



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA

LARA BURLAMAQUI VERAS

**INFLUÊNCIA DE DIETAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES LIPÍDICAS
COM ELEVADA RELAÇÃO ÔMEGA 9/ ÔMEGA 6 E BAIXA RELAÇÃO ÔMEGA 6/
ÔMEGA 3 SOBRE O FÍGADO DE RATOS NA VIGÊNCIA DA CARCINOGENESE
CÓLICA INDUZIDA POR AZOXIMETANO**

FORTALEZA

2015

LARA BURLAMAQUI VERAS

**INFLUÊNCIA DE DIETAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES LIPÍDICAS
COM ELEVADA RELAÇÃO ÔMEGA 9/ ÔMEGA 6 E BAIXA RELAÇÃO ÔMEGA 6/
ÔMEGA 3 SOBRE O FÍGADO DE RATOS NA VIGÊNCIA DA CARCINOGENESE
CÓLICA INDUZIDA POR AZOXIMETANO**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.
Área de concentração: Comportamento biocelular em neoplasias

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Coorientador: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

V584i

Veras, Lara Burlamaqui.

Influência de dietas com diferentes concentrações lipídicas com elevada relação ômega 9/ômega6 e baixa relação ômega 6/ ômega 3 sobre o fígado de ratos na vigência da carcinogênese cólica induzida por azoximetano / Lara Burlamaqui Veras. – 2015.

98 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Mestrado em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Comportamento Biocelular em Neoplasias.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

Coorientação: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues.

1. Fígado. 2. Azoximetano. 3. Carcinogênese. 4. Ratos. I. Título.

CDD 616.3607548

LARA BURLAMAQUI VERAS

**INFLUÊNCIA DE DIETAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES LIPÍDICAS
SOBRE O FÍGADO DE RATOS NA VIGÊNCIA DA CARCINOGENESE CÓLICA
INDUZIDA POR AZOXIMETANO**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós- Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Área de concentração: Comportamento biocelular em neoplasias

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Aprovada em: 29 /04/2015__

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Sérgio Pinheiros Regadas
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Charles Jean Gomes de Mesquita
Centro Universitário Christus - UNICHRISTUS

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará - UFC

"A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio".

Martin Luther King Jr.

A **DEUS**, que está sempre presente em minha vida, me iluminando e mostrando o caminho certo a ser seguido

Aos meus pais IDÁLIA e LUSMAR, pela formação moral, ética e profissional, cujo amor e carinho, nunca deixaram de existir na jornada de minha vida.

Aos meus irmãos LUIS ALBERTO, LIA E ROBSON MATHEUS, amigos e incentivadores, que sempre me apoiaram para a realização deste trabalho.

Às minhas avós, AGNESI e FRANCISCA e ao meu avô, **NEWTON**, pelas orações e torcidas que contribuem tanto para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu avô, JOSÉ VERAS e aos bisavós, EDSON, LUIS ALBERTO E MAGNÓLIA, *In memoriam*. Sei que se sentiriam orgulhosos e felizes ao meu lado neste momento.

Ao GERALDINHO e DORINHA, pelo incentivo, confiança e compreensão me dando forças para a realização de mais um sonho e compartilhando sempre de todas as minhas conquistas.

Aos meus sobrinhos, LUIS ALBERTO e RAUL, pela vibração e apoio nesta trajetória.

Aos meus amigos, que mesmo com a correria do dia-a-dia, encontram força e tempo para me apoiar.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **LUSMAR VERAS RODRIGUES**, Professor Titular em Cirurgia e Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade em participar como mestranda no programa, possibilitando a minha titulação e pelo constante estímulo, apoio, carinho e ensinamentos oportunos para minha vida pessoal e profissional.

Ao Professor Doutor, **PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS**, Professor Titular do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela demonstração de competência como orientador, pela seriedade e exigência para realização desta pesquisa.

À Doutora **IDÁLIA MARIA BRASIL BURLAMAQUI**, do Programa de Pós-graduação de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela dedicação, paciência, orientação, estímulo incansável, apoio incondicional, permanente disponibilidade e valiosos ensinamentos em todas as etapas deste trabalho, sem os quais, jamais teria sido concluído.

À Professora Doutora **CONCEIÇÃO APARECIDA DORNELAS**, Professora Adjunta do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela dedicação, orientação, disponibilidade, competência e valiosos ensinamentos em todas as etapas desse trabalho.

Ao Professor Doutor **FRANCISCO SÉRGIO PINHEIROS REGADAS**, Professor Titular do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina e Emérito da Universidade Federal do Ceará, pelos ensinamentos construtivos, ajuda e contribuição como membro da banca examinadora.

Ao Professor Doutor **CHARLES JEAN GOMES DE MESQUITA**, Professor Assistente do Centro Universitário Christus – UNICHRISTUS, pela contribuição científica e disponibilidade para compor a banca examinadora.

Ao Professor Doutor **SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃES**, Professor Associado do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela contribuição científica e ensinamentos pertinentes.

Ao Professor Doutor **RODRIGO DORNFELD ESCALANTE**, Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelos ensinamentos oportunos, ajuda e contribuição.

À Professora Doutora **NYLANE MARIA NUNES DE ALENCAR**, professora Associada do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela contribuição, disponibilidade e colaboração com as análises bioquímicas para a execução deste trabalho.

Ao Doutor **PAULO GOBERLÂNCIO DE BARROS SILVA**, pela contribuição na orientação e avaliação estatística dos dados obtidos no estudo.

À Professora e amiga, *In memoriam*, **MARINILA CALDERADO MUNGUBA MACEDO**, pelo exemplo de perseverança generosidade e fé, minha eterna admiração e gratidão.

Aos colegas médicos, **LARA ALBUQUERQUE DE BRITO, JOSÉ WILSON MEIRELES JÚNIOR, RAFAEL SUCUPIRA, FRANCISCO JOSÉ CABRAL MESQUITA** e **DANIEL MAGALHÃES COUTINHO MOTA**, dedicados colaboradores em todas as fases do experimento, com empenho e disciplina contribuindo para a elaboração do estudo.

Às Senhoras **MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA** e **MAGDA MARIA GOMES FONTENELE**, funcionárias do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, que com dedicação, amizade e ajuda permanente, incentivaram e tornaram menos áridos os caminhos trilhados na conclusão deste trabalho.

Ao Senhor **BENTO FRANCISCO DE OLIVEIRA**, técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio e dedicação no tratamento dos animais utilizados no experimento.

Aos **PROFESSORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO** *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela qualidade e empenho com que ministram as disciplinas, lapidando meus conhecimentos e contribuindo para a minha formação de pesquisadora.

A **TODOS** que auxiliaram de forma direta ou indireta, durante todas as etapas deste trabalho os meus sinceros agradecimentos com especial distinção.

À **Nutrimed Industrial LTDA**, pela contribuição em elaborar e fornecer todas as dietas empregadas nesta pesquisa.

RESUMO

Influência de dietas com diferentes concentrações lipídicas sobre o fígado de ratos na vigência da carcinogênese cólica induzida por azoximetano. **LARA BURLAMAQUI VERAS. Pós-graduação *Stricto Sensu*, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas). Abril, 2015. Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.**

Câncer colorretal e o hepático têm incidência crescente e são influenciados por fatores genéticos e ambientais, sendo um dos mais importantes a dieta. O azoximetano (AOM) é utilizado como iniciador da carcinogênese cólica em modelos experimentais. No fígado, o AOM causa alterações celulares semelhantes às observadas em modelos de agressão hepática crônica. Estudos sugerem que ácidos graxos ômega 3, 6 e 9 estão envolvidos na gênese e prevenção da carcinogênese. Objetivo foi verificar as repercussões hepáticas e sistêmicas em ratos alimentados com dietas hiperlipídica, normolipídica e hipolipídica com baixa relação ω -6/ ω -3 e alta ω -9/ ω -6 na vigência da carcinogênese cólica induzida por AOM. Foram usados 60 ratos Wistar, 3 semanas de idade, peso médio de 50g e distribuídos em 5 grupos de 12 animais: GI- Dieta Padrão sem AOM; GII- Dieta Padrão e AOM; GIII- Dieta Hiperlipídica e AOM; GIV- Dieta Normolipídica e AOM; GV- Dieta Hipolipídica e AOM. Avaliados peso e ingesta 4 vezes por semana até a 36^a. Os colos e fígados foram analisados quanto à presença de alterações macro e microscópicas. Determinaram-se colesterol total e frações, triglicerídeos, glicemia, ALT e AST, glutatona e TBARS. Ingestas de GI e GII foram maiores que em GIII, GIV e GV. GI e GII apresentaram aumento da massa corporal em relação aos GIII, GIV e GV. GV apresentou aumento da relação percentual entre o peso do fígado e o peso final do animal em relação aos demais grupos. Houve aumento na incidência dos tumores cólicos e lesões hepáticas pré-neoplásicas e neoplásicas benignas em GII e diminuição em GV. Concentração de glutatona foi maior e de TBARS menor em GV. Conclui-se que dietas hiperlipídica, normolipídica e hipolipídica com baixa relação ω -6/ ω -3 e alta ω -9/ ω -6 reduzem a ingesta e massa corporal dos animais, o aparecimento de tumores cólicos e lesões hepáticas pré-neoplásicas e neoplásicas, peroxidação lipídica e elevam a capacidade antioxidante. A utilização da dieta hipolipídica apresentou maior eficácia em relação às dietas normo e hiperlipídica.

Palavras Chaves: Fígado. Azoximetano. Carcinogênese. Ratos.

ABSTRACT

Influence of diets with different percentages of fat on the liver of rats in the presence of colonic carcinogenesis azoxymethane-induced. **LARA BURLAMAQUI VERAS. Post-Graduation *Stricto Sensu*, Department of Surgery, School of Medicine, Universidade Federal do Ceará (Degree of Master in Surgery Medical Sciences). April, 2015. Advisor: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.**

Colorectal and hepatic cancer have an increasing incidence and are influenced by genetic and environmental factors, one of the most important is diet. Azoxymethane (AOM) is used to induce colonic carcinogenesis in experimental models. In the liver, AOM cause cellular changes similar to those seen in chronic liver injury models. Fatty acids ω -3, ω -6 and ω -9 are believed to be involved in the pathogenesis and prevention of carcinogenesis. The objective was to evaluate the hepatic and systemic effects in rats fed hyperlipidic, normolipidic and hypolipidic diets with low ω -6: ω -3 ratio and high ω -9: ω -6 ratio in the presence of colonic carcinogenesis AOM-induced. Sixty 3-week-old male Wistar rats weighing 50g were assigned to 5 groups of 12 each: GI=Standard diet without AOM; GII=Standard diet and AOM; GIII=Hyperlipidic diet and AOM; GIV=Normolipidic diet and AOM; GV=Hypolipidic diet and AOM. Weight and ingestion were registered 4 times/week until the 36th week. Colons and livers were analyzed for macroscopic and microscopic changes. The levels of total and fractionated cholesterol, triglycerides, glycemia, ALT, AST, glutathione, TBARS were determined in plasma. Ingestion was greater in GI and GII than in GIII, GIV and GV. Body mass was greater in GI and GII than in GIII, GIV and GV. The ratio between liver's weight and animal's final weight was higher in GV than all the other groups. In GV, the incidence of colonic tumors and pre-neoplastic and benign neoplastic liver lesions were reduced. Glutathione was higher and TBARS was lower in GV. In conclusion, hyperlipidic, normolipidic and hypolipidic diets with low ω -6: ω -3 ratio and high ω -9: ω -6 ratio reduce ingestion, body mass, appearance of colonic tumors and pre-neoplastic and benign neoplastic liver lesions, lipid peroxidation and increase the antioxidant capacity. Hypolipidic diet

Key words: Liver. Azoxymethane. Carcinogenesis. Rats.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Delineamento do experimento.....	32
FIGURA 2 - Média de ingesta em cada grupo.....	36
FIGURA 3 - Média de massa corpórea (g) em cada grupo.....	37
FIGURA 4 - Média do peso do fígado (g) em cada grupo	37
FIGURA 5 – Relação % peso fígado/peso final do animal em cada grupo.....	38
FIGURA 6 – Carcinoma colorretal.....	40
FIGURA 7 – Lesões hepáticas.....	40
FIGURA 8 – Corte histológico de tumoração de colo distal.....	42
FIGURA 9 – Esteatose leve.....	44
FIGURA 10 – Esteatose moderada.....	44
FIGURA 11 – Esteatose grave.....	45
FIGURA 12 – Focos de células claras.....	45
FIGURA 13 – Focos de células anfofílicas.....	46
FIGURA 14 – Focos de células tigróides.....	46
FIGURA 15 – Focos de células acidófilas.....	47
FIGURA 16 – Focos de células vacuolares.....	48
FIGURA 17 – Focos de células intermediárias.....	48
FIGURA 18 – Focos de células basofílicas.....	48
FIGURA 19 – Focos de células oncocíticas.....	49
FIGURA 20 – Focos de células pequenas.....	49
FIGURA 21 – Número total de focos de células alteradas.....	50
FIGURA 22 – Espongiose.....	50
FIGURA 23 – Espongiose (HE).....	51
FIGURA 24 – Peliose.....	51
FIGURA 25 – Colangioma.....	52
FIGURA 26 – Colangioma cístico (HE).....	52
FIGURA 27 – Adenoma.....	53
FIGURA 28 – Atipias.....	53

FIGURA 29 – Número total de alterações microscópicas hepáticas.....	54
FIGURA 30 – Níveis de glutatona reduzida.....	55
FIGURA 31 – Níveis de TBARS.....	55
FIGURA 32 – Média de glicemia por grupo.....	56
FIGURA 33 - Média de colesterol total por grupo.....	56
FIGURA 34 - Média de colesterol LDL por grupo.....	57
FIGURA 35 - Média de colesterol HDL por grupo.....	57
FIGURA 36 - Média de triglicerídeos por grupo.....	58
FIGURA 37 - Média de ALT e AST por grupo.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Diarréia apresentada pelos animais em todos os grupos.....	39
TABELA 2 – Achados macroscópicos.....	40
TABELA 3 – Achados microscópicos do colo.....	41
TABELA 4 - Achados microscópicos do fígado.....	43
TABELA 5 – N° total focos de células alteradas e alterações microscópicas.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS/SÍMBOLOS

AA - Ácido araquidônico
AG - Ácidos graxos
AGE - Ácidos graxos essenciais
AL - Ácido linoléico
ALA - Ácido alfa-linolênico
ALT - Alanina aminotransferase
AO – Ácido oléico
AOM - Azoximetano
AST - Aspartato aminotransferase
ATP – Adenosina trifosfato
ATPase – Adenosina trifosfatase
CCR - Câncer colorretal
CEPA - Comitê de Ética de Pesquisas em Animais
CHC – Carcinoma hepatocelular
CHO - Carboidratos
DEN - dietilnitrosamina
DH - Dieta hiperlipídica
Dh - Dieta hipolipídica
DN - Dieta normolipídica
DNA - Ácido desoxirribonucléico
DHA - Ácido doicosahexaenóico
DMH - 1,2 dimetilhidrazina
DP - Dieta padrão
EHNA – Esteatose hepática não alcoólica
EPA - Ácido eicosapentaenoico
EPM – Erro padrão médio
EROs - Espécies reativas de oxigênio
FC – Focos de células
FHA – Focos de hepatócitos alterados
GAMA GT - Gama glutamil transferase
GST-P - glutathione S-transferase forma placentária

GI - Grupo com ratos alimentados com DP e não induzidos com AOM

GII - Grupo com ratos alimentados com DP e induzidos com AOM

GIII - Grupo com ratos alimentados com DH e induzidos com AOM

GIV - Grupo com ratos alimentados com DN e induzidos com AOM

GV - Grupo com ratos alimentados com Dh e induzidos com AOM

HDL - "High-density lipoprotein"

HE - Hematoxilina-Eosina

IFN- γ - Interferon gama

IL - Interleucina

INCA - Instituto nacional do câncer

IP - Intraperitoneal

RAS - Proteína reguladora de divisão celular

LDL - "Low-density lipoprotein"

LIP - Lipídio

MUFA - Ácidos graxos monoinsaturados

ω -3 - Ômega-3

ω -6 - Ômega-6

ω -9 - Ômega-9

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Proteína C Reativa

PTN - Proteína

PUFA - Ácidos graxos poliinsaturados

RI – Resistência à insulina

SS - Solução salina a 0,9%

SUS – Sistema Único de Saúde

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBARS - Substâncias reagentes do ácido tiobarbitúrico

TNF- α - Fator de necrose tumoral

UFC - Universidade Federal do Ceará

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Listas de abreviaturas / siglas / símbolos	
Resumo	
Abstract	
1 Introdução.....	20 2
2 Objetivo.....	29
3 Método.....	30
3.1 Amostra.....	30
3.2 Delineamento do experimento.....	31
3.2.1 Grupos controle.....	31
3.2.2 Grupos experimentos.....	31
3.3 Indução da carcinogênese cólica.....	32
3.4 Procedimento cirúrgico.....	33
3.5 Parâmetros avaliados.....	33
3.5.1 Avaliação clínica.....	33
3.5.1.1 Ingesta.....	33
3.5.1.2 Massa corpórea.....	33
3.5.1.3 Peso do fígado.....	33
3.5.1.4 Diarréia.....	34
3.5.2 Macroscopia.....	34
3.5.3 Microscopia.....	34
3.5.4 Análise laboratorial.....	34
3.5.4.1 Estresse oxidativo.....	34
3.5.4.2 Análise bioquímica.....	35
3.6 Análise estatística.....	35
4 Resultados.....	36
4.1 Ingesta.....	36
4.2 Massa corpórea.....	36
4.2.1 Peso do fígado.....	37
4.2.2 Relação % peso do fígado/peso final do animal.....	38
4.3 Diarréia.....	38
4.4 Macroscopia.....	39

4.5 Microscopia cólica.....	41
4.6 Microscopia hepática.....	42
4.6.1 Esteatose.....	44
4.6.2 Focos de células claras.....	45
4.6.3 Focos de células anfofílicas.....	45
4.6.4 Focos de células tigróides.....	46
4.6.5 Focos de células acidófilas.....	47
4.6.6 Focos de células vac., int., bas., onc. e peq.....	47
4.6.7 N° total de focos de células alteradas.....	49
4.6.8 Espongiose.....	50
4.6.9 Peliose.....	51
4.6.10 Colangioma.....	51
4.6.11 Adenoma.....	52
4.6.12 Atipias.....	53
4.6.13 N° total de alterações microscópicas.....	53
4.7 Estresse oxidativo.....	54
4.7.1 Glutaciona.....	54
4.7.2 TBARS.....	55
4.8 Avaliação bioquímica.....	55
4.8.1 Glicemia.....	55
4.8.2 Perfil lipídico.....	56
4.8.2.1 Colesterol total.....	56
4.8.2.2 Colesterol LDL.....	56
4.8.2.3 Colesterol HDL.....	57
4.8.2.4 Triglicerídeos.....	57
4.8.3 Enzimas hepáticas.....	58
5 Discussão.....	59
6 Conclusão.....	70
7 Referências.....	71

Apêndices

Anexos

1 INTRODUÇÃO

Câncer é um problema de saúde pública em todo o mundo. Sabe-se que sua origem está relacionada a condições multifatoriais, como poluentes ambientais, fatores genéticos, novos estilos de vida, o processo de “envelhecimento” da população, entre outras, as quais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o câncer (HE *et al.*, 2014; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014).

A maioria dos cânceres se desenvolve por etapas ao longo dos anos. Dessa forma, a eliminação ou diminuição da exposição aos fatores determinantes poderia evitar o aparecimento de alguns tipos de câncer. Se a doença for detectada em uma fase inicial, ou até mesmo antes de se tornar maligna, tem-se uma condição mais favorável para seu tratamento e maior possibilidade de cura (AHMEDIN *et al.*, 2011; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer em todo o mundo, em 2012. No Brasil, a estimativa para os anos de 2014 e 2015 aponta para a ocorrência de 576 mil casos novos, incluindo os de pele não melanoma. As estimativas para 2030 estão em torno de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, assim como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2014).

Nos países desenvolvidos, os tipos mais frequentes de câncer na população masculina são próstata, pulmão, colo e reto e, entre as mulheres, mama, colo e reto e pulmão. Nos países em desenvolvimento, os três cânceres mais frequentes em homens foram pulmão, estômago e fígado; e, em mulheres, mama, colo do útero e pulmão (INCA, 2014).

O câncer colorretal (CCR) apresenta incidência crescente com padrões bastante diferenciados entre as distintas regiões mundiais, o que sugere uma forte influência de fatores locais. Essa distinção pode ser observada de forma semelhante no Brasil, onde as regiões Sul e Sudeste apresentam elevada incidência dessa neoplasia em relação às regiões Norte e Nordeste, possivelmente em consequência de diferenças nos padrões dietéticos e no desenvolvimento socioeconômico (PINHO *et al.*, 2003).

O desenvolvimento do CCR é resultado da interação entre fatores endógenos e ambientais, sendo um dos mais notáveis a dieta. Os fatores protetores mais importantes são a atividade física e o consumo de alimentos que contêm fibra, ou seja, aqueles de origem vegetal. Por outro lado, são fatores de risco gorduras saturadas como a carne vermelha, carnes processadas (mortadelas, presuntos, salsichas, linguiças), bebidas alcoólicas, tabagismo, gordura corporal e abdominal. Outros fatores de risco são a história familiar de CCR, a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino e a idade, uma vez que tanto a incidência quanto a mortalidade aumentam com o passar dos anos (INCA, 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta o carcinoma hepatocelular (CHC) como a segunda causa de óbito por câncer na espécie humana, principalmente pela sua alta incidência no Oriente, em áreas do continente africano e do Pacífico oeste. No Brasil, sua incidência é baixa, sendo mais alta nos estados do Espírito Santo e Bahia. Segundo dados divulgados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em 2013, a incidência do câncer primário de fígado foi de 2,07/100.000 habitantes. A idade média dos doentes foi de 54,7 anos, existindo uma relação masculino/feminino de 3,4:1. Raramente ocorre antes dos 40 anos e atinge pico aproximadamente aos 70 anos (FERLAY *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2013).

A incidência do câncer hepático, apesar de ser mais comum em países em desenvolvimento, vem aumentando principalmente nos países desenvolvidos da América do Norte, Europa e Oceania (CENTER; JEMAL, 2011). Sua etiologia consiste de infecções virais, consumo excessivo de álcool, dietas ricas em gorduras, fatores ambientais e hemocromatose (FARAZI; DEPINHO, 2006; EL-SERAG; RUDOLPH, 2007). Recentemente, doenças metabólicas relacionadas à resistência à insulina (RI), reunidas em um grupo chamado esteatose hepática não alcoólica (EHNA) também foram relacionadas à etiologia do CHC (DELLA CORTE; COLOMBO, 2012). Apesar disso, o real entendimento e compreensão da patogênese do câncer hepático e dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento desse tumor permanecem incompletos (FAUSTO; CAMPBELL, 2010; VUCUR *et al.*, 2010).

O CHC constitui 70%-85% das neoplasias hepáticas primárias e é o tumor primário mais comum no fígado. O colangiocarcinoma, por sua vez, equivale a 10%-15%, e os restantes 5% são tumores incomuns como o angiossarcoma primário hepático, o hemangioendotelioma

epitelióide hepático, o hemangiopericitoma ou o linfoma hepático primário (AHMEDIN *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2013).

A carcinogênese é um processo dinâmico, envolvendo uma gama de alterações celulares, moleculares e morfológicas, sustentadas por modificações na expressão de oncogenes e genes supressores tumorais, que coordenam atividades essenciais da célula, como proliferação, diferenciação e apoptose (KERR; WINTERFORD; HARMON, 1994; WASHINGTON *et al.*, 2013).

Atualmente a doença neoplásica apresenta relevância inquestionável e, para entender com mais detalhes a fisiopatologia destas lesões, a utilização dos diversos modelos de carcinogênese se fez necessária.

O modelo de carcinogênese colorretal com carcinógeno específico, descrito por Bird (1987, 1995), utilizou roedores por apresentarem aspectos genéticos, morfológicos e histopatológicos similares aos seres humanos, favorecendo o estudo biológico da progressão natural desta doença e identificação de metas terapêuticas e desenvolvimento de novas estratégias de prevenção (WASHINGTON *et al.*, 2013).

De forma semelhante aos humanos, nos quais o câncer hepático se desenvolve como consequência a longo prazo de uma doença hepática crônica, a ocorrência espontânea de câncer de fígado no roedor é rara. Na maioria dos modelos de roedores, a carcinogênese hepática é induzida por intervenções específicas com o objetivo de tornar-se a mais semelhante possível com a dos humanos, isto é, induzir doença hepática crônica e/ou alterações genéticas no rato (CAVIGLIA; SCHWABE, 2015).

Os modelos de carcinogênese hepática variam em relação à latência do tumor e suas características, a depender se a neoplasia hepática será induzida por manipulação genética, doença hepática crônica ou transplante de células tumorais (CAVIGLIA; SCHWABE, 2015).

O azoximetano (AOM), metabólito ativo da 1,2-dimetilhidrazina (DMH), utilizado preferencialmente em modelos experimentais de câncer cólico, apresenta também repercussão sobre outros órgãos como fígado, intestino delgado e peritônio. (RONCUCCI *et al.*, 2000; BURLAMAQUI *et al.*, 2013; LAHOUAR *et al.*, 2014). É metabolicamente ativado no fígado por oxidação, gerando compostos reativos essenciais para a carcinogênese química (metilazoximetanol e íon metildiazóxido) sendo levado ao colo pela corrente sanguínea ou via

biliar como glucoronídeo conjugado. Após ativação, o DNA é metilado principalmente nas posições N^7 - e O^6 - da guanina (SAFFHILL; MARTGISON; O'CONNOR, 1985; CADERNI *et al.*, 2003).

No fígado, AOM induz proliferação de hepatócitos e apoptoses, hiperplasia de ductos biliares, expansão de células ovóides, depósitos de colágeno, fibrose e nodulações e altera a expressão de citocinas e fatores reguladores da matriz extracelular. Estas alterações são semelhantes às observadas em outros modelos de agressão hepática crônica (KHURANA *et al.*, 2010; KHURANA *et al.*, 2013).

Sabe-se que o AOM, no fígado, provoca alterações caracterizadas por proliferação de hepatócitos considerados ainda pré-neoplásicos, antes do surgimento do CHC, designado por focos e nódulos de hepatócitos alterados. Três linhagens hepatocíticas podem ser identificadas durante a evolução para tumores hepáticos em roedores: glicogenótica-basofílica, anofílica-basofílica e xenomórfica-tigróide-basofílica (BANNASCH; NEHRBASS; KOPP-SCHNEIDER, 2001; BANNASCH; HAERTEL; SU, 2003; NISHIHARA *et al.*, 2008).

Focos consistem em lesões hepáticas que ocupam menos de um lóbulo, enquanto área envolve porções de lóbulos adjacentes. Três tipos distintos principais dessas lesões podem ser encontrados no fígado de ratos expostos a carcinógeno: focos de células claras, acidófilas e basofílicas. Os demais focos (anofílicas, tigróides, vacuolares, intermediárias, oncocíticas e pequenas) consistem em uma combinação de duas ou três lesões descritas acima. Apresentam algumas características importantes como deficiência das enzimas adenosina trifosfatase (ATPase) e glicose-6-fosfatase, esta última sendo responsável pelo depósito anormal de glicogênio nessas células e a reativação da γ -glutamil transpeptidase, que normalmente não está presente nos hepatócitos de ratos adultos. Essas alterações celulares podem ocorrer como lesões únicas ou múltiplas, presentes simultaneamente no fígado e coexistir com nódulos neoplásicos e/ou CHC (STEWART *et al.*, 1980; SU; BANNASCH, 2003).

No rato, focos de células claras, acidófilas e basofílicas têm sido considerados estágios iniciais no desenvolvimento do CHC. Estudos mostram que focos e áreas são semelhantes aos elementos celulares do nódulo neoplásico quanto aos aspectos citológicos e podem, desta forma, contribuir para a formação do mesmo (STEWART *et al.*, 1980; SU; BANNASCH, 2003).

Espongiose é uma degeneração cística das células estreladas de Ito (células de gordura) preenchida por substância acidófila que pode ocupar extensas áreas do parênquima hepático, porções de focos de hepatócitos alterados (FHA), adenomas e CHC. Origina-se das células perisinusoidais hepáticas e pode aparecer com o envelhecimento. Estudos sugerem que a espongiose pode progredir para tumor mesenquimal maligno chamado pericitoma (BANNASCH; BLOCK; ZERBAN, 1981; BANNASCH, 1983), porém, seu potencial neoplásico é questionável, pois estão mais frequentemente associados à hipertrofia hepatocelular ou hepatotoxicidade do que hepatocarcinogenicidade (KARBE; KERLIN, 2002).

Peliose é uma dilatação focal irregular dos sinusóides hepáticos que, macroscopicamente, é a mais visível na superfície do fígado. Está frequentemente presente em ratos com mais de dois anos de idade e em algumas infecções como tuberculose. Sua coexistência com os adenomas é bastante comum. Observações sugerem que peliose, hemangioendotelioma e hemangiossarcoma podem representar estágios diferentes de uma evolução patogênica contínua (BANNASCH; ZERBAN, 1990).

O adenoma faz parte do processo de carcinogênese hepática, é considerado uma progressão dos focos e áreas de células alteradas e uma neoplasia benigna do fígado. Caracteriza-se por uma marcante variação em sua composição celular, porém é constituída, predominantemente, de células acidófilas ou basofílicas ou uma combinação delas (BANNASCH; ZERBAN, 1990; PARADIS, 2013).

Colangiomas são lesões proliferativas benignas dos ductos biliares que podem ser únicas ou múltiplas, simples ou multiloculares e podem aparecer em qualquer porção do fígado de ratos submetidos a carcinógeno hepático (STEWART *et al.*, 1980).

Todas essas lesões (focos de células alteradas: claras, vacuoladas, basofílicas, anfófilas, tigróides, oncocíticas, pequenas, acidófilas, espongiose, peliose, colangiomas e adenomas) podem ser distintas do tecido não-transformado ao seu redor por alterações na expressão de várias enzimas e marcadores moleculares, incluindo a ATPase, glicose-6-fosfatase, γ -glutamyltranspeptidase, glutathione S-transferase forma placentária (GST-P) (BANNASCH; ZERBAN, 1990; DRAGAN *et al.*, 1997; ITO *et al.*, 2000; ROSKAMS; KOJIRO, 2010; SALOMAO; MCMILLEN; LEFKOWITCH, 2012; JIN *et al.*, 2013).

Atualmente, sabe-se que a inflamação crônica desempenha um papel importante no desenvolvimento de neoplasias envolvendo mecanismos celulares e moleculares. Uma vez que dietas hiperlipídicas levam à obesidade, caracterizando-se por aumento do tecido adiposo e consequente inflamação crônica, pode-se inferir que o risco de desenvolvimento de cânceres é maior em pacientes obesos (TERZIC *et al.*, 2010; HONG *et al.*, 2010; NA; MYUNG, 2012).

Acredita-se que com o ganho de peso e hipertrofia dos adipócitos haja compressão dos vasos sanguíneos no tecido adiposo, impedindo um suprimento adequado de oxigênio, com consequente hipóxia local e morte de alguns adipócitos. Esse quadro desencadearia a quimiotaxia de macrófagos, o processo de angiogênese com aumento do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), a cascata da resposta inflamatória (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, PCR, Leptina e Resistina) e indução à expressão de genes pró-inflamatórios (WOOD *et al.*, 2009).

Em condições fisiológicas, a homeostase lipídica requer a existência de interações metabólicas coordenadas entre o fígado, músculo e o tecido adiposo através da ação reguladora da insulina. O fígado tem um papel central no metabolismo dos lipídios: capta, principalmente, os ácidos graxos (AG) circulantes provenientes do tecido adiposo e, em menor quantidade, os da absorção intestinal vindos da dieta. Além disso, os hepatócitos têm a capacidade de sintetizar novos AG. Uma vez no fígado, os AG têm dois caminhos principais: incorporar-se às vias de oxidação intracelular para gerar adenosina trifosfato (ATP) e converter-se em triglicerídeos através do processo de esterificação para, assim, formar lipoproteínas de muito baixa densidade. Por isso, aqueles processos que aumentam a captação hepática de AG alteram seu metabolismo e, conseqüentemente, produzem acúmulo de gordura no fígado (DAY; JAMES, 1998; COLINA; MONZÓN, 2010).

Atualmente, considera-se que a RI constitui o pilar patogênico básico para a formação da esteatose hepática. A RI produz um aumento do fluxo de AG não esterificados no fígado devido ao incremento da hidrólise dos triglicerídeos pela ativação mantida da lipase adipocitária. Além disso, a RI caracteriza-se por uma desregulação na taxa de captação hepática de AG não esterificados (LEWIS *et al.*, 2002)

O estresse oxidativo e, conseqüentemente, a peroxidação lipídica mediada pelas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e as citocinas (em especial a TNF- α) são os principais

responsáveis pela evolução de esteatose simples para esteatohepatite com todas suas lesões histológicas características (PESSAYRE *et al.*, 2001; FELDSTEIN *et al.*, 2003).

As células dos tecidos adiposos, que incluem os adipócitos, pré-adipócitos e os macrófagos, são capazes de secretar múltiplas moléculas bioativas que são denominadas adipoquinas. Entre estas incluem-se o TNF- α , a adiponectina, a leptina, resistina, IL-6, angiotensina II, norepinefrina, adiposina, visfatina, entre outras. Evidências experimentais mostraram que a leptina e adiponectina desempenham papel importante no desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica. Enquanto as concentrações séricas de leptina estão elevadas de maneira proporcional ao grau de esteatose hepática, as de adiponectina são inversamente proporcionais. Desta forma, a adiponectina é um hormônio anti-esteatótico que possui um efeito anti-inflamatório provavelmente devido a sua capacidade de inibir a síntese e a secreção de TNF- α por parte dos macrófagos que infiltram o tecido adiposo na obesidade (HUI *et al.*, 2004; BUGIANESI *et al.*, 2005; HUTLEY; PRINS, 2005).

Desta forma, dieta hiperlipídica e obesidade estão relacionadas com o desenvolvimento da carcinogênese hepática ao fazer parte de suas fases evolutivas, que vão desde a esteatose hepática gordurosa não alcoólica (leve, moderada e grave) passando para esteatohepatite, cirrose (fibrogênese) e CHC (COLINA; MONZÓN, 2010).

Os lipídios, especificamente os ácidos graxos poliinsaturados, ômega-3 e 6, afetam vários passos do processo de carcinogênese com efeitos diretos e indiretos no estresse oxidativo. Ocorre potencialização da peroxidação das membranas celulares devido a presença de mais duplas ligações apresentada principalmente pelo ômega-3 (ω -3), levando a constante estresse oxidativo e geração de EROs, as quais podem causar dano ao DNA (MARTINS; GRUENZO, 2009).

O efeito da gordura no metabolismo e na carcinogênese não depende somente da quantidade, como também da composição de ácidos graxos específicos (CAMPOS *et al.*, 2005). Muitos estudos têm demonstrado que os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e monoinsaturados ômega-9 (ω -9) desempenham um papel protetor no desenvolvimento do câncer colorretal, enquanto os ácidos graxos saturados e os poli-insaturados ômega-6 (ω -6) promovem a carcinogênese (NORAT *et al.*, 2005).

Os ácidos graxos (AG), portanto são divididos em saturados, que não apresentam duplas ligações em suas moléculas, e insaturados, os quais apresentam duplas ligações, e recebem nome de acordo com a posição da primeira dupla ligação a partir do terminal metil da cadeia carbônica, tais como ômega 3, 6 e 9. Estes podem ser poliinsaturados (PUFA), constituídos pelos ômegas 3 e 6, e monoinsaturados (MUFA), o ômega-9. Os ômegas 3 e 6 são também chamados de Ácidos Graxos Essenciais (AGE), pois não são sintetizados pelo organismo e como são imprescindíveis devem ser adquiridos por via exógena. Os ômegas-6: ácido linoleico (AL, 18:2n-6) e ácido aracdônico (AA, 20:4n-6) são encontrados em óleos vegetais como o de milho e soja; e os ômegas-3: ácido alfa-linolênico (ALA, 18:3 n3), ácido eicosapentanóico (EPA, 20:5 n3) e ácido docosahexanóico (DHA, 22:6 n3), principalmente nos óleos de peixes de águas frias e profundas como a cavala, o salmão, arenque, atum e sardinhas; e nos vegetais linhaça e soja. O ômega-9: ácido oleico (AO, 18:1n-9) está presente em maiores proporções no azeite de oliva, óleo de buriti e em nozes (ANDRADE; DO CARMO, 2006).

O MUFA (ω -9), considerado um lipídeo estável, embora com menos estudos em relação ao ω -3 e ω -6, surge atualmente como importante elemento, atuando de forma surpreendente como antiinflamatório. Ele pode aumentar a transcrição da potente interleucina-10 (IL-10) que é transcrita em conjunto com outras moléculas pró-inflamatórias como as interleucinas IL-6 e IL-1 β e a citocina TNF- α . O AO pode elevar de tal forma a transcrição da IL-10 que pode promover um mecanismo modulador com supressão das moléculas pró-inflamatórias, mas a razão entre a produção de substâncias anti e pró-inflamatórias ainda não está claramente elucidada (MORANI *et al.*, 2010).

Os estudos experimentais têm contribuído para a compreensão dos mecanismos de ação dos ácidos graxos ω -3 no câncer, e as evidências indicam que podem modular a formação dos eicosanóides e influenciar a expressão de genes, moléculas transdutoras de sinais e atividade de enzimas (ROYNETTE *et al.*, 2004). Consequentemente, a suplementação com ácidos graxos ω -3 pode atenuar a resposta inflamatória aguda, prevenir catabolismo, melhorar a utilização de substratos energéticos, diminuir angiogênese e ainda equilibrar apoptose, proliferação e diferenciação celular (KIM *et al.*, 2000; GARÓFOLO; PETRILLI, 2006).

A proporção de AG (ω -6, ω -3 e ω -9) na dieta é importante. A alta razão ω -6/ ω -3 está relacionada à patogênese de doenças cardiovasculares, cânceres, doenças inflamatórias e

imunológicas, enquanto a baixa razão ω -6/ ω -3 exerce efeitos preventivos. Ao longo do tempo, tem ocorrido um aumento da ingestão de gordura e substituição dos ácidos graxos alimentares com maior consumo de ω -6 em relação ao ω -3 e 9 (BARTSCH; NAIR; OWEN, 1999). A OMS em seu relatório sobre dieta, nutrição e prevenção de doenças crônicas recomenda uma ingestão de 5% a 7% das calorias totais provenientes do ω -6, enquanto 2% a 3% oriundas do ω -3 (FÜRST, 2002).

Como consequência das mudanças no padrão dietético humano, a relação entre AG ω -6: ω -3 também sofreu alterações no decorrer da história. No passado, na era Paleolítica, essa relação contemplava, aproximadamente, 1:1 a 2:1, enquanto que o padrão atual (dieta ocidental), onde o consumo ω -3 é deficiente, esta relação varia de 17:1 a 20:1 e a incidência de CCR vem aumentando em níveis alarmantes (SIMOPOULOS, 2006; CAMPOS, 2007). Atualmente a relação entre ácidos graxos ω -6/ ω -3 deve ser modulada em 2,5:1, para inibir a proliferação celular (efeito antiinflamatório) e promover a apoptose de células cancerígenas. No entanto, a melhor proposta, com base em experimentação animal, é de 1:1 (SIMOPOULOS, 2006).

A grande importância do câncer nos dias atuais leva à necessidade de estudos contínuos de seus vários aspectos. O CCR e o CHC, ambos muito prevalentes, tornam essas pesquisas extremamente necessárias. A utilização de modelos experimentais de carcinogênese tem sido uma ferramenta essencial na elucidação e identificação dos mecanismos e fatores envolvidos neste processo (BURLAMAQUI *et al.*, 2011; WARD; TREUTING, 2014; CAVIGLIA; SCHWABE, 2015). Dentre os modelos, o que utiliza o AOM, é um dos mais empregados na carcinogênese colorretal. Além de induzir a formação de lesões neoplásicas nos colos, o AOM tem vários efeitos sobre o fígado (KHURANA *et al.*, 2010; BURLAMAQUI *et al.*, 2013; KHURANA *et al.*, 2013). Diante disso, decidiu-se verificar a influência de dietas com diferentes concentrações lipídicas contendo elevadas concentrações de óleos ômega 3 e 9 e menor concentração de óleos ômega 6 sobre as alterações hepáticas induzidas pelo AOM.

2 OBJETIVO

1. Verificar se dietas com diferentes concentrações lipídicas (hiper, normo e hipolipídica), com elevada relação ômega 9/ ômega 6 e baixa relação ômega 6/ ômega 3, influenciam as repercussões hepáticas e sistêmicas em ratos na vigência da carcinogênese cólica induzida por azoximetano

2. Analisar a ação das diferentes dietas estudadas na ingesta, massa corporal e hepática dos animais submetidos à carcinogênese cólica

3 MÉTODO

A pesquisa foi realizada após avaliação do Comitê de Ética de Pesquisas em Animais da Universidade Federal do Ceará (CEPA-UFC) sob os números de protocolos 09/09 em 27/05/2009 e 53/12 em 28/11/2012, de acordo com as Normas Internacionais para Pesquisa Biomédica em Animais (Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciências Médicas, 1990) e a Lei Federal nº. 6.638 que estabelece normas para prática didático-científica da vivisseção de animais, de 27 de maio de 2009 (Anexo A).

3.1 Amostra

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Mammalia Rodentia*, *Muridae*) da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais tinham 3 semanas de vida e peso médio de 50g. Foram mantidos no laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFC, em gaiolas de polipropileno com tampa de arame galvanizado com zinco, forradas com maravalhas. Permaneceram alojados em condições adequadas, umidade relativa do ar em torno de 50%, e temperatura média de 25° C, ciclo claro e escuro de 12/12 horas e ventilação adequadas. Receberam água e ração *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos contendo 12 animais cada, identificados e pesados previamente. Os grupos I e II foram alimentados com ração padrão da Biobase Bio-tec Ratos e Camundongos® (Anexo B) e os grupos III, IV e V com rações para ratos modificadas em três tipos de dietas específicas, com calorias semelhantes, concentrações de lipídeos e carboidratos diferentes, porém com a mesma alta razão ω -9: ω -6 e baixa ω -6: ω -3 (APÊNDICE A, B, C e D). Todos os animais foram alimentados com suas respectivas dietas desde o desmame com três semanas até a eutanásia (36 semanas).

3.2 Delineamento do experimento

3.2.1 Grupos controle

Grupo I (SALINA) – grupo contendo ratos que receberam dieta padrão (DP), e não foram induzidos com azoximetano – Receberam diariamente DP, *ad libitum*, composta de 30% de proteínas (PTN), 58% de carboidratos (CHO) e 12% de lipídios (LIP). Com 10 semanas de vida, receberam injeção de 1,0ml de solução salina 0,9% (SS) estéril, IP, uma vez por semana por duas semanas consecutivas (Figura 1).

Grupo II (PADRÃO) – grupo contendo ratos que receberam dieta padrão e foram induzidos com azoximetano – Receberam diariamente DP, *ad libitum*, composta de 30% PTN, 58% CHO e 12% LIP. Com 10 semanas de vida, receberam injeção de AOM, 20 mg/kg, IP, uma vez por semana por duas semanas consecutivas (Figura 1).

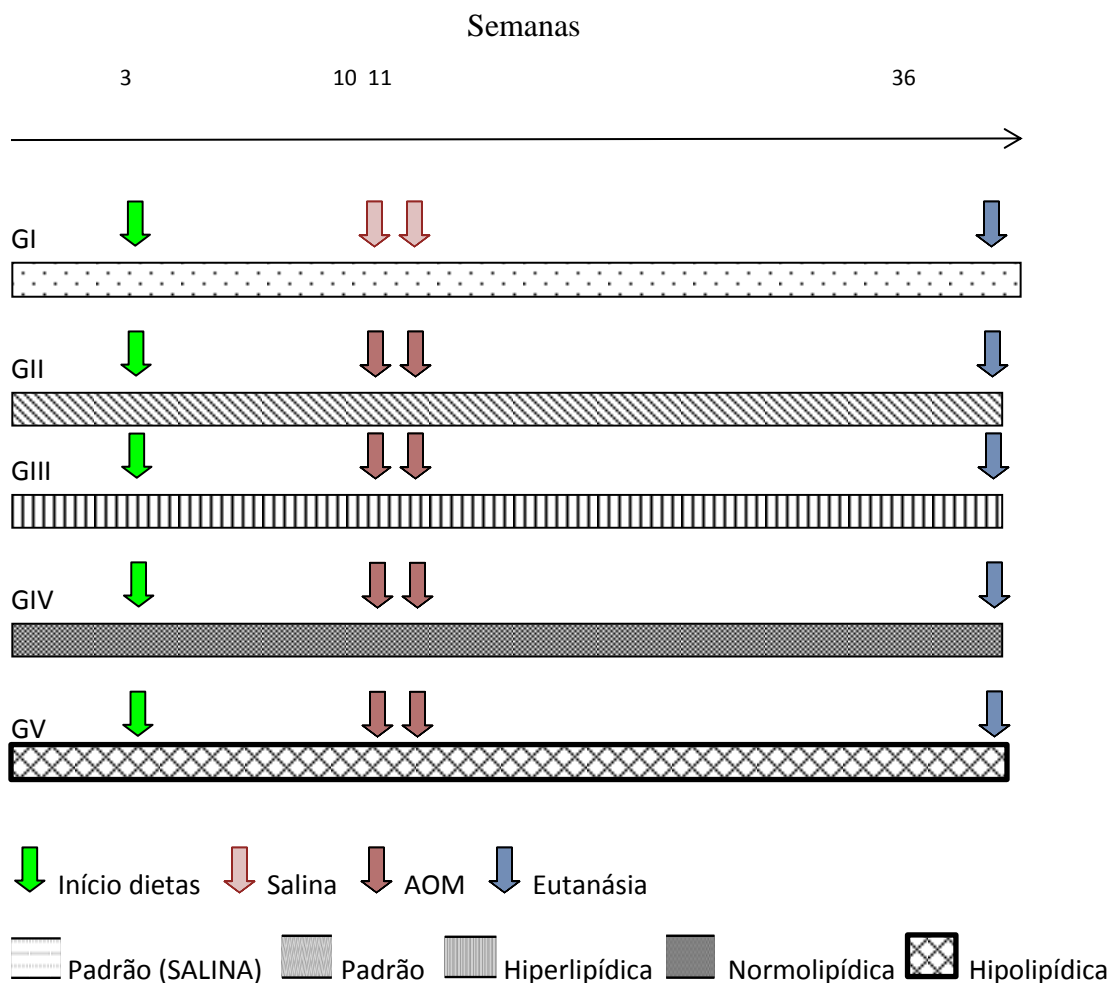
3.2.2 Grupos experimentos

Grupo III (HIPERLIPÍDICO) – grupo contendo ratos que receberam dieta hiperlipídica (DH) e foram induzidos com azoximetano – Receberam diariamente DH, *ad libitum*, composta de 30% PTN, 25% CHO e 45% LIP. Com 10 semanas de vida, receberam injeção de AOM, 20 mg/kg, IP, uma vez por semana por duas semanas consecutivas (Figura 1).

Grupo IV (NORMOLIPÍDICO) – grupo contendo ratos que receberam dieta normolipídica (DN) e foram induzidos com azoximetano – Receberam diariamente DN, *ad libitum*, composta de 30% PTN, 40% CHO e 30% LIP. Com 10 semanas de vida, receberam injeção de AOM, 20 mg/kg, IP, uma vez por semana por duas semanas consecutivas (Figura 1).

Grupo V (HIPOLIPÍDICO) – grupo contendo ratos que receberam dieta hipolipídica (Dh) e foram induzidos com azoximetano – Receberam diariamente Dh, *ad libitum*, composta de 30% PTN, 58% CHO e 12% LIP. Com 10 semanas de vida, receberam injeção de AOM, 20 mg/kg, IP, uma vez por semana por duas semanas consecutivas (Figura 1).

Figura 1 – Delineamento do experimento: 60 ratos, 3 semanas de vida, distribuídos em 5 grupos conforme dietas, GI- Dieta Padrão; GII- Dieta Padrão; GIII- Dieta Hiperlipídica; GIV- Dieta Normolipídica; GV- Dieta Hipolipídica. Na 10^a e 11^a semana o GI foi exposto a SALINA e todos os outros grupos ao AOM. Eutanásia ocorreu na 36^a semana do experimento.



Fonte: elaborada pelo autor.

3.3 Indução da carcinogênese cólica

O azoximetano (Wako Chemicals USA) foi adquirido na apresentação em frasco-ampola (100mg) e diluído em água para injeção estéril, a fim de obter a dose de 20mg/kg de peso do animal, sendo administrado por IP, na 10^a e 11^a semana de vida dos animais nos grupos II, III,

IV e V. A eutanásia ocorreu 26 semanas após exposição ao AOM (BIRD,1987; BIRD, 1995; BOATENG; VERGHESE; CHAWAN *et al.*, 2006).

3.4 Procedimento cirúrgico

Os animais permaneceram 12h recebendo somente água *ad libitum*, até o início do ato operatório. Foram anestesiados com ketamina (80mg/kg/peso) e Xilasina (8mg/kg/peso) por meio de injeções IP e posicionados em decúbito dorsal sobre prancha de madeira e imobilizados pela fixação dos membros anteriores e caudais. Em seguida, submetidos à laparotomia por incisão mediana, xifo-pubiana com exposição da cavidade peritoneal. Posteriormente, foram coletados 3ml de sangue da aorta abdominal para análise bioquímica. Logo após, foram realizadas proctocolectomia e hepatectomia total. Em seguida, os animais foram mortos por choque hipovolêmico, após secção da aorta abdominal.

Estes órgãos foram medidos, pesados e avaliados quanto à presença de lesões macroscópicas. Amostras dos lobos hepáticos direito, esquerdo e médio foram clivadas e encaminhadas para o laboratório de Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFC, para rotina de cortes histológicos e coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE).

3.5 Parâmetros avaliados

3.5.1 Avaliação clínica

3.5.1.1 Ingesta

Foi avaliada pela diferença entre o alimento oferecido e a sobra, a qual foi pesada pelo mesmo examinador, utilizando a balança analítica Ohaus AS 2600 no início do experimento e em dias alternados até a eutanásia.

3.5.1.2 Massa corpórea

Todos os animais foram pesados pelo mesmo examinador que utilizou a mesma balança (analítica Ohaus AS 2600) no início do experimento e em dias alternados até a eutanásia.

3.5.1.3 Massa do fígado

Na eutanásia, após hepatectomia total, o fígado de cada animal foi pesado pelo mesmo examinador que utilizou a balança analítica Ohaus AS 2600. Posteriormente, foi calculada a relação percentual entre a massa do fígado e a massa final do animal.

3.5.1.4 Diarréia

Todos os animais foram avaliados, em dias alternados, quanto à presença e intensidade da diarréia e classificados conforme escore de Kurita *et al.*, 2000 (Grau 0=fezes com aspecto normal; Grau 1=fezes levemente alteradas, pouco umedecidas; Grau 2=fezes úmidas com pouca sujidade perianal; Grau 3=fezes úmidas com bastante sujidade perianal).

3.5.2 Macroscopia

Logo após laparotomia, fez-se inventário da cavidade peritoneal, proctocolectomia e hepatectomia total, anotando-se a presença de tumores intestinais, cistos e nódulos hepáticos. As lesões existentes eram mensuradas, ressecadas, postas em solução de formalina a 10% e enviadas para o laboratório de Patologia, para rotina de cortes histológicos e coloração pela HE.

3.5.3 Microscopia

Os fragmentos colhidos dos lobos hepáticos e colo foram fixados em solução de formalina a 10% e, posteriormente, submetidos a processo histotécnico com emblocamento em parafina, cortes de 5 μ de espessura e coloração pela HE.

3.5.4 Análise laboratorial

3.5.4.1 Estresse oxidativo

Durante a eutanásia foram colhidos 3 ml de sangue, centrifugados e congelados em nitrogênio líquido a -70°C , para posterior determinação da concentração de glutathione. Utilizou-se o método de Sedlack e Lindsay (1968), que se baseia na reação do 2-ácido nitrobenzóico com o tiol livre, originando um dissulfeto misto + ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto

de formação da reação é feita em espectrofotômetro de Beckman, por leitura da absorbância a 412 nm (Anexo C).

A avaliação de peroxidação lipídica foi realizada pela reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) (BERNHEIM; BERNHEIM; WILBUR, 1948). Com esse fim, 3 ml de sangue foram colhidos no procedimento cirúrgico e submetidos a processos de centrifugação, sendo o plasma imediatamente congelado em nitrogênio líquido a -70°C (Anexo C).

3.5.4.2 *Análise bioquímica*

Foram realizadas dosagens séricas de glicose, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GAMA-GT), colesterol total, “High density Lipoprotein” (HDL), “Low density Lipoprotein” (LDL), triglicerídeos (Anexo C).

A glicose foi dosada utilizando-se fitas reativas, “One Touch Ultra®” e uma gota de sangue fresco colhido da cauda do animal antes do procedimento cirúrgico.

3.6 Análise estatística

Os dados quantitativos (expressos em forma de média e erro-padrão) foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e analisados por meio do teste ANOVA (1-way ou 2-way) seguido do pós-teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Variáveis semi-quantitativas (escores de intensidade de lesão hepática) foram expostos em forma de Mediana (mínima - máxima) e analisados por meio do teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn.

Variáveis qualitativas foram expressas em forma de frequência absoluta e percentual e analisadas por meio dos testes Exato de Fisher ou Qui-quadrado.

Todas as análises foram realizadas no software estatístico GraphPad Prism 5.0 para Windows e adotou-se uma confiança de 95% para todas as avaliações."

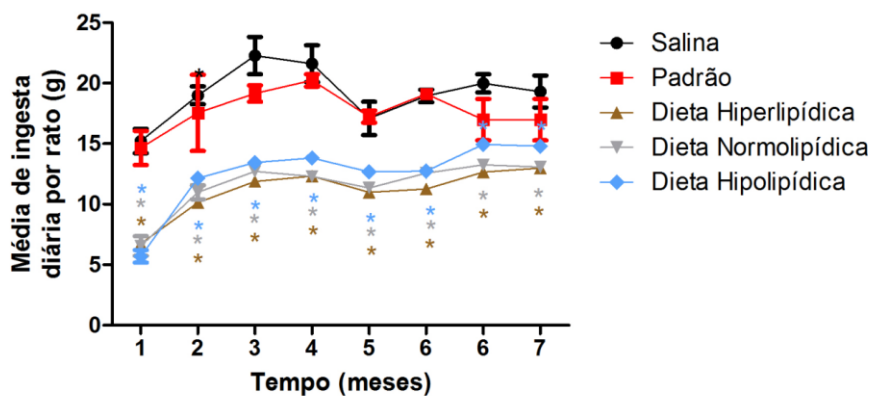
4 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram tabulados inicialmente e, após análise estatística, expressos em gráficos abaixo apresentados.

4.1 Ingesta

A ingesta dos animais dos grupos experimentos foi significativamente menor quando comparada à ingesta dos animais dos grupos controles (Padrão e Salina). Nos dois últimos meses, a média de ingesta não mostrou diferença significativa entre o grupo Hipolipídico e o Padrão ($p < 0.001$). Não se observou diferença estatisticamente significativa entre as ingestas dos animais dos grupos controles (Figura 2).

Figura 2 – Média de ingesta em cada grupo durante todo o experimento. ANOVA multifatorial para medidas repetidas/Bonferroni, média \pm EPM ($p < 0.001$).

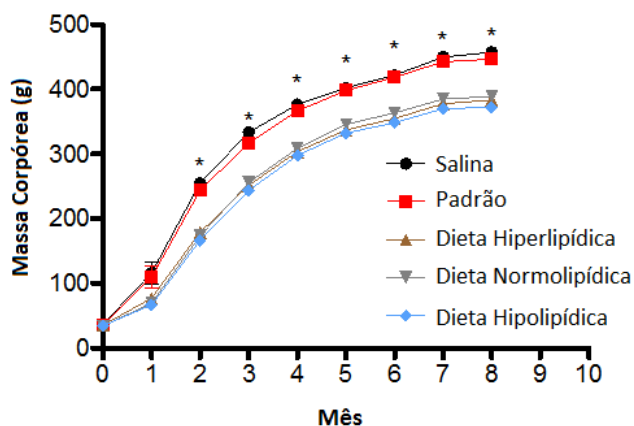


Fonte: elaborada pelo autor.

4.2 Massa corpórea

Até o primeiro mês do experimento, não houve diferença estatisticamente significativa na comparação do ganho de massa corpórea entre os cinco grupos estudados. A partir do 2º mês até a eutanásia os animais alimentados com dietas experimentais mostraram ganho de massa corpórea significativamente menor que os grupos com dieta controle ($p < 0.05$) (Figura 3).

Figura 3 – Média de massa corpórea (g) em cada grupo durante todo o experimento. Salina e Padrão *versus* Hiper, Normo e Hipolipídico. * $p < 0.05$, (ANOVA multifatorial para medidas repetidas /Bonferroni, média \pm EPM).

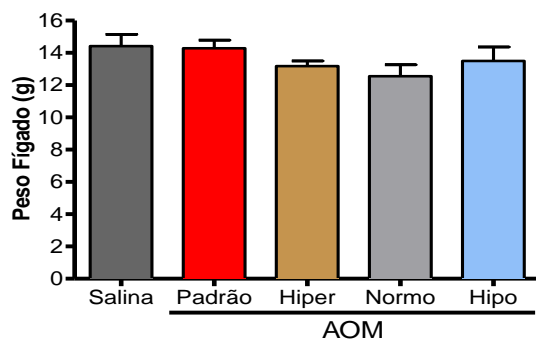


Fonte: elaborada pelo autor.

4.2.1 Massa hepática

Não houve diferença significativa na massa do fígado entre os grupos controles e experimentos (Salina = 14.4 ± 0.7 ; Padrão = 14.3 ± 0.5 ; Hiper = 13.2 ± 0.3 ; Normo = 12.5 ± 0.7 ; Hipo = 13.5 ± 0.9 mg) ($p = 0.247$) (Figura 4).

Figura 4 – Média do peso do fígado (g) em cada grupo durante todo o experimento. Salina e Padrão *versus* Hiper, Normo e Hipolipídico. * $p < 0.05$ em relação a Salina; ** $p < 0.05$ em relação a Padrão; ANOVA/Bonferroni (Média \pm EPM).

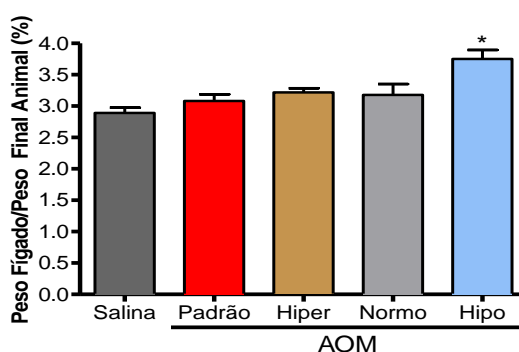


Fonte: elaborada pelo autor.

4.2.2 Relação percentual entre a massa do fígado e a massa final do animal

O grupo tratado com a dieta hipolipídica apresentou aumento significativo da relação percentual entre a massa do fígado e a massa final do animal em relação aos demais grupos (Salina = 2.9 ± 0.1 ; Padrão = 3.1 ± 0.1 ; Hiper = 3.2 ± 0.1 ; Normo = 3.1 ± 0.2) ($p < 0.001$) (Figura 5).

Figura 5 – Relação percentual entre o peso do fígado (g) e o peso final do animal (g) em cada grupo durante todo o experimento. Salina e Padrão *versus* Hiper, Normo e Hipolipídico. * $p < 0.05$ em relação aos demais grupos; ANOVA/Bonferroni (Média \pm EPM).



Fonte: elaborada pelo autor.

4.3 Diarréia

No decorrer do experimento, observou-se que os animais alimentados com diferentes dietas lipídicas apresentaram aumento significativo dos escores de diarréia em relação aos grupos Padrão e Salina. O grupo alimentado com dieta Hiperlipídica apresentou aumento do grau de diarréia em relação aos grupos com dieta Normo e Hipolipídica. Todos os ratos dos grupos Salina e Padrão apresentaram escore de diarréia grau 0. Por sua vez, os animais alimentados com dieta Hiperlipídica apresentaram diarréia grau 3, valor significativamente superior aos grupos Salina, Padrão, Normo e Hipolipídica. Os animais dos grupos Normo e Hipolipídico apresentaram diarréia grau 2 ($p < 0.001$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Diarréia apresentada pelos animais em todos os grupos. * $p < 0.05$ em relação aos grupos Padrão e Salina; † em relação ao grupo Hiperlipídico (Kruskall-Wallis/Dunn) (mediana, mínima-máxima). ** $p < 0.05$, Qui-Quadrado (Frequência absoluta e percentual).

Grupos	Número de Ratos	Diarréia/Grau
Salina	12	0 (0-0)
Padrão	12	0 (0-0)
Hiperlipídico	11	3 (3-3)*
Normolipídico	10	2 (2-2)*†
Hipolipídico	11	2 (2-2)*†
p-Valor		<0.001

Fonte: elaborada pelo autor.

4.4 Macroscopia

Houve aumento significativo de tumores cólicos nos animais do grupo Padrão em relação ao grupo Salina ($p < 0.001$). Não houve diferença entre os grupos alimentados com dietas Hiper ($p = 0,069$), Normo ($p = 1,000$) e Hipolipídica ($p = 0,069$) e o grupo Padrão (Tabela 2 e Figura 6).

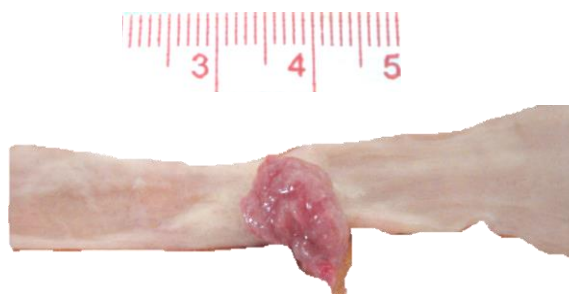
Houve variação significativa no número de animais exibindo lesões hepáticas ($p = 0.004$), aumento na frequência de lesão hepática no grupo Padrão em relação ao Salina ($p = 0.001$) e redução significativa no grupo de dieta Hipolipídica ($p = 0.036$) em relação ao Padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos Hiper ($p = 0.371$) e Normolipídico ($p = 0.172$) em relação ao Padrão (Tabela 2 e Figura 7).

Tabela 2 - Achados Macroscópicos. * $p < 0.05$, Qui-Quadrado (Frequência absoluta e percentual); † $p < 0.05$, em relação ao grupo Salina; ‡ $p < 0.05$, em relação ao Padrão, Teste Exato de Fisher.

Grupos	N	Tumores cólicos	Lesões hepáticas
Salina	12	1 (8.3%)	1 (8.3%)
Padrão	12	11 (91.7%)†	10 (83.3%)†
Hiperlipídico	11	6 (54.5%)	7 (63.6%)
Normolipídico	10	9 (90.0%)	5 (50.0%)
Hipolipídico	11	6 (54.5%)	4 (36.4%)‡
p-Valor*		<0.001	0.004

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 6- Carcinoma colorretal. Lesão vegetante, medindo 1,5 x 1,0 x 0,4 cm, localizada no colo médio. Grupo Padrão, Rato 11



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 7 – Lesões hepáticas. Fígado apresentando numerosas lesões císticas, algumas coalescentes e a maior delas medindo 0,7 cm de diâmetro. Grupo Hipolipídico, Rato 11.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.5 Microscopia cólica

Os achados microscópicos consistiram em adenomas, microadenomas, microcarcinomas e adenocarcinomas de colo, moderadamente diferenciados (Tabela 3 e Figura 8).

O número de animais com adenomas variou significativamente entre os grupos experimentais ($p=0.016$). Não houve diferença entre o percentual de animais com adenomas nos grupos Padrão e Salina ($p=0.478$), nem diferença entre os grupos Hiperlipídico e Padrão ($p=0.478$). Houve aumento significativo entre os animais com adenomas nos grupos Normo ($p=0.001$) e Hipolipídico ($p=0.014$) em relação ao grupo Salina (Tabela 3).

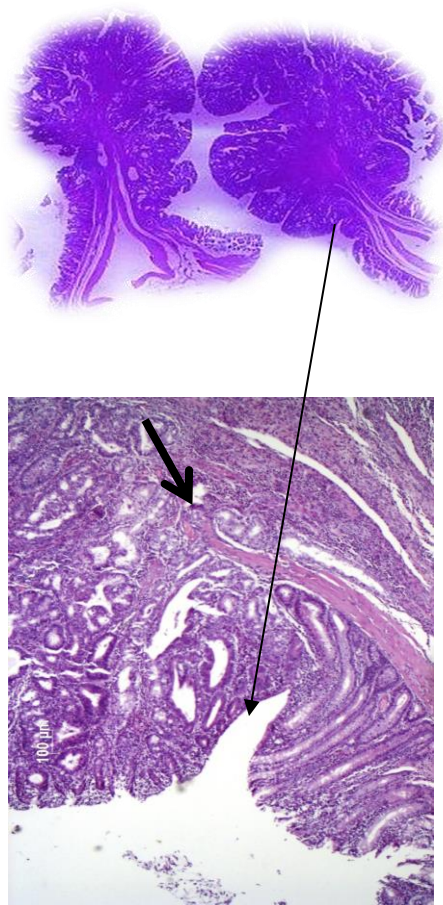
Houve aumento no número de animais com CCR ($p=0.009$) do grupo Padrão em relação ao grupo Salina ($p=0.005$). Não houve diferença entre o Padrão e os grupos Hiper ($p=0.414$) e Normo ($p=0.099$), porém houve redução significativa de CCR em ratos com dieta Hipolipídica ($p=0.027$) em relação ao grupo Padrão (Tabela 3).

Tabela 3 – Achados Microscópicos do colo. * $p<0.05$, Qui-Quadrado (Frequência absoluta e percentual); †Kruskall-Wallis/Dunn (média±EPM). ‡ $p<0.05$ em relação ao salina; § $p<0.05$ em relação ao Padrão; teste Exato de Fisher.

Grupos	N	Adenoma	CCR
Salina	12	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Padrão	12	2 (16.7%)	7 (58.3%)‡
Hiperlipídico	11	1 (9.1%)	4 (36.4%)
Normolipídico	10	5 (50.0%)‡	2 (20.0%)
Hipolipídico	11	5 (45.4%)‡	1 (9.1%)§
p-Valor*		0.016*	0.009*

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 8 – Corte histológico de tumoração de colo distal. Adenocarcinoma polipoide, moderadamente diferenciado, invadindo a muscular (seta menor). HE – 50x - Grupo Padrão, Rato 10.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.6 Microscopia hepática

Os achados microscópicos consistiram em esteatose (leve, moderada e grave), focos de células alteradas (claras, anofílicas, tigróides, acidófilas, vacuolares, intermediárias, basofílicas, oncocíticas e pequenas), espongiose, peliose, colangioma, adenoma e atipias celulares (Tabela 4; Figuras 9-29; Apêndice J).

Tabela 4 - Achados Microscópicos do fígado. *p<0.05 em relação a Salina; **p<0.05 em relação a Padrão; Qui-quadrado (%). †p<0.05 em relação a Salina; ††p<0.05 em relação a Padrão; ANOVA-1-way/Bonferroni (Média±EPM). ‡p<0.05 em relação a Salina; ‡‡p<0.05 em relação a Padrão; Kruskal-Wallis/Dunn (Mediana (Mínima-máxima)).

	AOM					p-Valor
	Salina	Padrão	Hiper	Normo	Hipo	
Esteatose leve	8 66.7%	9 75.0%	9 81.8%	6 60.0%	9 81.8%	0.735
Esteatose moderada	0 0.0%	1 8.3%	1 9.1%	3 30.0%	1 9.1%	0.243
Esteatose grave	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 10.0%	1 9.1%	0.483
Adenoma	0 0.0%	3 25.0%	7*** 63.6%	7*** 70.0%	4 36.4%	0.003
Espongiose	0 0.0%	8* 66.7%	9* 81.8%	9* 90.0%	6* 54.5%	<0.001
Peliose	0 0.0%	6* 50.0%	7* 63.6%	7* 70.0%	4 36.4%	0.006
Colangioma	0 0.0%	6* 50.0%	6* 54.5%	7* 70.0%	6* 54.5%	0.010
FC Claras	0 0.0%	6* 50.0%	3 27.3%	4 40.0%	6* 54.5%	0.040
FC Vacuolares	0 0.0%	5 41.7%	4 36.4%	4 40.0%	2 18.2%	0.109
FC Intermediárias	0 0.0%	2 16.7%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0.107
FC Basofílicas	1 8.3%	3 25.0%	4 36.4%	0 0.0%	1 9.1%	0.141
FC Anfofílicas	0 0.0%	8* 66.7%	2** 18.2%	2** 20.0%	1** 9.1%	0.001
FC Tigróides	0 0.0%	7* 58.3%	4 36.4%	2 20.0%	2* 18.2%	0.020
FC Oncocíticas	0 0.0%	2 16.7%	2 18.2%	4 40.0%	4 36.4%	0.135
FC Acidófilas	0 0.0%	3 25.0%	6*** 54.5%	0 0.0%	0 0.0%	0.001
FC Pequenas	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 10.0%	2 18.2%	0.201
Número de Atípias	0.1±0.1	5.2±0.5†	4.9±0.8†	4.7±0.5†	3.0±0.3††	<0.001
Intensidade da Atípia	0 (0-0)	2.5 (1-3)‡	1 (1-2)‡‡	1 (1-2)‡‡	0 (0-0)‡‡	<0.001

Fonte: elaborada pelo autor.

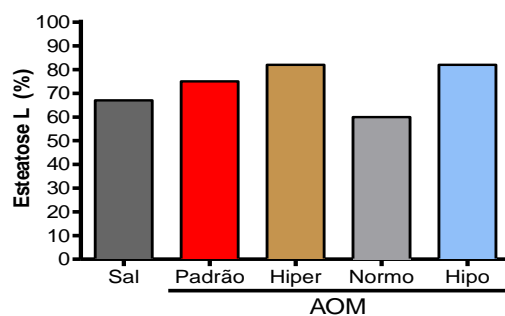
4.6.1 Esteatose

Não houve diferença significativa entre o número de animais que exibiram esteatose leve nos grupos Salina (n=8, 66.7%), Padrão (n=9, 75.0%) e tratados com dietas hiper (n=9, 81.8%), normo (n=6, 60.0%) e hipolipídico (n=9, 81.8%) (p=0.735) (Figura 9).

Com relação à esteatose moderada, não houve variação no número de animais que exibiram essa alteração nos grupos Salina (n=0, 0.0%) e tratados com dietas padrão (n=1, 8.3%), hiper (n=1, 9.1%), normo (n=3, 30.0%) e hipolipídica (n=1, 9.1%) (p=0.243) (Figura 10).

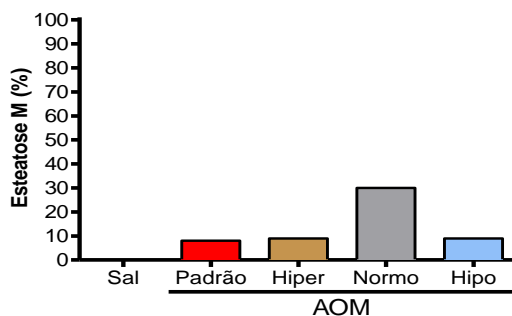
Não houve variação significativa no perfil de esteatose grave nos grupos Salina (n=0, 0.0%), Padrão (n=0, 0.0%), Hiper (n=0, 0.0%), Normo (n=1, 10.0%) e Hipolipídico (n=1, 9.1%) (p=0.483) (Figura 11).

Figura 9 – Esteatose leve. *p<0.05 em relação a Salina; **p<0.05 em relação a Padrão; Qui-quadrado (%).



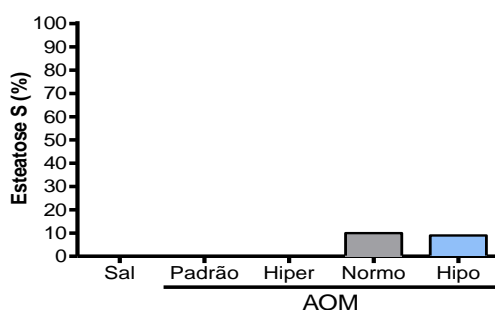
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 10 – Esteatose moderada. *p<0.05 em relação a Salina; **p<0.05 em relação a Padrão; Qui-quadrado (%).



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 11 – Esteatose grave. * $p < 0.05$ em relação a Salina; ** $p < 0.05$ em relação a Padrão; Qui-quadrado (%).

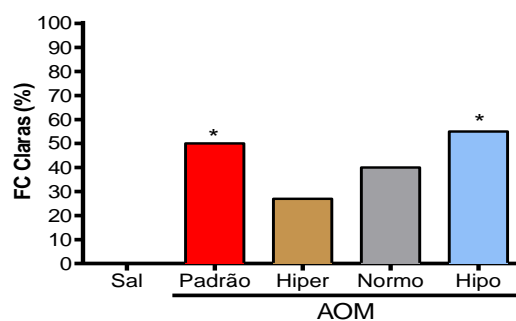


Fonte: elaborada pelo autor.

4.6.2 Focos de células claras

A presença de focos de células claras foi observada significativamente superior no grupo Padrão ($n=6$, 50.0%) e Hipolipídico ($n=6$, 54.5%) em relação ao grupo Salina ($p=0.040$). Os grupos Hiper ($n=3$, 27.3%) e Normo ($n=4$, 40.0%) não diferiram significativamente dos demais (Figura 12).

Figura 12 – Focos de células claras. * $p < 0.05$ em relação a Salina; ** $p < 0.05$ em relação a Padrão; Qui-quadrado (%).



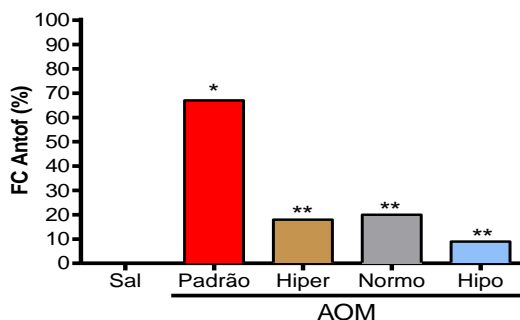
Fonte: elaborada pelo autor.

4.6.3 Focos de células anofílicas

Houve aumento significativo do número de animais exibindo focos de células anofílicas no grupo Padrão ($n=8$, 66.7%) em relação ao Salina ($n=0$, 0.0%) e redução

significante nos grupos tratados com dietas hiper (n=2, 18.2%), normo (n=2, 20.0%) e hipolipídica (n=1, 9.1%) em relação ao Padrão (p=0.001) (Figura 13).

Figura 13 – Focos de células anofílicas. *p<0.05 em relação a Salina; **p<0.05 em relação a Padrão; Qui-quadrado (%).

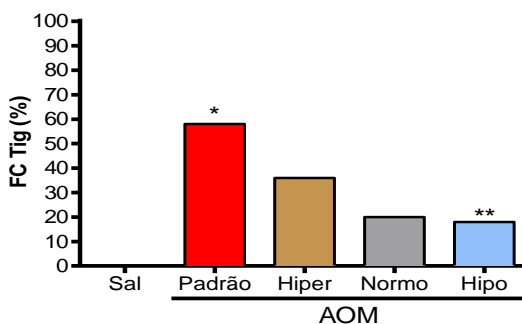


Fonte: elaborada pelo autor.

4.6.4. Focos de células tigróides

O número de animais com focos de células tigróides no grupo Padrão (n=5, 58.3%) foi significativamente superior ao grupo Salina (n=0, 0.0%), mas não diferiu significativamente dos grupos tratados com dietas hiper (n=4, 36.4%) ou normolipídica (n=2, 20.0%) (p=0.020). O grupo tratado com dieta hipolipídica apresentou redução significativa do número de animais exibindo essa alteração (n=2, 18.2%) em relação ao Padrão (Figura 14).

Figura 14 – Focos de células tigróides. *p<0.05 em relação a Salina; **p<0.05 em relação a Padrão; Qui-quadrado (%).

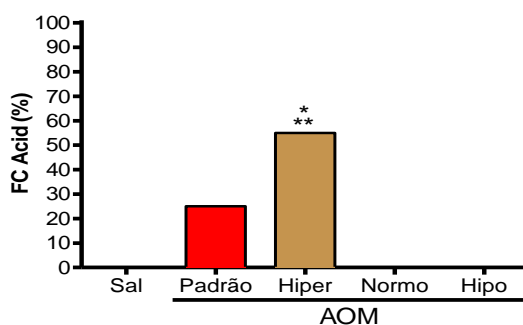


Fonte: elaborada pelo autor.

4.6.5 Focos de células acidófilas

O grupo tratado com dieta hiperlipídica apresentou aumento significativo do número de animais apresentando focos de células acidófilas (n=6, 54.5%) em relação aos grupos Padrão (n=3, 25.0%), Salina, Normo e Hipolipídico (n=0, 0.0%) (p=0.001) (Figura 15).

Figura 15 – Focos de células acidófilas. *p<0.05 em relação a Salina; **p<0.05 em relação a Padrão; Qui-quadrado (%).



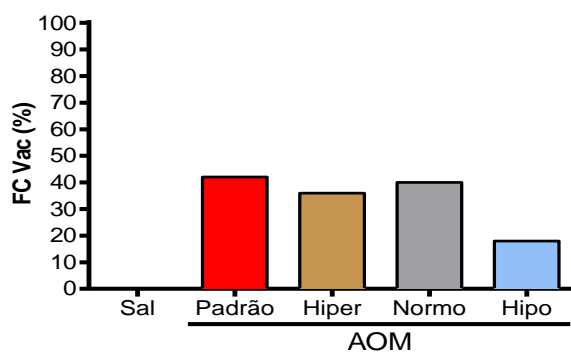
Fonte: elaborada pelo autor.

4.6.6 Focos de células vacuolares, intermediárias, basofílicas, oncocíticas e pequenas

Não houve diferença significativa entre o número de animais que exibiram focos de células vacuolares (Salina, n=0 (0.0%), Padrão, n=5 (41.7%); Hiper, n=4 (36.4%); Normo, n=4, (40.0%); Hipo, n=2, (18.2%)) (p=0.109), intermediárias (Padrão, n=2 (16.7%), Salina, Hiper e Normolipídico, n=0 (0.0%)) (p=0.107) e basofílicas ((Salina, n=1 (8.3%), Padrão, n=3 (25.0%); Hiper, n=4 (36.4%); Normo, n=0, (0.0%); Hipo, n=1, (9.1%)) (p=0.141) (Figuras 16, 17, 18).

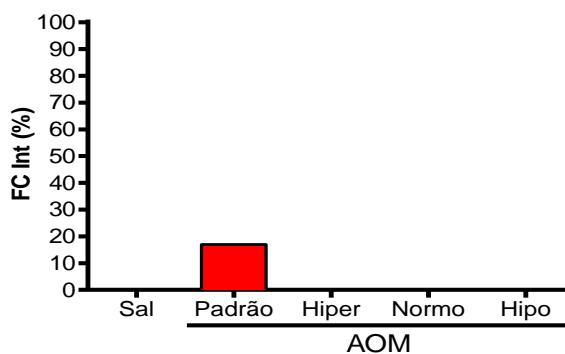
Não houve diferença no número de animais exibindo focos de células oncocíticas (Salina, n=0 (0.0%), Padrão, n=2 (16.7%); Hiper, n=2 (18.2%); Normo, n=4, (40.0%); Hipo, n=4, (36.4%)) (p=0.135) e pequenas (Salina, Padrão e Hiperlipídico, n=0 (0.0%); Normo, n=1, (10.0%); Hipo, n=2, (18.2%)) (p=0.443) (Figuras 19 e 20).

Figura 16 – Focos de células vacuolares. * $p < 0.05$ em relação a Salina; ** $p < 0.05$ em relação a Padrão; Qui-quadrado (%).



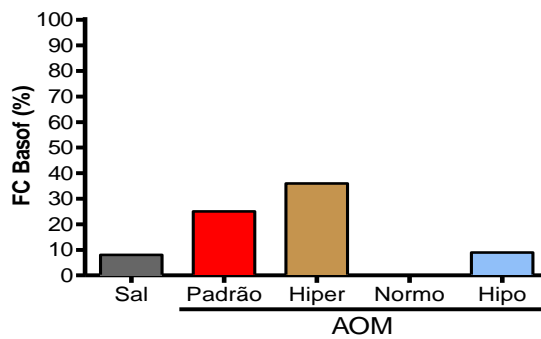
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 17 – Focos de células intermediárias. * $p < 0.05$ em relação a Salina; ** $p < 0.05$ em relação a Padrão; Qui-quadrado (%).



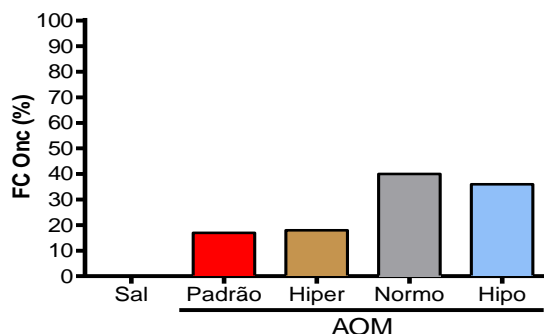
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 18 – Focos de células basofílicas. * $p < 0.05$ em relação a Salina; ** $p < 0.05$ em relação a Padrão; Qui-quadrado (%).



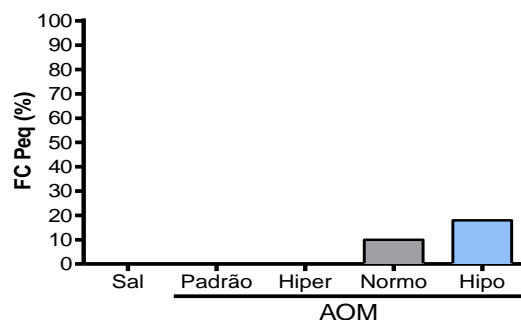
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 19 – Focos de células oncocíticas. * $p < 0.05$ em relação a Salina; ** $p < 0.05$ em relação a Padrão; Qui-quadrado(%).



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 20 – Focos de células pequenas. * $p < 0.05$ em relação a Salina; ** $p < 0.05$ em relação a Padrão; Qui-quadrado (%).

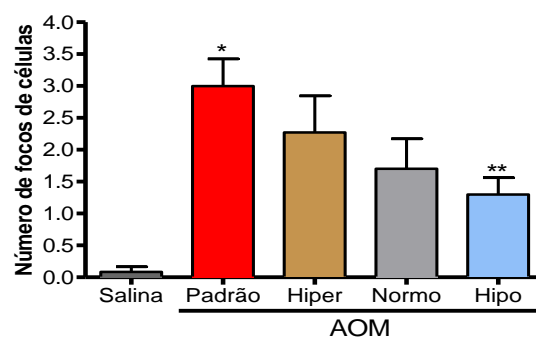


Fonte: elaborada pelo autor.

4.6.7 Número total de focos de células alteradas

O número total de focos de células alteradas no grupo Padrão (3.0 ± 0.4) foi significativamente maior que o número de focos de células no grupo Salina (0.1 ± 0.1). Não houve diferença significativa entre o grupo Padrão e os tratados com dietas hiper (2.3 ± 0.6) e normo (1.7 ± 0.5), porém o grupo tratado com dieta hipolipídica (1.3 ± 0.3) apresentou uma redução significativa desses valores ($p < 0.001$) (Figura 21).

Figura 21 – Número total de focos de células alteradas. * $p < 0.05$ em relação ao Salina; ** $p < 0.05$ em relação ao padrão; ANOVA/Bonferroni (Média \pm EPM).

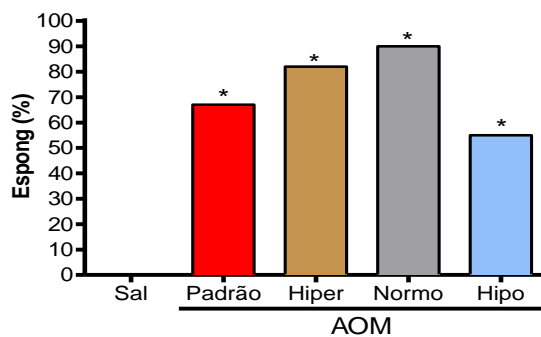


Fonte: elaborada pelo autor.

4.6.8 Espongiose

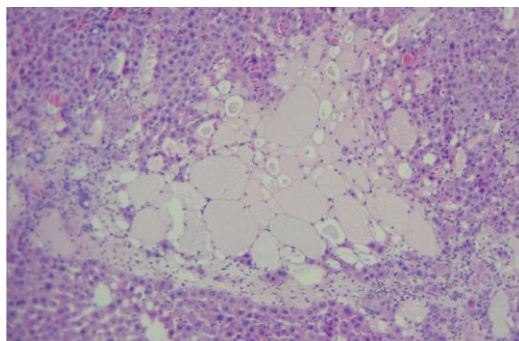
Todos os grupos (Padrão, $n=8$ (66.7%); Hiper, $n=9$ (81.8%); Normo, $n=9$, (90.0%); Hipo, $n=6$, (54.5%)) apresentaram espongiose de forma significativamente superior ao grupo Salina ($n=0$, 0.0%) ($p < 0.001$) (Figura 22 e 23).

Figura 22 – Espongiose. * $p < 0.05$ em relação a Salina; ** $p < 0.05$ em relação a Padrão; Qui-quadrado (%).



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 23 – Espongiose, HE – 10X, Grupo Hiperlipídico, Rato 6.

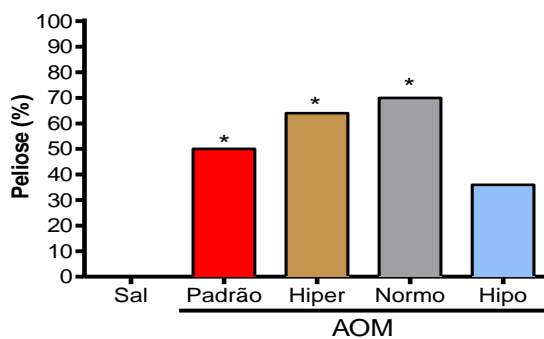


Fonte: elaborada pelo autor.

4.6.9 Peliose

Os grupos Padrão (n=8, 66.7%) e tratados com dietas hiper (n=7, 63.6%) e normolipídica (n=7, 70.0%) apresentaram aumento significativo do número de animais exibindo peliose em relação ao grupo Salina (n=0, 0.0%) ($p=0.006$). O grupo Hipolipídico (n=4, 36.4%) não diferiu significativamente do grupo Padrão (Figura 24).

Figura 24 – Peliose. * $p<0.05$ em relação a Salina; ** $p<0.05$ em relação a Padrão; Qui-quadrado (%).

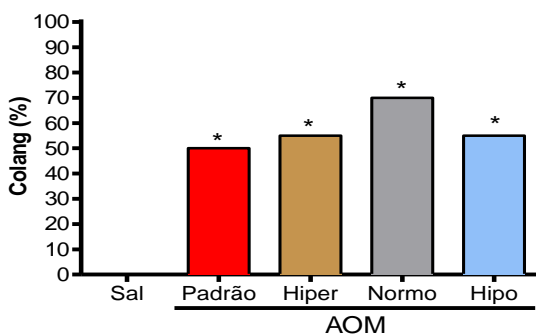


Fonte: elaborada pelo autor.

4.6.10 Colangioma

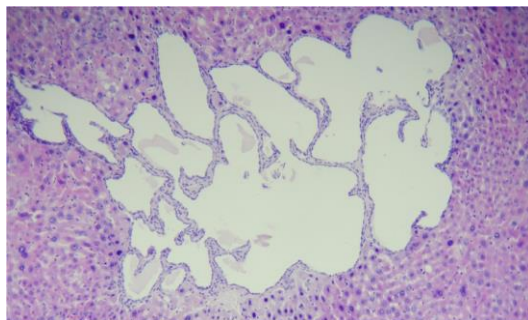
A presença de colangioma foi observada em todos os grupos (Padrão, n=6 (50.0%); Hiper, n=6 (54.5%); Normo, n=7, (70.0%); Hipo, n=6, (54.5%)) significativamente superior ao grupo Salina (n=0, 0.0%) ($p=0.010$) (Figura 25 e 26).

Figura 25 – Colangioma. * $p<0.05$ em relação a Salina; ** $p<0.05$ em relação a Padrão; Qui-quadrado (%).



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 26 – Colangioma cístico, HE - 10x, Grupo Normolipídico, Rato 4.

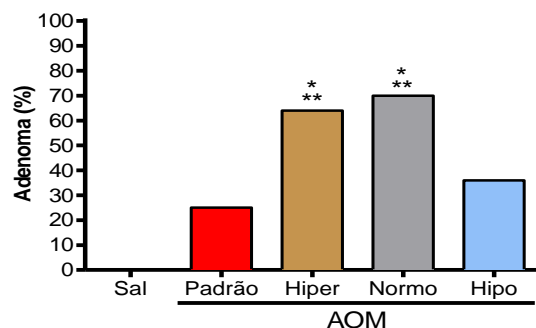


Fonte: elaborada pelo autor.

4.6.11 Adenoma

A presença de adenomas hepáticos foi observada em sete animais dos grupos tratados com dieta hiper (63.6%) e normolipídica (70.0%), valores significativamente superiores aos grupos Salina (n=0, 0.0%) e Padrão (n=3, 25.0%) ($p=0.003$). O grupo Hipolipídico não diferiu significativamente do grupo Padrão (Figura 27)

Figura 27 – Adenoma. * $p < 0.05$ em relação a Salina; ** $p < 0.05$ em relação a Padrão; Qui-quadrado (%).

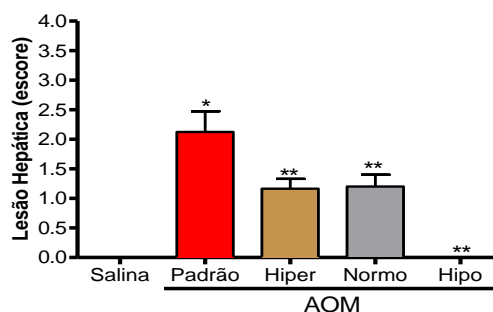


Fonte: elaborada pelo autor.

4.6.12 Atipias

Houve aumento significativo de atipias no grupo Padrão (2.5; 1-3) em relação ao grupo Salina (0; 0-0) e houve redução significativa nos grupos com dietas hiper (1; 1-2), normo (1; 1-2) e hipolipídica (0; 0-0) em relação ao grupo Padrão ($p < 0.001$) (Figura 28).

Figura 28 – Atipias. * $p < 0.05$ em relação ao Salina; ** $p < 0.05$ em relação a Padrão; Kruskal-Wallis/Dunn (Média \pm EPM).



Fonte: elaborada pelo autor.

4.6.13 Número total de alterações microscópicas

O número total de alterações microscópicas hepáticas, excetuando-se esteatose mostrou-se significativamente superior no grupo Padrão (5.2 \pm 0.5) em relação ao Salina (0.1 \pm 0.1), sem mostrar diferença com os grupos Hiper (4.9 \pm 0.8) ou Normolipídico (4.7 \pm 0.5). O grupo

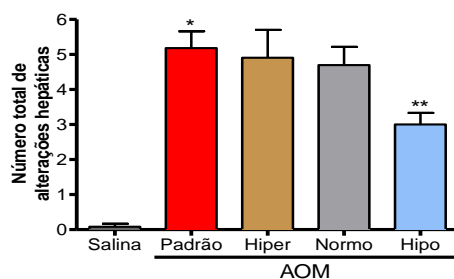
tratado com dieta hipolipídica (3.0 ± 0.3) apresentou redução significativa do número total de alterações hepáticas em relação ao Padrão ($p<0.001$) (Tabela 5; Figura 29).

Tabela 5 - Número total de focos de células alteradas e de alterações microscópicas hepáticas. * $p<0.05$ em relação a Salina; ** $p<0.05$ em relação a Padrão; *** $p<0.05$ em relação ao grupo tratado com dieta hiperlipídica; ANOVA-1-way/Bonferroni (Média \pm EPM).

	AOM					p-Valor
	Salina	Padrão	Hiper	Normo	Hipo	
Número de focos de células	0.1 \pm 0.1	3.0 \pm 0.4*	2.3 \pm 0.6	1.7 \pm 0.5	1.3 \pm 0.3**	<0.001
Total de alterações hepáticas excetuando-se esteatose	0.0 \pm 0.0	1.9 \pm 0.3*	3.0 \pm 0.2	2.6 \pm 0.4	1.8 \pm 0.3***	<0.001

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 29 – Número total de alterações microscópicas hepáticas. * $p<0.05$ em relação ao Salina; ** $p<0.05$ em relação ao padrão; ANOVA/Bonferroni (Média \pm EPM).



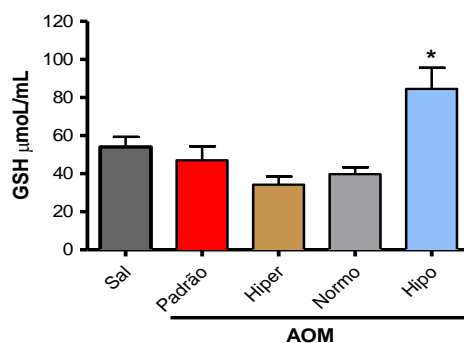
Fonte: elaborada pelo autor.

4.7 Estresse oxidativo

4.7.1 Glutathiona

A média de glutathiona reduzida no grupo Hipolipídico ($84,5\pm 11,2$) foi significativamente superior à média de glutathiona de todos os grupos estudados: Salina ($54,0\pm 5,4$), Padrão ($47,0\pm 7,3$), Hiper ($34,3\pm 4,2$) e Normolipídico ($39,8\pm 3,5$) ($p<0.0001$, ANOVA/Bonferroni) (Figura 30).

Figura 30 – Níveis de glutatona reduzida. * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos (ANOVA/Bonferroni, Média \pm EPM).

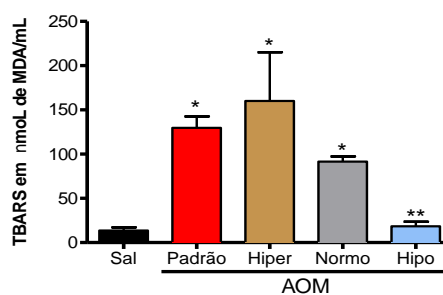


Fonte: elaborada pelo autor.

4.7.2 TBARS

A média de TBARS observada nos grupos Padrão (129,7 \pm 12,9), Hiper (160,0 \pm 55,1) e Normolipídico (91,5 \pm 5,8) mostraram-se significativamente superiores ao grupo Salina (13,6 \pm 3,6) e Hipolipídico (18,3 \pm 5,2) ($p < 0.0001$). Houve redução dos níveis de TBARS no grupo Hipolipídico em relação aos grupos Padrão, Hiper e Normolipídico ($p < 0.0001$) (Figura 31).

Figura 31 – Níveis de TBARS. * $p < 0.05$ versus Salina; ** $p < 0.05$ versus Padrão, Hiper e Normolipídico (Kruskal-Wallis/Dunn, Média \pm EPM).



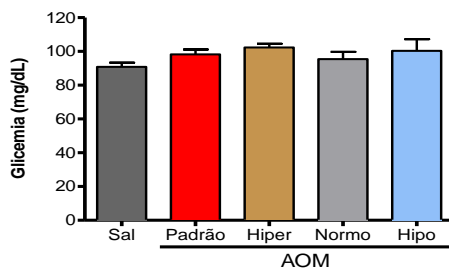
Fonte: elaborada pelo autor.

4.8 Avaliação bioquímica

4.8.1 Glicemia

A média da glicemia foi não significativa na comparação entre os grupos (Figura 32).

Figura 32 – Média de glicemia por grupo. * $p < 0.05$ ANOVA/Bonferroni (Média±EPM).



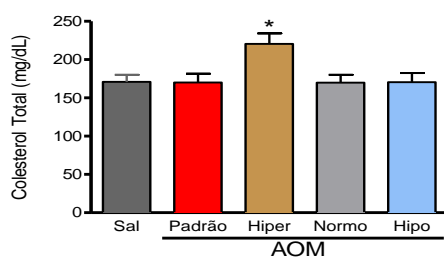
Fonte: elaborada pelo autor

4.8.2 Perfil lipídico

4.8.2.1 Colesterol Total

Apenas o grupo Hiperlipídico ($220,4 \pm 13,9$) mostrou aumento significativo do colesterol total em relação aos demais grupos Salina ($170,9 \pm 9,3$), Padrão ($170,2 \pm 11,3$), Normo ($169,9 \pm 10,2$) e Hipolipídico ($170,6 \pm 11,9$) ($p = 0.0128$) (Figura 33).

Figura 33 – Média de colesterol total por grupo. * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos, ANOVA/Bonferroni (Média±EPM).

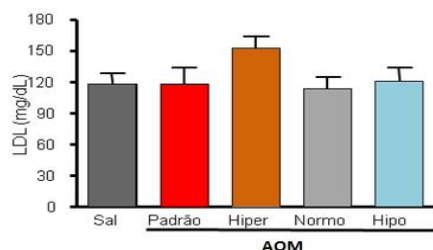


Fonte: elaborada pelo autor.

4.8.2.2 Colesterol LDL

A média de colesterol LDL nos grupos Salina ($117,7 \pm 10,0$), Padrão ($117,8 \pm 16,0$), Hiper ($152,1 \pm 11,4$), Normo ($113,9 \pm 10,3$) e Hipolipídico ($120,4 \pm 13,5$) não diferiu significativamente ($p=0.1933$) (Figura 34).

Figura 34 – Média de colesterol LDL por grupo. * $p < 0.05$, ANOVA/Bonferroni (Média \pm EPM).

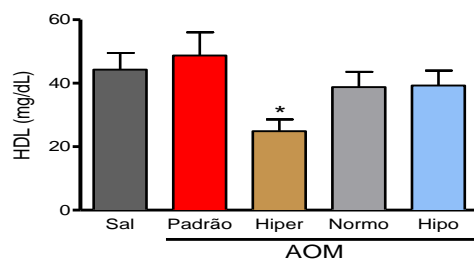


Fonte: elaborada pelo autor.

4.8.2.3 Colesterol HDL

O grupo Hiperlipídico apresentou média de colesterol HDL ($24,9 \pm 3,7$) significativamente inferior ao grupo Padrão ($48,7 \pm 7,2$), embora não tenha diferido dos demais grupos Salina ($44,3 \pm 5,3$), Normo ($38,8 \pm 4,8$) e Hipolipídico ($39,3 \pm 4,6$) ($p=0.0376$) (Figura 35).

Figura 35 – Média de colesterol HDL por grupo. * $p < 0.05$ em relação ao Padrão (ANOVA/Bonferroni, média \pm EPM).

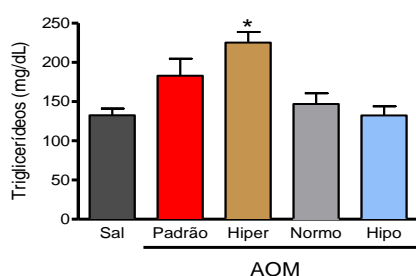


Fonte: elaborada pelo autor.

4.8.2.4 Triglicerídeos

O total de triglicerídeos do grupo Hiperlipídico ($225,3 \pm 13,5$) mostrou-se significativamente superior aos grupos Salina ($132,7 \pm 8,5$), Normo ($147,0 \pm 13,7$) e Hipolipídico ($132,3 \pm 11,8$), porém, não diferiu significativamente do grupo Padrão ($183,1 \pm 21,6$) ($p < 0,0001$) (Figura 36).

Figura 36 – Média de triglicerídeos por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao Salina, Normo e Hipolipídico (ANOVA/Bonferroni, média \pm EPM).

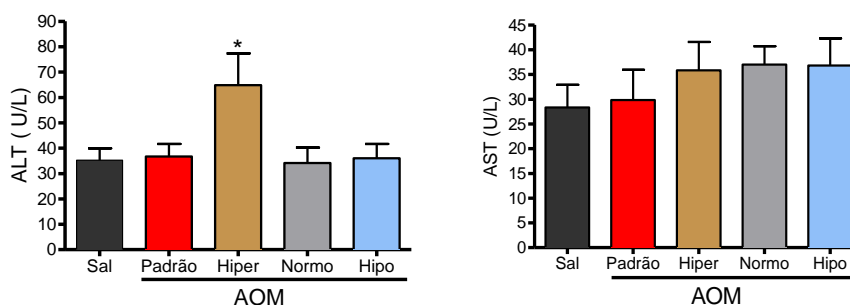


Fonte: elaborada pelo autor.

4.8.3 Enzimas hepáticas (AST e ALT)

Os níveis de ALT no grupo Hiperlipídico ($64,9 \pm 12,5$) mostraram-se significativamente superior aos grupos Salina ($35,2 \pm 4,7$), Padrão ($36,7 \pm 4,9$), Normo ($34,1 \pm 6,0$) e Hipolipídico ($36,0 \pm 5,7$) ($p = 0,0263$). Porém não houve diferença significativa entre os níveis de AST dos grupos Salina ($28,3 \pm 4,5$), Padrão ($29,8 \pm 6,1$), Hiper ($35,8 \pm 5,7$), Normo ($37,0 \pm 3,7$) e Hiperlipídico ($36,8 \pm 5,5$) ($p = 0,6531$) (Figura 37).

Figura 37 – Média de ALT e AST por grupo. * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos (ANOVA/Bonferroni, média \pm EPM).



Fonte: elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

As dietas atuais dos seres humanos têm uma proporção de ômega-6/ômega-3 que varia de 15/1 a 20/1, que promove a patogênese de doenças cardiovasculares, inflamatórias, autoimunes e vários tipos de cânceres como o CCR e o CHC, quando em comparação com a proporção de aproximadamente 1:1 no passado (SIMOPOULOS, 2006).

Dietas ricas em lipídios saturados e poliinsaturados do tipo ômega-6 favorecem a carcinogênese (NORAT *et al.*, 2005). A quantidade de ω -6 e ω -3 na dieta e suas razões ideais têm um importante papel na supressão da ciclooxigenase, bloqueando a formação dos eicosanóides pró-inflamatórios (HARDMAN, 2004). Os ácidos graxos ω -3 diminuem a capacidade das células mononucleares de produzir TNF- alfa, sendo a chave dos efeitos anti-inflamatórios, prevenindo assim a carcinogênese colorretal (CARMO; CORREIA, 2009).

Estudos epidemiológicos e experimentais têm mostrado que dietas ricas em lipídios e com alta taxa de calorias contribuem significativamente para o desenvolvimento da obesidade e esteato-hepatite gordurosa não alcoólica, uma vez que podem induzir peroxidação lipídica e consequente dano ao DNA. Desta forma, essas dietas são consideradas fator de risco para a carcinogênese hepática (CUI *et al.*, 2012; GOLDFARB *et al.*, 2012; DUAN *et al.*, 2014).

Modelos animais ajudam a elucidar a fisiopatologia das doenças neoplásicas, analisando inclusive fatores de riscos e contribuem, além do entendimento da sua formação, no desenvolvimento de medidas terapêuticas a partir de pesquisas experimentais (CAVIGLIA; SCHWABE, 2015).

O AOM é uma substância bem definida em modelo de carcinogênese cólica pela sua maior potência, praticidade, eficácia, além de produzir lesões com semelhança clínica, histopatológica e molecular em relação ao CCR em humanos (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2000; TAMMALI *et al.*, 2009; IMCHEN *et al.*, 2013). Seu mecanismo de indução de lesões pré-neoplásicas é atribuído ao aumento da expressão do gene c-fos e à diminuição do gene c-myc, assim como à mutação do gene K-ras. É geralmente preferido em relação à DMH por ser mais potente e requerer poucas reações para sua ativação (STOPERA; DAVIE; BIRD, 1992; CADERNI *et al.*, 2003).

Visto que dietas ricas em gorduras favorecem a carcinogênese cólica e hepática e que o AOM tem metabolização e ação sobre o fígado, procurou-se neste estudo identificar as repercussões hepáticas e sistêmicas em ratos alimentados com dietas de diferentes concentrações lipídicas (hiper, normo e hipolipídica) e com a mesma baixa relação ômega-6/ômega-3 e alta relação ômega-9/ômega-6 e submetidos à indução pelo AOM.

No presente estudo, a ingesta dos animais dos grupos controles (Padrão e Salina) foi significativamente maior quando comparada à ingesta dos grupos experimentos ($p < 0,001$). Comparando-se os grupos Salina e Padrão, não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,997$), mas entre o grupo Salina e os grupos Hiper, Normo e Hipolipídico houve diferença significativa ($p < 0,001$). Na comparação das ingestas do grupo Padrão com o Hipolipídico não houve diferença significativa nos dois últimos meses do experimento ($p > 0,05$) (Figura 2).

Isto pode ter ocorrido porque estas dietas não eram palatáveis aos roedores, já que eram de manipulação caseira e, principalmente no grupo Hiperlipídico, a dieta continha grande quantidade de lipídios favorecendo a saciedade (Apêndice F) (SANDE-LEE, VELLOSO, 2012). Cintra *et al.* (2012), em seu trabalho experimental com ratos para avaliar o papel dos ácidos graxos na disfunção hipotalâmica, demonstraram que injeções diárias de AG ômega-3 ou ômega-9 reduziram significativamente a ingesta espontânea dos animais. El-Gendy e Abbas (2014), ao investigar o papel de lipídios no metabolismo de ratos, identificaram que dieta rica em AG ômega-3 diminuiu a ingesta em ratos e atribuíram este achado a sua ação nos sistemas mesocorticolímbico e endocanabinóide, reduzindo o apetite, a ingesta, o sobrepeso e a obesidade.

Com relação à massa corpórea dos ratos, houve aumento no decorrer do tempo, apesar de ter ocorrido uma tendência à diminuição na velocidade de ganho de peso a partir do quinto mês. Esses dados estão de acordo com o exposto por Lahouar *et al.* (2014), que em sua pesquisa experimental usando o AOM para induzir carcinogênese cólica associada à dieta rica em fibras como proteção contra o seu desenvolvimento também mostraram esse mesmo padrão de ganho ponderal.

Esse ganho constante de massa corpórea que, inicialmente, mostrou-se positivamente acelerado, mas que, no decorrer dos dias, desacelerou-se gradativamente tendendo a uma relativa estabilidade assintótica é a tendência conhecida na evolução ponderal de ratos Wistar (CURI *et al.*, 1984; TOMANARI; PINE; SILVA, 2003).

Neste estudo, desde o seu início até a eutanásia, observou-se que a massa corpórea dos animais dos grupos Salina e Padrão foi significativamente maior quando comparada à massa dos animais dos grupos Hiper, Normo e Hipolipídico, o que pode ser explicado pela maior quantidade de ingesta dos grupos alimentados com dieta padrão (Salina e Padrão) quando em comparação com os grupos das dietas experimentais (Figuras 2 e 3).

A suplementação de PUFAs contribui para reduzir a gordura corporal com ação principalmente na adiposidade abdominal e estimula a oxidação lipídica em adultos saudáveis. EPA e DHA aumentam a perda de peso e regulam a expressão gênica do tecido adiposo de modo semelhante à restrição calórica independentemente da perda da massa gorda (SIMOPOULOS, 2010).

São bem conhecidos os efeitos benéficos dos PUFAs no tecido adiposo tais como prevenção de hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo, indução de biogênese mitocondrial em adipócitos, indução da secreção de adiponectina e redução da inflamação do tecido adiposo (KOPECKY *et al.*, 2009). Burlamaqui *et al.* (2013) verificaram redução da massa corpórea em ratos alimentados com dietas ricas em ômega 3, 6 e 9 e submetidos à carcinogênese cólica por AOM.

Outro fato, é que os animais dos grupos das dietas manipuladas apresentaram diarreia desde o início, contribuindo para a baixa massa corpórea apresentada (Figura 3). Os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram diarreia grau 3, valor significativamente superior aos grupos Salina, Padrão, Normo e Hipolipídico. Os animais dos grupos Normo e Hipolipídico apresentaram diarreia grau 2, valores significativamente superiores aos grupos Salina e Padrão ($p < 0.001$) (Tabela 1). Sabe-se que altas doses de ômega-3 apresentam poucos efeitos colaterais, sendo o principal deles a diarreia (CARMO; CORREIA, 2009).

Os grupos Salina e Padrão, alimentados com a mesma dieta padrão (Biobase Bio-tec Ratos e Camundongos®) não apresentaram diferença significativa da massa corporal no início, à administração de AOM, nem no final do experimento (Figura 3). Desta forma, pode-se inferir que o AOM não interferiu na ingesta dos animais e conseqüentemente na massa corporal final.

Esse dado está de acordo com o observado nos estudos de Ghafar *et al.* (2012), Zhong *et al.* (2012) e Lahouar *et al.* (2014), nos quais o AOM também não causou diferenças significantes no peso corporal entre os grupos experimentos estudados. Por sua vez, Shimizu *et*

al. (2008) demonstraram que o uso de AOM resultou em perda de peso em ratos com obesidade e diabetes mellitus. Os autores atribuíram este achado a maior suscetibilidade de ratos diabéticos à toxicidade do AOM.

Não houve diferença significativa na massa do fígado entre os grupos controles e experimentos ($p=0,247$). No entanto, o grupo tratado com a dieta hipolipídica apresentou aumento significativo da relação percentual entre o peso do fígado e o peso final do animal em relação aos demais grupos ($p<0,001$) (Figuras 4 e 5).

Esse dado está de acordo com a literatura, onde fígado e rim de ratos tratados com AOM não sofreram alterações de peso quando alimentados com Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) (GHAFAR *et al.*, 2012). Em animais tratados com dietilnitrosamina (DEN), para promoção da carcinogênese hepática, também não houve aumento estatisticamente significativo no peso do fígado (UEHARA *et al.*, 2013). Por outro lado, em estudo cujos ratos foram alimentados com dieta rica em fibras (Barley “Rihane”) e expostos ao AOM, verificou-se aumento no peso do fígado (LAHOUAR *et al.*, 2011).

Quanto à relação percentual entre a massa do fígado e a massa final do animal, que foi aumentada no grupo Hipolipídico, pode ser atribuída ao fato de os animais desse grupo terem apresentado massa hepática maior em relação aos demais grupos, apesar de não ter sido estatisticamente significativa.

Em relação à macroscopia, houve aumento significativo no grupo Padrão na frequência de tumores cólicos e lesões hepáticas (cistos e nódulos) em relação ao grupo Salina. Ocorreu redução significativa das lesões hepáticas no grupo Hipolipídico em relação ao Padrão (Tabela 2).

Estes achados comprovam o valor do modelo de carcinogênese utilizado, onde os animais expostos ao AOM apresentaram aumento significativo na frequência de tumores cólicos e lesões hepáticas em relação ao grupo Salina (BURLAMAQUI *et al.*, 2013). O grupo alimentado com dieta hipolipídica apresentou uma possível proteção contra as lesões hepáticas devido a menor quantidade absoluta de ácidos graxos ω -3, ω -6 e ω -9 e baixa razão ω -6/ ω -3 e alta ω -9/ ω -6, características consideradas antineoplásicas (Apêndices E e H) (ROYNETTE *et al.*, 2004; MARTINS; GRUEZO, 2009).

Houve aumento significativo do número de animais com adenomas colorretais nos grupos Normo e Hipolipídico em relação ao Salina. Em relação ao CCR, verificou-se uma maior incidência no grupo Padrão, enquanto que o grupo Hipolipídico foi o que apresentou possível proteção contra a carcinogênese (Tabela 3). Este fato provavelmente ocorreu devido à alta relação ω -6: ω -3 e uma baixa relação ω -9: ω -6 presente no grupo Padrão, a qual poderia interferir no processo de carcinogênese, principalmente nos estágios mais iniciais (CALDER, 2006; CALDER, 2007; BURLAMAQUI *et al.*, 2012). He *et al.*, (2014), em um trabalho utilizando ratos induzidos com AOM para a carcinogênese cólica, mostraram o efeito antiinflamatório da dieta com óleo de canola, rica em ácidos graxos poliinsaturados e monoinsaturados, ao reduzir citocinas pró-inflamatórias, prevenindo a formação de focos de criptas aberrantes e o desenvolvimento tumoral, confirmando os achados do presente estudo.

Quanto às alterações hepáticas, não houve diferença significativa entre os grupos em relação à esteatose leve ($p=0,735$), moderada ($p=0,243$), grave ($p=0,483$) (Figuras 9-11; Tabela 4).

Sabe-se que a esteatose consiste no acúmulo de lipídeos nas células parenquimatosas hepáticas, podendo ser macrovesicular, com distensão do hepatócito por um único e volumoso vacúolo e deslocamento nuclear ou microvesicular, com numerosos e menos volumosos vacúolos, mantendo-se a localização central do núcleo (DAY; JAMES, 1998). A macrovesicular é associada a distúrbio de longa duração do metabolismo hepático de lipídeos, podendo ser associada ao desenvolvimento da esteatohepatite, fibrose e cirrose (BACON *et al.*, 1994 OLESZCZUK *et al.*, 2007). É classificada em quatro graus, de acordo com o percentual de acometimento dos hepatócitos: 0 (ausência), 1 – leve (>0% a 33%), 2 – moderada (>33% a 66%) e 3 – grave (>66%) (BRUNT *et al.*, 1999).

Esperava-se que os grupos Padrão e Hiperlipídico apresentassem um maior número de animais com esteatose, uma vez que ambos foram expostos ao AOM e o Hiperlipídico apresentou maior quantidade total de gordura (45%) com consequente deposição lipídica no fígado, estresse oxidativo e peroxidação lipídica, os quais poderiam levar à esteatose hepática (DIEHL, 2005; ITO *et al.*, 2006). Porém, os grupos experimentos apresentaram uma baixa razão ω -6/ ω -3 e alta razão ω -9/ ω -6 (efeito protetor), enquanto o grupo Padrão, com baixo teor de gordura (12%), continha relação inversa entre os ômega.

No final do experimento, os animais atingiram 39 semanas de vida e, conforme estudado por Sengupta (2011), aos 5-6 meses o rato Wistar é considerado adulto maduro e, a partir de 10 meses, inicia-se o processo de senilidade. Desta forma, uma explicação para o grupo Salina ter se comportado de maneira semelhante aos grupos induzidos com AOM foi porque o fígado de animais senis também pode apresentar degeneração e áreas de esteatose, com células mais claras, vacuolizadas e abalonadas, núcleos mais volumosos e de formato irregular (GAGLIANONE *et al.*, 1991; AYDIN *et al.*, 2010).

A presença de focos de células claras foi observada significativamente superior nos grupos Padrão e Hipolipídico em relação ao Salina ($p=0.040$) (Figura 12).

Houve aumento significativo do número de animais exibindo focos de células anofílicas no grupo Padrão em relação ao Salina e redução significativa nos grupos tratados com dietas hiper, normo e hipolipídica em relação ao Padrão ($p=0.001$) (Figura 13).

O número de animais com focos de células tigróides no grupo Padrão foi significativamente superior ao grupo Salina ($p=0.020$). O grupo tratado com dieta hipolipídica apresentou redução significativa do número de animais exibindo essa alteração em relação ao Padrão (Figura 14).

O grupo tratado com dieta hiperlipídica apresentou aumento significativo do número de animais com focos de células acidófilas em relação aos grupos Padrão, Salina, Normo e Hipolipídico ($p=0.001$) (Figura 15).

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à quantidade de focos de células vacuolares ($p=0.109$), intermediárias ($p=0.107$), basofílicas ($p=0.141$), oncócicas ($p=0.135$) e pequenas ($p=0.443$) (Figuras 16-20).

O número total de focos de células alteradas no grupo Padrão foi significativamente maior que o número de focos de células no grupo Salina. Não houve diferença significativa entre o grupo Padrão e os tratados com dietas hiper e normo, porém o grupo tratado com dieta hipolipídica apresentou uma redução significativa desses valores ($p<0.001$) (Figura 21; Tabela 5).

Uma possível contribuição para o aparecimento dessas lesões no fígado dos ratos deste experimento é o fato de o AOM sabidamente induzir alterações histológicas hepáticas nesses animais. Lahouar *et al.* (2014) mostraram que o fígado de ratos submetidos ao AOM na dose de 20mg/kg de peso apresentava grave degeneração gordurosa e infiltração de leucócitos na

veia porta. Khurana *et al.* (2013) verificaram que o AOM na dose de 10mg/kg de peso induziu ativação de células estreladas hepáticas, deposição de colágeno, proliferação dos ductos biliares, nódulos e fibrose hepáticas. Burlamaqui *et al.* (2013) mostraram que, no modelo da carcinogênese colorretal, as lesões hepáticas pré-neoplásicas e neoplásicas apareceram e evoluíram na proporção do tempo e dose de exposição ao AOM (15 e 20mg/kg de peso).

A quantidade de focos de células claras, anfófilas e tigróides se mostrou significativamente maior no grupo Padrão, o que pode ser explicado pela dieta utilizada por este grupo no experimento, a qual apresentava relação ω -6/ ω -3=8:1, ω -9/ ω -6= 0,4:1 e Poli:Saturada=5,2:1, percentual de gordura poliinsaturada (54%), monoinsaturada (24%) e saturada (15%) (Apêndice E; Anexo B). Apesar de esta dieta ter apresentado baixo percentual de lipídios (12%), semelhante ao grupo Hipolipídico, a sua alta relação de ω -6/ ω -3 e a baixa ω -9/ ω -6 pode ter favorecido os maiores índices de lesões pré-neoplásicas apresentados por este grupo (PADIDAR *et al.*, 2012; IATROPOULOS *et al.*, 2013; DUAN *et al.*, 2014).

O número de focos de células acidófilas foi significativamente maior no grupo tratado com dieta hiperlipídica. Esses focos caracterizam-se, juntamente com as células claras, por apresentar depósito de glicogênio em excesso, uma vez que há diminuição da atividade da glicose-6-fosfatase. Sabe-se que o padrão histoquímico enzimático desses focos sofre influência de muitos fatores, tais como estado nutricional dos animais, ritmo circadiano no metabolismo dos hepatócitos e localização nos lóbulos hepáticos (BANNASCH; ZERBAN, 1990). Segundo Aoki (2003), a suplementação lipídica, em ratos, promoveu redução da utilização de carboidratos no músculo e no fígado, favorecendo o acúmulo do glicogênio hepático.

Estudos mostram que FHA no fígado de ratos apresentam diferentes fenótipos e que os mesmos tendem a mudar sequencialmente durante a carcinogênese hepática. Focos de células vacuolares apresentam acúmulo importante de gordura e, geralmente, surgem mais tardiamente que as células caracterizadas pelo depósito de glicogênio, inclusive podendo desenvolver-se a partir das mesmas. Estudos sugerem que focos de células intermediárias representam um estágio intermediário entre focos de células acidófilas e basofílicas (BANNASCH; ZERBAN, 1990).

Os focos de células basofílicas têm sido reconhecidos e largamente aceitos como um estágio inicial do CHC. Seu citoplasma é pobre em glicogênio e difusamente basofílico devido à abundância de ribossomos. Ocasionalmente, mostram células polimórficas com atipias nucleares

e mitoses frequentes (BANNASCH; ZERBAN, 1990). Apesar de existir uma diversidade fenotípica considerável e instabilidade dos FHA, estudos sugerem que os mesmos não ocorrem de forma aleatória, mas, sim, como partes integrais das três linhagens pré-neoplásicas hepatocelulares: glicogenótica-basofílica, sua variante xenomórfica-tigróide e anfofílica-basofílica. A sequência celular predominante tem início com as células acidófilas ou claras ricas em glicogênio, progredindo para células intermediárias, basofílicas e, por fim, culminando em nódulos (adenomas) e CHC (BANNASCH; HAERTEL; SU, 2003).

Focos de células oncocíticas ocorrem principalmente em fígados cirróticos cuja etiologia principal é a infecção pelo vírus da Hepatite B, o que não ocorreu no presente experimento. Focos de células pequenas têm características heterogêneas, tornando difícil a sua identificação (SU; BANNASCH, 2003).

Bishayee *et al.*, (2010) mostraram o efeito quimiopreventivo do Resveratrol na hepatocarcinogênese experimental ao suprimir a cascata inflamatória. Duan *et al.*, (2014), em sua pesquisa com ratos desnutridos e tratados com DEN, verificaram que dieta rica em lipídios poderia atuar como inibidor da carcinogênese hepática possivelmente pelo seu efeito anti-proliferativo e estimulador da apoptose.

Deve-se levar em consideração o fato de os ratos utilizados no presente trabalho serem de idade mais avançada, uma vez que o fígado de quase todos os animais senis contém FHA. Essa diferenciação entre lesões induzidas por substância carcinogênica hepática ou decorrentes do processo natural de envelhecimento do animal só seria possível se o número e tamanho dos FHA fossem determinados através de estudos morfométricos (BANNASCH; HAERTEL; SU, 2003).

Todos os grupos (Padrão; Hiper; Normo; Hipo) apresentaram espongiose de forma significativamente superior ao grupo Salina ($p < 0.001$), mostrando efeito eminentemente do AOM nestes achados (Figura 22).

Os grupos Padrão e tratados com dietas hiper e normolipídica apresentaram aumento significativo do número de animais exibindo peliose em relação ao grupo Salina ($p = 0.006$) (Figura 24).

A presença de colangioma foi observada em todos os grupos (Padrão; Hiper; Normo; Hipo) significativamente superior ao grupo Salina ($p = 0.010$) (Figura 25).

A presença de adenomas hepáticos foi observada nos grupos tratados com dietas hiper e normolipídica, valores significativamente superiores aos grupos Salina e Padrão ($p=0.003$) (Figura 27).

Houve um aumento significativo de lesões do tipo espongiase e peliose e neoplásica (colangioma) nos grupos Padrão e nos que receberam a dieta experimental, o que está de acordo com a literatura, uma vez que o AOM favorece a agressão hepática (KHURANA *et al.*, 2010; KHURANA *et al.*, 2013; LAHOUAR *et al.*, 2014).

A quantidade de adenomas hepáticos foi significativamente superior nos grupos tratados com dietas hiper e normolipídica. Uma possível explicação estaria no fato de as células acidófilas, ricas em glicogênio, serem componentes celulares importantes do adenoma hepático. O acúmulo de glicogênio hepático em ratos ocorre na vigência de suplementação lipídica, uma vez que há diminuição da captação periférica de glicose nos músculos (AOKI; BELMONTE; SEELAENDER, 2003).

Houve aumento significativo de atipias no grupo Padrão em relação ao grupo Salina e houve redução significativa destas nos grupos com dietas hiper, normo e hipolipídica em relação ao grupo Padrão ($p<0.001$) (Figura 28). Poudyal *et al.* (2012) verificaram, em ratos, que lesões hepáticas foram atenuadas por dieta baseada em semente de *chia*, rica em AG ômega-3, provavelmente devido os seus efeitos antiinflamatórios.

Atipias celulares hepáticas constituem-se na perda das características típicas das células do fígado. Podem ocorrer em lesões neoplásicas e não-neoplásicas. Focos displásicos são lesões microscópicas que medem menos de 1mm e constituem-se em alterações de grandes e pequenas células. Nestas últimas, as alterações são consideradas lesões precursoras mais desenvolvidas quando em comparação com as de grandes células, cuja heterogeneidade da lesão pode representar tanto alterações reativas como uma verdadeira pré-neoplasia. Nódulos displásicos podem ser classificados em baixo e alto grau de acordo com atipia. Os de alto grau mostram alterações moleculares semelhantes às do CHC e têm elevado risco de transformação maligna. A detecção precoce de lesões verdadeiramente pré-neoplásicas pode ser realizada pela aplicação de marcadores através da imunohistoquímica (PARK, 2011).

O número total de alterações microscópicas hepáticas excetuando-se esteatose mostrou-se significativamente superior no grupo Padrão em relação ao Salina. O grupo tratado

com dieta hipolipídica apresentou redução significativa em relação ao Padrão ($p < 0.001$) (Figura 29; Tabela 5). Weylandt *et al.* (2011) mostraram diminuição significativa da carcinogênese hepática em camundongos alimentados com dieta rica em AG ômega-3, demonstrando o papel protetor desta dieta no desenvolvimento tumoral hepático através do seu efeito anti-TNF- α .

Esses resultados mostraram que a dieta utilizada no presente estudo, com baixa razão ômega-6/ômega-3 e alta razão ômega-9/ômega-6 apresentou efeito protetor contra o aparecimento de lesões hepáticas pré-neoplásicas e neoplásicas (adenoma e colangioma) em ratos induzidos com AOM para o desenvolvimento de carcinogênese cólica.

O estresse oxidativo, fenômeno também envolvido na carcinogênese e influenciado por dieta com equilíbrio entre os lipídios, foi mensurado pela dosagem da glutatona reduzida e do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Observou-se que a média de glutatona reduzida no grupo Hipolipídico foi significativamente superior à média de glutatona de todos os grupos estudados: Salina, Padrão, Hiper e Normolipídico ($p < 0.0001$) (Figura 30). Embora a relação entre os ômeegas permanecesse a mesma, a menor quantidade de gordura no grupo Hipolipídico em relação aos outros contribuiu para esta diferença. O grupo Salina também foi significativo em relação ao Padrão, onde a única variável entre eles foi à exposição ao AOM. Heyland *et al.* (2006) mostraram que pacientes terminais apresentaram diminuição do estresse oxidativo e maior sobrevida quando suplementados com glutamina.

A média de TBARS observada nos grupos Padrão, Hiper e Normolipídico mostrou-se significativamente superior ao grupo Salina e Hipolipídico ($p < 0.0001$) (Figura 31). Uma possível explicação para este achado foi a dieta pobre em gordura do grupo Hipolipídico com alta razão ω -9: ω -6 e baixa ω -6: ω -3 eficaz na prevenção de carcinogênese cólica por diminuir a peroxidação lipídica. Melo *et al.* (2010) verificaram, em ratos, que ômega-3 agiu como antioxidante na regeneração hepática, enquanto ômega-6 apresentou ações pró-oxidantes, aumentando as concentrações de TBARS no sangue e no fígado.

No que diz respeito ao perfil lipídico, o grupo Hiperlipídico apresentou os maiores índices de colesterol total, colesterol LDL e triglicerídeos e o menor de colesterol HDL em relação aos grupos Salina, Padrão, Normo e Hipolipídico. A média da glicemia e de AST não

diferiu entre os grupos do estudo, mas ALT foi significativamente maior no grupo Hiperlipídico em relação aos demais grupos (Figuras 32-37).

Estes resultados não foram os encontrados em outros trabalhos, onde uma dieta rica em ácidos graxos ômega-3 reduziu os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos e aumentou o colesterol HDL (AGUILERA *et al.*, 2004; ROBERT, 2005; BURLAMAQUI *et al.*, 2011). Buckland *et al.* (2012) mostraram que dietas com alta concentração de ω -9 controlavam a glicemia, reduziam a inflamação sistêmica e diminuíaam o risco cardiovascular pela melhora do perfil lipídico.

Uma explicação para estes achados é a maior quantidade total de gordura presente no grupo Hiperlipídico (45%) em relação ao Padrão (12%), Normolipídico (30%) e Hipolipídico (12%). Outro fator que pode ter contribuído foi o percentual aumentado de gordura saturada presente nas dietas manipuladas (23,30%) em relação à dieta Padrão (15%) (Apêndice E; Anexo B).

O modelo de carcinogênese empregado favoreceu o aparecimento de lesões neoplásicas cólicas e causou repercussões hepáticas tais como: focos de células alteradas (claras, anofílicas, tigróides e acidófilas), espongiose, peliose, colangioma, adenomas e atipias. Por outro lado, a utilização de dietas hiperlipídicas, normolipídicas e hipolipídicas, com baixa razão ω -6/ ω -3 e alta razão ω -9/ ω -6 reduziu o aparecimento de lesões pré-neoplásicas, neoplásicas, atipias, peroxidação lipídica e estresse oxidativo, promovendo, pois, o efeito protetor contra as alterações hepáticas.

O presente estudo apresentou limitações tais como a não realização de testes imunohistoquímicos, fundamentais na identificação de lesões neoplásicas pela utilização de marcadores tumorais específicos. (TOMMASO *et al.*, 2009; SALOMAO; MCMILLEN; LEFKOWITCH, 2012; JIN *et al.*, 2013; FITZMORRIS; SINGAL, 2015; CANZONIERI *et al.*, 2015). Este método diagnóstico seria necessário para definição da origem das atipias encontradas, o que não foi realizado neste trabalho.

Mais estudos serão necessários, utilizando-se o modelo do AOM com o objetivo de descobrir novas dietas para identificar sua verdadeira ação na carcinogênese colorretal e suas possíveis repercussões hepáticas.

6 CONCLUSÃO

Dietas hiperlipídica, normolipídica e hipolipídica, com elevada relação ômega 9/ ômega 6 e baixa relação ômega 6/ ômega 3, em modelo de carcinogênese cólica e toxicidade hepática causam:

1. Redução das lesões displásicas no fígado, diminuição da peroxidação lipídica e elevação da capacidade antioxidante em ratos alimentados com dieta hipolipídica.
2. Redução da ingesta alimentar e da massa corpórea em animais alimentados com dietas hiper, normo ou hipolipídica.

7 REFERÊNCIAS

AGUILERA, A.A.; DÍAZ, G.H.; BARCELATA, M.L.; GUERREIRO, O.A.; ROS, R.M.O. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids and tumor necrosis factor- α in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. **J Nutr Biochem**. v. 15, n. 6, p. 350-357, 2004.

AHMEDIN, J.D.V.M.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; JACQUES FERLAY, M.E.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Cancer Statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

ANDRADE, P. M. M.; DO CARMO, M. G. T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **Rev Mn-Metabólica**. v. 8, n. 3, p. 135-143, 2006.

AOKI, M.S.; BELMONTE, M.A.; SEELAENDER, M.C.L. Influência da suplementação lipídica sobre a indução do efeito poupador de glicogênio em ratos submetidos ao exercício de "endurance". **Rev Paul Educ Fís**. v. 17, n. 2, p. 93-103, 2003.

AYDIN, S.; ATUKEREN, P.; ÇAKATAY, U.; UZUN, H.; AUTUG, T. Gender-dependent oxidative variations in liver of aged rats. **Biogerontology**. v. 11, p. 335-346, 2010.

BACON, B.R.; FARAHVASH, M.J.; JANNEY, C.G.; NEUSCHWANDER-TETRI, B.A. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. **Gastroenterology**. v. 107, p. 1103-1109, 1994.

BANNASCH, P.; BLOCK, M.; ZERBAN, H. Spongiosis hepatitis. Specific changes of the perisinusoidal liver cells induced in rats by N-nitrosomorpholine. **Lab Invest**, v. 44, p. 252-264, 1981.

BANNASCH, P. Strain and species differences in susceptibility to liver tumour induction. In: *Modulators of Experimental Carcinogenesis*, IARC Scientific Publications, n. 51, p. 9-38, 1983.

BANNASCH, P.; ZERBAN, H. **Tumours of the liver**. In: Turosov V.S., Mohr U., editors. *Pathology of tumor in laboratory animals*. Lyons: IARC; p. 199-240, 1990.

BANNASCH, P.; NEHRBASS, D.; KOPP-SCHNEIDER, A. Significance of hepatic preneoplasia for cancer chemoprevention. **IARC Sci Publ**. v. 154, p. 223-240, 2001.

BANNASCH, P.; HAERTEL, T.; SU, Q. Significance of hepatic preneoplasia in risk identification and early detection of neoplasia. **Toxicol Pathol**. v. 31, n. 1, p. 134-139, 2003.

BARTSCH, H.; NAIR, J.; OWEN, RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. **Carcinogenesis**. v. 20, n. 12, p. 2209-2218, 1999.

BERNHEIM F.; BERNHEIM M. L. C.; WILBUR K. M. J. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products on certain lipids. **J. Biol. Chem**. v. 174, p.257-264, 1948.

BIRD, R.P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer lett**. v. 37, p. 147-151, 1987.

BIRD, R.P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Lett.** v. 93, n. 1, p. 55-71, 1995.

BISHAYEE, A.; WAGHRAY, A.; BARNES, K.F.; MBIMBA, T.; BHATIA, D.; CHATTERJEE, M.; DARVESH, A.S. Suppression of the inflammatory cascade is implicated in Resveratrol chemoprevention of experimental hepatocarcinogenesis. **Pharmaceutical Research.** v. 27, n. 6, p. 1080-1091, 2010.

BOATENG, J.; VERGHESE, M.; CHAWAN, C.B.; SHACKELFORD, L.; WALKER, L.T.; KHATIWADA, J.; WILLIAMS, D.S. Red palm oil suppresses the formation of azoxymethane (AOM) induced aberrant crypt foci (ACF) in fisher 334 male rats. **Food Chem. Toxicol.** v. 44, p.1667-1673, 2006.

BRUNT, E.M.; JANNEY, C.G.; BISCEGLIE, A.M.D.; NEUSCHWANDER-TETRI, B.A.; BACON, B.R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **American Journal of Gastroenterology.** v. 94, p. 2467–2474, 1999.

BUCKLAND, G.; MAYEN, A. L.; AGUDO, A.; TRAVIER, N.; NAVARRO, C.; HUERTA, J.M.; CHIRLAQUE, M.D.; BARRICARTE, A.; ARDANAZ, E.; MORENO-IRIBAS, C.; MARIN, P.; QUIRÓS, J.R.; REDONDO, M-L.; AMIANO, P.; DORRONSORO, M.; ARRIOLA, L.; MOLINA, E.; SANCHEZ, M-J.; GONZALEZ, C.A. Olive oil intake and mortality with in the Spanish population (EPIC_SPAIN). **Am J Clin Nutr.** v. 96, p. 142-149, 2012.

BUGIANESI, E.; PAGOTTO, U.; MANINI, R.; VANNI, E.; GASTALDELLI, A.; DE LASIO, R.; GENTILCORE, E.; NATALE, S.; CASSADER, M.; RIZZETTO, M.; PASQUALI, R.; MARCHESINI, G. Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 90, n. 6, p. 3498-3504, 2005.

BURLAMAQUI, I.M.B.; DORNELAS, C.A.; VALENCA JUNIOR, J.T.; MESQUITA, F.J.C.; VERAS, L. B.; RODRIGUES, L.V. Hepatic and biochemical repercussions of a polyunsaturated fat-rich hypercaloric and hyperlipidic diet in Wistar rats. **Arq Gastroenterol.** v. 48, n. 2, p. 153-158, 2011.

BURLAMAQUI, I.M.B.; DORNELAS, C.A.; VALENCA JUNIOR, J.T.; MOTA, D.M.C.; MESQUITA, F.J.C.; VERAS, L. B.; VASCONCELOS, P.R.L.; RODRIGUES, L.V. Effect of a hyperlipidic diet rich in omegas 3, 6 and 9 on aberrant crypt formation in rat colonic mucosa. **Acta Cir. Bras.,** v.27, n.1, p. 30-35, 2012.

BURLAMAQUI, I.M.B.; DORNELAS, C.A.; VERAS, L.B.; BRITO, L.A.; TRIDADE JUNIOR, J.W.M.; SUCUPIRA, R. M.; AZEVEDO, O.G.R.; VASCONCELOS, P.R.L.; RODRIGUES, L.V. Ponderal behavior of rats fed an omegas 3, 6 and 9 enriched diet submitted to colon carcinogenesis induced by azoxymethane. **Acta Cir. Bras.,** v.28, n.10, p. 721-727, 2013.

BURLAMAQUI, I.M.B.; DORNELAS, C.A.; ALMEIDA, P.R.C.; JAMACARU, F.V.F.; MOTA, D.M.C.; MESQUITA, F.J.C.; BRITO, L.A.; VERAS, L.B.; RODRIGUES, L.V. Hepatic

repercussions of azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis. **Rev Col Bras Cir.** v. 40, n. 2, p. 137-141, 2013.

CADERNI, G.; FEMIA, A.P.; GIANNINI, A.; FAVUZZA, A.; LUCERI, C.; SALVADORI, M.; DOLARA, P. Identification of mucin-depleted foci in the un sectioned colon of azoxymethane treated rats: correlation with carcinogenesis. **Cancer Res.** v. 63, n. 10, p. 2388-2392, 2003.

CALDER, P.C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **Am J Clin Nutr.** v. 83, n. 6, p. 1505-1519, 2006.

CALDER, P.C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **PLEFA.** v. 77, n. 5-6, p. 327-335, 2007.

CAMPOS, F.G.; WAITZBERG, D.L.; LOGULLO WAITZBERG, A.F.; HABR-GAMA, A.; KISS, D.R.; GAMA-RODRIGUES, J. Diet and colorectal cancer: current evidence for etiology and prevention. **Nutr Hosp.** v. 20, n. 1, p. 18-25, 2005.

CAMPOS, F.G. **Dieta e câncer colorretal: evidências atuais.** Procto Site – Portal Interativo de Coloproctologia. Edição nº 1 – julho 2007. Disponível em: <http://www.proctosite.com/nwsletter/conteudo.php?id_conteudo=19&id_informativo=6&id_informativo_edicao=6>. Acesso em: 10 dez. 2014.

CANZONIERI, V.; ALESSANDRINI, L.; CAGGIARI, L.; PERIN, T.; BERRETTA, M.; CANNIZZARO, R.; RE, V. Hepatocellular carcinoma: an overview of clinico-pathological and molecular perspectives. **WCRJ.** v. 2, n. 1, p. e485, 2015.

CARMO, M.C.N.S.; CORREIA, M.I.T.D. The role of omega-3 fatty acids in cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v. 55, n. 3, p. 279-287, 2009.

CAVIGLIA, J.M.; SCHWABE, R.F. Mouse models of liver cancer. **Methods in Molecular Biology.** v. 1267, p. 165-183, 2015.

CENTER, M.M.; JEMAL, A. International trends in liver cancer incidence rates. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 20, p. 2362-2368, 2011.

CINTRA, D.E.; ROPELLE, E.R.; MORAES, J.C.; PAULI, J.R.; MORARI, J.; SOUZA, C.T.; GRIMALDI, R.; STAHL, M.; CARVALHEIRA, J.B.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A. Unsaturated Fatty Acids Revert Diet-Induced Hypothalamic Inflammation in Obesity. **PLoS ONE.** v. 7, 2012.

COLINA, M.E.M.; MONZÓN, C.G. Obesidad y enfermedad hepática. **Gastroenterol Hepatol.** v. 33, n. 8, p. 591-604, 2010.

CUI, P.H.; RAWLING, T.; BOURGET, K.; KIM, T.; DUKE, C.C.; DODDAREDDY, M.R.; HIBBS, D.E.; ZHOU, F.; TATTAM, B.N.; PETROVIC, N.; MURRAY, M. Antiproliferative and antimigratory actions of synthetic long chain n-3 monounsaturated fatty acids in breast cancer cells that overexpress cyclooxygenase-2. **J Med Chem.** v. 55, p. 7163–7172, 2012.

CUMMINGS, O.W. Pathology adenoma-carcinoma sequence: from aberrant crypt focus to invasive carcinoma. **Semin Gastrointest Dis.** v. 11, n.4, p. 229-237, 2000.

CURI, R.; HELL, S.; BAZOTTE, R. B.; TIMO-IARIA, C. Metabolic performance of free fed rats subjected to prolonged fast as compared to the metabolic pattern in rats under long term food restriction. **Physiology & Behavior.** v. 33, p. 525-531, 1984.

DAY, C.P.; JAMES, O.L.W. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? **Gastroenterology.** v. 114, p. 842-845, 1998.

DELLA CORTE, C.; COLOMBO, M. Surveillance for hepatocellular carcinoma. **Semin Oncol.** v. 39, p. 384-398, 2012.

DIEHL, A.M. Lessons from animal models of NASH. **Hepatology Res.** v. 33, p. 138-144, 2005

DRAGAN, Y.P.; CAMPBELL, H.A.; XU, X.H.; PITOT, H.C. Quantitative stereological studies of a ‘selection’ protocol of hepatocarcinogenesis following initiation in neonatal male and female rats. **Carcinogenesis.** v. 18, n. 1, p. 149-158, 1997.

DUAN, X.; PAN, Q.; YAN, S.; DING, W.; FAN, J.; QIAO, L. High-saturate-fat diet delays initiation of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. **BMC Gastroenterology.** v. 14, p. 195, 2014.

EL-GENDY, A.A.; ABBAS, A.M. Effect of omega-3 fatty acids on haemostatic functions in urocortin-treated obese rats. **J Physiol Biochem.** v. 70, p. 809-820, 2014.

EL-SERAG, H.B.; RUDOLPH, K.L. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. **Gastroenterology.** v. 132, p. 2557-2576, 2007.

FARAZI, P.A.; DEPINHO, R.A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: From genes to environment. **Nat Rev Cancer.** v. 6, p. 674-687, 2006.

FAUSTO, N.; CAMPBELL, J.S. Mouse models of hepatocellular carcinoma. **Semin Liver Dis.** v. 30, p. 87-98, 2010.

FELDSTEIN, A.E.; CANBAY, A.; ANGULO, P.; TANIAI, M.; BURGART, L.J.; LINDOR, K.D.; GORES, G.J. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. **Gastroenterology.** v. 125, p. 437-443, 2003.

FERLAY, J.; SHIN, H.R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer.** v. 127, n. 2, p. 893-917, 2010.

FITZMORRIS, P.; SINGAL, A.K. Surveillance and diagnosis of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology & Hepatology.** v. 11, n. 1, p. 38-46, 2015.

FÜRST, P. The striking diet island of Crete: lipid nutrition from the palaeolithic to the affluent modern society. **Clin Nutr.** v. 21, n. S2, p. 9-14, 2002.

GAGLIANONE, M.C.; SILVA NETTO, C.R.; SALA, M.A.; LOPES, R.A.; CAMPOS, G.M.; PETENUSCI, S.O. Estudo morfológico do fígado de ratos durante o envelhecimento. **Rev Esc Farm Odontol Alfenas.** v. 13, p. 91-100, 1991.

GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A.S. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Rev Nutr Campinas.** v. 19, n. 5, p. 611-625, 2006.

GHAFFAR, S.A.A.; YAZAN, L.S.; TAHIR, P.M.; ISMAIL, M. Kenaf seed supercritical fluid extract reduces aberrant crypt foci formation in azoxymethane-induced rats. **Experimental and Toxicologic Pathology.** v. 64, p. 247-251, 2012.

GOLDFARB, Y.; SHAPIRO, H.; SINGER, P.; KALDERON, Y.; LEVI, B.; GLASNER, A.; BENISH, M.; BEN-ELIYAHU, S. Fish oil attenuates surgery-induced immunosuppression, limits post-operative metastatic dissemination and increases long-term recurrence-free survival in rodents inoculated with cancer cells. **Clin Nutr.** v. 31, p. 396-404, 2012.

GOMES, M.A.; PRIOLLI, D.G.; TRALHÃO, J.G.; BOTELHO, M.F. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. **Rev Assoc Med Bras.** v. 59, n. 5, p. 514-524, 2013.

HARDMAN, W.E. ω -3 Fatty acids and cancer therapy. **J Nutr.** V. 134, p. 3427-3430, 2004.

HE, X.Q.; CICHELO, S.A.; DUAN, J.L.; ZHOU, J. Canola oil influence on Azoxymethane-induced colon carcinogenesis, hypertriglyceridemia and hyperglycemia in Kunming mice. **Asian Pac J Cancer Prev.** v. 15, n. 6, p. 2477-2483, 2014.

HEYLAND, D.K.; DHALIWAL, R.; DAY, A.G.; MUSCEDERE, J.; DROVER, J.; SUCHNER, U.; COOK, D. Reducing Deaths due to Oxidative Stress (The REDOXS Study): Rationale and study design for a randomized trial of glutamine and antioxidant supplementation in critically-ill patients. **Proc Nutr Soc.** v.65, n.3, p.250-263, 2006.

HONG, S.; LEE, H.J.; KIM, S.J.; HAHM, K.B. Connection between inflammation and carcinogenesis in gastrointestinal tract: focus on TGF-beta signaling. **World J Gastroenterol.** v. 16, p. 2080-2093, 2010.

HUI, J.M.; HODGE, A.; FARRELL, G.C.; KENCH, J.G.; KRIKETOS, A.; GEORGE, J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- α or adiponectin? **Hepatology.** v. 40, n. 1, p. 46-54, 2004.

HUTLEY, L.; PRINS, J.B. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. **Am J Med Sci.** v. 330, p. 280-289, 2005.

IATROPOULOS, M.J.; DUAN, J.D.; JEFFREY, A.M.; LEACH, M.W.; HAYES, A.N.; STEDMAN, N.L.; WILLIAMS, G.M. Hepatocellular proliferation and hepatocarcinogen bioactivation in mice with diet-induced fatty liver and obesity. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 65, p. 451-456, 2013.

IMCHEN, T.; MANASSE, J.; MIN, K.W.; BAEK, S.J. Characterization of PPAR dual ligand MCC-555 in AOM-induced colorectal tumorigenesis. **Exp Toxicol Pathol**. v. 65, p. 919-924, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (INCA). MINISTERIO DA SAUDE. BRASIL. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Cancer. – Rio de Janeiro: INCA, 2014.

ITO, N.; IMAIDA, K.; ASAMOTO, M.; SHIRAI, T. Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats. **Mutat Res**. v. 462, n. 2-3, p. 209-217, 2000.

ITO, M.; SUZUKI, J.; SASAKI, M.; WATANABE, K.; TSUJIOKA, S.; TAKAHASHI, Y.; GOMORI, A.; HIROSE, H.; ISHIHARA, A.; IWAASA, H.; KANATANI, A. Development of nonalcoholic steatohepatitis model through combination of high-fat diet and tetracycline with morbid obesity in mice. **Hepatol Res**. v. 34, p. 92-98, 2006.

JIN, G.Z.; DONG, H.; YU, W.L.; LI, Y.; LU, X.Y.; YU, H.; XIAN, Z.H.; DONG, W.; LIU, Y.K.; CONG, W.M.; WU, M.C. A novel panel of biomarkers in distinction of small well-differentiated HCC from dysplastic nodules and outcome values. **BMC Cancer**, v. 13, p. 161, 2013.

KARBE, E.; KERLIN, R.L. Cystic degeneration/spongiosis hepatitis in rats. **Toxicologic Pathology**. v. 30, n. 2, p. 216-227, 2002.

KERR, J.F.R.; WINTERFORD, C.M.; HARMON, B.V. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**. v. 73, p. 2013-2026, 1994.

KHURANA, S.; SHAH, N.; CHENG, K.; SHIU, B.; SAMIMI, R.; BELO, A.; SHANT, J.; DRACHENBERG, C.; WESS, J.; RAUFMAN, J. Scopolamine treatment and muscarinic receptor subtype-3 gene ablation augment azoxymethane-induced murine liver injury. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 333, n. 3, p. 639-649, 2010.

KHURANA, S.; JADEJA, R.; TWADDELL, W.; CHENG, K.; RACHAKONDA, V.; SAXENA, N.; RAUFMAN, J. Effects of modulating M3 muscarinic receptor activity on azoxymethane-induced liver injury in mice. **Biochem Pharmacol**. v. 86, n. 2, p. 329-338, 2013.

KIM, E.J.; KIM, W.Y.; KANG, Y.H.; HA, Y.L.; BACH, L.A.; PARK, J.H.Y. Inhibition of caco-2 cell proliferation by n-3 fatty acids: possible mediation by increased secretion of insulin-like growth factor binding protein-6. **Nutrition Res**. v. 20, n. 10, p. 1409-1421, 2000.

KOPECKY, J.; ROSSMEISL, M.; FLACHS, P.; KUDA, O.; BRAUNER, P.; JILKOVA, Z.; STANKOVA, B.; TVRZICKA, E.; BRYHN, M. n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 8, n. 4, p. 361-369, 2009.

KURITA, A.; KADO, S.; KANEDA, N.; ONOUE, M.; HASHIMOTO, S.; YOKOKURA, T. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 46, p. 211-220, 2000.

LAHOUAR, L.; GHRAIRI, F.; FELAH, M.E.; SALEM, H.B.; MILED, A.H.; HAMMAMI, M.; ACHOUR, L. Effect of dietary fiber of "Rihane" barley grains and azoxymethane on serum and liver lipid variables in Wistar rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**. v. 67, n. 1, p. 27-34, 2011.

LAHOUAR, L.; GHRAIRI, F.; AREM, A.E.; SGHAEIR, W.; FELAH, M.E.; SALEM, H.B.; SRIHA, B.; ACHOUR, L. Attenuation of histopathological alterations of colon, liver and lung by dietary fibre of barley Rihane in azoxymethane-treated rats. **Food Chemistry**. v. 149, p. 271-276, 2014.

LEWIS, G.F.; CARPENTIER, A.; ADELI, K.; GIACCA, A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Endocr Rev**. v. 23, p. 201-229, 2002.

MARTINS, J.M.; GRUENZO, N.D. N-6 fatty acid and colorectal cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 55, n. 1, p. 69-74, 2009.

MELO, J.U.S.; SANTOS, J.M.V.; KIMURA, O.S.; CAMPOS JÚNIOR, M.M.; MELO, R.B.; VASCONCELOS, P.R.L. Effects of fatty acids on liver regeneration in rats. **Rev Col Bras Cir** v. 37, n. 5, p. 351-357, 2010.

MORANI, J.; TORSONI, A. S.; ANHÊ, G. F.; ROMAN, E. A.; CINTRA, D. E.; WARD, L. S.; BORDIN, S.; VELLOSO, L. A. The role of proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α in the fatty-acid-dependent transcriptional control of interleukin-10 in hepatic cells of rodents. **Metabolism**. v. 59, p. 215-223, 2010.

NA, S.Y.; MYUNG, S.J. Obesity and colorectal cancer. **Korean J Gastroenterol**. v. 59, n. 1, p.16-26, 2012.

NISHIHARA, T.; BABA, M.; MATSUDA, M.; INOUE, M.; NISHIZAWA, Y.; FUKUHARA, A.; ARAKI, H.; KIHARA, S.; FUNAHASHI, T.; TAMURA, S.; HAYASHI, N.; IISHI, H.; SHIMOMURA, I. Adiponectin deficiency enhances colorectal carcinogenesis and liver tumor formation induced by azoxymethane in mice. **World J Gastroenterol**. v. 14, n. 42, p. 6473-6480, 2008.

NORAT, T.; BINGHAM, S.; FERRARI, F.; SLIMANI, N.; JENAB, M.; MAZUIR, M. Meat, fish and colorectal cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. **J Natl Cancer Inst**. v. 97, n. 12, p. 906-916, 2005.

OLESZCZUK, A.; SPANNBAUER, M.; TANNAPFEL, A.; BLÜHER, M.; HENGSTLER, J.; PIETSCH, U.C.; SCHUHMACHER, A.; WITTEKIND, C.; HAUSS, J.P.; SCHÖN, M.R. Regenerative capacity differs between micro- and macrovesicular hepatic steatosis. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 59, n. 3-4, p. 205-213, 2007.

PADIDAR, S.; FARQUHARSON, A.J.; WILLIAMS, L.M.; KEARNEY, R.; ARTHUR, J.R.; DREW, J.E. High-fat alters gene expression in the liver and colon: links to increased development of aberrant crypt foci. **Dig Dis Sci**, v.57, p. 1866-1874, 2012

PAPANIKOLAOU, A.; WANG, Q.; PAPANIKOLAOU, D.; WHITELEY, H.E.; ROSENBERG, D.W. Sequential and morphological analyses of aberrant crypt foci formation in mice of differing susceptibility to azoxymethane-induced colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**. v. 21, n. 8, p. 1567-1572, 2000.

PARADIS, V. Histopathology of hepatocellular carcinoma. **Multidisciplinary Treatment of Hepatocellular Carcinoma, Recent Results in Cancer Research**. v. 190, p. 21-32, 2013.

PARK, Y.N. Update on precursor and early lesions of hepatocellular carcinomas. **Arch Pathol Lab Med**. v. 135, n. 6, p. 704-715, 2011.

PESSAYRE, D.; BEARSON, A.; FROMENTY, B.; MANSOUR, A. Mitochondria in steatohepatitis. **Semin Liver Dis**. v. 21, p. 57-69, 2001.

PINHO, M.S.L.; FERREIRA, L.C.; BRIGO, M.J.K.; PEREIRA FILHO, A.; WENGERKIEVICZ, A.; PONATH, A; SALMORIA L. Incidência do câncer colorretal na região de saúde de Joinville (SC). **Rev Bras Coloproctol**. v. 23, n. 2, p.73-76, 2003.

POUDYAL, H.; PANCHAL, S.K.; WARD, L.C.; WAANDERS, J.; BROWN, L. Chronic high-carbohydrate, high-fat feeding in rats induces reversible metabolic, cardiovascular, and liver changes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 302, p. E1472-E1482, 2012.

ROBERT, O. Practical applications of fish oil (ω -3 fatty acids) in primary care. **J Am Board Fam Pract**. v. 18, n. 1, p. 28-36, 2005.

RONCUCCI, L.; PEDRONI, M.; VACCINA, F.; BENATTI, P.; MARZONA, L.; DE POL, A. Aberrant crypt foci in colorectal carcinogenesis. Cell and crypt dynamics. **Cell Prolif**. v. 33, n.1, p. 1-18, 2000.

ROSKAMS, T.; KOJIRO, M. Pathology of early hepatocellular carcinoma: conventional and molecular diagnosis. **Seminars in Liver Disease**. v. 30, n. 1, p. 17-25, 2010.

ROYNETTE, C.E.; CALDER, P.C.; DUPERTUIS, Y.M.; PICHARD, C. N-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clin Nutr**. v. 23, n. 2, p. 139-51, 2004.

SAFFHILL, R.; MARTGISON, G.P.; O'CONNOR, P.J. Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. **Biochem Biophys Acta**. v. 823, p. 111-145, 1985.

SALOMAO, M.; MCMILLEN, E.; LEFKOWITCH, J.H. Recent advances in the classification of hepatocellular carcinoma. **Diagnostic Histopathology**. v. 18, n. 1, p. 37-45, 2012.

SANDE-LEE, S.V.; VELLOSO, L.A. Disfunção hipotalâmica na obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 56, n. 6, p. 341-350, 2012.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein-bound, non-protein sulphhydryl group in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.** v. 25, p.192-205, 1968.

SENGUPTA, P. A scientific review of age determination for a laboratory rat: how old is it in comparison with human age? **Biomedicine International.** v. 2, p. 81-89, 2011.

SHIMIZU, M.; SHIRAKAMI, Y.; SAKAI, H.; ADACHI, S.; HATA, K.; HIROSE, Y.; TSURUMI, H.; TANAKA, T.; MORIWAKI H. Epigallocatechin gallate suppresses azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. **Cancer Prev Res.** v. 1, n. 4, p. 298-304, 2008.

SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** v. 60, p. 502-507, 2006.

SIMOPOULOS, A.P. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease. **Experimental Biology and Medicine.** v. 235, p. 785-795, 2010.

STEWART, H.L.; WILLIAMS, G.; KEYSER, C.H.; LOMBARD, L.S.; MONTALI, R.J. Histologic typing of liver tumors of the rat. **J Natl Cancer Inst.** v. 65, p. 179-206, 1980.

STOPERA, S.A.; DAVIE, J.R.; BIRD, R.P. Colonic aberrant crypt foci are associated with increased expression of c-fos: the possible role of modified c-fos expression in preneoplastic lesions in colon cancer. **Carcinogenesis.** v. 13, n. 4, p. 573-578, 1992.

SU, Q.; BANNASCH, P. Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. **Toxicologic Pathology.** v. 31, n. 1, p. 126-133, 2003.

TAMMALI, R.; REDDY, A.B.M.; RAMANA, K.V.; PETRASH, J.M.; SRIVASTAVA, S.K. Aldose reductase deficiency in mice prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic aberrant crypt foci formation. **Carcinogenesis.** v. 30, n. 5, p. 799-807, 2009.

TERZIC, J.; GRIVENNIKOV, S.; KARIN, E.; KARIN, M. Inflammation and colon cancer. **Gastroenterology.** v. 138, p. 2101-2114, 2010.

TOMANARI, G.Y.; PINE, A.S.; SILVA, M.T.A. Ratos wistar sob regimes rotineiros de restrição hídrica e alimentar. **Rev Bras Ter Comport Cogn.** v. 5, n. 1, p. 57-71, 2003.

TOMMASO, L.D.; DESTRO, A.; SEOK, J.Y.; BALLADORE, E.; TERRACCIANO, L.; SANGIOVANNI, A.; IAVARONE, M.; COLOMBO, M.; JANG, J.J.; YU, E.; JIN, S.Y.; MORENGHI, E.; PARK, Y.N.; RONCALLI, M. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology.** v. 50, p. 746-754, 2009.

UEHARA, T.; AINSLIE, G.R.; KUTANZI, K.; POGRIBNY, I.P.; MUSKHELISHVILI, L.; IZAWA, T.; YAMATE, J.; KOSYK, O.; SHYMONYAK, S.; BRADFORD, B.U.; BOORMAN, G.A.; BATALLER, R.; RUSYN, I. Molecular mechanisms of fibrosis-associated promotion of liver carcinogenesis. **Toxicological Sciences**. v. 132, n. 1, p. 53-63, 2013.

VUCUR, M.; RODERBURG, C.; BETTERMANN, K.; TACKE, F.; HEIKE/NWALDER, M.; TRAUTWEIN, C.; LUEDDE, T. Mouse models of hepatocarcinogenesis: What can we learn for the prevention of human hepatocellular carcinoma? **Oncotarget**. v. 1, p. 373-378, 2010.

WARD, J.M.; TREUTING, P.M. Rodent intestinal epithelial carcinogenesis: pathology and preclinical models. **Toxicologic Pathology**. v. 42, p. 148-161, 2014.

WASHINGTON, M.K.; POWELL, A. E.; SULLIVAN, R.; SUNDBERG, J.P.; WRIGHT, N.; COFFEY, R.J.; DOVE, W. F. Reviews in Basic and Clinical Gastroenterology and Hepatology-Pathology of Rodent Models of Intestinal Cancer: Progress Report and Recommendations. **Gastroenterology**. v.144, p.705-717, 2013.

WEYLANDT, K.H.; KRAUSE, L.F.; GOMOLKA, B.; CHIU, C.Y.; BILAL, S.; NADOLNY, A.; WAECHTER, S.F.; FISCHER, A.; ROTHE, M.; KANG, J.X. Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF- α . **Carcinogenesis**. v. 32, n. 6, p. 897-903, 2011.

WOOD, I.S.; DE HEREDIA, F.P.; WANG, B.; TRAYHURN, P. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. **Proc Nutr Soc**. v. 68, n. 4, p. 370-377, 2009.

ZHONG, Y.; CHIOU, Y.; PAN, M.; HO, C.; SHAHIDI, F. Protective effects of epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in mice. **Journal of Functional Foods**. v. 4, p. 323-330, 2012.

APÊNDICE A - COMPOSIÇÃO DAS DIETAS

Alimento	Quantidade(g)	Calorias	Carboidratos(g)	Proteínas(g)	Lipídios(g)
Dieta Padrão					
BiobaseBio-tec	27	120	17,6	8,8	1,6
Total	27	120	17,6	8,8	1,6
Total de calorias (%)			70,4 (58,7%)	35,2 (29,3%)	14,4 (12,0%)
Dieta Hiperlipídica					
Nutri dextrin	11,8	44,84	11,21	0	0
Óleos (mix)	9,5	78,92	0	0	8,77
Nutri Protein HWP	16,5	52,8	0	13,2	0
Total	37,8	176,57	11,21	13,2	8,77
Total de calorias (%)			44,84 (25,4%)	52,8 (29,9%)	78,9 (44,7%)
Dieta Normolipídica					
Nutri dextrin	18	68,4	17,1	0	0
	51,51	00	5,7	0	0
	51,2	012,8	0	0	0
	17,1	12,8	5,7	171,11	0
Total de calorias (%)			68,4 (40,0%)	51,2 (29,9%)	51,5 (30,1%)
Dieta Hipolipídica					
Nutri dextrin	27	102,6	25,65	0	0
Óleos (mix)	2,5	20,77	0	0	0
HWP	16,5	52,8	0	13,2	0
Total		176,17	25,65	13,2	2,31
Total de calorias (%)			102,6 (58,2%)	52,8 (30%)	20,8 (11,8%)

APÊNDICE B - COMPOSIÇÃO DA DIETA HIPERLIPÍDICA

ALIMENTO	QUANTIDADE	CALORIAS	CARBOIDRATOS(G)	PROTEINAS(G)	LIPÍDIOS(G)
Nutri dextri	11,8	44,84	11,21	0	0
Óleos (mix)	9,5	78,92	0	0	8,76945
Nutri Protein HWP	16,5	52,8	0	13,2	0
Total em gramas/mg/mcg			11,21	13,2	8,76945
Distribuição total de calorias			44,84	52,8	78,9251
Total de calorias	176,57				
Percentual/calorias			25,3957	29,904	44,7003
Mix de vitaminas e minerais	0,84				

Total em gramas por dia/cada rato 38,64g
 Percentual de Carboidratos 25%
 Percentual de Proteínas 30%
 Percentual de Lipídios 45%
 Total em calorias da dieta 176,57kcal

APÊNDICE C - COMPOSIÇÃO DA DIETA NORMOLIPÍDICA

Alimento	Quantidade	Calorias	Carboidratos (g)	Proteínas (g)	Lípidios(g)
Nutri dextri	18	68,4	17,1	0	0
Óleos (mix)	62	51,51	0	0	5,72322
Nutri Protein HWP	16	51,2	0	12,8	0
Total em gramas/mg/mcg			17,1	12,8	5,72322
Distribuição total de calorias			68,4	51,2	51,509
Total de calorias	171,11				
Percentual/calorias			39,9745	29,9225	30,103
Mix de vitaminas e minerais	0,84				

Total em gramas por dia/cada
rato 41,04g
 Percentual de Carboidratos 40%
 Percentual de Proteínas 30%
 Percentual de Lípidios 30%
 Total em calorias da dieta 171,11kcal

APÊNDICE D - COMPOSIÇÃO DA DIETA HIPOLIPÍDICA

Alimento	Quantidade(g)	Calorias	Carboidratos (g)	Proteínas (g)	Lipídios(g)
Nutri dextri	27	102,6	25,65	0	
	0Óleos (mix)	2,5	20,77	0	0
	2,30775				
Nutri Protein HWP	16,5	52,8	0	13,2	0
Total em gramas/mg/mcg			25,65	13,2	2,30775
Distribuição total de calorias			102,6	52,8	20,7698
Total de calorias	176,17				
Percentual/calorias			58,2393	29,9711	11,7896
Mix de vitaminas e minerais	0,84				

TOTAL EM GRAMAS POR DIA/CADA RATO 46,84g
 PERCENTUAL EM CARBOIDRATOS 58%
 PERCENTUAL DE PROTEINA 30%
 PERCENTUAL DE LIPÍDIOS 12%
 TOTAL EM CALORIAS DA DIETA 176,17KCAL

APÊNDICE E - PERFIL LIPÍDICO DAS DIETAS E RELAÇÃO ω 3, 6 e 9

	Dieta Padrão	Dieta Hiperlipídica	Dieta Normolipídica	Dieta Hipolipídica
Gordura				
Poliinsaturada	54%	26,50%	26,50%	26,50%
Monoinsaturada	24%	50,20%	50,20%	50,20%
Saturada	15%	23,30%	23,30%	23,30%
Relação ω 3, 6 e 9				
ω 6: ω 3	8:1	1,4:1	1,4:1	1,4:1
ω 9: ω 6	0,4:1	3,2:1	3,2:1	3,2:1
Poli:Saturada	5,2:1	3,3:1	3,3:1	3,3:1

APÊNDICE F - PERFIL LIPÍDICO DA DIETA HIPERLIPÍDICA

	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada	
		14,2	53,3	20	12,5	
Óleo de Linhaça	1,14	0,16188	0,60762	0,228	0,1425	12%

	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada	
		26	10	58	6	
Óleo de Canola	4,18	1,0868	0,418	2,4244	0,2508	44%

	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada	
		8	1	77	14	
Óleo de Oliva	2,755	0,2204	0,024795	2,12135	0,3857	29%

	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada	
		0	0	0	100	
TCM	1,425	0	0	0	1,425	15%

	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada
Total em gramas	9,5	1,469	1,050415	4,77375	2,204
Total em gramas		2,519495		4,77375	2,204
Total em Calorias		22,675455		42,96375	19,836
		POLI		MONO	SATURADA

	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Total de ômegas	
	1,46908	1,050415	4,77375	7,3	
Relação ω 6: ω 3	1,4				
Relação ω 9: ω 6	3,2				

APÊNDICE G - PERFIL LIPÍDICO DA DIETA NORMOLIPÍDICA

	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada	
		14,2	53,3	20	12,5	
Óleo de Linhaça	0,744	0,105648	0,396552	0,1488	0,093	12%

	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada	
		26	10	58	6	
Óleo de Canola	2,728	0,70928	0,2728	1,58224	0,16368	44%

	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada	
		8	1	77	14	
Óleo de Oliva	1,798	0,14384	0,016182	1,38446	0,25172	29%

	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada	
		0	0	0	100	
TCM	0,93	0	0	0	0,93	15%

	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada
Total em gramas	6,2	0,959	0,685534	3,1155	1,4384
Total em gramas		1,644302		3,1155	1,4384
Total em Calorias		14,798718		28,0395	12,9456
		POLI		MONO	SATURADA

	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Total de ômegas	
	0,958768	0,685534	3,1155	4,8	
Relação ω 6: ω 3	1,4				
Relação ω 9: ω 6	3,2	Tota de			

Gorduras: 6,2

APÊNDICE H - PERFIL LIPÍDICO DA DIETA HIPOLIPÍDICA

	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada	
		14,2	53,3	20	12,5	
Óleo de Linhaça	0,3	0,0426	0,1599	0,06	0,0375	12%

	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada	
		26	10	58	6	
Óleo de Canola	1,1	0,286	0,11	0,638	0,066	44%

	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada	
		8	1	77	14	
Óleo de Oliva	1,725	0,058	0,006525	0,55825	0,1015	29%

	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada	
		0	0	0	100	
TCM	0,375	0	0	0	0,375	15%

	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada
Total em gramas	2,5	0,387	0,276425	1,25625	0,58
Total em gramas		0,663025		1,25625	0,58
Total em Calorias		5,967225		11,30625	5,22
		POLI		MONO	SATURADA

	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Total de ômeegas	
	0,3866	0,276425	1,25625	1,9	
Relação □6:□3	1,4				
Relação □9:□6	3,2				

Total de Gorduras: | 2,5

APENDICE I – CARCINOGENESE COLORRETAL

Sítios de carcinogênese pelo modelo de Azoximetano

LESÕES			GRUPOS				
			G-I	G-II	G-III	G-IV	G-V
Colo	Foco de cripta aberrante	Clássico	3	535	391	89	109
		Displásico	0	11	2	1	0
		Multiplicidade (≥ 5 criptas/foco)	1	76	75	14	11
	Lesões Pré-malignas	Pólipo hiperplásico	1	2	0	0	0
		Adenoma tubular	0	2	1	4	4
		Adenoma tubulo-viloso	0	0	0	0	0
		Adenoma viloso	0	0	0	0	0
	Carcinoma in situ		0	1	0	1	0
	Adenocarcinoma		0	7	4	2	1
	Outros sítios	Delgado					
Fígado							

APENDICE J - LESÕES HEPÁTICAS

1. GRUPO PADRÃO

Grupo II Padrão com Acoo

2
 1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12

LESÕES		RATOS											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Esteatose	Leve	X	X	X	X		X	X	X	X			X
	Moderada											X	
	Severa												
Lesões Pré malignas	F.C. Claras		X		X	X	X		X				
	F.C. Vacuoladas	X	X			X		X					X
	F.C. Basofílicas	X						X				X	
	F.C. Intermediárias							X					X
	F.C. Anfílicas	X				X		X	X			X	X
	F.C. Tigroide	X	X	X	X		X				X		X
	F.C. Oncocítica	X											X
	F.C. Pequenas				X				X			X	
	F.C. Acidófilas							X					X
	Espongiose	X			X		X	X	X	X		X	
Peliose							X		X	X	X		
Colangioma	X			X	X					X	X	X	
Adenoma				X			X						
Atipias L										X	X	X	
Atipias M													
Atipias S	X				X		X	X	X				
Núcleos vacuolados													
Displasia BG	?				?		?	?	?	?	?	?	
Displasia AG	?				?		?	?	?	?	?	?	
Carcinoma in situ	?				?		?	?	?	?	?	?	
Hepatocarcinoma													
Infiltrado de eosinófilos							X	X	X			X	
Microabscessos												X	
Outros													

Rato 1 - glangione + vacuolado
 Rato 7 - glangione + oncocitico
 Rato 11 - glangione + vacuolado
 => onfirose

3.GRUPO NORMOLIPÍDICO

Grupo 10.....

LESÕES		RATOS											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Esteatose	Leve <i>discretas</i>						X	X			X	X	X
	Moderada		X							X			
	Severa <i>acentuadas</i>				X								
Lesões Pré malignas	F.C. Claras			X			X		X				X
	F.C. Vacuoladas			X			X		X				X
	F.C. Basofílicas												
	F.C. Intermediárias												
	F.C. Anfofílicas												
	F.C. Tigroide		X	X									
	F.C. Oncocítica						X	X					X
	F.C. Pequenas				X								
	F.C. Acidófilas												
	Espongiose		X				X	X	X	X	X	X	X
Pelióse		X	X			X				X	X		
Colangioma		X		X		X	X		X	X		X	
Adenoma		X	X			X		X				X	
Atipias L		X						X	X			X	
Atipias M						X							
Atipias S													
Núcleos vacuolados													
Displasia BG													
Displasia AG													
Carcinoma in situ													
Hepatocarcinoma													
Infiltrado de eosinófilos													
Microabscessos													
Outros													

inf. linfo.

4.GRUPO HIPOLIPÍDICO

Grupo..... U

LESÕES		RATOS											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Esteatose	Leve	X	X	X	X				X	X	X	X	X
	Moderada					X							
	Severa							X					
Lesões Pré malignas	F.C. Claras			X		X			X		X		X
	F.C. Vacuoladas								X				
	F.C. Basofílicas												
	F.C. Intermediárias												
	F.C. Anfofílicas												
	F.C. Tigroide			X					X				
	F.C. Oncocítica							X					
	F.C. Pequenas								X	X			
	F.C. Acidófilas												
Espongiose	X				X		X	X	X			X	
Peliose				X									
Colangioma		X					X	X				X	
Adenoma													
Atipias L													
Atipias M													
Atipias S													
Núcleos vacuolados													
Displasia BG													
Displasia AG													
Carcinoma in situ													
Hepatocarcinoma													
Infiltrado de eosinófilos													
Microabscessos													
Outros	X												

XX = hepatocarcinoma

↑
 hiperplasia
 atípica
 biliar
 esclerosa
 com dilatações
 lumbais

↑
 esclerosante
 ductal
 biliar
 esclerosante

↑
 esteatose
 lesão completa
 com perda das
 hormonas do pâncreas
 e da insulina

ANEXO A

1. DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 09/09, sobre o projeto intitulado: **“DIETAS HIPERLIPÍDICA, NORMOLIPÍDICA E HIPOLIPÍDICA, RICAS EM ÔMEGAS 3 E 9, NO ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E FORMAÇÃO DE CRIPTAS ABERRANTES INDUZIDAS POR AZOXIMETANO EM MUCOSA CÓLICA DE RATOS**, de responsabilidade de IDÁLIA MARIA BRASIL BURLAMAQUI e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 27 de maio de 2009.

Fortaleza, 16 de junho de 2009.

Profa. Dra. Nylane  Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

ANEXO A

2. DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 53/2012, sobre o projeto intitulado: “**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOLÓGICA DO COLO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE RATOS WISTAR**”, de responsabilidade de Lara Burlamaqui Veras e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 28 de novembro de 2012.

Fortaleza, 29 de novembro de 2012


Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

ANEXO B - COMPOSIÇÃO DA DIETA PADRÃO

Alimento	Quantidade	Calorias	Carboidratos (g)	Proteínas (g)	Lipídios(g)
Nutri dextri	18	68,4	17,1	0	0
Óleos (mix)	6,2	51,51	0	0	5,72322
Nutri Protein HWP	16	51,2	0	12,8	0
Total em gramas/mg/mcg			17,1	12,8	5,72322
Distribuição total de calorias			68,4	51,2	51,509
Total de calorias	171,11				
Percentual/calorias			39,9745	29,9225	30,103
Mix de vitaminas e minerais	0,84				

Total em gramas por
 dia/cada rato 46,84g
 Percentual de Carboidratos 58%
 Percentual de Proteínas 30%
 Percentual de Lipídios 12%
 Total em calorias da dieta 176,17kcal

ANEXO C - ESTRESSE OXIDATIVO

1. Dosagem da concentração das TBARS

Posteriormente, a amostra foi levada à temperatura ambiente, retiraram-se 100 µL de plasma e adicionaram-se 4 ml de KCl gelado a 1,15%, de forma que a amostra ficasse homogênea, resultando em uma solução ácida concentrada. Retirou-se uma alíquota de 0,5 ml da amostra e acrescentou-se 1 ml da solução aquosa de TBA a 0,6% e 3 ml da solução de ácido fosfórico (H₃PO₄) a 1%. A mistura foi colocada em banho fervente, pois o malondialdeído (MDA) é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido, com o TBA originando composto de cor rosa. Adicionaram-se então, 4 ml de n-butanol. Após isso, a mistura foi agitada por 2 minutos e então centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm.

A absorbância da fase sobrenadante foi medida em espectrofotômetro Beckman (520 nm a 535 nm), mensurando-se a concentração plasmática das Substâncias Reagentes do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em unidade de nmol MDA/mL plasma (MIHARA; UCHIYAMA, 1978).

2. Dosagem da concentração de Glutathione

Utilizaram-se os reagentes: Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), Ácido tricloroacético (ATA) a 50%, Tampão hidroximetilaminometano (TRIS) 0,4 M, pH 8,9, pH 8,9, 2-ácido nitrobenzóico (DTNB) 0,5 M, Metano e Glutathione (GSH), 1mg/ml.

Após a amostra ser submetida a processo de centrifugação, o plasma imediatamente é congelado em nitrogênio líquido a - 70°C. Posteriormente, o plasma foi levado à temperatura ambiente, retiraram-se 100 µL e realizou-se a homogeneização em 5 ml de EDTA 0,02M. Retiraram-se 4 ml do homogenato e misturaram-se 3,2 ml de água destilada e 0,8 ml de ácido tricloroacético a 50%. O tubo foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 25 minutos. Em seguida, retiraram-se 2 ml do sobrenadante e acrescentaram-se 4 ml de TRIS 0,4M (pH 8,9) e 0,1 ml de DTNB 0,01M. Agitou-se a mistura para homogeneização e após foram lidas as absorbâncias no espectrofotômetro à 412 nm. A concentração final da glutathione, em µmol/ml, foi obtida comparando-se o valor da absorbância de tabela padrão.

