

CAROLINA DE QUADROS CAMARGO

**EFEITOS DO ÓLEO DE PEIXE NO ESTRESSE OXIDATIVO,
EVENTOS ADVERSOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO DE
PACIENTES COM CÂNCER GASTROINTESTINAL EM
QUIMIOTERAPIA: um ensaio clínico randomizado, triplo-cego,
controlado por placebo.**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor na Linha de Pesquisa II – Estudo dietético e bioquímico relacionado com o estado nutricional do Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina
Orientador: Prof. Everson Araújo Nunes, Dr.

Florianópolis
2017.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Camargo, Carolina de Quadros
EFEITOS DO ÓLEO DE PEIXE NO ESTRESSE OXIDATIVO,
EVENTOS ADVERSOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO DE
PACIENTES COM CÂNCER GASTROINTESTINAL EM
QUIMIOTERAPIA : um ensaio clínico randomizado,
triplo-cego, controlado por placebo / Carolina de
Quadros Camargo ; orientador, Everson Araújo Nunes,
2017.

211 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Nutrição, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Nutrição. 2. Câncer. 3. óleo de peixe. 4.
Resposta ao tratamento. 5. Estresse Oxidativo. I.
Nunes, Everson Araújo. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição.
III. Título.

Dedico esta tese a todos os participantes dessa pesquisa, 56 pessoas que acreditaram junto conosco na busca de algo que pudesse lhes ajudar nesse desafio. Fizeram-me lembrar a todo o momento o real objetivo por trás de tudo. Graças a eles essa é uma pesquisa humana, feita com o coração, para que de alguma forma pudesse homenageá-los e honrar seus esforços.

AGRADECIMENTOS

Desde os primeiros dias foi dito que mais que a construção de uma tese o doutorado era uma jornada. Apesar de entender objetivamente o que isso significava, considerando as várias etapas que teria pela frente, não poderia imaginar o quão grandiosa e significativa seria essa jornada. Hoje, olhando retrospectivamente, posso dizer que os últimos quatro anos foram os mais desafiadores, intensos e sofridos da minha vida até o momento. Com isso tiveram também sua dose de satisfação, conquista e superação. Com certeza tudo isso não se deve “apenas” ao doutorado e à tese, uma série de fatores tiveram participação, inclusive uma coincidência de momentos. De qualquer maneira, para mim fica impossível separar tudo que aconteceu nesse período, a jornada é uma só. Cada fase do doutorado e cada pedaço dessa tese tiveram sua marca, seu contexto e são indissolúveis da minha vida e da minha trajetória. Digo isso porque ao agradecer cada pessoa envolvida nessa tese e nesse período, agradeço o que me foi proporcionado e compartilhado, agradeço as palavras, agradeço o exemplo, a companhia. Agradeço não só pelo que isso possa ter influenciado no trabalho final, mas principalmente pela maneira que enriqueceu meu caminho e contribuiu para meu crescimento profissional e pessoal.

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu professor orientador Dr. Everson Araújo Nunes. Há 6 anos, desde o início do meu mestrado, seus ensinamentos, postura, conhecimentos e experiência me inspiraram a melhorar e aprimorar. Aprecio e agradeço a oportunidade de ter trabalhado com um pesquisador e professor admirável.

Agradeço também toda a equipe do Laboratório de Investigação em Doenças Crônicas, o qual tem como um dos coordenadores o Prof. Everson. Muitos passaram por lá durante esses 4 anos e contribuíram com esse trabalho. Agradeço em especial a Thayz Chagas, Amanda Marreiro e Henver Brunetta, que se mostraram mais do que colegas competentes, mas amigos com quem pude contar.

Durante o ano de coleta de dados no CEPON contamos com profissionais que ajudaram muito para que a pesquisa andasse da melhor maneira possível. Destaco a equipe de enfermagem, da quimioterapia e do agendamento que sempre se mostraram disponíveis, as nutricionistas

Scheila Gevaert e Maria Emília de Souza Fabre que nos ajudaram na concepção e programação do estudo e na coleta de dados. Agradeço também a equipe de assistentes sociais, em especial a Maria Luiza, Fabíola, Cláudia, Ana Cláudia e Uilna que nos auxiliaram no recrutamento dos pacientes e foram grandes companhias para momentos de descontração.

Ao colega Michel Mocellin, que dividiu comigo as responsabilidades da coleta de dados. Passamos o ano de 2015 juntos no CEPON buscando fazer o melhor que nos fosse possível. Seus conhecimentos, tranquilidade e a nossa parceria fizeram com que a rotina fluísse muito bem.

Agradeço ao Prof. Dr. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade, com quem sempre pude contar desde a minha chegada em Florianópolis em 2011. Desde então, sua constante atenção, preocupação e apoio me deram muita segurança para desempenhar todas as atividades. Sou muito grata por ter me recebido tão bem e por ter se tornado uma referência.

A todos os professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, por todas as contribuições que fizeram direta e indiretamente nesse trabalho. Aos colegas de doutorado do ano de 2013, em especial a Alyne Cardoso, a amizade que construímos foi essencial para superar os desafios que se apresentaram.

Agradeço às amigas Ana Cláudia Mazzonetto, Rafaela Fabri, Suellen Martinelli, Daniela Hauschild, Vanessa Rodrigues e Naiara Publio por todas as vezes em que me deram forças para seguir em frente. Partilharam comigo momentos difíceis, falaram quando era a hora de falar e garantiram que, muitas vezes, somente suas companhias silenciosas também me trouxessem paz. Agradeço por serem mulheres fantásticas das quais posso sentir apoio incondicional.

Agradeço ao meu amor Walter Marquazan Augusto por essa aventura que vivemos continuamente. Obrigada por traçar novos caminhos comigo e por juntos aprendermos com os antigos, pela tenacidade que temos para encarar as fases difíceis, por me mostrar que cada aspecto da vida pode ser aproveitado. Estava presente em cada momento da construção dessa tese, desde as primeiras ideias até o ponto final. Durante esse período, transformamos um ao outro e compartilhamos nossas forças. Agradeço a tua confiança em mim, que

me levantou muitas vezes e ao nosso amor, que para mim fica a cada dia mais real e mais forte.

E por fim agradeço a minha família, ao meu pai Neilor, à minha mãe Celia e ao meu irmão Henrique. Sou grata por muitas coisas na minha vida, mas minha maior gratidão é ter nascido nessa família e ter a oportunidade de ter eles tão perto de mim. Durante esses quatro anos, fui surpreendida por uma imensidão de sabedoria e de amor incondicional. Graças a tudo que aconteceu nesse período e durante a construção dessa tese entrei em contato com um lado dos meus pais que foi fundamental para a concretização de tudo isso. Hoje, mais do que nunca, olho para eles com profundo respeito, admiração e amor e por isso sou muito grata.

RESUMO

CAMARGO, Carolina de Quadros. **Efeitos do óleo de peixe no estresse oxidativo, eventos adversos e resposta ao tratamento de pacientes com câncer gastrointestinal em quimioterapia: um ensaio clínico randomizado, triplo-cego, controlado por placebo.** Florianópolis, 2017. Tese (Doutorado em Nutrição) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

De acordo com estudos in vivo e in vitro, devido a serem altamente peroxidáveis, os ácidos graxos n-3, presentes no óleo de peixe, podem potencialmente aumentar a sensibilidade das células tumorais ao tratamento convencional do câncer, enquanto as células saudáveis permanecem inalteradas. Essa tese teve três objetivos específicos: 1-Avaliar retrospectivamente desfechos clínicos durante e após a quimioterapia em indivíduos com câncer colorretal suplementados com óleo de peixe; 2-Revisar sistematicamente estudos que avaliaram efeitos em parâmetros do estresse oxidativo do tratamento concomitante com agentes anticâncer e ácidos graxos ômega-3 e 3-Avaliar antes e após a ingestão de óleo de peixe em pacientes com câncer gastrointestinal submetidos a quimioterapia parâmetros de estresse oxidativo, presença e graduação de eventos adversos à quimioterapia e parâmetros indicativos de prognóstico e de resposta ao tratamento. Trinta indivíduos foram randomizados em: Grupo Suplementado (GS), que recebeu 2 g/dia de óleo de peixe (0,6 g/dia de EPA e DHA) por nove semanas ou Grupo Controle (GC), que não recebeu intervenção. As variáveis avaliadas retrospectivamente foram: número de ciclos e dias em quimioterapia; número de atrasos e interrupções da quimioterapia; número de hospitalizações durante a quimioterapia; progressão tumoral; valores do marcador tumoral CEA; dias até morte ou progressão; e sobrevida em três anos. Na revisão sistemática, após a pesquisa da literatura e triagem, foram incluídos 28 estudos para extração e avaliação de dados: 16 in vitro, oito em animais e quatro em humanos. Para atender ao objetivo 3 foi realizado um ensaio clínico randomizado, triplo-cego, controlado por placebo. O grupo óleo de peixe (GOP) recebeu duas cápsulas de óleo de peixe contendo 1,55 g de EPA + DHA por dia durante nove semanas, o grupo placebo (GP) recebeu placebo. Como resultado, após nove

semanas, embora não houvessem diferenças entre os grupos para a presença de eventos adversos, os pacientes do GP foram classificados com diarreia mais grave do que os pacientes do GOP ($p=0,03$) e com maior escore no *performance status* ($p = 0,02$). GP também teve mais hospitalizações devido a eventos adversos que o GOP ($p=0,048$). Não foram observadas diferenças na peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes entre os grupos. Como resultado referente ao objetivo 1, o tempo até a progressão tumoral foi significativamente maior no GS ($p=0,04$), outros resultados não diferiram entre os grupos. Os resultados obtidos na revisão sistemática foram que a maioria dos estudos *in vitro* e em animais mostrou um aumento na peroxidação lipídica e citotoxicidade do tratamento induzida por n-3. As alterações do estresse oxidativo causadas pelo tratamento concomitante podem exercer efeitos sobre a eficácia do tratamento convencional e isso parece acontecer na maioria das células e tumores testados, mas não em todos. O óleo de peixe pode levar a um melhor *performance status* em pacientes com câncer gastrointestinal submetidos a quimioterapia, enquanto não parece aumentar a toxicidade relacionada ao tratamento. A suplementação com 2 g/dia de óleo de peixe nas primeiras nove semanas de quimioterapia pode contribuir para um maior tempo até a progressão tumoral em pacientes com câncer colorretal.

Palavras-chave: Câncer. Óleo de peixe. Estresse oxidativo. Resposta ao tratamento.

ABSTRACT

CAMARGO, Carolina de Quadros. **Fish oil effects on oxidative stress, adverse events and response to treatment of gastrointestinal cancer patients undergoing chemotherapy: a randomized, triple-blind, placebo-controlled trial.** Florianópolis, 2017. Doctorate thesis (PhD in Nutrition) – Nutrition Graduation Program, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

According to in vivo and in vitro studies, due to its highly peroxidizable characteristics, n-3 fatty acids present in fish oil can potentially increase the sensitivity of tumor cells to conventional cancer treatments while healthy cells remain unaffected. This thesis had three specific aims: 1-To evaluate retrospectively clinical outcomes during and after chemotherapy of individuals with colorectal cancer supplemented with fish oil; 2-Systematically review studies that evaluated effects on oxidative stress parameters of co-treatment with anticancer agents and n-3 fatty acids. 3-Evaluate before and after fish oil intake parameters of oxidative stress, presence and grading of chemotherapy related adverse events, and parameters indicative of prognosis and response to treatment of patients with gastrointestinal cancer undergoing chemotherapy. Thirty individuals were randomized into: Supplemented Group (SG), who received 2 g/day of fish oil (0.6 g/day of EPA+DHA) for nine weeks or Control Group (CG), which received no intervention. The variables retrospectively evaluated were: number of cycles and days in chemotherapy; number of chemotherapy delays and discontinuations; number of hospitalizations during chemotherapy; tumor progression; CEA tumor marker values; days until death or progression; and survival in three years. In the systematic review, after literature search and screening, 28 studies were included for extraction and data evaluation: 16 in vitro, eight in animals and four in humans. A randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial was conducted to meet aim 3. Fish oil group (FOG) received two capsules of fish oil containing 1.55 g EPA+DHA a day for nine weeks, placebo group (PG) received a placebo. As a result, after nine weeks, although there were no differences between groups for presence of adverse events, PG patients presented more severe diarrhea than FOG patients ($p = 0.03$) and a

higher performance status ($p = 0.02$). PG also had more hospitalizations due to adverse events than FOG ($p = 0.048$). No differences were observed in lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes between groups. As a result of aim 1, time to tumor progression was significantly higher in SG ($p = 0.04$), other results did not differ between groups. Systematic review results showed that most in vitro and animal studies presented an increase in lipid peroxidation and in treatment cytotoxicity induced by n-3. Changes in oxidative stress caused by co-treatment may exert effects on the efficacy of conventional treatments, and this appears to occur in most but not all of cells and tumors tested. Fish oil may lead to a better performance status in gastrointestinal cancer patients undergoing chemotherapy, while it does not appear to increase treatment-related toxicity. Supplementation with 2 g/day of fish oil in the first nine weeks of chemotherapy may contribute to a longer time to tumor progression in patients with colorectal cancer.

Key-words: Cancer. Fish oil. Oxidative stress. Response to treatment.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos em humanos com suplementação de AGPI n-3, resposta ao tratamento e avaliação de reações adversas.....	71
Quadro 2 - Avaliação dos eventos adversos relacionados com o trato gastrointestinal.....	85
Quadro 3 - Avaliação dos eventos adversos hematológicos.....	87
Quadro 4 - Escala ECOG de <i>Performance Status</i>	89
Quadro 5 - Variáveis, seus indicadores e classificações utilizadas para o modelo de análise.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Informação nutricional das cápsulas de óleo de peixe e de azeite de oliva.....	83
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGPI Ácidos Graxos Poli-insaturados
AVD Atividades da Vida Diária
ALA Ácido Alfa-Linolênico
BHT Butylated hydroxytoluene (Hidroxitolueno Butilado)
CAT Catalase
CA-125 Antígeno associado ao câncer 125
CB Circunferência do Braço
CEA *Carcinoembryonic antigen* (Antígeno carcinoembriogênico)
CEPON Centro de Pesquisas Oncológicas de Florianópolis
CMB Circunferência Muscular do Braço
CTCAE *Common Terminology Criteria for Adverse Events* v 4.0
DCT Dobra Cutânea Tricipital
ECOG PS *Eastern Cooperative Oncology Group Scale of Performance Status* (Escala de *Performance Status* do *Eastern Cooperative Oncology Group*)
DHA *Docosaexaenoic acid* (ácido docosahexaenóico)
EPA *Eicosapentaenoic acid* (ácido eicosapentaenóico)
EROS Espécies Reativas de Oxigênio
GOP Grupo Óleo de Peixe
GP Grupo Placebo
GPx Glutathione Peroxidase
GSH Glutathione Reduzida
HPLC *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IMC Índice de Massa Corporal
INCA Instituto Nacional do Câncer
LA Ácido Linoléico
LIDoC Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas
MDA Malondialdeído
n-3 Ômega 3
RECIST *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos)
SOD Superóxido Dismutase
WHO *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)
4-HNE 4-hidroxi-2-nonenal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA.....	25
1.2 RELEVÂNCIA, ORIGINALIDADE E CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO.....	27
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	31
3.1 CÂNCER GASTROINTESTINAL.....	31
3.1.1 Câncer colorretal.....	31
3.1.1.1 <i>Incidência, fatores de risco, triagem e diagnóstico...</i>	31
3.1.1.2 <i>Tratamento e prognóstico.....</i>	33
3.1.2 Câncer gástrico.....	34
3.1.2.1 <i>Incidência, fatores de risco e triagem.....</i>	34
3.1.2.2 <i>Diagnóstico, tratamento e prognóstico.....</i>	35
3.2 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO NO CÂNCER GASTROINTESTINAL.....	36
3.3 FATORES DE PROGNÓSTICO E RESPOSTA AO TRATAMENTO PARA CÂNCER GASTROINTESTINAL.....	41
3.4 REAÇÕES ADVERSAS RELACIONADAS AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO.....	44
3.5 RELAÇÃO ENTRE TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO NO CÂNCER GASTROINTESTINAL E ÓLEO DE PEIXE.....	48
3.6 ÓLEO DE PEIXE.....	49
3.6.1 Caracterização dos ácidos graxos poli-insaturados.....	49
3.6.2 Incorporação dos ácidos graxos na membrana das células.....	51
3.7 ÓLEO DE PEIXE E ESTRESSE OXIDATIVO.....	52
3.8 ÓLEO DE PEIXE E APOPTOSE CELULAR.....	56
3.9 ÓLEO DE PEIXE E RESPOSTA AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO.....	59
3.10 ÓLEO DE PEIXE E A SENSIBILIZAÇÃO SELETIVA DE CÉLULAS AOS QUIMIOTERÁPICOS.....	63
3.11 ESTUDOS COM SUPLEMENTAÇÃO DE AGPI N-3, RESPOSTA AO TRATAMENTO E REAÇÕES ADVERSAS A QUIMIOTERAPIA EM HUMANOS.....	68

4 MÉTODO	73
4.1 MÉTODOS REFERENTES AO OBJETIVO 1.....	73
4.1.1 Tipo de estudo.....	73
4.1.2 Participantes do estudo.....	73
4.1.3 Delineamento do estudo.....	73
4.1.4 Suplemento dietético de óleo de peixe.....	75
4.1.5 Desfechos Clínicos estudados.....	75
4.1.6 Análise estatística.....	76
4.2 MÉTODOS REFERENTES AO OBJETIVO 2.....	77
4.2.1 Tipo de estudo.....	77
4.2.2 Delineamento do estudo.....	77
4.2.2.1 Estratégia de pesquisa.....	78
4.2.2.2 Critérios de inclusão.....	78
4.2.2.3 Extração de dados.....	79
4.3 MÉTODOS REFERENTES AO OBJETIVO 3.....	79
4.3.1 Tipo de estudo.....	79
4.3.2 Delineamento do estudo.....	80
4.3.3 Amostra do estudo.....	80
4.3.4 Grupos do estudo.....	81
4.3.5 Caracterização da intervenção e do placebo.....	82
4.3.6 Coleta de dados.....	83
4.3.6.1 Dados pessoais e clínicos.....	83
4.3.6.2 Hábito tabágico.....	83
4.3.6.2 Avaliação de presença e graduação de eventos adversos.....	84
4.3.6.3 Avaliação do Performance Status.....	88
4.3.6.4 Coleta de amostra sanguínea.....	89
4.3.6.5 Marcadores Tumorais CEA e CA 19.9.....	94
4.3.6.6 Análise de Sobrevida.....	94
4.3.6.7 Resposta ao Tratamento.....	94
4.3.7 Tratamento e análise dos dados.....	94
4.3.7.1 Variáveis do estudo.....	95
4.3.8 Procedimentos éticos da pesquisa.....	97
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
5.1 ARTIGO 1.....	100
5.2 ARTIGO 2.....	115
5.3 ARTIGO 3.....	142

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	177
6.1 LIMITAÇÕES E PONTOS FORTES.....	177
6.2 CONCLUSÕES DO ESTUDO.....	178
6.3 RECOMENDAÇÕES.....	179
REFERÊNCIAS.....	181
APÊNDICE A - FICHA DE COLETA DE DADOS.....	195
APÊNDICE B – NOTA DE IMPRENSA.....	199
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	203
ANEXO B – DOCUMENTO APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	207

1 INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

Cânceres gastrointestinais representados pelos tumores no esôfago, estômago, cólon ou reto estão entre os cânceres mais incidentes no mundo (GRIFFIN-SOBEL, 2017). O tratamento convencional para esses tipos de câncer consiste em cirurgia, quimioterapia e radioterapia (TANIGUCHI et al., 2016). Porém, atualmente esses tratamentos resultam em leve aumento da sobrevivência, especialmente quando se trata de doença avançada (GOEL & SUN, 2015).

O tratamento quimioterápico age em diversos tecidos do organismo, sejam eles neoplásicos ou não. Dessa maneira, a quimioterapia pode acarretar diversas lesões a tecidos saudáveis, conhecidas como reações adversas ao tratamento. Essas reações adversas costumam diferir em presença e intensidade entre os fármacos disponíveis, sendo que cada fármaco possui uma reação adversa limitante da dose. Ou seja, a administração é controlada pelo aparecimento e gravidade das reações e normalmente é realizada em ciclos para permitir a recuperação do tecido saudável (BRASIL, 2002a).

Porém, quando os tecidos saudáveis são lesados em maior intensidade ou não conseguem se recuperar efetivamente entre os ciclos, o tratamento quimioterápico pode ter sua dose reduzida, adiado ou até mesmo interrompido. Isso resulta em diminuição da efetividade desse tratamento (BRASIL, 2002a).

Os quimioterápicos apresentam diversos mecanismos de ação e são divididos em grupos conforme as similaridades dos mecanismos principais. A geração direta ou indireta de espécies reativas de oxigênio nas células têm sido identificada como um dos mecanismos pelos quais determinados quimioterápicos atuam para induzir a morte celular (MERENDINO et al., 2013). Dentre eles, estão a maioria dos fármacos utilizados na quimioterapia dos cânceres gastrointestinais (BLOCK et al., 2007).

O aumento do estresse oxidativo nas células, caracterizado por aumento nas concentrações de espécies reativas de oxigênio, favorece a formação de compostos nocivos derivados de um processo denominado

peroxidação lipídica (LIU; WANG, 2008, CAI; DUPERTUIS; PICHARD, 2012).

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI n-3), presentes no óleo de peixe, quando ingeridos são incorporados às membranas das células, sejam elas neoplásicas ou não. Esses ácidos graxos, por possuírem elevado número de insaturações, quando comparados com aqueles normalmente presentes na membrana celular de indivíduos que consomem uma dieta com alto teor de ácidos graxos ômega-6 (característica das dietas ocidentais), são altamente peroxidáveis. Portanto, são mais suscetíveis aos ataques de espécies reativas de oxigênio e ao desencadeamento da peroxidação lipídica (HAJJAJI; BOUGNOUX, 2013).

É demonstrado que células tumorais expostas ou tumores de animais suplementados com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 apresentam maior produção de derivados da peroxidação lipídica e, como consequência, maior morte celular ou regressão no tamanho de tumores (MUND et al., 2007; CAI et al., 2013). Sendo a apoptose a principal forma de morte celular induzida pela incorporação de ômega-3 na membrana das células (MERENDINO et al., 2013, KANG et al., 2010).

Quando a suplementação de AGPI n-3 ocorre combinado a quimioterapia parece ter efeitos sinérgicos ou até mesmo aditivos, favorecendo a morte de células tumorais dependendo da linhagem celular estudada (VIBET et al., 2008; HARDMAN, MUNOZ & CAMERON, 2002).

Por outro lado, ao mesmo tempo que demonstram amplificar os efeitos da quimioterapia, os ácidos graxos ômega-3 parecem ter efeito seletivo. A “sensibilização seletiva”, termo que foi atribuído a esses efeitos diferentes em variadas linhagens celulares, demonstrada pelos ácidos graxos ômega-3 sugere que eles não aumentam a sensibilidade de células saudáveis ao tratamento quimioterápico. Essa diferença parece estar ligada à capacidade de resposta ao estresse oxidativo, que costuma diferir em tecidos neoplásicos e não-neoplásicos, sugerindo que o segundo possua resposta mais consistente e efetiva. Porém, mecanismos que possam explicar essa “sensibilização seletiva” não estão consolidados (HAJJAJI; BOUGNOUX, 2013).

Ressalta-se que se esses efeitos descritos para os ácidos graxos ômega-3 forem comprovados em seres humanos, pode significar melhor resposta ao tratamento quimioterápico, devido ao aumento da atuação dos fármacos em células neoplásicas, sem que ocorra maior presença de reações adversas. Além disso, a elucidação dos mecanismos envolvidos na “sensibilização seletiva” se torna necessária para o melhor entendimento das ações desse suplemento em células saudáveis, de modo a garantir que sejam favoráveis.

Considerando o exposto, justifica-se a realização do presente estudo, o qual tem como pergunta de partida: Quais são os efeitos da ingestão de óleo de peixe no estresse oxidativo, resposta ao tratamento e nos eventos adversos à quimioterapia de indivíduos com câncer gastrointestinal?

1.2 RELEVÂNCIA, ORIGINALIDADE E CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO

O tratamento quimioterápico, por possuir ação sistêmica e inespecífica, exerce efeitos tanto em tecidos tumorais como em tecidos não tumorais. Esses efeitos nos tecidos não tumorais levam a eventos adversos relacionados com o tratamento, que podem diminuir a qualidade de vida do paciente submetido à quimioterapia. Adicionalmente, podem comprometer a eficácia do tratamento, levando à redução de doses e a possível interrupção do protocolo.

A busca por alternativas que visem aumentar os efeitos dos quimioterápicos em tecidos tumorais, mas que não aumentem esses efeitos em tecidos não tumorais, se torna interessante para aumentar a eficácia do procedimento, sem interferências no bem-estar do paciente.

Os ácidos graxos ômega-3, encontrados no óleo de peixe, têm demonstrado ações *in vitro*, *in vivo* e em alguns estudos em seres humanos que possibilitariam esses resultados, justificando a relevância de aprofundamentos no tema. A possível comprovação de ação benéfica da suplementação com óleo de peixe em desfechos clínicos de pacientes com câncer em quimioterapia, refletiria em ganho direto para esses indivíduos.

Ao desenvolver este estudo, buscou-se fornecer duas contribuições, tanto para o conhecimento teórico quanto para o prático.

A primeira baseia-se no mecanismo pelo qual os ácidos graxos ômega-3 exercem seus efeitos quando combinado a quimioterápicos nas células tumorais e não tumorais. Acredita-se que um dos mecanismos envolvidos esteja ligado com o estresse oxidativo, tanto a maior sensibilização das células tumorais aos quimioterápicos por ômega-3, aumentando conseqüentemente sua resposta ao tratamento, como a não sensibilização das células saudáveis, o que não aumentaria os efeitos nocivos do tratamento. Neste estudo, propôs-se avaliar variáveis do estresse oxidativo de células saudáveis, com o objetivo de agregar informações sobre as influências desse ácido graxo combinado a quimioterapia nessas células, como um caminho para a consolidação de mecanismos.

Como segunda contribuição, mais voltada para prática, pretendeu-se realizar um ensaio clínico randomizado, triplo cego, controlado por placebo, sobre os efeitos do óleo de peixe em pacientes com câncer gastrointestinal em quimioterapia na resposta ao tratamento e na gravidade de eventos adversos à quimioterapia. A condução deste estudo, permitiria a “tradução” para a clínica dos efeitos demonstrados em células e tecidos. Ou seja, se o óleo de peixe aumenta a sensibilidade de células tumorais à quimioterapia, isso poderia resultar em maior resposta ao tratamento e possível maior sobrevida dos pacientes. Da mesma maneira, se o óleo de peixe não aumenta a sensibilidade à quimioterapia de células saudáveis, não haveria maior incidência e gravidade de eventos adversos a esse tratamento.

Assim, os resultados desse estudo têm o potencial de guiar uma nova conduta nutricional durante o tratamento quimioterápico.

O desenvolvimento de um ensaio clínico randomizado, triplo cego, controlado por placebo caracteriza não somente uma contribuição prática, mas também a originalidade desta tese. Esse tipo de delineamento é considerado padrão ouro para se avaliar uma intervenção. Porém, até o momento, não foram encontrados estudos com esse delineamento que tratam da suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 em indivíduos submetidos à quimioterapia e seus efeitos em desfechos clínicos relacionados com a eficácia do tratamento (resposta ao tratamento e reações adversas dos quimioterápicos).

Os objetivos desse estudo, bem como o caminho teórico percorrido para justificá-lo serão apresentados a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do óleo de peixe em pacientes com câncer gastrointestinal submetidos a tratamento quimioterápico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 – Avaliar retrospectivamente desfechos clínicos durante e após a quimioterapia em indivíduos com câncer colorretal que receberam 2 g/dia de óleo de peixe nas primeiras nove semanas de tratamento.

2 – Revisar sistematicamente estudos que avaliaram efeitos em parâmetros do estresse oxidativo do tratamento concomitante com agentes anticâncer e ácidos graxos poli-insaturados ômega-3.

3 – Avaliar antes e após a ingestão de óleo de peixe em pacientes com câncer gastrointestinal:

- Parâmetros de estresse oxidativo em eritrócitos, leucócitos e no plasma;

- Presença e graduação de eventos adversos à quimioterapia;

- Parâmetros indicativos de prognóstico e de resposta ao tratamento.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CÂNCER GASTROINTESTINAL

Cânceres gastrointestinais são considerados os cânceres de esôfago, estômago, cólon e reto e estão entre os cânceres mais incidentes no mundo (GRIFFIN-SOBEL, 2017). O câncer colorretal é o tipo mais comum de câncer gastrointestinal. Tem causas multifatoriais, incluindo genética, exposição ambiental, dieta e condições inflamatórias do trato digestivo (NAHAS; NAHAS, 2015).

3.1.1 Câncer colorretal

3.1.1.1 Incidência, fatores de risco, triagem e diagnóstico

O câncer colorretal (CCR) é definido como um carcinoma, usualmente adenocarcinoma, no cólon ou reto. O termo “câncer colorretal” pode sugerir que seja uma doença homogênea, mas esse não é o caso (STEWART; WILD, 2014). Está associado a uma variedade de mutações genéticas heterogêneas, essa heterogeneidade faz com que tumores em um mesmo estágio que são histologicamente indistinguíveis tenham comportamentos diferentes em termos de recorrência e resposta a quimioterapia (AHN; GOLDBERG, 2016; STEWART; WILD, 2014).

Essa neoplasia representa cerca de 10% da incidência global de câncer e é a quarta causa de morte por câncer no mundo. Mais de 65% dos casos ocorrem em países com altos níveis de desenvolvimento humano (STEWART; WILD, 2014). No Brasil, as estimativas para 2016 foram de 16.660 novos casos de câncer de cólon e reto em homens e de 17.620 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,84 casos novos a cada 100 mil homens e 17,10 a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2016).

Dentre os fatores de risco estabelecidos para câncer colorretal estão composição da dieta, obesidade e falta de atividade física. Contudo, os processos biológicos envolvidos ainda não estão completamente definidos (STEWART; WILD, 2014).

Os fatores dietéticos associados a maior risco de câncer colorretal são: alto consumo de carne vermelha e carne processada

GRIFFIN-SOBEL, 2017). Nesse sentido, dietas ricas em gordura, especialmente gordura animal, favorecem o desenvolvimento de uma flora intestinal capaz de transformar os sais de bile em compostos nitrosos potencialmente carcinogênicos. Já, as aminas heterocíclicas e hidrocarbonos aromáticos que podem ser formados durante o cozimento de carne em altas temperaturas também parecem ter propriedades carcinogênicas (SHIVANNA; UROOJ, 2016). Alimentos com alto teor de fibras, especialmente vegetais crucíferos, são associados com um menor risco de câncer colorretal e gástrico (GRIFFIN-SOBEL, 2017). A ingestão de fibras aumenta a velocidade do trânsito intestinal e reduz a absorção de carcinogênicos pela mucosa do cólon. Além disso, as fibras também sofrem fermentação no intestino e agem como prébióticos para produzir ácidos graxos de cadeia curta como butirato, que podem proteger contra o câncer devido à habilidade de promover diferenciação, induzir apoptose e/ou reduzir o pH luminal (SHIVANNA; UROOJ, 2016). O excesso de ingestão de álcool está relacionado a maior risco de diversos tipos de câncer, incluindo CCR (GRIFFIN-SOBEL, 2017).

Dentre os fatores de risco não dietéticos estão: história pessoal ou familiar de pólipos colorretais, doença inflamatória intestinal, condições hereditárias, idade, etnia, inatividade física (SHIVANNA; UROOJ, 2016). Manter um peso saudável pode ser uma das medidas mais benéficas para a prevenção de câncer, sendo que a obesidade abdominal é fator de risco mais importante que a obesidade total em ambos homens e mulheres. O fumo, passivo ou não, representa um risco elevado para aparecimento de adenomas e CCR (GRIFFIN-SOBEL, 2017; SHIVANNA; UROOJ, 2016).

A triagem para câncer colorretal pode ser feita através do teste de sangue oculto nas fezes (anualmente), sigmoidoscopia (a cada 5 anos) e colonoscopia (a cada 10 anos). Essas medidas permitem a identificação precoce de pólipos pré-malignos e câncer colorretal nos estádios iniciais e curáveis. O diagnóstico nos estádios I a III possibilita que mais pacientes sejam submetidos a tratamentos com intenções curativas. Entretanto, uma grande parcela dos pacientes são diagnosticados com doença metastática (AHN; GOLDBERG, 2016; GRIFFIN-SOBEL, 2017; STEWART; WILD, 2014)

O diagnóstico de câncer colorretal é feito com auxílio de alguns exames: hemograma, função hepática, marcadores tumorais (CEA e CA

19.9), colonoscopia, biópsia e tomografia computadorizada. No material da biópsia alguns testes adicionais podem ser realizados para melhor classificar o câncer: testes genéticos, especialmente alterações nos genes KRAS, NRAS e BRAF e alterações nos genes MMR. O teste de mutação no KRAS é o principal realizado no câncer colorretal avançado (STEWART; WILD, 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

O estadiamento é baseado na classificação TNM, que leva em consideração a extensão do tumor, a presença em linfonodos e a presença de metástases (no caso desse tipo de câncer, geralmente no fígado e pulmões). Assim que as categorias T, N e M são determinadas, normalmente após a cirurgia, designa-se um estágio. Esse pode ir do 0 (carcinoma in situ) até o estágio IV, sendo que alguns estágios possuem sub-estádios representados com as letras A, B e C. A definição do estágio fornece informações sobre o prognóstico e qual o melhor tratamento a ser administrado (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

3.1.1.2 Tratamento e prognóstico

O tratamento do câncer colorretal depende do tipo de câncer e estágio da doença. Podem ser utilizados tratamentos locais como cirurgia, radioterapia e embolização, geralmente em estágios precoces, e tratamentos sistêmicos que incluem quimioterapia e imunoterapia. Abordagens diferentes de tratamento podem ser combinadas em busca de maior efetividade (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

A quimioterapia, administrada em ciclos, pode ser usada em diferentes momentos no tratamento do câncer colorretal. A quimioterapia adjuvante é aquela administrada após a cirurgia e tem o objetivo de matar células que possam ter ficado após o procedimento diminuindo as chances de recorrência. A quimioterapia neoadjuvante, normalmente utilizada no câncer retal, é indicada para alguns tipos de câncer e é administrada antes da cirurgia visando diminuir o tamanho do tumor e facilitar o procedimento. Para cânceres avançados, a quimioterapia ajuda a diminuir o tumor, aliviar os sintomas e aumentar a sobrevida. Os fármacos mais comuns nesse tipo de câncer são: 5-Fluorouracil (5-FU), fornecido com leucovorin (ácido folínico); capecitabina, pílula que é convertida em 5-FU no local do tumor;

irinotecano e oxaliplatina. Com frequência fármacos são combinados (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017) sendo que a terapia de preferência para carcinoma colorretal metastático costuma ser 5-FU em conjunto com leucovorin (KÖHNE et al., 2005).

A sobrevida média em 5 anos para câncer colorretal é 65%, podendo variar de 92% para cânceres em estágio I até 11% para cânceres colorretal em estágio IV ou metastático (GRIFFIN-SOBEL, 2017).

3.1.2 Câncer gástrico

3.1.2.1 Incidência, fatores de risco e triagem

A maior parte dos cânceres gástricos são carcinomas gástricos, neoplasias epiteliais malignas. Tumores não-epiteliais do estômago incluem predominantemente linfomas e tumores mesenquimais. Carcinomas gástricos representam um grupo de tumores biologicamente e geneticamente heterogêneos com etiologias multifatoriais, tanto ambientais como genéticas. São caracterizados por heterogeneidade morfológica com diferentes padrões de crescimento, diferenciação celular, histogênese e patogénia molecular. A maior parte dos casos são isolados e aqueles com histórico familiar são aproximadamente 10%. É o quinto tipo de câncer mais incidente no mundo, com aproximadamente $\frac{3}{4}$ dos casos ocorrendo na Ásia. A incidência nos homens é aproximadamente o dobro daquela observada nas mulheres (STEWART; WILD, 2014).

No Brasil, estimou-se 12.920 casos novos de câncer de estômago em homens e 7.600 em mulheres no ano de 2016. Esses valores correspondem a um risco estimado de 13,04 casos novos a cada 100 mil homens e 7,37 a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2016). Quando a triagem para esse tipo de câncer é feita consiste de endoscopia para pessoas com idade acima de 40 anos a cada 2 anos. Normalmente é curável nos estádios iniciais, mas por conta da incidência não tão elevada na maioria dos países, a triagem costuma ser improdutiva por conta dos custos e pouco realizada (GRIFFIN-SOBEL, 2017).

O risco é maior em populações com baixo nível socioeconômico e aquelas com infecções por *Helicobacter pylori*. Fatores de risco

dietéticos associados com câncer gástrico são: alimentos em salmoura, carne defumada, excesso de consumo de pimenta, consumo de alimentos em alta temperatura e álcool em excesso (GRIFFIN-SOBEL, 2017; SHIVANNA; UROOJ, 2016; STEWART; WILD, 2014).

Fatores não dietéticos incluem: infecção com *H. pylori*, sendo a bactéria classificada como carcinogênica para humanos pelo IARC (International Agency for Research on Cancer). A localização mais comum para a infecção é o antro gástrico e o risco aumenta de 3 a 6 vezes na presença de infecção por *H. pylori* (SHIVANNA; UROOJ, 2016).

As duas maiores mudanças de base populacional que podem ser feitas para reduzir a incidência de câncer gástrico são orientações para melhora da dieta e redução da prevalência de *H. pylori* (STEWART; WILD, 2014).

3.1.2.2 Diagnóstico, tratamento e prognóstico

O teste com pepsinogênio sérico tem sido avaliado com uma ferramenta de triagem para detectar paciente em risco alto e detectar cânceres em estádios iniciais. Convencionalmente, para o diagnóstico, a endoscopia é utilizada por ser um teste específico e sensível. A tomografia computadorizada é usada para detectar metástases no fígado e linfonodos. Para realizar o estadiamento o sistema de classificação TNM é utilizado e fornece os seguintes estádios: 0, IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC e IV (STEWART; WILD, 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017a).

A ressecção completa do adenocarcinoma gástrico permanece sendo a única terapia curativa para esse tipo de câncer, embora aproximadamente 2/3 dos pacientes tenham doença avançada ou metastática no momento do diagnóstico e muitas vezes não possam ser submetidos a cirurgia. Por outro lado, tumores recorrentes são observados em mais da metade de pacientes tratados com intenção curativa usando técnicas cirúrgicas padronizadas (VANHOEFER et al., 2000). As quimioterapias neoadjuvante e adjuvante melhoram os resultados da cirurgia e adjuvante com frequência é administrada em conjunto com a radioterapia, principalmente quando o câncer não foi completamente removido com cirurgia. Nos cânceres avançados, a

quimioterapia é administrada como tratamento principal, ajuda a reduzir o tumor ou diminuir o crescimento, alivia os sintomas e aumenta a sobrevida. Os benefícios dos tratamentos atuais, entretanto, são limitados e existe a necessidade de protocolos mais eficazes e com melhor tolerância (LUTZ et al., 2007; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017a).

A quimioterapia baseada em fluorouracil pode aumentar a sobrevida e qualidade de vida de pacientes com câncer gástrico avançado. E, assim como no caso do câncer colorretal, a atividade do 5-FU pode ser aprimorada com o acréscimo de ácido folínico. O protocolo utilizando etoposídeo, ácido folínico e 5-FU parece ser menos tóxico que outros protocolos quimioterápicos com comparável atividade antitumoral para pacientes com câncer gástrico avançado. Protocolos contendo cisplatina demonstraram eficácia antitumoral em câncer gástrico avançado, porém foram associados com toxicidades significativas (LUTZ et al., 2007; VANHOEFER et al., 2000). Os fármacos mais comuns em cânceres gástricos são: 5-FU (fluorouracil), administrado com Leucovorin (ácido folínico), Capecitabina, Carboplatina, Cisplatina, Epirrubicina, Oxaliplatina e Paclitaxel. Podem ser usados isoladamente, combinados entre si ou em conjunto com a radioterapia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017A).

O prognóstico é ruim para a maioria dos pacientes e poucas melhoras nos desfechos são alcançados com o tratamento quimioterápico. A sobrevida média em 5 anos de pacientes com câncer gástrico em tratamento é de 29%, podendo variar de 71% em estádios iniciais até 4% em pacientes com doença avançada (GRIFFIN-SOBEL, 2017; OHTSU et al., 2011).

3.2 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO NO CÂNCER GASTROINTESTINAL

O tratamento quimioterápico é caracterizado pela aplicação de fármacos isolados ou combinados que tem como objetivo principal a morte de células neoplásicas, embora, como são na sua maioria sistêmicos e inespecíficos, atuam tanto em células malignas como nas saudáveis (BRASIL, 2002a).

Agem interferindo com funções celulares vitais indistintamente, sendo necessária a interrupção periódica do tratamento para a recuperação do paciente. Logo, o sucesso terapêutico do tratamento quimioterápico está na morte efetiva das células malignas, porém sem desencadear toxicidades inaceitáveis em tecidos saudáveis, ou seja, lesão de células saudáveis de maneira incontrolável tornando impossível a continuação do tratamento como planejado (BRASIL, 2002a).

Podem ser classificados em seis grandes grupos:

1. Complexos de platina
 - a. Cisplatina
 - b. Carboplatina
 - c. Oxaliplatina
2. Agentes antimicrotúbulos Ciclo-específicos, fase-específicos, agem na fase da mitose.
 - a. Alcalóides da Vinca (vimblastina, vinorelbina):
 - b. Taxanos (paclitaxel, docetaxel)
3. Antimetabólicos: Ciclo-específicos, fase-específicos, agem na fase de síntese.
 - a. Metotrexato
 - b. Fluoropirimidinas (por exemplo: 5-Fluorouracil, capecitabina)
 - c. Citosina Arabinose (por exemplo: citarabina)
 - d. Gencitabina
4. Antibióticos Antitumor: Ciclo-específicos, fase inespecíficos, agem em várias fases do ciclo celular.
 - a. Actinomicina D
 - b. Mitomicina C
 - c. Bleomicina
 - d. Antraciclinas (doxorrubicina, daunorrubicina)
 - e. Podofilotoxinas (etoposídeo, teniposídeo)
 - f. Camptotecinas (irinotecano, topotecano)
5. Agente Alquilantes: Ciclo-inespecíficos, agem em todas as fases do ciclo celular.
 - a. Ciclofosfamida
 - b. Mostardas nitrogenadas
 - c. Nitrosuréias (carmustina)
 - d. Sulfonatos Alcanos

6. Outros, incluem drogas que não se encaixam nessas categorias (anticorpos monoclonais, inibidores de sinais) (BOULIKAS, et al., 2007; BRASIL, 2002a).

Por atuarem através de mecanismos diferentes, opta-se por usar a combinação de quimioterápicos no tratamento, onde dois ou mais tipos de fármacos pertencentes a grupos diferentes são utilizados (BRASIL, 2002a). Busca-se, dessa forma, explorar a sinergia entre os fármacos e tornar o tratamento mais eficiente, com diferentes alvos sendo atingidos (BOULIKAS, et al., 2007). Da mesma maneira que são associados fármacos com diferentes alvos de ação, são escolhidos aqueles que gerem diferentes eventos adversos, de maneira que se possa aumentar o efeito antitumoral, sem tornar a toxicidade tão intensa que comprometeria o tratamento. Os quimioterápicos são comumente utilizados em ciclos de administração, com intervalos suficientemente longos entre os ciclos para que ocorra a recuperação das células saudáveis, mas não tão longos que permitam a recuperação tumoral entre os ciclos (BRASIL, 2002a).

No tópico anterior foi abordado de maneira geral o tratamento nos cânceres colorretal e gástrico. A seguir serão abordados de maneira mais específica os quimioterápicos usados nesses tipos de câncer junto com os seus mecanismos de ação, visto que foram indivíduos submetidos a esse tipo de tratamento o foco do presente trabalho.

O cuidado quimioterápico usualmente destinado a indivíduos com câncer colorretal e câncer gástrico no CEPON (local onde foi realizado a coleta de dados) consiste, principalmente, em diferentes combinações dos seguintes quimioterápicos: 5-FU, capecitabina, cisplatina, oxaliplatina e irinotecano.

5-fluorouracil é um medicamento antineoplásico que apresenta como princípio ativo a fluorouracil, agente antineoplásico análogo da pirimidina, que age como antimetabólico ao uracil. Existem duas ações bioquímicas que podem explicar a citotoxicidade do composto. A fluorouracil é convertida e incorporada ao RNA, inibindo o processamento e a função deste. Um segundo metabólito, o 5-FdUMP, liga-se à timidilato sintetase, inibindo a formação eventual de dTTP, um dos quatro precursores necessários para a síntese do DNA. Assim, o composto interfere com a síntese dos dois ácidos nucleicos, o que explica a sua citotoxicidade. A degradação catabólica do composto

ocorre em células normais, porém não em células cancerosas (FAUDFLUOR, 2017),

A capecitabina é derivada do carbamato de fluoropirimidina, um agente citotóxico tumor ativado e tumor seletivo, que foi planejado para administração oral. É sequencialmente convertida para a fração citotóxica 5-fluoruracil (5-FU), que, por sua vez, é posteriormente metabolizada. A formação de 5-FU ocorre preferencialmente no tumor por um fator angiogênico associado ao tumor, minimizando assim a exposição dos tecidos sadios do organismo a 5-FU sistêmica (XELODA, 2017).

O DNA é o principal alvo celular da cisplatina, os efeitos antitumorais dos complexos de platina como um todo, são resultados de sua habilidade em formar vários tipos de adutos com DNA (reações de deslocamento de seu ligante de cloro levando a atividades de ligações cruzadas com DNA, causando flexão do mesmo), assim bloqueando a replicação e transcrição e detendo a proliferação. Adutos de DNA afetam vias de transdução e levam a apoptose e necrose da célula tumoral. A resistência aos complexos de platina pode acontecer através de diversos mecanismos: diminuição da captação do fármaco, aumento do efluxo do mesmo, inativação pela glutatona, evasão da apoptose e aumento do reparo do DNA, sendo a diminuição da captação o mecanismo mais importante para resistência. Vale destacar que a cisplatina é uma molécula pleiotrópica e mecanismos adicionais são descritos continuamente (BOULIKAS, et al., 2007).

Assim como outros derivados da platina, a oxaliplatina atua sobre o DNA, formando ligações alquil que levam à formação de pontes inter e intrafilamentos, inibindo a síntese e posterior formação de novas moléculas nucleicas de DNA. A cinética de ligação da oxaliplatina com o DNA é rápida, ocorrendo no máximo em 15 minutos, enquanto que com a cisplatina essa ligação é bifásica, com uma fase tardia após 4 a 8 horas (OXALIPLATINA, 2017).

Irinotecano é um agente antineoplásico que tem como principal mecanismo de ação a interação com a enzima topoisomerase I, uma enzima importante no processo de multiplicação das células. O bloqueio desta enzima causa um erro no funcionamento das células tumorais, levando-as a morte (CAMPTOSAR, 2017).

Os agentes quimioterápicos podem possuir vários mecanismos de ação. Além dos citados anteriormente, espécies reativas de oxigênio têm sido propostas como mediador comum da apoptose, sendo considerado que grande parte dos quimioterápicos trabalham através da geração indireta ou direta de espécies reativas de oxigênio. A base desse mecanismo consiste de que o acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio causa o rompimento do potencial de membrana mitocondrial, liberação do citocromo c com conseqüente ativação da cascata caspase e, por fim, leva a morte das células por apoptose (MERENDINO et al., 2013).

Dessa maneira, busca-se a geração de um desequilíbrio no status de espécies reativas de oxigênio na célula através de vários mecanismos, incluindo: a geração direta de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelo próprio agente, depleção dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), inibição de proteínas antioxidantes (LAU; WANG; CHIU, 2008).

Fármacos com o mecanismo de radicais livres incluem, mas não somente, os agentes alquilantes, antraciclina (exemplo: epirrubina) (BLOCK et al., 2007; BOUGNOUX et al., 2010), derivados de podofilina, complexos de platina (cisplatina, oxaliplatina) (BLOCK et al., 2007; LAU; WANG; CHIU, 2008) e camptotecinas (irinotecano). Esses fármacos exacerbam o estresse oxidativo, como pode ser demonstrado pela oxidação do DNA e peroxidação lipídica durante e depois da terapia anticâncer.

Seguindo a mesma lógica de inespecificidade dos demais mecanismos de ação, as espécies reativas de oxigênio também são consideradas responsáveis pelos eventos adversos (BLOCK et al., 2007). Mas, a ideia é que as células cancerígenas são mais suscetíveis à apoptose induzida por estresse oxidativo que as células saudáveis (LAU; WANG; CHIU, 2008), considerando que a habilidade de gerar radicais livres não é somente dose dependente mas também dependente da localização e do metabolismo da droga em tecidos específicos (BLOCK et al., 2007).

Apesar disso, alguns fármacos não parecem ter seus efeitos anticâncer dependentes de mecanismos oxidativos. Acredita-se que drogas como paclitaxel geram menor intensidade de estresse oxidativo, sendo o dano causado por radicais livres de menor importância nos seus mecanismos de ação (BLOCK et al., 2007).

3.3 FATORES DE PROGNÓSTICO E RESPOSTA AO TRATAMENTO PARA CÂNCER GASTROINTESTINAL

A identificação de fatores prognósticos é válida no aconselhamento individual de pacientes, considerando que a capacidade de prever o prognóstico precisamente pode auxiliar a seleção do melhor tratamento disponível (GRUNNET; SORENSEN, 2012).

Dentre os fatores de prognóstico, o *performance status* é uma avaliação relativamente simples da capacidade física, funcional e da habilidade de cuidados pessoais do paciente, medindo o impacto dos sintomas tumorais, em companhia de outras comorbidades nas suas atividades diárias (BOUKOVINAS; KOSMIDIS, 2009). Existem duas escalas largamente utilizadas, a Karnofsky e a *Eastern Cooperative Oncology Group Scale of Performance Status* (ECOG PS), as quais devem ser levadas em consideração no planejamento e avaliação de ensaios clínicos de tratamentos para o câncer.

Nos últimos anos, diversos marcadores de resposta ao tratamento e de prognóstico foram identificados. Dentre eles, os marcadores tumorais podem ser uma ferramenta para prever o prognóstico, podendo identificar pacientes com maior risco de progressão rápida ou recidiva da doença quando comparados àqueles com mesma idade, sexo, estágio e outras características semelhantes, rastreando os que se beneficiariam de um tratamento mais agressivo que o convencional (GRUNNET; SORENSEN, 2012).

Existem algumas diferenças entre os marcadores, que podem ser: biomarcadores de prognóstico, fornecem informações referentes a desfechos clínicos independente do tratamento e biomarcadores preditivos, podem ser usados para indicar resposta ao tratamento e podem ser alvos de agentes terapêuticos. Por fim, alguns marcadores podem ser tanto preditivos como de prognóstico (TONG; HARPOLE, 2012).

Marcadores séricos tumorais podem ser usados como ferramentas não-invasivas para triagem do câncer, determinantes de prognóstico e como componente indicativo de resposta ao tratamento (DAYYANI; MORGENSTERN; HOLDENRIEDER, 2016).

Marcadores tumorais são há tempos utilizados na prática clínica de cânceres gastrointestinais, sendo mais consolidados nos cânceres colorretais. Os marcadores tumorais mais comuns utilizados no câncer colorretal são CEA e CA 19.9, utilizados mais em combinação do que isolados. Estabelece-se que não podem ser usados isoladamente para triar ou diagnosticar o câncer devido a baixa sensibilidade. A sensibilidade e especificidade do CEA para o diagnóstico de câncer colorretal é de 0,53 e 0,86, respectivamente. Para CA19.9 a sensibilidade é 0,47 e especificidade 0,92. Para CA 125 a sensibilidade é 0,20 e especificidade é de 0,99. Resultados similares foram encontrados para o câncer gástrico (ACHARYA et al., 2017). Por outro lado, esses marcadores são mais usados para monitorar pacientes já diagnosticados, fornecendo informações de como o tratamento está evoluindo e de recidivas (ACHARYA et al., 2017; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

O CEA é uma glicoproteína produzida em pequenas quantidades após o desenvolvimento fetal e está envolvida na adesão celular. É utilizada em câncer colorretal e para cânceres do esôfago e estômago com avaliação de recorrência como a principal indicação. Na avaliação de metástase tem uma habilidade de preditiva de 77% devido sua associação com a propagação do câncer e aumento tumoral. O CEA parece ser um melhor indicador considerando custo-benefício quando comparado a CA19.9 e CA125 em CCR e câncer gástrico. Por outro lado, poucos estudos avaliam o uso do CA 19.9 e CA 125 como preditores de recorrência ou metástases, logo o CEA pode ter aparentemente maiores benefícios por ser o mais extensivamente estudado (ACHARYA et al., 2017).

Ainda existe uma necessidade clínica para um melhor marcador tumoral no câncer colorretal, com melhores índices de sensibilidade e especificidade e que tenham habilidade de diagnóstico. Embora possam existir marcadores mais novos que ofereçam melhor uso no diagnóstico, podem ser também mais difíceis de quantificar e conseqüentemente mais caros (ACHARYA et al., 2017).

O papel dos marcadores tumorais em doenças avançadas é otimizar o cuidado com o paciente, por exemplo, adiando exames de imagem em pacientes com marcadores estáveis ou em redução ou adiantando exames de imagem em pacientes com aumento de

marcadores, levando a redução de custos e mudanças precoces nos protocolos de tratamento (DAYYANI; MORGENSTERN; HOLDENRIEDER, 2016).

Em contraste com CCR, ainda não há consenso do uso de marcadores tumorais no câncer gástrico. Eles são utilizados amplamente na prática clínica, com o CEA e o CA 19.9 como os mais frequentes e com o monitoramento de recorrência como a indicação mais comum. Embora o CEA seja considerado melhor que o CA 19.9 e o CA 125, os três possuem baixa acurácia de diagnóstico. Diferente do CCR, os três também possuem baixa capacidade de prever recorrência. A avaliação do uso desses marcadores na prática clínica no câncer gástrico deve ser feita e seus resultados interpretados com cautela. Devido à sensibilidade de 95% da endoscopia e sua capacidade para avaliação histológica, o valor pragmático dos marcadores tumorais tradicionais para câncer gástrico é restrito (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017a).

A resposta ao tratamento em ensaios clínicos é comumente determinada pela mudança da carga tumoral, importante na avaliação clínica da terapia do câncer. Tanto diminuição do tumor (resposta objetiva) como tempo para progressão da doença são importantes desfechos, visto que podem influenciar a sobrevida. São baseados em medições anatômicas do tamanho do tumor, que devem ser realizadas seguindo critérios amplamente aceitos e conhecidos.

O RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), publicado pela primeira vez em 2000 e revisado em 2009, é adotado por instituições acadêmicas, grupos cooperativos e indústria e define os critérios para determinar a resposta do tumor em ensaios onde o desfecho primário é a resposta objetiva ou progressão da doença. As classificações consistem em: resposta completa com desaparecimento de todas as lesões e redução de linfonodos patológicos (menores que 10 mm); resposta parcial, decréscimo de pelo menos 30% na soma dos diâmetros das lesões; doença em progressão, aumento de pelo menos 20% na soma dos diâmetros das lesões ou aparecimento de uma ou mais novas lesões; e doença estável, nem encolhimento suficiente para caracterizar resposta parcial nem aumento suficiente para caracterizar doença em progressão (EISENHAUER et al., 2009).

Por outro lado, a avaliação após a quimioterapia com RECIST tem suas limitações. A resposta a quimioterapia deve ser avaliada para

prontamente serem consideradas mudanças e possível redução de seu potencial tóxico. RECIST pode não levar em consideração respostas mistas de lesões múltiplas, por exemplo, aumento de algumas lesões e decréscimo em outras. Somado a isso, embora o estudo de imagens baseado no RECIST permanece sendo a ferramenta mais objetiva disponível para avaliar resposta a quimioterapia, nem todos os pacientes possuem doença mensurável, complicando a avaliação de respostas objetivas (ARRIETA et al., 2013).

Quando mensuráveis, as alterações macroscópicas da massa tumoral podem apenas serem detectadas por técnicas de imagem apenas após vários ciclos de quimioterapia. Considerando isso, os parâmetros bioquímicos são alternativas promissoras para estimativa precoce da eficácia terapêutica, possivelmente refletindo a resposta bioquímica do tumor durante a fase inicial do tratamento (HOLDENRIEDER et al., 2006).

3.4 REAÇÕES ADVERSAS RELACIONADAS AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Como visto anteriormente, a quimioterapia, mesmo tendo seus efeitos tanto em células neoplásicas quanto saudáveis, é possível pois os tecidos saudáveis costumam se recuperar mais rápido do que a maioria dos tumores, fato que é levado em consideração na definição do protocolo quimioterápico (número de ciclos, duração, dose). Cada quimioterápico causa reações adversas em tecidos diferentes e com intensidades diferentes. Quando essas reações são muito graves e intensas muitas vezes é necessária a diminuição da dose, adiamento da administração do próximo ciclo ou até mesmo parada total do tratamento, o que influencia na sua eficácia. Deste modo, as reações adversas devem ser previstas para cada protocolo, bem como identificadas e tratadas com rapidez (BRASIL, 2002a).

As reações adversas são comumente divididas em hematológicas, que engloba leucopenia, anemia, neutropenia, e não hematológicas, referentes àquelas que atingem os demais tecidos, podendo ser: gastrointestinais, pulmonares, cardíacas, hepáticas, neurológicas, renais, dermatológicas, disfunções reprodutivas, alterações metabólicas. Nas reações hematológicas o tempo transcorrido entre a

aplicação do agente quimioterápico e o aparecimento dos menores valores das contagens hematológicas é denominado de Nadir (RIUL; AGUILLAR, 1999) e este período é variável para cada droga. De modo geral, para a realização do novo ciclo essa contagem deve estar normalizada ou próxima do normal.

As reações adversas mais prevalentes dos principais fármacos utilizados no tratamento de cânceres gastrointestinais serão descritas a seguir.

Para 5-fluorouracil, as reações adversas mais comuns incluem as hematológicas representadas principalmente por diminuição dos leucócitos, das hemácias e das plaquetas. São comuns as gastrointestinais, que levam a perda de apetite, náusea, vômitos, inflamação das mucosas, diarreia e dermatológicas com queda de cabelo como a mais comum (FAUDFLUOR, 2017).

Para Capecitabina as reações adversas mais comuns são as hematológicas com neutropenia, leucopenia, trombocitopenia e anemia e gastrointestinais levando a anorexia, obstipação, dispepsia. No sistema nervoso pode ocorrer neuropatia periférica, parestesia, disgeusia, disestesia, dor de cabeça. Reações oculares que levam ao aumento do lacrimejamento; vasculares aumentando risco de trombose, hipertensão, edema dos membros inferiores; respiratórias causando disestesia faríngea, dor na garganta; dermatológicas como alopecia e distúrbio ungueal e músculo-esqueléticas como artralgia, mialgia e dores nas extremidades podem ocorrer (XELODA, 2017).

As reações adversas mais comuns para cisplatina são as hematológicas, sendo que a mielossupressão normalmente não é grave. O nadir das contagens de plaquetas e leucócitos ocorre entre os dias 18 e 23, mas os valores retornam ao normal no dia 39. Reações gastrointestinais levando a náusea, vômitos, anorexia, estomatite e mucosite estão associadas ao uso do medicamento. Nefrotoxicidade é a reação adversa mais grave da cisplatina. Este é o principal fator limitante da dose. Ocorre elevações na ureia, ácido úrico e creatinina séricos e um decréscimo no clearance da creatinina. Podem ocorrer também reações adversas cardíacas como distúrbios da função cardíaca e vascular, podendo incluir infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, microangiopatiatrombótica e arterite cerebral. A ototoxicidade que pode ocorrer com a administração da cisplatina manifesta-se por

zumbido e/ou perda de audição na faixa de alta frequência (4000-8000 Hz). As reações neurológicas podem ser neuropatia sensorial bilateral que se manifesta por parestesias, decréscimo na sensação de vibração, do sentido do tato e queda nos reflexos dos tendões profundos. Convulsões, amnésia, tremores, perda do paladar e hipotensão ortostática podem ocorrer. Além de outras como: distúrbios eletrolíticos, alterações na função hepática leves e temporárias (CISPLATINA, 2014).

Para a oxaliplatina podem ocorrer reações adversas hematológicas como anemia, neutropenia, distúrbio granulocitopênico, esplenomegalia, trombocitopenia; cardiovasculares como edema, taquicardia; dermatológicas com alopecia e síndrome mão-pé como as mais comuns; gastrointestinais representadas por dor abdominal, constipação, diarreia, anorexia, náusea, estomatite, vômito, hepáticas com fosfatase alcalina anormal, bilirrubina anormal, ALT/TGP anormal, AST/TGP anormal, aumento da função hepática; músculo-esqueléticas levando a dores nas costas; neurológicas podendo ocorrer disestesia faringolaríngea, neuropatia aguda ou persistente, neuropatias periféricas sensitivas agravadas pelo frio, parestesia e respiratórias, como tosse e dispnéia (OXALIPLATINA, 2017).

O Irinotecano possui como reações adversas mais comuns as hematológicas principalmente leucopenia, anemia, neutropenia; gastrointestinais levando a diarreia, náusea, vômitos, dor/cólicas abdominais, anorexia, estomatite; alterações metabólicas e nutricionais como perda de peso e desidratação; dermatológicas com alopecia como a mais comum e cardiovasculares aumentando a probabilidade de eventos tromboembólicos (CAMPTOSAR, 2017).

O estresse oxidativo induzido por fármacos quimioterápicos, ao interferir com células e tecidos normais, está implicado também como um mecanismo de geração de reações adversas em diversos tecidos e órgãos, incluindo fígado, rim, aparelho auditivo, sistemas cardíaco e nervoso (ARETI et al., 2014; DEAVALL et al., 2012).

No caso da neuropatia periférica, indicativa de neurotoxicidade, prejuízos estruturais e funcionais causados por agentes anticâncer aumentam a produção mitocondrial de radicais livres. Essa disfunção da mitocôndria induzida por quimioterápicos e o consequente aumento na geração de estresse oxidativo geram danos aos nervos periféricos. A neurodegeneração mediada por estresse oxidativo pode acontecer devido

a depleção de defesas antioxidantes, danos moleculares, ativação de canal de íons, desmielinização, neuro-inflamação, apoptose. Uma explicação para isso é o fato de que nervos de mamíferos são mais suscetíveis a estresse oxidativo pelo seu alto conteúdo de fosfolípidos, axoplasma rico em mitocôndrias e defesas antioxidantes celulares frágeis (ARETI et al., 2014).

No caso das nefrotoxicidades geradas por quimioterápicos, tem sido demonstrado que antioxidantes podem proteger contra essa reação em modelos experimentais (DEAVALL et al., 2012; BOULIKAS, 2007), apoiando o envolvimento do estresse oxidativo no seu desenvolvimento. Tanto geração de radicais livres como depleção de antioxidantes foram observados nos rins como resposta da administração de cisplatina (DEAVALL et al., 2012).

Igualmente, a geração de espécies reativas de oxigênio foi considerada uma das causas da ototoxicidade causada pela cisplatina (BOULIKAS, 2007).

Considerando o apresentado, existe uma busca contínua de agentes que promovam proteção contra as reações adversas geradas pelos quimioterápicos. Baseando-se no fato de que as reações atribuídas a cisplatina tem o estresse oxidativo induzido pelo fármaco em vários tecidos como um possível mecanismo, o estudo de Hassan et al., 2013 buscou investigar o papel protetor do extrato de proantocianidina de semente de uva ou de óleo de peixe na nefrotoxicidade, estresse oxidativo e danos ao DNA induzidos por cisplatina em ratos. A cisplatina causou um decréscimo no GSH e superóxido dismutase (SOD), enquanto níveis de malondialdeído (MDA), peróxido de hidrogênio e óxido nítrico estavam aumentados. Administração tanto do extrato como de óleo de peixe antes do tratamento com cisplatina amenizou as mudanças na maioria dos parâmetros, particularmente de estresse oxidativo, defesa antioxidante endógena e danos ao DNA. Além disso, reduziram significativamente altas concentrações de creatinina, ureia e ácido úrico no soro e aumentaram sua excreção na urina. Os autores concluíram que o uso do óleo de peixe pode ajudar a prevenir a nefrotoxicidade causada por cisplatina.

3.5 RELAÇÃO ENTRE TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO NO CÂNCER GASTROINTESTINAL E ÓLEO DE PEIXE

Como visto nos tópicos anteriores, o tratamento quimioterápico para o câncer acarreta, com frequência, reações adversas, muitas vezes graves, que podem levar a diminuição da dose e, conseqüentemente, da intensidade do tratamento, bem como causar atrasos ou até a descontinuação do mesmo. Além dessa possível perda de eficácia, as reações adversas podem levar ao maior sofrimento do paciente e diminuição da qualidade de vida. Dessa maneira, existe uma crescente demanda por agentes que possam reduzir seletivamente as reações adversas dos quimioterápicos em células normais sem que provoquem um efeito protetor nas células tumorais. Nesse sentido, alguns agentes farmacológicos, denominados citoprotetores, são utilizados na prática clínica com esse propósito, entre eles estão: amifostine, dexrazoxane, leucovorin e mesna (KINTZEL, 2007).

Após o diagnóstico de câncer os pacientes encontram-se, na sua maioria, motivados a buscar informações sobre a dieta e o uso de suplementos alimentares que possam auxiliar na terapia. Da mesma forma, os profissionais da saúde devem possuir informações baseadas em evidências para que possam aconselhar da melhor maneira possível, levando em consideração que nutrientes podem trabalhar combinados a fármacos ou contrapor a atividade de agentes antineoplásicos (D'INCALCI; STEWARD; GESCHER, 2007).

Nesse contexto, vitaminas e antioxidantes são os agentes dietéticos mais explorados em ensaios clínicos com o objetivo de investigar sua habilidade em modular a quimioterapia (D'INCALCI; STEWARD; GESCHER, 2007). Porém, o uso de antioxidantes acompanhado de quimioterapia e seu efeito na alteração da eficácia desse tratamento tem ocasionado contradições e levado a dois argumentos opostos para refutar ou apoiar o seu uso. Por um lado, os antioxidantes podem proteger as células cancerígenas contra o dano oxidativo induzido pelos quimioterápicos, eliminando as EROs, consideradas importantes para atividade de alguns fármacos, e diminuindo, assim, sua eficácia. Por outro lado, podem diminuir as reações adversas em células saudáveis bloqueando as espécies reativas de oxigênio, reduzindo as interrupções e reduções de doses durante o

protocolo quimioterápico, sendo, neste sentido, benéficos ao tratamento (BLOCK et al, 2007; D'INCALCI; STEWARD; GESCHER, 2007).

Devido ao grande número de estudos e a presença de contradições no seu uso, revisões sistemáticas foram realizadas avaliando os efeitos de antioxidantes na eficácia da quimioterapia e nas reações adversas ao tratamento. Embora nenhuma revisão tenha observado a redução da eficácia e tenham sido encontrados vários estudos que demonstraram reduções das reações adversas, ainda assim, foram constatadas limitações comuns em tais estudos, como a falta de poder estatístico e baixa qualidade (BLOCK et al, 2007; BLOCK et al., 2008; NAKAYAMA et al., 2011). Sendo assim, até o momento, não foi possível estabelecer diretrizes para o uso apropriado desses nutrientes no decorrer do tratamento quimioterápico (NAKAYAMA et al., 2011).

Ainda na perspectiva de mudanças dietéticas e do uso de suplementos para proporcionar uma ação mais seletiva dos quimioterápicos, estudos sugerem que os ácidos graxos ômega-3 podem ter papel no aumento da citotoxicidade às células malignas, atuando em sinergia com os quimioterápicos, enquanto exercem papel protetor nas células saudáveis, sem contrapor os meios de ação dos tratamentos convencionais (GLEISSMAN; JOHNSEN; KOGNER, 2010).

Nos próximos tópicos, abordaremos os prováveis mecanismos para essa ação seletiva dos ácidos graxos ômega-3, bem como estudos que apoiam esse efeito.

3.6 ÓLEO DE PEIXE

3.6.1 Caracterização dos ácidos graxos poli-insaturados

Ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) são cadeias de hidrocarbonos com duas ou mais ligações duplas situadas ao longo da cadeia de carbono. Dependendo da localização da primeira dupla ligação relativa a terminação metil, os ácidos graxos poli-insaturados podem ser classificados em ômega 6 (n-6) ou ômega 3 (n-3). O ácido linoléico (LA, 18:2, n-6), é um ácido graxo essencial da família ômega 6 e não pode ser sintetizado endogenamente, é encontrado em óleos vegetais, sementes e nozes. O ácido alfa-linolênico (ALA, 18:3, n-3) é um ácido graxo da família ômega 3 e também deve ser consumido através da

dieta, é encontrado em nozes, linhaça e óleos vegetais. Ambos, LA e ALA, podem ser metabolizados futuramente em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, através de uma série de reações. LA é metabolizado em ácido araquidônico (AA, 20:4, n-6) enquanto ALA pode ser metabolizado em ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5, n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6, n-3) (ANDERSON; MA, 2009).

Embora ALA possa ser convertido em EPA e DHA endogenamente, isso não significa que não há necessidade de suprimento exógeno desses ácidos graxos pela dieta. Isso se deve ao fato que as vias biossintéticas das famílias ômega 3 e ômega 6 compartilham uma mesma enzima, vital para a conversão de ALA em DHA e EPA. Essa enzima tem preferência por ALA, porém a presença de grandes quantidades de LA (devido a alta ingestão) o torna preferencial, ocasionando inibição da conversão de ALA. Além disso, suspeita-se que essa conversão não é eficiente (RUXTON et al., 2007), a conversão de ALA para DHA é em torno de 1% em crianças e consideravelmente menor em adultos (ANDERSON; MA, 2009), existindo uma maior conversão de ALA para ácidos graxos ômega 3 de cadeia longa em mulheres do que em homens (DECSI; KENNEDY, 2011).

Estudo de Welch et al. (2010) indicou que existe a possibilidade de uma maior conversão de ALA em EPA e DHA em pessoas que não consomem peixes. O AA pode ser obtido de fontes de gorduras animais e EPA e DHA podem ser consumidos diretamente de fontes marinhas (ANDERSON; MA, 2009). Peixes contêm altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ômega 3, EPA e DHA (JOHANSSON et al., 2010). Entre os peixes, os de origem marinha, como sardinha, salmão, arenque e truta, geralmente apresentam quantidades maiores de EPA que os peixes provenientes de água doce. A expressiva quantidade de ácidos graxos ômega 3 no fitoplâncton garante sua distribuição ao longo da cadeia alimentar marinha (GOMES; OLIVEIRA, 2010).

De acordo com o Institute of Medicine (2005), a ingestão adequada de ácido linoléico para homens de 19 a 50 anos é de 17 g/dia e 14 g/dia para homens de 51 a 70 anos, para as mulheres a ingestão adequada é 12 e 11 g/dia respectivamente. Com relação ao ácido alfa-linolênico, a ingestão adequada é de 1,6 g/dia para homens e 1,1 g/dia para as mulheres. A razão entre ácido linoléico e ácido alfa-linolênico é

importante visto que esses ácidos graxos competem pelas mesmas enzimas para serem metabolizados, uma razão de 5:1 a 10:1 é recomendada para adultos (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005). Em dietas ocidentais, a relação atinge de 10 a 25:1, causando um desequilíbrio desses ácidos graxos no organismo (PERINI et al., 2010).

3.6.2 Incorporação dos ácidos graxos na membrana das células

Ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 e ômega 6 não competem somente pelas mesmas enzimas metabólicas, mas também pela incorporação nas membranas celulares, nas quais influenciam a fluidez e funções dos constituintes da mesma, incluindo receptores e enzimas. Devido ao fato que a dieta ocidental típica contém proporção significativamente maior de ácidos graxos ômega 6 do que de ômega 3, a membrana da maioria das células contém grandes quantidades de AA (ANDERSON; MA, 2009). Os fosfolípidos de células mononucleares, por exemplo, contém aproximadamente 6-10% do total de ácidos graxos de ácido linoléico (18:2 n-6), 1-2% de ácido dihomo-alfa-linolênico (20:3 n-6) e 15-25% de ácido araquidônico (CALDER, 2002).

Diferentemente, a proporção de ácidos graxos ômega 3 são baixas, ácido alfa-linolênico (18:3 n-3) é raro e EPA e DHA abrangem apenas 1% e 2,5% de ácidos graxos totais, respectivamente (CALDER, 2007). A suplementação da dieta com óleo de peixe resulta em substituição parcial do AA nas membranas celulares por EPA e DHA, modificando o perfil de ácidos graxos das células (PERINI et al., 2010).

Faber et al. (2011), com o objetivo de verificar se a incorporação de EPA e DHA em leucócitos é atingida em apenas uma semana de suplementação com 2,4 g de EPA e 1,2 g de DHA, encontraram como resposta aumento significativo de EPA de 0,5% antes da suplementação para 2,8% no final de uma semana. Sugerindo assim, que a incorporação de ácidos graxos pode ser obtida rapidamente, conforme explicitado pelos autores, pode ser devido ao fato de leucócitos possuírem um rápido turnover e de que o EPA pode permutar rapidamente do plasma para as células.

3.7 ÓLEO DE PEIXE E ESTRESSE OXIDATIVO

Pode-se definir estresse oxidativo como uma condição de desequilíbrio entre produção de espécies reativas e defesas antioxidantes (MANDELKER, 2008). Os organismos aeróbicos produzem ampla gama de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo radicais livres e compostos não radicais, constantemente gerados dentro das células (MERENDINO et al., 2013).

A eliminação e defesa celular contra os radicais livres são funções das enzimas antioxidantes como catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD). Essas são enzimas primárias, localizadas nas células e usualmente capazes de eliminar e remover espécies reativas, criando um equilíbrio celular. Dessa maneira, em estados normais, poucas espécies reativas saem das células e causam danos aos tecidos, e mesmo que isso ocorra, as células geralmente toleram uma quantidade leve de estresse oxidativo, aumentando a síntese de antioxidantes numa tentativa de restaurar o equilíbrio oxidante/antioxidante. Entretanto, em condições estressantes, o sistema antioxidante intracelular pode ficar sobrecarregado, aumentando as concentrações de espécies reativas e expondo células e tecidos ao estresse oxidativo excessivo ou inapropriado. Esse desequilíbrio pode resultar tanto de excesso na produção de EROs ou por deficiência de antioxidantes (MANDELKER, 2008).

A peroxidação lipídica é um processo metabólico natural e acontece em condições normais. A peroxidação lipídica pode ser dividida em três estágios: iniciação, propagação e terminação. A iniciação pode ser por uma variedade de fontes, incluindo metais de transição, enzimas, radical hidroxil, irradiação, espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (LIU; WANG, 2008). A peroxidação lipídica é uma das consequências mais investigadas das ações dos EROs na estrutura e função das membranas considerando que ácidos graxos presentes na membrana celular são suscetíveis a esse processo (GAGO-DOMINGUEZ; JIANG; CASTELAO, 2007).

Enquanto ocorre, a peroxidação lipídica gera uma gama de compostos reativos de carbonil, cetonas e alcanos, os quais vão produzir uma série de produtos finais, entre eles o malondialdeído (MDA), o mais mutagênico, e o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), o mais tóxico (CAI;

DUPERTUIS; PICHARD, 2012). Esses compostos podem interagir com DNA e formar adutos, além disso a lipoperoxidação nas membranas leva ao aumento na formação de EROs dentro das células (MERENDINO et al., 2013).

Importante para os efeitos dos produtos da peroxidação lipídica são as defesas enzimáticas e não-enzimáticas que protegem as células do estresse oxidativo. As já citadas anteriormente, SOD, CAT e GPx formam a primeira linha de defesa contra ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, além de inibirem a peroxidação lipídica induzida por ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana celular (GAGO-DOMINGUEZ; JIANG; CASTELAO, 2007).

Apesar disso, a ideia da peroxidação lipídica como processo somente destrutivo mudou, foi demonstrado que hidroperóxidos lipídicos e os isoprostanos, produtos finais da peroxidação, compostos similares a prostaglandinas, participam da cascata de transdução de sinais, controle da proliferação celular e na indução da diferenciação, maturação e apoptose (CAI; DUPERTUIS; PICHARD, 2012; GAGO-DOMINGUEZ; JIANG; CASTELAO, 2007). O 4-HNE pode aumentar o estresse oxidativo promovendo o consumo celular de glutatona e a inativação da glutatona peroxidase, pode, portanto, ter efeito anticâncer relacionado com a alteração do estresse oxidativo, induzindo apoptose nas células cancerígenas (CAI; DUPERTUIS; PICHARD, 2012).

Nesse contexto, os ácidos graxos poli-insaturados n-3 podem atuar como adjuvante para aprimorar a citotoxicidade a células tumorais (MERENDINO et al., 2013). Os AGPI n-3 têm sido implicados a inibição do crescimento de cânceres in vivo e in vitro e essa inibição está associada com a geração e a extensão da peroxidação lipídica causada por esses ácidos graxos em células tumorais (MERENDINO et al., 2013; SIDDIQUI; HARVEY; STILWELL, 2008; GAGO-DOMINGUEZ, JIANG, CASTELAO, 2007).

Mund et al. (2007) avaliaram possíveis mecanismos relacionados com a redução do crescimento tumoral em ratos portadores de tumores (tumor ascítico Walker 256) cronicamente suplementados com óleo de peixe. A suplementação com óleo de peixe resultou em menor peso tumoral, maior porcentagem de células em apoptose no tumor, menor proliferação das células tumorais ex vivo, maior conteúdo

de peróxidos lipídicos no tecido tumoral do que ratos recebendo dieta normal ou suplementados com óleo de coco. De acordo com os autores, esses resultados sugerem que a redução do crescimento do tumor por óleo de peixe envolve aumento da apoptose e da peroxidação lipídica no tecido tumoral, com redução da proliferação das células tumorais.

Colquhoun e Schumacher (2001) realizaram estudo com objetivo de investigar os mecanismos pelos quais ocorre a inibição por ácidos graxos do crescimento do tumor Walker 256 *in vitro*. O EPA, além de causar um decréscimo na proliferação celular e um aumento na taxa de apoptose, aumentou também as EROs e a produção de peróxidos lipídicos no tumor. Uma das principais características dos ácidos graxos poli-insaturados n-3 é o fato de serem altamente suscetíveis à oxidação. Dentre eles, o DHA é o mais suscetível a peroxidação lipídica que é iniciada após ataque de radicais livres, resultando em um radical DHA instável que sofre isomerização e rearranjo das duplas ligações. Essas mudanças levam à formação de dienos conjugados, que sucessivamente, após oxidações seguintes, são convertidos em hidroperóxidos lipídicos. Hidroperóxidos lipídicos podem seguir dois caminhos: desintegração da cadeia de carbonos e produção de radicais alcoxi como aldeídos (malondialdeído, por exemplo) e alcanos ou alquenos (pentano, por exemplo) ou permanecer com a cadeia de carbono intacta com a formação de radicais peroxi como isoprostanos e isofuranos (MERENDINO et al., 2013).

Aldeídos derivados da peroxidação lipídica foram implicados a redução do crescimento tumoral, diminuindo a proliferação celular de maneira dependente da concentração (SIDDIQUI; HARVEY; STILWELL, 2008). Apoiando a indicação de que peroxidação lipídica desempenha um papel em atribuir propriedades anticâncer aos AGPI n-3, sugere-se que a supressão do crescimento de tumores ocasionada por esse nutriente é eliminada ou reduzida por antioxidantes como vitamina E, superóxido dismutase, hidroxitolueno butilado (BHT), entre outros (SIDDIQUI, HARVEY, STILWELL, 2008; GAGO-DOMINGUEZ, JIANG, CASTELAO, 2007).

Em estudo de Trombetta et al. (2007), ao exporem células de câncer de pulmão (A549) ao DHA, observou-se que ocorreu diminuição do crescimento de células de câncer de pulmão de maneira dependente da concentração e do tempo. O mecanismo de antiproliferação envolve

mudanças na composição de ácidos graxos das membranas e produção de aldeídos derivados da peroxidação lipídica (avaliada pela produção de MDA). Alfa-tocoferol e BHT preveniram a inibição de crescimento, sendo que o alfa-tocoferol aboliu totalmente a produção de MDA.

De maneira divergente, o estudo de Cai et al. (2013) ao avaliar proliferação celular, sobrevivência, apoptose e peroxidação lipídica após suplementação de óleo de peixe contendo vitamina E em células in vitro e tumores de câncer colorretal em ratos, observou que esse parece ter um efeito antitumor correlacionado com a peroxidação lipídica que ocorre independentemente do conteúdo de vitamina E presente no óleo. A suplementação inibiu a viabilidade e proliferação celular de maneira dose dependente e a peroxidação lipídica e a apoptose celular aumentaram in vitro. In vivo, embora o tratamento com óleo de peixe não tenha alterado o crescimento do tumor, ocorreu aumento na área necrótica do mesmo. Malondialdeído e peróxidos lipídicos aumentaram significativamente quando comparado com controles não tratados.

Diferentemente das células normais, células cancerígenas frequentemente exibem elevadas concentrações de EROs endógenas principalmente devido ao seu metabolismo acelerado para manutenção de altas taxas de proliferação. Por outro lado, EROs foram propostas como mediador comum da apoptose das células tumorais e a ampla maioria de agentes anticâncer citotóxicos trabalham com a geração direta ou indireta de EROs (MERENDINO et al., 2013). Somado a isso, as defesas antioxidantes estão alteradas em células cancerígenas, com frequente menor atividade de SOD, GPx e CAT, tornando-as mais vulneráveis ao estresse oxidativo que as células normais (SIDDIQUI; HARVEY; STILWELL, 2008; DING et al., 2004) (as diferenças entre defesas antioxidantes de células tumorais e normais serão melhor abordadas no capítulo 3.10). Ações adjuvantes, levando em conta essas considerações, podem representar uma boa estratégia para aumentar a eficácia dos tratamentos convencionais, mantendo altas concentrações de EROs em células tumorais e reduzindo ainda mais suas defesas antioxidantes, favorecendo a peroxidação lipídica e resultando em apoptose (MERENDINO et al., 2013).

3.8 ÓLEO DE PEIXE E APOPTOSE CELULAR

Usualmente as EROs podem iniciar uma série de respostas nas células dependendo da sua concentração e da duração de sua exposição. Em geral, baixas concentrações de EROs são mitogênicas e promovem proliferação celular, enquanto concentrações intermediárias impedem transitoriamente ou permanentemente o ciclo celular e induzem a diferenciação celular. Por outro lado, altas concentrações de EROs são prejudiciais às células e podem induzir a morte celular (LAU; WANG; CHIU, 2008).

A morte celular pode-se dar de duas formas, apoptose e necrose, distinguidas por mudanças morfológicas e bioquímicas. A necrose induz danos a células, que podem ser caracterizados pelo inchaço e ruptura da membrana celular, liberando assim o conteúdo celular e podendo resultar numa resposta inflamatória (ALGHAZEER; GAO; HOWELL, 2008).

A apoptose acontece na maioria das vezes por dois mecanismos: as vias intrínseca e extrínseca. A primeira é causada pela liberação do citocromo mitocondrial c no compartimento citoplasmático, que por sua vez se liga ao fator apoptótico ativador de proteases citoplasmático, desencadeando a ativação da caspase iniciadora 9 e então das caspases executoras 3, 6 e 7 (MERENDINO et al., 2013).

Existe a indicação de que estresse oxidativo mitocondrial promove apoptose. Quando os níveis de EROs e hidroperóxidos fosfolipídicos excedem a capacidade da mitocôndria de destoxicá-los, o estresse oxidativo crônico resultante pode desencadear diretamente a liberação de fatores pró-apoptóticos da mitocôndria para o citosol (FAN et al., 2009).

A mitocôndria é um dos locais celulares onde os AGPI n-3 são rapidamente incorporados e esses podem alterar as propriedades e funções da membrana mitocondrial (SIDDIQUI; HARVEY; STILWELL, 2008). Os AGPI n-3 presentes na mitocôndria estão em associação com cardiolipinas e sofrem ataque de radicais livres, geralmente em altas concentrações nas células cancerígenas (MERENDINO et al., 2013; GLEISSMAN; JOHNSEN; KOGNER, 2010).

A peroxidação decorrente do ataque de radicais livres resulta numa menor concentração de cardiolipina mitocondrial, o que altera a atividade de proteínas dependentes da cardiolipina, causando queda no potencial de membrana mitocondrial, que por sua vez inicia a apoptose. O estresse oxidativo na mitocôndria, portanto, desencadeia aumento nas taxas de vazamento de prótons resultando na depleção do potencial de membrana. Sugere-se também, que a peroxidação ou perda de cardiolipina induz a liberação de citocromo c da mitocôndria para o citosol. Assim que o citocromo c é liberado da mitocôndria, interage com Apaf-1, dATP e procaspase 9, a formação desse complexo resulta na clivagem e ativação da caspase 9 e como consequência a execução da cascata de caspases ocorre (SIDDIQUI; HARVEY; STILWELL, 2008).

De acordo com essa via, alguns autores consideram que a morte celular induzida por AGPI n-3 em células malignas é mediada pelo aumento da produção de EROs, levando ao colapso do potencial de membrana mitocondrial e subsequentemente resultando em morte celular por apoptose (KANG et al., 2010).

Colquhoun e Schumacher (2001) tiveram como objetivo investigar os mecanismos responsáveis pela inibição do crescimento de tumores Walker 256 in vitro por ácidos graxos poli-insaturados. EPA diminuiu a proliferação e aumentou a apoptose celular. Além disso, ocorreu aumento nas EROs intracelulares, na produção de peróxidos lipídicos e diminuição do potencial de membrana mitocondrial. Foi observada também a liberação de citocromo c pela mitocôndria e ativação da caspase 3.

Já, o estudo de Fan et al. (2009), procurou elucidar os mecanismos que regulam a apoptose induzida por estresse oxidativo in vivo, usando ratos knockout para SOD2, que apresentam maior estresse oxidativo mitocondrial. Os ratos foram alimentados com dietas contendo óleo de peixe a 15% por 4 semanas. A dieta com óleo de peixe aumentou em 22% a apoptose nas células enquanto que a insuficiência em SOD2 também aumentou em 20% a apoptose. Esses efeitos foram aditivos, sendo observado um aumento de 36% em ratos alimentados com óleo de peixe e deficientes em SOD2. Concluíram que os efeitos apoptóticos dos AGPI n-3 são maiores em ratos com estresse oxidativo mitocondrial exacerbado, produzindo um desequilíbrio oxidativo, que pode desencadear direta ou indiretamente a apoptose.

Posteriormente Fan et al. (2011) realizou novo estudo também com objetivo de elucidar os mecanismos que regulam a apoptose induzida por estresse oxidativo in vivo. Para isso suplementaram ratos com modificação genética de enzimas antioxidantes (SOD e Gpx) com dietas contendo 11,5% de óleo de peixe por 4 semanas. Nos ratos com modificação genética de enzimas antioxidantes, a predisposição genética ao estresse oxidativo facilita a apoptose, ou seja, os ratos com depleção de genes de SOD2 e GPx4 tiveram um efeito apoptótico maior com a suplementação de AGPI n-3. Já, em ratos com superexpressão de GPx4, que sem a suplementação com AGPI n-3 tinham apoptose reduzida por conta do efeito protetor da enzima antioxidante, com a suplementação foi observado aumento da apoptose celular nesses ratos. Os ratos alimentados com óleo de peixe apresentam um aumento no vazamento de prótons induzidos pela respiração quando comparados com os controles, enquanto a depleção ou superexpressão de enzimas não influenciou nesse achado. O resultado foi considerado consistente com uma perda do potencial de membrana como resposta ao estresse oxidativo crônico e apoia o argumento que AGPI n-3 alteram a atividade metabólica mitocondrial, aumentando a atividade da caspase 3 e consequentemente da apoptose.

Por outro lado, os efeitos apoptóticos de AGPI n-3 parecem ser tanto pela via intrínseca como pela extrínseca. A via extrínseca da apoptose é iniciada pela ativação de receptores de morte celular por ligantes FasL, seguido pela união do complexo sinalizador indutor de morte, que causa a ativação da caspase 8 ou 10. A ativação da caspase 8 ou 10 resulta na ativação subsequente das caspases executoras, que serão as reais efetoras da apoptose (MERENDINO et al., 2013).

Nesse sentido, o estudo de Kang et al. (2010), buscou investigar os efeitos anticâncer in vivo e in vitro do DHA, focando na indução de estresse oxidativo e apoptose como um mecanismo importante para esses efeitos. In vitro, DHA reduziu a viabilidade, síntese de DNA e também promoveu a morte celular via apoptose de células de câncer de mama (MCF-7). O acúmulo de EROs e a ativação da caspase 8 contribuíram significativamente para indução da apoptose. Com ratos, a suplementação de 5% da dieta com óleo de peixe por 6 semanas reduziu o crescimento de MCF-7 in vivo através da inibição da proliferação celular bem como a promoção da morte celular. Assim como in vitro,

houve aumento significativo do estresse oxidativo de células tumorais in vivo. Os autores concluíram que a apoptose é a principal forma de morte celular induzida por DHA em células MCF-7 tanto in vitro como in vivo e essa indução tem como importante mediador a ativação da caspase 8.

Ao investigar as ações anticâncer de EPA e DHA em células de câncer pancreático humano (MIA-PaCa-2 and Capan-2), Fukui et al. (2013) também consideraram a morte celular induzida por EPA e DHA dependente de caspase 8 in vitro. Em animais alimentados com dieta contendo 5% de óleo de peixe, com altas concentrações de EPA e DHA, ocorreu uma supressão do crescimento dos tumores pela indução de estresse oxidativo e morte celular. Embora tanto o estudo de Fukui et al. (2013) como o estudo de Kang et al. (2010) tenham associado a morte celular induzida por EPA e DHA com a caspase 8, o mecanismo pelo qual essa caspase é ativada seletivamente ainda não é compreendido. É especulado que o EPA e o DHA podem aumentar a acumulação de EROs preferencialmente dentro ou próximo dos rafts de lipídeos da membrana plasmática onde ocorre a união do complexo sinalizador indutor de morte e a subsequente ativação da caspase 8 (FUKUI et al., 2013).

3.9 ÓLEO DE PEIXE E RESPOSTA AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Os ácidos graxos poli-insaturados demonstram aumentar os efeitos antitumor de alguns agentes quimioterápicos e terapias anticâncer (BARACOS; MAZURAK; MA, 2004; MERENDINO et al., 2013). Hipotetiza-se que existem mecanismos relacionados com a suplementação de AGPI n-3 que beneficiam a atividade antineoplásica. Os quimioterápicos com os quais os AGPI n-3 parecem aumentar a eficácia são: compostos de platina, agentes alquilantes, irinotecan, ciclofosfamida, vincristina, antraciclina (doxorubicina, epirrubicina), taxanos (paclitaxel, docetaxel), vinorelbina, 5-fluorouracil e mitomicina (HARDMAN; MUNOZ; CAMERON, 2002; BARACOS; MAZURAK; MA, 2004; BOUGNOUX et al., 2010).

No estudo de Cai et al. (2014), ao avaliarem se DHA ou EPA aumentam a eficácia do tratamento radioterápico em duas linhagens de câncer colorretal, demonstraram que DHA e EPA aumentaram a morte

celular e produção de peróxidos após a realização de radioterapia. Observou-se também, que as linhagens possuem sensibilidades diferentes tanto ao tratamento radioterápico como à suplementação com AGPI n-3. Os autores concluíram que a radioterapia em combinação com DHA e com EPA resultou em efeitos sinérgicos ou até mesmo aditivos dependendo da linhagem.

No estudo de Kokura et al. (2002) ao usar uma linhagem celular de câncer hepático de ratos observou-se que o EPA aumenta a suscetibilidade do tecido tumoral a peroxidação lipídica e dessa forma aumenta o efeito antitumoral da hipertermia, um tipo de tratamento anticâncer.

Porém, os mecanismos por trás desses efeitos não foram completamente elucidados. Existe a suposição de que os AGPI n-3 possam atuar de diferentes formas (MERENDINO et al., 2013). Algumas proposições incluem: ação na transdução de sinais e geração de mudanças na composição dos rafts de membrana, indução de peroxidação lipídica potencializada por terapias pró-oxidantes, inibição da indução da ativação de NF- κ B por quimioterápicos, aumento da captação de drogas pela alteração de propriedades de membrana, indução de apoptose pela modulação de efeitos das proteínas pró e antiapoptóticas (GLEISSMAN; JOHNSEN; KOGNER, 2010). Dentre esses, os principais mecanismos que se acredita estarem envolvidos são: a indução de mudanças na captação de droga e as mudanças no status oxidativo das células malignas provocadas por AGPI n-3 (BOUGNOUX et al., 2010).

A incorporação de AGPI nos fosfolipídeos de membrana pode modificar a estrutura e permeabilidade da membrana. Hipotetiza-se que os rafts de lipídeos (microdomínios de membrana ricos em ácidos graxos saturados, esfingolipídeos, colesterol e diversas proteínas sinalizadoras) e transdução de sinal associada podem ser modificados pela incorporação do AGPI DHA nas membranas (BOUGNOUX et al., 2010). Uma membrana mais fluída e com maior taxa de insaturação após a suplementação com AGPI n-3 pode permitir maior influxo, captação e permeabilidade de drogas, ou seja, capacidade de transporte aprimorada, resultando em maior concentração intracelular de agentes anticâncer (BARACOS; MAZURAK; MA, 2004; PARDINI, 2006).

Ainda assim, não são em todas as linhagens celulares e modelos tumorais que a incorporação de DHA na membrana acarreta maior concentração intracelular de fármacos (BOUGNOUX et al., 2010).

Maheo et al. (2005) observaram que a sensibilização de células de câncer de mama a quimioterápicos por DHA foi diferente para linhagens diferentes. A maior eficácia do quimioterápico foi relacionado com aumento nas concentrações de malondialdeído e de GSH, além daquele induzido por doxorubicina, nas células suplementadas com DHA e não houve diferenças intracelulares do fármaco induzidas por DHA nessas células. Diferentes linhagens celulares podem possuir diferentes características celulares, como formação e configuração de membrana. De qualquer maneira, os AGPI n-3 também podem tornar as células mais vulneráveis ao dano oxidativo induzido por agentes quimioterápicos (MERENDINO et al., 2013).

Os AGPI n-3 podem enfraquecer as células através de sua incorporação nos fosfolipídeos de membrana e sua subsequente peroxidação como resposta ao estresse oxidativo induzido por agentes anticâncer. A sensibilidade aumentada das células aos quimioterápicos, induzida por peroxidação lipídica e estresse oxidativo ligados aos AGPI n-3, também não é regra para todas as linhagens celulares. O sucesso desse mecanismo depende do mecanismo de ação do fármaco utilizado e do status de defesa antioxidante da célula sofrendo ataque (BOUGNOUX et al., 2010).

Hardman, Munoz e Cameron (2002) suplementaram ratos portadores de câncer de mama (MDA-MB-231) com óleo de peixe ou dietas controles, ambos com e sem vitamina E. Um grupo de ratos foi morto antes e um depois do tratamento com doxorubicina para avaliar fatores envolvidos na supressão do crescimento tumoral. O crescimento médio de tumores dos ratos suplementados com óleo de peixe foi significativamente menor do que o crescimento médio dos tumores dos ratos controles. Observaram que a supressão da atividade da glutatona peroxidase celular por óleo de peixe (com ou sem adição de vitamina E na dieta) antes do tratamento com doxorubicina foi mais importante que o aumento da peroxidação lipídica causada pelo óleo para explicar a supressão do crescimento tumoral. Sugere-se que o DHA possui habilidade de induzir a extrusão celular de GSH em linhagens de células tumorais. Também pode induzir a redução da expressão da proteína de

Gpx4 e a regulação negativa de SOD1 em células tumorais (MERENDINO et al., 2013).

Defesas antioxidantes baixas enfraquecem as células tumorais quando o estresse oxidativo induzido por quimioterápicos é elevado (BOUGNOUX et al., 2010) Existe a indicação, por exemplo, de que o status redox da glutationa das células é importante para determinar sua resposta a quimioterapia (PARDINI, 2006).

Vibet et al. (2008), com o objetivo de avaliar a relação entre o aumento da sensibilização a fármacos por DHA e status antioxidante de células tumorais, utilizou duas linhagens celulares de câncer de mama. Em uma das linhagens o DHA aumentou a sensibilidade a doxorubicina e a outra não apresentou efeitos após a exposição com DHA. Enzimas antioxidantes são, geralmente, reguladas positivamente por peróxidos de hidrogênio e outras EROs. Nesse estudo, a maior diferença entre as duas linhagens celulares foi a atividade de GPx, que foi regulada negativamente por doxorubicina+DHA na linhagem sensível e não na linhagem resistente. O aumento de espécies reativas aconteceu durante o tratamento com antraciclina apenas na linhagem sensível ao DHA, isso ocorreu concomitantemente com a diminuição da atividade de glutationa peroxidase citosólica e com a acumulação de glutationa reduzida, co substrato de GPx.

Nos tumores in vivo, quando a suplementação dietética de DHA acarretou o aumento da sensibilidade do tumor a antraciclinas, a atividade da GPx estava igualmente diminuída. Os autores sugerem que a inibição da atividade de GPx pode ser um dos principais mecanismos na sensibilização do tumor às antraciclinas por DHA e a regressão desse durante a quimioterapia foi correlacionada com baixa atividade de GPx e com a acumulação da glutationa celular. Entretanto, a causa da resposta diferente de GPx ao DHA nas duas linhagens celulares não é clara (VIBET et al., 2008).

Independente disso, a incorporação na membrana celular de alvos peroxidáveis e a falta de resposta apropriada de GPx podem participar no aumento da sensibilidade das células a terapias que geram EROs (VIBET et al., 2008).

Pardini (2006) levantou uma questão importante relacionada às células normais ao observar os resultados de que essa intervenção nutricional aumentou a sensibilidade de células tumorais à

quimioterapia: “qual seria o impacto dos lipídeos dietéticos na toxicidade das células normais concomitante à administração de quimioterápicos, considerando que as reações adversas da quimioterapia podem limitar a utilização de fármacos anticâncer?”

3.10 ÓLEO DE PEIXE E A SENSIBILIZAÇÃO SELETIVA DE CÉLULAS AOS QUIMIOTERÁPICOS

Como demonstrado, EPA e DHA podem sensibilizar células cancerígenas e tumores a fármacos e tratamentos anticâncer. Sabe-se que quando suplementados os AGPI n-3 são incorporados nos tecidos independentemente de serem tecidos tumorais ou não (KOKURA et al., 2002; HAJJAJI; BESSON; BOUGNOUX, 2012; HAJJAJI; BOUGNOUX, 2013) e que, como visto, a quimioterapia também possui ação sistêmica. Logo, a sensibilização por AGPI n-3 de tecidos saudáveis a quimioterapia é um ponto a ser considerado, levando-se em conta que se a sensibilidade dessas células a quimioterápicos também for aumentada, as vantagens de tal suplementação podem ser abolidas.

Em estudo de revisão de Hajjaji e Bougnoux (2013), os autores propuseram o termo “sensibilização seletiva” ao se referirem aos efeitos dos AGPI n-3 em células cancerígenas e em células normais. Os autores consideram que EPA e DHA tem o potencial de sensibilizar diferentemente tecidos à quimioterapia, enquanto aumentam a citotoxicidade de diversas células tumorais a grande parte dos quimioterápicos, não parecem sensibilizar os tecidos livres de tumor a esses fármacos, sugerindo que seus efeitos são seletivos. Nos estudos apresentados nessa revisão, enquanto EPA e DHA aumentaram a sensibilidade de células cancerígenas a fármacos não alteraram a baixa sensibilidade apresentada pelas células normais, sendo que, em alguns estudos foi observado até redução da sensibilidade dos tecidos normais aos fármacos. É importante destacar que nenhum estudo nessa revisão relatou aumento dos eventos adversos relacionados aos quimioterápicos em animais suplementados com EPA e/ou DHA.

Baumgartner et al. (2004) tiveram como objetivo avaliar se o efeito citotóxico combinado de trióxido de arsênio e DHA, apresentado em linhagens sensíveis, é observado também em células resistentes a esse fármaco. Foram avaliadas diversas linhagens de células tumorais e

o tratamento combinado reduziu a viabilidade de 7 das 10 linhagens resistentes ao trióxido de arsênio. Também foi observado que esses efeitos foram seletivos para as células tumorais, pois não foram observados maiores efeitos citotóxicos e sensibilidade ao fármaco em fibroblastos normais, células endoteliais humanas e células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis.

Como visto, diversos mecanismos e alvos nas células tumorais que aumentam a citotoxicidade dos quimioterápicos por EPA e DHA foram propostos, porém os mecanismos envolvidos nos seus efeitos seletivos ainda não foram tão amplamente estudados. Um conjunto de mecanismos explorados são aqueles relacionados com o estresse oxidativo (HAJJAJI; BOUGNOUX, 2013).

DHA e EPA são altamente peroxidáveis e podem amplificar o dano causado por fármacos indutores de estresse oxidativo. Tem sido associado, portanto, o aumento da citotoxicidade dos fármacos por DHA e EPA com aumento na produção de peróxidos lipídicos. O que se observa é que tecidos normais e tumorais parecem responder diferentemente ao estresse oxidativo gerado e como consequência é verificado aumento nos peróxidos lipídicos em tumores, mas não em tecidos saudáveis. Propõe-se que EPA e DHA possam interferir na atividade de enzimas antioxidantes e que o efeito diferente apresentado pelas células está relacionado com essas enzimas (HAJJAJI; BOUGNOUX, 2013).

Efeitos inversos dos AGPI n-3 na atividade de GPx foram descritos em células normais e tumorais. A atividade dessa enzima parece ser maior após a suplementação em células normais e o contrário acontece em células tumorais (BOUGNOUX et al, 2010). Kokura et al. (2002) ao avaliarem o efeito do EPA na suscetibilidade de células tumorais ao tratamento anticâncer, também compararam o efeito desse ácido graxo no tecido hepático normal de ratos suplementados com EPA. O grupo controle, não tratado com EPA, demonstrou baixa concentração de antioxidantes e de produtos da peroxidação lipídica no tecido tumoral comparado com o normal. Após a suplementação de EPA e a ocorrência do tratamento (hipertermia), houve aumento da atividade de GPx no tecido normal, enquanto que no tecido tumoral não foi modificada, observando-se ainda um decréscimo na GSH. Esses dados

sugerem que o tecido tumoral se tornou mais suscetível a peroxidação lipídica do que o tecido normal.

Embora não ter comparado a suscetibilidade de células normais e tumorais Maheo et al. (2005), observaram que a sensibilização de células de câncer de mama por DHA ao quimioterápico doxorubicina foi diferente para diferentes linhagens. Consideraram que as diferenças apresentadas entre as linhagens estavam relacionadas com a capacidade de resposta ao estresse oxidativo. Ocorreu aumento de GSH e de GSSH tanto por DHA como por doxorubicina apenas na linhagem sensível e não na linhagem na qual a suscetibilidade ao fármaco não foi aumentada por DHA. Hipotetiza-se que se deve ao fato de ocorrer uma inibição nas enzimas que consomem GSH, principalmente glutathione peroxidase, nas células sensíveis.

As defesas antioxidantes celulares são necessárias para neutralizar as ações danosas de radicais livres e peróxidos lipídicos e sua diminuição pelos AGPI n-3 pode aumentar a ação citotóxica desses compostos. Portanto, a habilidade de AGPI em suprimir o conteúdo antioxidante das células tumorais pode levar ao conseqüente aumento na geração de radicais livres e peroxidação lipídica e a um aumento na citotoxicidade desses compostos (SIDDIQUI, HARVEY, STILWELL, 2008).

No caso do estudo de Ding et al. (2004), ao estudarem os efeitos citotóxicos de DHA em linhagens de células cancerígenas, os autores observaram que embora o AGPI fosse tóxico às cinco linhagens testadas no estudo (MCF-7, MDA-MB-231, SiHa, Raji, and DHL-4), elas não foram sensíveis uniformemente. As células mais sensíveis aos efeitos citotóxicos DHA apresentam maior aumento nos produtos da peroxidação lipídica enquanto que as células resistentes não demonstram esse aumento. Observaram também uma regulação negativa da expressão da enzima SOD nas células mais sensíveis, mas não nas resistentes, sendo que nessas últimas também não houve diferença entre a expressão de CAT e GPx. Concluem que a expressão de SOD pode ter um papel importante na determinação de diferentes sensibilidades das células aos efeitos do DHA. Testaram também duas linhagens de células, uma normal e outra tumoral, que já demonstraram ter diferentes sensibilidades ao DHA: a citotoxicidade foi maior nas células tumorais do que nas normais. Porém, essa diferença desta vez não estava

relacionada com a expressão de SOD, sugerindo que o efeito seletivo de DHA nas células tumorais em comparação com as células normais pode não estar relacionado com SOD.

O mecanismo proposto por Bougnoux et al. (2010) para explicar a sensibilização seletiva pelos AGPI n-3 dos tumores aos quimioterápicos é que as defesas antioxidantes que promovem a resposta ao estresse oxidativo estão eficientes em células normais. Enquanto isso, a perda de defesas antioxidantes (SOD e GPx) como consequência da tumorigênese em células tumorais enfraquece essas células quando o estresse oxidativo induzido pela quimioterapia ocorre na presença de lipídeos peroxidáveis. Em artigo publicado posteriormente pelo mesmo autor em conjunto com outros, ao buscarem explorar o mecanismo relacionado com estresse oxidativo na sensibilização seletiva de células tumorais a fármacos por AGPI n-3, no grupo de animais controle (sem DHA e sem quimioterapia) as defesas antioxidantes diferiram entre tumores e outros tecidos. A capacidade antioxidante total e atividade de SOD foi significativamente maior em tecidos tumorais quando comparados com os tecidos saudáveis de fígado e coração. Embora a atividade da GPx tenha sido significativamente menor no tumor do que nos outros tecidos. Sugeriram que comparados aos tecidos normais, os tumores necessitam de uma maior atividade de SOD e capacidade antioxidante total para manter os peróxidos lipídicos em concentrações similares às encontradas em tecidos normais. Isso pode estar ligado com a maior produção de EROs em tumores ou uma menor atividade de GPx. Corroborando com o já apresentado, que células cancerígenas demonstram maior estresse oxidativo e defesas antioxidantes prejudicadas (HAJJAJI; BESSON; BOUGNOUX, 2012).

Esse estudo de Hajjaji, Besson e Bougnoux (2012) avaliou a concentração de peróxidos lipídicos, capacidade antioxidante total, atividades de GPx e SOD em tumores, intestino, fígado e coração de ratos tratados com DHA e epirrubicina e em ratos recebendo óleo de palma e sem quimioterapia. No momento basal, a concentração de peróxidos lipídicos foi similar em tumores, fígado, coração e intestino. DHA e epirrubicina induziram um aumento significativo de peróxidos lipídicos em tumores, mas não foi detectado aumento nos outros tecidos. As diferenças de peróxidos lipídicos entre esses tecidos foi associada

com diferenças nas defesas antioxidantes das células. Em tumores, o ajuste da atividade de GPx ao aumento de peróxidos lipídicos foi possível mas limitada (ou seja, o aumento foi menor do que o observado em tecidos saudáveis), e não houve ajuste na atividade de SOD e na capacidade antioxidante total em comparação com outros tecidos. Já, em tecidos saudáveis, a falta de mudança na concentração de peróxidos lipídicos foi associada com mudanças eficientes nas defesas antioxidantes. Concluíram que a suplementação de DHA durante a quimioterapia induziu ao aumento seletivo de peróxidos lipídicos em tumores e não em tecidos normais e que essa seletividade pode ser resultado de respostas diferentes ao estresse oxidativo entre tecidos tumorais e normais.

Hardman et al. (2001) avaliaram se dieta contendo 3% de óleo de peixe + 2% de óleo de milho é benéfica durante tratamento com doxorrubicina em ratos com tumores. Comparada com a dieta contendo 5% de óleo de milho, o óleo de peixe aumentou a peroxidação lipídica nos tumores e no fígado, mas também aumentou significativamente a atividade das enzimas GPx e CAT no fígado. Nos tumores, o consumo de óleo de peixe aumentou somente a atividade de SOD, mas sem aumento de GPx e CAT. Como GPx e CAT neutralizam o peróxido de hidrogênio produzido por SOD, o aumento dessa enzima sem aumento das demais leva ao acúmulo de peróxido de hidrogênio e aumento do estresse oxidativo nas células tumorais. A toxicidade da doxorrubicina não aumentou em animais alimentados com óleo de peixe, mas ocorreu diminuição do crescimento tumoral nesses animais, ou seja, o óleo de peixe aumentou a efetividade do tratamento com doxorrubicina sem aumentar suas toxicidades.

No estudo de Hajjaji, Besson e Bougnoux (2012), as células tumorais aumentaram a atividade (embora limitadamente) de GPx após a suplementação de AGPI n-3 e administração de quimioterápico, enquanto não houve mudança na SOD, o contrário foi observado no estudo de Hardman et al. (2001). Ainda, no caso do estudo de Hajjaji, Besson e Bougnoux (2012), a alta concentração de enzimas antioxidantes no tumor do grupo controle (sem DHA e quimioterápico) e a incapacidade de células tumorais de aumentá-las após o tratamento com DHA e quimioterápico, de acordo com os autores, sugere que os máximos níveis de proteção antioxidante foram atingidos no momento

basal e não puderam ser ajustados a uma presença aumentada de EROs. Contraditoriamente, existem relatos de que as atividades das enzimas antioxidantes estão reduzidas em células malignas (BOUGNOUX et al., 2010; XUE et al., 2011).

A atividade de diferentes enzimas antioxidantes variam entre linhagens celulares e entre células normais e malignas e esse fator pode ser importante para a susceptibilidade das células cancerígenas aos efeitos anticâncer dos lipídeos oxidados (SIDDIQUI, HARVEY, STILWELL, 2008). O que se ressalta dos estudos apresentados é a inabilidade de responder apropriadamente ao estresse oxidativo gerado pela suplementação de AGPI n-3 e administração concomitante de quimioterápicos apresentada pela maioria das células malignas. Acontecimento que não é observado em células normais, que parecem ter resposta consistente ao estresse oxidativo, podendo evitar dessa maneira a sensibilização aos quimioterápicos provocada pelos AGPI n-3. Ainda assim, sugere-se que mais de um mecanismo esteja envolvido na ação seletiva de DHA e EPA e estudos são necessários para elucidar esses mecanismos (HAJJAJI; BOUGNOUX, 2013).

3.11 ESTUDOS COM SUPLEMENTAÇÃO DE AGPI N-3, RESPOSTA AO TRATAMENTO E REAÇÕES ADVERSAS A QUIMIOTERAPIA EM HUMANOS

Foi realizada uma busca nas bases de dados Scopus e Pubmed com o objetivo de identificar estudos que se propuseram a avaliar os efeitos do óleo de peixe, ou de um de seus compostos ativos (EPA ou DHA), na resposta ao tratamento e em reações adversas da quimioterapia. Embora, como foi demonstrado, existam vários estudos *in vivo* e *in vitro* que tratam da ação citotóxica sinérgica e/ou aditiva à quimioterapia dos AGPI n-3 nas células tumorais e também que demonstram sua ação seletiva ao não sensibilizarem as células normais, apenas três estudos foram encontrados em seres humanos com esse enfoque.

O primeiro deles, o estudo de Bougnoux et al. (2009), teve como objetivo inicial avaliar a eficácia e segurança da suplementação de 1,8 g de DHA acompanhada de quimioterapia baseada em antraciclinas em pacientes com câncer de mama com rápida progressão de metástases

viscerais. Esse estudo foi composto por apenas um grupo e baseou as análises dos resultados na incorporação de DHA no plasma, ou seja, dividiu o grupo inicial entre os que apresentaram alta e baixa incorporação. Enquanto observaram diferenças na progressão da doença e sobrevida entre os grupos, sendo essas mais favoráveis ao grupo com alta incorporação, não observaram aumento das reações adversas nos tecidos não-tumorais. Os autores concluíram que essa suplementação pode melhorar o desfecho clínico do câncer de mama e sugeriram a ação seletiva do DHA, sensibilizando os tumores e não as células normais.

O segundo estudo, publicado em 2011 de Murphy et al., teve como objetivo principal avaliar se a combinação de óleo de peixe e quimioterapia resultaria em benefício clínico e na melhor taxa de resposta ao tratamento em pacientes com câncer de pulmão não-pequenas células avançado. Os pacientes foram suplementados com óleo de peixe encapsulado ou líquido contendo o óleo e embora tenha tido um grupo controle, que não recebeu nenhum tipo de intervenção nutricional, esse estudo não foi randomizado. Os pacientes no grupo óleo de peixe obtiveram melhor taxa de resposta à quimioterapia e melhor benefício clínico comparado com aqueles que não receberam. A incidência das reações adversas não diferiu entre os dois grupos.

Por fim, o estudo de Sánchez-Lara et al. (2014) foi um ensaio clínico randomizado e controlado com pacientes diagnosticados com câncer de pulmão não-pequenas células avançado recebendo quimioterapia. Teve como objetivo avaliar o efeito da intervenção em parâmetros nutricionais, clínicos e inflamatórios, qualidade de vida e toxicidade. Porém, a intervenção fornecida foi um suplemento nutricional enriquecido com EPA, que possui outros compostos que podem ser responsáveis por possíveis efeitos que não podem ser atribuídos somente a um nutriente. Por sua vez, o grupo controle recebeu uma dieta padronizada. Apesar de não observar diferenças na taxa de resposta ao tratamento e na sobrevida entre os dois grupos, também não observou aumento das reações adversas à quimioterapia no grupo suplementado.

Destaca-se que nenhum dos três estudos apresentou cegamento e apenas um deles foi randomizado. Os ensaios clínicos randomizados, cegados e controlados sofrem menos a influência de fatores de confusão e vieses e são considerados o delineamento padrão ouro para investigar

os efeitos de uma intervenção (MENEZES; SANTOS, 1999). As principais características e resultados desses estudos são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Estudos em humanos com suplementação de AGPI n-3, resposta ao tratamento e avaliação de reações adversas.

Autor / Ano (n)	Características do Estudo	Grupo(s) e Intervenções(s) usada(s) (n)	Duração Suplementação	Principais resultados
Bougnoux et al, 2009 (25)	Estudo de fase 2 não randomizado e não controlado; Pacientes diagnosticadas com câncer de mama com metástases recebendo quimioterapia baseada em antraciclina.	9 cápsulas de DHA (totalizando 1,8 g DHA/dia) G1) recebendo as cápsulas, alta incorporação de DHA no plasma (>2,5%) (12) G2) recebendo as cápsulas, baixa incorporação de DHA no plasma (<2,5%) (13)	Iniciada de 7-10 dias antes da quimioterapia e mantida por 5 meses durante a quimioterapia	↑ Tempo para progressão (G1/G2: p=0,02) ↑ Sobrevida total (G1/G2:p=0,007) ↓ Anemia e Trombocitopenia (G1/G2: p=0,01) ↔ Toxicidades Hematológicas
Murphy et al., 2011 (46)	EC não randomizado e controlado; Pacientes com diagnóstico de CPNPC com estágio IIIB ou IV em quimioterapia	G1) OP 4 cápsulas de 1 g (totalizando 2,2 g EPA + 240 mg DHA/dia) ou 7,5 mL de líquido contendo óleo de peixe (totalizando 2,2 g EPA e 500 mg DHA/dia) (15) G2) Tratamento padrão, sem intervenção (31)	Durante o tratamento quimioterápico	↑ taxa de resposta ao tratamento (G1/G2: p=0,008) ↑ Benefício Clínico (G1/G2: p=0,02) ↑ número de ciclos de QT recebidos (G1/G2: P=0,02) ↑ tempo em QT (G1/G2: p=0,05) ↔ Presença e Graduação de eventos adversos ↔ Descontinuação do tratamento devido a eventos adversos
Sánchez-Lara et al., 2014 (92)	EC randomizado controlado. Pacientes diagnosticados com CPNPC avançado recebendo quimioterapia (paclitaxel e cisplatina/carboplatina)	G1) 2X237 ml /dia de Prosure® (totalizando 2 g EPA/dia)(46) G2) Dieta com controle de calorías (46)	Durante o tratamento quimioterápico	↑ perda de peso (G2/G1: p=0,01) ↑ massa magra (kg) (G1/G2: p=0,01) ↓ Perda de apetite (G1/G2: p<0,05) ↓ Neuropatia (G1/G2: p<0,05) ↔ Toxicidades Hematológicas ↔ Sobrevida Total ↔ Taxa de Resposta ao tratamento

↑ = aumento; ↓ = redução; ↔ = sem alteração; G = grupo/ = comparado à.; EC = Ensaio Clínico.

Fonte: Elaborado pela autora.

4 MÉTODO

4.1 MÉTODOS REFERENTES AO OBJETIVO 1

4.1.1 Tipo de estudo

Ensaio clínico controlado, randomizados e não cegado com grupos paralelos.

4.1.2 Participantes do estudo

Este estudo incluiu 30 indivíduos com câncer colorretal diagnosticados por histopatologia e tratados no Centro de Pesquisa Oncológica de Florianópolis de novembro de 2009 a março de 2010 e de julho de 2011 a março de 2012. Originalmente recrutados para os estudos de Silva et al. (2012) e Mocellin et al. (2013) respectivamente, ambos ensaios clínicos randomizados. Os critérios de elegibilidade foram: idade superior ou igual a 18 anos; não estar em cuidados paliativos; nunca ter sido submetido a quimioterapia; ingestão oral preservada; não ser alérgico ou intolerante a peixes e derivados; sem diagnóstico de doenças inflamatórias ou autoimunes; não tomar estatinas ou drogas anti-inflamatórias; e não ter consumido suplementos contendo PUFA n-3 durante um período prolongado (> 120 dias) durante os seis meses anteriores à inclusão do estudo. O procedimento de amostragem foi feito por conveniência e saturação temporal, ou seja, foram convidados a participar de todos os indivíduos elegíveis identificados pelos pesquisadores no Centro de Pesquisa Oncológica de Florianópolis nos períodos estabelecidos para a fase de recrutamento e coleta de dados que concordaram em participar. O consumo de menos de 80% das cápsulas durante as nove semanas foi um critério de exclusão.

4.1.3 Delineamento do estudo

Os indivíduos elegíveis foram randomizados em dois grupos de acordo com as técnicas anteriormente descritas nos estudos de Silva et al. (2012) e Mocellin et al. (2013): 1) grupo suplementado (GS) e grupo controle (GC). As técnicas de randomização diferiram entre estudos.

Brevemente, em Silva et al. (2012) os sujeitos foram alocados de acordo com o dia do mês em que foram encaminhados aos pesquisadores e em Mocellin et al. (2013) a randomização foi realizada usando uma ferramenta projetada para o Microsoft Office Excel® que alocou pacientes a um dos grupos multiplicando o número de registro do paciente na instituição por um número aleatório entre 0 e 1. O GS foi orientado a consumir 4 cápsulas por dia (2g /dia) de óleo de peixe por nove semanas, enquanto o GC não recebeu nem suplemento de óleo de peixe e nem um placebo.

O início do consumo de cápsulas de óleo de peixe ocorreu no mesmo dia do primeiro ciclo de quimioterapia, caracterizando o momento basal. Neste momento foi feita a coleta de dados de identificação (nome, sexo, data de nascimento, endereço e contato), de dados clínicos (localização do tumor, estágio clínico, presença de outras doenças, protocolo de quimioterapia prescrito e uso de outros fármacos) e hábito tabágico (Fumante, não fumante ou ex-fumante).

Os indivíduos foram instruídos a proceder com a ingestão das cápsulas 30 minutos antes das refeições principais acompanhadas de ingestão de água, duas vezes ao dia, ou seja, duas cápsulas antes de uma refeição principal e as duas restantes antes de outra refeição principal.

Nove semanas após o momento basal, após a administração de, pelo menos, dois ciclos de quimioterapia, caracterizou o momento final. Neste momento, os indivíduos do GS cessaram o consumo de cápsulas de óleo de peixe.

O cumprimento do protocolo de suplementação de óleo de peixe foi estabelecido através do consumo diário de cápsulas registradas pelos participantes em um formulário fornecido pelos pesquisadores e considerando as cápsulas restantes, caso houvesse. Além disso, no estudo de Mocellin et al. (2013), o perfil de ácidos graxos do plasma, incluindo as porcentagens de EPA e DHA, foi realizado de acordo com metodologia descrita.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Centro de Pesquisa Oncológica de Florianópolis e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Em abril de 2015, pelo menos 36 meses após o último recrutamento do estudo de Mocellin et al. (2013), foi realizada uma

pesquisa documental nos prontuários médicos dos pacientes para coletar informações referentes a desfechos clínicos durante e após a quimioterapia.

4.1.4 Suplemento dietético de óleo de peixe

O óleo de peixe foi oferecido sob a forma de cápsulas de 500 mg (Omega -3, Phytomare®, Governador Celso Ramos, SC, Brasil), com óleo de peixe extraído de salmão, cavala e sardinha, além de conter gelatina, glicerina e vitamina E. A dosagem experimental de 2 g/dia de óleo de peixe forneceu aproximadamente 600 mg/dia de EPA (360 mg/dia) e DHA (240 mg/dia).

4.1.5 Desfechos Clínicos estudados

As seguintes variáveis foram coletadas para caracterizar o curso clínico dos participantes após pelo menos 36 meses de inclusão na pesquisa:

a) Morte e, em caso de morte, dias entre a primeira quimioterapia até a ocorrência do evento (a data da morte foi considerada a data registrada no atestado de óbito);

b) Progressão da doença e, em caso de progressão da doença, tempo para a progressão da doença, definido como dias entre a primeira quimioterapia e o primeiro registro de progressão da doença feito por um médico;

c) Número de ciclos de quimioterapia administrados;

d) Número de dias em quimioterapia, considerando os dias do ciclo em que os medicamentos não foram administrados e os dias em que houve atraso na administração por toxicidade. Os dias em que houve uma interrupção do tratamento foram descontados;

e) Número de atrasos na administração da quimioterapia: atraso na administração de sessões programadas de quimioterapia devido a qualquer evento relacionado;

f) Número de interrupções da quimioterapia: cessação total não planejada da administração da quimioterapia;

g) Número de hospitalizações durante a quimioterapia: número de vezes que o paciente precisou ser hospitalizado (pelo menos 24 horas após admissão) enquanto realizava quimioterapia;

h) Antígeno carcinoembrionário (CEA): valores em ng/mL. Os valores basais correspondem a valores registrados antes do início da quimioterapia. Os valores finais são o primeiro valor CEA registrado após o término dos ciclos de quimioterapia planejados.

Apenas informações claras registradas nos prontuários foram consideradas válidas. Na presença de dúvidas sobre qualquer informação registrada, esta informação foi considerada perdida.

Para os pacientes com mais de 12 meses sem consulta médica na instituição e sem informações atualizadas sobre o estado clínico atual, foram considerados em acompanhamento aqueles com tal declaração na última informação registrada no prontuário. Foram considerados mortos, aqueles com atestados de óbito ou aqueles que estavam em cuidados paliativos no momento do último registro. Neste último caso, a data da morte foi considerada a data da última informação registrada.

4.1.6 Análise estatística

Os dados foram inseridos em uma planilha do Microsoft Office Excel® vs. 2013 (Microsoft, Washington, EUA) e transferidos com a ajuda do *software* Stat/Transfer® (Circle Systems Inc., Washington, EUA) para o *software* estatístico STATA v. 11.0 (Stata Corp., Texas, Estados Unidos) onde foram realizadas as análises estatísticas.

As variáveis “atraso na administração da quimioterapia”, “interrupção da quimioterapia”, “hospitalização durante a quimioterapia”, “progressão da doença” e “morte em três anos de acompanhamento” foram transformadas em variáveis dicotômicas (evento presente ou ausente). As variáveis “ciclos de quimioterapia”, “dias em quimioterapia”, “número de atrasos na administração da quimioterapia”, “tempo para a progressão da doença” e “tempo até a morte” foram tratadas como variáveis numéricas discretas, enquanto que “valores finais de antígeno carcinoembrionário (CEA)” e “Diferença de valores de antígeno carcinoembrionário (CEA) (valor final menos basal)” foram tratados como variáveis numéricas contínuas.

A simetria dos dados foi determinada utilizando o cálculo do coeficiente de variação [$CV = (SD / \text{média}) \times 100$], assumindo como variáveis assimétricas $CV \geq 50\%$.

O teste Qui-quadrado exato de Fisher foi usado para testar diferenças em variáveis dicotômicas de acordo com a exposição ao “suplemento de óleo de peixe”, no qual pelo menos uma categoria da tabela 2x2 apresentou menos de 5 observações. O teste Qui-quadrado de Pearson foi usado para variáveis dicotômicas, onde todas as categorias da tabela 2x2 apresentaram 5 ou mais observações, ou para testar diferenças nas frequências do “estádio clínico” de acordo com a exposição.

O teste t de Student ou o teste de Mann-Whitney foram utilizados para testar diferenças em variáveis contínuas de acordo com a exposição ao “suplemento de óleo de peixe”, considerando distribuição de dados simétrica ou assimétrica, respectivamente.

Para avaliar a influência do estágio clínico do câncer nos desfechos clínicos, foram realizadas análises estratificadas para esta variável.

A análise de poder foi calculada quando resultado significativo. Para isso, foi usado o *software* on-line OpenEpi, os valores médios do resultado, desvios padrão em cada grupo e o número de observações (n).

O nível de significância de $p < 0,05$ foi adotado em todas as análises.

Para a apresentação dos dados, utilizou-se média e desvio padrão se a distribuição dos dados fosse simétrica ou mediana e intervalo interquartil se assimétrica.

4.2 MÉTODOS REFERENTES AO OBJETIVO 2

4.2.1 Tipo de estudo

Revisão sistemática.

4.2.2 Delineamento do estudo

Esta revisão sistemática segue o diagrama de fluxo com 4 fases do PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and

Meta-Analyses) e é baseado no PRISMA Statement (MOHER et al., 2009). Apesar de ser uma revisão sistemática que também inclui estudos in vitro, todos os estudos avaliaram uma intervenção. A questão da pesquisa foi adaptada da PICO: População – células ou animais de estudos in vitro e in vivo e indivíduos em ensaios clínicos; Intervenção e Comparação – uso de um ácido graxo poli-insaturado n-3 e um tratamento anticâncer concomitantemente versus controle; Desfecho – parâmetros de estresse oxidativo.

4.2.2.1 Estratégia de pesquisa

Uma busca sistemática foi realizada no MEDLINE (via PubMed, National Library of Medicine, Bethesda, Maryland), usando as seguintes combinações de termos MeSH e outras palavras-chave: relacionadas ao câncer (cancer OR neoplasms OR tumor OR carcinoma OR neoplastic OR malignant), a intervenção com ácidos graxos n-3 (eicosapentaenoic OR docosahexaenoic OR EPA OR DHA OR omega-3 OR "fish oil" OR n-3 OR linolenic OR alpha-linolenic), aos tratamentos anticâncer (antineoplastic OR drug OR chemotherapy OR therapy OR anti-cancer OR radiotherapy OR radiation) e aos parâmetros de estresse oxidativo (oxidative OR oxidation OR oxides OR antioxidant OR catalase OR superoxide OR glutathione OR GSH OR peroxidation OR "lipid peroxidation" OR "lipid peroxides" OR "MDA" OR malondialdehyde).

Foi utilizada uma ampla estratégia de busca para evitar perda de informações; aspas permitiram pesquisas de termos ou expressões exatas, parênteses indicaram sinônimos. Foram incluídos filtros adicionais resultando em artigos apenas em inglês, espanhol ou português publicados até Agosto de 2017. Inicialmente, os títulos e resumos de todos os estudos identificados foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão.

4.2.2.2 Critérios de inclusão

Os artigos foram selecionados de acordo com títulos e resumos para escolher aqueles que apresentaram o assunto de interesse: efeitos dos ácidos graxos n-3 nos parâmetros de estresse oxidativo em linhagens

de células neoplásicas ou animais/indivíduos com câncer submetidos a um tratamento anticâncer.

Os artigos aparentemente elegíveis e sem acesso completo foram solicitados para os autores. Aqueles que responderam com os artigos completos tiveram esses incluídos na análise, os demais foram excluídos. Se o título e o resumo indicassem possível inclusão, os artigos foram lidos e avaliados por dois revisores independentes. Como critério de inclusão, estabelecemos: indivíduos, animais com câncer ou linhagens celulares neoplásicas suplementadas com alguma fonte de ácidos graxos poli-insaturados n-3; uso concomitante de algum tratamento anticâncer (por exemplo, quimioterapia, radioterapia) e avaliação de variáveis relacionadas ao estresse oxidativo. Deve-se destacar que os estudos foram excluídos se as variáveis de estresse oxidativo avaliadas não fossem o resultado da intervenção com n-3 e tratamento anticâncer aplicado concomitantemente.

4.2.2.3 Extração de dados

Os dados foram extraídos dos artigos elegíveis de forma independente por dois revisores e revisados. Os artigos foram consultados novamente em caso de divergência de opiniões. Uma planilha padronizada foi utilizado para a extração de dados, e os seguintes dados foram extraídos: tipo de estudo (in vitro, in vivo, ensaio clínico ou série de casos), suplemento utilizado, tipo de células, tumores ou características do paciente (localização do tumor), desenho do estudo, tratamento anticâncer utilizado e resultados relacionados ao estresse oxidativo. As alterações de resultados atribuídas à intervenção foram consideradas quando foram significativamente diferentes. Devido às diferenças nos desenhos dos estudos, métodos e características das populações, uma meta-análise não pode ser realizada.

4.3 MÉTODOS REFERENTES AO OBJETIVO 3

4.3.1 Tipo de estudo

Ensaio clínico randomizado, triplo-cego, controlado por placebo.

4.3.2 Delineamento do estudo

Esse presente estudo foi dividido em três momentos definidos como: momento basal, 9 semanas e um ano. No momento basal, foi feita a identificação dos pacientes, coleta de dados clínicos, avaliação de presença e graduação de eventos adversos, do *performance status*, aferição de dados antropométricos, marcadores tumorais e coleta de amostra sanguínea dos indivíduos alocados em dois grupos (Grupo Óleo de Peixe e o Grupo Placebo). O Grupo Óleo de Peixe (GOP) recebeu cápsulas de óleo de peixe e o Grupo Placebo (GP) recebeu cápsulas contendo azeite de oliva, ambos receberam igualmente as orientações de consumo. O momento basal foi anterior à quimioterapia, mais próximo possível do início da mesma para os dois grupos, a suplementação ocorreu durante o tratamento quimioterápico. Nove semanas após o momento basal, ocorreu nova avaliação de presença e graduação de eventos adversos, do *performance status*, aferição de dados antropométricos e coleta de amostra sanguínea dos grupos óleo de peixe (GOP) e placebo (GP), e caracterizou o fim do consumo das cápsulas. Após 6 meses foram coletados dados de sobrevida e 1 ano do início do tratamento quimioterápico e da suplementação com óleo de peixe ou placebo foram coletados dados de sobrevida, resposta ao tratamento e marcadores tumorais. Durante todo o período de acompanhamento, o pesquisador e colaboradores mantiveram contato com os indivíduos participantes. O contato foi feito no CEPON, onde realizaram o tratamento quimioterápico e por via telefônica.

4.3.3 Amostra do estudo

O número amostral foi atingido por saturação temporal com início da coleta em 1 março de 2015 e término em 31 de março de 2016. Utilizou-se para o cálculo do número amostral os resultados obtidos com a realização do objetivo 1 dessa tese. Para isso se utilizou o desfecho “tempo para progressão da doença” como base, visto que teve diferença significativa entre os grupos. Embora não seja uma variável que foi avaliada no objetivo 3, está relacionada a resposta ao tratamento. Dessa forma, utilizando a ferramenta online OpenEpi, a amostra necessária em cada grupo é de 10 indivíduos, considerando 15% de perdas, erro alfa de

0,05 e poder de 80%. Os indivíduos participantes do estudo foram recrutados e atendidos no Centro de Pesquisa Oncológica de Florianópolis – Santa Catarina (CEPON) e tinham previsão para início do tratamento quimioterápico. Para seleção da amostra foram considerados os seguintes critérios:

– Critérios de inclusão: diagnóstico de câncer gastrointestinal (gástrico, intestino, reto e canal anal), idade entre 18 e 70 anos, *performance status* (ECOG) menor ou igual a 2, estar apto a iniciar o tratamento quimioterápico no CEPON.

– Critérios não-inclusão: já ter realizado quimioterapia e/ou radioterapia, impossibilidade de ingestão oral, possuir diagnóstico de doença infectocontagiosa, ser alérgico a peixe e/ou derivados, ser gestante, estar em tratamento com estatinas, ter feito uso de óleo de peixe e/ou outro suplemento contendo ômega-3 ou outro tipo de ácido graxo poli-insaturado nos seis meses prévios ao período do estudo, uso contínuo de suplementos que contenham antioxidantes, limitações cognitivas para entender o protocolo do estudo e responder as questões.

Foram consideradas perdidas indivíduos elegíveis que não aceitarem participar do estudo ou que desistirem de participar durante a realização do mesmo.

A triagem dos indivíduos aptos a participar do estudo foi feita nos agendamentos de primeira consulta e de quimioterapia. Os indivíduos foram encaminhados ao serviço de nutrição. No setor de nutrição, os pacientes tiveram conhecimento do estudo, receberam informações quanto ao desenho e foram convidados a participar. Foi apresentado o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO A) e os que aceitaram participar entregaram assinado.

4.3.4 Grupos do estudo

Os indivíduos foram alocados de forma randomizada em dois grupos: Grupo Óleo de Peixe e Grupo Placebo. O GOP foi formado por pacientes que receberam suplementação nutricional com cápsulas de óleo de peixe, duas cápsulas por dia, totalizando 2,5 g/dia de óleo de peixe, durante nove semanas. Enquanto que o GP recebeu duas cápsulas por dia contendo azeite de oliva, totalizando 2 g, também durante nove semanas. A randomização dos pacientes foi feita utilizando o *software*

estatístico STATA® version 13.0 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA). A randomização foi estratificada por sexo e localização tumoral para que cada grupo ficasse com número equivalente de homens e mulheres. As cápsulas foram acondicionadas em frascos iguais, com um código para cada frasco. Os códigos foram gerados com auxílio da ferramenta de randomização e uma pessoa que não estava incluída na realização da pesquisa foi responsável pela codificação. A randomização foi feita em blocos, cada bloco tinha dois códigos (cada um correspondente a um dos grupos do estudo) que foram sorteados a dois indivíduos consecutivos, de maneira que os grupos mantivessem números semelhantes de indivíduos no decorrer da pesquisa. Isso proporciona a cada grupo um integrante a cada dois indivíduos que aderissem à pesquisa.

4.3.5 Caracterização da intervenção e do placebo

A suplementação do óleo de peixe foi realizada por meio do consumo de duas cápsulas de óleo de peixe por dia com 1,25 g de óleo cada (Tabela 1). As cápsulas são compostas por extrato de ácidos graxos poli-insaturados marinhos ômega 3, gelatina (gelificante) e glicerina (umectante). O produto é registrado no Ministério da Saúde com o número: 6.5204.0034.001-0 (Ômega-3 Concentrate, 2014). O placebo consistiu na suplementação de duas cápsulas por dia contendo azeite de oliva. Os ingredientes são azeite de oliva extravirgem (*Olea europaea*) e a cápsula é composta por gelatina (gelificante), glicerina (umectante) e água (Tabela 1). O produto também é registrado no Ministério da Saúde com o número: 6.5204.0082.001-3. Destaca-se, que o óleo de peixe encapsulado, assim como o azeite de oliva são considerados suplementos nutricionais de acordo com a Portaria No 19, de 16 de março de 1995 (BRASIL, 1995).

Tabela 1- Informação nutricional das cápsulas de óleo de peixe e de azeite de oliva.

	Azeite de Oliva Quantidade de 2 g (2 cápsulas)	Óleo de Peixe Quantidade de 2,5 g (2 cápsulas)
Valor Calórico (Kcal)	20	26
Proteínas (g)	0,6	0,7
Gorduras Totais (g)	2,0	2,50
Gorduras Monoinsaturadas	1,4	-
Ácido Oleico (g)	1,1	0
Gorduras poli-insaturadas (g)	0,2	1,50
Ácido docosahexaenóico - DHA (mg)	0	550
Ácido eicosapentaenóico - EPA (mg)	0	1000

Fonte: Rótulos dos suplementos (Cápsulas de Oliveira, 2014 e Ômega 3 Concentrate, 2014).

4.3.6 Coleta de dados

Os indivíduos participantes do estudo foram identificados e caracterizados com auxílio de instrumento (APÊNDICE A) por meio das seguintes informações:

4.3.6.1 Dados pessoais e clínicos

Os dados pessoais incluíram: nome completo, data de nascimento, sexo, endereço residencial, telefone, e-mail, número do prontuário do CEPON. E os dados clínicos foram compostos por: data do diagnóstico, localização tumoral, estadiamento, protocolo do tratamento, fármacos utilizados e comorbidades associadas. Essas informações foram obtidas através do prontuário do paciente no CEPON, bem como perguntando para o paciente ou para seu acompanhante.

4.3.6.2 Hábito tabágico

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer no material disponibilizado “Registros Hospitalares de Câncer: Rotinas e Procedimentos”, a avaliação do hábito tabágico do paciente com câncer deverá levar em consideração toda a vida do paciente e não apenas a situação atual. Além disso, devem ser avaliados todos os tipos de tabagismo: cigarro, cigarrilha, charuto, cachimbo e mascar. Deve ser

classificado como tabagista o indivíduo que fizer uso desses e como não fumante o fumante eventual e aquele que nunca fez uso de tais produtos (BRASIL, 2000).

Sendo assim, incrementando o proposto pelo INCA e baseado nas classificações e critérios usados por Tsao et al. (2006) escolheu-se classificar os pacientes em:

- Nunca Fumante: nunca fumou cigarros na vida nem outro produto do tabaco ou fumou menos que 100 cigarros durante o curso de vida;
- Ex-fumantes: história de fumo mas que tenham parado pelo menos 1 ano antes do diagnóstico;
- Fumantes: aqueles que fumaram ativamente no ano prévio ao diagnóstico (incluindo os que ainda fumam durante o tratamento e aqueles que pararam em menos de um ano antes do diagnóstico e tratamento).
- Fumante Passivo: nunca fumou cigarros na vida nem outro produto do tabaco ou fumou menos que 100 cigarros durante o curso de vida, porém tem um cônjuge ou mora com um fumante.

4.3.6.2 Avaliação de presença e graduação de eventos adversos

Foi realizada a avaliação de presença e graduação de eventos adversos no momento basal, para posterior avaliação após nove semanas, com a finalidade de avaliar o aparecimento e graduação desses eventos relacionados ao tratamento em cada um dos grupos de estudo. Os quimioterápicos mais comumente utilizados nos pacientes diagnosticados com câncer gastrointestinal no CEPON são os seguintes: oxaliplatina, capecitabina e fluorouracil, cisplatina e irinotecano. Como toxicidades comuns entre os quimioterápicos utilizados estão as hematológicas e gastrointestinais.

Desse modo, para realização das avaliações no momento basal e após nove semanas, foi utilizado o *Common Terminology Criteria for Adverse Events* v 4.0 (CTCAE), material disponibilizado pelo National Cancer Institute, dos Estados Unidos da América, que descreve a terminologia adequada para cada evento adverso relacionado ao tratamento de câncer. Além disso, fornece graduações para o melhor relato desses eventos, onde cada graduação refere-se à gravidade dos mesmos. O CTCAE disponibiliza diversos eventos adversos

relacionados a vários sistemas do organismo, dentro dos eventos gastrointestinais, por exemplo, são mais de 100 eventos com definições e graduações. Considerando isso, escolheu-se avaliar os eventos adversos hematológicos e gastrointestinais em comuns que foram listados como ocorrências no uso de cada quimioterápico. As avaliações dos eventos adversos gastrointestinais foram realizadas por entrevista com o paciente e/ou acompanhante antes do primeiro ciclo e após nove semanas de quimioterapia. Já para a avaliação dos eventos adversos hematológicos, visto que os pacientes realizam hemograma de rotina antes de cada ciclo de quimioterapia, foram coletadas as informações desses exames realizados antes do primeiro ciclo e após nove semanas de tratamento. Os pacientes foram avaliados e classificados de acordo com os Quadros 2 e 3 a seguir:

Quadro 2 - Avaliação dos eventos adversos relacionados com o trato gastrointestinal (continua).

Evento Adverso	Definição	Gradação				
		1	2	3	4	5
Constipação	Caracterizada pela evacuação irregular, não frequente ou difícil.	Sintomas ocasionais ou intermitentes, uso ocasional de supositórios, laxativos, enema ou modificações alimentares.	Sintomas persistentes com uso regular de laxativos ou enemas, limitando AVD instrumental.	Obstipação com evacuação manual indicada, limitando AVD de cuidados próprios.	Consequências que ameaçam a vida, intervenção urgente indicada.	Morte.
Diarreia	Caracterizada por evacuações frequentes e líquidas.	Aumento < 4 evacuações por dia comparado com basal; leve aumento no débito da ostomia comparado com basal.	Aumento de 4 a 6 evacuações por dia comparado com basal; aumento moderado no débito da ostomia comparado com basal.	Aumento ≥ 7 evacuações por dia comparado com basal; incontinência; indicação de hospitalização; aumento grave no débito da ostomia comparado com basal.	Consequências que ameaçam a vida; intervenção urgente indicada.	Morte.

Quadro 2 - Avaliação dos eventos adversos relacionados com o trato gastrointestinal (continuação).

		Gradação				
Mucosite Oral	Caracterizada por inflamação da mucosa oral.	Assintomática ou sintomas leves; intervenção não indicada.	Dor moderada; não interfere com ingestão oral; modificação de dieta indicada.	Dor grave; interfere com ingestão oral.	Consequências que ameaçam a vida; intervenção urgente indicada.	Morte.
Náusea	Caracterizada por enjoos e /ou pela vontade de vomitar.	Perda de apetite sem alteração nos hábitos alimentares.	Diminuição da ingestão oral sem perda de peso significativa, desidratação ou desnutrição.	Ingestão calórica ou de fluidos inadequada; nutrição enteral; nutrição parenteral ou hospitalização indicada.	-	-
Vômitos	Caracterizada pelo ato reflexivo de ejetar os conteúdos do estômago pela boca.	1-2 episódios (separados por 5 minutos) em 24 hrs	3-5 episódios (separados por 5 minutos) em 24 hrs.	≥ 6 episódios (separados por 5 minutos) em 24 hrs, nutrição enteral; nutrição parenteral ou indicação de hospitalização	Consequências que ameaçam a vida, indicação de intervenção urgente.	Morte.
Anorexia*	Caracterizada pela perda de apetite.	Perda de apetite sem alteração nos hábitos alimentares.	Ingestão oral alterada sem perda de peso significativa ou desnutrição; indicação de suplementos nutricionais orais.	Perda de peso significativa ou desnutrição (por ex. Ingestão inadequada de calorias e/ou fluidos); nutrição enteral ou parenteral indicada.	Consequências que ameaçam a vida; intervenção urgente indicada.	Morte.

*Incluída em eventos adversos relacionados a desordens nutricionais e do metabolismo; AVD= Atividades da Vida Diária

Fonte: National Cancer Institute (2010).

Quadro 3 - Avaliação dos eventos adversos hematológicos.

		Gradação				
Evento Adverso	Definição	1	2	3	4	5
Anemia	Caracterizada pela redução da quantidade de hemoglobina em 100ml de sangue.	Hgb <10,0 g/dL	Hgb <10,0 – 8,0 g/dL	Hgb <8,0 g/dL; indicação de transfusão	Consequências que ameaçam a vida, intervenção urgente indicada.	Morte.
Diminuição na contagem de linfócitos	Caracterizada pela redução do número de linfócitos no sangue.	<800/mm ³	<800 – 500/mm ³	<500 – 200/mm ³	<200/mm ³	-
Diminuição na contagem de plaquetas	Caracterizada pela redução do número de plaquetas no sangue.	<75000/mm ³	<75000 – 50000/mm ³	<50000 – 25000/mm ³	<25000/mm ³	-
Diminuição na contagem de leucócitos	Caracterizada pela redução do número de leucócitos no sangue.	<3000/mm ³	<3000 – 2000/mm ³	<2000 – 1000/mm ³	<1000/mm ³	-
Diminuição na contagem de neutrófilos	Caracterizada pela redução do número de neutrófilos no sangue.	<1500/mm ³	<1500 – 1000/mm ³	<1000 – 500/mm ³	<500/mm ³	-

Hgb = Hemoglobina

Fonte: National Cancer Institute (2010).

As graduações referem-se à gravidade do evento adverso, o CTCAE possui graduações de 1 a 5 com descrições clínicas únicas baseadas em cada evento de acordo com o guia a seguir:

- Grau 1: Leve; assintomático ou sintomas leves; apenas observações clínicas ou diagnósticas; intervenção não indicada.
- Grau 2: Moderado; indicada intervenção mínima, local ou não invasiva; limitante da AVD instrumental.

– Grau 3: Grave ou significativa, mas não oferece consequências imediatas que ameçam a vida; indicada hospitalização ou prolongamento da hospitalização; incapacitante; limitante da AVD de cuidados próprios.

– Grau 4: Consequências que ameçam a vida; intervenção urgente indicada.

– Grau 5: Morte relacionada ao evento adverso.

O “ponto e vírgula” (;) indica “ou” na descrição das graduações. O traço (-) indica que o grau não está disponível naquele evento. Nem todas as graduações são apropriadas para todos os eventos adversos, por isso, alguns têm menos de 5 graduações disponíveis para seleção.

Os conceitos de Atividades da Vida Diária (AVD) propostas pelo CTCAE são:

– AVD instrumental: Refere-se à preparação de refeições, compras de roupas ou compras no mercado, usar o telefone, administrar contas, etc.

– AVD de cuidados próprios: Refere-se à capacidade de tomar banho, vestir-se, alimentar-se, ir ao banheiro, tomar medicações sem auxílio e não estar acamado.

No caso da avaliação do evento diarreia, o CTCAE faz as avaliações de graduação comparando com o tempo basal, logo, a primeira avaliação do paciente nesse quesito consistiu apenas pelo questionamento do número de evacuações por dia e a consistência das mesmas. As avaliações em todos os momentos foram feitas com auxílio dos Quadros 2 e 3 e do instrumento apresentado no APÊNDICE A.

Além disso, para que pudesse haver o acompanhamento de outros eventos adversos, assim como das consequências dos possíveis eventos adversos que possam ter surgido, também foram coletados os seguintes dados: hospitalizações, reduções da dose dos quimioterápicos (% da redução), atraso na administração dos quimioterápicos (duração do atraso), interrupção da quimioterapia (momento da interrupção) por conta dos eventos adversos.

4.3.6.3 Avaliação do Performance Status

A escala do *performance status* é usada por profissionais de saúde e pesquisadores para avaliar o grau em que a doença afeta as habilidades diárias, além de ajudar a determinar o tratamento e

prognóstico. Os indivíduos foram avaliados e classificados nos momentos basal e após 9 semanas de acordo com o apresentado no Quadro 4:

Quadro 4 - Escala ECOG de *Performance Status*.

Grau	Definição
0	Totalmente ativo e sem restrições de atividade.
1	Restrição a atividades físicas rigorosas; mas deambula e é capaz de trabalhos leves ou de natureza sedentária.
2	Deambula e é capaz de realizar todos os autocuidados, mas incapaz de realizar qualquer atividade de trabalho, em pé 50% ou mais das horas em que está acordado.
3	Capaz de realizar somente autocuidados limitados, confinado ao leito ou à cadeira mais de 50% das horas em que está acordado.
4	Completamente incapaz. Não realiza autocuidados básicos, totalmente confinado ao leito ou à cadeira.

Fonte: Oken et al. (1982).

4.3.6.4 Coleta de amostra sanguínea

As amostras de sangue dos indivíduos foram obtidas por punção venosa na região cubital do antebraço utilizando tubos a vácuo. A coleta de amostra sanguínea foi feita por profissionais capacitados no CEPON, as análises descritas nos itens seguintes foram realizadas no Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas (LIDoC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pelos pesquisadores, que também ficaram responsáveis pelo transporte e armazenamento das amostras.

4.3.6.4.1 Preparo das amostras

Foi realizado o hemolisado, a separação do plasma, de hemácias e leucócitos do sangue total. Os tubos de coleta foram centrifugados a 400 g por 7 minutos em temperatura ambiente para separação do plasma. As hemácias foram coletadas e parte delas lavadas e depois adicionada solução hemolisante (solução de Sulfato de Magnésio

(MgSO₄ 4) 4 nM e Ácido Acético 1 nM) a 100 µL de células para realização do hemolisado. Após a separação do plasma de uma alíquota de sangue total, as hemácias foram lisadas e lavadas da amostra, restando apenas os leucócitos para armazenamento. As amostras de hemolisado, plasma, hemácias e leucócitos foram armazenadas em freezer -80°C para análises posteriores descritas a seguir.

4.3.6.4.2 *Análise da atividade da enzima Catalase*

A atividade da enzima catalase é obtida utilizando a velocidade de consumo de peróxido de hidrogênio adicionado à amostra. Foi realizada através do monitoramento da decomposição do peróxido de hidrogênio durante 2 minutos em 240 nm (AEBI, 1984). Em placa de 96 poços sensível a UV foram adicionados tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), peróxido de hidrogênio 0,3 M e amostra do hemolisado. A variação da absorbância a 240 nm por unidade de tempo foi registrada e utilizada para o cálculo da atividade enzimática da catalase. Para normalização foi utilizada a concentração de hemoglobina na amostra.

4.3.6.4.3 *Análise da atividade da enzima Glutathione Peroxidase*

A amostra utilizada neste ensaio foi o hemolisado. A atividade da GPx pode ser medida pela taxa de oxidação de NADPH na presença de GSH e glutathione reductase (WENDEL, 1981). O ensaio foi realizado em placas de 96 poços e normalizado pela concentração de hemoglobina na amostra. A atividade foi representada como U/mg de hemoglobina.

4.3.6.4.4 *Análise da atividade da enzima Superóxido Dismutase*

A determinação da superóxido dismutase (SOD) é baseada na inibição da autooxidação do pirogalol (MARKLUND & MARKLUND, 1974). O princípio do método é a competição da oxidação do pirogalol pelo radical superóxido com a dismutação desse radical pela SOD. A quantificação é feita em unidades relativas, sendo, uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% oxidação do pirogalol. A atividade foi representada como U/mg de hemoglobina.

4.3.6.4.5 Quantificação de Hemoglobina

A hemoglobina foi determinada em amostras do lisado por reação colorimétrica de ponto final de acordo com Drabkin e Austin (1934) e Henry, Cannon e Winkelman (1974). O Fe (III) do grupo heme da hemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina é oxidado ao estado férrico pelo ferricianeto formando hemiglobina (Hi), que se combina com o cianeto ionizado para produzir cianeto de hemiglobina (HiCN), o qual é medido em 540 nm.

4.3.6.4.6 Determinação de hidroperóxidos lipídicos no plasma e nos leucócitos

Foram obtidos pelo método descrito por Nourooz-Zadeh et al. (1994), as amostras foram homogeneizadas com metanol numa diluição de 1:5 e então centrifugadas a 5000 g por 5 minutos. Para cada poço de uma placa foram transferidos o sobrenadante, num total de 6 poços por amostra, em 3 desses poços se adicionou TPP (os hidroperóxidos são convertidos em hidroxila pela trifetilfosfina) e nos 3 restantes, adiciona-se metanol. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente; foi adicionado FOX-2 (constituído de xilenol laranja, hidroxitolueno butilado, ácido sulfúrico e sulfato ferroso de amônio, em metanol 90%) e incubado novamente a temperatura ambiente.

Os cátions ferrosos presentes na solução FOX-2 foram oxidados pelos hidroperóxidos na amostra, não somente pelos hidroperóxidos lipídicos, formando Fe^{3+} sendo que nas amostras já acrescentadas de TPP essa oxidação foi menor. A leitura das placas foi a 550 nm num leitor de microplacas (Apollo-8 Microplate Absorbance Reader LB 912-Berthold Technologies).

É subtraído o valor da absorbância das amostras tratadas com TPP (não possuem hidroperóxidos lipídicos) do valor da absorbância das amostras as quais não foi acrescentado TPP, obtendo somente a quantidade de ferro oxidado por hidroperóxidos lipídicos. Foi realizada curva padrão com quantidades conhecidas de peróxido de hidrogênio, submetidas aos mesmos procedimentos das amostras, sem acrescentar TPP. Os resultados foram expressos em nmol/mg de lipídeos.

4.3.6.4.7 Quantificação de Lipídeos

A quantificação de lipídeos totais na amostra foi realizada com base no método proposto por Cheng, Zheng e Vandergheynst (2011). Consiste da utilização do método colorimétrico sulfo-phospho-vanilina (SPV), que é caracterizado por uma solução de reação que é mantida na placa de 96 poços durante todo o experimento. Com auxílio de uma curva padrão a concentração em mg/ml de lipídeos na amostra é obtida.

4.3.6.4.8 Análise da composição de ácidos graxos nas hemácias

A análise do perfil de ácidos graxos celular teve como finalidade a avaliação da incorporação lipídica dos AGPI n-3 no plasma após a ingestão das cápsulas. Além de sua relevância como marcador da ingestão e conseqüentemente da adesão à suplementação, essa avaliação limita o possível viés de variabilidade interindividual do metabolismo de lipídeos (HAJJAJI; BOUGNOUX, 2013). Somado a isso, a avaliação de incorporação pode refletir a disponibilidade de AGPI n-3 para os tecidos, incluindo tumores (BOUGNOUX et al., 2009). Embora não tenha sido feita a avaliação de incorporação em tecidos tumorais, com suplementação oral de AGPI n-3 a presença de DHA foi aumentada rapidamente e estabilizou-se no período de aproximadamente um mês no tecido tumoral de ratos. Se padrão semelhante for observado em humanos, pode-se considerar que os efeitos desses ácidos graxos nos tumores podem ser avaliados a partir de um mês após o início da suplementação (HAJJAJI; BOUGNOUX, 2013).

O perfil de ácidos graxos eritrocitários foi determinado por cromatografia líquida de alta performance (High Performance Liquid Chromatography – HPLC), segundo Nishiyama-Naruke et al. (1998). Para extração lipídica foi utilizada uma adaptação da metodologia descrita por Folch et al (1957). Inicialmente a amostra foi homogeneizada com Clorofórmio-metanol (2:1) logo após adicionada de metanol e centrifugada por 10 minutos, 5000 g, transferido o sobrenadante para um novo tubo e desprezando o infranadante. Realizou-se novamente uma lavagem com a adição de Clorofórmio e água destilada. A amostra foi agitada e depois descansada por 10

minutos e após a reconstituição espontânea do sistema bifásico, o sobrenadante foi removido e descartado. Foi lavada 3 vezes com alíquotas de 1 ml da FSP (Solução de Folch – Fase Superior Pura Suplementada). Cada amostra foi agitada e centrifugada e, após o descarte da fase superior (hidrometanólica), a fase orgânica foi evaporada com nitrogênio gasoso.

Para saponificação dos extratos lipídicos, esses foram ressuspensos em metanol e saponificados com solução alcalina em metanol (hidróxido de sódio 1 M em metanol a 90%), a 37 °C por 2 horas, em banho-maria sob agitação (NISHIYAMA-NARUKE et al, 1998). A solução alcalina foi então acidificada até aproximadamente pH 3,0, com ácido clorídrico 1 M. Os ácidos graxos em solução foram extraídos 3 vezes com hexano. O solvente foi evaporado em nitrogênio gasoso em seguida foi realizada a derivatização com BMMC (Bromo metil metoxi coumirin).

A reação de derivatização foi baseada no método descrito por Abushufa, Reed e Weinkove (1994). O reagente 1 foi preparado adicionando-se BMMC em acetonitrila. O reagente 2 foi preparado adicionando-se 18-crown-6 e carbonato de potássio em acetonitrila. O reagente 2 foi sonicado por 30 minutos e mais acetonitrila foi adicionada. O sobrenadante foi separado do precipitado e a solução foi estocada a 4-8 °C. As amostras contendo ácidos graxos a serem derivatizadas foram reconstituídas em acetonitrila e homogeneizadas em vórtex. Após 30 segundos, foram adicionados nas amostras o reagente 1 e o reagente 2, acetonitrila e foram homogeneizadas durante 30 segundos e aquecidas por 15 minutos a 60°C. Após derivatização, pequenas alíquotas dessa solução derivatizada, foram injetadas em um sistema HPLC, separadas em coluna analítica de fase reversa: Sigma®-MV-C8 4,6 mm i.d.x 25 cm com partículas de 5 µm (Supelco®). A análise cromatográfica foi efetuada com módulo de separação Waters Alliance e2695 composto por bomba quaternária, degaseificador, detector amperométrico eletroquímica (Waters, Milford, MA, EUA). Foram injetados derivados diluídos, que foram eluídos isocraticamente através do gradiente binário de acetonitrila e água (70-30%) em 80 minutos de corrida em temperatura de 18 à 21°C. Os compostos foram detectados fluorimetricamente pelo detector de fluorescência (2475 multi fluorescence detector - Waters), com excitação a 325 nm e

emissão a 398 nm e os dados registrados e integrados pelo *software* Empower Pro Version 2.0. Os dados estão expressos em porcentagem. Foi utilizada para a curva padrão uma mistura de ácidos graxos na concentração de 40 µg/mL (mirístico, palmitoleico, α-linolênico, esteárico, oleico, araquidônico, linoleico, palmítico, EPA e DHA).

4.3.6.5 Marcadores Tumorais CEA e CA 19.9

Os valores dos marcadores tumorais CEA e CA 19.9 foram coletados dos prontuários dos pacientes no CEPON quando disponíveis. Os valores para o momento basal foram os mais próximos registrados antes do início do tratamento. E os valores finais foram aqueles coletados após um ano de inclusão no estudo, para isso foram usados os valores registrados nos prontuários mais próximos dessa data.

4.3.6.6 Análise de Sobrevida

Após 6 meses e 1 ano do início do tratamento, foram obtidos dados de sobrevida. Para isso foi feita a busca dessa informação no prontuário do CEPON. Caso óbito fosse constatado o número de dias passados da inclusão do estudo até o óbito foi registrado.

4.3.6.7 Resposta ao Tratamento

Após um ano do início do tratamento foi obtido nos prontuários dos pacientes no CEPON dados de resposta ao tratamento sendo eles: resposta parcial, resposta completa, em seguimento, doença em progressão e recidiva. Foi coletado o dado registrado no prontuário do paciente pelo médico responsável.

4.3.7 Tratamento e análise dos dados

Os dados foram organizados e registrados em banco de dados no programa LibreOffice versão 5.1.6.2. O banco de dados foi transformado mediante o *software* Stat-Transfer® (Circle Systems, Seattle, WA, Estados Unidos) e a análise estatística foi realizada no

programa estatístico STATA® versão 11.0 para Windows (StataCorp, Texas, Estados Unidos).

As variáveis quantitativas foram tratadas como: média e desvio padrão se a distribuição foi simétrica, ou mediana e intervalo interquartil se foi assimétrica. As variáveis categóricas foram descritas em categorias e frequência absoluta e relativa a partir do aparecimento nos grupos. Para avaliação da distribuição dos dados foi usado o coeficiente de variância e aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo a hipótese nula de que a variável segue distribuição normal; se resultado $<0,05$, rejeita-se normalidade dos dados. Para comparar os efeitos da intervenção sobre as variáveis quantitativas, como todas foram assimétricas, foram usados os testes de Mann-Whitney ou de Wilcoxon para dados pareados. Para as variáveis qualitativas foi usado o teste qui-quadrado, qui-quadrado com correção de Yates e Teste Exato de Fisher de acordo com a distribuição dos dados. ANCOVA foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos para os desfechos contínuos controlando os valores finais com os valores obtidos no momento basal, para isso, os dados foram transformados em logaritmo natural. Para dados de sobrevida, foi utilizado o método de Kaplan-Meier com teste de log-rank para comparar diferenças entre os grupos. Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$). O cálculo de tamanho de efeito foi feito utilizando os resultados do eta-squared (η^2) transformados em Cohen's d. Tamanhos de efeito de 0,2 foram considerados pequenos, 0,5 foram considerados médios e 0,8 foram considerados grandes.

4.3.7.1 Variáveis do estudo

Considerando os objetivos deste estudo, são apresentadas no Quadro 5 as variáveis do estudo, seus respectivos indicadores e sua classificação teórica.

Quadro 5 - Variáveis, seus indicadores e classificações utilizadas para o modelo de análise (continua).

Variáveis	Indicadores	Classificação
Sexo	Masculino Feminino	Independente, qualitativa nominal dicotômica
Idade	Anos	Independente quantitativa discreta
Localização Tumoral	Gástrico Cólon Reto/sigmoide	Independente, qualitativa nominal Politômica
Estadiamento (TNM)	II, III, IV	Independente qualitativa ordinal
Hábito tabágico	Nunca Fumante Ex-fumante Fumante Fumante Passivo	Independente qualitativa nominal politômica
Gradação de eventos adversos gastrointestinais	1 2 3 4	Dependente qualitativa politômica
Gradação de eventos adversos hematológicos	1 2 3 4	Dependente qualitativa politômica
Hospitalização, redução da dose, atraso e interrupção da quimioterapia por eventos adversos	Sim Não	Dependente qualitativa dicotômica
<i>Performance Status</i>	1 2 3 4	Dependente qualitativa politômica
Catalase	U/mg de hemoglobina	Dependente quantitativa contínua
Glutaciona Peroxidase	U/mg de hemoglobina	Dependente quantitativa contínua
Superóxido Dismutase	U/mg de hemoglobina	Dependente quantitativa contínua
Hidroperóxidos lipídicos no plasma e em leucócitos	nmol/mg de lipídeos	Dependente quantitativa contínua
CEA	ng/ml	Dependente quantitativa contínua
CA 19.9	U/ml	Dependente quantitativa contínua

Quadro 5 - Variáveis, seus indicadores e classificações utilizadas para o modelo de análise (continuação).

Variáveis	Indicadores	Classificação
Sobrevida	Dias até evento	Dependente quantitativa discreta
Composição de ácidos graxos em eritrócitos	% de EPA e DHA	Dependente quantitativa contínua

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.8 Procedimentos éticos da pesquisa

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSC e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Oncológicas de Florianópolis (CEPON), instituição coparticipante, com o número CAAE: 24096013.7.0000.0121 (ANEXO B). Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após a leitura conjunta e sanadas todas as possíveis dúvidas (ANEXO A).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo traz os resultados da tese em ordem cronológica de execução. Inicialmente é apresentado o primeiro artigo referente à tese, no formato publicado no periódico *Nutrition and Cancer* (FI=2.241) em dezembro de 2015. Esse primeiro artigo foi redigido em 2015, durante o período de coleta de dados no CEPON. Para isso foram utilizados dados dos pacientes incluídos em duas pesquisas anteriores do grupo de pesquisa. Dessa maneira foi possível obter resultados do efeito da suplementação durante nove semanas após um período maior de follow-up (pelo menos 36 meses), visto que o primeiro estudo teve a coleta de dados realizada em 2009.

Em seguida, está o manuscrito do segundo artigo resultante da tese. Essa revisão sistemática foi proposta como uma maneira de avaliar o efeito do tratamento concomitante de ácidos graxos n-3 e agentes anticâncer no estresse oxidativo tanto de tumores quanto de células saudáveis. A revisão sistemática, que inclui tanto estudos in vitro, in vivo e em humanos, busca entender por quais mecanismos os ácidos graxos n-3 podem exercer efeitos em tecidos neoplásicos.

Por fim, está o manuscrito do terceiro artigo, a ser submetido ao periódico *Clinical Nutrition* (FI=4.487). Estão contemplados nesses resultados os requisitos de originalidade, contribuição científica e prática de uma tese de doutorado.

TITLE**Fish oil supplementation during chemotherapy increases posterior time to tumor progression in colorectal cancer****AUTHORS**

Carolina de Quadros Camargo^a, Michel Carlos Mocellin^a, Juliana de Aguiar Pastore Silva^b, Maria Emilia de Souza Fabre^c, Everson Araújo Nunes^a, Erasmo Benicio Santos de Moraes Trindade^a

^a Nutrition Graduate Program - Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^bSciences Department, Antônio Prudente Foundation, São Paulo, Brazil

^cOncology Research Center – Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

ABSTRACT

AIMS: Evaluate clinical outcomes during and after chemotherapy in colorectal cancer patients supplemented with fish oil during the first nine weeks of treatment. METHODOLOGY: Thirty individuals never submitted to chemotherapy were randomized into: Supplemented Group (SG), which received 2 g/day of fish oil (0.6 g/day of EPA and DHA) for 9 weeks or Control Group (CG), which received neither fish oil nor placebo. Outcomes assessed were: number of chemotherapy cycles administered; days undergoing chemotherapy; number of delays and interruptions in the administration of chemotherapy; number of hospitalizations during chemotherapy; tumor progression; values of Carcinoembryonic Antigen (CEA); days until events (death and progression); and 3 years survival. RESULTS: Time to tumor progression was significantly longer in SG [SG: 593 days (\pm 211.5) vs CG: 330 days (\pm 135.1); $p = 0.04$], other outcomes did not differ between groups. Subjects with advanced cancer who received fish oil presented longer time to tumor progression and lower CEA values after chemotherapy, however these differences were not statistically significant. CONCLUSION: Supplementation with 2 g/day of fish oil for

the first 9 weeks of chemotherapy may contribute to delay in tumor progression in colorectal patients, possibly by enhancing the antineoplastic action of the chemotherapeutic drug.

KEYWORDS

Colorectal cancer; fish oil; tumor progression; clinical outcome; chemotherapy.

BACKGROUND

Colorectal cancer (CRC) is currently one of the most incident types of cancer worldwide. In 2012 this cancer was third in the incidence ranking, with approximately 1.4 million new cases. Mortality in such disease is considered low, occurring in 8.5% of cases (694,000 deaths in 2012) (1), and survival rate in five years, in general, is approximately 65% varying according to tumor stage (90.1 % to located tumors and 13.1% to metastatic tumors) (2).

The treatment of CRC consists mainly of surgical resection followed by chemotherapy and/or adjuvant radiotherapy. However, the CRC is often refractory to these conventional treatments. Over 50% of patients develop recurrence or metastasis within two years after tumor resection (3). In this regard, new approaches that can optimize treatment outcome for the CRC are of great interest.

Polyunsaturated omega-3 fatty acids, especially the long chain eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) fatty acids, have been widely used as adjuvants in cancer therapy. They are mainly found in deep cold water fishes with a high fat content, as well as in the oil extracted of them (4-6). Studies, especially *in vitro*, have shown that EPA and DHA can increase the sensitization of tumor cells to chemotherapeutic drugs (7-9) and/or to ionizing radiation (9-11), therefore influencing the antineoplastic action of these therapies. Another line of *in vivo* studies suggests significant anti-inflammatory action of these fatty acids, promoting several positive clinical outcomes in cancer patients, for example, maintenance of nutritional status and quality of life and reduction of chemotherapy toxicity (12, 13).

Our group has shown that fish oil supplementation during the 9 weeks of chemotherapy can beneficially modulate the inflammatory nutritional state (14, 15). However, studies evaluating long-term effects after a previous intervention with EPA and DHA in colorectal cancer are scarce, especially assessing clinical outcomes, including survival. Thus, the aim of this study is to evaluate clinical outcomes during and after chemotherapy in individuals with colorectal cancer who received supplementation of 2 g/day of fish oil in the first nine weeks of treatment. We hypothesized that the group receiving fish oil will present better clinical outcomes and response to treatment compared with control group.

METHODS

Type of study

Randomized controlled clinical trial with two arms, parallel-groups, open label.

Study participants

This study included 30 subjects with colorectal cancer diagnosed by histopathology treated at the Oncology Research Center of Florianopolis from November 2009 to March 2010 and from July 2011 to March 2012, originally recruited for Pastore-Silva et al. (2012) (14) and Mocellin et al. (2013) (15) randomized clinical trials, respectively.

Eligibility criteria were: age greater than or equal to 18 years; not to be in palliative care; have never undergone chemotherapy; have preserved oral intake; not to be allergic or intolerant to fish and derivatives; not to be diagnosed with inflammatory or autoimmune diseases; do not take statins or anti-inflammatory drugs; and have not consumed supplements containing n-3 PUFA for an extended period (> 120 days) during the six months prior to the study inclusion.

Sampling procedure was done by convenience and temporal saturation, i.e., were invited to participate all eligible individuals identified by the researchers at the Oncology Research Center of Florianopolis in the periods established for the recruitment phase and data collection and that agreed to participate. Consumption of less than 80% of the capsules during the nine weeks was an exclusion criteria.

Study Design

Eligible subjects were randomized into two groups according to the techniques previously described (14, 15): 1) supplemented group (SG) and control group (CG). Randomization techniques differed between studies, briefly, in Pastore-Silva et al. (2012) (14) subjects were allocated according to the day of the month they were referred to the researchers and in Mocellin et al. (2013) (15) randomization was performed using a tool designed for Microsoft Office Excel which allocated patients to one of the groups multiplying the number of the patient's records in the institution by a random number between 0 and 1. SG was oriented to consume 4 capsules per day (2g/day) of fish oil for nine weeks, whereas the CG did not receive fish oil supplement nor a placebo.

The beginning of fish oil capsules consumption occurred on the same day of the first cycle of chemotherapy, characterizing the baseline moment. At this time collection of identification data (name, sex, date of birth, address and contact), clinical data (tumor location, clinical stage, presence of other illnesses, prescribed chemotherapy protocol and use of other drugs) and self-reported smoking habit (smoker, nonsmoker or former-smoker) were performed.

Subjects were instructed to proceed with the ingestion of the capsules 30 minutes before main meals accompanied by water intake, in two doses, i.e., two capsules before a main meal, and the two remaining before another main meal.

Nine weeks from the baseline, after administration of at least two chemotherapy cycles, characterized the final moment. At this time SG individuals ceased the consumption of fish oil capsules.

Compliance of fish oil supplementation protocol was established through investigation of daily consumption of capsules recorded by participants in a form provided by the researchers and accounting for remaining capsules at the end of the study. Additionally, on Mocellin's study (15), plasma fatty acid profile, including the EPA and DHA rates, were performed according to methodology described previously (15).

The study protocol was approved by Human Research Ethics Committee of Oncology Research Center of Florianopolis and all participants signed a free informed consent form.

In April 2015, at least 36 months after the last recruitment of Mocellin et al (2013) study, a documentary search on patient's medical records was performed to meet the aims of the current study.

Fish oil dietary supplement

Fish oil was offered in the form of 500 mg gelatin capsules (Omega -3, Phytomare®, Governador Celso Ramos, SC, Brazil), extracted from salmon, mackerel and sardines, plus gelatin, glycerin and vitamin E. The experimental dosage of 2g/day of fish oil supplied approximately 600 mg/day of EPA (360 mg /day) and DHA (240mg/day).

Clinical outcome variables

The following variables were collected to characterize the participants' clinical course after at least 36 months of research inclusion:

a) Death, and in case of death, days from the first chemotherapy until the occurrence of the event (date of death was considered the date registered in the death certificate);

b) Disease progression, and in case of disease progression, time to disease progression, defined as days between the first chemotherapy and the first record of disease progression made by a medical doctor;

c) Number of administered chemotherapy cycles;

d) Number of days in chemotherapy, considering days of the cycle in which the drugs were not administered in addition to days when there was a delay in administration due to toxicity. Days when there was an interruption of treatment were discounted;

e) Number of delays chemotherapy administration: delay in the administration of scheduled chemotherapy sessions due to any related event;

f) Number of interruptions of chemotherapy: unplanned total cessation of chemotherapy administration;

g) Number of hospitalizations during chemotherapy: number of times that the patient needed to be hospitalized (at least 24 hours after admission) while conducting chemotherapy.

h) Carcinoembryonic Antigen (CEA): Values in ng/mL. Baseline values correspond to values recorded before the beginning of chemotherapy. Final values are the first CEA value recorded after the end of the planned chemotherapy cycles.

Only clear information recorded in medical records were considered valid. In the presence of doubts about any recorded information, this information was considered lost.

For patients who were over 12 months without medical consultation in the institution and without updated information on current clinical status, were considered on follow-up those with such statement on the last information registered on medical records. Were considered dead, those with death certificates or those who were in palliative care by the time of the last record. In this last case, date of death was considered the date of the last information registered.

Statistical analysis

Data were entered into a spreadsheet of Microsoft Office Excel® vs. 2013 (Microsoft, Washington, USA) and transferred with the help of Stat/Transfer® software (Circle Systems Inc., Washington, USA) to statistical software STATA v. 11.0 (Stata Corp., Texas, United States) where statistical analysis were performed.

Outcome variables "delay in chemotherapy administration", "interruption of chemotherapy", "hospitalization during chemotherapy", "disease progression" and "death within three years of follow-up" were transformed into dichotomous variables (present or absent event). The variables "chemotherapy cycles", "days in chemotherapy," "number of delays in chemotherapy administration" "time to disease progression" and "time to death" were treated as discrete number variables, whereas "Final carcinoembryonic antigen (CEA) values" and "Difference of carcinoembryonic antigen (CEA) values (final value minus baseline)" were treated as continuous variables.

The symmetry of the data was determined using the calculation of the coefficient of variation [$CV = (SD/ \text{mean}) \times 100$], assuming as asymmetric variables $CV \geq 50\%$.

Qui-squared Fisher's exact test was used to test differences in dichotomous variables according to exposure to "fish oil supplementation" also dichotomous, in which at least one category of the table 2x2 presented less than 5 observations. Pearson's Qui-squared test was used for dichotomous variables, where all categories of 2x2 table presented five or more observations, or to test differences in frequencies in variable "clinical stage" according to exposure.

Student t test or Mann Whitney test were used to test differences in continuous variables according to exposure to "fish oil supplementation", considering symmetrical or asymmetrical data distribution, respectively.

In order to evaluate the influence of cancer clinical stage in clinical outcomes, stratified analysis were performed for this variable.

Power analysis was calculated, when significant. For this, using online software OpenEpi, outcome's mean values and standard deviations in each group plus the number of observations (n) was used

Significance level of $p < 0.05$ was adopted in all analyses.

For data presentation, mean and standard deviation was used if data distribution was symmetrical or median and interquartile range was used if it was asymmetrical.

RESULTS

Of the 30 subjects that complied with the protocol of the original studies, 17 received fish oil supplementation (SG) and 13 were allocated to control group (CG). Characteristics of the participants are presented in Table 1.

Both study groups were comparable in gender, age, tumor location and clinical stage, as well as in tobacco use, pre-chemotherapy CEA values and exposure to radiation therapy (RDT) concomitantly. This comparability persists even after stratification by clinical stage. However, it is noted that pre-chemotherapy CEA values at stage IV (median 109 ng/ml, IQR: 45-447) were higher than values at stages II and III (median = 1.5 ng/ml, IQR: 0.8 to 3.0) ($p=0.003$). Furthermore, considering only individuals at stage IV, there was a trend ($p=0.05$) for lower pre-chemotherapy CEA values in the group receiving the fish oil [median (IQR): SG=105.4 ng/mL (45.0; 109.0); CG = 880.0 ng/mL (447.0; 1313.0)]. Results for clinical outcomes are shown in Table 2.

Although very similar proportion of subjects in supplemented group (35.3%) and in control group (38.5%) had progressive disease ($p=0.858$), there was a statistically significant difference when considering the period of time between first chemotherapy and diagnosis of tumor progression. Supplemented group showed a greater median

time to progression compared to control group ($p = 0.04$). For the rest of clinical outcomes there were no significant changes.

Analyses stratified by clinical stage, showed no statistical difference between study groups. However, time to disease progression still was numerically higher in SG compared to CG, both in stages II and III [mean (SD): SG (3 subjects)= 627 days (± 82.9); CG (2 subjects)= 445 days (± 162.6); $p = 0.184$], and in stage IV [median (IQR): SG (3 subjects)= 522 days (262; 896); CG (n=2)=260 days (224; 296); $p = 0.248$]. Furthermore, it was observed that individuals at stage IV and belonging to CG at the end of chemotherapy presented higher CEA values than SG [median (IQR): SG (n=2)=25.3 ng/mL (1.2 ; 49.4); CG (2 observations)=6562.0 ng/mL (1775.0, 11349.0); $p=0.121$]. Likewise, subtracting CEA values after chemotherapy from pre-chemotherapy values, it was observed that individuals at stage IV belonging to CG had a substantial increase in this marker, whereas SG showed a decrease [median (IQR): SG (2 observations)=-51.7 ng/mL (-59.6,-43.8); CG (2 observations)=5682.0 ng/mL (1328.0, 10036.0); $p=0.121$].

When analysis excluded individuals at stage II there was a trend ($p = 0.08$) for longer time to progression in the supplemented group compared with control group [mean (SD): SG (6 observations)= 593.5 days (± 211.4); CG (4 observations)= 352.5 days (± 145.2)].

Table 1 - Characterization of study participants.

Characterization variables	Study Groups		p
	Supplemented Group (n=17)	Control Group (n=13)	
Gender (n)			1.000*
Male	11 (64.7)	9 (30.8)	
Female	6 (35.3)	4 (69.2)	
Age (years)	52.1 (± 7.6)	53.1 (± 10.2)	0.756**
Tumor Location (n)			0.638***
Colon	8 (47.1)	5 (38.5)	
Rectum	9 (52.9)	8 (61.5)	
Clinical Stage TNM (n)			> 0.05 ^{ab}
II	2 (11.8)	5 (41.7)	
III	9 (52.9)	5 (41.7)	
IV	6 (35.3)	2 (16.6)	
Smoking Habit (n)			0.785***
Non smoker	10 (58.8)	7 (53.9)	
Former-smoker	7 (41.2)	6 (46.1)	
Carcinoembryonic Antigen – CEA (ng/mL) ^b	2.9 [1.0; 75.2]	3.0 [1.4; 7.2]	0.776 ^y
Concomitant radiotherapy (n)	5 (29.4)	6 (50.0)	0.260****

Data are presented as mean (SD) or median [interquartile range] for continuous variables, and absolute frequency (relative frequencies) for categorical variables.

*Qui-squared Fisher's exact test

**Student t test for independent samples

***Qui-squared Test

^yMann Whitney Test

^aGiven the low frequency of observations (< 5) in each stratum, the differences were tested by Qui-squared Fisher's exact test combining two categories at a time.

^bNumber of participants in SG = 12; Number of participants in CG = 9.

Table 2 - Clinical Outcomes of study participants according to study groups.

Clinical Outcomes	Study Groups		p
	Supplemented Group (n=17)	Control Group (n=13)	
Chemotherapy Cycles (n)	6 [6; 8]	6 [4; 16]	0.792**a
Days in chemotherapy (days)	201.5 [133; 450]	196 [106; 541]	0.848**b
Delays in chemotherapy administration (number of individuals)	5 (29.4)	5 (38.5)	0.602**
Number of delays in chemotherapy administration (number of delays)	1 [1; 2]	1 [1; 4]	0.425**c
Interruption of chemotherapy (number of individuals)	8 (47.1)	4 (30.8)	0.465***
Hospitalizations during chemotherapy (number of individuals)	2 (11.8)	3 (23.1)	0.628***
Disease progression (number of individuals)	6 (35.3)	5 (38.5)	0.858**
Time to disease progression (days)	593 (\pm 211.5)	330 (\pm 135.1)	0.040 [§]
Death within 3 years of follow-up (number of individuals)	5 (29.4)	5 (38.5)	0.602**
Time to death (days)	407 [300; 874]	687 [415; 798]	0.602*
Final carcinoembryonic antigen (CEA) values (ng/mL)	2.1 [1.2; 4.1]	2.4 [1.7; 890.1]	0.536**d
Difference of carcinoembryonic antigen (CEA) values - final minus baseline (ng/mL)	0.4 [-1.9; 0.8]	0.6 [-0.9; 1,328.0]	0.368**e

Data are presented as mean (SD) or median [interquartile range] for continuous variables, and absolute frequency (relative frequencies) for categorical variables.

* Mann Whitney test

** Qui-squared test

*** Qui-squared Fisher's exact test

[§] Student t test for independent samples

[§] Power of analysis: 70,4%.

^a Number of participants in SG = 17; Number of participants in CG=11

^b Number of participants in SG = 14; Number of participants in CG=11

^c Number of participants in SG = 6; Number of participants in CG=5

^d Number of participants in SG = 11; Number of participants in CG=8

^e Number of participants in SG = 9; Number of participants in CG=7

DISCUSSION

The main findings of this study include the following: the group receiving fish oil supplementation showed greater time to disease progression and, although it was not significant, at the advanced stages, SG showed a reduction in CEA values while CG showed an increase patterned.

Bougnoux et al. (2009) (16), had as initial aim to evaluate the efficacy and safety of 1.8 g supplementation of DHA fatty acid present in fish oil along with anthracycline-based chemotherapy in patients with breast cancer with rapidly progressing visceral metastases. The supplementation started 7 to 10 days before chemotherapy and

continued for five months during treatment. This study consisted of only one group and analysis of the results was based on incorporation of DHA in plasma, i.e., initial group was divided between those who had high or low incorporation. Similarly to what it was found in the present study, differences in time to disease progression were observed, with a longer time in individuals with high plasma incorporation of DHA. In addition, the group with higher incorporation also showed significantly longer survival time. As a conclusion, Bougnoux et al. (2009) (16) suggested that DHA supplementation can improve chemotherapy outcomes in breast cancer patients.

Omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) might increase antitumor effects of some chemotherapeutic agents and anti-cancer therapies (17, 18). It is hypothesized that there are mechanisms related to n-3 PUFA supplementation that can benefit antineoplastic activity. N-3 PUFA appear to increase the efficacy of the following chemotherapeutic agents: platinum compounds, alkylating agents, irinotecan, cyclophosphamide, vincristine, anthracyclines (doxorubicin, epirubicin), taxanes (paclitaxel, docetaxel), vinorelbine, 5-fluorouracil and mitomycin (17, 19, 20), some of which are used in the main chemotherapy protocols for patients with colorectal cancer. Although the mechanisms that are involved in this potential increased efficacy are not fully elucidated, it is suggested that they are linked to the induction of changes in drug uptake and oxidative status of malignant cells caused by n-3 PUFA (20).

Unlike Bougnoux et al. (2009) (16) study, in which it was observed an increase in survival in high DHA incorporation group, it was not possible to observe less deaths within 3 years in the supplemented group. This may be related to the fact that the vast majority of subjects (73.3 %) had no metastasis to distant organs/structures as well as uncompromised anatomical region, which provide better survival rate. Still, there are differences between dose and supplementation time when compared to the one used here, both lower than those performed by Bougnoux et al. (2009) (16), which could influence the magnitude of the effects attributed to fish oil.

There were no differences between groups for number of administered chemotherapy cycles and days in chemotherapy. The open-label clinical trial of Murphy et al. (2011) (21) aimed to evaluate effects

of fish oil supplementation in individuals with advanced non-small cell lung cancer undergoing chemotherapy on clinical outcomes and response to treatment. The group of individuals who received fish oil spent more time undergoing chemotherapy, had a higher number of cycles administered, and better response rate to chemotherapy, represented by reduction in tumor mass observed by CT scan, when compared with the control group (without supplementation). Greater number of administered chemotherapy cycles may indicate that fewer complications and adverse events, which could prevent treatment administration, occurred. We did not observe differences in delays, interruptions and hospitalizations during treatment. These data may be relevant to the extent that might indicate absence of differences in treatment toxicity between groups. Considering the potential effects of these fatty acids in increasing sensitivity of tumor cells to chemotherapy, treatment toxicity related to non-neoplastic tissues needs to be monitored, increase in this parameters would suggest that beneficial effects to tumor cells can be blunted.

Both studies, Bougnoux et al. (2009) ([16](#)) and Murphy et al. (2011) ([21](#)), which showed improvement in clinical outcomes after n-3 PUFA supplementation, specifically survival and response to treatment, were conducted in subjects with advanced disease. In this study, when stratifying analysis by tumor stage there was a higher, but not statistically significant, reduction in CEA at advanced stage and a tendency to longer time to disease progression at stages III and IV after supplementation. This information may suggest clinical benefit of fish oil supplementation especially for individuals at more advanced stages of cancer.

Limitations of this study include: some death dates (3 dates) were estimated and not confirmed, therefore it is possible to assume some level of an underestimation of the time to death, however this underestimation is probably of a few days and does not compromise the results. There were difficulties in identifying some information in medical records, especially those recorded by hand; as well as the absence of CEA values for several individuals, an evaluation that was certainly required and performed but not recorded. Also, the small number of observations in some stratified analysis is a limitation. Furthermore, data on plasma incorporation of EPA and DHA was not

verified in participants involved in Pastore-Silva et al. (2012) study (14), for these individuals compliance to supplementation protocol was only guaranteed by participant's report and devolution of capsules storage jar, which might contain remaining capsules. Although there were some differences in studies randomization techniques, this did not influenced on results, time to disease progression remained statistically different between groups when considering only patients recruited in Pastore-Silva et al. (2012) (14) study. However, a separate analysis for such outcome in Mocellin et al.'s (2013) (15) study were not possible due to small number of subjects in SG (n=1).

Strengths include long time elapsed to obtain survival data; medical record data collection was performed by two researchers at the same time, which decreases the chance of misinterpretation or collection of misleading results for the proposed outcomes; and unclear data were excluded from the analysis. Few studies evaluated survival of cancer patients after supplementation with omega-3 PUFA, to our knowledge this is the first study held with colorectal cancer patients.

CONCLUSION

Supplementation of 2 g/day of fish oil for 9 weeks concomitant with chemotherapy treatment in colorectal cancer may prolong time to disease progression, as well as it seems to enhance antineoplastic effect of the chemotherapeutic agent, reducing carcinoembryonic antigen marker concentrations. According to these findings, fish oil supplementation combined with chemotherapy may contribute to clinical outcomes of patients with colorectal cancer, especially in advanced tumor stages. In order to confirm this potential, the execution of larger clinical trials evaluating the effects of this intervention in clinical outcomes of cancer patients undergoing chemotherapy are required.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Nutrition Graduate Program and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the scholarship granted to the first two authors and

Phytomare® for fish oil capsules donation. Also, we would like to thank the Oncology Research Center of Florianópolis (CEPON) and its professionals who contributed to recruitment and implementation of this study.

REFERENCES

1. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. [Internet]. International Agency for Research on Cancer. 2013 [cited 22 de janeiro de 2015]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011. Bethesda, MD, United States: National Cancer Institute; 2014.
3. Andre N, Schmiegel W. Chemoradiotherapy for colorectal cancer. *Gut*. 2005;54(8):1194-202.
4. Roynette CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C. n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clinical nutrition*. 2004;23(2):139-51.
5. Hardman WE. (n-3) fatty acids and cancer therapy. *The Journal of nutrition*. 2004;134(12 Suppl):3427S-30S.
6. Berquin IM, Edwards IJ, Chen YQ. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer letters*. 2008;269(2):363-77.
7. Zajdel A, Wilczok A, Latocha M, Tarkowski M, Kokocinska M, et al. Polyunsaturated fatty acids potentiate cytotoxicity of cisplatin in A549 cells. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2014;71(6):1060-5.
8. Germain E, Chajes V, Cognault S, Lhuillery C, Bougnoux P. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1998;75(4):578-83.
9. Calviello G, Serini S, Piccioni E, Pessina G. Antineoplastic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in combination with drugs and radiotherapy: preventive and therapeutic strategies. *Nutrition and cancer*. 2009;61(3):287-301.
10. Benais-Pont G, Dupertuis YM, Kossovsky MP, Nouet P, Allal AS, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and ionizing radiation:

- combined cytotoxicity on human colorectal adenocarcinoma cells. *Nutrition*. 2006;22(9):931-9.
11. Cai F, Sorg O, Granci V, Lecumberri E, Miralbell R, et al. Interaction of omega-3 polyunsaturated fatty acids with radiation therapy in two different colorectal cancer cell lines. *Clinical nutrition*. 2014;33(1):164-70.
 12. Trabal J, Leyes P, Forga M, Maurel J. Potential usefulness of an EPA-enriched nutritional supplement on chemotherapy tolerability in cancer patients without overt malnutrition. *Nutricion hospitalaria*. 2010;25(5):736-40.
 13. de Aguiar Pastore Silva J, Emilia de Souza Fabre M, Waitzberg DL. Omega-3 supplements for patients in chemotherapy and/or radiotherapy: A systematic review. *Clinical nutrition*. 2015;34(3):359-66.
 14. Silva Jde A, Trindade EB, Fabre ME, Menegotto VM, Gevaerd S, et al. Fish oil supplement alters markers of inflammatory and nutritional status in colorectal cancer patients. *Nutrition and cancer*. 2012;64(2):267-73.
 15. Mocellin MC, Pastore e Silva J de A, Camargo C de Q, Fabre ME, Gevaerd S, et al. Fish oil decreases C-reactive protein/albumin ratio improving nutritional prognosis and plasma fatty acid profile in colorectal cancer patients. *Lipids*. 2013;48(9):879-88.
 16. Bougnoux P, Hajjaji N, Ferrasson MN, Giraudeau B, Couet C, et al. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *British journal of cancer*. 2009;101(12):1978-85.
 17. Baracos VE, Mazurak VC, Ma DW. n-3 Polyunsaturated fatty acids throughout the cancer trajectory: influence on disease incidence, progression, response to therapy and cancer-associated cachexia. *Nutrition research reviews*. 2004;17(2):177-92.
 18. Merendino N, Costantini L, Manzi L, Molinari R, D'Eliseo D, et al. Dietary omega -3 polyunsaturated fatty acid DHA: a potential adjuvant in the treatment of cancer. *BioMed research international*. 2013;2013:310186.
 19. Hardman WE, Munoz J, Jr., 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.

20. Bougnoux P, Hajjaji N, Maheo K, Couet C, Chevalier S. Fatty acids and breast cancer: sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Progress in lipid research*. 2010;49(1):76-86.
21. Murphy RA, Mourtzakis M, Chu QS, Baracos VE, Reiman T, et al. Supplementation with fish oil increases first-line chemotherapy efficacy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2011;117(16):3774-80.

5.2 ARTIGO 2

TITLE

Effects of co-treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids and anti-cancer agents on oxidative stress parameters: a systematic review of in vitro, animal, and human studies.

AUTHORS

Carolina de Quadros Camargo^{1,2}, Henver Simionato Brunetta^{1,3}, Everson Araújo Nunes^{1,2,3}

1 Physiological Sciences Department, Federal University of Santa Catarina, Brazil

2 Nutrition Graduation Program, Federal University of Santa Catarina, Brazil

3 Multicenter Graduation Program in Physiological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Brazil

CORRESPONDING AUTHOR

Everson Araújo Nunes (everson.nunes@ufsc.br)

ABSTRACT

N-3 polyunsaturated fatty acids, especially docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids, demonstrate possible effects as adjuvants in cancer treatment. The mechanism associated with this, seems to be related to alterations promoted in cancer cells redox state acting in

synergy with conventional agents. The aim of this article is to review published data regarding effects on oxidative stress parameters of concomitant treatment with anti-cancer agents and n-3 polyunsaturated fatty acids to verify consistency and directions of results regarding oxidative stress alterations caused by these fatty acids in addition to treatments. After literature search and screening of 1616 citations, 28 studies were included for data extraction and evaluation: sixteen in vitro studies (with two of them using an in vivo approach as well), eight animal studies and four human studies (three clinical trials and one case series). Most in vitro and animal studies showed an enhanced lipid peroxidation compared to control groups or baseline values and enhanced cytotoxicity induced by these fatty acids. And in ten of the eleven studies that investigated the effect of vitamin E on treatment sensitization induced by n-3 fatty acids showed that this antioxidant abolished this effect. These results suggest that oxidative stress alterations caused by the co-treatment can exert effects on conventional treatment efficacy and this seems to happen in most cells and tumors tested, but not all. Identifying tumors that are sensitive to these oxidative effects can consolidate the use of n-3 supplements as an adjuvant treatment in specific cancer types.

KEYWORDS

n-3 fatty acids; anti-cancer treatments; oxidative stress; lipid peroxidation; cytotoxicity

HIGHLIGHTS

- Most studies show increased lipid peroxidation, this varies in distinct cell lines
- Increase in lipid peroxidation resulted in cytotoxicity enhancement in most studies
- Resistant cells show no increment or increased lipid peroxidation to a lesser extent
 - In non-neoplastic tissues, co-treatment did not enhance lipid peroxidation

– Lower GPx activity is usually associated with higher sensitivity to co-treatment

INTRODUCTION

Conventional anti-cancer treatments aim to exert cytotoxic activity against cancer cells as a primary goal, consequently controlling tumor growth and preventing metastasis. Cancer cells often rely on mechanisms to evade anti-cancer drugs' actions, possibly by becoming resistant to drugs and compromising response to treatment[1]. Besides, the majority of cancer drugs are highly toxic, and the effects can sometimes be unbearable to patients causing treatment discontinuation and loss of efficacy. Investigations of adjuvant treatments that are able to enhance the efficacy of known anti-cancer agents, amplifying cancer cell death and acting in synergy to reduce tumor growth, are needed for a more successful approach[2].

N-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are receiving increasing attention due to the possible effects as an adjuvant treatment, enhancing the therapeutic efficacy of anti-cancer drugs[3]. In a review evaluating the additive or synergistic interaction of docosahexaenoic acid (DHA), an n-3 fatty acid, with anti-cancer drugs, several biological activities are demonstrated to be responsible for this enhancement: increased drug transport, apoptosis, reduction of cell growth, proliferation, cell cycle arrest and others[2].

The most plausible explanation for these effects so far is that PUFAs are highly susceptible to both enzymatic and non-enzymatic peroxidation. These products generated from lipid peroxidation are toxic to cells and can exert their anti-cancer effects in mitochondrial and nuclear sites[4].

Several studies have been published evaluating n-3 PUFAs used in combination with anti-cancer treatments and their effects on cytotoxicity and oxidative stress parameters. Relying on these mechanisms proposed by in vitro and in vivo studies, clinical trials also have observed a higher response to treatment and clinical benefits after supplementation with n-3 PUFAs during chemotherapy[5,6].

However, studies are performed with different cell lines and different anti-cancer treatments. To our knowledge, no systematic

review was conducted in order to verify if results are consistent and leading to the same conclusions regarding alteration in oxidative stress-related parameters caused by these fatty acids in addition to the treatment. Furthermore, it is not known if there are substantial differences indicating that some inferences are not appropriate for all cancer types and treatments.

The aim of this study was to systematically review published data regarding effects on oxidative stress parameters of concomitant treatment with anti-cancer agents and n-3 polyunsaturated fatty acids.

METHODS

This systematic review follows the 4-phase flow diagram of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) and is based on the PRISMA statement [7]. Despite being a systematic review that also includes in vitro studies, all studies evaluate an intervention. The question of research was adapted from the PICO framework: Population – specimens or animals from in vitro and in vivo animal studies and individuals in clinical trials; Intervention and Comparison – use of one n-3 fatty acid and anti-cancer treatment concomitantly versus control; Outcome – oxidative stress parameters.

Search Strategy

A systematic search was conducted on MEDLINE (via PubMed; National Library of Medicine, Bethesda, Maryland), using the following combinations of MeSH terms and other keywords: related to cancer (cancer OR neoplasms OR tumor OR carcinoma OR neoplastic OR malignant), to intervention with n-3 fatty acids (eicosapentaenoic OR docosahexaenoic OR EPA OR DHA OR omega-3 OR “fish oil” OR n-3 OR linolenic OR alpha-linolenic), to cancer treatments (antineoplastic OR drug OR chemotherapy OR therapy OR anti-cancer OR radiotherapy OR radiation) and to parameters of oxidative stress (oxidative OR oxidation OR oxides OR antioxidant OR catalase OR superoxide OR glutathione OR GSH OR peroxidation OR “lipid peroxidation” OR “lipid peroxides” OR “MDA” OR malondialdehyde). A wide search strategy was used to avoid missing information; quotation marks allowed searches of exact terms or expressions, parenthesis indicated synonymously. Additional filters were included resulting in

articles only in English, Spanish or Portuguese published until August 2017. Initially, the titles and abstracts of all identified studies were screened according to selection criteria.

Selection Criteria

Articles were selected according to titles and abstracts in order to choose those which presented the subject of interest: effects of n-3 fatty acids on oxidative stress parameters of malignant cells lines or animals/individuals with cancer submitted to an anti-cancer treatment. Articles apparently eligible without full access were requested for the original authors, replies with full-text articles were included in the analysis, or else articles were excluded. If the title and abstract indicated possible inclusion, articles were fully read and assessed for eligibility by two independent reviewers (C.Q.C and H.S.B). As inclusion criteria, we established: individuals or animals with cancer or malignant cell lines supplemented with some source of n-3 fatty acids; concomitant use of some anti-cancer treatment (e.g. chemotherapy, radiotherapy) and evaluation of oxidative stress-related variables. It should be highlighted that studies were excluded if variables of oxidative stress evaluated were not a result of n-3 intervention and anti-cancer treatment applied concomitantly.

Data extraction

Data were extracted of remaining eligible articles independently by two reviewers (C.Q.C. and H.S.B.) and cross-checked. Articles were consulted again in case of divergence of opinions. A standardized outline was used for data extraction, and the following data was extracted: study type (in vitro, in vivo, clinical study or case series), supplement used, type of cells, tumors or patient characteristics (tumor location), study design, anti-cancer treatment used and oxidative stress-related outcomes. Outcomes alterations attributed to the intervention were considered when variables values were significantly different. Because of differences in study designs, methods, and population characteristics, a meta-analysis was not possible to be performed.

We did not performed a formal quality assessment of the articles due to different types of studies included, especially in vitro studies, which would limit the establishment of a standard analysis.

RESULTS

Literature search retrieved 1616 citations. After screening and exclusion by titles and abstracts, the full text was obtained for 105 articles where title and abstracts alone were insufficient to determine eligibility for inclusion. Seventy-seven of these studies were removed from the analysis, the remaining 28 studies (Figure 1) are summarized in Table 1, 2 and 3.

Study Characteristics

Of the 28 selected studies, 16 were *in vitro* studies (with two of them using an *in vivo* approach as well), eight were animal model-based studies (*in vivo*), and four were studies using human subjects (three clinical trials and one case series).

In *in vitro* studies, the most common cancer cells studied were breast cancer cells, specially MDA-MB-231 (five studies) and MCF-7 cell lines (four studies). All articles used DHA as a source of n-3 fatty acid, and seven of them also included EPA as an intervention. As anti-cancer treatments, three studies used radiation, three arsenic trioxide and six studies used anthracyclines (doxorubicin was present in all of these).

Of all eight *in vivo* studies, seven induced some mammary tumor. Consequently, the most common anti-cancer treatment, used in five studies, was also with anthracyclines (doxorubicin or epirubicin). Three used DHASCO (a nutritional oil derived from microalgae containing a minimum of 40% DHA) as an intervention, three used fish oil, and one used a parenteral lipid emulsion enriched in n-3 PUFAs.

In human studies, all of them used EPA+DHA as interventions. Although all used chemotherapeutic agents, as each study included different subjects and cancer types, drugs used were also different.

Outcomes

Three *in vitro* studies evaluated oxidative stress related genes. HMOX1, AKR1C1, and NQO1 were up-regulated due to co-exposure to PUFAs and radiation treatment[8]. HO-1 expression was enhanced in cells treated with DHA and disulfiram[9]. In human lung adenocarcinoma cell, EPA and DHA addition to doxorubicin down-regulated SOD1, SOD2, GPx-4, and GST-pi genes expression[10].

Nineteen studies evaluated variables related to lipid peroxidation. When evaluated in cancer cell lines and animal tumors,

most studies showed an enhancement in lipid peroxidation compared to control groups or baseline values. Although, it must be highlighted that the extent of these increases was not similar to all cell lines. The only exception for this was Ding et al., 2006[11] in which clioquinol did not enhance DHA-induced lipid peroxidation. Differently, in animal studies, when the effect of n-3 and anti-cancer treatment on lipid peroxidation was evaluated in healthy tissues the results weren't the same as tumor tissues. Combination treatment did not induce higher lipid peroxidation in healthy tissues (liver, heart, and intestine). Only on Hardman et al, 2001[12], TBARS in the livers of mice fed a diet containing fish oil were higher than TBARS in the livers of control mice, even though doxorubicin treatment did not significantly increase TBARS in the liver.

Of the 22 *in vitro* and *in vivo* studies that evaluated differences in anti-cancer treatments effects due to n-3 interventions, nine *in vitro* studies showed an enhanced cytotoxicity induced by these fatty acids. The remaining six *in vitro* studies that evaluated such outcome observed these enhancing effects but not in all cell lines tested[13–18] or varied depending on the combination of cell lines, and anti-cancer treatment used[15]. All seven animal studies that evaluated antitumor effects of anti-cancer treatments showed a greater antitumor activity when n-3 interventions were used concomitantly.

Ten of the eleven studies that investigated the effect of vitamin E on treatment sensitization induced by n-3 fatty acids showed that this antioxidant abolished this effect.

Only five *in vitro* studies examined reactive oxygen species (ROS) after combined treatment with n-3 fatty acids and anti-cancer agents. Of these, three studies led to synergistic effects and increased ROS levels, depending on the cell line.

Three studies evaluated antioxidant enzymes activities. However, results varied widely according to cell lines and tissues analyzed.

Regarding human studies, two that measured lipid peroxidation found lower levels of this parameter in n-3 supplemented groups. In one study, differently, lower hydrogen peroxide production was found in control group. One study observed higher total antioxidant capacity and antioxidant levels in the group receiving n-3 supplementation. Additionally, another group found a significant increase in SOD, CAT

and GRx activities in the red blood cells fractions after fish oil supplementation as compared to the values obtained before chemotherapy and supplementation (no control group).

DISCUSSION

Most of the studies included in this systematic review showed an increased lipid peroxidation after concomitant treatment with n-3 fatty acids and anti-cancer agents. anti-cancer agents may have several mechanisms of action. Among them, direct and/or indirect reactive oxygen species generation is one of the most common[1]. Oxidative stress is a consequence of drugs as anthracyclines (e.g. doxorubicin, epirubicin), topoisomerase inhibitor (e.g. etoposide, irinotecan), arsenic trioxide[19–21]and ionizing radiation used as interventions in studies where lipid peroxidation was increased. Oxidative stress can alter the membrane bilayers and cause the lipid peroxidation of PUFAs; this process can alter permeability and fluidity of the membrane lipid bilayer and compromise cell integrity[22].

However, one study used as an anti-cancer agent Clioquinol, which has the potential to reduce Cu and Zn ions, acting as an antioxidant, the binding of clioquinol to transition metals reduces the production of reactive oxygen species[23]. Such event could explain why the combination of this with DHA did not enhance DHA-induced lipid peroxidation.

In others, even using oxidative stress inducer drugs[13,14,17], the level of the increase in lipid peroxidation products differ from cell lines. Cells that showed a greater increase in lipid peroxidation parameters were also the ones that were sensitive to anti-cancer treatments. Cells resistant to treatment were cells that showed no increase or increase to a lesser extent compared to sensitive cells with the combined treatment of n-3 and anti-cancer agent. This suggests that in some cases resistance to treatment may be related to the capacity of the cell to handle oxidative damages, which are commonly induced by drugs and ionizing radiation and can be exacerbated by n-3 fatty acids.

This is consistent with data observed in animal studies. In four of the five studies that evaluated a healthy tissue (liver, colon or heart) showed that n-3 + anti-cancer treatment did not enhance lipid

peroxidation compared to controls, or n-3 fatty acids did not increase lipid peroxidation caused by the treatment alone. This was not seen in tumor cells, that showed greater lipid peroxidation with concomitant treatment when compared to control or healthy tissues. Healthy tissues can probably tolerate more a certain level of oxidative stress due to their antioxidant reserve, which can prevent cell transformation, including lipid peroxidation, and ultimately cell death[22].

Differently, for human studies, of the three that evaluated lipid peroxidation, two showed a reduction of this parameter, while in one of them values remained unchanged. It is important to note that these studies showed a decrease evaluating lipid peroxidation in serum or plasma, none of them investigated lipid peroxidation in tumor tissues, which for human trials can be a difficult sample to obtain. No changes in lipid peroxidation were observed in polymorphonuclear cells. Considering these cells are healthy cells in a context of patients with tumors from various sites (but mainly gastrointestinal), these results were similar to animal studies. We can suggest that systematically n-3 supplementation concomitantly with anti-cancer agents in human subjects can lead to a decrease in lipid peroxidation despite its possible different effects in different tissues, but more studies are needed to confirm this hypothesis.

Five *in vitro* studies evaluated generation of reactive oxygen species (ROS). In three of them, combined treatment led to an increase in ROS levels, which is consistent with the proposition that most anti-cancer treatments can induce oxidative stress. Such event can be caused by the generation of singlet oxygen, superoxide or hydroxyl radicals and on top of that, n-3 fatty acids can also induce the production of peroxy/nitroperoxyl radicals[24]. Two studies found no changes in ROS levels, one of them[24] suggested that although no increase in ROS levels was observed paradoxically levels of lipoperoxides were increased. This might indicate that reactions between radicals produced by both interventions can occur and result in a production of ROS not directly detected by fluorescence probes, but they probably participate in lipoperoxides production.

Albeit cytotoxicity promoted by an association between n-3 supplementation and anti-cancer agents is not a variable related to oxidative stress per se, we consider that this can occur as a consequence

of oxidative stress generation. All animals studies and most in vitro studies found an increase in cytotoxicity when n-3 and treatment were combined. However, it also varied among cell lines and the anti-cancer agent used in six studies, for some combined treatment did not result in enhanced cytotoxicity. Interestingly, some studies that found variations between lipid peroxidation were the ones that observed a mixed response in cell lines. On the other hand, a conclusion linking these two parameters is not possible to be drawn, since, in some studies, cells that showed greater lipid peroxidation showed also higher cytotoxicity but the opposite was observed in one study. This could be related to the fact that other variables influence the redox state of the cell. For instance, antioxidant enzymes activities, and the possible effects and consequences of each cell line are a sum of factors rather than one specific mechanism.

Although it may not be directly linked to lipid peroxidation in every cell line, oxidative stress does seem to have an important role in synergistic or additive cytotoxic interactions when combining n-3 fatty acids with the chemotherapeutic treatment. All studies that supplemented groups or exposed cells receiving combined treatment with some form of vitamin E (an antioxidant) observed a decrease in lipid peroxidation and/or an abolishment of the n-3 induced increase in cytotoxicity. The exception was Hardman et al., 2002[25], in which vitamin E wasn't able to prevent an induced increase in lipid peroxidation. Those observations supports the notion that enhanced sensitivity to anti-cancer agents caused by n-3 fatty acids is probably dependent on oxidative stress generation. Furthermore, in most cells, it seems to involve the formation of lipid peroxides.

Not many studies evaluated antioxidant enzymes activity and the ones that did analyze different sets of variables and had, in some cases, different results. However, some patterns of response seem to emerge from some studies. In one study[26], depletion of GSH (reduced glutathione) resulted in induced cytotoxicity, whereas enhanced GSH protected cells from DHA-induced cytotoxicity. The same logic was observed in Vibet et al. (2008), cells that showed sensitivity to co-treatment had lower GPx1 values, and cells that were resistant had higher GPx1 activity, in the *in vivo* approach lower GPx1 activity also resulted in higher cytotoxicity. Accordingly, in Xue et al.[27],

GSH/GSSH ratio was also reduced in both tumor tissues and heart. It is possible to suggest that in these cases lower GPx activity due to lower levels of the substrate or lower enzyme activity can be associated with higher sensitivity to co-treatment with anti-cancer agents and n-3 fatty acids.

However, in one study[28], although GPx activity was increased in tumors after concomitant treatment, this did not translate into reduced lipid peroxidation, and thus a higher sensitivity to treatment was observed. Even though there was an increase in the activity of the primary enzyme responsible for detoxifying lipid peroxides this was not enough to prevent the increase in the concentration of such substances. In this study, the lack of changes in lipid peroxides levels observed in healthy tissues was associated with different but efficient adjustments to their antioxidant defenses. In some tissues, GPx activity was not enhanced (e.g. liver and intestines), but this was compensated in other ways. This may be the key to understanding higher sensitization to treatment showed by some cells, even if resistance to co-treatment is possible to occur when higher GPx activity is observed, this doesn't necessarily apply if the increase doesn't translate into an efficient antioxidant defense in general.

Mechanisms mentioned to explain higher sensitization to anti-cancer agents induced by n-3 fatty acids

Out of the 28 studies analyzed, 22 mentioned lipid peroxidation as one of the mechanisms polyunsaturated fatty acids use to induce higher sensitization of cancer cells or tumors to anticancer agents. The aggravation of oxidative stress in the tumor tissue leading to increased lipid peroxidation can be explained in different ways. Some authors suggest that n-3 supplementation can reduce angiogenesis and tumor vascularization, which will result in hypoxia and higher reactive oxygen species generation[29, 30]. The sensitization would be a consequence of lower tumor oxygenation.

Others indicate that there might be a modulation of antioxidant enzymes activities. PUFAs may enter the nucleus via fatty acid binding protein and modify gene transcription, reducing transcription of enzymes. N-3 can also exhaust antioxidant capacity, cause lower expression of enzymes and suppression of antioxidant activity by lipid peroxidation products in tumor tissues (e.g. GPx could be damaged by

these products). However, exactly how n-3 fatty acids regulate the expression of antioxidant enzymes is not established[10, 18, 25]. Many proposed that the increase in reactive oxygen species and lipid peroxidation would result in apoptosis. Such events can cause a reduction of the mitochondrial membrane potential, up-regulation of Bax and activation of caspase-3, inhibition of Akt phosphorylation and NF- κ B activation, with subsequent apoptotic cell death[9, 11, 13, 14, 15, 26, 31].

As a ROS-independent mechanism, n-3 can cause increased drug uptake and/or decreased efflux due to alterations of membrane properties caused by incorporation and thus affecting drug transport in tumor cells[26, 27]. However, two studies[10, 17] could not correlate higher sensitization to anticancer drugs intracellular concentration.

CONCLUSION

Cells and tumors that are reportedly vulnerable to cytotoxicity induced by n-3 fatty acids and anti-cancer agents frequently present an increase in lipid peroxidation. This seems to happen, independently of ROS generation or activity of antioxidant enzymes. Apparently, some neoplastic cells seem less able to tolerate oxidative stress generated not only by the anti-cancer agents but also when exacerbated by n-3 fatty acids. Screening for neoplastic cells and tumors with such characteristics can help to determine which patients can potentially benefit from an enhancement of conventional treatment efficacy promoted by n-3 fatty acids on oxidative stress.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Nutrition Post-Graduate Program and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Capes) for the scholarship granted to the first two authors.

STATEMENT OF AUTHORSHIP

All authors of this article have read and approved the final version and there are no other persons who satisfied the criteria for

authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us. C.Q.C.: Conceptualization, articles search, data extraction, data analysis, original draft; H.B.S.: articles search, data extraction, manuscript review; E.A.N.: conceptualization, project administration, supervision, manuscript review. All authors of this article have read and approved the final version.

FUNDING SOURCES

There are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome. This research did not receive any specific grant from funding agencies in public, commercial, or not-for-profit sectors. E.A.N. is funded by National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) – Brazil – 302692/2016-9.

Table 1 – In vitro studies.

Study	Intervention	Cell line/type of tumor	Anti-cancer treatment	Oxidative stress-related genes	Lipid peroxidation	Presence of antioxidant	Generation of ROS	Cytotoxic effect	Antioxidant enzymes
Antal, et al., 2014[8]	AA, EPA, DHA, GLA, OA.	U87 MG (ATCC HTB-14 TM) glioma cells	Radiation dose of 5 or 10 Gy	↑ HMOX1, AKR1C1 and NQO1	-	-	-	↑ with AA, DHA, and GLA	-
Baumgartner, et al., 2004[13]	DHA or OA	HT-29, SW-620, LS-174T (colon cancer), MDA-MB-468, MCF-7, SK- R-3 (breast cancer), SKOV-3, ES-2 (ovarian cancer), PC-3 (prostate cancer), HeLa (cervical cancer), PANC-1 (pancreatic cancer), normal human skin fibroblasts, human microvascular endothelial cells, peripheral blood mononuclear cells	Arsenic trioxide	-	Cells sensitive to As2O3 + DHA: correlation between TBARS and apoptotic cells	TBARS returned to normal levels	-	Reduced viability in 7 of the 10 As2O3-resistant solid tumors	-
Cai et al., 2014[14]	EPA and DHA	Human colorectal cancer cell lines (LS174T and HT-29 cells)	Radiation of 2 or 4 Gy	-	↑ in LS174T and lesser extent in HT29 cells.	-	-	↑LS174T and to a lesser extent in HT-29	-
Ding et al., 2006[11]	DHA	Raji (human B-cell lymphoblastoid), SiHa (cervical cancer), MDA-MB-231 (breast cancer), SCC-38 (squamous carcinoma) and A2780 (ovarian cancer)	Clioquinol	-	-	Abolished synergistic interaction.	-	↑	-

Study	Intervention	Cell line/type of tumor	Anti-cancer treatment	Oxidative stress-related genes	Lipid peroxidation	Presence of antioxidant	Generation of ROS	Cytotoxic effect	Antioxidant enzymes
Fahrmann, et al., 2013[15]	AA, EPA or DHA	EHEB and MEC-2 (B-CLL-derived leukemic cell lines) and JVM-2 (B-prolymphocytic leukemic-derived cell line)	Doxorubicin, vincristine and fludarabine.	-	DHA: ↑TBARs in doxorubicin-treated cells. EPA or DHA: ↓ TBARs when treated with vincristine (MEC-2 cells).	Abrogated sensitization of MEC-2 cells	↔	EPA and DHA differentially sensitized cells to treatments.	-
Gederaas, et al., 2005[16]	DHA or AA	SW480 and WiDr (colon carcinoma), A-172 (glioblastoma) and A-427 (lung adenocarcinoma)	Porphyrin precursor 5-aminolevulinic acid and photodynamic therapy	-	↑MDA in SW480 (8.6 times), WiDr cells (6.6 times) and A-427 cells (7.9 times), A-172 (2.4 times)	↓ peroxidation lipid	-	↑ in A-172 and A-427 cells, but not in SW480 and WiDr cells.	-
Germain, et al., 1998[32]	DHA, AA, ALA, LA and OA	MDA-MB-231 (breast cancer)	Doxorubicin, mitoxantrone	-	↑	Hydroperoxide formation was abolished	-	DHA enhanced cytotoxicity of Doxorubicin	-
Jiao, et al., 2017[9]	DHA (in vitro) and diet	A2780 (ovarian cancer), MDA-MB-231 and BT-20	Disulfiram	↑ HO-1 expression	-	-	-	↑	-

Study	Intervention	Cell line/type of tumor	Anti-cancer treatment	Oxidative stress-related genes	Lipid peroxidation	Presence of antioxidant	Generation of ROS	Cytotoxic effect	Antioxidant enzymes
	containing 7.5% fish oil (in vivo)	(breast cancer) and MDA-MB-231 (breast cancer) inoculated in Balb/C nude mice							
Kello et al., 2010[24]	n-3 and n-6 PUFAs	HT-29 and HeLa tumour cells	Photodynamic therapy with Hypericin	-	↑	-	↓	Enhanced with DHA or AA.	-
Lindskog et al., 2006 [26]	DHA and OA	SK-N-DZ, SH-SY5Y, SK-N-BE(2), SK-N-AS and IMR-32 (neuroblastoma) and MRC-5 (lung fibroblast)	Doxorubicin, cyclosporin, irinotecan, cisplatin and arsenic trioxide	-	-	Inhibited cytotoxicity but to different extents in each cell line.	-	DHA, but not OA, enhanced cytotoxicity.	GSH-depleting agent, BSO enhanced efficacy of DHA. NAC, a precursor of GSH, protected cells from DHA-induced cytotoxicity.
Mahéo, et al., 2005[17]	DHA	MDA-MB-231, MCF-7 and MCF-7dox cell line (breast cancer)	Doxorubicin	-	↑ MDA in MDA-MB-231, ↑ in MCF-7 but much lower extent, ↑ in MCF-7dox, but lower than induced	-	-	Cell-line selective, affecting MDA-MB-231 and MCF-7dox but not MCF-7.	-

Study	Intervention	Cell line/type of tumor	Anti-cancer treatment	Oxidative stress-related genes	Lipid peroxidation	Presence of antioxidant	Generation of ROS	Cytotoxic effect	Antioxidant enzymes
					by DHA alone.				
Puskás, et al., 2010[33]	EPA e DHA	HepG2 (hepatocarcinoma), MCF7 (breast adenocarcinoma), U87 (glioblastoma), HT168 (melanoma), K562, HL60 (myeloid leukemia), U266 (multiple myeloma) cells	Thalidomid e Analogs (AC-177, AC-202, AC-1041)	-	-	-	↑ in HT168 cells.	-	-
Sturlan, et al., 2003[31]	DHA	HL-60, Jurkat, Namalwa, Daudi and SH-1 cells, Human microvascular endothelial cells and peripheral blood mononuclear cells	Arsenic trioxide	-	↑	↓TBARS and deleterious effects on cell viability.	↑	↑	-
Vartak, et al., 1997[34]	DHA, EPA and GLA	EthylNitrosourea-induced malignant rat astrocytoma	Radiation (0–10 Gy γ -rays).	-	-	Blocked enhanced radiation-induced cell kill caused by GLA and DHA.	-	↑	-
Vibet, et al., 2008[18]	In vitro: DHA; In vivo: DHASCO	In vitro: MDA-MB-231 and MCF-7 (breast cancer). Animal study: Female Sprague-Dawley rats	Doxorubicin and epirubicin	-	-	Tumor activity was restored where chemosensitization was abolished by vitamin E.	MDA-MB-231: ↑ MCF-7 cells: ↔	In vitro: MDA-MB-231: ↑ and MCF-7: ↔ Animal: ↑, an inverse	In vitro: MDA-MB-231: ↑ γGCS, GR, GSH, ↔ SOD activity, ↓GPx1 activity. MCF-7:

Study	Intervention	Cell line/type of tumor	Anti-cancer treatment	Oxidative stress-related genes	Lipid peroxidation	Presence of antioxidant	Generation of ROS	Cytotoxic effect	Antioxidant enzymes
Zajdel, et al., 2010[10]	EPA and DHA	A549 human adenocarcinoma cells	lung Doxorubicin	↓SOD1, SOD2, GPx-4, and GST-pi genes expression	-	-	-	↑	-
<p>↑higher than control; ↔ no difference from control; ↓lower than control; ROS: Reactive Oxygen Species; AA: Arachidonic Acid; EPA: Eicosapentaenoic Acid; DHA: Docosahexaenoic Acid; GLA: Gamma-linolenic Acid; OA: Oleic Acid; As2O3: Arsenic Trioxide; TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances; MDA: Malondialdehyde; PUFAs: Polyunsaturated Fatty Acids; GSH: Glutathione; BSO: Buthionine Sulphoximine; NAC: N-acetyl-cysteine; Gpx1: Glutathione Peroxidase; γGCS: Gamma Glutamyl Cysteine Synthetase; GR: Glutathione Reductase; SOD: Superoxide Dismutase.</p>									

Table 2 – Animal Studies.

Study	Intervention	Cell line/type of tumor	Design	Anti-cancer treatment	Lipid Peroxidation	Presence of antioxidant	Cytotoxic effect	Antioxidant enzymes
Colas, et al., 2004[29]	Diet low (palm oil) or high (DHASCO) in DHA content.	Mammary tumors induced by N-methylnitrosourea (NMU) in rats.	DHA group was divided into without or with vitamin E.	Ionizing radiation of 18 Gy	-	Abolished sensitization	↑	-

Study	Intervention	Cell line/type of tumor	Design	Anti-cancer treatment	Lipid Peroxidation	Presence of antioxidant	Cytotoxic effect	Antioxidant enzymes
Colas, et al., 2006[30]	Palm oil or DHA group receiving DHASCO.	Mammary tumors induced by N-methylnitrosourea (NMU) in Sprague-Dawley rats.	Epirubicin was given as a weekly injection for both groups	Epirubicin	-	Abolished epirubicin enhancement of efficacy	↑	-
Hajjaji, et al., 2012[28]	Palm oil or DHA (DHASCO)	Rats with chemically induced mammary tumors where it is known that DHA sensitize tumors to epirubicin	After mammary tumors were induced rats were fed a control diet (palm oil) or a DHA-enriched diet (DHASCO)	Epirubicin	↑LPO in tumors compared to control rats, liver or heart.. ↔ LPO in liver, heart, or intestine	-	-	Total antioxidant activity: ↔ in tumors, liver, or heart ↑ in intestine. Gpx: ↔ in liver and intestine, ↑ in tumors and heart. GPx in the heart was higher than in tumors, liver, or intestine. SOD: ↔ in tumors or liver, ↑ in heart and intestine. SOD was greater in tumors compared to liver or heart, but lower compared to intestine
Hardman, et al., 1999[35]	Diet supplemented with 3% or 6% fish oil	MCF7 human breast carcinoma xenografts in mice	Four groups: one chow diet and no irinotecan Three	Irinotecan	↔ TBARS in livers. Tumours had regressed to	-	↑	-

Study	Intervention	Cell line/type of tumor	Design	Anti-cancer treatment	Lipid Peroxidation	Presence of antioxidant	Cytotoxic effect	Antioxidant enzymes
			groups received irinotecan and diets: 1. 7% corn oil 2. 4% corn oil, 3% fish oil 3. 1% corn oil, 6% fish oil		the extent that there was not enough tissue for TBARS analyses.			
Hardman, et al., 2001[12]	Diet containing 3% fish oil concentrate (FOC) and 2% Corn oil.	Cancer xenografts in mice (MDA-MB 231 cancer cells).	Mice bearing MDA-MB-231 human breast carcinoma xenografts divided into two groups: One group received diet containing 5% Corn oil and the other received diet containing 3% FOC and 2% Corn oil	Doxorubicin.	↑ TBARS in - tumors and liver		↑	Tumours had regressed to the extent that there was not enough tissue for enzyme analyses.
Hardman, et al., 2002[25]	Diet containing 3% fish oil concentrate (FOC) and 2% Corn oil.	Cancer xenografts in mice (MDA-MB 231 cancer cells).	Mice were fed fish oil concentrate (FOC) or control diets, with and without Vitamin E and sacrificed before and after doxorubicin..	Doxorubicin.	↔ lipid peroxidation in liver or colon.	Did not prevent a ↑ doxorubicin-induced increase in lipid peroxidation in mice that consumed the FOC diet.	↑	-

Study	Intervention	Cell line/type of tumor	Design	Anti-cancer treatment	Lipid Peroxidation	Presence of antioxidant	Cytotoxic effect	Antioxidant enzymes
Kokura, et al., 2002[36]	EPA	Rat AH109A carcinoma into Male Donryu rats	EPA administration started on the day carcinoma was implanted and continued for 10 days. Buthionine sulphoximine (BSO) was given orally. After receiving EPA or BSO rats were given Hyperthermia.	Hyperthermia using radiofrequency dielectric Heater with an 8 MHz dielectric system.	↑TBARS, ↓GSH. There was an inverse linear correlation between TBARS in tumor tissue and tumor volume after treatment.	-	↑	-
Xue, et al., 2006[27]	Parenteral supplementation with single and combined glutamine and n-3 PUFAs.	MatBIII mammary adenocarcinoma tumor-bearing rats.	Doxorubicin treatment was initiated when the tumor mass reached about 1.2 cm ³ .	Doxorubicin	↔ LPO in cardiac tissue compared to control receiving doxorubicin	-	↑	↔ cardiac antioxidant enzyme reserves compared to control receiving doxorubicin

↑higher than control; ↔ no difference from control; ↓lower than control; DHA: Docosahexaenoic Acid; LPO: Lipid Peroxidation; Gpx: Glutathione Peroxidase; SOD: Superoxide Dismutase; TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances; FOC: Fish Oil Concentrate; EPA: Eicosapentaenoic Acid; GSH: Glutathione; PUFAs: Polyunsaturated Fatty Acids.

Table 3 – Human Studies.

Study	Study Type	Intervention	Subjects	Design	Anti-cancer treatment	Oxidative stress related results
Bonato et al., 2012[37]	Clinical trial	Fish oil (0.3 g EPA + 0.4 g DHA)	Patients who undergone surgery for removal of tumors at various sites (predominantly gastrointestinal) and will begin chemotherapy.	Control group received standard chemotherapy, and Fish oil group received 2 g/day of fish oil and chemotherapy for 8 weeks	5-fluorouracil and leucovorin	↑superoxide production by polymorphonuclear cells. ↔ Hydrogen peroxide production by polymorphonuclear cells
Elbarbary, et al., 2016[38]	Randomized, double-blind, placebo-controlled trial.	Fish oil (180 mg EPA+ 120 mg DHA)	Children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia in the maintenance phase.	Group A received oral Methotrexate and n-3 fatty acids and group B received methotrexate and placebo for 6 months	Methotrexate	normal antioxidant levels, ↔ oxidative stress markers, ↓ levels of MDA, ↑total antioxidant capacity and antioxidant levels compared to B
Finocchiaro, et al., 2012[39]	Randomized, double-blind, placebo-controlled trial.	510 mg EPA + 340 mg DHA	Patients with advanced non-small-cell lung cancer undergoing chemotherapy.	Divided into two groups EPA and DHA or placebo for 66 days.	Cisplatin and Gemcitabine.	↓ Plasma HNE and ROS, ↓ ROS compared to placebo group.
Mansara, et al., 2015[40]	Case series.	Fish oil (EPA+DHA). Dose was individualized.	Five Indian women with poorly differentiated breast carcinoma and who underwent a modified radical mastectomy.	Postsurgery, patients were given fish oil capsules during chemotherapy and were followed-up to six chemotherapy cycles.	Adriamycin, 5-fluorouracil, cyclophosphamide, doxorubicin, paclitaxel.	↑SOD, CAT, Grx and Oxygen Radical Absorbance Capacity level compared with baseline values and supplementation.

↑higher than control; ↔ no difference from control; ↓lower than control; EPA: Eicosapentaenoic Acid; DHA: Docosahexaenoic Acid; MDA: Malondialdehyde; HNE: 4-hydroxy-2-nonenal; ROS: Reactive Oxygen Species; SOD: Superoxide Dismutase; CAT: Catalase; Grx: Glutathione Reductase.

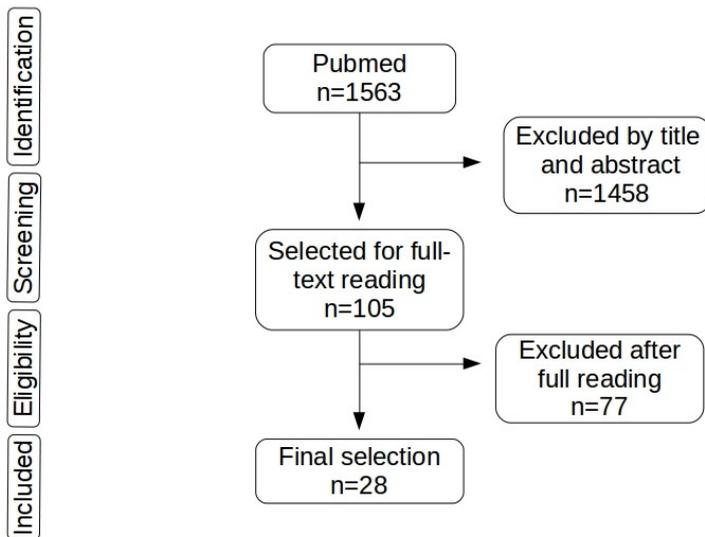


Figure 1: Flow diagram of the study according to the PRISMA statement

REFERENCES

- [1]Merendino N, Costantini L, Manzi L, Molinari R, D'Eliseo D, Velotti F. Dietary ω -3 Polyunsaturated Fatty Acid DHA: A Potential Adjuvant in the Treatment of Cancer. *BioMed Res Int* 2013;2013:1–11. doi:10.1155/2013/310186.
- [2]Siddiqui RA, Harvey KA, Xu Z, Bammerlin EM, Walker C, Altenburg JD. Docosahexaenoic acid: A natural powerful adjuvant that improves efficacy for anti-cancer treatment with no adverse effects. *BioFactors* 2011;37:399–412. doi:10.1002/biof.181.
- [3]Song E, Kim H. Docosahexaenoic Acid Induces Oxidative DNA Damage and Apoptosis, and Enhances the Chemosensitivity of Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2016;17:1257. doi:10.3390/ijms17081257.
- [4]Siddiqui RA, Harvey K, Stillwell W. anti-cancer properties of oxidation products of docosahexaenoic acid. *Chem Phys Lipids* 2008;153:47–56. doi:10.1016/j.chemphyslip.2008.02.009.
- [5]Murphy RA, Mourtzakis M, Chu QSC, Baracos VE, Reiman T, Mazurak VC. Supplementation with fish oil increases first-line chemotherapy efficacy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2011;117:3774–80. doi:10.1002/cncr.25933.
- [6]Bougnoux P, Hajjaji N, Ferrasson MN, Giraudeau B, Couet C, Le Floch O. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br J Cancer* 2009;101:1978–85. doi:10.1038/sj.bjc.6605441.
- [7]Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P, others. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* 2009;6:e1000097.
- [8]Antal O, Hackler L, Shen J, Mán I, Hideghéty K, Kitajka K, et al. Combination of unsaturated fatty acids and ionizing radiation on human glioma cells: cellular, biochemical and gene expression analysis. *Lipids Health Dis* 2014;13:142.
- [9]Jiao Y, Hannafon BN, Zhang RR, Fung K-M, Ding W-Q. Docosahexaenoic acid and disulfiram act in concert to kill cancer cells: a mutual enhancement of their anti-cancer actions. *Oncotarget* 2017. doi:10.18632/oncotarget.14702.

- [10]Zajdel A, PADUSZY—SKI P, Gruchlik A. Polyunsaturated fatty acids alter expression of genes encoding antioxidant enzymes in A549 cells exposed to doxorubicin. *Acta Pol Pharm* 2010;67:696–700.
- [11]Ding W-Q. Clioquinol and docosahexaenoic acid act synergistically to kill tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5:1864–72. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0067.
- [12]Hardman WE, Avula CR, Fernandes G, Cameron IL. Three percent dietary fish oil concentrate increased efficacy of doxorubicin against MDA-MB 231 breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2001;7:2041–2049.
- [13]Baumgartner M, Sturlan S, Roth E, Wessner B, Bachleitner-Hofmann T. Enhancement of arsenic trioxide-mediated apoptosis using docosahexaenoic acid in arsenic trioxide-resistant solid tumor cells. *Int J Cancer* 2004;112:707–12. doi:10.1002/ijc.20462.
- [14]Cai F, Sorg O, Granci V, Lecumberri E, Miralbell R, Dupertuis YM, et al. Interaction of ω -3 polyunsaturated fatty acids with radiation therapy in two different colorectal cancer cell lines. *Clin Nutr* 2014;33:164–70. doi:10.1016/j.clnu.2013.04.005.
- [15]Fahrman JF, Hardman WE. Omega 3 fatty acids increase the chemo-sensitivity of B-CLL-derived cell lines EHEB and MEC-2 and of B-PLL-derived cell line JVM-2 to anti-cancer drugs doxorubicin, vincristine and fludarabine. *Lipids Health Dis* 2013;12:36.
- [16]Gederaas OA, Schønberg SA, Ramstad S, Berg K, Johnsson A, Krokan HE. Cell specific effects of polyunsaturated fatty acids on 5-aminolevulinic acid based photosensitization. *Photochem Photobiol Sci* 2005;4:383–9. doi:10.1039/B502000J.
- [17]Mahéo K, Vibet S, Steghens JP, Dartigeas C, Lehman M, Bougnoux P, et al. Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: A role for lipoperoxidation. *Free Radic Biol Med* 2005;39:742–51. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.04.023.
- [18]Vibet S, Goupille C, Bougnoux P, Steghens J-P, Goré J, Mahéo K. Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response. *Free Radic Biol Med* 2008;44:1483–91. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.009.

- [19]Rigas B, Sun Y. Induction of oxidative stress as a mechanism of action of chemopreventive agents against cancer. *Br J Cancer* 2008;98:1157–60. doi:10.1038/sj.bjc.6604225.
- [20]Block KI, Koch AC, Mead MN, Tothy PK, Newman RA, Gyllenhaal C. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Cancer Treat Rev* 2007;33:407–18. doi:10.1016/j.ctrv.2007.01.005.
- [21]Bougnoux P, Hajjaji N, Maheo K, Couet C, Chevalier S. Fatty acids and breast cancer: Sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Prog Lipid Res* 2010;49:76–86. doi:10.1016/j.plipres.2009.08.003.
- [22]Barrera G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncol* 2012;2012:1–21. doi:10.5402/2012/137289.
- [23]Bareggi SR, Cornelli U. Clioquinol: Review of its Mechanisms of Action and Clinical Uses in Neurodegenerative Disorders: Clioquinol. *CNS Neurosci Ther* 2012;18:41–6. doi:10.1111/j.1755-5949.2010.00231.x.
- [24]Kello M, Mikeš J, Jendželovský R, Koval' J, Fedoročko P. PUFAs enhance oxidative stress and apoptosis in tumour cells exposed to hypericin-mediated PDT. *Photochem Photobiol Sci* 2010;9:1244. doi:10.1039/c0pp00085j.
- [25]Hardman WE, Munoz J, 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 Int* 2002;2:10.
- [26]Lindskog M, Gleissman H, Ponthan F, Castro J, Kogner P, Johnsen JI. Neuroblastoma cell death in response to docosahexaenoic acid: Sensitization to chemotherapy and arsenic-induced oxidative stress. *Int J Cancer* 2006;118:2584–93. doi:10.1002/ijc.21555.
- [27]Xue H, Ren W, Denking M, Schlotzer E, Wischmeyer PE. Nutrition modulation of cardiotoxicity and anti-cancer efficacy related to doxorubicin chemotherapy by glutamine and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Parenter Enter Nutr* 2016;40:52–66.
- [28]Hajjaji N, Besson P, Bougnoux P. Tumor and non-tumor tissues differential oxidative stress response to supplemental DHA and

chemotherapy in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012;70:17–23. doi:10.1007/s00280-012-1884-0.

[29]Colas S, Paon L, Denis F, Prat M, Louisot P, Hoinard C, et al. Enhanced radiosensitivity of rat autochthonous mammary tumors by dietary docosahexaenoic acid. *Int J Cancer* 2004;109:449–54. doi:10.1002/ijc.11725.

[30]Colas S, Maheo K, Denis F, Goupille C, Hoinard C, Champeroux P, et al. Sensitization by Dietary Docosahexaenoic Acid of Rat Mammary Carcinoma to Anthracycline: A Role for Tumor Vascularization. *Clin Cancer Res* 2006;12:5879–86. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0386.

[31]Sturlan S. Docosahexaenoic acid enhances arsenic trioxide-mediated apoptosis in arsenic trioxide-resistant HL-60 cells. *Blood* 2003;101:4990–7. doi:10.1182/blood-2002-08-2391.

[32]Germain E, Chajès V, Cognault S, Lhuillery C, Bougnoux P. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. *Int J Cancer* 1998;75:578–583.

[33]Puskás LG, Fehér LZ, Vizler C, Ayaydin F, Rásó E, Molnár E, et al. Polyunsaturated fatty acids synergize with lipid droplet binding thalidomide analogs to induce oxidative stress in cancer cells. *Lipids Health Dis* 2010;9:56.

[34]Vartak S, Robbins ME, Spector AA. Polyunsaturated fatty acids increase the sensitivity of 36B10 rat astrocytoma cells to radiation-induced cell kill. *Lipids* 1997;32:283–292.

[35]Hardman WE, Moyer MP, Cameron IL. Fish oil supplementation enhanced CPT-11 (irinotecan) efficacy against MCF7 breast carcinoma xenografts and ameliorated intestinal side-effects. *Br J Cancer* 1999;81:440.

[36]Kokura S, Nakagawa S, Hara T, Boku Y, Naito Y, Yoshida N, et al. Enhancement of lipid peroxidation and of the antitumor effect of hyperthermia upon combination with oral eicosapentaenoic acid. *Cancer Lett* 2002;185:139–144.

[37]Bonatto SJR, Oliveira HHP, Nunes EA, Pequeto D, Iagher F, Coelho I, et al. Fish Oil Supplementation Improves Neutrophil Function During Cancer Chemotherapy. *Lipids* 2012;47:383–9. doi:10.1007/s11745-011-3643-0.

[38]Elbarbary NS, Ismail EAR, Farahat RK, El-Hamamsy M. ω -3 fatty acids as an adjuvant therapy ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: A randomized placebo-controlled study. *Nutrition* 2016;32:41–7. doi:10.1016/j.nut.2015.06.010.

[39]Finocchiaro C, Segre O, Fadda M, Monge T, Scigliano M, Schena M, et al. Effect of n-3 fatty acids on patients with advanced lung cancer: a double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 2012;108:327–33. doi:10.1017/S0007114511005551.

[40]Mansara P, Ketkar M, Deshpande R, Chaudhary A, Shinde K, Kaul-Ghanekar R. Improved antioxidant status by omega-3 fatty acid supplementation in breast cancer patients undergoing chemotherapy: a case series. *J Med Case Reports* 2015;9. doi:10.1186/s13256-015-0619-3.

5.3 ARTIGO 3

TITLE

Fish oil decreases severity of treatment related adverse events and hospitalization of gastrointestinal cancer patients undergoing chemotherapy: a placebo-controlled, triple-blind clinical trial.

AUTHORS

Carolina de Quadros Camargo^{a,b}, Michel Carlos Mocellin^b, Henver Simionato Brunetta^{a,c}, Thayz Rodrigues Chagas^{a,b}, Maria Emília de Souza Fabre^c, Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade^b, Edson Luiz da Silva^b, Everson Araújo Nunes^{a,b,c}

^aLaboratory of Investigation in Chronic Diseases, Department of Physiological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^bNutrition Graduation Program, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^cMulticenter Graduation Program in Physiological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^dOncology Research Center – Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

CORRESPONDING AUTHOR

Everson Araújo Nunes

Email address: everson.nunes@ufsc.br

Postal address: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas / Departamento de Ciências Fisiológicas.

Campus Universitário Trindade

Trindade

88040900 - Florianópolis, SC - Brasil

TRIAL REGISTRATION

ID number: NCT02699047

www.clinicaltrials.gov

ABSTRACT

Background and Aims: Due to its high peroxidizable characteristics, n-3 fatty acids, present in fish oil, could increase tumor cells sensitivity to conventional cancer treatment while non-neoplastic cells remain unaffected, this may lead to an increase in cancer treatment response with no increase of adverse effects. The aim of this study was to evaluate anti-cancer treatment response, performance status and adverse events after supplementing gastrointestinal cancer patients with fish oil. Oxidative stress parameters were investigated as a mechanism to explain non-neoplastic cells response to intervention. **Methods:** This is a randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial. Fish oil group (FOG) received two capsules of fish oil containing 1.55 g of EPA+DHA a day for nine weeks, placebo group (PG) received two capsules containing olive oil. Baseline was right before the administration of the first chemotherapy, oxidative stress parameters, adverse events presence and grading and performance status were assessed at baseline and after nine weeks of supplementation. Tumor markers, response to treatment and survival were evaluated at baseline and after one year of study inclusion. **Results:** 76 patients were considered eligible, 56 were randomized, and 51 remained for analysis. After nine weeks, although there were no differences between groups for treatment response and

presence of adverse events, PG patients were graded with more severe diarrhea than FOG patients ($p=0.03$) and with higher performance status score ($p=0.02$). PG group also had more hospitalizations due to adverse events than FOG group ($p=0.048$). No differences in lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes were observed between groups. **Conclusions:** Fish oil may lead to a better performance status for gastrointestinal cancer patients undergoing chemotherapy while does not seem to increase treatment-related toxicity.

KEYWORDS

Fish oil, n-3 fatty acids, cancer, treatment response, tumor markers, oxidative stress.

INTRODUCTION

Gastrointestinal cancers, represented by tumors on esophagus, stomach or colon and rectum, are among the most common cancers worldwide[1]. Conventional treatment for these type of diseases consists in therapies such as surgery, chemotherapy, and radiation[2]. However, currently approved treatments for these tumors result in only modest improvement in overall survival (OS), especially when dealing with advanced diseases [3]. Development of new therapeutic strategies with higher efficacy or new approaches to treatment are encouraged and needed[3,4].

Direct or indirect reactive oxygen species generation is one of the mechanisms of action presented by the majority of chemotherapeutics used in gastrointestinal cancer treatment to induce cell death[5]. Increased cellular oxidative stress, characterized by a higher concentration of reactive oxygen species, favors the formation of toxic compounds derived from a process called lipid peroxidation[6,7]. N-3 polyunsaturated fatty acids, found in fish oil, mainly eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), when ingested are incorporated into cells membranes, independently if cancerous or not. These fatty acids, have a higher number of double bonds and are highly peroxidizable. Therefore, n-3 fatty acids are more

susceptible to reactive oxygen species and the onset of lipid peroxidation[8].

Studies show that cancerous cells exposed to n-3 fatty acids (or tumors of animals supplemented with) presented a higher production of compounds derived from lipid peroxidation and, as a consequence, increased susceptibility to cell death or tumor size reduction [9,10]. In addition, when supplementation occurs concomitantly with treatment, it seems to induce synergistic or additive effects, increasing cells death in some lines[11–13].

Besides lipid peroxidation, other mechanisms mediated by n-3 fatty acids are shown to enhance the efficacy of anti-cancer drugs such as improvement of drug uptake and intracellular targets including cyclooxygenase-2, nuclear factor kappa B, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, mitogen-activated protein kinase, AKT, and BCL-2/BAX are also involved[14].

However, although n-3 fatty acids demonstrate the capacity to amplify chemotherapy effects, they seem to have “a selective” effect. “Selective sensitization” was the term attributed to the observation of distinct effects when exposing different cells types (*e.g.* malignant and non-malignant) to n-3 fatty acids. This hypothesis suggests that n-3 fatty acids do not increase treatment sensitivity (*e.g.* side-effects) in healthy cells. This difference is possibly related to cells’ oxidative stress response, more consistent and efficient in healthy cells/tissues when compared to neoplastic cells/tumors[8]. Such observation might suggest that n-3 fatty acids can be used as adjuvants to improve the efficacy of anti-cancer treatments without increasing adverse effects, as observed in two studies performed in human subjects[15,16]

This is the first randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial to evaluated treatment response and adverse effects after combining anti-cancer agents and fish oil supplementation. In addition, this clinical trial also evaluates the effect of fish oil on oxidative stress of non-neoplastic cells during anticancer treatment. We hypothesize that fish oil will increase treatment response without increasing adverse events and lipid peroxidation on healthy cells.

MATERIALS AND METHODS

This is a randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial, registered at ClinicalTrials.gov (NCT02699047) and Brazilian Register of Clinical Trials (RBR-2XCD99).

Patients

Patients with lower gastrointestinal cancer (stomach, intestine, rectum, and anal canal) assisted at a cancer-specialized public Hospital and outpatient clinic (Oncology Research Center - Florianópolis, Santa Catarina, Brazil) between March 1st, 2015 and March 31st, 2016 were enrolled in this study. Eligibility criteria were: age between 18 and 70 years, no previous chemo or radiotherapy treatment, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status[17] of less than or equal to 2 and a prescription for chemotherapy initiation. Exclusion criteria were: diagnosis of inflammatory or infectious disease; Diabetes Mellitus; pregnancy; inability to take capsules orally; patients in palliative care; allergy to the dietary supplements used; use of statins; chronic use of anti-inflammatory drugs or use on the day prior to baseline assessment; use of polyunsaturated fatty acids supplements in the six months prior to inclusion; continuous use of supplements containing antioxidants and cognitive limitations to understand the study protocol and answer the questions asked.

Study design

Eligible patients were randomized into two groups: experimental group, which received two capsules per day of fish oil containing 1.55 g/day of EPA and DHA (Omega 3 Concentrate®, Tiaraju, Rio Grande do Sul, Brazil) or control group, which received 2 capsules/day of placebo supplement containing extra-virgin olive oil (Cápsulas de oliveira®, Tiaraju, Santo Ângelo, Rio Grande do Sul, Brazil), in addition to the habitual diet. Supplementation started on the same day of the first chemotherapy and continued for nine weeks. Patients were instructed to ingest capsules right before a substantial meal, both at the same time or divided into two meals. The nutritional information of the supplements is presented in Table 1.

Table 1 - Nutritional composition of supplements used.

	Olive Oil- 2 g (2 capsules)	Fish oil – 2.5 g (2 capsules)
Calories (kcal)	20	26
Protein (g)	0.6	0.7
Total Fat (g)	2.0	2.50
Monounsaturated Fat	1.4	-
Oleic Acid (mg)	1100	0
Polyunsaturated Fat (mg)	200	1500
Docosahexaenoic Acid - DHA (mg)	0	550
Eicosapentaenoic Acid - EPA (mg)	0	1000

Information provided by the producer (Tiarajú, Santo Ângelo, Rio Grande do Sul, Brazil).

Fish oil was extracted from sardines, anchovies, and mackerel and fatty acids are presented in the form of ethyl ester. Placebo consisted of pure extra-virgin olive oil. Patients who received radiotherapy in addition to chemotherapy were not excluded, but analysis of oxidative stress parameters was also performed separately. The study protocol was carried out in accordance with the ethical standards of the World Medical Association's Declaration of Helsinki and was reviewed and approved by the Ethic Review Board of the Hospital. Written informed consent was obtained from each patient prior to participation in the trial.

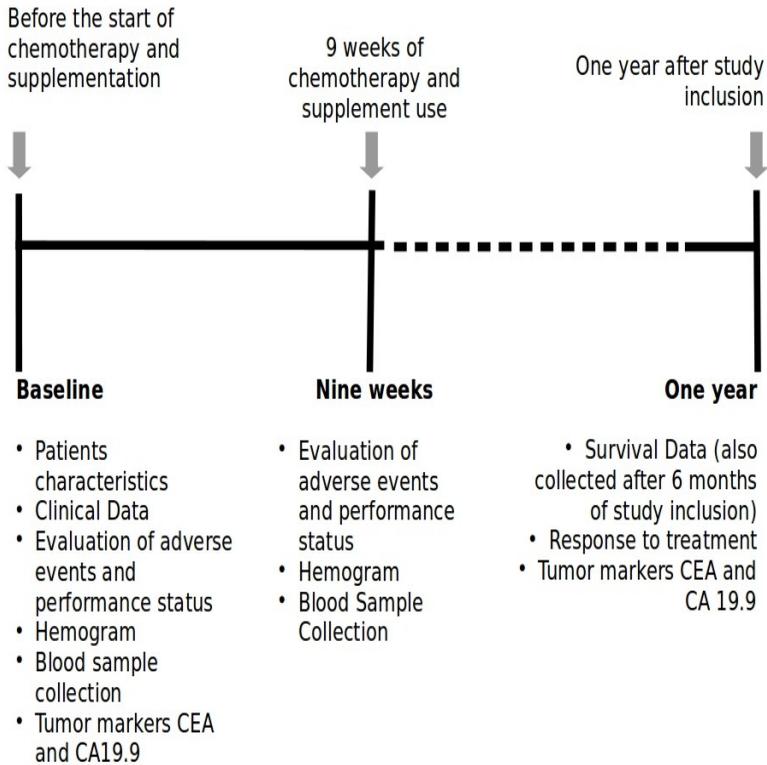


Figure 1 – Study Timeline

Randomization and allocation concealment

Sequence generation (1:1) was created using the computer software STATA® version 13.0 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA) and was stratified by gender. Three sequences were generated in accordance with the cancer type and with the incidence prospectation at the hospital, to evenly distribute tumor types (colorectal, gastric and other cancers) and males or females within groups. One researcher not involved in the study codified the name of the groups using different numeric codes (eight digits each) from a table containing random

numbers. No code was repeated. These codes were used to identify the supplements by the same researcher. Randomization was planned to provide a proportion 1:1 in both strata (male or female). Researchers responsible for recruitment had access to the list with the codified randomization sequence, but it was not possible to predict to which group the patient would be allocated.

Blinding

Fish oil and olive oil were provided in soft gel capsules with same appearance and color. Both supplements were stored in an equal plastic white bottles identified with a numeric code (the same of the randomization sequence list). The patients and their caregivers, medical staff and researchers involved in the recruitment, data collection, and analysis (biochemical and statistical analysis) were blinded. To minimize the residual taste that could compromise patient blinding, we instructed the consumption of the supplements just before a main meal.

Data collection

Clinical data (tumor type and stage, antineoplastic treatment protocol, associated comorbidities) and date of birth were obtained from patient's charts. Tobacco use, medications and body weight change in the past six months were reported by the patient. All outcomes were collected before the intravenous chemotherapy session (baseline) and after nine weeks of treatment and supplementation, except for tumor markers, response to treatment and survival, which were recorded at baseline, 6 months (for survival) and one year after study inclusion.

Nutritional Status

Weight, height, mid-upper arm circumference and triceps skinfold were measured by a nutritionist with experience in anthropometry and standardized for these measures, according to the techniques proposed by WHO[18]. An electronic platform scale with a coupled vertical stadiometer (Toledo®, Toledo Company of Brazil, São Paulo, Brazil; scale: 100 g and 0.5 cm), an inelastic tape measure and a skinfold compass (Lange Skinfold Caliper®, Beta Technology, Santa Cruz, California, USA; scale: 1 mm) were used.

Presence and grading of treatment-related adverse events

Toxicity to chemotherapy treatment was graded using Common Terminology Criteria for Adverse Events v 4.0 (CTCAE) provided by National Cancer Institute of United States of America. Hematological

and gastrointestinal toxicities most commonly associated with treatments used were graded at baseline and after nine weeks of treatment based on patients report and blood tests. Grades range from 0 (no symptoms) to 5 (death). Treatment dose reduction, discontinuation, and delay due to toxicities, as well as hospitalization and death at any given moment during 9 weeks, were also recorded.

Performance Status, response to treatment and survival

As an indication of prognosis, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status[17] was evaluated at baseline and after nine weeks . After one year since study initiation, data on response to treatment (disease progression, relapse and complete response to treatment) was collected on patients charts. Also, six months and one-year-survival were recorded. After 27 months of study initiation (June, 2017) we collected again data on survival and follow-up time. Tumor markers CEA (ng/ml) and CA 19.9 (U/ml) were obtained in patient's charts. Baseline values were those right before the initiation of chemotherapy; final values were the ones closest to the date marking one year of patient's study inclusion.

Blood Collection

Venous blood samples were collected into tubes containing lithium-heparin as anti-coagulant. Blood was centrifuged, plasma was collected, leukocytes and erythrocytes were isolated, and all were frozen immediately at -80°C for further analysis. The lysate obtained from erythrocytes was used for antioxidant enzymes activities assays.

Erythrocyte Catalase Activity

This assay was adapted from the procedures described by Aebi[19]. Data were expressed as units normalized by hemoglobin concentration.

Erythrocyte Superoxide Dismutase Activity

SOD activity was determined by the ability of the enzyme to inhibit the autoxidation of pyrogallol[20]. The principle of this method is based on the competition between the pyrogallol autoxidation by $\text{O}_2^{\cdot-}$ and the dismutation of this radical by SOD. SOD activities are expressed as units/mg of hemoglobin. One unit of SOD activity is defined as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of pyrogallol autoxidation.

Erythrocyte Glutathione Peroxidase Activity

GPx activity was measured by monitoring the oxidation of β -nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt (NADPH) in the presence of hydrogen peroxide, as previously described by Wendel[21] and the specific activity was represented as U/mg hemoglobin.

Plasma and Leukocyte Lipid Hydroperoxides

The method described by Nourooz-Zadeh et al.[22] was used. The plasma was homogenized with methanol and then centrifuged. The supernatant was transferred to six wells of a 96-well plate, in 3 of these wells was added triphenyl phosphate (TPP) and only methanol in the remaining three. The samples were incubated for 30 minutes and then added a FOX-2 solution and incubated again. The absorbance was read at 550 nm. The value of absorbance of the samples treated with tpp was subtracted from the absorbance value of the samples without tpp, a standard curve was made with known concentrations of hydrogen peroxide (H1009 Hydrogen Peroxide Solution, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Total lipids were measured according to Cheng, Zheng and Vanderghaynst (2011)[23] and the lipid hydroperoxides data normalized to this variable. The results were expressed in nmol/mg of lipids.

Erythrocyte Fatty Acid Analysis

The erythrocyte fatty acid profile was determined by HPLC according to the method described by Nishiyama-Naruke et al.[24]. Cells fatty acid constituents of phospholipids, triacylglycerols, cholesterol esters and free fatty acids were extracted using chloroform : methanol (2 : 1, v/v), adapting the method described by Folch et al.[25]. Fatty acids were derivatized with 4-bromomethyl-7-coumarin and acetonitrile as described by Abushufa et al.[26] and separated on a reversed phase analytical column (Discovery BIO Wide Pore, C8, 5 microns particles, 250 9 4.6 mm; Supelco/Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The chromatographic analysis was performed with an Alliance BIO Separation Module e2796 (Waters Corp., Milford, MA, USA). Compounds were detected by fluorescence detection (Waters 2475 Multi k Fluorescence Detector; Waters Corp.). Chromatographic data were recorded and integrated into EMPOWER PRO, version 2.0 (Waters Corp.). The fatty acids investigated were: DHA, EPA, arachidonic, stearic, oleic, linoleic, α -linolenic, palmitic, myristic and lauric. Data are expressed as a percentage of total fatty acids.

Statistical Analysis

Determination of data symmetry was based on Shapiro-wilk test results and analyses of the coefficient of variation. Quantitative variables are presented as median and interquartile and average \pm standard deviation according to symmetry. Categorical variables are presented in categories and frequencies. Mann-Whitney test was used to compare groups and Wilcoxon matched-pairs test to compare moments in the same group. For categorical variables, X^2 Test, X^2 Test with Yates correction and Fisher's Exact Test were used according to data distribution. ANCOVA was performed to test differences in continuous variables between groups using baseline data as a covariate, for these analyses asymmetrical data was transformed in natural logarithm. For the survival data we performed a Kaplan-Meier survival estimates using log-rank test to compare differences between groups. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. For effect sizes of non-parametric tests, results on eta-squared (η^2) were transformed to Cohen's d , effect sizes of 0.2 were considered small, 0.5 were considered medium and 0.8 were considered large. Statistical analyses were performed using STATA[®] statistical software version 11.0 for Windows (StataCorp, Texas, USA).

RESULTS

During the recruitment period, 76 patients were considered eligible for the study. Of these, six patients denied participation, while researchers were unable to contact 14 individuals before they underwent the first chemotherapy session. A total of 56 patients were randomized into two study groups, 28 on placebo group and 28 on fish oil group. Two patients withdrew from the placebo group; both did not want to attend the evaluations anymore. Two on fish oil group changed their treatment to another clinic and one patient in fish oil group started using an immunomodulatory nutritional supplement enriched with n-3 fatty acids, therefore, was excluded from the analysis. For the remaining 51 patients, characteristics are presented in Table 2.

Both study groups were similar regarding baseline characteristics, with no significant difference in sex, age, tumor location, disease stage, performance status, treatment protocol, smoking habit and

nutritional status. The most common diagnosis was colon cancer, in 29 patients (56.86%), and the most used chemotherapy protocol was oxaliplatin plus capecitabine. Although patients in both groups presented weight loss in the six months prior to study inclusion, at baseline, both groups were at overweight classification according to BMI. Patients presented similar values of skinfolds adequacy, indicating eutrophy except for triceps skinfold which also indicated overweight.

Presence and grading of treatment-related adverse events

There were no differences between groups at baseline for any of the investigated adverse events. After nine weeks of treatment, the most common gastrointestinal adverse events were nausea (40.4%), anorexia (34%) and diarrhea (28.8%). Regarding hematological adverse events, after nine weeks, only one patient presented grade higher than 2 for lymphocyte count reduction. Anemia, neutrophil, and lymphocyte count reductions were the most common events, although each only had 4 (8,6%) individuals. There were no differences between groups for the presence of adverse events after nine weeks of treatment. However, diarrhea grades were different between groups. Of the six patients that presented this adverse event in the placebo group, five were graded 2 or 3. As for fish oil group, of the eight patients that presented diarrhea after nine weeks, only one received grade 2, none received grade 3 and 7 were classified as grade 1 and this was statistically significant ($p=0.03$). For the other gastrointestinal and hematological adverse events, there were no differences related to grading after nine weeks (Supplementary Tables 1 and 2).

Adverse events consequences and outcomes were monitored during supplementation period of nine weeks and are presented in Table 4. Chemotherapy administration delay, interruption and dose reduction due to adverse events occurred in both groups with no statistically significant differences. In each group, one individual died because of treatment-related adverse events. Hospitalization caused by adverse events also occurred in both groups, but in the placebo group, six individuals were hospitalized compared to one subject in fish oil group, and this difference was statistically significant ($p=0.048$). Fish oil was a protective factor or hospitalization ($RR=0.17$), although this was not significant ($p=0.09$).

Performance Status, response to treatment and survival

Performance status was evaluated at baseline in order to verify if groups had the same indication of prognosis related to this parameter, no differences were found between groups (Table 2). After nine weeks, there was also no difference in presence or absence of performance restriction. But, there were differences when grades were considered (Table 5). Although fish oil group had significantly higher number of patients classified as grade 1 compared to placebo group when only grades 0 and 1 are considered ($p=0.01$), placebo group had a significant higher number of individuals classified as 2 or 3 compared to fish oil group when grades 1 and 2 or 3 are considered ($p=0.02$). This means that even though there were no differences between groups regarding presence or absence of performance restriction, individuals in the placebo group were classified with higher grades, indicating that they had severe performance restrictions than fish oil group individuals (Table 5).

We were not able to obtain data for tumor markers CEA and CA 19-9 for all the patients included in this study as these tests were performed only as a request of the assigned oncologist. The presented in this study were obtained from patients charts records. According to the collected data, there is a statistically significant difference at final values for tumor marker CA 19-9. As shown in Table 5, higher values were presented by individuals in placebo group when compared to final levels presented by fish oil group ($p=0.04$). However, after adjusting final values with baseline values, there are no differences between groups ($p=0.23$). For the remaining analysis of the response to treatment and survival (six months survival, one year survival and Kaplan-Meier survival estimates) there were no differences between groups after six months and one year of follow-up.

Oxidative Stress Variables

Catalase, Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase activity were measured at baseline and after nine weeks of treatment. Activity values for all the enzymes tested remained unchanged for both groups after nine weeks of treatment. Also, when baseline values and final values are compared between groups, there were no statistically different changes. For plasma and leukocyte lipid peroxidation, no differences were observed between groups and comparing baseline and final values in each group (Table 6). When individuals that were also

submitted to radiotherapy were excluded from the analysis, the results remained the same (data not shown).

Compliance

In order to evaluate if fish oil supplements were ingested by fish oil group and if, therefore, n-3 fatty acids were incorporated into cells membranes we performed erythrocytes fatty acids analysis. Fish oil group had an increased percentage of EPA on cells membranes after supplementation, and this was statistically significant ($p=0.03$) even after adjustments for baseline values ($p =0.04$). No increase in percentage of EPA or DHA was observed in placebo group (Table 3).

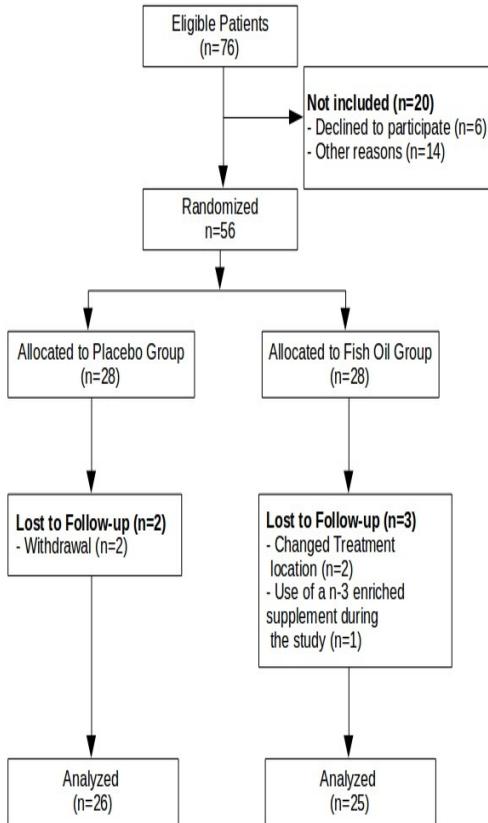


Figure 2 – Flowchart of participants.

Table 2 – Patients characteristics at baseline (part 1).

	Placebo Group (n=26)	Fish Oil Group (n=25)	p
Sex (n)			0.49*
Female	11 (42.31%)	13 (52.00%)	
Male	15 (57.69%)	12 (48.00%)	
Age (years)	51 [41; 60]	58 [46; 63]	0.12 [§]
Tumor Location			0.91*
Gastric	6 (23.08%)	5 (20.00%)	
Colon	14 (53.85%)	15 (60.00%)	
Rectum/sigmoid	6 (23.08%)	5 (20.00%)	
Disease Stage**			0.69*
2	6 (24.00%)	5 (20.00%)	
3	9 (36.00%)	12 (48.00%)	
4	10 (40.00%)	8 (32.00%)	
Performance Status			>0.05 ^a
0	10 (38.46%)	12 (48.00%)	
1	11 (42.31%)	11 (44.00%)	
2	5 (19.23%)	2 (8.00%)	
Comorbidities***			0.41*
Yes	9 (34.62%)	6 (24.00%)	
No	17 (65.38%)	19 (76.00%)	
Chemotherapy Treatment			>0.05 ^b
Oxaliplatin +capecitabine	11 (42.31%)	12 (48.00%)	
Oxaliplatin + fluorouracil	6 (23.08%)	2 (8.00%)	
Fluorouracil + leucovorin	5 (19.23%)	5 (20.00%)	
Others [‡]	4 (15.38%)	6 (24.00%)	
Radiotherapy			0.41 ^c
Yes	4 (15.38%)	2 (8.00%)	
No	22 (84.62%)	23 (92.00%)	
Smoking Habit			0.19*
Never Smoked	8 (30.77%)	14 (56.00%)	
Ex-Smoker	8 (30.77%)	5 (20.00%)	
Smoker and Passive Smoker	10 (38.46%)	6 (24.00%)	
Nutritional Status			

Table 2 – Patients characteristics at baseline (part 2).

	Placebo Group (n=26)	Fish Oil Group (n=25)	p
Body mass index (Kg/m ²)	25.56 (±4.16)	26.46 (±4.60)	0.47 [#]
% Weight Loss	11.34 (±12.88)	7.23 (±8.73)	0.19 [#]
Mid-Upper Arm circumference adequacy (%)	93.54 (±13.15)	92.17 (±12.81)	0.71 [#]
Triceps Skinfold adequacy (%)	116.78 (±53.08)	105.67 (±43.32)	0.47 [†]
Mid-arm muscle circumference adequacy (%)	90.90 (±9.72)	91.25 (±9.79)	0.84 [‡]

Data presented as median [interquartile range] for age, average (± standard deviation) for nutritional status variables and absolute frequencies (relative frequencies) for other variables.

*X² Test

^aX² Test and Fischer's Exact Test, categories were tested as two at once.

^bFischer's Exact Test, categories were tested as two at once.

^cX² Test, with Yates correction.

[#]T test

[†]Mann-Whitney Test

** For one individual, there was no record of disease stage

***Related comorbidities: Systemic arterial hypertension (n=11), hypothyroidism (n=4), pre-diabetes (n=1), osteoarthritis (n=1), heart murmurs (n=1) e arrhythmia (n=1).

[‡]Irinotecan+cisplatin;oxaliplatin+capecitabine+bevacizumab;epirubicin+cisplatin; cisplatin+capecitabine; folfiri+cetuximab

Table 3 – Erythrocyte EPA and DHA percentage before and after supplementation for each study group.

	Placebo Group	Fish Oil Group	p
EPA (%)			
Baseline	0.73 [0.52;0.73], n=19	0.73 [0.61; 0.85], n=17	0.97*
9 weeks	0.74 [0.60; 1.04], n=12	1.13 [0.32; 2.44], n=17	0.26*
p	0.93**	0.03**	0.04 [#]
Δ	0 (-0.15; 0.14), 11	0.70 (-0.17; 1.76), 14	0.10*
DHA (%)			
Baseline	0.05 [0.01; 0.16], n=19	0.11 [0.04; 0.17], n=17	0.16
9 weeks	0.03 [0.02; 0.12], n=12	0.07 [0.03; 0.20], n=17	0.17
p	0.86**	0.55**	0.32 [#]
Δ	0 (-0.02; 0.03), 11	0 (-0.02; 0.07), 14	0.70*

EPA= Eicosapentaenoic Acid; DHA= Docosahexaenoic Acid

Data presented as median [interquartile range]

*Mann-Whitney Test

**Wilcoxon matched-pairs test

[#]ANCOVA using baseline values as a covariate to test group differences in final values

Table 4 – Adverse Events Consequences during supplementation for each study group.

	Placebo Group (n=26)	Fish Oil Group (n=25)	p	RR	95% CI	p
Chemotherapy Administration Delay	5 (19,23%)	10 (40.00%)	0.10*	2.08	0.83 - 5.23	0.12
Chemotherapy Interruption	3 (11.54%)	2 (8.00%)	0.67**	0.69	0.13 - 3.81	0.67
Chemotherapy dose reduction	1 (3.85%)	3 (12.00%)	0.28**	3.12	0.35 - 28.03	0.31
Hospitalization	6 (23.08%)	1 (4.00%)	0.048**	0.17	0.02 - 1.34	0.09
Death	1 (3.85%)	1 (4.00%)	0.98**	1.04	0.07 - 15.74	0.98

RR= Relative Risk; CI= Confidence Interval.

Data presented as absolute frequencies (relative frequencies)

*Chi-squared Test

**Chi-squared Test, with Fisher correction.

Table 5 – Performance Status after supplementation, 6 months and one-year survival and one-year response to treatment for each study group.

	Placebo Group		Fish Oil Group		Effect Size (Cohen's d)	p
Performance Status after nine weeks	n=24	95% CI	n=23	95% CI		0.09*** **†
0	12 (50.00%) ^a	-	6 (26.09%) ^a	-	-	-
1	5 (20.83%) ^{bs}	-	14 (60.87%) ^{bs}	-	-	-
2	3 (12.50%) ^{ab}	-	3 (13.04%) ^{ab}	-	-	-
3	4 (16.67%) ^a	-	0 (0.00%) ^a	-	-	-
Carcinoembryonic antigen (CEA) (ng/mL)						
Baseline	3.35 [0.84; 171], n=14	-49.86-425.89	3.82 [0.8; 24.1], n=19	-31.39-291.08	0.08	0.83*
1 year	2.4 [1.08; 37], n=11	-202.53-658.61	2.92 [0.72; 6.57], n=18	-34.27-116.21	0.19	0.60*
p	0.89**		0.57**			0.77 [#]
Δ	-0.5 (-79.36; 145.45), 8		0.6 (-2.88; 3.30), 15			0.70*
Cancer antigen 19-9 (CA-19-9) (U/ml)						
Baseline	12.40 [4.22; 36.5], n=13	-123.99-949.61	12.80 [7.00; 79.56], n=13	18.44-99.36	0.17	0.66**
1 year	17.90 [15.96; 420], n=11	-358.21-1894.43	11 [6.54; 37.08], n=15	-15.79-103.32	0.85	0.04*
p	0.31**		0.96**			0.23 [#]
Δ	10.63 (-1.21; 383.5), 7		1.86 (-16.58; 4.22), 10			0.14*
Six months Survival	22 (88.00%), n=25	-	20 (83.33%), n=24	-	-	0.64 ^y
One year Survival	18 (72.00%), n=25	-	20 (77.55%), n=24	-	-	0.34** *
Complete response/ Follow-up	10 (40.00%), n=25	-	12 (50.00%), n=24	-	-	0.48** *
Disease progression/ Relapse	6 (24.00%), n=25	-	5 (20.83%), n=24	-	-	0.79** *

CI= Confidence Interval

Data presented in median [interquartile range] or absolute frequencies (relative frequencies).

[†]Difference between groups regarding presence (grades 1, 2 or 3) and absence (grade 0) of performance restriction.

[‡]There were differences between grades 1 and 0 ($p=0.01$), grades 1 and 3 ($p=0.01$) and grades 1 and 2 or 3 ($p=0.02$) between groups.

^{a, b}Groups assigned with the same letters are not significantly different

*Mann-Whitney Test

**Wilcoxon matched-pairs test

***Chi-squared Test

[‡]Chi-squared test with fisher correction

[#]ANCOVA using baseline values as a covariate to test group differences in final values

Table 6 – Oxidative stress variables before and after supplementation for each study group (part 1).

	Placebo Group			Fish Oil Group			Effect Size (Cohen's d)	p
Catalase (U/mg of hemoglobin)	Median	[interquartile range], n	95% CI	Median	[interquartile range], n	95% CI		
Baseline	0.77	[0.55;1.13], n=25	0.66-0.99	0.79	[0.39;1.23], n=24	0.62-1.05	0.03	0.91*
9 weeks	0.81	[0.45;1.11], n=21	0.60-1.12	0.60	[0.33;0.88], n=19	0.43-0.84	0.42	0.18*
p	0.64**			0.14**				0.54 [#]
Delta	0.14 (-0.28; 0.45), 21			-0.27 (-0.71; 0.15), 19				0.24 [‡]
Superoxide Dismutase (U/mg of hemoglobin)	Median	[interquartile range], n	95% CI	Median	[interquartile range], n	95% CI		
Baseline	0.74	[0.55;1.04], n=25	0.62-0.93	0.67	[0.37;1.03], n=24	0.56-0.94	0.11	0.69*
9 weeks	0.68	[0.42;0.87], n=21	0.52-0.92	0.76	[0.48;0.94], n=19	0.60-0.90	0.28	0.39*
p	0.54**			0.63**				0.41 [#]
Δ	-0.14 (-0.37; 0.25), 21			0.14 (-0.37; 0.45), 19				0.77 [‡]
Glutathione Peroxidase (U/mg of hemoglobin)	Median	[interquartile range], n	95% CI	Median	[interquartile range], n	95% CI		

Table 6 – Oxidative stress variables before and after supplementation for each study group (part 2).

	Placebo Group		Fish Oil Group		Effect Size (Cohen's d)	p
Baseline	9.57 [3.57;19.21], n=25	7.26-16.45	8.18 [4.06; 13.10] n=24	7.03-15.43	0.01	0.97*
9 weeks	7.72 [3.86; 13.04], n=21	6.09-13.41	7.50 [4.50; 13.21], n=19	6.06-14.69	0.09	0.78*
p	0.97**		0.55**			0.68 [#]
Δ	0.49 (-3.38; 1.44), 21		-0.90 (-5.42; 3.19), 19			0.82*
Leukocyte lipid peroxidation (nmol/mg of lipids)						
Baseline	0.84 [0.50; 1.88], n=23	0.78-1.88	0.72 [0.30; 2.49], n=21	0.83-2.57	0.10	0.75*
9 weeks	0.61 [0.20; 2.67], n=19	0.65-2.81	0.57 [0.48; 2.09], n=14	-3.78-13.59	0.31	0.38*
p	0.84**		0.51**			0.63 [#]
Δ	-0.17 (-0.89; 1.30), 18		-0.10 (-1.42; 0.27), 14			0.62*
Plasma lipid peroxidation (nmol/mg of lipids)						
Baseline	2.01 [0.94; 3.17], n=24	1.30-6.55	2.43 [1.18; 5.22], n=24	-0.41-13.87	0.23	0.43*
9 weeks	3.33 [1.92; 6.21], n=21	2.94-9.29	2.53 [1.49; 5.32], n=18	1.99-6.14	0.39	0.24**
p	0.19**		0.95**			0.26 [#]
Δ	0.89 (-1.43; 3.43), 20		-0.52 (-2.47; 1.69), 18			0.36*

CI= Confidence Interval

Data presented as median [interquartile range]

*Mann-Whitney Test

**Wilcoxon matched-pairs test

[#] T test[#]ANCOVA using baseline values as a covariate to test group differences in final values

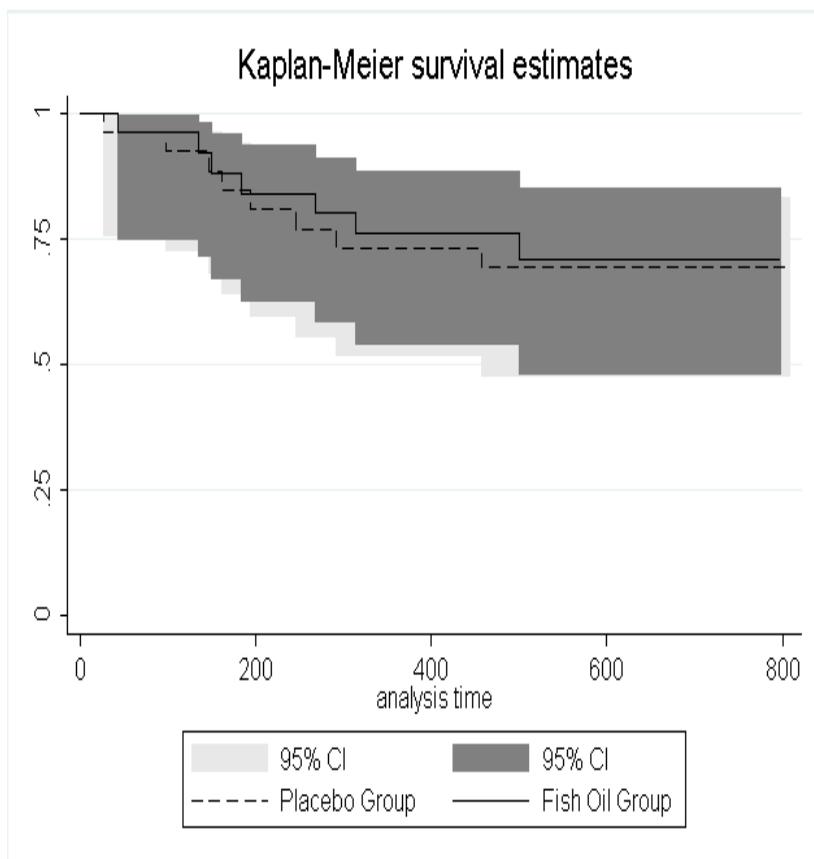


Figure 3 - Kaplan-Meier Survival curve for both study groups.

Supplementary Table 1 – Presence and grading of gastrointestinal adverse events after supplementation for each study group.

	Placebo Group (n=24)	Fish Oil Group (n=23)	p ^y
Constipation			0.66*
0	20 (83.33%)	18 (78.26%)	
1	3 (12.50%)	5 (21.74%)	
2	1 (4.17%)	0 (0.00%)	
Diarrhea			0.46**
0	18 (75.00%) ^a	15 (65.22%) ^a	
1	1 (4.17%) ^{bs}	7 (30.43%) ^{bs}	
2	2 (8.33%) ^{ab}	1 (4.35%) ^{ab}	
3	3 (12.50%) ^a	0 (0.00%) ^a	
Oral Mucositis			0.38*
0	21 (91.30%)	19 (82.61%)	
1	2 (8.70%)	3 (13.04%)	
3	0 (0.00%)	1 (4.35%)	
Nausea			0.17**
0	12 (50.00)	16 (69.57%)	
1	9 (37.50%)	3 (13.04%)	
2	2 (8.33%)	4 (17.39%)	
3	1 (4.17%)	0 (0.00%)	
Vomiting			0.41*
0	20 (83.33%)	21 (91.30%)	
1	3 (12.50%)	1 (4.35%)	
2	1 (4.17%)	1 (4.35%)	
Anorexia			0.61*
0	15 (62.50%)	16 (69.57%)	
1	4 (16.67%)	4 (17.39%)	
2	4 (16.67%)	3 (13.04%)	
3	1 (4.17%)	0 (0.00%)	

Data presented as absolute frequencies (relative frequencies).

^yDifference between groups regarding presence (grades 1, 2 or 3) or absence (grade 0) of gastrointestinal adverse events

*Chi-squared Test, with Yates correction

** Chi-squared Test

[§]There were differences between grades 1 and 0 ($p=0.03$), grades 1 and 3 ($p=0.024$) and grades 1 and 2 or 3 ($p=0.03$) between groups.

^{a, b}Groups assigned with the same letters are not significantly different

There were no differences between groups at baseline for presence and grading of: constipation, diarrhea, oral mucositis, nausea, vomiting, and anorexia.

Supplementary Table 2 – Presence and grading of hematological adverse events after supplementation for each study group.

	Placebo Group (n=23)	Fish Oil Group (n=23)	p ^a
Anemia			1.00*
0	21 (91.30%)	21 (91.30%)	
1	2 (8.70%)	2 (8.70%)	
Lymphocyte count reduction			0.30*
0	20 (86.96%)	22 (95.65%)	
2	2 (8.70%)	1 (4.35%)	
3	1 (4.35%)	0 (0.00%)	
Platelets count reduction			**
1, 2, 3, or 4	0 (0.00%)	0 (0.00%)	
Leukocyte count reduction			1.00*
0	22 (95.65%)	22 (95.65%)	
1	0 (0.00%)	1 (4.35%)	
2	1 (4.35%)	0 (0.00%)	
Neutrophils count reduction			0.30*
0	22 (95.65%)	20 (86.96%)	
1	0 (0.00%)	1 (4.35%)	
2	1 (4.35%)	2 (8.70%)	

Data presented as absolute frequencies (relative frequencies).

^aDifference between groups regarding presence (grades 1, 2 or 3) or absence (grade 0) of hematological adverse events

*X² Test, with Yates correction

** No individual presented platelets count reduction after supplementation.

There were no differences between groups at baseline for presence and grading of: anemia, lymphocyte count reduction, platelets count reduction, leukocyte count reduction and neutrophils count reduction.

Supplementary Table 3 – Nutritional status before and after supplementation for each study group.

	Placebo Group	Fish Oil Group	p
Body Mass Index (kg/m²)			
Baseline	25.56 (±4.16), n=26	26.46 (±4.60), n=25	0.47*
9 weeks	25.65 (±4.76), n=24	26.07 (±6.15), n=22	0.80*
p	0.69**	0.50**	
Weight Loss (%)			
Baseline	11.34 (±12.88), n=26	7.23 (±8.73), n=25	0.19*
9 weeks	0.54 (±8.06), n=24	0.50 (±5.09), n=22	0.98 [§]
p	0.009 ^{§§}	0.004 ^{§§}	
Mid-Upper Arm Circumference Adequacy (%)			
Baseline	93.54 (±13.15), n=26	92.17 (±12.81), n=25	0.71*
9 weeks	95.78 (±14.70), n=23	92.43 (±11.86), n=22	0.41*
p	0.93**	0.93**	
Triceps Skinfold Adequacy (%)			
Baseline	116.78 (±53.08), n=26	105.67 (±43.32), n=25	0.47 [§]
9 weeks	134.00 (±76.76), n=23	115.33 (±52.29), n=22	0.62 [§]
p	0.34 ^{§§}	0.11 ^{§§}	
Mid-Arm Muscle Circumference Adequacy (%)			
Baseline	90.90 (±9.72), n=26	91.25 (±9.79), n=25	0.84 [§]
9 weeks	90.61 (±11.01), n=23	89.93 (±9.05), n=22	0.82*
p	0.09 ^{§§}	0.33 ^{§§}	

Data presented as average (± standard deviation)

*T Test

** Paired T-test

[§]Mann-Whitney Test

^{§§}Wilcoxon Test

DISCUSSION

This study is based on the hypothesis that fish oil supplementation would increase tumor sensitivity to treatment without

increasing toxicity to normal tissues. Adverse events presence and grading were evaluated in order to certify this supplementation's safety. But, not only fish oil did not increase gastrointestinal and hematological adverse events, it also showed an increased protection regarding diarrhea. Patients receiving fish oil had less severe diarrhea when compared to patients receiving placebo. Other studies conducted in animals also observed a protective effect of n-3 fatty acids (especially DHA) on increase of intestines permeability and structural changes induced by chemotherapy[27–29], which could reduce the severity of diarrhea. In human trials, increase in toxicity on healthy tissues was not observed in patients receiving n-3 fatty acids in addition to chemotherapy[15,16], and in one a decrease in anemia and thrombocytopenia in individuals with high plasma n-3 incorporation was observed.

One proposed mechanism is that normal tissues are able to effectively handle the exacerbation of chemotherapy-induced oxidative stress promoted by n-3 fatty acids by enhancing its antioxidant defenses. This would guarantee no increase in toxicity already caused by the anti-cancer agent itself, but the decrease in toxicity in one specific tissue may be due to a differential response. According to a study by Hajjaji, et al. [30]even though normal tissues of animals receiving DHA and epirubicin had an effective response and showed no increase in lipid peroxidation generated by concomitant treatment on tumor tissues, each tissue analyzed (heart, liver and intestines) presented different changes in antioxidant defenses. We evaluated antioxidant enzymes in our study, without significant changes between groups and comparing baseline to nine weeks. However, this was not a direct measure of redox status of colonocytes, which could indicate an even more effective response by these cells to oxidative damages stimulated by n-3 fatty acids than expected from healthy cells.

Another mechanism referred by Hardman et al.[29]would be the suppression of PGE_2 and TXA_2 synthesis by the ingestion and incorporation of n-3 fatty acids. The increase of n-3 fatty acids in the phospholipids of cells membranes, decreasing n-6 eicosanoids substrates, leads to the synthesis of n-3 derived eicosanoids, as PGE_3 and TXA_3 . This could reduce diarrhea caused by eicosanoid-mediated Cl^- secretion and lessen this treatment-related adverse event severity.

To monitor the occurrence of other treatment-related adverse events that were not evaluated by this study and possible consequences of these effects, data on treatment administration, hospitalization and death due to adverse events were recorded. In the placebo group, hospitalization due to adverse events was significantly higher than that observed in fish oil group ($p=0.048$). This reinforces the indication that those ingesting fish oil may have less severe adverse effects, confirmed by diarrhea grading, not needing to be hospitalized and receive special care.

We observed better performance status for patients receiving fish oil, which has not only a prognostic value but also acts as an operational tool, used to indicate how well a patient is tolerating the prescribed treatment. Similar to what was observed with diarrhea grading, there were no differences between groups regarding presence or absence of performance restrictions, but the severity was higher in placebo group patients. This two parameters also may be linked, to the extent that higher severity of any adverse event will ultimately lead to a decrease in general well-being and restrict activities of daily life.

Tumor markers are used in clinical practice to monitor response and help in the detection of recurrence. Although CA19.9 tumor marker is increased in multiple gastrointestinal cancers, it is considered insufficient and imprecise to detect disease progression alone, so its use is often combined with other markers as CEA to increase sensitivity to the presence of cancer[31]. In this study, we were not able to detect changes in CEA between study groups, but final values for CA 19.9 were lower in individuals receiving fish oil. This would be an indication of better response to treatment, however, after adjusting final values for baseline, the difference was no longer significant. Other studies performed in humans using an n-3 fatty acid intervention during chemotherapy treatment showed a better response to treatment, higher time to tumor progression and survival[15,16,32,33] after supplement use and n-3 fatty acid plasma incorporation. In our study, when diagnoses regarding treatment response are considered, which represents the sum of response evaluation methods and also the clinician's view, also no differences were observed between groups. On the four previously mentioned humans studies which also evaluated response, two of them[15,16] included only patients with advanced disease, and

one[32] had a longer time of follow-up (at least 36 months). This might suggest that fish oil impact in disease course may be more relevant after a more prolonged period of time or in more advanced stages.

Many *in vitro* and animal studies showed an increase in cytotoxicity of anti-cancer agents after co-treatment with n-3 fatty acids, and this was accompanied by an increase in lipid peroxidation products[34–37]. In studies performed in humans evaluating lipid peroxidation after supplementation with n-3 and anti-cancer treatments, two found a reduction of this parameter (measured in plasma and serum) [38,39] and one showed no changes (measured in polymorphonuclear cells)[40]. Our study did not find any differences regarding lipid peroxidation or antioxidant enzymes activities between groups. This set of analysis was performed in plasma, erythrocytes, and leukocytes, better representing the systemic view of the redox status. Propositions that n-3 fatty acids would sensitize tumor cells to treatment due to an increase in the production of lipid peroxidation products without an effective response of the tumor cells antioxidant system, leading to cells death, are well established in *in vitro* and in animals studies. However, this was not proven yet in clinical studies. Data on better treatment response influenced by supplementation with n-3 fatty acids are starting to emerge from clinical trials. Nevertheless, these clinical changes are still not associated with biochemical changes. If, in fact, oxidative stress mechanisms are playing a role in the tumor's response, it is not possible to conclude with available *in vivo* or *ex vivo* human data. This would probably require clinical trials aimed at finding these answers using biopsies obtained from tumor tissues. Our main focus was to investigate systemic changes, especially those occurring in normal cells, in order to verify if supplementation was altering redox status in these cells and if this could potentially lead to harmful effects. As to evaluate direct effects on the tumor, the analysis must be performed in this specific tissue, the same applies to other tissues, so inferences on normal cells based on systemic variables are limited. However, we consider the lack of differences between groups as a sign that supplementation is not increasing systemic lipid peroxidation in a damaging manner or overwhelming normal cell's antioxidant defense system.

This study presents some limitations and strengths. At planning, we aimed to minimize as possible the recognition of fish oil

characteristic flavor instructing patients to ingest it right before a main meal. Even though this can still be considered a limitation, after the end of nine weeks we asked some of the patients if they knew what group they were assigned to. Some subjects in the placebo group (6 of 20, 30%) reported perceiving a fishy flavor as some in fish oil group did not notice this. Considering this, we believe that placebo effect was present in both groups, therefore annulled and not responsible for differences observed. As far as we know, this is the first placebo-controlled, triple-blind clinical trial to evaluate response to treatment and adverse events after a fish oil supplementation. All the analysis (including statistical analysis and data presenting) were performed before groups disclosure.

CONCLUSION

Supplementing patients undergoing chemotherapy for gastrointestinal cancers with fish oil may lead to a better performance status. This supplementation does not seem to increase treatment-related toxicity, as it can reduce the severity of diarrhea, a common adverse event of this type of treatment and therefore also reduces hospitalization. Furthermore, fish oil ingestion during chemotherapy does not seem to negatively alter systemic redox status. If or how n-3 fatty acids can act to increase sensitization of tumor cells to treatment, it is still not established in human trials.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Nutrition Graduation Program and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Capes) for the scholarship granted to the first four authors. Also, to the staff of Oncology Research Center of Florianópolis for all their help and assistance during the study. And to Tiarajú Laboratory and Company for the donation of capsules used in this study with no conflict of interest.

STATEMENT OF AUTHORSHIP

C.Q.C.: Conceptualization, recruitment, data collection, biochemical analysis, statistical analysis, original draft; M.C.M.:

recruitment, data collection, biochemical analysis, manuscript review; H.S.B. and T.R.C.: biochemical analysis, manuscript review; MF: recruitment, supervision, manuscript review; E.B.S.M.T. and E.A.N.: conceptualization, project administration, supervision, manuscript review. All authors of this article have read and approved the final version.

CONFLICT OF INTEREST AND FUNDING SOURCES

The authors declare that they have no conflict of interest. This research did not receive any specific grant from funding agencies in public, commercial, or not-for-profit sectors. E.A.N. is funded by National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) – Brazil – 302692/2016-9.

REFERENCES

- [1]Griffin-Sobel JP. Gastrointestinal Cancers: Screening and Early Detection. *Semin Oncol Nurs* 2017;33:165–71. doi:10.1016/j.soncn.2017.02.004.
- [2]Taniguchi H, Moriya C, Igarashi H, Saitoh A, Yamamoto H, Adachi Y, et al. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancer. *Cancer Sci* 2016;107:1556–62. doi:10.1111/cas.13069.
- [3]Goel G, Sun W. Advances in the management of gastrointestinal cancers—an upcoming role of immune checkpoint blockade. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol* 2015;8. doi:10.1186/s13045-015-0185-6.
- [4]Ahn DH, Goldberg RM. Colorectal clinical trials: what is on the horizon? *Future Oncol* 2016;12:525–31. doi:10.2217/fon.15.327.
- [5]Merendino N, Costantini L, Manzi L, Molinari R, D’Eliseo D, Velotti F. Dietary ω -3 Polyunsaturated Fatty Acid DHA: A Potential Adjuvant in the Treatment of Cancer. *BioMed Res Int* 2013;2013:1–11. doi:10.1155/2013/310186.
- [6]Liu W, Wang J-Y. Protein modification by peroxidative products of polyunsaturated fatty acids. *Curr Proteomics* 2008;5:62–72.
- [7].Cai F, Dupertuis YM, Pichard C. Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation on colorectal cancer risk and treatments: *Curr*

- Opin Clin Nutr Metab Care 2012;15:99–106. doi:10.1097/MCO.0b013e32834feab4.
- [8]Hajjaji N, Bougnoux P. Selective sensitization of tumors to chemotherapy by marine-derived lipids: A review. *Cancer Treat Rev* 2013;39:473–88. doi:10.1016/j.ctrv.2012.07.001.
- [9]Mund RC, Pizato N, Bonatto S, Nunes EA, Vicenzi T, Tanhoffer R, et al. Decreased tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats chronically supplemented with fish oil involves COX-2 and PGE2 reduction associated with apoptosis and increased peroxidation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007;76:113–20. doi:10.1016/j.plefa.2006.11.008.
- [10]Cai F, Granci V, Sorg O, Buchegger F, Pichard C, Dupertuis YM. Vitamin E content in fish oil emulsion does not prevent lipoperoxidative effects on human colorectal tumors. *Nutrition* 2013;29:450–6. doi:10.1016/j.nut.2012.06.011.
- [11]Cai F, Sorg O, Granci V, Lecumberri E, Miralbell R, Dupertuis YM, et al. Interaction of ω -3 polyunsaturated fatty acids with radiation therapy in two different colorectal cancer cell lines. *Clin Nutr* 2014;33:164–70. doi:10.1016/j.clnu.2013.04.005.
- [12]Jiao Y, Hannafon BN, Zhang RR, Fung K-M, Ding W-Q. Docosahexaenoic acid and disulfiram act in concert to kill cancer cells: a mutual enhancement of their anti-cancer actions. *Oncotarget* 2017. doi:10.18632/oncotarget.14702.
- [13]Fahrman JF, Hardman WE. Omega 3 fatty acids increase the chemo-sensitivity of B-CLL-derived cell lines EHEB and MEC-2 and of B-PLL-derived cell line JVM-2 to anti-cancer drugs doxorubicin, vincristine and fludarabine. *Lipids Health Dis* 2013;12:36.
- [14]Siddiqui RA, Harvey KA, Xu Z, Bammerlin EM, Walker C, Altenburg JD. Docosahexaenoic acid: A natural powerful adjuvant that improves efficacy for anti-cancer treatment with no adverse effects. *BioFactors* 2011;37:399–412. doi:10.1002/biof.181.
- [15]Bougnoux P, Hajjaji N, Ferrasson MN, Giraudeau B, Couet C, Le Floch O. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br J Cancer* 2009;101:1978–85. doi:10.1038/sj.bjc.6605441.
- [16]Murphy RA, Mourtzakis M, Chu QSC, Baracos VE, Reiman T, Mazurak VC. Supplementation with fish oil increases first-line

- chemotherapy efficacy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2011;117:3774–80. doi:10.1002/cncr.25933.
- [17]Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982;5:649–55.
- [18]WHO Expert Committee on Physical Status: the Use and Interpretation of Anthropometry, editor. *Physical status: the use and interpretation of anthropometry: report of a WHO Expert Committee*. Geneva: World Health Organization; 1995.
- [19]Aebi H. [13] Catalase in vitro. *Oxyg Radic Biol Syst* 1984;105:121–6. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- [20]Marklund S, Marklund G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur J Biochem* 1974;47:469–74. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x.
- [21]Wendel A. [44] Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, vol. 77, Elsevier; 1981, p. 325–33.
- [22]Nouroozzadeh J, Tajaddinisarmadi J, Wolff SP. Measurement of Plasma Hydroperoxide Concentrations by the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Assay in Conjunction with Triphenylphosphine. *Anal Biochem* 1994;220:403–9. doi:10.1006/abio.1994.1357.
- [23]Cheng Y-S, Zheng Y, VanderGheynst JS. Rapid Quantitative Analysis of Lipids Using a Colorimetric Method in a Microplate Format. *Lipids* 2011;46:95–103. doi:10.1007/s11745-010-3494-0.
- [24]Nishiyama-Naruke A, Souza JA, Carnelós M, Curi R. HPLC Determination of Underivatized Fatty Acids Saponified at 37°C Analysis of Fatty Acids in Oils and Tissues. *Anal Lett* 1998;31:2565–76. doi:10.1080/00032719808005325.
- [25]Folch J, Lees M, Stanley GHS. A Simple Method For The Isolation And Purification Of Total Lipides From Animal Tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497–509.
- [26]Abushufa R, Reed P, Weinkove C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. *Clin Chem* 1994;40:1707–12.
- [27]Horie T, Nakamaru M, Masubuchi Y. Docosahexaenoic acid exhibits a potent protection of small intestine from methotrexate-induced damage in mice. *Life Sci* 1998;62:1333–1338.

- [28]de Segura IAG, Valderrábano S, Vázquez I, Vallejo-Cremades MT, Gómez-García L, Sánchez M, et al. Protective effects of dietary enrichment with docosahexaenoic acid plus protein in 5-fluorouracil-induced intestinal injury in the rat. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:479–485.
- [29]Hardman WE, Moyer MP, Cameron IL. Fish oil supplementation enhanced CPT-11 (irinotecan) efficacy against MCF7 breast carcinoma xenografts and ameliorated intestinal side-effects. *Br J Cancer* 1999;81:440.
- [30]Hajjaji N, Besson P, Bougnoux P. Tumor and non-tumor tissues differential oxidative stress response to supplemental DHA and chemotherapy in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012;70:17–23. doi:10.1007/s00280-012-1884-0.
- [31]Home MMP. CA 19-9 Tumor Marker: Is It Reliable? A Case Report in a Patient With Pancreatic Cancer n.d.
- [32]Camargo C de Q, Mocellin MC, Pastore Silva J de A, Fabre ME de S, Nunes EA, Trindade EBS de M. Fish oil supplementation during chemotherapy increases posterior time to tumor progression in colorectal cancer. *Nutr Cancer* 2016;68:70–6. doi:10.1080/01635581.2016.1115097.
- [33]Chagas TR, Borges DS, de Oliveira PF, Mocellin MC, Barbosa AM, Camargo CQ, et al. Oral fish oil positively influences nutritional-inflammatory risk in patients with haematological malignancies during chemotherapy with an impact on long-term survival: a randomised clinical trial. *J Hum Nutr Diet* 2017. doi:10.1111/jhn.12471.
- [34]Kello M, Mikeš J, Jendželovský R, Koval' J, Fedoročko P. PUFAs enhance oxidative stress and apoptosis in tumour cells exposed to hypericin-mediated PDT. *Photochem Photobiol Sci* 2010;9:1244. doi:10.1039/c0pp00085j.
- [35]Sturlan S. Docosahexaenoic acid enhances arsenic trioxide-mediated apoptosis in arsenic trioxide-resistant HL-60 cells. *Blood* 2003;101:4990–7. doi:10.1182/blood-2002-08-2391.
- [36]Hardman WE, Avula CR, Fernandes G, Cameron IL. Three percent dietary fish oil concentrate increased efficacy of doxorubicin against MDA-MB 231 breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2001;7:2041–2049.

- [37]Kokura S, Nakagawa S, Hara T, Boku Y, Naito Y, Yoshida N, et al. Enhancement of lipid peroxidation and of the antitumor effect of hyperthermia upon combination with oral eicosapentaenoic acid. *Cancer Lett* 2002;185:139–144.
- [38]Elbarbary NS, Ismail EAR, Farahat RK, El-Hamamsy M. ω -3 fatty acids as an adjuvant therapy ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: A randomized placebo-controlled study. *Nutrition* 2016;32:41–7. doi:10.1016/j.nut.2015.06.010.
- [39]Finocchiaro C, Segre O, Fadda M, Monge T, Scigliano M, Schena M, et al. Effect of n-3 fatty acids on patients with advanced lung cancer: a double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 2012;108:327–33. doi:10.1017/S0007114511005551.
- [40]Bonatto SJR, Oliveira HHP, Nunes EA, Pequito D, Iagher F, Coelho I, et al. Fish Oil Supplementation Improves Neutrophil Function During Cancer Chemotherapy. *Lipids* 2012;47:383–9. doi:10.1007/s11745-011-3643-0.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 LIMITAÇÕES E PONTOS FORTES

Algumas limitações foram previstas para o presente estudo, desfechos que puderam ser incluídos no primeiro artigo publicado não puderam ser avaliados pelo ensaio clínico proposto nessa tese. Isso se deve ao fato que pouco tempo se passou para que certas informações fossem coletadas como, por exemplo, tempo para progressão da doença. Com essa perspectiva buscamos avaliar esses desfechos nos estudos mais antigos, porém o desenho desses estudos não era cego e a dosagem da suplementação era menor.

Estudos com suplementação oral de óleo de peixe possuem limitação característica: o odor do óleo que dificulta a realização de estudo duplo-cego com a presença de placebo. Tentamos minimizar ao máximo essa limitação com a utilização de uma cápsula desodorizada de óleo de peixe e com o placebo de óleo de oliva. E, ainda que alguns indivíduos tenham relatado ter sentido o gosto de peixe após o consumo das cápsulas, essa sensação esteve presente em ambos os grupos e alguns indivíduos do grupo placebo acreditaram receber o óleo de peixe.

Como limitação reconhecemos o não aumento significativo da porcentagem do ácido docosahexaenóico nos eritrócitos dos pacientes suplementados com óleo de peixe. Isso provavelmente ocorreu devido ao tempo de suplementação e a dose administrada. Muito da hipótese de maior aumento da sensibilização de células tumorais ao tratamento quimioterápico, levando a uma possível melhor resposta ao tratamento, se baseia no maior número de insaturações apresentadas por esses ácidos graxos, em especial o ácido graxo docosahexaenóico. Esse ácido graxo seria mais relevante que o ácido eicosapentaenóico para desencadear os efeitos referentes a resposta ao tratamento. No nosso estudo os pacientes do grupo óleo de peixe tiveram um aumento significativo da porcentagem do ácido eicosapentaenóico nos eritrócitos e, portanto, provavelmente beneficiaram-se dos efeitos mais ligados a esse ácido graxo.

Além disso, a grande variabilidade de diagnósticos, estadiamentos e protocolos entre os pacientes contribuiu para a

heterogeneidade da amostra, o que possivelmente limitou alguns resultados e a realização de conclusões mais consistentes.

Por fim, idealmente gostaríamos de ter realizado as avaliações de estresse oxidativo também em células tumorais de modo a investigar possível mecanismos envolvidos na suplementação em conjunto com o tratamento. Porém, o acesso ao tecido tumoral ficaria inviável visto que teria que ser coletado antes e após a suplementação. Embora muitos pacientes tenham sido submetidos a cirurgia para ressecção tumoral, a maioria estava recebendo quimioterapia adjuvante e já não passaria mais por procedimentos cirúrgicos. Por esse motivo as análises foram realizadas em células sanguíneas consideradas não cancerígenas em um contexto de câncer gastrointestinal e inferências sobre os mecanismos que poderiam explicar a sensibilização seletiva em células tumorais, caso essa ocorresse, não foram possíveis de serem realizadas.

O principal ponto forte dessa tese foi a realização de um ensaio clínico randomizado, triplo-cego, controlado por placebo. De acordo com nosso conhecimento, poucos estudos avaliaram em humanos o efeito da suplementação com óleo de peixe em conjunto com a quimioterapia na resposta ao tratamento e desses nenhum foi cegado. Esse tipo de estudo é o padrão ouro para avaliação de uma intervenção.

Como ponto forte destacamos também a realização de uma revisão sistemática para avaliar os efeitos nos parâmetros de estresse oxidativo dos ácidos graxos n-3 em células tumorais submetidas a tratamentos anticâncer. Dessa maneira buscamos agregar a tese algumas informações sobre o possível comportamento das células tumorais, visto que não seria possível realizar análises em tecidos tumorais dos indivíduos incluídos no ensaio clínico.

6.2 CONCLUSÕES DO ESTUDO

Com esse estudo se conclui que:

- A suplementação de 2 g/dia de óleo de peixe por nove semanas concomitante ao tratamento quimioterápico em indivíduos com câncer colorretal pode prolongar o tempo para progressão da doença.
- Com relação a resposta de marcadores tumorais e a suplementação com óleo de peixe, embora o primeiro artigo tenha encontrado menores valores de CEA após o tratamento no grupo suplementado, essa

observação foi apenas para os estádios mais avançados e não significativa. O mesmo resultado não foi encontrado no estudo original dessa tese.

– De acordo com o observado nos artigos incluídos na revisão sistemática, células e tumores vulneráveis ao aumento da citotoxicidade dos tratamentos convencionais pelos AGPI n-3, apresentam aumento na peroxidação lipídica, independente da geração aumentada de espécies reativas de oxigênio ou da atividade de enzimas antioxidantes. Esse comportamento, entretanto, difere em linhagens tumorais, sendo que algumas células parecem ser mais sensíveis aos agravos oxidativos exacerbados pela suplementação.

– A suplementação de pacientes com cânceres gastrointestinais submetidos a tratamento quimioterápico com 2,5 g de óleo de peixe parece favorecer um melhor prognóstico.

– A suplementação de pacientes com cânceres gastrointestinais submetidos a tratamento quimioterápico com 2,5 g de óleo de peixe não parece aumentar ou agravar os eventos adversos induzidos pelo tratamento. Por outro lado, pode reduzir a gravidade da diarreia e diminuir as hospitalizações que tem como causa os eventos adversos ao tratamento.

– A suplementação de pacientes com cânceres gastrointestinais submetidos a tratamento quimioterápico com 2,5 g de óleo de peixe não parece alterar negativamente o status redox sistêmico. Não foram observadas alterações nas atividades de enzimas antioxidantes de eritrócitos nem um aumento na peroxidação lipídica de leucócitos e do plasma.

6.3 RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, sugere-se algumas recomendações práticas e científicas.

– Recomenda-se a suplementação de óleo de peixe para indivíduos com cânceres gastrointestinais submetidos a tratamento quimioterápico como ferramenta para diminuir a gravidade da diarreia e melhorar o prognóstico. E embora esse estudo não tenha encontrado diferenças com relação aos parâmetros de resposta ao tratamento entre os grupos, a hipótese de que os AGPI n-3 possam promover uma maior

sensibilização das células tumorais ao tratamento ainda não pode ser completamente descartada.

– Sugere-se uma triagem sistemática de células tumorais de maneira a identificar aquelas mais suscetíveis a exacerbação pelos AGPI n-3 dos agravos oxidativos gerados pelos quimioterápicos. Ou seja, identificar quais tipos de tumor poderiam ser mais sensíveis a esse tipo de tratamento concomitante e quais pacientes poderiam potencialmente serem beneficiados com um incremento da eficácia dos tratamentos convencionais.

– Recomenda-se ainda a realização de ensaios clínicos seguindo o mesmo modelo proposto nessa tese, porém com uma maior dose de AGPI n-3, especialmente do ácido docosahexaenóico e com maior tempo de suplementação.

REFERÊNCIAS

ABUSHUFA, R. REED, P. WEINKOVE, C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clin Chem**. v. 40, n. 9, p. 1707-12, 1994.

ACHARYA, A. et al. Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancers: Surgeon Perceptions and Cost-Benefit Trade-Off Analysis. **Annals of surgical oncology**, v. 24, n. 5, p. 1165–1173, 2017.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 121-126, 1984.

AHN, D. H.; GOLDBERG, R. M. Colorectal clinical trials: what is on the horizon? **Future Oncology**, v. 12, n. 4, p. 525–531, fev. 2016.

ALGHAZEER, R.; GAO, H.; HOWELL, N.K. Cytotoxicity of oxidised lipids in cultured colonal human intestinal cancer cells (caco-2 cells). **Toxicology Letters**, v.180, p.202-211, 2008.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Colorectal cancer**. Disponível em:<<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer.html>>. Acesso em: maio de 2017.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Stomach cancer**. Disponível em:<<https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer.html>>. Acesso em: maio de 2017a.

ANDERSON, B.M.; MA, D.W. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? **Lipids in Health and Disease**, v.8, n.33, 2009.

ARETI, A.; YERRA, V.G.; NAIDU, V.G.M.; KUMAR, A. Oxidative stress and nerve damage: Role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. **Redox Biology**, v.2, p.289-95, 2014.

ARRIETA, O.; VILLARREAL-GARZA, C.; MARTÍNEZ-BARRERA, L.; MORALES, M.; DORANTES-GALLARETA, Y.; PEÑA-CURIEL, O.; CONTRERAS-REYES, S.; MACEDO-PÉREZ, E.O.; ALATORRE-

ALEXANDER, J. Usefulness of Serum Carcinoembryonic Antigen (CEA) in evaluating response to chemotherapy in patients with advanced non small-cell lung cancer: a prospective cohort study. **BMC Cancer**, v.13, 2013.

BARACOS, V.E.; MAZURAK, V.C.; MA, D.W.L. n-3 Polyunsaturated fatty acids throughout the cancer trajectory: influence on disease incidence, progression, response to therapy and cancer-associated cachexia. **Nutrition Research Reviews**, v.17, p.177-192, 2004.

BAUMGARTNER, M.; STURLAN, S.; ROTH, E.; WESSNER, B.; BACHLEITNER- HOFMANN, T. Enhancement of arsenic trioxide-mediated apoptosis using Docosahexaenoic acid in arsenic trioxide-resistant Solid tumor cells. **Int. J. Cancer**, v. 112, p. 707-712, 2004.

BLOCK, K.I.; KOCH, A.C.; MEAD, M.N.; TOTY, P.K.; NEWMAN, R.A.; GYLLENHAAL. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials. **Cancer Treatment Reviews**, v.33, p. 407-418, 2007.

BLOCK, K.I.; KOCH, A.C.; MEAD, M.N.; TOTY, P.K.; NEWMAN, R.A.; GYLLENHAAL, C. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials. **Int. J. Cancer**, v.123, p.1227-1239, 2008.

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

BOUGNOUX, P.; HAJAJI, N.; MAHEO, K.; COUET, C.; CHEVALIER, S. Fatty acids and breast cancer: Sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. **Progress in Lipid Research**, v.49, p.76-86, 2010.

BOUKOVINAS, J.; KOSMIDIS, P. Treatment of non-small cell lung cancer patients with performance status 2 (PS2). **Lung Cancer**, v.63, p.10-15, 2009.

BOULIKAS, T.; PANTOS, A.; BELLIS, E.; CHRISTOFIS, P. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. **Cancer Therapy**, v.5, p.537-583, 2007.

BRASIL. Portaria n 19, de 15 de março de 1995. Aprova norma Técnica para Complemento Nutricional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 mar. 1995. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/19_95.htm>. Acesso em: Maio, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino- serviço. 2.ed. - Rio de Janeiro: **INCA**, 2002a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

CAI, F.; DUPERTUIS, Y.M.; PICHARD, C. Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation on colorectal cancer risk and treatments. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.15, n.99-106, 2012.

CAI, F.; GRANCI, V.; SORG, O.; BUCHEGGER, F.; PICHARD, C.; DUPERTUIS, Y.M. Vitamin E content in fish oil emulsion does not prevent lipoperoxidative effects on human colorectal tumors. **Nutrition**, v.29, p.450-456, 2013.

CAI, F.; SORG, O.; GRANCI, V.; LECUMBERRI, E.; MIRALBELL, R.; DUPERTUIS, Y.M.; PICHARD, C. Interaction of ω -3 polyunsaturated fatty acids with radiation therapy in two different colorectal cancer cell lines. **Clinical Nutrition**, v.33, p.164-170, 2014.

CALDER, P.C. Dietary modification of inflammation with lipids. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, p.345-358, 2002.

CALDER, P.C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.77, p.327-335, 2007.

CAMPTOSAR: cloridrato de irinotecano tri-hidratado. Farmacêutico Responsável: José Cláudio Bumerad. São Paulo: Laboratórios Pfizer Ltda., 2017. Bula de Remédio.

CHENG, Y.S.; ZHENG, Y.; VANDERGHEYNST, J.S. Rapid Quantitative Analysis of Lipids Using a Colorimetric Method in a Microplate Format. **Lipids**, v.46, p.95-103, 2011.

CISPLATINA. São Paulo: Asta Medica Oncologia, 2014. Bula de Remédio.

COLQUHOUN, A.; SCHUMACHER, R.I. Alfa-Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1533, p.207-219, 2001.

DAYYANI, F.; MORGENSTERN, D.; HOLDENRIEDER, S. In Response to “Serum Tumor Marker Use in Patients With Advanced Solid Tumors”. **Journal of Oncology Practice**, v. 12, n. 3, p. 273–274, 2016.

DEAVALL, D.G.; MARTIN, E.A.; HORNER, J.M.; ROBERTS, R. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. **Journal of Toxicology**, v. 2012, p.1-13, 2012.

DECSI, T.; KENNEDY, K. Sex-specific differences in essential fatty acid metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.94, p.1914S-1919S, 2011.

D'INCALCI, M.; STEWARD, W.P.; GESCHER, A.J. Modulation of response to cancer chemotherapeutic agents by diet constituents – Is the available evidence sufficiently robust for rational advice for patients? **Cancer Treatment Reviews**, v.33, p. 223-229, 2007.

DING, W.; VAUGHT, J.L.; YAMAUCHI, H.; LIND, S.E. Differential sensitivity of cancer cells to docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity: The potential importance of down-regulation of superoxide dismutase 1 expression. **Mol Cancer Ther**, v.3, p.1109-1117, 2004.

DRABKIN, D.L.; AUSTIN, H. Spectrophotometric studies: i. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. **Journal of Biological Biochemistry**, v.98, p.719-733, 1932.

EISENHAUER, E.A.; THERRASSE, P.; BOGAERTS, J.; SCHWARTZ, L.H.; SARGENTE, D.; FORD, R.; DANCEY, J.; ARBUCK, S.; GWYTHYER, S.; MOONEY, M.; RUBINSTEIN, L.; SHANKAR, L.; DOOD, L.; KAPLAN, R.; LACOMBE, D; VERVWEIJ, J. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). **European Journal of Cancer**, v.45, p.228-247, 2009.

FABER, J.; BERKHOIT, M.; VOS, A.P.; SIJEN, J.W.C.; CALDER, P.C.; GARSSSEN, J.; HELVOORT, A.V. Supplementation with a fish oil-enriched, high-protein medical food leads to rapid incorporation of EPA into white blood cells and modulates immune responses within one week in healthy men and women. **The Journal of Nutrition**, p.964-970, 2011.

FAN, Y.; ZHAN, Y.; AUKEMA, H.M.; DAVIDSON, L.A.; ZHOU, L.; CALLAWAY, E.; TIAN, Y.; WEEK, B.R.; LUPTON, J.R.; TOYOKUNI, S.; CHAPKIN, R.S. Proapoptotic Effects of Dietary (n-3) Fatty Acids Are Enhanced in Colonocytes of Manganese-Dependent Superoxide Dismutase Knockout Mice. **Journal of Nutrition**, v.139, p.1328-1332, 2009.

FAN, Y.; RAN, Q.; TOYOKUNI, S.; OKAZAKI, Y.; CALLAWAY, E.S.; LUPTON, J.R.; CHAPKIN, R.S. Dietary Fish Oil Promotes Colonic Apoptosis and Mitochondrial Proton Leak in Oxidatively Stressed Mice. **Cancer Prev Res**, v.4, n.8, 2011.

FAUDFLUOR (Fluoruracila). Farmacêutica Responsável: Cintia Delphino de Andrade. São Paulo: Libbs Farmacêutica Ltda., 2017. Bula de Remédio.

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

FUKUI, M.; KANG, K.S.; OKADA, K.; ZHU, B.T. EPA, an omega-3 fatty acid, induces apoptosis in human pancreatic cancer cells: role of ROS accumulation, caspase-8 activation, and autophagy induction. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.114, p.192-203, 2013.

GAGO-DOMINGUEZ, M.; JIANG, X.; CASTELAO, E. Lipid peroxidation, oxidative stress genes and dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. **Breast Cancer Research**, v.9, n.201, 2007.

GLEISSMAN, H.; JOHNSEN, J.I.; KOGNER, P. Omega-3 fatty acids in cancer, the protectors of good and the killers of evil? **Experimental Cancer Research**, v.316, p.1365-1373, 2010.

GOEL, G; SUN, W. Advances in the management of gastrointestinal cancers—an upcoming role of immune checkpoint blockade. **J Hematol Oncol**, v.8, 2015.

GOMES, T.K.C.; OLIVEIRA, S.L. O papel dos ácidos graxos essenciais no perfil de eicosanóides e sua repercussão na resposta imune. **Nutrire**, v.35, n.1, p.167-186, 2010.

GRIFFIN-SOBEL, J. P. Gastrointestinal Cancers: Screening and Early Detection. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 33, n. 2, p. 165–171, maio 2017.

GRUNNET, M.; SORENSEN, J.B. Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. **Lung Cancer**, v.76, p.138-143, 2012.

HAJJAJI, N.; BESSON, P.; BOUGNOUX, P. Tumor and non-tumor tissues differential oxidative stress response to supplemental DHA and chemotherapy in rats. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.70, p.17-23, 2012.

HAJJAJI, N.; BOUGNOUX, P. Selective sensitization of tumors to chemotherapy by marine- derived lipids: A review. **Cancer Treatment Reviews**, v.39, p.473-488, 2013.

HARDMAN, E. AVULA, C.P.R.; FERNANDES, G.; CAMERON, I.L. Three Percent Dietary Fish Oil Concentrate Increased Efficacy of Doxorubicin Against MDA-MB 231 Breast Cancer Xenografts. **Clin Cancer Res**, v. 7, p.2041-2049, 2001.

HARDMAN, W.E.; MUNOZ, 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. **Cancer Cell International**, v.2, n.10, 2002.

HASSAN, H.A.; EDREES, G.M.; EL-GAMEL, E.M.; EL-SAYED, E.A. Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity by grape seed extract and fish oil is mediated by lowering oxidative stress and DNA damage. **Cytotechnology**, 2013.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J.W. **Clinical Chemistry Principles And Technics**. Harper & Row, Hagerstown, Maryland, U.S.A, 1974.

HOLDENRIEDER, S.; STIEBER, P.; PAWEL, J.V.; RAITH, H.; NAGEL, D.; FELDMANN, K.; SEIDEL, D. Early and Specific Prediction of the Therapeutic Efficacy in Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Nucleosomal DNA and Cytokeratin-19 Fragments. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, v.1075, p.244-257, 2006.

INSTITUTE OF MEDICINE - IOM. **Dietary reference intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients)**. Washington, DF: National Academy Press, 2005.

JOHANSSON, S., LONNQVIST, A., OSTMAN, S., SANDBERG, A.S., WOLD, A.E. Long- chain polyunsaturated fatty acids are consumed during allergic inflammation and affect T helper type 1 (Th1)- and Th2-mediated hypersensitivity differently. **British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology**, v. 160, p.411-419, 2010.

KANG, K.S.; WANG, P.; YAMABE, N.; FUKUI, M.; JAY, T.; ZHU, B.T. Docosahexaenoic Acid Induces Apoptosis in MCF-7 Cells In Vitro and In Vivo via Reactive Oxygen Species Formation and Caspase 8 Activation. **Plos One**, v. 5, n.4, 2010.

KINTZEL, P.E. Guidelines for Cytoprotectant Agents. **Clinical Oncology News**, 2007.

KÖHNE, C.-H. et al. Phase III study of weekly high-dose infusional fluorouracil plus folinic acid with or without irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40986. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 22, p. 4856–4865, 2005.

KOKURA, S.; NAKAGAWA, S.; HARA, T.; BOKU, Y.; NAITO, Y.; YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T. Enhancement of lipid peroxidation and of the antitumor effect of hyperthermia upon combination with oral eicosapentaenoic acid. **Cancer Letters**, v.185, p.139-144, 2002.

LAU, A.T.Y.; WANG, Y.; CHIU, J. Reactive Oxygen Species: Current Knowledge and Applications in Cancer Research and Therapeutic. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.104, p.657-667, 2008.

LIU, W.; WANG, J. Protein Modification by Peroxidative Products of Polyunsaturated Fatty Acids. **Current Proteomics**, v.5, p.62-72, 2008.

LUTZ, M. P. et al. Weekly Infusional High-Dose Fluorouracil (HD-FU), HD-FU Plus Folinic Acid (HD-FU/FA), or HD-FU/FA Plus Biweekly Cisplatin in Advanced Gastric Cancer: Randomized Phase II Trial 40953 of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group and the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 18, p. 2580–2585, 20 jun. 2007.

MAHEO, K.; VIBET, S.; STEGHEN, J.P.; DARTIGEASA, C.; LEHMAN, M.; BOUGNOUX, P.; GORE, J. Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: A role for lipoperoxidation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 39, p. 742-751, 2005.

MANDELKER, L. Introduction to Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. **Vet Clin Small Anim**, v.38, p.1-30, 2008.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **Eur J Biochem**, v.47, 1974.

MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D.G. GROUP, P.; et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **PLoS Med** 2009.

MENEZES, A. M.B; SANTOS, I. S. Curso de epidemiologia básica para pneumologistas: 3a parte - estudos de intervenção. **J. Pneumologia**, v. 25, n. 5, 1999.

MERENDINO, N.; CONSTANTINI, L.; MANZI, L.; MOLINARI, R.; D'ELISEO, D.; VELOTTI, F. Dietary ω -3 Polyunsaturated Fatty Acid DHA: A Potential Adjuvant in the Treatment of Cancer. **BioMed Research International**, v. 2013, p.1-11, 2013.

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

MUND, R.C.; PIZATO, N.; BONATTO, S.; NUNES, E.A.; VICENZI, T.; TANHOFFER, R.; OLIVEIRA, H.H.P.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Decreased tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats chronically supplemented with fish oil involves COX-2 and PGE2 reduction associated with apoptosis and increased peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 76, p.113-120, 2007.

MURPHY, R.A.; MOURTZAKIS, M.; CHU, Q.S.C.; BARACOS, V.E.; REIMAN, T.; MAZURAK, V.C. Supplementation With Fish Oil Increases First-Line Chemotherapy Efficacy in Patients With Advanced Nonsmall Cell Lung Cancer. **Cancer**, 2011.

NAHAS, S. C.; NAHAS, L. A. B.-L. Fatores prognósticos de pacientes com câncer de cólon direito tratados cirurgicamente: experiência de 10 anos de uma instituição universitária. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 28, n. 1, p. 3–7, 2015.

NAKAYAMA, A.; ALLADIN, K.P.; IGBOKWE, O.; WHITE, J.D. Systematic Review: Generating Evidence-Based Guidelines on the Concurrent Use of Dietary Antioxidants and Chemotherapy or Radiotherapy. **Cancer Invest.**, v.29, n.10, p.655-667, 2011.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Division of Cancer Treatment and Diagnosis. **Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) 4.0**. NIH Publication No. 09-5410, 2010. Disponível em: <https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_application/s/ct.c.htm#ctc_40>. Acesso em: Maio, 2017.

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

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry**, v.220, p.403-409, 1994.

OHTSU, A. et al. Bevacizumab in Combination With Chemotherapy As First-Line Therapy in Advanced Gastric Cancer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 30, p. 3968–3976, 20 out. 2011.

OXALIPLATINA. Farmacêutica Responsável: Eliza Yukie Saito. São Paulo: Blau Farmacêutica S.A.. 2017. Bula de Remédio.

PARDINI, R.S. Nutritional intervention with omega-3 fatty acids enhances tumor response to anti-neoplastic agents. **Chemico-Biological Interactions**, v.162, p.89-105, 2006.

PERINI, J.A.L.; STEVANATO, F.B.; SARGI, S.C.; VISENTAINER, J.E.L.; DALALIO, M.M.O.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Ácidos graxos poli- insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, v.23, n.6, p. 1075-1086, 2010.

RIUL, S.; AGUILLAR, O.M. Quimioterapia antineoplásica: revisão da literatura. **Rev. Min. Enf.**, v. 3, p. 60-7, 1999.

RUXTON, C.H.S.; REED, S.C.; SIMPSON, M.J.A.; MILLINGTON, K.J. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 20, p.275-285, 2007.

SÁNCHEZ-LARA, K.; TURCOTT, J.G.; JUÁREZ-HERNÁNDEZ, E.; NUÑEZ-VALENCIA, C.; VILLANUEVA, G.; GUEVARA, P.; TORRE-

VALLEJO, M.; MOHAR, A.; ARRIETA, O. Effects of an oral nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid on nutritional and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer: Randomised trial. **Clinical Nutrition**, 2014.

SHIVANNA, L. M.; UROOJ, A. A Review on Dietary and Non-Dietary Risk Factors Associated with Gastrointestinal Cancer. **Journal of gastrointestinal cancer**, v. 47, n. 3, p. 247–254, 2016.

SIDDIQUI, R.A.; HARVEY, K.; STILWELL, W. Anticancer properties of oxidation products of docosahexaenoic acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.153, p.47-56, 2008.

SILVA, J.A.; TRINDADE, E.B; FABRE, M.E.; MENEGOTTO, V.M.; GEVAERD, S.; BUSS, Z.S.; FRODE. T.S. Fish oil supplement alters markers of inflammatory and nutritional status in colorectal cancer patients. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n.2, p. 267-273, 2012.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World Cancer Report 2014**. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization, 2014.

TANIGUCHI, H.; IAGARASHI, H.; SAITOH, A.; YAMAMOTO, H.; ADACHI, Y. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancer. **Cancer Sci**, v. 107, p. 1556-62, 2016.

TONG, B.C.; HARPOLE, D.H. Molecular Markers for Incidence, Prognosis, and Response to Therapy. **Surg Oncol Clin N Am**, v.21, p.161-175, 2012.

TROMBETTA, A.; MAGGIORA, A.; MARTINASSO, G.; COTOGNI, P.; CANUTO, R.; MUZIO, G. Arachidonic and docosahexaenoic acids reduce the growth of A549 human lung- tumor cells increasing lipid peroxidation and PPARs. **Chemico-Biological Interactions**, v.165, p.239-250, 2007.

TSAO, A.S.; LIU, D.; LEE, J.J.; SPITZ, M.; HONG, W.K. Smoking Affects Treatment Outcome in Patients with Advanced Nonsmall Cell Lung Cancer, **Cancer**, v.106, n.11, p.2428-36, 2006.

VANHOEFER, U. et al. Final results of a randomized phase III trial of sequential high-dose methotrexate, fluorouracil, and doxorubicin versus etoposide, leucovorin, and fluorouracil versus infusional fluorouracil and cisplatin in advanced gastric cancer: a trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Tract Cancer Cooperative Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 14, p. 2648–2657, 2000.

VIBET, S.; GOUPILLE, C.; BOUGNOUX, P.; STEGHENS, J.P.; GORÉ, J.; MAHÉO, K. Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response. **Free Radical Biology & Medicine**, v.44, p.1483-1491, 2008.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v.77, p. 325-333, 1981.

XELODA (Capecitabina). Farmacêutica Responsável: Tatiana Tsiomis Díaz. Rio de Janeiro: Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., 2017. Bula de Remédio.

XUE, H.; SAWYER, M.B.; WISCHMEYER, P.E.; BARACOS, V.E. Nutrition Modulation of Gastrointestinal Toxicity Related to Cancer Chemotherapy: From Preclinical Findings to Clinical Strategy. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.35, n.1, p.74-90, 2011.

APÊNDICE A - FICHA DE COLETA DE DADOS

Data: ____/____/____

Número do prontuário no CEPON: _____

Código do suplemento recebido: _____

1) DADOS PESSOAIS

Nome completo: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Sexo: _____

Procedência: _____

Unidade Básica de Saúde: _____

Endereço residencial: _____

Telefone: (____) _____ ; (____) _____

E-mail: _____

2) DADOS CLÍNICOS

Data do Diagnóstico: _____

Tipo de tumor: _____

Estadiamento: _____

Comorbidades associadas: _____

Protocolo de tratamento: _____

Fármacos utilizados: _____

HÁBITO TABÁGICO

Você:

 Nunca experimentou fumo (cigarro, cigarrilha, charuto, cachimbo e mascar) (ir questão 7) Experimentou, mas nunca fumou regularmente (ir questão 6) Deixou de fumar (ir questão 2) Fuma

1) Quantos cigarros fuma por dia, semana ou mês?

2) Que idade tinha quando fumou o primeiro cigarro? (se fuma parar nessa questão)_____

3) Fumou durante quanto tempo?

4) Há quanto tempo deixou de fumar?

5) Quando fumava, fumava quantos cigarros por dia, semana ou mês? (parar nessa questão)_____

6) Quantos cigarros já fumou?

7) É casado ou tem pessoa próxima que fuma regularmente ao seu lado?

ANÁLISE ANTROPOMÉTRICA

Peso Usual:_____

Altura:_____

	Momento Basal	Momento Final
Peso atual		
CB		
DCT		
CMB		

IMC		
%PP		

PERFORMANCE STATUS

	Momento Basal	Momento Final
Grau		

GRADUAÇÃO DE EVENTOS ADVERSOS

Evento Adverso	Graduação	
	Basal: ___/___/___	Final: ___/___/___
Constipação		
Diarreia*		
Mucosite Oral		
Náusea		
Vômitos		
Anorexia		

*No momento basal: Número de evacuações/dia, consistência.

Evento Adverso	Graduação	
	Basal: ___/___/___	Final: ___/___/___
Hemoglobina		
Linfócitos		
Plaquetas		
Leucócitos		
Neutrófilos		

198

Observações:

ACOMPANHAMENTO

Contato em 6 meses: _____

Contato em 1 ano: _____

APÊNDICE B – NOTA DE IMPRENSA

O tratamento convencional para cânceres gastrointestinais (composto dentre outros por câncer gástrico e colorretal) consiste em cirurgia, quimioterapia e radioterapia. O tratamento quimioterápico age em diversos tecidos do organismo, sejam eles neoplásicos ou não. Dessa maneira, pode acarretar diversas lesões a tecidos saudáveis, conhecidas como reações adversas ao tratamento. Quando os tecidos saudáveis são lesados em maior intensidade ou não conseguem se recuperar efetivamente entre os ciclos, o tratamento quimioterápico pode ter sua dose reduzida, adiado ou até mesmo interrompido. Isso resulta em diminuição da efetividade desse tratamento. Além disso, os eventos adversos do tratamento costumam apresentar grande desconforto para a maioria dos pacientes, sendo algumas vezes debilitantes e incapacitam a realização das atividades da vida diária.

Os quimioterápicos apresentam diversos mecanismos de ação e são divididos em grupos conforme as similaridades dos mecanismos principais. A geração direta ou indireta de espécies reativas de oxigênio nas células têm sido identificada como um dos mecanismos pelos quais determinados quimioterápicos atuam para induzir a morte celular. Dentre esses, estão a maioria dos fármacos utilizados na quimioterapia dos cânceres gastrointestinais. O aumento do estresse oxidativo nas células, gerado pelos quimioterápicos favorece a formação de compostos nocivos derivados de um processo denominado peroxidação lipídica.

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI n-3), são lipídeos presentes no óleo de peixe, que, quando ingeridos, são incorporados às células, sejam elas células do tumor ou células saudáveis. Quando presente nas células esses lipídeos são mais propensos aos ataques dos quimioterápicos e ao desencadeamento da peroxidação lipídica, do que os normalmente consumidos em uma dieta ocidental. Quando as células tumorais de estudos in vitro e em animais foram submetidas ao tratamento com esses lipídeos acompanhado do tratamento convencional anticâncer morreram em maior quantidade ou tiveram o tamanho do tumor reduzido. Por outro lado, sugere-se que embora possam aumentar os efeitos dos quimioterápicos nos tumores, esses ácidos graxos não parecem aumentar o efeito nas células

saudáveis, não aumentando assim os eventos adversos relacionados com o tratamento.

Isso, entretanto, ainda não é comprovado em estudos em humanos. Embora poucos estudos tenham sido realizados avaliando os efeitos da suplementação com óleo de peixe, combinado a quimioterapia na resposta ao tratamento e na presença e gravidade dos eventos adversos, nenhum estudo era cego e controlado por placebo. Os estudos cegos são aqueles que os pacientes não sabem quais suplementos ou medicamentos, por exemplo, estão recebendo. Logo, não existe a interferência do chamado efeito placebo, que seriam efeitos terapêuticos devido aos efeitos psicológicos acarretados pela crença de receber tratamento.

Foi isso que a tese de doutorado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Nutrição da UFSC, Carolina de Quadros Camargo, orientada pelo Prof. Dr. Everson Araújo Nunes propôs avaliar.

51 pacientes com câncer gástrico ou colorretal atendidos no Centro de Pesquisa Oncológicas de Florianópolis, o CEPON, que iam receber tratamento quimioterápico participaram do estudo. Os pacientes foram divididos em dois grupos, um grupo recebeu óleo de peixe e o outro azeite de oliva. Após nove semanas de suplementação, embora não houvesse diferenças entre os grupos para a presença de eventos adversos, os pacientes do grupo placebo, que receberam azeite de oliva, foram classificados com diarreia mais grave do que os pacientes do grupo óleo de peixe, que receberam duas cápsulas de óleo de peixe contendo 1,55 g de EPA + DHA por dia. Além disso os pacientes do grupo que recebeu óleo de peixe tiveram menos restrições das atividades da vida diária, avaliadas por uma escala denominada *Performance Status*. O grupo que não recebeu o óleo de peixe também teve mais hospitalizações devido aos efeitos da quimioterapia que o grupo que recebeu óleo de peixe.

De acordo com os resultados desse estudo o consumo de óleo de peixe acompanhado do tratamento quimioterápico pode levar a um melhor prognóstico para pacientes com câncer gastrointestinal, enquanto não parece aumentar os efeitos tóxicos do tratamento. O grupo de estudo recomenda a suplementação de óleo de peixe para indivíduos com cânceres gastrointestinais submetidos a tratamento quimioterápico como ferramenta para diminuir a gravidade da diarreia e melhorar o

prognóstico. E embora esse estudo não tenha encontrado diferenças com relação aos parâmetros de resposta ao tratamento entre os grupos, a hipótese de que esse óleo possa promover uma maior efetividade do tratamento ainda não pode ser completamente descartada.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Por favor, leia com atenção as informações a seguir e se desejar, discuta com sua família e com seu médico, para fazer uma decisão bem informada. O pesquisador principal é professor doutor do Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

O objetivo do estudo é: Avaliar a efetividade da terapia nutricional de suplementação de 2,4 g/dia de óleo de peixe em modular a inflamação, o estado nutricional, a resposta oxidativa associada ao câncer e influenciar a qualidade de vida durante o tratamento de indivíduos portadores de câncer gastrointestinal e pulmonar.

Cabe ao senhor(a) decidir se irá ou não participar. Caso não queira, não terá nenhuma desvantagem, inclusive em relação ao tratamento médico e aos cuidados que tenha direito a receber. Se decidir participar, o(a) senhor(a) assinará este termo de consentimento, mas mesmo depois de assinado estará livre para sair do estudo a qualquer momento, basta para isso informar a sua desistência. Isso não atrapalhará de maneira nenhuma os cuidados que receberá.

Caso aceite participar, no início, após 3 semanas e após 9 semanas, o(a) senhor (a) será pesado e será medida a sua altura; no Laboratório de Análises Clínicas será retirado uma amostra de sangue para avaliação bioquímica laboratorial. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele. Complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte. Se houver pequena perda de sangue no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. Alguns indivíduos consumirão duas cápsulas de óleo de peixe (suplemento alimentar) durante nove semanas – 63 dias, ingerindo-as longe dos horários das refeições principais (café da manhã, almoço ou jantar), enquanto que, outros, consumirão uma cápsula contendo um óleo vegetal. Poderá sentir-se cansado com as perguntas e avaliações, porém se necessitar de uma pausa ou interrupção tem toda a liberdade para fazê-la. A ingestão das cápsulas pode gerar algum desconforto

relacionado à digestão do alimento, porém o pesquisador e a equipe estarão aptos a lhe dar assistência.

O(a) senhor(a) não terá nenhum gasto com a pesquisa e não receberá nada financeiramente por sua participação. As cápsulas serão doadas pelo pesquisador, ele também pagará os exames. Os potenciais benefícios que serão avaliados incluem: redução da inflamação, manutenção ou melhora do estado nutricional, melhora da qualidade de vida durante o tratamento, incremento do efeito citotóxico do tratamento por meio do possível estresse oxidativo gerado pelo suplemento. Contudo, não podemos assegurar que os mesmos ocorrerão, pois os objetivos do projeto são verificar se existem ou não os benefícios propostos.

Algumas informações clínicas e de exames laboratoriais serão coletados de seu prontuário. As amostras de sangue coletadas serão armazenadas até o final da vigência do presente projeto em biorrepositório (biofreezer) localizado em Laboratório no Departamento de Nutrição – UFSC, para as avaliações propostas neste estudo e outras avaliações importantes que possam complementar os resultados desta pesquisa. Uma vez vencido esse prazo as amostras serão descartadas em lixo hospitalar. Garantimos que as informações fornecidas serão confidenciais, apenas o pesquisador e colaboradores terão acesso aos dados. Não serão tiradas fotos, nem realizadas filmagens ou qualquer tipo de gravação das avaliações. Caso seja do seu interesse, todos os resultados das avaliações e acesso às suas amostras coletadas estarão disponíveis, ao final da pesquisa. Para tanto, basta contatar o pesquisador responsável, cujo número telefônico está descrito a seguir, identificar-se e declarar seu interesse nos resultados obtidos de suas avaliações.

Esta pesquisa está pautada nas orientações e recomendações da Resolução CNS 466/2012 e suas complementares. O pesquisador entrará em contato uma vez por semana via telefone. Mas em caso de alguma dúvida ou dificuldade em relação ao estudo, o(a) senhor(a) pode entrar em contato com o pesquisador responsável: Everson Araujo Nunes pelo telefone: (48) 3721-2289 ou e-mail: everson.nunes@ufsc.br

Se tiver dúvidas sobre seus direitos, o(a) senhor(a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC, coordenador Washington Portela de Souza pelo telefone (48)3721-9206 e/ou com o

Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON)
(48)3331-1502.

Eu.....
 .., portador do RG: Fone(s) para
 contato:() ()..... fui esclarecido
 sobre a pesquisa: Suplementação de óleo de peixe em câncer
 gastrointestinal e pulmonar: efeitos sobre a resposta inflamatória, o
 estado nutricional, o perfil de ácidos graxos plasmático e celular, a
 qualidade vida e a resposta oxidativa, além de ter lido e entendido todas
 as informações fornecidas sobre minha participação na pesquisa, tive
 oportunidade de discuti-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas
 foram esclarecidas satisfatoriamente. Eu, voluntariamente, concordo em
 participar deste estudo e autorizo a coleta de informações do meu
 prontuário, além de autorizar a coleta, o armazenamento e a utilização
 de minhas amostras sanguíneas pelo pesquisador para as avaliações
 pretendidas nesta pesquisa. Ao assinar este termo de consentimento,
 estou de pleno acordo com os dados a serem coletados, podendo os
 mesmos ser utilizados conforme descrito neste termo de consentimento.
 Entendo que receberei uma cópia assinada deste termo de
 consentimento.

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do profissional que apresentou o termo

Florianópolis ___/___/___

ANEXO B – DOCUMENTO APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

	<p>CENTRO DE PESQUISAS ONCOLÓGICAS -CEPON</p>	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
Elaborado pela Instituição Coparticipante		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
<p>Título da Pesquisa: Câncer gastrointestinal e pulmonar, repercussões da ingestão de óleo de peixe durante o tratamento: efeitos sobre a qualidade de vida, estado nutricional e parâmetros imunometabólicos</p>		
<p>Pesquisador: Everson Araujo Nunes</p>		
<p>Área Temática:</p>		
<p>Versão: 4</p>		
<p>CAAE: 24096013.7.0000.0121</p>		
<p>Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina</p>		
<p>Patrocinador Principal: Financiamento Próprio</p>		
DADOS DO PARECER		
<p>Número do Parecer: 580.649</p>		
<p>Data da Relatoria: 04/04/2014</p>		
Apresentação do Projeto:		
<p>A terapia nutricional pode ser encarada como uma adjuvante no tratamento do câncer por fornecer nutrientes em quantidade adequada para manutenção das funções vitais e prevenir a desnutrição, situação esta, muito frequente em pacientes oncológicos devido aos efeitos colaterais indesejáveis advindos do tratamento altamente tóxico e, ainda, devido ao próprio curso metabólico da doença; ou, através da utilização de "nutrientes especiais", como os ácidos graxos ômega-3 presentes no óleo de peixe, que são capazes de modular positivamente respostas celulares e orgânicas, melhorando a tolerância ou até mesmo, potencializando os efeitos anticâncer do tratamento, assim como, proporcionando melhor qualidade de vida ao paciente oncológico (PINHO et al., 2011). Estudos anteriores do Grupo de Pesquisa em Imunonutrição e Metabolismo (GPI/M) desenvolvidos com câncer colorretal (SILVA et al., 2012; MOCELLIN et al., 2013) demonstraram que a suplementação de óleo de peixe (0,6g/dia de ômega-3) durante 9 semanas, no curso do tratamento quimioterápico, evita a perda de peso, mantendo o estado nutricional e prevenindo a desnutrição associada, e reduz significativamente o risco de complicações inflamatórias e nutricionais nestes pacientes, em decorrência de uma provável melhor resposta orgânica ao processo inflamatório existente. Além do potencial anti-inflamatório e de seus benefícios sistêmicos, as evidências sugerem que a suplementação de ácidos graxos omega-3 possa</p>		
<p>Endereço: Rodovia Admar Gonzaga,655 - SC 404 Bairro: Itacorubi CEP: 88.034-000 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS Telefone: (48)3331-1502 Fax: (48)3331-1502 E-mail: cep@cepon.org.br</p>		



CENTRO DE PESQUISAS
ONCOLÓGICAS - CEPON



Continuação do Parecer: 590.649

potencializar a ação antitumoral do tratamento radio ou quimioterápico, por ser mais susceptível a peroxidação lipídica com consequente formação de radicais livres, que é o princípio de ação do tratamento. Acredita-se que, se melhor comprovadas tais ações, mediante a realização deste estudo, o óleo de peixe possa ser adotado como terapia adjuvante, de baixo custo, ao tratamento quimioterápico na perspectiva de resultar melhor prognóstico e qualidade de vida do paciente e, não obstante, reduzir custos com o tratamento oncológico.

A execução deste estudo contribuirá com o conhecimento científico sobre o assunto, assim como, poderá fornecer evidências para a tomada de decisões clínicas no âmbito do Sistema de Único de Saúde no que tange a terapias adjuvantes ao tratamento do câncer.

Trata-se de ensaio clínico randomizado, prospectivo e controlado, composto por amostra de conveniência, constituída por indivíduos maiores de 18 anos de idade, de ambos os sexos com diagnóstico de adenocarcinoma localizado no trato gastrointestinal (estômago, intestino, cólon, reto e canal anal), incluindo aqueles com adenocarcinoma pancreático e pulmonar, assistidos e recrutados entre julho de 2014 a dezembro de 2015 no Centro de Pesquisas Oncológicas de Florianópolis, CEPON, Santa Catarina, Brasil, e que concordarem em participar deste estudo. Os critérios para elegibilidade são: ter idade maior que 18 anos; possuir diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma nas localizações supracitadas e ter indicação de tratamento quimioterápico. Não serão elegíveis aqueles: em tratamento paliativo ou em uso de estatina ou fármacos anti-inflamatórios; com alergia a peixes e derivados; sem condições de ingestão via oral; submetidos anteriormente à quimioterapia; portadores de doenças autoimunes ou cuja patologia envolva um processo inflamatório; que fizeram uso de suplementos contendo óleo de peixe ou AGPI n-3 por um período prolongado (>90 dias), seis meses antes da inclusão no estudo; ou ainda, sem condições psicológicas adequadas de entender o protocolo do estudo e de fornecer seu consentimento livre. Os indivíduos elegíveis serão alocados randomicamente em dois grupos de estudo assim definidos: 1) Grupo suplementado (GS) ou 2) Grupo Controle (GC). Os indivíduos do grupo suplementado farão a ingestão de 2,4 g/dia de óleo de peixe encapsulado (Fish oil, Nature's Bounty INC®, Nova York, Estados Unidos) durante as 9 semanas. O grupo controle, por sua vez, fará a ingestão de óleo de oliva encapsulado.

Objetivo da Pesquisa:

Primário: Avaliar os efeitos da terapia nutricional de suplementação de 2,4 g/dia de óleo de peixe, durante o tratamento quimioterápico, sobre o estado nutricional, a qualidade de vida, o perfil de ácidos graxos plasmáticos e celular, e a resposta inflamatória e oxidativa de indivíduos portadores de câncer gastrointestinal e pulmonar.

Endereço: Rodovia Admar Gonzaga, 655 - SC 404

Bairro: Itaconubi

CEP: 88.034-000

UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3331-1502

Fax: (48)3331-1502

E-mail: cep@cepon.org.br



CENTRO DE PESQUISAS
ONCOLÓGICAS - CEPON



Continuação do Parecer: 590.649

Secundários: Avaliar o estado nutricional através de índices antropométricos e do ângulo de fase antes e após o protocolo experimental do estudo; Determinar a composição corpórea através de bioimpedância bioelétrica e por Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA), antes e após o protocolo experimental do estudo; Avaliar o risco de complicações nutricionais e inflamatórias por meio do índice da relação PCR/Albumina nos grupos e nos momentos do estudo; Avaliar a qualidade de vida dos participantes durante o tratamento através da aplicação de questionários específicos, antes e após o protocolo experimental do estudo;

Determinar o perfil de ácidos graxos plasmático e celular (células mononucleares e eritrócitos) nos grupos de estudo, antes, durante e após a suplementação de 2,4 g/dia de óleo de peixe; Verificar o comportamento dos marcadores de inflamação (citocinas pró e anti-inflamatórias, proteínas hepáticas de fase aguda e eicosanoides metabólitos de ácidos graxos) antes, durante e após a suplementação de 2,4 g/dia de óleo de peixe durante nove semanas, em relação aos não suplementados; Verificar o comportamento de marcadores endógenos de estresse oxidativo, antes, durante e após a suplementação de 2,4 g/dia de óleo de peixe durante 9 semanas, em relação aos não suplementados; Quantificar a proporção de linhagens celulares nos grupos e momentos do estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há referência aos riscos eventuais do uso do óleo de peixe, no projeto original.

Possíveis benefícios de tal uso: Manter o estado nutricional através da estabilização do peso e da composição corpórea; Reduzir os efeitos colaterais do tratamento, identificados por escores dos questionários de qualidade de vida menores no GS do que no GC, ou seja, melhorar qualidade de vida destes pacientes durante o tratamento; Modular a produção de marcadores inflamatórios ao final das 9 semanas, podendo ser identificado por menores valores dos marcadores pró-inflamatórios no grupo suplementado quando comparado com o grupo controle, e/ou maiores valores dos marcadores anti-inflamatórios no GS em comparação com o GC, sugerindo potencial atividade anti-inflamatória; Apresentar valores da relação PCR/albumina menor no GS do que no GC, sugerindo redução ou ausência de risco inflamatório e nutricional; Estimular a resposta imunológica do participante, identificada por um incremento nas proporções de células imunitárias. Modular a resposta oxidativa associada ao tratamento do câncer, aumentando os valores destes parâmetros ao final de 9 semanas no GS em comparação com os do GC, sugerindo adjuvância no tratamento, uma vez, que a toxicidade à célula tumoral ocasionada pelo tratamento poderá ser intensificada.

Endereço: Rodovia Admar Gonzaga, 655 - SC 404

Bairro: Itacorubi

CEP: 88.034-000

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48) 3331-1502

Fax: (48) 3331-1502

E-mail: cep@cepon.org.br



CENTRO DE PESQUISAS
ONCOLÓGICAS - CEPON



Continuação do Parecer: S00.640

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de estudo clínico prospectivo randomizado que poderá trazer grande benefício aos pacientes do grupo estudado, através da adoção de medida nutricional simples e eventualmente pouco onerosa (não há referência ao custo da suplementação com cápsulas de óleo de peixe por 9 semanas), se os benefícios esperados forem confirmados.

A forma escolhida para randomização não é a ideal, porém sua aplicação rigorosa pode corresponder à aleatorização esperada. Melhor seria a randomização em Central computadorizada. Seria muito conveniente acrescentar um cegamento dos pesquisadores, não permitindo que saibam quais pacientes pertencem ao GS, validando mais fortemente as entrevistas e questionários, e caracterizando o estudo como duplo cego, já que também os pacientes não devem saber o que tomam. Atentar para eventual retrogosto do óleo de peixe nos pacientes suplementados, fazendo-os supor que recebem a suplementação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE e Cronograma bem elaborados. No projeto original não há referência a quem arcará com os custos altos do estudo.

Demais documentos, principalmente a aceitação por parte do CEPON, estão presentes, salvo o compromisso por escrito das pesquisadoras do Serviço de Nutrição aceitando colaborar com o estudo.

Recomendações:

Deve ser feita uma rigorosa revisão gramatical no texto, que contém muitos erros de vernáculo. Exemplo: Lembre-se de consumir duas (2) cápsulas por dia, fora do horário das refeições (2 h após ou antes há (A) uma grande refeição). A observação constante do final do parecer consubstanciado da UFSC, datado de 10/03/2014, item conclusões ou pendências e lista de inadequações, é absolutamente inadequada, já que a pesquisa será realizada no CEPON.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pesquisa de potencial relevância para os pacientes e para as Instituições realizadoras.
Providenciar as correções solicitadas nos itens anteriores.

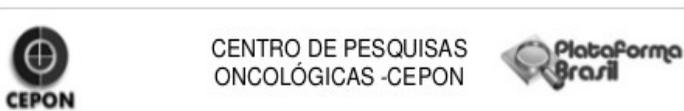
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rodovia Admar Gonzaga, 655 - SC 404
 Bairro: Itacorubi CEP: 88.034-000
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
 Telefone: (48)3331-1502 Fax: (48)3331-1502 E-mail: cep@cepon.org.br



Continuação do Parecer: 580849

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que relatórios da pesquisa devem ser encaminhados semestralmente ao CEP, bem como quaisquer alterações no projeto original devem ser imediatamente comunicadas.

FLORIANOPOLIS, 04 de Abril de 2014

Assinador por:
Luiz Roberto Medina dos Santos
(Coordenador)

Endereço: Rodovia Admar Gonzaga,655 - SC 404
Bairro: Itacorubi **CEP:** 88.034-000
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3331-1502 **Fax:** (48)3331-1502 **E-mail:** cep@cepon.org.br