

Efeito modulador do ômega-3 contra a genotoxicidade da doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Luís Carlos Guimarães

Acadêmico do Curso de Graduação em Ciências Biológicas (UNIPAM)

Júlio César Nepomuceno

Professor Titular do Centro Universitário de Patos de Minas.

Professor Adjunto do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Resumo

O Ômega-3 é um ácido graxo poliinsaturado, que não é sintetizado pelo organismo, encontrado principalmente em peixes de climas temperados e com importante papel na prevenção de doenças e de cânceres. Devido a suas atividades biológicas, tem sido amplamente utilizado na medicina popular. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos genotóxicos do Ômega-3, por meio do teste da mancha da asa da *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART). Larvas de terceiro estágio, provenientes dos cruzamentos padrão (ST), foram tratadas com diferentes concentrações de Ômega-3 (50 mg/mL; 100 mg/mL; 200 mg/mL). Água destilada estéril e doxorrubicina (DXR) (0,125 mg/mL) foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Os resultados observados sugerem que o Ômega-3, nessas condições experimentais, não é um agente genotóxico e exerce um efeito protetor quando associado ao quimioterápico doxorrubicina. No entanto, novos experimentos devem ser realizados para reforçar esses resultados.

Palavras chave: Ômega-3, *Drosophila melanogaster*, SMART, Efeito protetor, Doxorrubicina

Introdução

O Ômega-3 é um ácido graxo poliinsaturado encontrado nos produtos vegetais (óleos de soja e de noz), e nos animais (principalmente peixes e óleos de peixes), tendo por propriedade a redução do nível de colesterol no sangue. Os peixes que apresentam maior quantidade do ômega-3 são: cavala, arenque e salmão (GARÓFOLO; PETRILLI, 2006).

O ômega-3 é um óleo essencial porque não pode ser sintetizado pelo organismo, tanto no homem como nos outros animais, e, por esta razão, tem que ser ingerido na dieta. Ele tem uma função importante na prevenção de doenças e de cânceres (GARÓFOLO; PETRILLI, 2006).

Os ácidos graxos poliinsaturados abrangem a família do ácido graxo ômega-3. Os ácidos graxos de cadeia muito longa, como os ácidos araquidônico e docosahexanoico, desempenham

importantes funções no desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina. Esses grupos de ácidos graxos são sintetizados a partir dos ácidos linoleico e alfa-linolênico presentes na dieta (MARTIN et al., 2006).

De acordo com Fraser (2006), um grupo de pesquisadores do centro de Karolinska em Estocolmo examinaram os hábitos alimentares de quase 1.500 homens com câncer de próstata e de mais de 1.100 homens sem a doença. Nesse estudo verificou-se, em homens que ingeriam pelo menos um salmão por semana, a redução do risco de desenvolver câncer de próstata para 43%, quando comparado aos homens que não consumiam esses peixes. Os ácidos Ômega-3 não somente servem para reduzir o risco do câncer de próstata, também baixam dramaticamente os riscos do câncer de mama, da doença de coração e da depressão (ADAMS apud FRASER 2006).

O Ômega-3 pode causar a restauração da via apoptótica que geralmente está prejudicada nos tecidos neoplásicos, ativando fosfatases proteicas envolvidas na inativação do Bcl-2 (genes anti-apoptóticos) e na ativação da caspase-3, fatores que de forma independente promovem o aumento da apoptose. O Ômega-3 também induz a diferenciação de células do câncer e de células diferenciadas que não se multiplicam e seguem as vias normais de apoptose (NARAYANAN et al., 2001).

O estrógeno tem um papel promotor na carcinogênese da mama, entretanto, é importante recordar que também existem receptores de estrógeno na próstata e no colon, os quais podem promover a proliferação maligna desses órgãos. A prostaglandina E2 (PGE2), ativa a aromatase P450, o que aumenta a produção de estrógenos. A prostaglandina E3 (PGE3), não ativa a aromatase P450. Dessa forma, a diminuição da PGE2 e o aumento da PGE3 diminuem a produção de estrógenos e conseqüentemente diminui a proliferação celular (FOLEY, 2000).

Os ácidos graxos poliinsaturados aumentam a geração do radical superóxido (O_2^*) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células tumorais provocando a sua morte. Os radicais livres e os peróxidos lipídicos suprimem a expressão do Bcl-2, ativam as caspases e encurtam os telômeros e assim induzem apoptose das células malignas (BOUGNOUX et al., 1999).

Os ácidos graxos ômega-3 provocam aumento do potencial trans membrana, aumentando a excreção renal de sódio, diminuindo o cálcio intracelular e aumentando o potássio intracelular, interferindo desta forma no potencial de ação das células malignas. Todos esses fatores levam ao aumento do potencial de ação, isto é, à polarização da membrana celular e mitocondrial com o conseqüente aumento da produção de ATP. Sabe-se que o aumento do potencial de membrana acima de -15mv faz cessar a proliferação mitótica e que o aumento da produção de ATP via fosforilação oxidativa mitocondrial faz cessar a glicólise anaeróbia, motor da mitose (KNAPP, 1991).

O Ômega-3 atua na modulação da enzima glicose-6-fosfatodehidrogenase (G6PD), responsável pela produção de NADPH, potente agente redutor que aumenta a proliferação celular e uma das responsáveis pela produção de ribose, coluna dorsal do RNA e do DNA das células malignas (FELIPPE, 2006). O Ômega-3 ainda inibe a translação do mRNA, debilitando o cálcio iônico intracelular, levando à fosforilação da subunidade eIF2 com a subseqüente inibição da translação do mRNA, o que provoca a diminuição da proliferação celular e a apoptose das células neoplásicas

em vários tipos de câncer, podendo também o Ômega-3 aumentar a imunidade celular e a citotoxicidade das células natural killer (AKTAS; HALPERIN, 2004).

Para a efetivação deste trabalho, foi utilizado o teste SMART (Somatic Mutation and Recombination Test), teste para detecção de mutação e recombinação somática, que é utilizado para avaliar a genotoxicidade de misturas complexas com partículas aéreas, de extrato de plantas, e de bebidas como café, chás e vinhos. O teste SMART utiliza a *Drosophila melanogaster*, um organismo experimental eucariótico, com alta similaridade genética e bioquímica, quando comparado aos mamíferos, possibilitando detecção simultânea de mutações gênicas e cromossômicas e/ou recombinação somática, com ênfase sobre eventos relacionados com recombinação homóloga (RIBEIRO, 2003).

Devido a sua alta sensibilidade, o teste SMART é considerado como excelente modelo para estudo de genotoxicidade, podendo fornecer respostas relevantes para o homem, com um alto índice de acerto.

A suplementação alimentar com ômega 3 é uma questão polêmica e que diverge entre autores. Existem evidências epidemiológicas de que a suplementação alimentar com ômega-3 poderia diminuir a incidência de diversos tipos de câncer em certas populações, e, também, a oferta desse óleo essencial, associada às drogas antineoplásicas, poderia resultar em menores efeitos colaterais durante a quimioterapia. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos genotóxicos do ômega-3 nas doses 50, 100 e 200 mg/mL. O trabalho teve ainda o objetivo de avaliar os efeitos antigenotóxicos do ômega-3 contra a ação genotóxica da doxorubicina (0,125 mg/mL), geradora de radicais livres.

Material e métodos

Agentes Químicos

Ômega-3 é um ácido graxo poliinsaturado encontrado em produtos vegetais e animais, e adquirido comercialmente na Farmácia Homeopática e Manipulação Violeta, na cidade de Patos de Minas-MG, sob a forma de cápsulas contendo 1g do princípio ativo.

O cloridrato de doxorubicina (DXR) é conhecido comercialmente por Adriblastina RD, um pó liofilizado composto por metilparabeno, lactose além da doxorubicina, e é usado restritamente por hospitais e laboratórios com emprego específico em neoplasias malignas (GILMAN et al., 1996).

A DXR é ativa durante todo o ciclo celular, incluindo a intérfase, provocando efeitos antiproliferativos nos tecidos tumorais, mas também em outros tecidos sensíveis como a medula óssea, a mucosa gastrointestinal e oral, os folículos capilares e outros (ADRIBLASTINA RD: pó liofilizado. Responsável farmacêutica bioquímica Dr.^a F. Cutrupi. Milão: Pharmacia & Upjohn S.p.A, 2002. Bula de remédio).

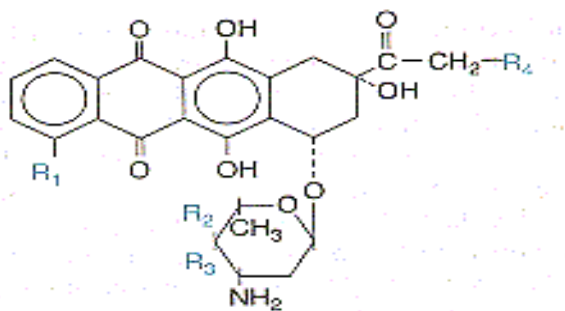


Figura 1. Fórmula estrutural da doxorubicina (Fonte: Katzung, 2001).

Sendo R1 - **OCH₃** R2 - **H**
 R3 - **OH** R4 - **OH**

Preparação do Extrato Oleoso de Ômega-3

O extrato oleoso de Ômega-3 foi diluído em Tween 80 a 1% nas concentrações de 50mg/ml, 100mg/ml e 200mg/ml. Todo o preparo foi aquecido e misturado, constantemente, por meio de um agitador magnético, para que se tornasse uma mistura homogênea.

Procedimento Experimental

Para a realização do presente estudo, foram utilizadas as linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* existentes no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas. Os estoques da mosca foram mantidos à temperatura de 25° C em frascos de 250 ml contendo um meio preparado com 820 ml de água, 11g de ágar, 156 g de banana, 1g de nipagim e 25g de fermento biológico (*Sacharomyces cerevisiae*), que depois de aquecido é distribuído de maneira uniforme pelos frascos.

Foram utilizadas três linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*, portadoras dos marcadores genéticos *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e *flare-3* (*flr³*, 3-38,8)

1. *multiple wing hairs* (*mwh*), com constituição genética y: *mwh jv*.
2. *Flare - 3* (*flr³*), com constituição genética *flr³/ In(3LR)TM₃, ri p^p sepI(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s*.
3. *ORR; flare - 3* (*ORR; flr³*) com constituição genética *ORR; flr³/ In(3LR)TM₃, ri p^p sepI(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s*.

Os cruzamentos entre as linhagens mutantes foram realizados, seguindo-se o seguinte protocolo:

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

Fêmeas virgens *flr³/ In(3LR)TM₃, ri p^p sepI(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s* cruzadas com machos *mwh/mwh*.

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

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

Desses cruzamentos foram obtidos dois tipos de descendentes: marcador trans-heterozigoto (MH: *mwh +/+ flr³*), e balanceador heterozigoto (BH: *mwh +/TM3, Bd^s*). As larvas, de ambos os genótipos, emergentes desses cruzamentos, são tratadas com diferentes concentrações do agente químico a ser testado.

Os ovos foram coletados por um período de 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (4% de ágar em água) e uma camada de fermento (*S. cerevisiae*) suplementado com açúcar. Após 72 +/- 4 horas, as larvas de 3.º estágio foram lavadas com água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina. Grupos de aproximadamente 100 larvas foram transferidas para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) contendo 1,5 g de meio de cultura instantânea (fórmula 4-24 Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC, USA) e 5,0 mL de solução oleosa de Ômega-3, nas concentrações de 50mg/mL, 100mg/mL e 200mg/mL, isoladamente, ou em associação com a DXR. Como controle negativo foi utilizado Tween 80 diluído a 1%, e como controle positivo, 5mL de doxorrubicina (0,125 mg/mL). Os tratamentos foram realizados na ausência de luz, para evitar a fotodegradação da DXR.

De ambos os cruzamentos foram obtidos dois tipos de descendentes: 1 marcador trans-heterozigoto (*mwh +/+ flr³*) – asas fenotipicamente do tipo selvagem – e balanceador heterozigoto (*mwh +/+ TM3 Bds*) – asas fenotipicamente do tipo serrilhada. As moscas adultas emergentes foram coletadas e fixadas em etanol 70%.

As asas das moscas foram retiradas, embebidas em solução de Faure (30g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 1,5g de hidrato de cloral e 50 mL de água destilada) e distendidas sobre uma lâmina seca.

Em seguida, as lâminas foram levadas para secar por 24 horas sobre placa aquecedora (40°C). No final, procede-se à montagem com lamínula, e deixa-se secar por mais de 48 h.

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

Ao final da análise, foram comparadas as frequências de mutações encontradas nas moscas tratadas com o extrato de ômega-3 com as encontradas nos controles negativo e positivo.

Análise estatística

A análise estatística utilizada para a verificação da possível ação genotóxica do ômega-3 foi realizada por meio do teste descrito por Frei e Würzler (1988). Para a análise estatística de antigenotoxicidade, as frequências de cada tipo de mancha por mosca foram comparadas aos pares [ex: controle negativo *versus* DXR, DXR (agente genotóxico) isoladamente *versus* ômega-3 + DXR], usando o teste *U* de Mann, Whitney e Wilcoxon (FREI; WÜRGLER, 1995).

Resultados e discussão

A Tabela 1 apresenta os resultados das frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH), do cruzamento Padrão (ST), tratados com Tween 80 1% (controle negativo), Doxorrubicina (DRX – 0,125 mg/mL), e diferentes diluições de Ômega-3 (50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL). A tabela também informa o tamanho de manchas por mosca, manchas simples pequenas, manchas simples grandes, manchas gêmeas e o número total de manchas.

Nos descendentes trans-heterozigotos, a tabela nos informa que não houve aumento estatisticamente significativo ($\forall = 0,05$) do ômega-3 (ω -3), nas três doses testadas, quando comparado com o controle negativo, em todas as classes de manchas (simples pequenas, simples grandes, gêmeas e o total de manchas).

Tabela 1. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes “MH” de *Drosophila melanogaster*, do Cruzamento Padrão (ST), tratados com diferentes diluições de Ômega-3 (ω -3).

Tratamentos	N. de In-div. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP	MSG	MG	TM	
		(1-2 céls) ^b m = 2	(>2 céls) ^b m = 5	m = 5	m = 2	
<i>mwh/flr³</i>						
Contr. Neg.	20	0,15 (03)	0,05 (01)	0,00 (00)	0,20 (04)	4
DRX 0,125 mg/mL	20	0,45 (09) i	1,90 (38) +	1,05 (21) +	3,40 (68) +	64
ω -3 50 mg/mL	20	0,25 (05) i	0,20 (04) i	0,05 (01) i	0,50 (10) i	8
ω -3 100 mg/mL	20	0,15 (03) i	0,00 (00) i	0,00 (00) i	0,15 (03) i	3
ω -3 200 mg/mL	20	0,20 (04) i	0,05 (01) i	0,00 (00) i	0,25 (05) i	5

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância

a = b = 0,05.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

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

Os dados da tabela 1, observados nos descendentes trans-heterozigotos, do cruzamento padrão, demonstram que o quimioterápico doxorrubicina (DRX) está exercendo seu efeito genotóxico, aumentando o número de manchas mutantes, quando comparado ao controle negativo. Esse aumento é estatisticamente significativo ($\forall = 0,05$) para quase todas as classes de manchas. A alta frequência de manchas, no cruzamento padrão, evidencia que a DRX é uma droga com ação genotóxica direta.

A tabela 2 apresenta os resultados das frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH), do cruzamento Padrão (ST), tratados Tween 80 1% (controle negativo), Doxorubicina (DRX – 0,125 mg/mL), e diferentes diluições de ω -3 (50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL) em associação com a DXR (0,125 mg/mL). A tabela informa também o tamanho de manchas por mosca, manchas simples pequenas, manchas simples grandes, manchas gêmeas e o número total de manchas.

Os resultados obtidos mostraram que ω -3, em todas as suas concentrações (50, 100 e 200 mg/mL), quando associadas com DXR (0,125 mg/mL), reduziram as frequências de manchas mutantes, induzidas pelo quimioterápico (DXR). Estas reduções foram, estatisticamente significativas, para as categorias de manchas simples grandes, manchas gêmeas, bem como para o total de manchas.

Tabela 2. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes “MH” de *Drosophila melanogaster*, do Cruzamento Padrão (ST), tratados com diferentes diluições de Ômega-3 (ω -3) associadas à Doxorubicina (0,125 mg/mL).

Tratamentos	N. de In-div. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP	MSG	MG	TM	
		(1-2 céls) ^b m = 2	(>2 céls) ^b m = 5	m = 5	m = 2	
<i>mwh/flr³</i>						
Controle água	20	0,15 (03)	0,0 (01)	0,0 (00)	0,2 (04)	
DXR 0,125 mg/mL + ω -3 50 mg/mL + DXR	20	0,45 (09)	1,90 (38)	1,05 (21)	3,40 (68)	64
ω -3 100 mg/mL + DXR	20	0,2 (04)	0,35 (07)	0,2 (04)	0,75 (15)	13
ω -3 200 mg/mL + DXR	20	0,15 (03)	0,4 (08)	0,3 (06)	0,8 (17)	17
	20	0,15 (03)	0,45 (09)	0,65 (13)	1,25 (25)	23

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância

a = b = 0,05.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

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

Os mecanismos pelos quais o ω -3 exerce sua ação protetora contra a DXR não foram analisados. Contudo, o ω -3 pode causar a restauração da via apoptótica que geralmente está prejudicada nos tecidos neoplásicos, ativando fosfatases proteicas envolvidas na inativação do Bcl-2 (genes anti-apoptóticos) e na ativação da caspase-3, fatores que de forma independente promovem o

Luís Carlos Guimarães e Júlio César Nepomuceno | Efeito modulador do Ômega-3 contra a genotoxicidade
aumento da apoptose (NARAYANAN; *et al.*, 2001). Portanto, o ω -3 é um agente conhecidamente indutor de apoptose.

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

Na mitose podemos descrever alguns mecanismos em que o Ômega-3 atua na sua redução – revertem a atividade da proteína quinase C (PKC) indutora da mitose; diminuem a atividade dos oncogenes Ras e AP-1 que frequentemente estão ativos nos tumores malignos humanos, estimulando a mitose; induzem a parada do ciclo celular e a apoptose, ativando fosfatases proteicas que promovem a defosforilação da proteína retinoblastoma; e promovem a fosforilação da subunidade IF2 com a subsequente inibição do início da translação, o que leva à inibição da proliferação celular maligna (AKTAS; HALPERIN, 2004).

Os ácidos graxos poliinsaturados não possuem ação como agente antioxidante e são especialmente suscetíveis à oxidação que resulta na ação de radicais livres de oxigênio, formados naturalmente e acumulados em células vivas ou mortas, sobre os lipídios altamente insaturados da membrana e do conteúdo celular (BURTON, 1994). Portanto, o mecanismo pelo qual o ω -3 reduz o número de manchas mutantes não foi devido à ação antioxidante, ou seja, pela redução do número de radicais livres gerados pela DXR.

Sendo assim, é possível que a redução nas frequências de manchas, verificada no tratamento associado do ω -3 com a DXR, tenha ocorrido devido à via de apoptose e à morte celular, na presença desse óleo essencial. Portanto, aquelas células mutantes, induzidas pela DXR, desencadearam a via de apoptose e, conseqüentemente, morreram durante a morfogênese das asas da mosca. Com a apoptose dessas células mutantes, ocorre inevitavelmente a redução de manchas, na presença de ω -3.

Finalmente, pode-se concluir, com base nos resultados e nas condições experimentais mencionadas no trabalho, que o ω -3 não é genotóxico, nas doses utilizadas neste trabalho e, também, exerce um efeito protetor quando associado ao quimioterápico DXR (0,125 mg/mL), usando-se como organismo-teste a *D. melanogaster*.

Referências

ADRIBLASTINA RD: pó liofilizado. Responsável farmacêutica bioquímica Dr^a F. Cutrupi. Milão: Pharmacia & Upjohn S.p.A, 2002. Bula de remédio.

ABRAHAM, Suresh K. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis*. Oxford, v. 9 n. 4, p. 383-386, 1994.

AKTAS, H.; HALPERIN, J. A. Translational Regulation of gene expression by omega-3 fatty acids. *J Nutr*; 134(9): 2487S-2491S, 2004.

BOUGNOUX, P.; CHAJÉS, V.; GERMAIN, E.; HUBERT, B.; LHUILLERY, C.; LE FLOCH, O.; BODY, G.; CALAIS, G. Cytotoxic drug efficacy correlates with adipose tissue docosahexaenoic acid level in locally advanced breast carcinoma. *Lipids*; 34: S109 (abs.), 1999.

BURTON, G.W. Vitamin E: molecular and biological function. *Proceedings of the Nutrition Society*, v.53, p. 53: 251-262, 1994.

FELIPPE, J.J.; G6PD e câncer. *Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar*. www.medicinacomplementar.com.br. Novembro de 2006.

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

FRAGIORGE, E. J. *Efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridato de doxorubicina em células somáticas de Drosophila melanogaster, tratadas na presença ou ausência de luz*. 2000. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2000.

FRASER, Jéssica. Fatty fish consumption slashes risk of prostate cancer by 43 percent. *NewsTarget*, 07 nov. 2006. Disponível em: < <http://www.newstarget.com/021002.html> >. Acesso em: 16 maio 2007.

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

GARÓFOLO, Adriana; PETRILLI, Antônio Sérgio. Balanço entre ácidos graxo ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caqueixa. *Revista de Nutrição*, Campinas, v.5, n.5, p. 611-621, set./ out. 2006.

GILMAN, Alfred G.; LIMBIRD, Lee E.; HARDMAN, Joel G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Graw Hill, 1996. p. 909-943.

GRAF, U.; et. al. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Pub Med*, 1984. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list%5Fuids=6423380&mode=AbstractPlus&portalrelocation=false&term=somatic%20mutation%20and%20recombination%20test>>. Acesso em: 14 maio 2007.

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

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

HARDMAN, W. E. Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy. *J Nutr*; 132(11 Suppl): 3508S-3512S, 2002.

KEIZER, H. G.; PINEDO, H. M.; SCHUURHUIS, G. J.; JOENJE, H. Doxorubicin (Adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacology and Therapeutics*, Oxford, v. 47, n. 02, p. 219 – 231, 1990.

KNAPP, H. R.; MILLER, A. J.; LAWSON, J. A. Urinary excretion of diols derived from eicosapentaenoic acid during n-3 fatty acid ingestion by man. *Prostaglandins*, 42:47-54, 1991.

MARTIN, Clayton Antunes; et. al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*. Campinas, v. 19, n. 6, nov./dec. 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732006000600011&script=sci_arttext. Acesso em: 14 maio 2007.

NARAYANAN, B. A.; NARAYANAN, N. K.; REDDY, B. S. Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. *Internat J. Oncol*; 19: 1255-1262, 2001.

RIBEIRO, Lucia Regina; et al. *Mutagênese Ambiental*. Rio Grande do Sul: Ulbra, 2003. p.356.

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

WÜRGLER, F. E.; SOBELS, F. H.; VOGEL, E. Drosophila as an assay system for detecting genetic changes. In: *Handbook of mutagenicity test procedure* (B. J., KILBEY et al., Eds.) 2nd ed. Elsevier, Amsterdam pp. 555-601, 1984.