UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus de Ribeirão Preto

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

IZABEL DE ARRUDA LEME

Concentrações de ácidos graxos e de aminoácidos em tecido tumoral e tecido normal adjacente de pacientes com carcinoma espinocelular de mucosa de cabeça e pescoço

Ribeirão Preto
2008

IZABEL DE ARRUDA LEME

Concentrações de ácidos graxos e de aminoácidos em tecido tumoral e tecido normal adjacente de pacientes com carcinoma espinocelular de mucosa de cabeça e pescoço

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica - Investigação Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Julio Sérgio Marchini.

Ribeirão Preto
2008

Autorizo a reprodução e divulgação total e parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Leme, Izabel de Arruda

Concentrações de ácidos graxos e de aminoácidos em tecido tumoral e tecido normal adjacente de pacientes com carcinoma espinocelular de mucosa de cabeça e pescoço. Ribeirão Preto, 2008.

67p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica - Investigação Biomédica.

Orientador: Marchini, Julio Sérgio.

1. Carcinoma espinocelular. 2. Ácidos graxos. 3. Aminoácidos.

Izabel de Arruda Leme

Concentrações de ácidos graxos e de aminoácidos em tecido tumoral e tecido normal adjacente de pacientes com carcinoma espinocelular de mucosa de cabeça e pescoço.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica -
Investigação Biomédica.

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo incentivo constante.

Ao Prof. Sérgio pela oportunidade e aprendizado proporcionados.

Ao Guilherme pela amizade e pela preciosa ajuda no desenvolvimento da metodologia.

Ao Padovan, que guiou meus primeiros passos no laboratório.

Aos amigos que me acompanharam e contribuíram diretamente para meu amadurecimento durante essa jornada: Karina, Estela, Flávia, Rafa, Fer, Karla.

Ao Prof. Alceu por conceder o laboratório de Nutrição durante o desenvolvimento da metodologia.

Ao Prof. Francisco Veríssimo de Mello Filho por ter aberto as portas do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Aos residentes e à equipe de enfermagem do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço pela colaboração durante a avaliação dos pacientes e coleta das amostras.

Aos pacientes, sem os quais a pesquisa não teria se concretizado.

À FAPESP pela concessão de bolsa e de auxílio à pesquisa.

“Nada há em uma lagarta que diga que ela se tornará uma borboleta”

Richard Fuller

RESUMO

Leme IA. **Concentrações de ácidos graxos e de aminoácidos em tecido tumoral e tecido normal adjacente de pacientes com carcinoma espinocelular de mucosa de cabeça e pescoço.** 2008. 65 f. Dissertação - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP.

A alta taxa de replicação celular no tumor, aumenta a demanda de ácidos graxos para composição de membrana e de nucleotídeos para síntese de DNA. Visto que a síntese de ambos depende de intermediários do ciclo de Krebs e que no tumor a maior parte da glicose disponível é convertida a ácido láctico (e não a acetil-coA, como ocorre na célula normal), a glutamina passa a ser a principal fonte de intermediários do ciclo de Krebs para síntese de ácidos graxos e de nucleotídeos. Além da glutamina, outros aminoácidos têm seu metabolismo alterado no tumor. Assim, os objetivos do trabalho foram comparar o perfil de ácidos graxos e de aminoácidos em tecido tumoral e tecido normal adjacente de pacientes com carcinoma espinocelular de mucosa de cabeça e pescoço, quantificar lipídeos totais nas amostras e avaliar o estado nutricional dos pacientes. Participaram da pesquisa pacientes internados junto ao Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. As amostras de tecido tumoral e de tecido normal foram coletadas durante procedimento cirúrgico, após excisão do tumor. A extração dos lipídeos e dos aminoácidos livres foi realizada pelo método de Folch. A determinação de ácidos graxos livres e totais foi realizada por cromatografia gasosa/espectrometria de massa. A análise de aminoácidos foi realizada por cromatografia gasosa com detector de chama. A avaliação nutricional incluiu: aferição de peso, estatura, dobras cutâneas e exame de impedância bioelétrica para estimativa de composição corporal, além de avaliação da ingestão alimentar por questionário de frequência alimentar. Não foi verificada diferença na concentração de lipídeos totais e dos ácidos palmítico, esteárico e oléico. Quanto à análise de aminoácidos, apenas a alanina, metionina e a lisina não mostraram diferença entre tecido tumoral e normal. Os demais aminoácidos apresentaram-se aumentados no tumor em relação à margem. A extração de aminoácidos a partir do método de Folch (desenvolvido para extração de lipídeos) possibilita a determinação de ácidos graxos e de aminoácidos livres em fragmentos bastante reduzidos de tecido, como, por exemplo, material obtido a partir de biópsia. O estado nutricional dos pacientes variou de eutrofia a sobrepeso, predominando excesso de gordura corporal, avaliado por impedância bioelétrica. A ingestão alimentar de macronutrientes mostrou-se adequada na maior parte da população avaliada.

Palavras-chave: carcinoma espinocelular de mucosa, ácidos graxos, aminoácidos.

ABSTRACT

Leme IA. **Fatty acids and amino acids concentrations in tumoral and adjacent normal tissue of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.** 2008. 65 f. Dissertation - Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto, Universidade de Sao Paulo, Ribeirao Preto - SP.

Due to its rapid growth, tumor cells need more fatty acids for membrane composition and nucleotides for DNA synthesis. Both fatty acids and nucleotides synthesis depends on Krebs cycle intermediates. As most of glucose available is converted to lactic acid (and not to acetyl-CoA, as occur in normal cells), glutamine is used as major source for Krebs cycle intermediates for fatty acids and nucleotides synthesis. Not only metabolism of glutamine is altered in tumor cells, but also other amino acids. The aims of the study were to compare fatty acid and amino acid profiles in tumoral and adjacent normal tissue of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck, to quantify total lipids in tissue samples and to assess nutritional status of patients. The study included patients diagnosed with squamous cell carcinoma of the head and neck, scheduled for cancer operation within Head and Neck Surgery Service of Clinics Hospital of Ribeirao Preto - University of Sao Paulo. Samples were collected immediately after tumor removal. Lipids and free amino acids were extracted using Folch method. Free and total fatty acids analyses were performed by gas chromatography/mass spectrometer. Amino acids analysis was performed by gas chromatography with flame ionization detector. Nutritional assessment included: weight, height and skinfold measurements, bioelectric impedance exam for estimative of body composition and dietetic assessment through food frequency questionnaire. We observed no difference in total lipids and of palmitic, stearic and oleic fatty acids concentrations in tumor and normal tissues. Only alanine, methionine and lysine showed no difference in tumor and normal tissues. Other amino acids concentrations were higher in tumor compared to normal tissue. Amino acids extraction through Folch method (created for lipid extraction purpose) enables the determination of fatty acid and amino acid in small slices of tissue, as that obtained from biopsy. Nutritional status of patients ranged from eutrophic to overweight, with excess of body fat, assessed by bioelectric impedance. Food intake was adequate in most of patients studied.

Key words: squamous cell carcinoma, fatty acids, amino acids.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 Ácidos graxos e câncer	03
2.2 Alterações metabólicas no câncer	06
2.3 Aminoácidos e câncer	12
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo Geral	15
3.2 Objetivos Específicos	15
4 MÉTODOS	16
4.1 Casuística	16
4.2 Coleta de amostras	18
4.3 Extração dos analitos	18
4.4 Análise de ácidos graxos.....	19
4.5 Análise de aminoácidos	22
4.6 Avaliação do estado nutricional	24
4.7 Análise Estatística	26
5 RESULTADOS	27
5.1 Ácidos graxos	27
5.2 Aminoácidos	28
5.3 Estado nutricional	31
6 DISCUSSÃO	34
6.1 Ácidos graxos	34
6.2 Aminoácidos	36
6.3 Estado nutricional	40
7 CONCLUSÃO	42
BIBLIOGRAFIA CITADA	43
APÊNDICES	51
ANEXOS	58

1 INTRODUÇÃO

Em 2005, 13% (7,6 milhões) das mortes ocorridas em todo mundo foram por câncer, sendo que mais de 70% dessas mortes ocorreram em países de média ou baixa renda¹. No Brasil, estima-se que em 2008 e 2009 ocorrerão 466.730 novos casos de câncer. A distribuição de casos novos segundo localização primária da neoplasia é bastante heterogênea nas regiões do país, sendo que as maiores taxas observadas nas regiões sul e sudeste enquanto as menores taxas são encontradas nas regiões norte e nordeste².

Neoplasias de cabeça e pescoço, o sexto tipo mais comum de câncer no mundo³, são neoplasias malignas que afetam epitélio da faringe, laringe, seios paranasais e cavidades nasal e oral⁴. Entre 1979 e 2000 foram contabilizadas no Brasil 38263 mortes por câncer de cavidade oral e 40314 por câncer de faringe, o que representa 1,8% e 1,9% do total de mortes por neoplasia, respectivamente⁵. Praticamente todas as neoplasias epiteliais consistem em carcinoma espinocelular⁴. Carcinoma espinocelular é uma das doenças neoplásicas mais freqüentes no Brasil, acometendo predominantemente homens com idade superior a 50 anos⁶.

Dados de pacientes portadores de cabeça e pescoço registrados entre 2000 e 2006 no Hospital do Câncer da Fundação Oncocentro de São Paulo revelam maior número de casos em homens, com maior proporção de casos em indivíduos na faixa acima de 55 anos. Verificou-se ainda que a maioria dos indivíduos eram analfabetos ou tinham primeiro grau incompleto e que apresentavam estágio da doença avançado no momento do diagnóstico⁷.

Estima-se que um terço das causas de câncer são atribuídas a fatores relacionados a alimentação, nutrição e atividade física⁸. Segundo o AICR (American Institute for Cancer Research) e a WCRF (World Cancer Research Fund), manutenção do peso corporal, atividade física e dieta adequada podem prevenir de 30 a 40% de todos os tipos de câncer e 20% podem ser prevenidos pelo alto consumo de frutas e vegetais⁹. O excesso de peso consiste risco de câncer de cólon/reto, mama (pós menopausa), endométrio, rim e esôfago (adenocarcinoma), sendo que o risco aumenta quanto maior a adiposidade. Diferente do adenocarcinoma de esôfago, os principais fatores de risco para carcinoma espinocelular de esôfago são tabagismo e etilismo⁴. Somado a isso, o consumo de frutas, verduras e legumes tem relação inversa com o risco de câncer de cavidade oral, faringe e esôfago¹⁰.

Entre os diversos nutrientes que supostamente aumentam ou reduzem o risco de desenvolvimento de câncer, os ácidos graxos têm sido amplamente estudados, mostrando efeitos tanto na prevenção como no tratamento do câncer¹¹⁻¹⁴. Já os aminoácidos estão relacionados principalmente às respostas metabólicas e imunológicas do organismo ao tumor já instalado, o que é secundário às alterações ocorridas na célula neoplásica¹⁵.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ácidos graxos e câncer

Os ácidos graxos podem ser classificados segundo a presença de duplas ligações entre carbonos da molécula, denominando-se ácidos graxos saturados aqueles que não apresentam duplas ligações entre carbonos da molécula e insaturados aqueles apresentam pelo menos uma dupla ligação entre os carbonos da molécula. Os insaturados com apenas uma dupla ligação são chamados monoinsaturados e aqueles com mais de uma dupla ligação são chamados poliinsaturados. Os ácidos graxos saturados estão presentes predominantemente em gorduras de origem animal e os mais abundantes são o ácido palmítico e esteárico. Já os insaturados são encontrados predominantemente em óleos vegetais. Entre os monoinsaturados, o ácido oléico é o mais abundante, seguido do palmitoléico¹⁶. Entre os poliinsaturados, os mais abundantes são o linoléico (ω -6) e o α -linolênico (ω -3), que não são sintetizados pelo organismo humano, devendo, portanto, ser obtidos a partir da dieta. Por esse motivo são denominados ácidos graxos essenciais (AGE).

O ácido linoléico, encontrado principalmente em óleos vegetais, e o ácido α -linolênico, encontrado principalmente em óleo de peixe e em sementes de linhaça. O produto do metabolismo do ácido linoléico é o ácido araquidônico, a partir do qual são formados principalmente eicosanóides pró-inflamatórios. Os produtos do

ácido α -linolênico são o ácido eicosapentaenóico e o ácidos docosahexaenóico, que são precursores de eicosanóides anti-inflamatórios^{16, 17}.

Os ácidos linoléico e α -linolênico competem pelas mesmas enzimas para serem metabolizados (Figura 1). A Δ -6-dessaturase atua preferencialmente sobre o metabolismo do ácido α -linolênico. No entanto, quando há excesso de ácido linoléico na dieta, essas enzimas passam a metabolizar preferencialmente esses ácidos graxos, favorecendo a formação de eicosanóides pró-inflamatórios¹⁸. Assim, as recomendações de ingestão devem ser baseadas na proporção entre esses ácidos graxos. Embora ainda haja controvérsias quanto a essas recomendações, a FAO/WHO (1993) recomenda uma razão ω -6: ω -3 de 5:1 a 10:1 para adultos¹⁹. Dietas com proporção adequada de ácidos graxos essenciais (ácidos linoléico e α -linolênico) podem tanto prevenir o desenvolvimento de câncer²⁰ como amenizar os efeitos secundários à doença^{21, 22}.

Com o objetivo de avaliar o efeito dos ácidos graxos ω -3 sobre o crescimento de tumor, Budowski *et al.* adicionaram ácido eicosapentaenóico (EPA) ao sangue arterial durante infusão *in situ* em hepatoma em animais. Com exceção do EPA, foi verificada redução da retenção de todos os ácidos graxos. Observaram ainda retenção muito pequena dos ácidos graxos²³. Apesar desses resultados, os mecanismos pelos quais os ácidos graxos da série ω -3 atuam na carcinogênese ou no crescimento do tumor ainda não estão bem elucidados.

Figura 1. Metabolismo dos ácidos graxos essenciais. As dessaturases retiram hidrogênio da cadeia, levando à formação de uma dupla ligação. As elongases adicionam carbonos à cadeia. Os eicosanóides são formados a partir de ácidos graxos poliinsaturados de 20 carbonos. Prostaglandinas e tromboxanos das séries 2 e leucotrienos da série 4 têm propriedades pró-inflamatórias, ao contrário daqueles das séries 3 e 5, que têm propriedades anti-inflamatórias. As lipoxinas e resolvinas, formadas a partir dos ácidos araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico, também apresentam propriedades anti-inflamatórias.

2.2 Alterações metabólicas no câncer

As alterações metabólicas que ocorrem no câncer devem ser tratadas de duas formas: alterações do metabolismo celular do próprio tumor (abordadas posteriormente) e alterações metabólicas secundárias à presença do tumor, que se manifestam de forma sistêmica, como perda de peso, seguida ou não de redução de tecido adiposo e de massa muscular.

Cerca de 40-43% dos pacientes com câncer apresentam perda de peso importante^{24, 25} (Tabela 1), caracterizada por redução de 5% do peso em 6 meses ou 10% em um ano²⁶. A perda de peso, um importante indicador de prognóstico de sobrevida nesses pacientes²⁷, pode estar presente antes mesmo de qualquer sinal de malignidade²⁸, podendo contribuir consideravelmente para o diagnóstico da doença²⁹. Em pacientes com câncer de cabeça e pescoço perda de peso superior a 10% no período de 6 meses é um importante preditor de complicações pós-cirúrgicas³⁰.

A desnutrição em pacientes com câncer é decorrente de um desequilíbrio entre a disponibilidade de nutrientes no organismo (geralmente reduzida) e as necessidades nutricionais do paciente, que estão aumentadas³¹. A redução de consumo de alimentos nesses pacientes pode ser provocada por complicações mecânicas (obstrução de vias do trato digestório), dor, depressão, alteração de apetite e/ou de paladar, além de alterações provocadas pelas terapias anti-neoplásicas³². Acredita-se que a maior necessidade de energia e de nutrientes em pacientes com câncer deve-se à maior utilização de vias metabólicas energeticamente onerosas³³.

Tabela 1.

Média de perda de peso em pacientes acometidos por neoplasia em diferentes locais, em diferentes estágios da doença, seguidos ou não por terapia anti-neoplásica

		Porcentagem de perda de peso
Local do tumor	Esôfago	16
	Pâncreas	16
	Estômago	15
	Intestino curto	5
	Cólon/reto	8
	Pulmão	10
	Cabeça/pescoço	9
Estágio da doença	0	2
	1	6
	2	9
	3	9
	4	9
Terapia anti-neoplásica	Não realizada/encerrada*	10
	Uma terapia em andamento	7
	Duas ou mais em andamento	11

*Terapia realizada a pelo menos três meses antes do estudo

Adaptado de Bozzeti (2008)²⁴

Estima-se que a desnutrição atinge cerca de 50% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço³⁴. A qualidade de vida desses pacientes também é bastante comprometida, visto que apresentarem disfagia, disartria e ainda enfrentam problemas com a aparência física. Embora essa condição normalmente seja agravada após ressecção cirúrgica ou após terapias anti-neoplásicas, disfagia e disartria podem ocorrer mesmo antes de qualquer tratamento³⁴.

A caquexia do câncer é caracterizada por perda de peso involuntária e progressiva, com redução de massa muscular^{35, 36} e de tecido adiposo²⁶ associada a anorexia, alteração de paladar, saciedade precoce e fadiga³⁷. Essa condição parece ser

um mecanismo que o organismo encontra para se adaptar ao gasto energético promovido pelo tumor³³. O perfil de gasto energético em pacientes com câncer varia de estado hipometabólico a hipermetabólico^{25, 38}. Diferente do que ocorre na inanição (privação de alimentos por período de tempo suficiente para provocar alteração metabólica importante), o quadro clínico da caquexia do câncer não é revertido com oferta energética adequada³³. Alterações do gasto energético, assim como a perda de peso progressiva, estão associadas a fatores humorais (produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo sistema imunológico do paciente em resposta ao tumor) e tumorais, como fator indutor de proteólise³⁹ e fator indutor de lipólise⁴⁰.

As alterações no metabolismo celular e sistêmico são, em sua maioria, decorrentes do metabolismo de glicose alterado no tumor^{41, 42}. Uma das primeiras evidências sobre o metabolismo celular no tumor, na década de 50, foi a de que células tumorais apresentam elevada taxa de glicólise e produzem mais lactato (fermentação láctica) do que as células normais, independentemente da presença de oxigênio, o que é denominado “efeito Warburg”⁴³. A preferência pela fermentação láctica é atribuída ao “fator indutor da hipóxia”⁴¹. Trata-se de um fator de transcrição genética que controla a adaptação das células a baixas concentrações de oxigênio⁴⁴. Esse fator, cuja expressão está elevada no tumor, determina a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo anaeróbico. Em outras palavras, nas células tumorais, os fatores responsáveis pelo efeito Warburg comprometem a habilidade da célula em gerar ATP via respiração aeróbica mitocondrial, passando então a dar preferência à via glicolítica anaeróbica, aumentando a produção de

(Figura 2).

ATP: adenosina trifosfato; NADH: niconamida adenina dinucleotídeo; FADH₂: flavina adenina dinucleotídeo.

Diante da rápida replicação celular, o tumor tem necessidade aumentada de ácidos graxos para composição de membrana. Os ácidos graxos são sintetizados a partir do acetil-CoA, em uma reação catalizada pelo complexo enzimático ácido graxo sintase (AGS). Em condições normais, a AGS é responsável por manter o equilíbrio energético na célula. Quando há excesso de energia oriunda de nutrientes exógenos, essa enzima converte o excesso em ácidos graxos, que são então esterificados a triglicérides para armazenamento. A atividade da AGS é bastante reduzida na grande maioria dos tecidos. Apenas em tecidos como fígado, glândulas mamárias e tecido adiposo a atividade dessa enzima é acentuada⁴⁶. A função fisiológica primordial da AGS é a síntese de ácidos graxos para armazenamento como triglicérides no tecido adiposo. Em células tumorais, que apresentam expressão elevada dessa enzima, a síntese de ácidos graxos pela AGS se destina preferencialmente à formação de componentes celulares como fosfolipídeos, triglicérides e colesterol⁴⁷. Além da expressão aumentada da AGS no tumor, a síntese de ácidos graxos para manutenção da célula tumoral parece ocorrer independentemente dos sinais de regulação que inibem a síntese de ácidos graxos⁴⁸.

Os nucleotídeos, componentes dos ácidos nucléicos (RNA e DNA) que determinam a sequência de aminoácidos de todas as proteínas, também têm especial importância diante da alta taxa de replicação celular. A síntese de ácidos graxos e de nucleotídeos tem três fatores em comum: 1) utilizam glicose como precursor; 2) dependem dos intermediários do ciclo de Krebs e 3) consomem redutores (NADPH) em suas reações⁴². Visto que na célula tumoral 85% de glicose é convertida a piruvato, e que apenas 5% deste é convertido a acetil-CoA para dar início ao ciclo de Krebs (80% é transformado em lactato), a célula passa a utilizar glutamina como

precursor para compensar a falta de intermediários do ciclo e para fornecer NADPH como redutor (Figura 3). Cerca de 35% da glutamina disponível à célula é oxidada a CO_2 , gerando pelo menos 9 ATP, enquanto 13% é convertido a ácido láctico⁴⁹.

Figura 3. Formação de ácidos graxos e de nucleotídeos a partir dos intermediários do ciclo de Krebs formados a partir da glutamina. No tumor, a glicose fornece a maior parte do acetil-CoA necessário para síntese de ácidos graxos, que está aumentada nessas células. No entanto, a utilização contínua de citrato provoca um *déficit* no ciclo de Krebs. O metabolismo de glutamina no tumor, além de prover intermediários para o ciclo de Krebs, tem a função de produzir NADPH. Redutores NADPH podem ser obtidos quando o malato é exportado da mitocôndria para o citoplasma e então convertido a piruvato. Podem ser obtidos ainda por meio da conversão do citrato (exportado ao citoplasma) a oxalacetato, seguida da síntese de lactato. Essas vias consistem as principais fontes de NADPH para síntese de ácidos graxos no tumor.

2.3 Aminoácidos e câncer

Desde a década de 50 já se sabe que células tumorais utilizam grandes quantidades de glutamina⁵⁰. A glutamina é o aminoácido mais abundante no organismo, visto que participa do metabolismo de todos os demais aminoácidos. A maior utilização de glutamina pelo tumor é apenas uma das formas como os aminoácidos podem influenciar sobre o metabolismo do tumor. A metionina, por exemplo, é um aminoácido essencial para o crescimento tumoral⁵¹. Dietas restritas em metionina provocam inibição do crescimento tumoral em ratos. No entanto, a restrição de metionina, assim como de demais aminoácidos essenciais, pode comprometer o estado nutricional do paciente⁵². Com o objetivo de avaliar o efeito dos aminoácidos da dieta sobre o crescimento tumoral, Theuer comparou o crescimento do tumor e a perda de peso em ratos alimentados com dietas restritas em aminoácidos essenciais. Aminoácidos essenciais são aqueles que não podem ser sintetizados pelo organismo, devendo ser obtidos a partir da dieta. São eles: leucina, isoleucina, valina, metionina, triptofano, fenilalanina, histidina, lisina, treonina. Foi verificado que a restrição de triptofano, de treonina, de leucina e de metionina contribuíram para o controle do crescimento do tumor, mas provocou perda de peso nos animais. Já a restrição de fenilalanina, de leucina e de isoleucina contribuíram para o controle do crescimento do tumor, sem provocar perda de peso dos animais⁵².

Enzimas que metabolizam a arginina (arginase e óxido nítrico sintase) têm expressão aumentada no tumor, o que varia conforme o tipo e estágio do tumor, especialmente no caso da arginase⁵³⁻⁵⁵. Acredita-se que a atividade da arginase no tumor está relacionada à síntese de poliaminas, que são essenciais para proliferação celular e são obtidas a partir da ornitina, subproduto formado por intermédio da arginase⁵⁴. A óxido nítrico sintase forma citrulina e óxido nítrico a partir da arginina. No tumor, o óxido nítrico pode tanto suprimir como estimular o crescimento do

tumor, o que depende da dose, do tempo de exposição e da sensibilidade da célula ao óxido nítrico⁵⁶.

As alterações que ocorrem no tumor, especialmente no que diz respeito aos aminoácidos, também o protegem contra infiltração de linfócitos. A degradação do triptofano, por exemplo, é bastante elevada no tumor. Isso se deve à maior expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase, essa enzima que forma, a partir do triptofano, produtos tóxicos aos linfócitos. A administração sistêmica de inibidores dessa enzima em ratos reduzem a resposta imunossupressora provocada pela presença do tumor⁵⁷ e quando associado à administração de drogas quimioterápicas citotóxicas, provocam redução do tumor⁵⁸.

Nocito *et al.* observaram que animais com deficiência de serotonina, subproduto do triptofano, apresentam angiogênese e crescimento tumoral reduzidos⁵⁹. A disponibilidade de triptofano parece estar relacionada ao processo de caquexia, já que circulação desse aminoácido está aumentada nesses pacientes. Cangiano *et al.* observaram que a administração via oral de aminoácidos de cadeia ramificada reduz a incidência de anorexia e provoca aumento da ingestão calórica em pacientes com câncer⁶⁰. Isso ocorre porque a síntese de serotonina no cérebro depende da disponibilidade de triptofano circulante, que, por sua vez, compete com outros aminoácidos (tirosina, fenilalanina, metionina, aminoácidos aromáticos e de cadeia ramificada) para ser transportado ao cérebro. No entanto, diante das diferentes respostas a aminoácidos de cadeia ramificada^{61, 62}, seu uso de nesses pacientes ainda é questionado.

São escassas pesquisas *in vivo* voltadas para análise de nutrientes em tecido tumoral em humanos. A comparação da composição de tecido entre portadores de

câncer e indivíduos saudáveis pode apresentar limitações como influência da alimentação e demais fatores individuais. A avaliação da ingestão alimentar representa um obstáculo devido à subjetividade dos relatos de consumo e dificuldade de avaliação da biodisponibilidade e da interação entre nutrientes. Desse modo, a análise de tecido tumoral e normal de um mesmo paciente elimina a influência da alimentação e de outros fatores individuais.

Assim, diante das alterações observadas no metabolismo tumoral, o presente trabalho tem por hipótese que existem diferenças na concentração de ácidos graxos e de aminoácidos em tecido tumoral e no tecido normal de mesmo paciente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Comparar o perfil de ácidos graxos e de aminoácidos em tecido tumoral e tecido normal adjacente de pacientes com carcinoma espinocelular de mucosa de cabeça e pescoço.

3.2 Objetivos Específicos

Quantificar gordura total nas amostras de tecido;

Avaliar o estado nutricional dos pacientes.

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

Participaram da pesquisa pacientes internados junto ao Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto no período junho de 2006 a fevereiro de 2008. A coleta de amostras foi realizada naqueles pacientes que contemplavam os seguintes critérios: 1) ser diagnosticado com carcinoma espinocelular; 2) ter encaminhamento para cirurgia pelo Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço; 3) não ser recidiva; 4) dispor de material (tanto tecido doente como margem) suficiente para realização das análises. O delineamento completo do estudo está descrito na Figura 4. A avaliação quanto ao enquadramento aos critérios de inclusão foi realizada em conjunto com o Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, desde a confirmação do diagnóstico até a disponibilidade de material para coleta de modo que não compromettesse a avaliação anátomo-patológica da peça retirada. Todos os procedimentos da pesquisa foram explicados aos indivíduos (e/ou responsável) participantes do trabalho, que confirmaram concordância mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A). O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, sob processo nº 15484/2005 (Apêndice A).

Figura 4. Delineamento do estudo. A coleta de amostras foi planejada para os pacientes que não apresentavam recidiva e que tivessem encaminhamento para cirurgia. Caso o volume tumoral não fosse grande o suficiente para que pudesse ser retirada amostra, a coleta não era realizada. As amostras coletadas foram congeladas para posterior análise de ácidos graxos e aminoácidos, por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GCMS) e cromatografia gasosa com detector de chama (GC-FID).

4.2 Coleta de amostras

A coleta foi realizada durante o procedimento cirúrgico, após excisão do tumor. A fim de evitar extração de material necrótico, as amostras de tumor foram extraídas da borda do mesmo. Já as mostras de margem foram extraídas o mais distante possível do centro da peça, evitando-se assim contaminação do tecido normal com tecido tumoral. No momento da coleta, ao verificar que a coleta de amostra poderia comprometer a realização do exame anátomo-patológico, a coleta não era realizada. Cada amostra coletada foi pesada e imediatamente congelada a -20° C. Para pesagem foi utilizada balança analítica (BEL Engineering™) com capacidade de 210 g e precisão de 0,0001 g.

4.3 Extração dos analitos

As análises das amostras foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massa do Departamento de Clínica Médica, Divisão de Nutrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, onde, por meio do presente trabalho, foi implantada a metodologia de análise de ácidos graxos e de aminoácidos em tecido por cromatografia gasosa.

Para extração dos analitos foi utilizado método de Folch⁶³. Em tubos de ensaio, foi adicionado 1 mL de solução de clorofórmio-metanol (2:1) para cada 50 mg de amostra. Após homogeneização em triturador de tecido (Marconi®), foi adicionado água destilada (volume equivalente a 20% do volume de solução inicial).

A solução foi novamente homogeneizada no triturador, seguindo então para centrifugação, a fim de separar as fases (clorofórmio; metanol e água). A fase polar (superior) foi extraída e armazenada para análise de aminoácidos livres. A fase apolar (inferior) foi transferida para *vial* previamente pesado. Após secar sob nitrogênio, os *vials* foram novamente pesados para cálculo de gordura total da amostra.

4.4 Análise de ácidos graxos

Os ácidos graxos estão presentes no organismo principalmente sob forma de triglicerídeos e fosfolipídeos, que são formados por ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol, e por ácidos graxos livres. No presente trabalho foram analisados tanto ácidos graxos livres como totais. Para análise dos ácidos graxos totais, antes de submeter a amostra à esterificação, foi realizada hidrólise (separação dos ácidos graxos ligados) com 1 mL solução de hidróxido de potássio/metanol 0,5 M a 100° C durante 5 minutos. Para análise de ácidos graxos livres, a amostra foi esterificada sem realização de hidrólise. A esterificação dos ácidos graxos foi realizada adicionando-se 400 µL de solução de ácido clorídrico/metanol (4:1) à amostra, mantendo a 100° C durante 15 minutos. Após atingir temperatura ambiente foram adicionados 2 mL de água e 3 mL de hexano. Os tubos foram agitados por cerca de um minuto e centrifugados em seguida para extração da fase orgânica, que foi transferida para *vial*. Foi adicionado o padrão interno e, após secar sob nitrogênio, a

amostra foi ressuspensa em clorofórmio, seguindo então para análise por cromatografia gasosa/espectrometria de massa.

Foi utilizado cromatógrafo gasoso (Shimadzu™ GC-17A) acoplado ao espectrômetro de massa (Shimadzu™ GCMS-QP5000), sob as seguintes condições: temperatura do injetor: 250° C; temperatura da interface: 270° C; temperatura do forno 80° C, aumentando para 160° C e para 240° C a 2° C/0,5 minuto; pressão da coluna: 70 KPa, split ratio: 1:50. Foi utilizada coluna DB-wax 250 (30 m x 0,25 mm) (J&W Scientific). Como padrões internos foram utilizados o ácido heptadecanóico (C17:0) e o éster metílico do ácido tricosanóico (C23:0) (Supelco™). Para identificação dos picos foi utilizado padrão de ácidos graxos *37 Component FAME Mix* (Supelco™), a partir do qual foram feitas as diluições para construção da curva de calibração, nas concentrações 6, 8 e 10 µg/µL (Figura 5). Concentrações abaixo de 6 µg/µL não foram suficientes para detecção de todos os ácidos graxos.

Figura 5. Cromatograma referente ao padrão (10 µg/µL). A eluição dos picos se faz por ordem de comprimento e de saturação da cadeia dos ácidos graxos. Os ácidos graxos com menor comprimento de cadeia eluem antes daqueles com maior comprimento. Assim como os saturados, que eluem antes dos insaturados.

4.5 Análise de aminoácidos

Os aminoácidos livres foram extraídos da fase polar formada a partir da extração. Para análise de aminoácidos foi utilizado kit *EZ:Faast Amino Acid Analysis* (Phenomenex®). Foi utilizado cromatógrafo gasoso com detector de chama (Shimadzu™ GC-17A), sob as seguintes condições: temperatura do injetor: 300° C; temperatura do detector: 320° C; temperatura do forno 110° C, aumentando para 320° C a 32° C/0,5 minuto; pressão da coluna: 60 KPa, split ratio: 1:20. Foi utilizada coluna ZB-AAA (10 m x 0,25 mm) (Zebron™ - Phenomenex®). Para identificação dos picos foi utilizado padrão fornecido no próprio *kit*, a partir do qual foram feitas as diluições para construção da curva de calibração, nas concentrações 50, 100 e 200 µmol/L (Figura 6).

Figura 6. Cromatograma referente ao padrão (200 μ mol/L).

4.6 Avaliação do estado nutricional

Foram realizados avaliação antropométrica, exame de bioimpedância e avaliação dietética. A avaliação antropométrica e o exame de bioimpedância foram realizados no período da manhã, estando o paciente em jejum.

A avaliação antropométrica incluiu aferição de peso, estatura, pregas cutâneas tricipital, bicipital, sub-escapular e supra-ilíaca. Os pacientes foram pesados e medidos descalços, vestindo o mínimo de roupa possível em balança mecânica (Filizola®) com capacidade de até 150 Kg e precisão de 100 g, com estadiômetro de comprimento máximo de 1,92 m e precisão de 0,5 cm. A partir desses dados foi calculado índice de massa corporal (IMC), classificados segundo critérios da Organização Mundial de Saúde⁶⁴.

Para aferição das pregas cutâneas foi utilizado adipômetro Lange® com precisão de 0 a 60 mm, escala de 1 mm e pressão constante de 10 g/mm². A medida da prega cutânea tricipital, aferida na face posterior do braço, foi realizada no ponto médio entre a ponta do processo acromial da escápula e o processo olécrano da ulna (ponto médio do braço). A prega bicipital foi aferida à mesma altura da dobra tricipital, porém, na face anterior do braço. Para essas medidas, as pregas foram destacadas no sentido vertical, ao longo do braço. A prega sub-escapular foi aferida um centímetro abaixo do ângulo inferior da escápula, destacando-se a prega paralelamente às linhas naturais de clivagem da pele (usualmente uma linha cerca de 45° da horizontal). A prega supra-ilíaca foi aferida um centímetro acima da espinha ilíaca ântero-superior, na linha axial média, destacando a prega no sentido horizontal. Para cálculo da porcentagem de gordura a partir das pregas cutâneas foi

aplicada fórmula de Siri⁶⁵, que utiliza valores de densidade corporal. A densidade corporal foi calculada pelas equações de Durnin & Womerley⁶⁶.

O exame de impedância bioelétrica foi realizado com aparelho de frequência única (50kHz), marca Quantum BIA 101® (Q-JL Systems, Michigan, USA). Para este exame o paciente permaneceu em decúbito dorsal. Os eletrodos foram colocados nos seguintes pontos anatômicos: próximo à articulação metacarpo-falangeana e à articulação metatarso-falangeana (eletrodos emissores de corrente); entre as proeminências distais do rádio e da ulna e entre o maléolo medial e lateral do tornozelo (eletrodos detectores de voltagem). A porcentagem de gordura a partir do exame de bioimpedância foi calculada pela equação de Lohman⁶⁷.

Para a análise da adequação da porcentagem de gordura estimada a partir de valores de resistência e reactância, foram seguidas as recomendações de Lohman, considerando adequados os valores 22,1 a 23,9% para mulheres e 14,1 a 15,9% para homens. A porcentagem de gordura estimada a partir das pregas cutâneas foi avaliada conforme classificação de Frisancho, que propõe percentis de distribuição segundo sexo e faixa etária, sendo considerados adequados valores entre os percentis 5 e 95⁶⁸. A partir dos valores de resistência e de reactância foi calculado também o ângulo de fase, medida geométrica da razão entre a reactância e a resistência⁶⁹. Os instrumentos utilizados para avaliação da composição corporal encontram-se no Apêndice B.

Para avaliação dietética foi utilizado questionário de frequência alimentar⁷⁰ (Apêndice C). Para aplicação desse questionário os pacientes foram orientados a relatar o consumo referente aos três meses anteriores. O cálculo foi realizado com o *software Dietsys* (HHHQ-DietSys Analysis Software, Version 4.02, National Cancer

Institute, 1999), que fornece a média de ingestão diária de calorias e de nutrientes. A avaliação da adequação do consumo alimentar foi baseada nas faixas recomendações (AMDR - Acceptable Macronutrient Distribution Ranges) para macronutrientes, que preconiza faixas de adequação de 45-65%, 10-35% e 20-35% do valor calórico total da dieta para carboidratos, proteínas e lipídeos, respectivamente¹⁶.

4.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão (DP). A fim de avaliar diferenças entre tumor e tecido normal foi aplicado teste de t de *student* para amostras pareadas, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Ácidos graxos

Foram coletadas 23 amostras de tumor e respectiva margem, que pesaram em média 386,1 (310,3) mg e 305,6 (205,7) mg, respectivamente. As lesões de laringe representaram 61% das amostras coletadas, enquanto as demais eram neoplasias da cavidade oral. Os dados clínicos individuais encontram-se no Anexo B.

A concentração de gordura nas amostras de tumor e de tecido normal não foi diferente, com médias de 41,0 (57,2) e 48,2 (46,5) mg/g de tecido, respectivamente. Embora detectados nos padrões, os ácidos graxos poliinsaturados não foram detectados nas amostras analisadas. Os ácidos palmítico, esteárico e oléico (livres e totais) não mostraram diferença entre tecido tumoral e normal (Tabela 2).

Tabela 2.

Concentração de ácidos graxos em tecido tumoral e normal

		Média (DP)			
		mg/g de tecido		mg/g de gordura	
		Tumor	Margem	Tumor	Margem
Ácido palmítico	livre	3,4 (4,0)	3,1 (2,5)	117,7 (99,4)	101,6 (98,8)
	total	5,2 (6,1)	7,4 (7,4)	157,4 (133,5)	179,1 (111,0)
Ácido esteárico	livre	6,2(9,4)	4,7 (4,8)	219,8 (180,1)	172,6 (195,0)
	total	6,9(7,9)	6,4 (5,8)	232,1 (197,1)	201,1 (176,5)
Ácido oléico	livre	3,4 (2,4)	5,5 (6,5)	173,9 (201,2)	137,5 (188,3)
	total	5,3 (4,0)	12,9 (12,9)	201,7 (232,4)	248,8 (111,0)

DP: desvio padrão

5.2 Aminoácidos

A análise de aminoácidos foi realizada em 15 amostras. Apenas a alanina, a metionina e a lisina não apresentaram diferença entre tumor e tecido normal. Os demais aminoácidos (glicina, valina, leucina, isoleucina, treonina, serina, prolina, ácido aspártico, ácido glutâmico, fenilalanina e tirosina) apresentaram maior concentração no tumor em relação ao tecido normal (Tabela 3 e Figura 6).

Tabela 3.

Concentração média de aminoácidos em tecido tumoral e normal

	Média (DP)	
	Concentração ($\mu\text{mol/g}$)	
	Tumor	Margem
Alanina	4,9 (2,5)	4,1 (2,2)
Glicina	6,4 (4,3) *	3,8 (2,2)
Valina **	1,7 (0,9) *	1,2 (0,9)
Leucina **	1,7 (0,9) *	1,2 (0,6)
Isoleucina **	0,7 (0,4) *	0,5 (0,3)
Treonina **	1,3 (0,9) *	0,8 (0,5)
Serina	1,9 (1,1) *	1,5 (0,9)
Prolina	1,8 (1,2) *	1,2 (0,6)
Aspartato	2,2 (1,7) *	0,8 (0,4)
Metionina **	0,6 (0,6)	0,5 (0,3)
Glutamato	6,3 (4,5) *	3,6 (2,8)
Fenilalanina **	0,7 (0,4) *	0,5 (0,3)
Lisina **	1,2 (0,7)	1,1 (0,6)
Tirosina	0,4 (0,3) *	0,3 (0,2)
Aminoácidos essenciais	7,7 (4,3) *	5,4 (3,3)
Aminoácidos não essenciais	24,7 (13,8) *	15,9 (9,0)

DP: desvio padrão; ** Aminoácidos essenciais; * $p < 0,05$.

Aminoácidos não detectados: asparagina, triptofano, glutamina, ornitina, histidina.

Figura 6. Concentração de aminoácidos em tecido tumoral e tecido normal (µmol/g)

*sem diferença significativa

5.3 Estado nutricional

Foram avaliados 87 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, dos quais, 51 eram diagnosticados com carcinoma espinocelular. Essa amostra final foi composta por 5 mulheres e 46 homens, com idade média de 74 (8) e 57 (10) anos, respectivamente. Entre esses pacientes, 23 atendiam aos critérios para coleta de amostra de tecido, sendo que nenhuma das mulheres se enquadrava a esses critérios por apresentarem metástase ou por não terem realizado cirurgia. Portanto, a caracterização da população inclui apenas pacientes do sexo masculino. As características antropométricas e de ingestão alimentar estão descritas nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Quanto ao IMC, 53% dos pacientes estavam dentro da faixa de normalidade e 36% estavam acima dessa faixa. Nenhum paciente estava dentro da faixa de normalidade de porcentagem de gordura, quando estimada a partir das pregas cutâneas, sendo que 50% apresentou excesso de gordura corporal. Quando avaliada por impedância bioelétrica, todos os pacientes apresentaram excesso de gordura corporal. Quanto à avaliação dietética, foi verificado consumo adequado de carboidrato, proteína e lipídeos na maioria dos pacientes (73%, 93%, 77%, respectivamente). O consumo de ácidos graxos saturados mostrou-se adequado (<10% do valor calórico total da dieta) em 47% dos pacientes.

Tabela 4.

Características antropométricas da amostra estudada

Características	Média (DP)	
	Homens	n
Peso (Kg)	65,1 (13,9)	46
Estatura (m)	1,66 (0,07)	46
IMC (Kg/m ²)	23,6 (4,8)	46
PCT	10 (5,5)	38
PCB	6,9 (3,9)	38
PCSE	14,6 (6,9)	38
PCSI	9,2 (5,8)	38
GC ¹ (%)	14,7 (8,2)	38
R (Ω)	588,3 (89,8)	31
Xc (Ω)	58,6 (9,3)	31
GC ² (%)	33,6 (6,5)	31
AF	5,8 (1,0)	31

DP: desvio padrão; IMC: índice de massa corporal; PCT: prega cutânea tricipital; PCB: prega cutânea bicipital; PCSE: prega cutânea sub-escapular; PCSI: prega cutânea supra-ilíaca; GC: gordura corporal (1: estimada por pregas cutâneas; 2: estimada por impedância bioelétrica); R: resistência; Xc: reactância; AF: ângulo de fase.

Tabela 5.
Ingestão diária de nutrientes *

Características	Média (DP)
	Homens
Calorias (Kcal)	1914 (595)
Carboidrato (%VCT)	56 (8)
Proteína (%VCT)	15 (4)
Lípido (%VCT)	27 (6)
Ácidos graxos saturados (%VCT)	8 (3)

* Média da ingestão diária referente aos três meses anteriores à cirurgia, avaliada por Questionário de Frequência Alimentar.

DP: desvio padrão; VCT: valor calórico total da dieta; AGS: ácidos graxos saturados.

6 DISCUSSÃO

6.1 Ácidos graxos

No presente estudo buscou-se a comparar as concentrações de ácidos graxos e de aminoácidos em tecido tumoral e normal de pacientes portadores de carcinoma espinocelular de mucosa de cabeça e pescoço.

São escassos os trabalhos que avaliam o perfil de ácidos graxos em tecido tumoral e sadio de um mesmo paciente, eliminando assim influência da dieta e demais fatores individuais^{71, 72}. No presente trabalho não foram observadas diferenças na concentração de lipídeos totais e no perfil dos ácidos graxos palmítico, esteárico e oléico em carcinoma e em tecido normal. Embora o método de extração e de esterificação, assim como as condições de análise por cromatografia gasosa/espectrometria de massa tenham se mostrado eficientes, não foram detectados ácidos graxos poliinsaturados. Esse fato pode ser atribuído ao período e à temperatura de armazenamento das amostras, visto a instabilidade desses ácidos graxos⁷³.

Em análise do perfil de ácidos graxos livres e totais em tecido neoplásico e normal de colo de útero, foi observada menor concentração dos ácidos palmítico e esteárico e maior concentração dos ácidos palmitoléico (detectado apenas em tecido neoplásico) e oléico no tumor, comparado ao tecido normal. Verificou-se ainda menor concentração dos ácidos graxos ω -6 e maior concentração dos ω -9 no tumor. Ácidos graxos da série ω -3 foram detectados apenas em tecido neoplásico. Os

autores acreditam que a maior demanda por ácidos graxos essenciais devido ao rápido crescimento celular, pode levar a uma deficiência dos mesmos nas células tumorais, ativando a Δ -9-desaturase, que converte o ácido palmítico a palmitoléico e o ácido esteárico a oléico (ω -9)⁷⁴⁻⁷⁶. Ainda em relação aos ácidos graxos essenciais, um importante dado desse trabalho foi a detecção do ácido docosaheptaenóico (DHA) apenas nas amostras de tumor. O DHA, um dos ácidos graxos mais insaturados presentes no sistema biológico, parece acumular-se mais rapidamente nos tecidos acometidos pela neoplasia do que nos tecido adjacentes, podendo alterar a composição da membrana celular, tornando a célula mais susceptível a ação do sistema imunológico. No mesmo trabalho verificado menor concentração de ácidos graxos saturados e poliinsaturados, e maior concentração de ácidos graxos monoinsaturados em tecidos neoplásico. Segundo os autores, o aumento de ácidos graxos monoinsaturados pode ser um mecanismo compensatório devido a depleção de ácidos graxos poliinsaturados. Acredita-se ainda que os ácidos graxos saturados representem grande parte do substrato para síntese de ácidos graxos monoinsaturados⁷⁶.

Rakheja *et al.*, em análise de tecido de mucosa intestinal tumoral e normal de mesmo paciente, verificaram maior concentração de ácido esteárico e maior razão ácido graxo saturado:insaturado no tumor⁷⁷. Segundo os autores, o aumento de ácidos graxos saturados na membrana pode colaborar para a sobrevivência da célula tumoral, propiciando proliferação celular, protegendo contra apoptose e contra sistema imunológico.

Szachowicz-Petelska *et al.*, em análise do perfil de ácidos graxos de membrana de tecido neoplásico e sadio de mesmo paciente, observaram menor concentração

dos ácidos linoléico e α -linolênico e maior concentração dos ácidos araquidônico e oléico em membrana de células neoplásicas comparadas às normais. O aumento do ácido araquidônico e redução do ácido linoléico sugere que este possa ter sido convertido a ácido araquidônico. A partir do ácido linoléico e do ácido α -linolênico são formados eicosanóides, que podem tanto participar na regulação do sistema imunológico e nos processos inflamatórios, como também sustentar o crescimento tumoral⁷⁸.

Embora não tenham sido detectados no presente estudo, cabe ressaltar que os ácidos graxos ω -6 e ω -3 têm sido o foco de estudos que visam avaliar a associação entre a composição de ácidos graxos da dieta e o risco de desenvolvimento de câncer. Apesar de os resultados de tais estudos serem inconclusivos¹⁴, trabalhos verificam importante influência dos ácidos graxos da dieta sobre o crescimento do tumor já instalado⁷⁹ e sobre a ocorrência de metástase⁸⁰.

6.2 Aminoácidos

Diferente dos trabalhos que estudam o perfil de ácidos graxos, cujas análises são realizadas diretamente a partir dos tecidos tumorais e sadios, aqueles que avaliam concentrações de aminoácidos analisam o perfil plasmático em pacientes com câncer e grupo saudável ou o fluxo de aminoácidos em tecido doente e sadio, ou seja, verificam a retenção e a liberação de aminoácidos em cada região avaliada.

O perfil plasmático de aminoácidos em pacientes com câncer varia conforme o grau de perda de peso, estadiamento e local da doença⁸¹⁻⁸⁴, o que contribui para os

resultados controversos de trabalhos que avaliam o perfil de aminoácidos nesses pacientes. Kubota *et al.* observaram maior concentração plasmática de aminoácidos de cadeia ramificada, essenciais, aromáticos e glicogênicos em pacientes com câncer de mama sem perda de peso importante, comparada ao grupo controle. Já em pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço desnutridos, não foi observada diferença na concentração desses aminoácidos em relação ao grupo controle⁸⁴. Esses resultados vão de encontro aos de Norton *et al.*, que analisaram o perfil plasmático de aminoácidos em pacientes com câncer com diferentes graus de perda de peso e verificaram maior alteração de concentração plasmática de aminoácidos no grupo com maior grau de perda de peso⁸². Clarke *et al.* não observaram diferença no perfil plasmático de aminoácidos em pacientes com diferentes tipos de câncer com e sem perda de peso, tampouco entre esses pacientes e grupo controle (saudável e eutrófico)⁸³.

A interpretação de qualquer alteração de concentração plasmática de aminoácidos em pacientes com câncer comparada a um grupo controle fica comprometida por dois motivos: 1) comumente pacientes com câncer, especialmente de cabeça e pescoço, apresentam ingestão alimentar reduzida; 2) o perfil plasmático de aminoácidos (especialmente os essenciais) é extremamente sensível à dieta, raramente avaliada nos trabalhos. Cabe lembrar ainda que alterações de aminoácidos circulantes nesses pacientes são uma resposta do organismo à presença do tumor, mas não indicam metabolismo de aminoácidos no tumor.

A análise de tecido doente e sadio de um mesmo paciente permite avaliar o metabolismo do tumor eliminando interferências da alimentação. Hagmüller *et al.*, que estudaram o fluxo de aminoácidos em tumor e tecido normal, ressaltam que esse

tipo de análise deve ser de caráter qualitativo e não quantitativo, visto que os valores encontrados indicam uma medida instantânea de uma série de reações dentro do metabolismo dos aminoácidos⁸⁵. O presente trabalho verificou, em amostras de tecido de mesmo paciente, maior concentração de aminoácidos no tumor em relação à margem, o que provavelmente deve-se ao aumento da biossíntese nessas células para suprir demanda aumentada por compostos celulares estruturais para confecção de novas células⁴². Além disso, visto as condições anaeróbicas da célula neoplásica, a oxidação tanto de aminoácidos como de ácidos graxos na célula neoplásica é quase nula⁴¹.

As concentrações dos aminoácidos alanina, metionina e lisina não foram diferentes em tumor e margem. Wang *et al.* avaliaram o fluxo de aminoácidos em tecido tumoral e normal de mucosa intestinal e verificaram que, com exceção da metionina, a retenção de aminoácidos foi maior no tumor⁸⁶. Diversos trabalhos comprovam que a metionina é essencial para proliferação de células tumorais. Trabalhos *in vitro* mostram que a proliferação de células tumorais diminui na ausência de metionina ou quando a metionina é substituída pela homocisteína, seu precursor imediato^{51, 87}. Yoshida *et al.* verificaram em ratos que a administração de nutrição parenteral isenta de metionina reduzem o volume do tumor, comparado à dieta parenteral padrão. Observaram ainda que a ausência de metionina na dieta não afetou a síntese de proteína, sugerindo que metionina endógena supre tais necessidades no tumor⁸⁸.

Hagmüller *et al.* observaram diferenças no fluxo de aminoácidos em tumor e margem, com maior retenção dos aminoácidos glutamina, valina, leucina, isoleucina e serina e maior liberação da alanina e glutamato pelo tumor, comparado à sua

margem. Verificaram ainda maior retenção de aminoácidos essenciais, não essenciais e de cadeia ramificada em tecido neoplásico com proliferação acelerada (designados prognóstico desfavorável pelos autores), comparado a tumores menos agressivos (designados prognóstico favorável). Além disso, foi observado que o tumor retém proteína, enquanto a região adjacente sofre perda protéica⁸⁵. Diferente do presente e dos demais estudos, Wang *et al.* verificaram em carcinoma gástrico maior concentração de glutamina, metionina e de arginina e menor concentração de alanina e triptofano, comparado ao tecido normal⁸⁹.

Embora a arginina não tenha sido analisada e o triptofano não tenha sido detectado na grande maioria das amostras, cabe ressaltar a relevância desses aminoácidos quanto ao papel na imunidade anti-tumoral. Tanto o metabolismo da arginina como do triptofano estão aumentados no tumor, produzindo metabólitos através dos quais o tumor consegue driblar o sistema imunológico^{53-55, 57, 58}. A concentração dos aminoácidos asparagina, triptofano, glutamina, ornitina e histidina foi muito baixa na maioria das amostras e, portanto, não foram detectados na leitura do aparelho. O presente trabalho obteve sucesso em verificar diferenças na concentração de aminoácidos em tumor e margem utilizando metodologia relativamente simples quando comparada à análise de fluxo de aminoácidos. A extração de aminoácidos a partir do método de Folch (desenvolvido para extração de lipídeos) possibilita a determinação de ácidos graxos e de aminoácidos em fragmentos bastante reduzidos de tecido, como, por exemplo, material obtido a partir de biópsia.

6.3 Estado nutricional

Baseado no índice de massa corporal, o estado nutricional variou de eutrofia a sobrepeso. O percentual de gordura estimado pelas pregas cutâneas foi menor em relação ao estimado por impedância bioelétrica no grupo avaliado. Equações baseadas em densidade corporal podem subestimar valores de percentual de gordura em idosos devido a alterações da densidade da massa magra que ocorre em idades avançadas. A distribuição de gordura em idosos também pode ser um fator limitante ao uso de pregas cutâneas nesses pacientes ⁹⁰.

Outra medida obtida a partir do exame de impedância bioelétrica é o ângulo de fase. Assim como os demais indicadores obtidos a partir da impedância bioelétrica, valores de ângulo de fase variam conforme etnia, sexo, idade e condição de saúde do indivíduo. Homens apresentam maior ângulo de fase em relação às mulheres e esses valores diminuem com aumento da idade⁹¹. O ângulo de fase também se relaciona com massa muscular e tempo de sobrevida em pacientes hospitalizados⁹².

Pacientes com câncer de pâncreas com ângulo de fase menor que 5° apresentam sobrevida média de cerca de 6 meses, enquanto aqueles com ângulo de fase maior que 5° apresentam sobrevida média de 10 meses⁹³. Em pacientes com câncer colorretal, a média de sobrevida é de 8,6 meses para aqueles com valores de ângulo de fase menor que 5,6° e de 40,4 meses para aqueles com ângulo de fase maior que 5,6°⁹⁴. Pacientes com câncer de pulmão com ângulo de fase menor que 4,5° apresentam sobrevida média de aproximadamente 4 meses, enquanto aqueles com ângulo e fase maior que 4,5° apresentam sobrevida média de 12 meses⁹⁵. No

presente trabalho 76% do grupo avaliado apresentou ângulo de fase superior 5° e 85% apresentou ângulo de fase superior a 4,5°. Baseado nos resultados de outros trabalhos, pode-se afirmar que a maior parte do grupo avaliado apresenta bom prognóstico.

Quanto a ingestão alimentar, embora a disfagia seja comum em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, a maior parte da amostra não mostrou inadequação na ingestão alimentar.

7 CONCLUSÃO

Não foram observadas diferenças na concentração de ácidos graxos e de lipídeos totais em tecido tumoral e normal.

Quanto às análises de aminoácidos, salvo para a alanina, a metionina e a lisina, foi verificado maior concentração dos aminoácidos glicina, valina, leucina, isoleucina, treonina, serina, prolina, ácido aspártico, ácido glutâmico, fenilalanina e tirosina no tumor, comparado à margem. A proposta de extração e de análise de aminoácidos livres em tecido a partir do método de Folch mostrou-se eficiente, possibilitando a extração concomitante de aminoácidos e de compostos orgânicos em fragmentos de tecido de tamanho reduzido.

O estado nutricional dos pacientes avaliados variou de eutrofia a sobrepeso, predominando excesso de gordura corporal, avaliado por impedância bioelétrica. A ingestão alimentar de macronutrientes mostrou-se adequada na maior parte dos pacientes avaliados.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- 1 WHO. Cancer. Fact sheet nº 297. 2008 [citado em set. 2008]; Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>
- 2 INCA. Estimativa 2008: Incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde 2007 [citado em set. 2008] Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>
- 3 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA: a cancer journal for clinicians 2005 Mar-Apr; 55(2): 74-108.
- 4 Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. Lancet 2008 May 17; 371(9625): 1695-1709.
- 5 Boing AF, Peres MA, Antunes JL. Mortality from oral and pharyngeal cancer in Brazil: trends and regional patterns, 1979-2002. Rev Panam Salud Publica 2006; 20(1): 1-8.
- 6 Dedivits RA FC, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. Rev Bras Otorrinolaringol 2004; 70(1): 35-40.
- 7 Bergamasco VD, Marta GN, Kowalski LP, Carvalho AL. Perfil epidemiológico do câncer de cabeça e pescoço no estado de São Paulo. Rev Bras Cir Cabeça e Pescoço 2008; 37(1): 15-19.
- 8 Wiseman M. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Proc Nutr Soc 2008; 67(3): 253-256.
- 9 Glade MJ. Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. Nutrition 1999; 15(6): 523-526.
- 10 Chainani-Wu N. Diet and oral, pharyngeal, and esophageal cancer. Nutr Cancer 2002; 44(2): 104-126.
- 11 Roynette CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C. n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. Clin Nutr 2004; 23(2): 139-151.
- 12 Pizato N, Bonatto S, Yamazaki RK, Aikawa J, Nogata C, Mund RC, Nunes EA, Piconcelli M, Naliwaiko K, Curi R, Calder PC, Fernandes LC. Ratio of n6 to n-3 fatty

acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. *Nutr Cancer* 2005; 53(2): 194-201.

13 Koralek DO, Peters U, Andriole G, Reding D, Kirsh V, Subar A, Schatzkin A, Hayes R, Leitzmann MF. A prospective study of dietary alpha-linolenic acid and the risk of prostate cancer (United States). *Cancer Causes Control* 2006; 17(6): 783-791.

14 MacLean CH, Newberry SJ, Mojica WA, Khanna P, Issa AM, Suttorp MJ, Lim YW, Traina SB, Hilton L, Garland R, Morton SC. Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *JAMA* 2006; 295(4): 403-415.

15 Viola A, Bronte V. Metabolic mechanisms of cancer-induced inhibition of immune responses. *Semin Cancer Biol* 2007; 17(4): 309-316.

16 Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. 2005 [citado em set. 2008]; Disponível em: <http://www.nap.edu/catalog/10490.html>

17 Das UN. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol J* 2006; 1(4): 420-439.

18 Budowski P. Omega 3-fatty acids in health and disease. *World Rev Nutr Diet* 1988; 57: 214-274.

19 FAO/WHO. Fats and oils in human nutrition. Rome: FAO/WHO, 1993.

20 Kobayashi N, Barnard RJ, Henning SM, Elashoff D, Reddy ST, Cohen P, Leung P, Hong-Gonzalez J, Freedland SJ, Said J, Gui D, Seeram NP, Popoviciu LM, Bagga D, Heber D, Glaspy JA, Aronson WJ. Effect of altering dietary omega-6/omega-3 fatty acid ratios on prostate cancer membrane composition, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2. *Clin Cancer Res* 2006; 12(15): 4662-4670.

21 Barber MD, McMillan DC, Preston T, Ross JA, Fearon KC. Metabolic response to feeding in weight-losing pancreatic cancer patients and its modulation by a fish-oil-enriched nutritional supplement. *Clin Sci (Lond)* 2000; 98(4): 389-399.

22 Barber MD, Fearon KC, Tisdale MJ, McMillan DC, Ross JA. Effect of a fish oil-enriched nutritional supplement on metabolic mediators in patients with pancreatic cancer cachexia. *Nutr Cancer* 2001; 40(2): 118-124.

23 Sauer LA, Dauchy RT, Blask DE. Mechanism for the antitumor and anticachectic effects of n-3 fatty acids. *Cancer Res* 2000; 60(18): 5289-5295.

24 Bozzetti F. Screening the nutritional status in oncology: a preliminary report on 1,000 outpatients. *Support Care Cancer* 2008.

- 25 Bosaeus I, Daneryd P, Svanberg E, Lundholm K. Dietary intake and resting energy expenditure in relation to weight loss in unselected cancer patients. *Int J Cancer* 2001; 93(3): 380-383.
- 26 Ryden M, Arner P. Fat loss in cachexia-is there a role for adipocyte lipolysis? *Clin Nutr* 2007; 26(1): 1-6.
- 27 Tisdale MJ. Pathogenesis of cancer cachexia. *J Support Oncol* 2003; 1(3): 159-168.
- 28 Drochioiu G. Chronic metabolic acidosis may be the cause of cachexia: body fluid pH correction may be an effective therapy. *Medical Hypotheses* 2008; 70(6): 1167-1173.
- 29 Nourissat A, Mille D, Delaroche G, Jacquin JP, Vergnon JM, Fournel P, Seffert P, Porcheron J, Michaud P, Merrouche Y, Chauvin F. Estimation of the risk for nutritional state degradation in patients with cancer: development of a screening tool based on results from a cross-sectional survey. *Ann Oncol* 2007; 18(11): 1882-1886.
- 30 van Bokhorst-de van der S, van Leeuwen PA, Kuik DJ, Klop WM, Sauerwein HP, Snow GB, Quak JJ. The impact of nutritional status on the prognoses of patients with advanced head and neck cancer. *Cancer* 1999; 86(3): 519-527.
- 31 Argiles JM, Busquets S, Felipe A, Lopez-Soriano FJ. Molecular mechanisms involved in muscle wasting in cancer and ageing: cachexia versus sarcopenia. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(5): 1084-1104.
- 32 Barber MD, Ross JA, Fearon KC. Cancer cachexia. *Surg Oncol* 1999; 8(3): 133-141.
- 33 Tisdale MJ. Molecular pathways leading to cancer cachexia. *Physiology* 2005; 20: 340-348.
- 34 Hammerlid E, Wirblad B, Sandin C, Mercke C, Edstrom S, Kaasa S, Sullivan M, Westin T. Malnutrition and food intake in relation to quality of life in head and neck cancer patients. *Head Neck* 1998 Sep; 20(6): 540-548.
- 35 Langer CJ, Hoffman JP, Ottery FD. Clinical significance of weight loss in cancer patients: rationale for the use of anabolic agents in the treatment of cancer-related cachexia. *Nutrition* 2001; 17(1 Suppl): S1-20.
- 36 Tisdale MJ. Cancer anorexia and cachexia. *Nutrition* 2001; 17(5): 438-442.
- 37 Fearon KCH. Nutritional support in cancer. *Clin Nutr* 2001; 20(Suppl): S187-190.

- 38 Fredrix EW, Soeters PB, Wouters EF, Deerenberg IM, von Meyenfeldt MF, Saris WH. Effect of different tumor types on resting energy expenditure. *Cancer Res* 1991 Nov 15; 51(22): 6138-6141.
- 39 Belizario JE, Katz M, Chenker E, Raw I. Bioactivity of skeletal muscle proteolysis-inducing factors in the plasma proteins from cancer patients with weight loss. *Br J Cancer* 1991; 63(5): 705-710.
- 40 Todorov PT, McDevitt TM, Cariuk P, Coles B, Deacon M, Tisdale MJ. Induction of muscle protein degradation and weight loss by a tumor product. *Cancer Res* 1996; 56(6): 1256-1261.
- 41 Bongaerts GP, van Halteren HK, Verhagen CA, Wagener DJ. Cancer cachexia demonstrates the energetic impact of gluconeogenesis in human metabolism. *Med Hypotheses* 2006; 67(5): 1213-1222.
- 42 Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current Opin Genet Dev* 2008; 18(1): 54-61.
- 43 Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123(3191): 309-314.
- 44 Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18(6): 598-608.
- 45 Bartrons R, Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr* 2007; 39(3): 223-229.
- 46 Chirala SS, Wakil SJ. Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids* 2004; 39(11): 1045-1053.
- 47 Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(10): 763-777.
- 48 Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* 2000; 16(3): 202-208.
- 49 Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 1979; 254(8): 2669-2676.
- 50 Eagle H, Oyama VI, Levy M, Horton CL, Fleischman R. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *J Biol Chem* 1956; 218(2): 607-616.
- 51 Guo HY, Herrera H, Groce A, Hoffman RM. Expression of the biochemical defect of methionine dependence in fresh patient tumors in primary histoculture. *Cancer Res* 1993; 53(11): 2479-2483.

- 52 Theuer RC. Effect of essential amino acid restriction on the growth of female C57BL mice and their implanted BW10232 adenocarcinomas. *J Nutr* 1971; 101(2): 223-232.
- 53 Chang CI, Liao JC, Kuo L. Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Res* 2001; 61(3): 1100-1106.
- 54 Mumenthaler SM, Yu H, Tze S, Cederbaum SD, Pegg AE, Seligson DB, Grody WW. Expression of arginase II in prostate cancer. *Int J Oncol* 2008; 32(2): 357-365.
- 55 Rotondo R, Mastracci L, Piazza T, Barisione G, Fabbi M, Cassanello M, Costa R, Morandi B, Astigiano S, Cesario A, Sormani MP, Ferlazzo G, Grossi F, Ratto GB, Ferrini S, Frumento G. Arginase 2 is expressed by human lung cancer, but it neither induces immune suppression, nor affects disease progression. *Int J Cancer* 2008; 123(5): 1108-1116.
- 56 Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(7): 521-534.
- 57 Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003; 9(10): 1269-1274.
- 58 Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 2005; 11(3): 312-319.
- 59 Nocito A, Dahm F, Jochum W, Jang JH, Georgiev P, Bader M, Graf R, Clavien PA. Serotonin regulates macrophage-mediated angiogenesis in a mouse model of colon cancer allografts. *Cancer Res* 2008; 68(13): 5152-5158.
- 60 Cangiano C, Laviano A, Meguid MM, Mulieri M, Conversano L, Preziosa I, Rossi-Fanelli F. Effects of administration of oral branched-chain amino acids on anorexia and caloric intake in cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(8): 550-552.
- 61 Tayek JA, Bistrian BR, Hehir DJ, Martin R, Moldawer LL, Blackburn GL. Improved protein kinetics and albumin synthesis by branched chain amino acid-enriched total parenteral nutrition in cancer cachexia. A prospective randomized crossover trial. *Cancer* 1986; 58(1): 147-157.
- 62 Sun LC, Shih YL, Lu CY, Hsieh JS, Chuang JF, Chen FM, Ma CJ, Wang JY. Randomized, controlled study of branched chain amino acid-enriched total

parenteral nutrition in malnourished patients with gastrointestinal cancer undergoing surgery. *Am Surg* 2008; 74(3): 237-242.

63 Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226(1): 497-509.

64 WHO. Global Database on Body Mass Index. 2006 [citado em set. 2008]; Disponível em: http://www.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html

65 Siri W. Body composition from fluid and density: analysis of methods. In: Brozek J, Henschel, A., ed. *Techniques for measuring Body Composition*. Washington, DC: National Academy of Sciences, 1961: 223-244.

66 Durnin JV, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr* 1974; 32(1): 77-97.

67 Lohman T. *Advances in body composition assessment*. Champaign, IL: Human Kinetics Publishers, 1992.

68 Frisancho A. *Anthropometric Standards for the Assessment of Growth and Nutritional Status*. Ann Arbor, MI: University of Michigan Press, 1990.

69 Barbosa-Silva MC, Barros AJ. Bioelectrical impedance analysis in clinical practice: a new perspective on its use beyond body composition equations. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005; 8(3): 311-317.

70 Ribeiro AC, MA. Desenvolvimento de um questionário de frequência alimentar como subsídio para programas de prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. *Rev Nutr* 2002; 15(2): 239-245.

71 Bagga D, Anders KH, Wang HJ, Glaspy JA. Long-chain n-3-to-n-6 polyunsaturated fatty acid ratios in breast adipose tissue from women with and without breast cancer. *Nutr Cancer* 2002; 42(2): 180-185.

72 Christensen JH, Fabrin K, Borup K, Barber N, Poulsen J. Prostate tissue and leukocyte levels of n-3 polyunsaturated fatty acids in men with benign prostate hyperplasia or prostate cancer. *BJU Int* 2006; 97(2): 270-273.

73 Zhao G, Nyman M, Jonsson JA. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomed Chromatogr* 2006; 20(8): 674-682.

- 74 Louw L, Engelbrecht AM, Cloete F. Comparison of the fatty acid compositions in intraepithelial and infiltrating lesions of the cervix: part I, total fatty acid profiles. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998; 59(4): 247-251.
- 75 Engelbrecht AM, Louw L, Cloete F. Comparison of the fatty acid compositions in intraepithelial and infiltrating lesions of the cervix: part II, free fatty acid profiles. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998; 59(4): 253-257.
- 76 Louw L, Engelbrecht AM, Cloete F. Comparison of the fatty acid compositions in intraepithelial and infiltrating lesions of the cervix: part III, saturated and unsaturated fatty acid profiles. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998; 59(4): 259-264.
- 77 Rakheja D, Kapur P, Hoang MP, Roy LC, Bennett MJ. Increased ratio of saturated to unsaturated C18 fatty acids in colonic adenocarcinoma: implications for cryotherapy and lipid raft function. *Med Hypotheses* 2005; 65(6): 1120-1123.
- 78 Szachowicz-Petelska B, Sulkowski S, Figaszewski ZA. Altered membrane free unsaturated fatty acid composition in human colorectal cancer tissue. *Mol Cell Biochem* 2007; 294(1-2): 237-242.
- 79 Calder PC, Davis J, Yaqoob P, Pala H, Thies F, Newsholme EA. Dietary fish oil suppresses human colon tumour growth in athymic mice. *Clin Sci (Lond)* 1998; 94(3): 303-311.
- 80 Suzuki I, Iigo M, Ishikawa C, Kuhara T, Asamoto M, Kunimoto T, Moore MA, Yazawa K, Araki E, Tsuda H. Inhibitory effects of oleic and docosahexaenoic acids on lung metastasis by colon-carcinoma-26 cells are associated with reduced matrix metalloproteinase-2 and -9 activities. *Int J Cancer* 1997; 73(4): 607-612.
- 81 de Blaauw I, Deutz NE, Boers W, von Meyenfeldt MF. Hepatic amino acid and protein metabolism in non-anorectic, moderately cachectic tumor-bearing rats. *J Hepatology* 1997; 26(2): 396-408.
- 82 Norton JA, Gorschboth CM, Wesley RA, Burt ME, Brennan MF. Fasting plasma amino acid levels in cancer patients. *Cancer* 1985; 56(5): 1181-1186.
- 83 Clarke EF, Lewis AM, Waterhouse C. Peripheral amino acid levels in patients with cancer. *Cancer* 1978; 42(6): 2909-2913.
- 84 Kubota A, Meguid MM, Hitch DC. Amino acid profiles correlate diagnostically with organ site in three kinds of malignant tumors. *Cancer* 1992; 69(9): 2343-2348.
- 85 Hagmuller E, Kollmar HB, Gunther HJ, Holm E, Trede M. Protein metabolism in human colon carcinomas: in vivo investigations using a modified tracer technique with L-[1-13C]leucine. *Cancer Res* 1995; 55(5): 1160-1167.

- 86 Wang LB, Shen JG, Zhang SZ, Ding KF, Zheng S. Amino acid uptake in arterio-venous serum of normal and cancerous colon tissues. *World J Gastroenterol* 2004; 10(9): 1297-1300.
- 87 Hoffman RM. Methionine dependence in cancer cells - a review. *In Vitro* 1982; 18(5): 421-428.
- 88 Yoshida S, Yamasaki K, Kaibara A, Takagi K, Noake T, Ishibashi N, Kakegawa T. Effect of methionine-deprived total parenteral nutrition on tumor protein turnover in rats. *Cancer* 1995; 76(7): 1275-1282.
- 89 Wang LL, B.Y. Li, Q.R. The study on interrelation between gastric cancer tissue free amino acid and tumor volume. *Parenteral and Enteral Nutrition* 2000; 7: 41-44.
- 90 Reilly JJ, Murray LA, Wilson J, Durnin JV. Prediction of body density from skinfold thickness in elderly subjects: are the existing equations valid? *Ann Hum Biol* 1994; 21(6): 613-616.
- 91 Barbosa-Silva MC, Barros AJ, Wang J, Heymsfield SB, Pierson RN, Jr. Bioelectrical impedance analysis: population reference values for phase angle by age and sex. *Am J Clin Nutr* 2005; 82(1): 49-52.
- 92 Selberg O, Selberg D. Norms and correlates of bioimpedance phase angle in healthy human subjects, hospitalized patients, and patients with liver cirrhosis. *Eur J Appl Physiol* 2002; 86(6): 509-516.
- 93 Gupta D, Lis CG, Dahlk SL, Vashi PG, Grutsch JF, Lammersfeld CA. Bioelectrical impedance phase angle as a prognostic indicator in advanced pancreatic cancer. *Br J Nutr* 2004; 92(6): 957-962.
- 94 Gupta D, Lammersfeld CA, Burrows JL, Dahlk SL, Vashi PG, Grutsch JF, Hoffman S, Lis CG. Bioelectrical impedance phase angle in clinical practice: implications for prognosis in advanced colorectal cancer. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(6): 1634-1638.
- 95 Toso S, Piccoli A, Gusella M, Menon D, Bononi A, Crepaldi G, Ferrazzi E. Altered tissue electric properties in lung cancer patients as detected by bioelectric impedance vector analysis. *Nutrition* 2000; 16(2): 120-124.

APÊNDICES

Apêndice A. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO – MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 09 de fevereiro de 2006

Ofício nº 284/2006
CEP/SPC

Prezada Senhora:

O trabalho intitulado **“COMPARAÇÃO DO TEOR DE MACRONUTRIENTES EM TECIDO NEOPLÁSICO E SADIO DE MESMO PACIENTE”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 218ª Reunião Ordinária realizada em 06/02/2006, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 15484/2005.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
IZABEL DE ARRUDA LEME
PROF. DR. JÚLIO SÉRGIO MARCHINI (Orientador)
Depto. de Clínica Médica – Divisão de Nutrologia
Em mãos

Apêndice B. Instrumentos para avaliação de composição corporal

Equações de Durnin & Womerley (1974) para cálculo de densidade corporal a partir das pregas cutâneas

40-49 anos	Mulheres	$DC = 1,1333 - 0,0612 \cdot \left(\log \sum 4PC \right)$
	Homens	$DC = 1,1620 - 0,0700 \cdot \left(\log \sum 4PC \right)$
≥50 anos	Mulheres	$DC = 1,1339 - 0,0645 \cdot \left(\log \sum 4PC \right)$
	Homens	$DC = 1,1715 - 0,0779 \cdot \left(\log \sum 4PC \right)$

DC: densidade corporal; $\sum 4PC$: somatório das 4 pregas cutâneas

Fórmula de Siri (1961) para estimativa de gordura corporal

$$\%GC = \frac{495}{DC} - 450$$

onde

%GC: porcentagem de gordura corporal

DC: densidade corporal

Equação de Lohman (1992) para estimativa de massa magra e gordura corporal

$$\square MLG = 6,34 + 0,474 \cdot \left(\frac{h^2}{R} \right) + 0,180 \cdot P$$

$$\square MLG = -11,41 + 0,6 \cdot \left(\frac{h^2}{R} \right) + 0,186 \cdot P + 0,226 \cdot Xc$$

$$\%GC = 100 - \left(\frac{MLG \cdot 100}{P} \right)$$

onde

MLG: massa livre de gordura (Kg)

h: estatura (cm)

R: resistência (ohm)

P: peso atual (Kg)

Xc: reactância (ohm)

Apêndice B. Instrumentos para avaliação de composição corporal (continuação)

$$AF = \text{arcotangente} \left(\frac{Xc}{R} \right) \cdot \frac{180}{\pi}$$

onde:

AF: ângulo de fase (graus)

Xc: reactância (ohm)

R: resistência (ohm)

Classificação de índice de massa corporal para adultos

Classificação	Pontos de corte
Baixo peso	< 18,5 Kg/m ²
Eutrofia	> 18,5 e < 24,9 Kg/m ²
Sobrepeso	> 24,9 Kg/m ²

Adaptado de WHO

Faixas de adequação de porcentagem de gordura corporal
conforme percentis (5-95), distribuídos por sexo e faixa etária

Faixa de normalidade de gordura corporal (%)		
Faixa etária	Mulheres	Homens
30-34,9	21-42	16-30
35-39,9	22-42	15-29
40-44,9	25-43	14-36
45-49,9	26-44	15-36
50-54,9	27-48	15-37
55-59,9	27-49	15-37
60-64,9	28-48	16-37
65-69,9	27-47	13-37
70-74,9	26-47	13-36

Adaptado de Frisancho (1990)

Apêndice C. Modelo de questionário de frequência alimentar

QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

LEITE E DERIVADOS	Quantas vezes você come	Unidade			P25	P75	Codif.
		1	2	3	P(1)	M(2) G(2)	
Leite integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	100ml	-----250ml	
Leite magro	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	100ml	-----250ml	
logurte natural	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	150ml	-----250ml	
logurte com frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	150ml	-----250ml	
Queijo fresco ou ricota	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	20g	----- 50g	
Queijos amarelos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	15g	----- 30g	
Pão branco, forma	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	25g	----- 75g	
Pão integral, centeio	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	25g	----- 75g	
Pão doce, queijo, croissant	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	25g	----- 50g	
Biscoitos doces/salgados/torradas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	14g	----- 40g	
Requeijão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	10g	-----40g	
Margarina light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	2,5g	----- 6g	
Margarina comum	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	2,5g	----- 6g	
Manteiga	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	3g	----- 7g	
Mel, geléia	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	9g	----- 18g	
Arroz branco	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	60g	-----145g	
Aveia, granola, e cereais	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	15g	----- 50g	
Batata, mandioca, polenta fritas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	25g	----- 100g	
Batata, mandioca, polenta não fritas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	50g	----- 140g	
Batata doce	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	50g	----- 120g	
Massas, macarrão, lasanha, nhoque	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	45g	----- 200g	
Salgados, tortas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	40g	----- 150g	
Pizza	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	50g	----- 300g	
Farofa, farinhas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	15g	----- 30g	
Laranja, mixirica, pokan	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	125g	----- 360g	
Banana	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	50g	----- 120g	
Maçã, pêra	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	60g	----- 130g	
Mamão, papaya	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	100g	----- 170g	
Melancia, melão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	55g	----- 150g	
Uva, abacaxi, goiaba na época	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	40g	----- 150g	
Abacate na época	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	80g	----- 215g	
Manga, caqui na época	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	45g	----- 180g	
Outras frutas (pêssego, jabuticaba, amora)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	30g	----- 75g	
Suco de laranja natural	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	165ml	----- 250ml	
Suco de outras frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	200ml	----- 600ml	
Feijão roxo, carioca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	55g	----- 140g	
Ervilha, lentilha, outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D	S	M	20g	----- 60g	

Feijoada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	150g ----- 300g	
Alface, couve, agrião	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g ----- 40g	
Repolho, acelga	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g ----- 75g	
Couve-flor, brócolis	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25g ----- 80g	
Cenoura, abóbora	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	12g ----- 48g	
Tomate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g ----- 80g	
Outros (berinjela)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g ----- 80g	
Beterraba	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25g ----- 80g	
Vagem, chuchu, abobrinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g ----- 65g	
Maionese, salada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	7g ----- 30g	
Sopas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	290g ----- 780g	
Carne bovina	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	75g ----- 120g	
Carne de porco	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	77,5g ----- 255g	
Bacon, toucinho, torresmo, pururuca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	8g ----- 24g	
Carne de frango ou outras aves	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	65g ----- 135g	
Peixes	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100g ----- 230g	
Miúdos (dobradinha, fígado, coração)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	65g ----- 130g	
Camarão, frutos do mar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 150g	
Lingüiça, salsicha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	40g ----- 120g	
Presunto, mortadela	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	15g ----- 30g	
Ovo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25g ----- 100g	
Café amargo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50ml ----- 100ml	
Café com açúcar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50ml ----- 100ml	
Café com adoçante	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50ml ----- 100ml	
Chá preto ou mate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	150ml ----- 300ml	
Chá de ervas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	150ml ----- 300ml	
Água	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	120ml ----- 360ml	
Cerveja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	300ml ----- 600ml	
Pinga, destilados	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	45ml ----- 90ml	
Vinho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	60ml ----- 200ml	
Sucos artificiais	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	200ml ----- 600ml	
Refrigerante diet/light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	200ml ----- 350ml	
Refrigerante normal	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	200ml ----- 350ml	
Bolo, tortas pavês	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 150g	
Chocolate, brigadeiro	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	15g ----- 50g	
Sorvete, milk-shake	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	70g ----- 160g	
Pudim, doces com leite	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 150g	
Doces de frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g ----- 50g	
Castanhas, oleaginosas, amendoins	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25g ----- 100g	
Pipoca, chips, outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 150g	
Maionese, molhos para salada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	5g ----- 20g	

Na maioria das vezes você costuma realizar

(021) Almoço e jantar (011) Almoço e lanche/Lanche e jantar

Há algum alimento que você costuma consumir e não foi mencionado neste questionário?

Alimento	Freqüência	Qtde consumida	Código do alimento	Codificação

Quantas refeições você faz por dia? _____

Que tipo de óleo/gordura você costuma utilizar para cozinhar ou preparar as refeições?

(00) não usa (01) margarina (02) manteiga (03) azeite de oliva
(04) óleo de soja, milho, outros (05) bacon (06) banha (99) não sabe

Quando você come carne bovina/porco, você costuma comer a gordura?

(1) nunca/raramente (2) algumas vezes (3) sempre

Quando você come carne de frango, você costuma comer a pele?

(1) nunca/raramente (2) algumas vezes (3) sempre

Você costuma acrescentar sal na comida depois de pronta?

(1) nunca/raramente (2) algumas vezes (3) sempre

Quando você come:

iogurte/sorvete são light/diet?

(1)sempre (2)algumas vezes (3)raramente ou não come (9)não sabe

maionese/molhos para salada são light/diet?

(1)sempre (2)algumas vezes (3)raramente ou não come (9)não sabe

queijo/requeijão são light/diet?

(1)sempre (2)algumas vezes (3)raramente ou não come (9)não sabe

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisa: Comparação do teor de macronutrientes em tecido neoplásico e sadio de mesmo paciente

O câncer é uma doença que há muito tempo tem sido bastante estudada a fim de encontrar formas de prevenção, tratamento e cura. Até hoje, as informações sobre esta doença ainda não são suficientes para esclarecer todas as dúvidas sobre o câncer. Por isso são realizadas pesquisas em busca de novas informações.

Sendo assim, esta pesquisa tem como objetivo comparar tecido doente e sadio, em pacientes com diagnóstico firmado e com encaminhamento para cirurgia. Será utilizado o tecido extraído durante a cirurgia, sendo que o procedimento cirúrgico será realizado de forma habitual, ou seja, a pesquisa não interferirá no processo. Este procedimento não oferece riscos à saúde ou à moral do paciente, que poderá concordar ou não em participar da pesquisa, sem sofrer qualquer prejuízo.

Os resultados obtidos na pesquisa poderão ser publicados em periódicos especializados, sendo mantidos em sigilo identidade dos pacientes e os procedimentos durante a cirurgia.

Dúvidas poderão ser esclarecidas com a responsável pela pesquisa, Izabel Arruda Leme, que se coloca à disposição pelo telefone (16) 3602-3187 ou (16) 8137-1315 ou por e-mail: iza_arruda@email.com.

Izabel de Arruda Leme

Tendo sido devidamente informado(a) sobre o objetivo da pesquisa “Comparação do teor de macronutrientes em tecido neoplásico e sadio de mesmo paciente”, eu, _____, estou de acordo com os procedimentos a serem realizados.

Assinatura do paciente ou familiar responsável

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 200 .

Anexo B. Dados clínicos individuais

Dados clínicos individuais			
Paciente	Local da neoplasia	Estadiamento	
9	laringe	MD	pT4 pN0 pMx
15	laringe	BD	pT1 pN1 pMx
18	boca	BD	pT4 pN0 pMx
19	laringe	IND	IND
22	laringe	MD	pT2 pN2c pMx
23	laringe	MD	pT4a pN2c pMx
24	boca	IND	IND
25	boca	BD	pT4a pN1 pMx
26	laringe	PD	pT4a pN0 pMx
29	laringe	MD	IND
36	laringe	BD	pT3 pN0 pMx
38	laringe	MD	IND
39	boca	MD	IND
40	língua	MD	IND
43	laringe	MD	IND
44	língua	PD	pT4b pN3 pMx
45	laringe	PD	pT1 pN2b pMx
47	língua	MD	IND
48	língua	MD	pT4 pN1 pMx
49	laringe	MD	pT3 pN2 pMx
50	laringe	IND	pT4a pN3 pMx
51	laringe	PD	pT2 pN2b pMx
52	língua	PD	IND

MD: moderadamente diferenciado; BD: bem diferenciado; PD: pouco diferenciado; IND: informação não disponível