar danos ao organismo (CAMPOS, 2009).

Os óleos essenciais (*EFA – Essential Fats Acids*) são divididos em dois grupos: os do tipo Ômega-3 (ω -3) e os do tipo Ômega-6 (ω -6).

O ω -6 é representado pelo ácido linoléico (LA) que é metabolizado em ácido araquidônico (AA); o ω -3 é representado pelo ácido alfa-linolênico (ALA), de cadeia curta, que é metabolizado em ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) ambos de cadeia longa (CARMO e CORREIA, 2009).

Os processos metabólicos usados na formação dos ácidos graxos ω -3 e ω -6 são mediados pelas enzimas chamadas elongases e dessaturases (Figura 5), resultando em uma competição metabólica entre os dois grupos (TONIAL, 2007). A dessaturação é caracterizada pela introdução de uma dupla ligação na cadeia de carbono e a elongação, pela introdução de dois novos átomos de carbono (AIKAWA, 2004). A enzima $\Delta 6$ dessaturase tem uma maior preferência pelo ALA (FAGUNDES, 2002), porém, uma maior disponibilidade de LA reverte esta preferência para si. Portanto, é necessário um equilíbrio entre o aporte dos dois ácidos graxos através da dieta (TONIAL, 2007), pois a falta de ácido ômega-3 e o desequilíbrio entre ômega-3 e ômega-6 estão associados a uma longa lista de doenças (FAGUNDES, 2002).

Em um experimento com animais de laboratório criados com dietas ricas em ômega-6, invariavelmente apresentaram algum tipo de enfermidade. E ao serem implantado células cancerosas, os tumores cresciam rapidamente, tornando-se invasores; esse experimento reforça a questão de que o desequilíbrio entre os ácidos graxos essenciais causam comportamento destrutivo comprometendo o organismo (FAGUNDES, 2002).

O LA está presente nas margarinas e na maior parte dos óleos vegetais como soja, milho e girassol (FAGUNDES, 2001; SPOSITO *et al.*, 2007). O ALA é encontrado principalmente em alimentos vegetais, incluindo óleos como

o de linhaça, canola (MARQUES, 2008), soja e nozes (CITADIN *et al.*, 2008). O EPA e o DHA são sintetizados por minúsculos organismos vegetais marinhos, os fitoplânctons, mas são encontrados em peixes marinhos de águas frias e profundas, salmão, sardinha, cavala, arenque, bacalhau, anchova, que se alimentam de fitoplânctons, e também em certos frutos do mar, a exemplo de lagostas e camarões (MARQUES, 2008; FETT *et al.*, 2001).

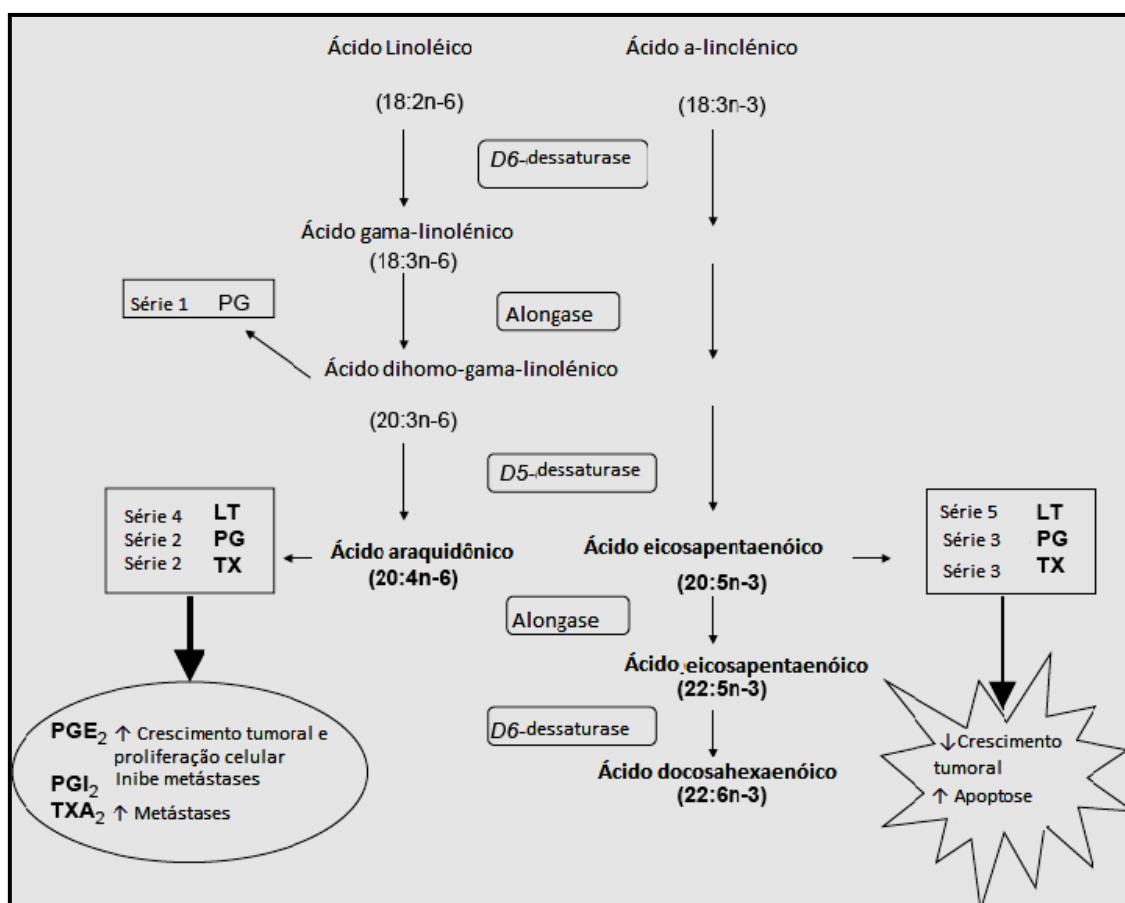


Figura 5: Metabolismo dos AGPI n-3 e n-6 e seus supostos efeitos em tumores. Os AGPI podem atuar como precursores de diferentes eicosanóides, incluindo leucotrienos (LT), prostaglandinas (PG) e tromboxanas (TX). *Fonte:* BORGHETTI, 2010.

Os ácidos do tipo ω-3 são componentes essenciais de membranas celulares, incluindo membranas mitocondriais e as membranas nucleares. estão envolvidos em diversos processos metabólicos, principalmente mecanismos de defesa anti-inflamatórios, de crescimento e de multiplicação celular. Na composição celular podeMW atuar determinando a fluidez da membrana, a formação de receptores, capacidade de ligação das proteínas com receptores e

ativação de vias metabólicas. Eles são os precursores de toda uma série de RNA mensageiros, regulando assim a formação de citocinas, que modulam o comportamento da maioria das proteínas da membrana vinculada incluindo receptores, canais iônicos e ATPase (MANNA, 2007; NESTLÉ, 2004).

Os benefícios da alta ingestão de ω-3 são atribuídos à sua capacidade de modular as funções metabólicas e celulares. Essas ações incluem as alterações de processos inflamatórios nos quais participam os eicosanóides, alterações da estrutura das membranas celulares e funções induzida pela incorporação ω-3 em fosfolipídios da membrana, a modulação de sinalizações em diferentes vias envolvidas nas funções celulares normais e patológicas, bem como seu efeito direto sobre a expressão gênica (GRAZI, 2006).

A família ω-6 produz eicosanóides inflamatórios e cancerígenos, aumentando o risco de situações como: câncer, morte súbita, doenças cardíacas, vasoconstrição, aumento da pressão arterial, elevação da taxa de triglicerídeos, artrite e depressão entre outras doenças inflamatórias. Enquanto que o ω-3 produz eicosanóides anti-inflamatórios, antitrombóticos, antiarrítmicos e que reduzem os lipídeos do sangue, tendo propriedades vasodilatadoras. Esses efeitos benéficos do ω-3 foram demonstrados na prevenção de doenças cardíacas, da hipertensão, do diabete tipo 2, da artrite reumatóide, do câncer, dentre outras (AIRES, 2005).

Os eicosanóides são mediadores inflamatórios de origem lipídica que modulam a resposta inflamatória do organismo, participando também na agregação plaquetária, no crescimento e na diferenciação celular. Eles são sintetizados a partir dos ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 (CARMO e CORREIA, 2009; RIBEIRO, 2011).

A produção de eicosanóides começa com a liberação dos ácidos graxos poliinsaturados ω-3 e ω-6 da membrana fosfolipídica pela ação de várias fosfolipases. Liberados da membrana, esses ácidos graxos servem como substratos para cicloxigenases (COX), lipoxigenases (LOX) e citocromo P450 monoxigenase (CARMO e CORREIA, 2009). O ω-3 e o ω-6 competem entre si pelas mesmas vias enzimáticas, a cicloxigenases e lipooxigenases. Nessa competição serão sintetizados os leucotrienos e as prostaglandinas, da série par e ímpar (RIBEIRO, 2011).

A cicloxigenase e lipooxigenase produzem respectivamente prostanoídes (tromboxanos, prostaglandinas) e leucotrienos e lipoxinas, que serão chamados de séries pares e ímpares de acordo como ácido graxo metabolizado ω-3 ou ω-6 (Figura 5). Os eicosanóides oriundos do metabolismo ω-6, particularmente o araquidônico, são da série par, e são as prostaglandinas 2, leucotrienos 4, e tromboxanos A2, que promovem a imunossupressão e inflamação. O EPA e o DHA competem com o AA pelas vias enzimáticas da cicloxigenase e lipoxigenase para formar os eicosanóides da série ímpar, como as prostaglandinas da série 3, leucotrienos da série 5, e tromboxanos A3, que têm menor efeito inflamatório e não inibe o sistema imune (NESTLÉ, 2004; PADILHA e PINHEIRO, 2004; WAITZBERG, (s. d.)).

As cicloxigenases possuem duas isoenzimas a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é produzida constitutivamente na maioria dos tecidos. A COX-2 é induzida em resposta à inflamação e não é detectada nos tecidos normais, não inflamados. Entretanto, a COX-2 está aumentada em grande variedade de cânceres humanos, incluindo de epiderme, hepatocelular, cervical, pancreático, carcinoma epidermóide de esôfago, carcinoma transicional de bexiga, cólon e mama (FELIPPE, 2009).

4.1.2. O papel do Ômega-3 na luta contra o câncer

As pesquisas relacionando a gordura com o câncer mostram que populações com alto consumo de gordura apresentam maiores incidências de tumores, principalmente de mama. Entretanto, na Groelândia, população que também consome grande quantidade de gordura, apresentou baixa incidência de câncer. Foi visto que nesta população, a origem da gordura dietética consumida era diferente e composta basicamente de peixes e mamíferos marinhos, fontes de PUFA ω-3 (LISBOA, 2006).

A relação entre o consumo de gorduras na dieta e o câncer também foi demonstrada nas populações de esquimós, que consomem dietas ricas em PUFA ω-3 e apresentam baixa incidência de câncer além de outras doenças, como as inflamatórias. Similarmente, outras populações que também consomem elevada

quantia de ácidos graxos poliinsaturados, como os japoneses, apresentam baixa incidência de câncer de mama nas mulheres (AIKAWA, 2004).

Outra pesquisa realizada por um grupo de pesquisadores, do Centro de Karolinska em Estocolmo, examinou os hábitos alimentares de quase 1.500 homens com câncer de próstata e mais de 1.100 homens sem a doença; verificaram que os homens que ingeriam pelo menos um salmão por semana reduziram o risco de desenvolver câncer de próstata para 43%, quando comparado aos homens que não consumiam esses peixes (FRASER, 2006).

Os benefícios nutricionais e medicinais do ω-3 são discutidos em muitos artigos e conferências. Dentre os efeitos fisiológicos em humanos estão redução de fatores de riscos associados a doenças cardiovasculares, psoríase, depressão, Alzheimer, diabetes, artrite e câncer. Vários estudos epidemiológicos evidenciaram que grupos de pessoas que consomem dietas ricas em ácidos graxos ω-3 podem ter um menor prevalência de alguns tipos de câncer (MACLEAN *et al.*, 2010), como o câncer de cólon, próstata, mama (SANT'ANA, 2004) e ovário (SERVAN-SCHREIBER, 2008) e ainda reduzir o índice de metástase (HARDMAN, 2005).

Os efeitos de proteção à saúde humana, produzidos pelo consumo de peixe ou do óleo de peixe, são atribuídos à presença de ácidos graxos ω-3, principalmente EPA e DHA (SUÁREZ-MAHECHA *et al.*, 2002). Embora se saiba que o ALA, obtido em vegetais, é convertido em EPA e DHA dentro do nosso organismo; essa conversão ocorre em baixas proporções. Daí a exigência de consumo de alimentos ricos em EPA e DHA (MARQUES, 2008).

A ingestão de EPA e DHA é importante, pois ambos podem inibir a carcinogênese, retardar o crescimento de tumores e aumentar a eficácia da radioterapia e de várias drogas quimioterápicas (CARMO, CORREIA, 2009). Estes ácidos graxos têm a capacidade de se incorporar no interior da membrana celular, influenciando na permeabilidade da mesma, dessa forma podem agir nas funções de receptor, na atividade enzimática de citoquinas e na produção de eicosanóides (SUÁREZ-MAHECHA *et al.*, 2002). Podem ainda diminuir a atividade dos oncogenes RAS e AP-1 que frequentemente estão ativos nos tumores malignos humanos (FELIPPE, 2009).

O PUFA ω-3 tem sido associado à diminuição do volume tumoral, melhora do peso corporal e diminuição da caquexia, devido sua ação antiinflamatória. A caquexia é responsável por cerca de 20% das mortes de pacientes com câncer, e é caracterizada pela perda progressiva de peso, principalmente devido à perda de gordura na musculatura esquelético, e anorexia. O EPA inibe a ação do PIF (Fator Indutor de Proteólise), que tem ação aumentada no catabolismo protéico da caquexia. Eicosanóides derivados do EPA e DHA têm mostrado também uma ação inibitória direta sobre a lipólise induzida pelo tumor. O mecanismo de reversão da caquexia pelo EPA envolve a supressão das citocinas inflamatórias TNF α (fator de necrose tumoral alfa), IL-1(interleucina-1) e IL-6 (interleucina-6) (GARÓFOLO e PETRILLI, 2006; OTTO *et al.*, 2008; SILVA, 2006).

O ω-3 é capaz de suprimir a produção de citocinas próinflamatórias, aumentar a ação da insulina, aumentar a síntese de óxido nítrico e a concentração de acetilcolina no cérebro e proteger os neurônios das ações tóxicas do TNF α . A interação das substâncias citadas com o ω-3 sugere que o EPA e o DHA sejam substratos promissores no manejo da síndrome da caquexia induzida por citocina. (SILVA, 2006; LISBOA, 2006).

Os PUFA ω-3 possuem vários mecanismos de ação contra células neoplásicas, dentre eles podemos citar: 1) supressão do ácido araquidônico e da biossíntese dos eicosanóides derivados, o que resulta em resposta imune alterada de células cancerosas e modulação da inflamação, proliferação celular, apoptose, metástase e angiogênese; 2) aumento ou diminuição na produção de radicais livres; 3) inibição da expressão gênica e das vias de transdução de sinais, levando a mudanças no metabolismo celular, crescimento e diferenciação das células; 4) envolvimento em mecanismos diretamente relacionados à sensibilidade à insulina e 5) alteração no metabolismo do estrogênio, o que gera menor estímulo ao crescimento das células hormônio dependente (CARMO e CORREIA, 2009; LARSSON *et al.*, 2004).

Há relatos que o ω-3 inibe parcialmente as superóxidos dismutases e provoca aumento da geração do radical superóxido (O_2^*) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células tumorais provocando a sua morte. Os radicais livres e os peróxidos lipídicos suprimem a expressão do Bcl-2, ativam as caspases e

encurtam os telômeros e assim induzem a apoptose das células malignas (FELIPPE, 2005).

Existem evidências de que o ômega-3 inibe o fator de transcrição nuclear NF-kappaB e assim suprime a expressão da COX-2 (HARDMAN, 2002). O NF-kappaB é um fator de transcrição que induz a expressão de citocinas inflamatórias, IL-1(interleucina-1), IL-6 (interleucina-6), COX-2, TNF-alfa (fator de necrose tumoral alfa) e fatores de crescimento como a IL-2 (interleucina-2) e o fator estimulante de colônias de granulócitos. O NF-kappaB é um fator de sobrevivência da célula maligna e a sua inibição provoca diminuição da proliferação celular, aumento da apoptose e diminuição da angiogênese (SCHWARTZ, 1999).

Com relação ao estrógeno, esse hormônio tem um papel promotor na carcinogênese da mama, entretanto, é importante recordar que também existem receptores de estrógeno na próstata e no cólon os quais podem promover a proliferação maligna destes órgãos. A prostaglandina E2 (PGE2), ativa a aromatase P450, o que aumenta a produção de estrógenos. A prostaglandina E3 (PGE3), não ativa a aromatase P450. Desta forma, a diminuição da PGE2 e o aumento da PGE3, diminuem a produção de estrógenos e consequentemente diminui a proliferação celular (FOLEY, 2000).

4.2. Doxorrubicina (DXR)

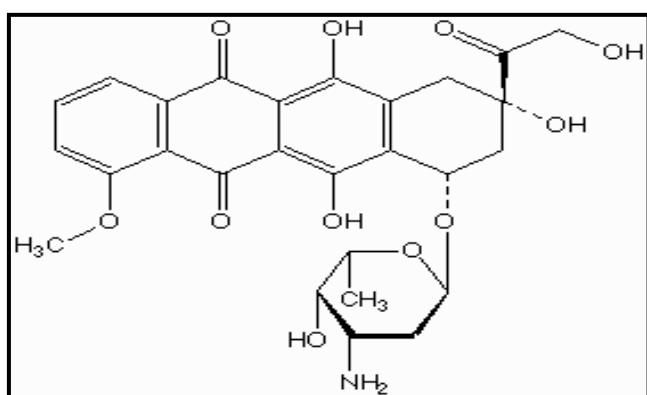


Figura 6: Fórmula estrutural da doxorrubicina. *Fonte:* KATZUNG, 2001.

A doxorrubicina (DXR) foi descoberta no decorrer dos anos 60 e destaca-se pelo seu amplo espectro antitumoral (KOTAMRAJU *et al.*, 2000). É um

antibiótico citotóxico antraciclínico isolado de culturas de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, possui fórmula molecular C₂₄H₂₉NO₁₁ (Figura 6), sendo usada na forma de cloridrato (FREITAS, 2006).

O quimioterápico DXR apresenta atividade terapêutica em inúmeras neoplasias humanas, como câncer de mama, carcinoma do ovário, carcinoma de cabeça e pescoço, leucemia, carcinoma de pulmão e tumores do testículo (CHIUCHETTA e CASTRO-PRADO, 2002; MINOTTI *et al.*, 2004). No entanto, o valor terapêutico da DXR e de outras antraciclinas é diminuído por seus efeitos colaterais ocasionados pelo efeito cumulativo que as doses exercem no organismo do paciente. Os efeitos colaterais mais frequentes são: cardiotoxicidade, toxicidade da medula óssea, pancitopenia subsequentes e anormalidade renal (KWOK e RICHARDSON, 2002; KWOK e RICHARDSON, 2003; MARCZAK *et al.*, 2006; MINOTTI *et al.*, 2004).

Por ser pouco absorvida via oral é administrada intravenosa, liga-se extensivamente às proteínas, não atravessa a barreira hematoencefálica, sofre biotransformação rápida no fígado e é excretada principalmente na bile, 50% na forma íntegra e 23% como doxorrubucinol. Menos de 10% são eliminados pela urina, dos quais metade como metabólitos (FREITAS, 2006; RAMJI, 2003). Náuseas, vômitos, irritações na pele e tecidos, mielosupressão, alopecia, mucosites, toxicidade cardíaca, infertilidade e carcinogenicidade podem surgir como efeitos adversos (FREITAS, 2006).

A DXR possui vários mecanismos de ação em células cancerosas, mas estes ainda não foram totalmente esclarecidos. Os mecanismos considerados são os seguintes: 1) intercalação no DNA, levando à inibição da síntese de macromoléculas; 2) geração de radicais livres, levando a danos ao DNA e peroxidação lipídica; 3) alquilação vinculativa ao DNA; 4) formação de ligações cruzadas à molécula de DNA; 5) interferência com o desenrolamento ou separação das fitas de DNA e atividade das helicases; 6) efeitos diretos na membrana; 7) indução de danos ao DNA através da inibição da enzima topoisomerase II, e 8) indução de apoptose em resposta à inibição da enzima topoisomerase II (MINOTTI *et al.*, 2004).

Sabe-se que a doxorrubicina induz a apoptose (ou morte celular programada) em células tumorais através do bloqueio do ciclo celular

(KOTAMRAJU *et al.*, 2000). Sabe-se também, que este quimioterápico é um agente não-específico do ciclo celular, ou seja, atua tanto nas células em divisão quanto nas células na fase de repouso; no entanto, sua principal ação citotóxica é observada durante a fase S do ciclo celular (NEUWALD, 2009).

A DXR é capaz de formar um complexo ternário com DNA e com a topoisomerase II, induzindo a formação de quebras duplas no DNA, podendo levar a uma parada no ciclo celular (o que permite à célula recrutar as enzimas de reparo) ou a morte por apoptose (AGNOLETTI, 2006). As quebras do DNA são causadas pela união da droga ao DNA e à enzima topoisomerase II, a qual tem um papel importante na liberação das cadeias de DNA e na condensação dos cromossomos. Assim, a doxorrubicina tem ação mutagênica e carcinogênica (CHABNER *et al.*, 2006).

Em *Drosophila melanogaster*, os danos no DNA induzidos por DXR são reparados preferencialmente pelo processo de recombinação homóloga (AGNOLETTI, 2006). A perda da heterozigose induzida pelos eventos mutagênicos levam a manifestação dos fenótipos dos genes marcadores recessivos (LEHMANN, 2003)..

A estrutura molecular da DXR apresenta um anel de quinona e de hidroquinona em anéis adjacentes, que lhes permitem funcionar como acceptor e doador de elétrons. A importância principal é dada ao anel de quinona, porque é um potente gerador de radicais livres. A redução por um elétron deste anel leva a formação de radicais relativamente estáveis, chamados de radicais livres de semiquinonas, ativados pela enzima mitocondrial (SIMEONI, 2006).

Embora haja pouco conhecimento de que as espécies reativas de oxigênio não sejam a principal via de ação antitumoral da doxorrubicina, a formação destas substâncias também afeta a estabilidade do DNA (AISSA, 2010, MINOTTI *et al.*, 2004). Os radicais livres produzidos pela doxorrubicina provêm de um sistema não enzimático que envolve reações com o ferro. O Fe^{3+} reage com a doxorrubicina em uma ação redox, que recebe um elétron e produz um radical complexo Fe^{2+} -doxorrubicina. Este complexo ferro-doxorrubicina pode reduzir oxigênio a peróxido de hidrogênio e formar outras espécies reativas de oxigênio. Quando estes radicais são formados podem se ligar ao DNA e provocar quebras das fitas (AISSA, 2010).

A DXR pode ainda reagir com a enzima citocromo P450 redutase e formar intermediários de radicais semiquinonas, os quais reagem com oxigênio para produzir radicais de ânion superóxido que podem gerar peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila que atacam o DNA e oxidam suas bases (CHABNER, 2006).

5. SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) - Teste para detecção de mutação e recombinação somática

A *Drosophila melanogaster*, popularmente conhecida como mosca da fruta (Figura 7), foi um dos primeiros animais a ser intensivamente estudado geneticamente. No laboratório do Dr. T.H. Morgan (USA), logo após a redescoberta dos trabalhos de Mendel, a *D. melanogaster* foi reconhecida como um animal experimental ideal para estudos genéticos, devido ao seu pequeno tamanho, fácil manutenção em laboratório, pequeno tempo de geração, grande progênie, baixo número de cromossomos e por possuir cromossomos salivares gigantes (GRAF; VAN SCHAIK, 1992).

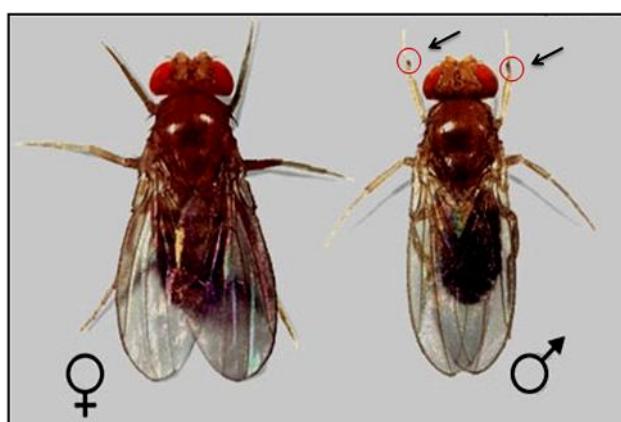


Figura 7. Casal de *Drosophila melanogaster*. O macho (direita) é a mosca menor e apresenta o pente sexual indicado pelas setas e a fêmea (esquerda) a maior. Fonte: <<http://www.sc.didaxis.pt/hereditariedade/drosophila.htm>>

Devido à alta sensibilidade e por possuir genes semelhantes aos de humanos, o teste SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) em *D. melanogaster* é uma ferramenta valiosa para a detecção de mutações genéticas.

melanogaster é um excelente modelo para estudo de mutagenicidade, podendo fornecer respostas relevantes para o homem, com um alto índice de acerto.

O teste SMART foi desenvolvido por Graf *et al.* (1984) e permite detectar a perda de heterozigosidade de marcadores genéticos identificados nos fenótipos expressos nas asas da moscas. Os ensaios somáticos podem ser realizados em uma só geração (aproximadamente 10 dias) em contraste com outros testes clássicos que necessitam de meses para conclusão. O teste é adequado para avaliar antimutagenicidade e mutagenicidade devido a uma grande variedade e flexibilidade nos protocolos para a aplicação dos compostos no teste (GRAF *et al.*, 1998).

Os compostos a serem analisados pelo SMART podem ser substâncias puras ou misturas complexas, como partículas aéreas, extrato de plantas, bebidas como o café, chás e vinhos dentre várias outras substâncias (GRAF *et al.*, 1984).

O teste SMART de asa de *D. melanogaster*, fundamenta-se na premissa de que, durante o desenvolvimento embrionário, grupos de células (os discos imaginais das asas) proliferam-se mitoticamente até o ponto em que se diferenciam, durante a metamorfose, em estruturas que originam as asas das moscas adultas (GRAF *et al.*, 1984).

5.1. Linhagens e marcadores

As linhagens utilizadas no teste SMART são: [1] *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*); [2] *flare³, Third Multiple3* (*flr³/In(3LR)TM3, ri p⁰ sep I(3)89Aa bx^{34e} and Bd⁶*); [3] Oregon R, *flare³* (*ORR/ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p⁰ sep I(3)89Aa bx^{34e} and Bd⁶*). Estas linhagens foram gentilmente cedidas pelo Dr. Ulrich Graf (Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Switzerland).

O bioensaio (*D. melanogaster*) faz uso de dois genes marcadores para a forma dos pêlos das asas: pêlos múltiplos (*mwh*, 3-03) cujo marcador é um gene recessivo, mantido em homozigose na linhagem *mwh* (Figura 8). Este gene está localizado próximo à extremidade do braço esquerdo do cromossomo 3 e na condição homozigota, expressa-se como pêlos múltiplos, ou seja, 3 ou mais pêlos

dentro de uma única célula das asas dos adultos – ao contrário do gene selvagem que origina um único pêlo (GRAF *et al.*, 1984).

Outro gene marcador *f1r³* também é um gene recessivo que afeta a forma dos pêlos, cujo formato lembra uma “chama de vela” do inglês *flare* (*f1r³*, 3-38.8) (Figura 9); e está também localizado no braço esquerdo do cromossomo 3, porém em uma região mais proximal (3-38.8). Todos os alelos *f1r³* conhecidos são letais zigóticos recessivos (RIBEIRO, 2003).

No entanto, células do disco imaginal das asas, que são homozigotas para este gene, expressam o fenótipo *f1r³*, sendo visíveis. Em função desta característica, os alelos *f1r³* são mantidos na linhagem marcadora em estado de heterozigose na presença de um cromossomo平衡ador TM3, que carrega múltiplas inversões (*TM3/Bd^S*) (GRAF *et al.*, 1984).

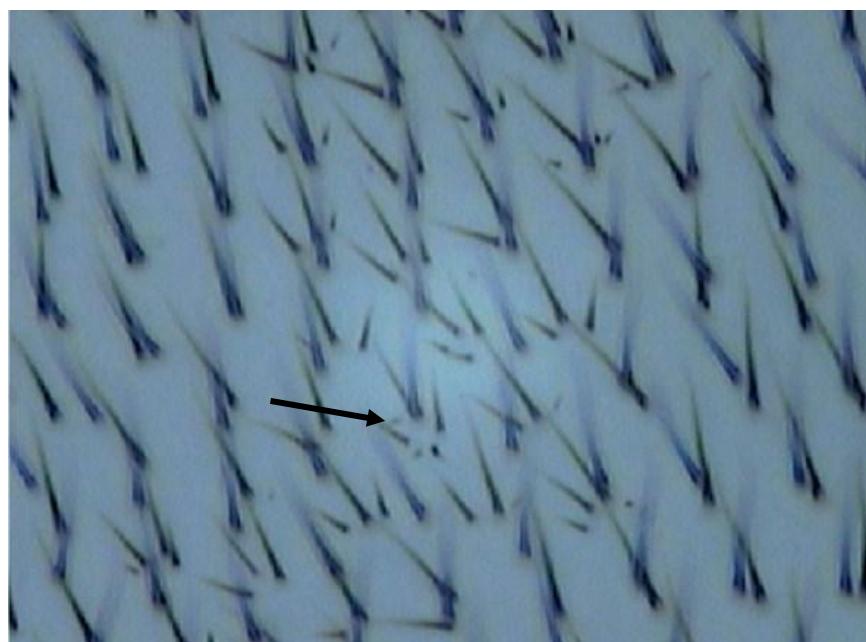


Figura 8: Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, dos pêlos da asa de *Drosophila melanogaster*, obtida no Laboratório de Citogenética e Mutagênese - Centro Universitário de Patos de Minas/UNIPAM, Patos de Minas – MG. Apresentação de pêlos múltiplos (seta).

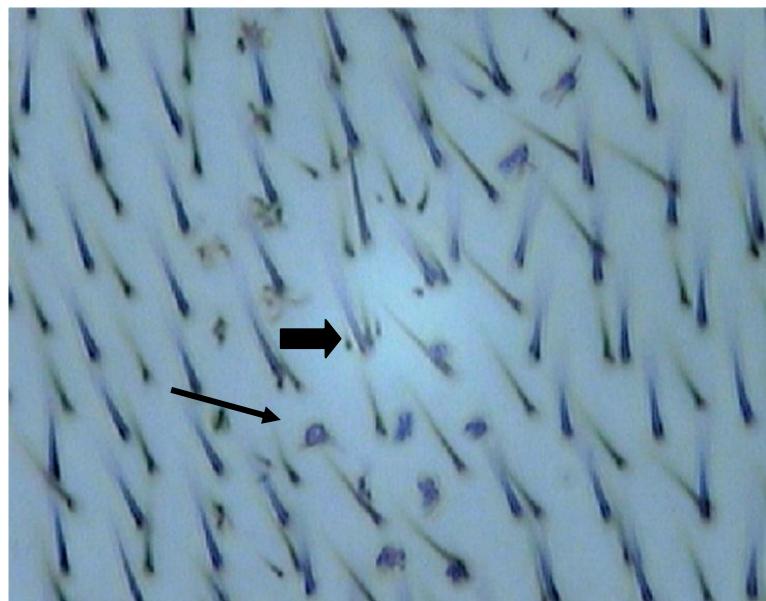


Figura 9: Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, dos pêlos da asa de *Drosophila melanogaster*, obtida no Laboratório de Citogenética e Mutagênese - Centro Universitário de Patos de Minas/UNIPAM, Patos de Minas – MG. Apresentação de pêlos múltiplos (seta larga) e apresentação de pêlos *flare* (seta fina).

5.2. Cruzamentos

Para o desenvolvimento do teste de detecção de mutação e recombinação somática em asas de *D. melanogaster* são realizados os seguintes cruzamentos:

1 - Cruzamento padrão (*ST- Standard Cross*) (GRAF *et al.*, 1989)

Fêmeas virgens *flr³/In(3LR)TM, ri p^b sepI(3)89Aa bx^{34e}* e *Bd^s* cruzadas com machos *mwh/mwh* (Figura 11).

2 - Cruzamento de alta biotivação (*HB - High Bioactivation Cross*) (GRAF; VAN SCHAIK, 1992).

Fêmeas virgens *ORR; flr³/In(3LR)TM, ri p^b sepI(3)89Aa bx^{34e}* e *Bd^s* cruzadas com machos *mwh/mwh* (Figura 12).

Desses cruzamentos são obtidos dois tipos de descendentes: marcador trans-heterozigoto (MH: *mwh +/+ flr³*), e balanceador heterozigoto (BH: *mwh +/TM3, Bd^s*). Os indivíduos MH expressam pêlos mutantes nas asas originados de alterações mutagênicas e recombinogênicas envolvendo os *loci*

gênicos *mwh* e *f1r³*. Já os descendentes BH possuem um cromossomo balanceador TM3/Bd^s que inibe recombinação, ocorrendo apenas eventos mutagênicos devido a inversões múltiplas. O fenótipo do descendente heterozigoto marcado (MH) desenvolve asa normal, com borda lisa, enquanto que no heterozigoto balanceado (BH), as asas são mal formadas, com aparência picotada ou serrilhada, denominadas “serrate” (GUZMÁN-RINCON; GRAF, 1995) (Figura 10).

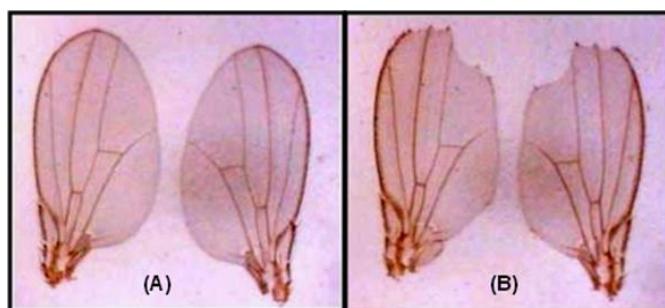


Figura 10: Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, da asa de *Drosophila melanogaster*, obtida no Laboratório de Citogenética e Mutagênese - Centro Universitário de Patos de Minas, Patos de Minas – MG. (A) Borda lisa = formato da asa do descendente MH. (B) Borda serrilhada = formato da asa do descendente BH.

Cruzamento Padrão

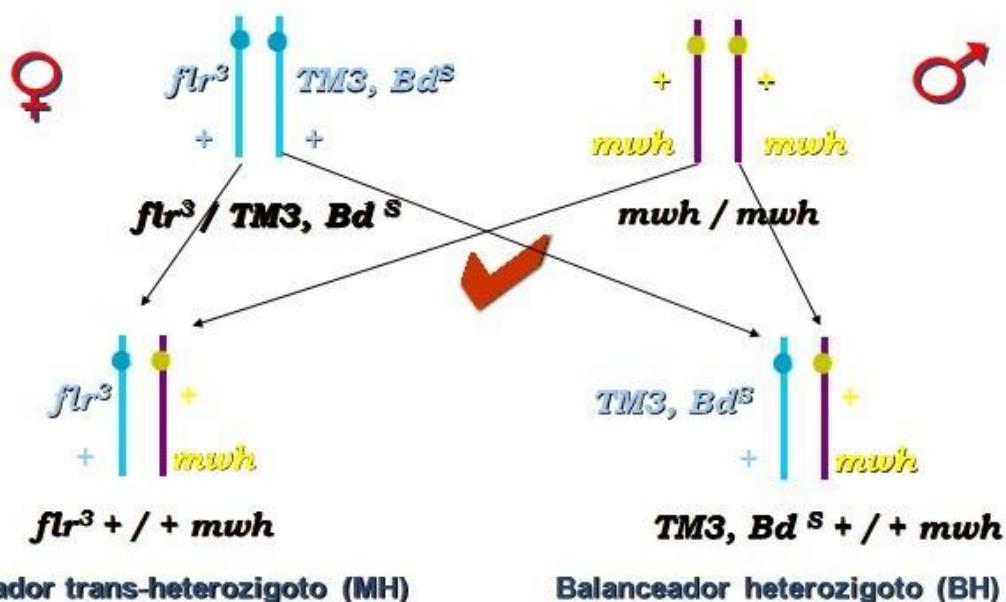


Figura 11: Esquema representativo dos Cruzamentos no teste SMART. Cruzamento Padrão – ST utilizando fêmeas virgens *f1r³/TM3*, cruzadas com machos *mwh/mwh*.

Cruzamento de Alta Bioativação

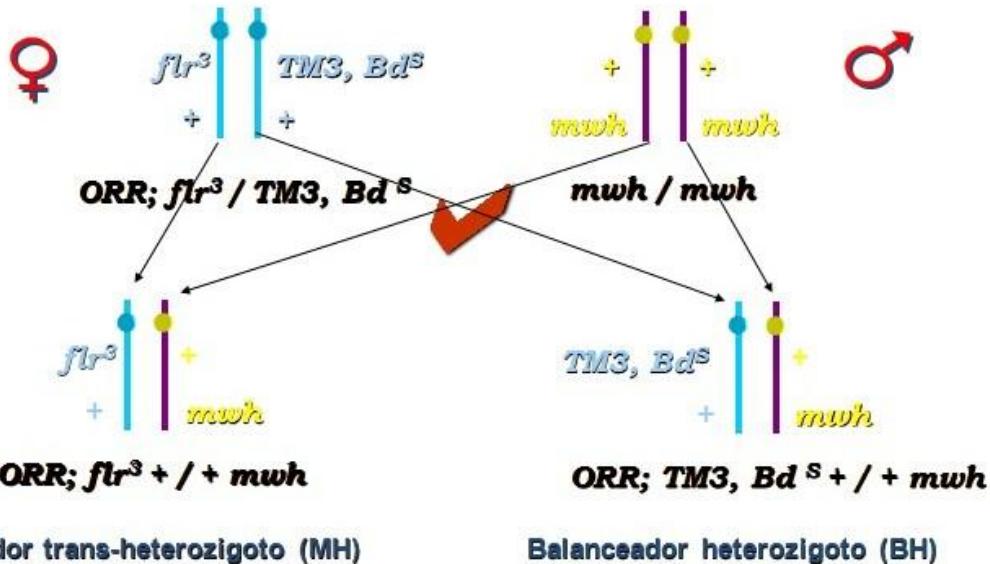


Figura 12: Esquema representativo dos Cruzamentos no teste SMART. Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação (HB) cruzando fêmeas virgens ORR e machos *mwh/mwh*.

6. Warts (Wts) - Teste para detecção de clones de tumor epitelial em *D. melanogaster*

O teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster* é usado para testar a atividade carcinogênica e antitumoral de substâncias puras ou misturas complexas. Assim como no SMART, qualquer substância pode ser testada como chás, vinhos, extrato de plantas, partículas aéreas, etc.

O gene *warts* (*wts*) é um gene supressor de tumor em *Drosophila* localizado no cromossomo 3R100A5 (NCBI, 2010) necessário para o controle da quantidade e direção da proliferação celular, bem como para a morfogênese normal (JUSTICE *et al.*, 1995). A deleção desse gene leva à formação de clones de células grandes e arredondadas gerando uma espécie de "verrugas" nas pernas, asas e no corpo das moscas (NISHIYAMA *et al.*, 1999), como pode ser observado na Figuras 13. A ausência de função do gene *wts* também resulta em hipertrofia apical das células epiteliais do disco imaginal (JUSTICE *et al.*, 1995).

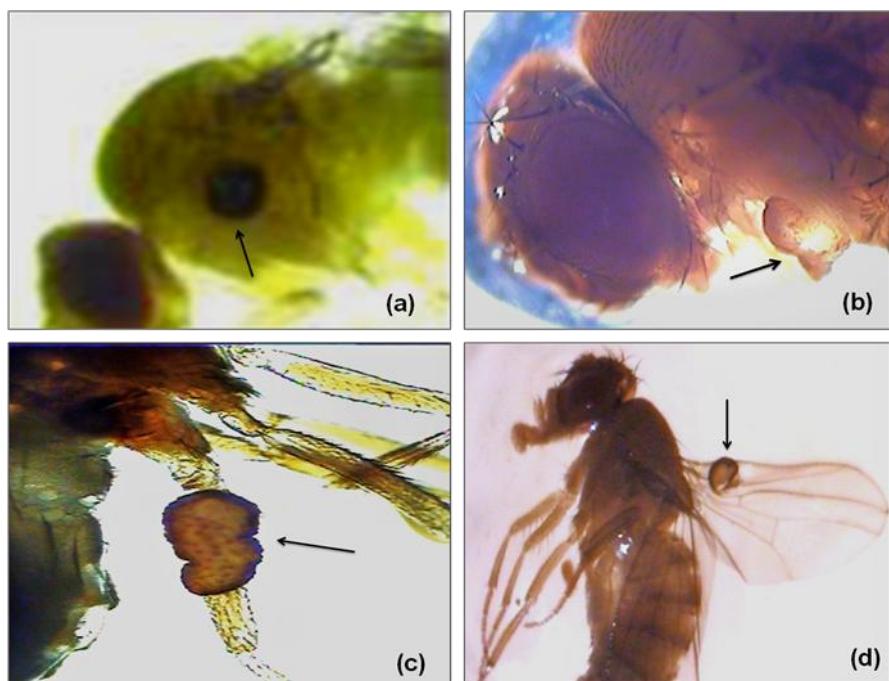


Figura 13: (a) e (b) Tumor no tórax. (c) Tumor na perna. (d) Tumor na asa. *Fonte:* Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas / UNIPAM, Patos de Minas-MG.

A forma arredondada das células de clones *wts* sugere que as divisões celulares são orientadas preferencialmente pela falta de função do gene *wts*, pois os discos imaginais dos clones parecem ser do tipo selvagem e/ou há um defeito na adesão celular que conduz ao regime de células anormais. A presença de junções apicais intactas indica que o defeito celular em clones *wts* não é devido à separação de célula apical seguido por deposição de cutícula entre as células separadas, mas sim, devido às extremidades apicais das células serem em forma de cúpula, em vez de planas, como no epitélio normal. A deposição de cutícula sobre a superfície do domo apical produz morfologia cuticular alterada (BRODY, 2005).

Os discos imaginais de *Drosophila* são tecidos celulares, de camada única, que as larvas desenvolvem durante a metamorfose, nas estruturas epidérmicas adultas. As células dos discos imaginais tem um ciclo celular que é muito semelhante ao das células somáticas de mamíferos (EEKEN *et al.*, 2002).

A indução e desenvolvimento de tumores em células do disco imaginal de *Drosophila* podem contribuir diretamente para a compreensão do câncer em

seres humanos (POTTER *et al.*, 2000), devido a existência de genes supressores de tumor homólogos ao gene *wts* como por exemplo o gene *LATS1* (MORISAKI *et al.*, 2002; XIA *et al.*, 2002) localizado cromossomo 6q24-25 (NISHIYAMA *et al.*, 1999).

O gene *LATS* em mamíferos assim como o gene *wts* em *Drosophila* codificam uma proteína quinase composta por serina/treonina e um componente dinâmico do aparelho mitótico (MORISAKI *et al.*, 2002). Deficiências nesse gene estão relacionadas ao desenvolvimento de sarcomas de partes moles e tumores de células do estroma ovariano (NISHIYAMA *et al.*, 1999; XIA *et al.*, 2002) que são altamente sensíveis à tratamentos quimioterápicos (EEKEN *et al.*, 2002).

Estudos anteriores em células HeLa mostraram que a perda de função de *wts* em *Drosophila* resulta em aumento da regulação da ciclina-A sugerindo que a família do gene *wts* pode controlar o desenvolvimento do tumor regulando negativamente a proliferação celular através do bloqueio da transição da fase G2 para fase M (XIA *et al.*, 2002). Essas observações bioquímicas indicam que *LATS* é um regulador negativo do complexo CDC2/ciclina A (BRODY, 2005).

6.1. Cruzamentos

Para o desenvolvimento do teste para detecção de clones de tumor epitelial em *D. melanogaster* são utilizadas duas linhagens mutantes (*wts* e *mwh*) portadoras dos marcadores genéticos *warts* (*wts*, 3-100) e *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3). Os estoques são mantidos no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas, em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura de *D. melanogaster* com 820 mL de água, 25g de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*); 11g de ágar, 156g de banana e 1g de nipagin, à temperatura de 25º C e 60% de umidade. A linhagem *wts/TM3, sb¹* foi gentilmente cedida pelo Bloomington Drosophila Stock Center, da Universidade de Indiana, USA, com o número de registro: Bloomington/7052.

Para obtenção de larvas heterozigotas *wts* +/+ *mwh*, é realizado o cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3, Sb¹* com machos *mwh/mwh*. Desse cruzamento, todas as larvas são tratadas com a substância a ser testada.

Para análise são utilizadas apenas moscas de pelo longo, pois estas possuem o fenótipo mutante quanto à presença do tumor (*wts^{+/+} mwh*). As moscas que apresentam o balanceador cromossômico (*TM3, Sb¹*), caracterizam-se pela presença de pelos curtos e grossos e são descartadas.

7. REFERÊNCIAS

- ARM, R. A; KUCUK, O.; KHURI, R. F.; DONG, S. M. Prospects for Cancer Prevention with natural compounds. **Jour. of Clin. Onc.** 27 (16): 2712-2725. 2009.
- AGNOLETTI, M. H. Estudo de lesões e reparo de DNA em pacientes com câncer de mama e em fibroblastos humanos. 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). **Universidade Federal do Rio Grande do Sul.** Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Rio Grande do Sul. 2006.
- AIKAWA, J. Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a caquexia, o crescimento tumoral e o sistema imunitário. 93 f. 2004. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). **Universidade Federal do Paraná.** Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Paraná. 2004.
- AIRES, J. L. F. Ácidos graxos ômega-3 e ômega-6: Importância no metabolismo e na nutrição. Seminário apresentado na disciplina de Bioquímica do tecido animal. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul.** 2005. Disponível em: http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/restrito/pdf/ag_omega.pdf. Acesso em: 29/04/2011.
- AISSA, A. F. Avaliação da atividade antimutagênica do beta-caroteno microencapsulado em células de ratos tratados com o antitumoral doxorrubicina empregando os ensaios de micronúcleo e cometa. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) **Universidade de São Paulo.** Pós-graduação em Toxicologia. Ribeirão Preto. 2010.
- ALMEIDA, A. P. F.; MOURA, L.; CHAVES, F. R.; ROMALDINI, J. H. Dislipidemias e *Diabetes mellitus*: fisiopatologia e tratamento. **Rev. Ciênc. Méd.**, Campinas, 16(4-6): 267-277. 2007.
- ASHA, Acharya; LLA, Das; CHANDHOK, Des; TAPAS, Saha. Redox regulation in cancer: A double-edged sword with therapeutic potential. **Oxid Med Cell Longev.** 3 (1): 23–34. 2010.
- BARREIROS, A. L.B.S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativa e defesa do organismos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, 113-123, 2006.
- BATISTA, M. S. H. O papel dos fitoquímicos na quimioprevenção do cancro. 51 f. 2010. Monografia. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação. **Universidade do Porto. Porto.** Portugal. 2010.
- BÉLIVEAU, R. e GINGRAS, D. Role of nutrition in preventing cancer. **Can Fam Physician.** 53 (11): 1905–1911. 2007.

BEVILACQUA, M.e R.; GIMENO, Sueley G. A; MATSUMURA, Luiza K.; FERREIRA, Sandra R. G.. Hiperlipidemias e Fatores Dietéticos: Estudo Transversal Entre Nipo-Brasileiros. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 51/4. 2007.

BIANCHI, M. L. P. e ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. de nutr.** São Paulo. v. 12. n. 2. 1999.

BORGHETTI, G. Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a expressão gênica de COX-2 em ratos portadores de tumor de Walker 256. 60 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). **Universidade Federal do Paraná**. Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Paraná. 2010.

BRODY, T. B. Biological overview: gene warts. **The interactive fly. Society for Developmental Biology's Web server**. 2005. Disponível em: <<http://www.sdbonline.org/fly/newgene/warts1.htm>>. Acesso: 28/11/2010.

CAMPOS, L. de. Ácidos graxos e seus números - os ômegas. **Beefpointe: Cadeia Produtiva**. 2009. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/sic/acidos-graxos-e-seus-numeros-os-omegas-55995n.aspx>>. Acesso: 20/03/2011.

CARDOSO, A. L.; OLIVEIRA, G. G. Alimentos Funcionais. Empresa Júnior de Consultoria em Nutrição. **Jornal Eletrônico**. n. 5. 2008. Disponível em: <www.nutrijr.ufsc.br/jornal/jornal_eletronico_06-08.pdf>. Acesso: 05/04/2011.

CARMO, Maria Carmen Neves Souza; CORREIA, Maria Isabel Toulson Davisson. A Importância dos ácidos graxos ômega-3 no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 53(3): 279-287. 2009.

CHABNER, B. A. CALABRESI, P. Quimioterapia das Doenças Neoplásicas. In: GILMAN, A. G. et al. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro. **McGraw-Hill Interamericana do Brasil**. cap. 51. p. 1185-1264. 2006.

CHIUCHETTA, Simone Jurema Ruggeri; CASTRO-PRADO, Marialba Avezum Alves de. Doxorubicin and etoposide induce somatic recombination in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. **Braz. Jour. of Microb.** 33:255-259. 2002.

CITADIN, C. T.; ALMEIDA, E. R .P.; SILVA-WERNECK, J.; MARTINS, N. F.; DERNER, R. B.; TOGAWA, R.; MONTE, D. C. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 – clonagem e caracterização do primeiro gene da via de síntese microalga marinha *Thalassiosira fluviatilis*.

Brasília. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. n. 224. p. 20. 2008.

COMBA, A.; MAESTRI, D. M.; BERRA, M. A.; GARCIA, C. P.; UNDURTI, N. D.; EYNARD, A. R.; PASQUALINI, M. Effect of ω -3 and ω -9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. **Lipids in Health and Disease.** 9:112. 2010.

DANTAS, É. L. R.; SÁ, F. H. L.; CARVALHO, S. M. F.; ARRUDA, A. P.; RIBEIRO, M. E.; RIBEIRO, E. M. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia.** 55(3), 262-269. 2009.

DIVISI, Duilio; et al. Diet and cancer. Italy. **Acta Biomed.** n. 77.p. 118-123. 2006.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Phys. Rev.** 82:47-95. 2002.

EEKEN, J. C.; KLINK, I.; VEEN, B. L. V.; PASTINK, A. e FERRO, W. I. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene wts. **Environ. Mol. Mutagen.** 40 (4): 277-82. 2002.

ENDRINGER, D. C. Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae): Inibição da enzima conservadora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer. 259 f. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Minas Gerais. Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Minas Gerais. 2007.

FAGUNDES, L. A. A escolha dos alimentos para proteção contra o câncer. Porto Alegre: Fundação de Radioterapia do Rio Grande do Sul, p. 128. 2001.

FAGUNDES, L. A. Ômega-3 & Ômega-6: o equilíbrio dos ácidos gordurosos essenciais na prevenção de doenças. Porto Alegre: Fundação de Radioterapia do Rio Grande do Sul, p. 111 2002.

FELIPPE, J. J. Efeito dos Ácidos Graxos Poliinsaturados no câncer: indução de apoptose, inibição da proliferação celular e anti-angiogênese. **Rev. Eletr. Assoc. Bras. Med. Comp.**, 2005. Disponível em: <http://www.medicinacomplementar.com.br>. Acesso: 20/12/2010.

FELIPPE, J. J. Óleo de peixe ômega-3 e câncer: diminuição da proliferação celular maligna, aumento da apoptose, indução da diferenciação celular e diminuição da neoangiogênese tumoral. **Assoc. Bras. Med. Biom.** 2009. Disponível em: <<http://www.medicinacomplementar.com.br>>. Acesso 20/12/2010.

FERNANDES, I. C. e MELLO, A. A. Entendendo e combatendo o câncer. **Revista Tema: Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento**. Paraíba. v. 7. n. 10/11. p. 2-11. 2008.

FERREIRA, A. L. A. e MARSUBARA L. S. Radicais livres: Conceitos, Doenças Relacionadas, Sistema de Defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**: São Paulo. v. 43.n.1. 1997.

FETT, C. A.; PETRICIO, A.; MAESTÁ, N.; CORREA, C.; CROCCI, A. J.; BURINI, R. C. Suplementação de Ácidos Graxos Ômega-3 ou Triglicerídios de Cadeia Média para Indivíduos em Treinamento de Força. **Mot.**, v. 7, n.2, p. 83-91. 2001.

FOLEY, E. F.; JAZAERI, A. A.; SHUPNIK, M. A.; JAZAERI, O.; HICE, L. W.; Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. **Can. Res.**, 60: 245-248, 2000.

FOOD TODAY. A importância dos ácidos gordos ômega 3 e ômega 6. **The european information council newsletter**. 2008. Disponível em: <<http://www.eufic.org/article/pt/artid/importancia-dos-acido-gordos-omega-3-e-omega-6/>>. Acesso em: 19/10/2010.

FRASER, J. Fatty fish consumption slashes risk of prostate cancer by 43 percent. **News Target**. 2006. Disponível em: <<http://www.newstarget.com/021002.html>>. Acesso: 16/05/2007.

FREITAS, C. S. de. Estudo da atividade genotóxica do tratamento combinado de doxorrbucina e vincristina em camundongos, através do teste de micronúcleo e teste cometa. 2006. 52 f. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético Molecular). **Universidade Luterana do Brasil**. Pós-graduação em Diagnóstico Genético e Molecular. Rio Grande do Sul. 2006.

FUGANTI, P. E.; MACHADO, M. T.; WROCLAWSKIK, E. R. Dieta e câncer de próstata: aspectos atuais relacionados à quimioprevenção. **Rev. Bras. de Med.** São Paulo, v. 60, n. 1/2, p. 246-250. 2003.

GAMA, R. R. Efeitos de quimioprevenção dos ligantes do PPAR-? E dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 no processo de carcinogênese da via aerodigestiva superior induzida pelo uso de 4-nitroquinolina-1-óxido em camundongos. 206 f. 2010. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina da **Universidade de São Paulo**. Pós-graduação em Oncologia. 2010.

GARÓFOLO, A.; AVESANI, C. M.; CAMARGO, K. G.; BARROS, M. E.; SILVA, S. R. J.; TADDEI, J. A. A. C.; SIGULEM, D. M. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Rev. Nutr.**, Campinas, 17 (4): 491-505, 2004.

GARÓFOLO, A. e PETRILLI, A. S. Balanço entre ácidos graxo ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Rev. de Nutr.**, Campinas, v.5, n.5, p.611-621, set./ out. 2006.

GATES, R. A. e FINK, R. M. Segredos em enfermagem Oncológica: Respostas necessárias ao dia-a-dia. São Paulo: **Artmed**. 3 ed. p. 31-41. 2008.

GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Envir. Mutagenesis**, v. 6, p.153-188, 1984.

GRAF, U.; FREI, A.; KAGI, A.; KATZ, A. J.; WÜRGLER, F. E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Res.**, 222:359-373. 1989.

GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bio activations cross for the wing somatic mutations and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Res.** 271: 59-67. 1992.

GRAF, U.; ABRAHAM, S. K.; RINCÓN-GUZMÁN, J.; WURGLER, F. E. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Res.** 402: 203-209. 1998.

GRAF, U; WURGLER, F E; KATZ A.J; FREI H.; JUON, H., HALL, C.B. and KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Eviron. Mutag.** 6:153-188. 1984.

GUZMÁN-RICON, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. New York: Edit by F. M. Butterworth *et al.*, **Phenunum Press**. p. 169-181. 1995.

GAZI, I.LIBEROPOULOS, E. N.; SAOUGOS, V. G.; ELISAF, M. Beneficial Effects of Omega-3 Fatty Acids: The Current Evidence. Hellenic **Jour. of Card.** 47: 223-231. 2006.

HARDMAN, W E.; MUÑOZ, J. J.; CAMERON, I. L. Role of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in omega 3 fatty acids induced suppression of breast cancer xenograft growth in mice. **Canc. Cell Intern.** 2:10. 2002.

HARDMAN, E. W.; LUZHE, D.; SHORT, N.; CAMERON, I. L. Dietary omega-3 fatty acids and ionizing irradiation on human xenograft growth of breast cancer and angiogenesis. **Canc. Cell Intern..** 5: 12. 2005.

HIDRATA, L. L.; SATO, M. E. O.; SANTOS, C. A. M. Radicais Livres e o Envelhecimento cutâneo. **Acta Farm. Bonaerense**. 23 (3): 418-24. 2004.

JUSTICE, R. W.; ZILIAN, O.; WOODS, D. F.; NOLL, M. e BRYANT, P. J. The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes Development.** v. 9, p. 534-546. 1995.

KATZUNG, B. **Farmacologia Básica e Clínica.** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

KOTAMRAJU, S.; KONOREV, E. A.; JOSEPH, J.; KALYANARAMAN, B. Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitrone spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. **J. Biol. Chem.** n. 275. p. 33585-33592. 2000.

KUROIWA-TRZMIELINA, J. Atividade quimiopreventiva da tributirina na hepatocarcinogênese em ratos. 167 f. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas. **Universidade de São Paulo.** São Paulo. 2007.

KWOK, J. C. e RICHARDSON, D. R. Unexpected anthracycline-mediated alternations in iron-regulatory protein-RNA-binding activity: the iron and copper complexes of anthracyclines decrease RNA-binding activity. **Mol Pharmacol.** 62 : 888-900. 2002.

KWOK, J. C. and RICHARDSON, D. R. Anthracyclines induce accumulation of iron in ferritin in myocardial and neoplastic cells: inhibition of the ferritin iron mobilization pathway. **Mol. Pharmacol.** 63: 849-861. 2003.

LARSSON; S. C.; MARIA, K.; SUNDBERG, M. I.; WOLK, A. Dietéticos de cadeia longa n-3 os ácidos gordos para a prevenção do câncer: uma revisão dos mecanismos potenciais. **Amer. Jour. of Clin. Nutr.** v. 79, n. 6, 935-945. 2004.

LEHMANN, M. Toxicidade Genética das Antraciclinas: Associação entre estrutura química e ação inibitória sobre a Topoisomerase II. 2003. 103 f. Tese de Doutorado (Doutorando em Ciências). **Universidade Federal do Rio Grande do Sul.** Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular. Rio Grande do Sul. 2003.

LISBOA, A. Q.. Estudo nutricional e ácidos graxos plasmáticos de pacientes com câncer de colo uterino. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana). Faculdade de Ciências da Saúde da **Universidade Brasília.** Pós-graduação em Nutrição Humana. Brasília. 2006.

LOURO, I. D.; LLERENA, J. C. J.; MELO, M. S. V.; ASHTON-PROLLA, P.; CONFORTI-FROES, N. Genética Molecular do Câncer. São Paulo: **MSG Produção Editorial.** p. 275. 2002

MANNA, S.; TRIDIB, C.; SURESH, D.; KARTICK, S.; BASABI, R.; CHATTERJEE, M. Protective role of fish oil (Maxepa) on the early events of mammary carcinogenesis in rats by modulating protein-DNA crosslinking, cell proliferation and p53 protein expression. **Cancer Cell International**, 7:6. 2007.

MARCZAK, A.; KOWALCZYK, A.; KUS, A. W.; ROBAK, T.; ZOFIA, J. Interaction of doxorubicin and idarubicin with red blood cells from acute myeloid leukaemia patients. **Cell Biology International**, 30, p.127-132. 2006.

MARQUES, R. Efeitos biológicos dos ácidos graxos ômega 3 sobre a saúde humana. 2008. Disponível em:< <http://saibavocetambem.wordpress.com/2008/04/18/efeitos-biologicos-dos-acidos-graxos-omega-3-sobre-a-saude-humana/>>. Acesso: 10/05/2010.

MACLEAN, C. H.; NEWBERRY, S. J.; MOJICA, W. r A.; et al. Effects of Omega-3 fatty acids on cancer risk: Systematic Review. Californian. **JAMA: online article**. v. 295, n. 4. 2006.

MILNER, J.A. Free radicals are potentially dangerous products of cellular metabolism that have direct effects on cell growth and development: News insights into the mechanism of action of antioxidants. Nutrition Science Research Group: **Division of Cancer Prevention**. National Cancer Institute Bethesda, MD 20892. 2002. Disponível em: <http://ods.od.nih.gov/pubs/conferences/ada2002/Milner_abstract.html>. Acesso: 24/02/2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ações de enfermagem para o controle do câncer: Uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: **Instituto Nacional do Câncer** (INCA). 3 ed. p. 58. 2008.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Antracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Rev. Pharmacol.** 56. p. 185-229. 2004.

MORISAKI, T.; HIROTA, T.; IIDA, S.; MARUMOTO, T.; HARA, T.; NISHIYAMA, Y.; KAWASUZI, M.; HIRAKO, T.; MIMORI, T.; ARAKI, N.; IZAWA, I.; INAGAKI, M. e SAYA, H. WARTS tumor suppressor is phosphorylated by Cdc2/cyclin B at spindle poles during mitosis. **Febs Letters**. v. 529. p. 319-324. 2002.

NAOUM, P. C. Biologia do Câncer. **Portal Educação: Biologia**. 2008. Disponível em: <<http://www.portaleducacao.com.br/biologia/artigos/2102/biologia-do-cancer>>. Acesso: 22/12/2010.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. **Gene**: Genes and mapped phenotypes: Warts *Drosophila melanogaster*. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/43651>>. Acesso: 14/04/2011.

NESTLÉ Nutrição. Temas de Nutrição em Pediatria. **Sociedade Brasileira de Pediatria**. Rio de Janeiro. v.1.n.3.p.24. 2004.

NEUWALD, E. B. Avaliação hematológica, bioquímica e eletrocardiográfica de cães com diferentes neoplasias tratadas com doxorrubicina. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal). **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Pós-graduação em Ciências veterinárias. Rio Grande do Sul. 2009.

NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IADA, S.; MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.; HIRAKAWA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H. A human homolog of *Drosophila* warts suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. **Febs Letters**. 459: 159-165. 1999.

OLIVEIRA, V. M. de; ALDRIGHI, J. M.; RINALDI, J. F. Quimioprevenção do câncer de mama. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 52(6): 453-9. 2006.

OLIVEIRA, E. M. S. Efeito modulador do café sobre a carcinogênese hepática induzida e ratos. 65 f. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Farmácia da **Universidade Federal de Minas Gerais**. Pós-graduação em Ciências dos Alimentos. Minas Gerais. 2007.

OTTO, C.; KAEMMERER, U.; MUEHLING, B.; PFETZER, N.; WITTIG, R.; VOELKER, H. U.; THIEDE, A.; COY, J. F. Growth of human gastric cancer cells in nude mice is delayed by a ketogenic diet supplemented with omega-3 fatty acids and medium-chain triglycerides. **BMC Cancer**. 8: 122. 2008.

PADILHA, P. C.; PINHEIRO, R. L.O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. **Rev. Bras. de Canc.** 50(3): 251:260. 2004.

POTTER, C.; TURENCHALK, G.S.; XU, T. *Drosophila* in cancer research: na expanding role. **Trends in Genetics**. v. 16,p. 33-39. 2000.

RAMJI, S.; LEE, C.; INABA, T.; PATTERSON, A. V.; RIDICK, D. S. Human NADPH-cytochrome p450 reductase over expression does not enhance the aerobic cytotoxicity of doxorubicin in human breast cancer cell lines. **Cancer Res.**, 63, p. 6914-6919. 2003.

RIBEIRO, J. Suplementação lipídica. **Sports Nutrition Center**. 2011. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/53419573/SUPLEMENTACAO-LIPIDICA>>. Acesso: 20/03/2011.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, DMF; MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. Rio Grande do Sul: **Ulbra**, p.356. 2003.

ROSA, E. F. e COIMBRA, V. C. Câncer de cólon e estresse oxidativo. **O Mundo da Saúde**, São Paulo: 33 (4): 415-418. 2009.

SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Rev. Bras. de Canc.** 47(3): 303-08. 2001.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Radicais Livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Rio Grande do Sul: ULBRA. p. 204. 2004.

SANT'ANA, L. S. Mecanismos bioquímicos envolvidos na digestão, absorção e metabolismos dos ácidos graxos ômega. Revista **Brasileira em Promoção da Saúde**. Universidade Federal de Fortaleza. Fortaleza. V.17. n. 004. P211-216. 2004.

SCHWARTZ S. A.; HERNANDEZ, A.; EVERIS, B. M.; The role of NF-KappaB proteins in cancer; implications for novel treatment strategies. **Surg. Oncol.**; 8: 143-153, 1999.

SERVAN-SCHREIBER, D. **Anticâncer: Prevenir e vencer usando nossas defesas naturais**. Rio de Janeiro: Objetiva. p. 284. 2008.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRRIQUES, J. A. P. **Genética Toxocológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SILVA, M. P. N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. **Rev. Bras. de Canc.**, 52(1): 59-77, 2006.

SIMEONI, R. B. Efeitos do transplante autólogo de células-tronco mononucleares da medula óssea na miocadipatia induzida pela doxorrubicina em ratos *wistar*. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). **Pontifícia Universidade Católica do Paraná**. Pós-graduação em Ciências da Saúde. Paraná. 2006.

SPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A. H.; BERTOLAMI, M. C. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose: Departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. de Card.** v. 88. suplem. I. 2007.

SUÁREZ-MAHECHA, H.; FRANCISCO, A. de; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; SACCOL, A.; PARDO-CARRASCO, S. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 28(1): 101 – 110. 2002.

SUZUKI, D. T. **Introdução à Genética**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 794. 2002.

TONIAL, I. B. Manipulação da composição de ácidos graxos ômega-3 e 6 em tilápias (*Oreochromis niloticus*) em função do tempo da dieta com óleo de linhaça. 2007. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) **Universidade Estadual de Maringá**. Programa de Pós-graduação em Química. Maringá. 2007.

VANCINI, R. L.; LIRA, C. A. B.; ABOULAFIA, J; NOUAILHETAS, V. L. A. Radical Livre, estresse oxidativo e exercício. **Centro de Estudos de Fisiologia do Exercício** – Universidade Federal de São Paulo. 2005. Disponível em: <<http://www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf>>. Acesso: 15/02/2011.

VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M.F. Pesquisa de produtos naturais: Plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 4 (2), 119-130, 2007.

WAITZBERG, D. L. Ômega-3: o que existe de concreto (s. d.). **Departamento de Gastroenterologia da FMUSP**. Disponível em: http://www.amway.com.br/downloads/misc/Monografia_omega3.pdf. Acesso: 10/02/2011.

XIA, H.; HUILIN, Q.; LI, Y.; PEI, J.; BARTON, J.; BLACKSTAD, M.; XU, T. e TAO, W. LATS1 tumor suppressor regulates G2/M transition and apoptosis. **Oncogene**. v. 21. n. 8. p. 1233-1241. 2002.

CAPÍTULO 2

EFEITO MODULADOR DO ÔMEGA-3
SOBRE A MUTAGENICIDADE E CARCINOGENICIDADE DA
DOXORRUICINA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE
Drosophila melanogaster

RESUMO

O ômega-3 (ω -3) é conhecido por atuar na prevenção e tratamento de vários tipos de câncer, tais como cólon, próstata, mama e ovário. O ω -3 pode ser encontrado em peixes gordurosos com alto teor de óleo como salmão, sardinha, bacalhau e sábalo, mas também pode ser encontrado em óleos vegetais como o de linhaça, canola, soja e nozes. O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades antimutagênicas e antitumorais de diferentes concentrações de ω -3 (50, 100 e 200 mg/ml) contra o efeito do quimioterápico doxorrubicina (DXR a 0,125 mg/ml) por meio do testes SMART (Somatic Mutation and Recombination Test), e *Wts* (Teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*), ambos em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. No teste SMART não foram verificados aumentos significativos nas frequências de manchas mutantes, quando tratados apenas com ω -3. No entanto, foi observada uma redução significativa nas frequências de manchas em todas as concentrações em que o ω -3 foi associado com o quimioterápico DXR 0,125 mg/ml. No teste *Wts* os resultados mostram que não houve aumento significativo das frequências de tumores nos indivíduos tratados isoladamente com ω -3, quando comparados com o controle negativo. Contudo, houve redução significativa na frequência de tumores, nas concentrações 100 e 200 mg/mL associados com DXR 0,125 mg/ml, quando comparadas com o controle positivo. Nas condições experimentais propostas neste estudo, o ω -3 não apresentou atividade mutagênica modulando os efeitos induzidos pela DXR. Esta ação moduladora sobre a DXR sugere a possibilidade do uso do ω -3 como quimiopreventivo.

PALAVRAS-CHAVE: Ômega-3, antimutagênico, antitumoral, SMART, *wts*.

ABSTRACT

Omega-3 (ω -3) is known for its actuation in the prevention and treatment of many kinds of colon, prostate, breast, and ovary cancer. ω -3 can be found in oily fishes with a high level of oil, such as sardine, salmon, codfish, as well as in vegetable oils, such as linseed, canola, soybeans, broccoli leaves and dark green leaves, such as spinach. The aim of this work was to evaluate the antimutagenic and antitumor proprieties of different ω -3 concentrations against the effect of the chemotherapeutic drug doxorubicin (DXR 0.125 mg/ml). To assess the mutagenicity of omega-3 use the SMART test (Somatic Mutation and Recombination Test) and assessment of carcinogenicity testing Warts for detection of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster*, both in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. The concentrations used in both experiments are: omega-3 (50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml) a positive control using doxorubicin(0.125 mg/ml) and a negative control using Twenn 80 of 1%. The SMART test results did not present a significant increase in the frequencies of mutant spots, when treated with only ω -3. However we observed a significant decrease in the frequencies of spots, in all the concentrations in which ω -3 was associated with the chemotherapeutic drug doxorubicin (DXR 0.125 mg/mL). In test for detection of epithelial tumor in *Drosophila melanogaster*, the results showed that there was no significant increase in the frequencies of tumors, when compared to the negative control. However there was a significant decrease in the frequency of tumors, in higher concentrations (100 and 200 mg/mL), when compared to the positive control. Under the experimental conditions proposed in this study, ω -3 showed antimutagenic activity modulating the effects induced by DXR. This modulating action on the DXR suggests the possibility of using the ω -3 as a chemopreventive.

KEYWORDS: Omega-3, antimutagenic, antitumor, SMART, wts.

1. INTRODUÇÃO

A luta contra o câncer é um dos maiores desafios da humanidade. Diante deste problema, diferentes estudos têm reavaliado os efeitos benéficos de alguns alimentos para a prevenção do câncer. Estima-se que 30-40% dos tumores podem ser evitados com dieta correta e um estilo de vida saudável [9].

Com relação à dieta, vários fatores nutricionais podem reduzir o risco de progressão do câncer através de antioxidantes e efeitos anti-inflamatórios [8, 14] como exemplo, os ácidos graxos poliinsaturados (*PUFA – Polyunsaturated Fatty Acids*), lipídeos indispensáveis para a saúde por não serem sintetizados pelo organismo do homem [28] por esse motivo são considerados essenciais [17].

Os PUFAs são classificados de acordo com sua configuração molecular: ômega-6 (ω -6) representado pelo ácido linoléico (LA, 18:2) e ácido araquidônico (AA, 20: 4) com propriedades inflamatórias [14]; ômega-3 (ω -3) representado pelo ácido alfa-linolênico (ALA, 18:3) ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5) e ácido docosahexaenoico (DHA, 22: 6) com propriedades anti-inflamatórias [4, 14].

As principais fontes de ω -3 são: ALA presente em óleos vegetais como canola e soja, linhaça, nozes e brócolis [7]; EPA e DHA encontrados principalmente em peixes gordurosos com alto teor de óleo como salmão, sardinha, bacalhau e sábalo [21, 38].

Na conversão enzimática, ω -3 e ω -6 competem pelas mesmas vias metabólicas. Os ácidos graxos ω -3 formam eicosanóides da série ímpar (protaglandianas, leucotrienos e troboxanos) a partir substratos como cicloxigenases e lipoxigenases. Esses eicosanóides são mediadores anti-inflamatórios capazes de reduzir alguns efeitos da imunossupressão, além do importante papel na agregação plaquetária, no crescimento e na diferenciação celular [14, 17].

Os eicosanóides produzidos pela conversão enzimática de ômega-6 (ω -6) são da série par, considerados cancerígenos devido sua ação pró-inflamatória. Como exemplo, podemos citar a COX-2, uma isoenzima que se apresenta aumentada em grande variedade de cânceres humanos, incluindo de

epiderme, hepatocelular, cervical, pancreático, carcinoma epidermóide de esôfago, carcinoma transicional de bexiga, cólon e mama [12].

Os ácidos graxos ω-3 são necessários para a estrutura normal das membranas, incluindo membranas celulares, membranas mitocondriais e as membranas nucleares [26]. Estes ácidos graxos têm a capacidade de se incorporar no interior da membrana celular, influenciando na permeabilidade da mesma, dessa forma podem agir nas funções de receptor, na atividade enzimática, citoquinas e na produção de eicosanóides [39]. Eles são os precursores de toda uma série de RNA mensageiros, regulando assim a formação de citocinas, que modulam o comportamento da maioria das proteínas da membrana vinculada incluindo receptores, canais iônicos e ATPase [26].

Os benefícios nutricionais e medicinais do ω-3 têm sido discutidos em muitos artigos e conferências. Vários estudos epidemiológicos evidenciam que grupos de pessoas que consomem dietas ricas em ácidos graxos ω-3 podem ter um menor prevalência de alguns tipos de câncer [27], como o câncer de cólon, próstata, mama [33] e ovário [35] e ainda reduzir o índice de metástase [24].

Há relatos que o ω-3 inibe parcialmente as superóxidos dismutases e provocam aumento da geração do radical superóxido (O_2^*) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células tumorais provocando a sua morte. Os radicais livres e os peróxidos lipídicos suprimem a expressão do Bcl-2, ativam as caspases e encurtam os telômeros e assim induzem a apoptose das células malignas [11]. O ômega-3 pode ainda inibir o fator de transcrição nuclear NF-kappaB e assim suprimir a expressão da COX-2 [23].

Com relação à carcinogênese da mama, o estrógeno tem um papel promotor, e sua produção é aumentada quando organismo dispõe de maior produção de prostaglandinas E2 (PGE2). Assim uma maior disponibilidade de ω-3 no organismo pode aumentar a produção de prostaglandinas E3 diminuir produção de estrógenos e consequentemente a proliferação celular [13].

O cloridrato de doxorrbicina (DXR) é um antibiótico citotóxico antraciclínico isolado de culturas de *Streptomyces peucetius var. caesius*. É um quimioterápico usado restritamente em hospitais e laboratórios com emprego específico em inúmeras neoplasias humanas, como câncer de mama, carcinoma

do ovário, carcinoma de cabeça e pescoço, leucemia, carcinoma de pulmão e tumores do testículo [5, 6].

Acredita-se que a quebra do DNA por este quimioterápico seja mediada por sua intercalação ao DNA e a ligação à topoisomerase II. Esta droga reage com a enzima citocromo P450 redutase e forma intermediários de radicais semiquinonas, os quais reagem com oxigênio para produzir radicais de ânion superóxido que podem gerar peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila que atacam o DNA e oxidam suas bases [6], acredita-se que estas reações estejam envolvidos no seu mecanismo de citotoxicidade contra uma variedade de tumores [3].

O teste SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) é utilizado para avaliar a mutagenicidade e recombinogenicidade de misturas complexas como partículas aéreas, extrato de plantas e bebidas como café, chás e vinhos. O teste SMART utiliza a *Drosophila melanogaster* como organismo teste, com alta similaridade genética e bioquímica, quando comparada aos mamíferos, possibilitando detecção simultânea de mutações gênicas e cromossômicas e/ou recombinação somática, com ênfase sobre eventos relacionados com recombinação homóloga [32]. As mutações genéticas podem ser detectadas através de machas de pêlos mutantes nas asas de moscas adultas [22].

O teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster* é usado para testar a atividade carcinogênica e antitumoral de misturas, e também faz uso da *D. melanogaster* como organismo teste. De acordo Nishiyama *et al.* [30], o gene *warts* (*wts*) foi identificado com base na sua habilidade para ação como um supressor de tumor em *Drosophila*. A deleção desse gene leva à formação de clones de células circulares e extremamente invasivas, chamadas de verrugas, que desenvolvem ao longo do corpo da mosca. Este disco imaginal da *Drosophila*, de acordo com Eeken *et al.* [10], corresponde a um grupo de células da mosca em estádio larval que durante a metamorfose desenvolvem nas estruturas da epiderme do indivíduo adulto. O ciclo de regulação celular do disco imaginal é muito similar às células somáticas de mamíferos.

O presente estudo teve como objetivo avaliar as atividades antimutagênicas e antitumorais de diferentes concentrações de ω-3 sobre o efeito mutagênico e carcinogênico do quimioterápico DXR (0,125 mg/mL), por meio dos

testes SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) e *wts* (Warts - Teste para detecção de tumor epitelial), ambos em células somáticas de *D. melanogaster*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Compostos Químicos

Doxorrubicina (DXR)

O cloridrato de doxorrubicina Doxolem® produzido pela Eurofarma Laboratórios LTDA, lote nº 83520 e distribuído pela Zodiac Produtos Farmacêuticos S.A., São Paulo, Brasil. É um pó liofilizado composto por metilparabeno, lactose e doxorrubicina (DXR), cada frasco contém 10mg do composto. Possui peso molecular de 580,0 e fórmula molecular C₂₇H₂₉NO₁₁.HCl. O cloridrato de doxorrubicina, conhecido comercialmente por Doxolem®, foi utilizado neste trabalho como controle positivo dissolvido em água osmose reversa.

Ômega-3 (ω -3)

O ω -3 é um ácido graxo poliinsaturado encontrado em produtos vegetais e animais e pode ser adquirido comercialmente em farmácias homeopáticas.

O ω -3 usado neste experimento foi adquirido na Farmácia Homeopática e Manipulação Violeta na cidade de Patos de Minas - MG, sob a forma de cápsulas contendo 1g do princípio ativo. Foram utilizadas 3 concentrações de ômega-3: 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200mg/mL diluídos em Tween 80 a 1%.

2.2. SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) - Teste para detecção de mutação e recombinação somáticas

No teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de *D. melanogaster* são utilizadas três linhagens mutantes: *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*, *flare*³ (*flr*³/ *In(3LR)TM3*) e *Oregon R*, *flare*³ (*ORR*; *flr*³/

In(3LR)TM3. Essas linhagens são mantidas em estoque em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura para *D. melanogaster* (820 mL de água, 25g de fermento biológico -*Saccharomyces cerevisiae*, 11g de ágar, 156g de banana e 1g de nipagin).

Foram realizado cruzamento de fêmeas virgens *f1r³/In(3LR)TM3, ri p⁰ sep I(3)89Aabx^{34e}* e *Bd^s* com machos *mwh* – Cruzamento Padrão (ST - Standard Cross)[19]; fêmeas virgens *ORR; f1r³/In(3LR)TM3, ri p⁰ sep I(3)89Aabx^{34e}* e *Bd^s* com machos *mwh* – Cruzamento de Alta Bioativação – (HB - High Bioactivation Cross) [20].

Destes cruzamentos nascem dois tipos de descendentes: trans heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Esses descendentes são distintos fenotipicamente, com base no marcador *TM3, Bd^s*. Os MH (*mwh +/+ f1r³*) apresentam os cromossomos estruturalmente normais, enquanto que os BH (*mwh +/+ TM3, Bd^s*) apresentam um cromossomo com um平衡ador gênico com múltiplas inversões (*TM3, Bd^s*).

Os ovos foram coletados por um período de 8 horas, em frascos contendo uma base sólida de ágar (4% de ágar em água) e uma camada de fermento (*S. cerevisiae*) suplementado com açúcar. Após 72 horas, +/- 4 horas, as larvas de 3º estágio foram lavadas com água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina. Grupos de aproximadamente 100 larvas foram transferidas para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) contendo 1,5 g de meio de cultura e 5,0 mL de diferentes concentrações de ω-3 (50, 100 ou 200 mg/ml) isoladamente ou associadas com DXR (0,125 mg/m) foram incluídos também um controle positivo usando DXR a 0,125 mg/mL e um controle negativo Tween 80 a 1%.

Após o tratamento foram obtidos dois tipos de descendentes: o marcador trans-heterozigoto (MH) (*mwh +/+ f1r3*) com asas fenotipicamente do tipo selvagem e o平衡ador heterozigoto (BH) (*mwh +/+ TM3 Bd^s*) com asas fenotipicamente do tipo serrilhada. As moscas adultas emergentes deste tratamento foram coletadas e fixadas em etanol 70% para posterior montagem das lâminas.

As asas das moscas foram retiradas, embebidas em solução de *Faure* (30g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 1,5g de hidrato de cloral e 50 mL de

água destilada) e distendidas sobre uma lâmina seca. Em seguida, as lâminas foram levadas para secar por 1 hora sobre placa aquecedora (40°C). Por fim, procedeu-se à montagem com lamínula, e novamente a lâmina foi colocada para secar em temperatura ambiente.

A análise das asas foi realizada em microscópio óptico (objetiva 40x), registrando o número e os tipos de manchas encontradas (simples ou gêmeas), assim como o tamanho das mesmas, e a posição em que se encontram na asa. Aproximadamente 24.800 células foram analisadas por asa.

A análise estatística utilizada para a verificação da possível ação genotóxica do ω -3 foi realizada por meio do teste descrito por Frei e Würgler [15]. Para a análise estatística de antimutagenicidade, as frequências de cada tipo de mancha por mosca, foram comparadas aos pares [ex: controle negativo versus DXR, DXR (agente mutagênico) isoladamente versus ω -3 + DXR], usando o teste *U* de Mann, Whitney e Wilcoxon [16].

2.3. Warts (wts) - Teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*

Para o tratamento *wts* foram cruzadas fêmeas virgens *wts/TM3, Sb¹* com machos *mwh/mwh*. Os ovos descendentes deste cruzamento foram coletados por um período de 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (4% de ágar em água) e uma camada de fermento (*S. cerevisiae*) suplementado com açúcar. Após 72 horas as larvas foram lavadas com água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina. Grupos de aproximadamente 100 larvas foram transferidas para frascos (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) contendo 1,5g de meio de cultura instantâneo para *Drosophila* sp., aos quais foram adicionadas diferentes concentrações de ω -3 (50, 100 ou 200 mg/ml) isoladamente ou associadas com DXR 0,125 mg/ml. Foram incluídos também um controle positivo com DXR a 0,125 mg/mL e um controle negativo com Tween 80 a 1%.

Após o tratamento os indivíduos adultos foram transferidos para frasco contendo etanol 70%. Desse cruzamento obtivemos dois tipos de descendentes: moscas com pelo curto e moscas com pelo longo. Apenas as moscas com pelos

longos foram analisadas, pois estas possuem o fenótipo selvagem quanto a presença do tumor (*wts+/+ mwh*). Análise foi feita através da lupa estereoscópica e em seguida os resultados foram submetidos à análise estatística usando o teste *U*, não-paramétrico de Mann-Whitney.

3. RESULTADOS

3.1. SMART

A Tabela 1 apresenta os resultados das frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH), do cruzamento Padrão (ST), tratados com Tween 80 a 1% (controle negativo), doxorrubicina (DXR) a 0,125 mg/mL (controle positivo), e diferentes diluições de ω -3 (50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL).

Não houve aumento estatisticamente significativo ($p \geq 0,05$) do número total de manchas nas três concentrações testadas do ômega-3 (ω -3), quando comparado com o controle negativo. Os dados da Tabela 1 confirmam que o quimioterápico doxorrubicina (DXR) possui efeito mutagênico, devido ao aumentando significativo ($p < 0,05$) no número de manchas mutantes quando comparado com controle negativo.

A Tabela 1 apresenta também os resultados das frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes tratados com diferentes concentrações de ω -3 (50, 100 ou 200 mg/mL) em associação com a DXR (0,125 mg/mL).

Em todas as concentrações de ω -3 (50, 100 ou 200 mg/mL), quando associadas com DXR (0,125 mg/mL) houve uma redução significativa nas frequências de manchas mutantes, induzidas pelo quimioterápico (DXR). O número de manchas gêmeas também não foi significativo quando comparado com controle positivo, portanto, o ω -3 não é recombinogênico.

É possível observar também uma redução estatisticamente significativa no número de manchas para o total de manchas. Essas reduções indicam que ω -3 possui efeito protetor.

Tabela 1: Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes “MH” de *Drosophila melanogaster*, do Cruzamento Padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de ω-3 isoladas e associadas à DXR (0,125mg/ml).

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total manchas mwh ^c (n)	
		MSP (1-2 céls) ^b		MSG (>2 céls) ^b		MG		TM			
		<i>m</i> = 2	<i>m</i> = 5	<i>m</i> = 5	<i>m</i> = 5	<i>m</i> = 2	<i>m</i> = 2	<i>m</i> = 2	<i>m</i> = 2		
<i>mwh/flr</i> ³											
Contr. Neg.	20	0,15 (03)	0,05 (01)	0,00 (00)	0,00 (00)	0,20 (04)				4	
DXR 0,125 mg/mL	20	0,45 (09)	i 1,90 (38)	+ 1,05 (21)	+ 3,40 (68)	+ 0,50 (10)	i			64	
ω-3-50 mg/mL	20	0,25 (05)	i 0,20 (04)	i 0,05 (01)	i 0,15 (03)	i 0,50 (10)	i			8	
ω-3-100 mg/mL	20	0,15 (03)	i 0,00 (00)	i 0,00 (00)	i 0,15 (03)	i 0,50 (10)	i			3	
ω-3-200 mg/mL	20	0,20 (04)	i 0,05 (01)	i 0,00 (00)	i 0,25 (05)	i 0,50 (10)	i			5	
ω-3-50 mg/mL + DXR	20	0,20 (04)	i 0,35 (07)	+ 0,20 (04)	+ 0,75 (15)	+ 0,50 (10)	+ 0,50 (10)			13	
ω-3-100 mg/mL + DXR	20	0,15 (03)	i 0,40 (08)	+ 0,30 (06)	+ 0,85 (17)	+ 0,50 (10)	+ 0,50 (10)			17	
ω-3-200 mg/mL + DXR	20	0,15 (03)	i 0,45 (09)	+ 0,65 (13)	i 1,25 (25)	i 1,25 (25)	i 1,25 (25)			23	

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler [15]: +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância *a* = *b* = 0,05.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

3.2. Warts (wts)

A Tabela 2 apresenta as frequências de tumores observadas nas diferentes partes do corpo da *Drosophila melanogaster* tratadas com diferentes concentrações de ω-3 e associações com doxorrubicina.

A análise de indução de tumor pelo do ω-3 mostrou que nas concentrações 50, 100 e 200 mg/mL não houve aumento significativo na frequência de tumores, quando comparados ao controle negativo. No entanto, quando o ω-3 foi associado à DXR notou-se uma redução significativa na frequência de tumores nas concentrações mais altas (100 e 200 mg/mL), quando comparados ao controle positivo, evidenciando o efeito inibidor e antitumoral do ω-3 nas concentrações analisadas. Este resultado confirma que o ω-3 possui efeito protetor contra ação tumoral da DXR.

Tabela 2: Frequência de clones de tumor observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratada com diferentes concentrações de ω -3 isoladas e associadas a DXR (0,125 mg/ml).

Tratamentos			Número de tumores analisados								Frequência (Nº de tumores/ mosca)
Ômega-3 (concentração) mg/mL	DXR (mg/mL)	Número de moscas analisadas	Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter	Total		
0	0	200	0	1	12	19	1	0	33	0,16	
0	0,125	200	1	4	37	25	20	8	95*	0,47*	
50	0	200	0	2	8	13	13	0	36	0,18	
100	0	166	2	1	17	4	6	1	31	0,19	
200	0	195	1	1	12	5	3	0	22	0,11	
50	0,125	190	2	3	44	11	8	2	70	0,37	
100	0,125	176	1	1	17	8	4	2	33	0,19**	
200	0,125	142	1	1	17	8	4	3	34	0,24**	

Diagnóstico estatístico de acordo com Mann-Whitney Teste. Nível de significância $p = 0,05$

* Valor considerado diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

** Valor considerado diferente do controle positivo (DXR 0,125 mg/mL) ($p < 0,05$).

DXR, doxorrubicina.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As concentrações do ω -3 testadas no SMART não apresentaram aumento significativo no número de manchas, quando comparadas com o controle negativo. Também não houve aumento significativo no número manchas nas concentrações associadas ao quimioterápico DXR. Ao contrário, quando ω -3 foi associado à DXR houve uma redução significativa no número de manchas mutantes. Estes resultados nos levam acreditar que ω -3 possui efeito modulador sobre a mutagenicidade da DXR.

Para verificar se os efeitos moduladores do ω -3 não eram apenas no sentido da atividade antimutagênica, mas, também, no sentido reduzir a formação de tumores foi realizado o teste para detecção de clones de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*. Fazendo uso de uma amostra maior, verificou-se que o

ω -3 realmente exerce efeito protetor, pois quando associado ao quimioterápico DXR, reduziu, significativamente, o número de tumores quando, comparado o controle positivo.

Acreditamos que os mecanismos pelos quais o ω -3 modulou a ação da DXR, diminuindo o número de manchas mutantes (atividade antimutagênica), foram os mesmos mecanismos que promoveram a redução de tumores, induzidos pela DXR. Estes mecanismos pelos quais o ω -3 exerceu esta ação protetora não foram diretamente avaliados em nossos experimentos. Contudo, Narayanan *et al.* [29] explica que o ω -3 pode causar a restauração da via apoptótica que geralmente está prejudicada nos tecidos neoplásicos, ativando fosfatasas protéicas envolvidas na inativação do Bcl-2 (genes anti-apoptóticos) e na ativação da caspase-3, fatores que de forma independente promovem o aumento da apoptose.

O ω -3 pode aumentar os níveis da proteína PTEN (proteína responsável pela inibição do ciclo celular) e da atividade da Akt quinase (proteína que desempenha um papel fundamental em vários processos celulares como a proliferação celular e apoptose) nos tumores levando a uma inibição significativa da ativação NF κ B [18]. O NF- κ B é um fator de sobrevivência da célula maligna e a sua inibição provoca diminuição da proliferação celular, aumento da apoptose e diminuição da angiogênese [34].

Outro mecanismo de ação dos ácidos graxos ômega-3, sugere que após o consumo, PUFAS ω -3 (ácidos graxos poli-insaturados) são incorporados em todas as membranas celulares do corpo, então, pode afetar a função das proteínas que estão em contato direto com a bicamada lipídica como, por exemplo, o controle da atividade das canaletas de íons sódio e cálcio [40].

Hardman [23] constatou que a presença de PUFAS ω -3 na dieta aumenta a poli-insaturação da membrana e aumenta a susceptibilidade à peroxidação lipídica melhorando significativamente a eficácia da terapia com doxorrubicina. Berquini, Edwards e Chen [1], complementam que a capacidade de peroxidação lipídica do ω -3 pode induzir a apoptose. Portanto, o ω -3 é um agente conhecidamente indutor de apoptose.

Os ácidos graxos poliinsaturados não possuem ação como agente antioxidante e são especialmente suscetíveis à oxidação que resulta na ação de

radicais livres de oxigênio [2]. Alguns tipos de quimioterapia e radioterapia geram grandes estouros de radicais livres (moléculas altamente reativas) que atacam as membranas celulares matando as células cancerosas; quando o ômega-3 é associado ao tratamento torna as células cancerosas mais vulneráveis aos ataques dos radicais livres, melhorando assim os efeitos da quimioterapia e radiação [37]. Portanto, o mecanismo pelo qual o ω-3 reduz o número de manchas mutantes pode não ser devido à ação antioxidante.

De acordo com Lisboa (2006) [25] e Felippe (2009)[12], a suplementação de ácidos graxos ω-3 no tratamento quimioterápico diminui a proliferação maligna aumentando a eficácia da droga e ainda reduz os efeitos colaterais diminuindo os efeitos tóxicos do tratamento.

Para Simopoulos [37], um dos mecanismos pelos quais o ω-3 impede o tumor de se espalhar é através da membrana basal que cerca os vasos sanguíneos e órgãos. A dieta suplementada com ω-3 impede que as células cancerosas se fixem as membranas basais através do bloqueio da expressão de moléculas na superfície da célula (moléculas de adesão), o ω-3 pode, ainda, bloquear a produção de colagenase (dissolve a membrana) caso estas células consigam penetrar a barreira.

A combinação de PUFAS ω-3 no tratamento com radiação ionizante promoveu o aumento do efeito antitumoral devido a diminuição da expressão de COX-2 induzida pela irradiação e pela baixa regulação do gene bcl-2 anti-apoptótica e, ainda, por um efeito antiangiogênico [24, 41].

O tratamento com dieta cetogênica suplementada com ω-3 apresentou-se benéfica no sentido de melhorar a qualidade de vida do paciente, diminuindo a caquexia (perda progressiva de peso) e também na redução de tumores malignos, pois estes são dependentes de glicose para seu crescimento e sobrevivência e são incapazes de metabolizar os corpos cetônicos para produzir energia. Com a dieta cetogênica, enriquecida com ω-3, o suprimento de glicose é restrinido e o corpo produz a energia adequada e substratos na forma de gordura para gerar corpos cetônicos, dessa forma promove a redução do crescimento tumoral [31, 36].

A dieta rica em PUFA ω-3 no tratamento e prevenção do câncer ainda não foi totalmente comprovada, apesar de existir vários estudos que

demonstraram que esse óleo essencial é capaz de reduzir o crescimento tumoral alguns autores divergem opiniões, como é caso de MacLean [27] que realizou um estudo para avaliar os créditos do ω -3 na prevenção do câncer. Ele constatou que dos 38 artigos, que preenchiam os critérios do estudo, publicados entre 1966 e 2005, nenhum apresentou evidências significativas de que o ω -3 possa afetar algum mecanismo de desenvolvimento de células cancerígenas e que há poucos indícios de que o ω -3 reduz o risco de qualquer tipo de câncer. No entanto, o teste SMART e o teste para detecção de clones de tumor (*wts*), realizados nesta pesquisa com o ω -3, apresentaram resultados positivos, com relação aos efeitos moduladores do ω -3 sobre a ação da DXR.

A redução no número de manchas no teste SMART e a redução no número de tumores no teste *wts* sugerem fortemente que o ω -3 é uma substância potencialmente útil na prevenção e tratamento do câncer, pois os resultados nos levam a acreditar que o ω -3 é capaz de melhorar os efeitos do quimioterápico DXR.

Diante dos resultados apresentados neste trabalho podemos concluir que o ω -3 apresentou atividade antimutagênica, modulando os efeitos induzidos pela DXR. Esta ação moduladora sobre a DXR sugere a possibilidade do uso do ω -3 como quimiopreventivo. Quando verificamos a inequívoca redução de tumores pelo ω -3, podemos suscitar o uso deste ácido graxo como adjuvante no tratamento contra o câncer.

Concluímos, também, que ainda é preciso desenvolver vários estudos com ênfase em seres humanos para que a terapia de prevenção e tratamento do câncer, suplementada com ácidos graxos ω -3, seja completamente aceita.

5. REFERENCIAS

1. Berquini, IM; Edwards, IJ; Chen, YP: **Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids.** Cancer Letters 2008, **269**(2): 363-377.
2. Burton, GW: **Vitamin E: molecular and biological function.** Proceedings of the Nutrition Society 1994, **53**(2): 251-262.
3. Brunstein, CG; Silva, HNS: **Fármacos Antineoplásicos** In: Farmacologia Clínica: Fundamentos da terapêutica Funcional. 3 ed. Edited by Funchs, FD; Wannmacher, L e Ferreira, MB. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2006: 502-531.
4. Carmo, MCNS; Correia, MITD: **A Importância dos ácidos graxos ômega-3 no câncer.** Revista Brasileira de Cancerologia 2009, **53**(3): 279-287.
5. Chiuchetta, SJR; Castro-Prado MAA: **Doxorubicin and etoposide induce somatic recombination in diploid cells of *Aspergillus nidulans*.** Brazilian Journal of Microbiology 2002, **33**(3):255-259.
6. Chabner, BA; Calabresi, P: **Quimioterapia das Doenças Neoplásicas** In Goodman & Gilman : As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11 ed. Edited by Brunton, LL; Lazo, JS e Parker, KL. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil 2006: 1185-1264.
7. Citadin, CT; Almeida, ERP; Silva-Werneck, J; Martins, NF; Derner, RB; Togawa, R; Monte, DC: **Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 – clonagem e caracterização do primeiro gene da via de síntese microalga marinha *Thalassiosira fluviatilis*.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 2008, **224**: 20.
8. Comba, A; Maestri, DM; Berra, MA; Garcia, CP; Undurti N Das; Eynard, AR; Pasqualini, M: **Effect of ω-3 and ω-9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and**

cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. *Lipids in Health and Disease* 2010, **9**:112.

9. Divisi, D; Tommaso, S di; Salvatore, S; Margherita, G; Crisi, R: **Diet and cancer**. *Acta Biomed* 2006, **77**(2):118-123. 2006.

10. Eeken, JC; Klink, I; Veen, BL; Pastink, A; Ferro, W: **Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene wts**. *Environ. Mol. Mutagen* 2002, **40**(4): 277-82.

11. Felippe, JJ: **Efeito dos Ácidos Graxos Poli Insaturados no câncer: indução de apoptose, inibição da proliferação celular e antiangiogênese** [<http://www.medicinacomplementar.com.br>]

12. Felippe, JJ: **Óleo de peixe ômega-3 e câncer: diminuição da proliferação celular maligna, aumento da apoptose, indução da diferenciação celular e diminuição da neoangiogênese tumoral** [<http://www.medicinacomplementar.com.br>]

13. Foley, EF; Jazaeri, AA; Shupnik, MA; Jazaeri, O; Hice, LW: **Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon**. *Cancer Res.* 2000, **60**: 245-248.

14. Fradet, V, Cheng, I, Casey, G, Witte, JS: **Dietary Omega-3 Fatty Acids, Cyclooxygenase-2 Genetic Variation, and Aggressive Prostate Cancer Risk**. *Clinical. Cancer Research*. 2009, **15**: 2559.

15. Frei, H.; & Würgler, FE: **Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result**. *Mutation Res.* 1988, **203**: 297-308.

16. Frei, H; Wurgler, FE: **Optimal experimental design and sample size for the evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*.** Mutation Res. 1995, **334**: 247-258.
17. Garófalo, A e Petrilli, AS: **Balanço entre ácidos graxo ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caqueixa.** Revista de Nutrição, 2006, **5** (5): 611-621.
18. Ghosh-choudury, T; Mandal, CC; Woodruff, K; Clair, PS; Fernandes, G; Choudhury, GG; Ghosh-Choudhury, N: **Fish oil targets PTEN to regulate NF κ B downregulation of genes anti-apoptotic in tumor growth of breast.** Breast Cancer Res Treat. 2009, **118** (1): 213-228.
19. Graf, U; Frei, A; Kagi, A; Katz, AJ; Würgler, FE: **Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test.** Mutation Res. 1989, **222**:359-373.
20. Graf, U; Van Schaik, N: **Improved high bio activations cross for the wing somatic mutations and recombination test in *Drosophila melanogaster*.** Mutation Res. 1992, **271**: 59-67.
21. Grazi, I; Liberopoulos, EN; Saougos, VG; Elisaf, M: **Beneficial Effects of Omega-3 Fatty Acids: The Current Evidence.** Hellenic Journal of Cardiology 2006, **47**: 223-231.
22. Guzmán-Ricon, J; Graf, U: ***Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor.** In: Biomonitoring and Biomarkers a Indicators of Environmental Change. Edit by Butterworth FM; corkum, LD e Guzmán-Ricon, J. New York: Plenun Press, 1995:169-181.
23. Hardman, WE; Munoz JJ; Cameron, IL: **Role of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in omega 3 fatty acids induced suppression of breast cancer xenograft growth in mice.** Cancer Cell International 2002, **2**(1):10.

24. Hardman, EW; Luzhe, D; Short, N; Cameron, IL: **Dietary omega-3 fatty acids and ionizing irradiation on human xenograft growth of breast cancer and angiogenesis.** Cancer Cell International 2005, **5:** 12.
25. Lisboa, AQ: **Estudo nutricional e ácidos graxos plasmáticos de pacientes com câncer de colo uterino.** Dissertação de mestrado da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Pós-graduação em Nutrição Humana, 2006.
26. Manna, S; Tridib, C; Suresh, D; Kartick, S; Basabi, R, Chatterjee, M: **Protective roleof fish oil (Maxepa) on the early events of mammary carcinogenesis in rats by modulating protein-DNA crosslinking, cell proliferation and p53 protein expression.** Cancer Cell International 2007, **7:6.**
27. Maclean, CH; Newberry, SJ; Mojica, WA; Khanna, P; Issa, AM; Suttorp, MJ; Lim, YW; Tranina, SB; Hilton, L; Garland, R; Morton, SC: **Effects of Omega-3 fatty acids on cancer risk: Systematic Review.** JAMA: online article 2006, **295** (4): 403-415.
28. Marques, R: **Efeitos biológicos dos ácidos graxos ômega 3 sobre a saúde humana.** [<http://saibavocetambem.wordpress.com/2008/04/18/efeitos-biologicos-dos-acidos-graxos-omega-3-sobre-a-saude-humana/>]
29. Narayanan, BA; Narayanan, NK; REDDY, BS: **Docosahexaenoic acid regulated genes andtranscription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells.** Internat J. Oncol. 2001 **19**(6): 1255-1262.
30. Nishiyama, Y; Hirota, T; Morisaki, T; Hara, T; Marumoto, T; Iada, S; Makino, K; Yamamoto, H; Hiraoka, T; Kitamura, N; Saya, H: **A human homolog of Drosophila warts suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosos.** Febs Letters 1999, **459**(2): 159-165.

31. Otto, C; Kaemmerer, U; Illert, B; Muehling, B; Pfetzer, N; Wittig, R.; Voelker, HU; Thiede, A; Coy, JF: **Growth of human gastric cancer cells in nude mice is delayed by a ketogenic diet supplemented with omega-3 fatty acids and medium-chain triglycerides.** BMC Cancer 2008, **8**:122.
32. Ribeiro, LR; Salvadori, DMF; Marques, EK: **Mutagênesis Ambiental.** Rio Grande do Sul: Ulbra, 2003: 356.
33. Sant'Ana, LS: **Mecanismos bioquímicos envolvidos na digestão, absorção e metabolismos dos ácidos graxos ômega.** Revista Brasileira em Promoção da Saúde 2004, **17**(4): 211-216.
34. Schwartz SA; Hernandez, A; Evers, BM: **The role of NF-KappaB proteins in cancer; implications for novel treatment strategies.** Surg Oncol 1999, **8**: 143-153.
35. Servan-Schreiber, D: **Anticâncer: Prevenir e vencer usando nossas defesas naturais.** Rio de Janeiro: Objetiva 2008: 284.
36. Silva, MPN: **Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer.** Revista Brasileira de Cancerologia 2006, **52**(1): 59-77.
37. Simopoulos, AP: **The Omega- Plan: Fighting Cancer with Omega-3 Fatty Acids. Provided Courtesy of Barlean's Organic Oil** [<http://www.barleans.com/literature/flax/68-fighting-cancer.pdf>]
38. Souto, DL: **Ácidos Graxos** [<http://debbys2008.blogspot.com/2009/10/acidos-graxos.html>]
39. Suárez-Mahecha, H; Francisco, A de; Beirão, LH; block, J. M; Saccol, A; Pardo-Carrasco, S: **A importância dos ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes.** São Paulo: Boletim do Instituto de Pesca 2002, **28**(1): 101 – 110.

40. Surette, ME: **Mechanisms and innovations: The science behind dietary omega-3 fatty acids.** Canadian Medical Association or its licensors 2008, **178**(2):177-180.
41. Wen, B; Deutsch, E, Oppolon, P; Auperin, A; Frascogna, V; Connault, E; Bourhis, J: **N-3 polyunsaturated fatty acids decrease mucosal / epidermal reactions and enhancethe anti-tumor effect of ionizing radiation with inhibition of tumor angiogenesis.** Bristsh Journal of Cancer 2003, **89**(6): 1102-1107.