



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

IDÁLIA MARIA BRASIL BURLAMAQUI

**DIETAS HIPERLIPÍDICA, NORMOLIPÍDICA E HIPOLIPÍDICA COM BAIXA
RELAÇÃO ÔMEGA 6/ ÔMEGA 3 E ALTA ÔMEGA 9/ ÔMEGA 6 NA
CARCINOGENESE CÓLICA EM RATOS**

FORTALEZA

2014

IDÁLIA MARIA BRASIL BURLAMAQUI

**DIETAS HIPERLIPÍDICA, NORMOLIPÍDICA E HIPOLIPÍDICA COM BAIXA
RELAÇÃO ÔMEGA 6/ ÔMEGA 3 E ALTA ÔMEGA 9/ ÔMEGA 6 NA
CARCINOGENESE CÓLICA EM RATOS**

Tese 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 Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

FORTALEZA

2014

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

B974d Burlamaqui, Idália Maria Brasil
Dietas hiperlipídica, normolipídica e hipolipídica com baixa relação ômega 6/ômega 3 e alta
ômega 9/ ômega 6 na carcinogênese cólica em ratos / Idália Maria Brasil Burlamaqui. – 2014.
136f. : enc. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade
de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza, 2014.

Orientação: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues

Co- orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão

1. Neoplasias Colorretais. 2. Azoximetano. 3. Dieta Hiperlipídica. 4. Ratos. I. Título.

CDD: 616.994347

IDÁLIA MARIA BRASIL BURLAMAQUI

**DIETAS HIPERLIPÍDICA, NORMOLIPÍDICA E HIPOLIPÍDICA COM BAIXA
RELAÇÃO ÔMEGA 6/ ÔMEGA 3 E ALTA ÔMEGA 9/ ÔMEGA 6 NA
CARCINOGENESE CÓLICA EM RATOS**

Tese 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 Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues

Aprovada em 21/02 /2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Eduardo Alonso Araújo
Universidade de São Paulo - USP

Dra. Rosilma Gorete Lima Barreto
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof^ª. Dra. Conceição Aparecida Dornelas
Universidade Federal do Ceará - UFC

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

Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues
Universidade Federal do Ceará - UFC

“O estudo é a valorização da
mente a serviço da felicidade
humana”

Guizat

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

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

Aos meus filhos LUIS ALBERTO, LIA e LARA,
pelo incentivo, confiança e compreensão me dando
forças para a realização de mais um sonho e
compartilhando sempre de todas as minhas
conquistas.

Ao GERALDINHO, companheiro de todas as
horas, principal apoio para a realização deste
trabalho, por sua ajuda, carinho e amor sempre
presentes.

**Aos meus avôs, *In memoriam*, EDSON, LUIS
ALBERTO E MAGNÓLIA.**
Sei que se sentiriam orgulhosos e felizes ao meu
lado neste momento.

Ao meu neto LUIS ALBERTO,
pela vibração e apoio nesta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS**, 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 doutoranda no programa, apoio e coorientação durante o curso, possibilitando a minha titulação.

Ao Professor Doutor **LUSMAR VERAS RODRIGUES**, 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, pelo constante estímulo e ensinamentos oportunos para minha vida pessoal e profissional.

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 e orientação, estímulo incansável, apoio incondicional, permanente disponibilidade, amizade, competência e valiosos ensinamentos em todas as etapas desse trabalho, sem os quais, certamente não teria sido concluído.

À Professora Doutora **RENATA FERREIRA DE CARVALHO LEITÃO**, Professora Adjunta do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, o meu mais sincero agradecimento pelo seu apoio, amizade, confiança, credibilidade e ensinamentos construtivos que muito me ajudaram mesmo à distância.

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 Professor Doutor **REINALDO BARRETO ORIÁ**, Professor Adjunto IV do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio, orientação, compromisso e valiosas sugestões que foram decisivas na condução desta pesquisa.

À Professora Doutora **GERLIANE CASTRO BRITO**, Professora Adjunta do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela calorosa recepção em seu laboratório e auxílio na realização dos testes de imunohistoquímica fundamentais neste trabalho.

Aos Profs. Doutores **PAULO ROBERTO CARVALHO DE ALMEIDA** e **FRANCISCO VALDECI DE ALMEIDA FERREIRA**, pela colaboração na elaboração da análise anatomopatológica.

Ao Professor Doutor **SÉRGIO EDUARDO ALONSO ARAÚJO**, Professor livre docente do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela contribuição científica e disponibilidade para compor a banca examinadora.

À Doutora **ROSILMA GORETE LIMA BARRETO**, médica assistente do Serviço de Colo-Proctologia do Hospital Universitário Presidente Dutra da Faculdade de Medicina da

Universidade Federal do Maranhão, pela ajuda e contribuição como membro da banca examinadora.

Ao Doutor **ORLEÂNCIO GOMES RIPARDO DE AZEVEDO**, Pesquisador do Laboratório de Nutrigenoma do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela preciosa ajuda e disponibilidade sempre presentes.

Aos Doutores **FRANCISCO VAGNALDO FECHINE JAMACARU** e **PAULO GOBERLÂNCIO DE BARROS SILVA**, pela contribuição na orientação e avaliação estatística dos dados obtidos no estudo.

À Professora Doutoranda **MARINILA CALDERADO MUNGUBA MACEDO**, pelo exemplo de perseverança generosidade e fé, meu abraço apertado e minha eterna gratidão.

À Mestranda **ALINE MATOS CUNHA**, Nutricionista e Professora da Faculdade Gama Filho pela elaboração das dietas usadas, essenciais para a realização desta pesquisa.

Aos ilustres componentes do Laboratório de Morfologia Mestranda **CONCEIÇÃO DA SILVA MARTINS**, **ROSEMAYRE FREIRE**, **ALCEU MACHADO DE SOUZA** e **MARIA DO SOCORRO FRANÇA MONTE**, pela disponibilidade, convívio agradável e colaboração direta na realização da imunohistoquímica, contribuindo significativamente para este trabalho.

Aos Estudantes de Medicina, **LARA ALBUQUERQUE DE BRITO**, **JOSÉ WILSON MEIRELES JÚNIOR** e **RAFAEL SUCUPIRA** e aos Médicos **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

Dietas hiperlipídica, normolipídica e hipolipídica com baixa relação ômega 6/ ômega 3 e alta ômega 9/ ômega 6 na carcinogênese cólica em ratos. **IDÁLIA MARIA BRASIL BURLAMAQUI. Pós-Graduação *Stricto Sensu*, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas). Fevereiro, 2014. Orientador: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues.**

Câncer colorretal tem alta incidência, sendo influenciado por fatores genéticos e ambientais. Estudos sugerem que ácidos graxos ômega 3, 6 e 9 estão envolvidos na sua gênese e prevenção. Objetivo foi verificar efeitos de dietas hiperlipídica, normolipídica e hipolipídica, com baixa relação ω -6: ω -3 e alta ω -9: ω -6 na carcinogênese colorretal induzida por azoximetano (AOM). Foram usados 60 ratos Wistar, 3 semanas de idade, pesando 40 a 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 foram analisados quanto à presença de tumores, focos de criptas aberrantes, número de criptas por foco, incidência, invasão, atipias e multiplicidade dos carcinomas. Determinaram-se colesterol total e frações, triglicerídeos, glicemia, ALT e AST, glutathione, TBARS, interleucinas no plasma. Índice apoptótico e mitótico, NF κ B, COX-2 e K-Ras foram medidos em tecido tumora. GI e GII apresentaram aumento da massa corporal em relação aos GIII, GIV e GV. Ingestas de GI e GII foram maiores que em GIII, GIV e GV. Houve redução do número de criptas aberrantes e do total de focos com menos e mais de 5 criptas em GIV e GV comparados com GII. Houve diminuição na incidência dos tumores em GV. O índice de carcinogênese foi superior no GII em relação ao GV. Glutathione foi maior e TBARS menor em GV. IL-10 no GIII foi maior que em GI. IFN γ elevou-se em GII em relação aos GIII e GV. TNF- α aumentou em GIV e GV em relação ao GI. Apoptose aumentou nos grupos V, IV, III, em relação aos GII e GI. Índice mitótico foi menor em GV em relação aos GII, GIII e GIV. Conclui-se que dietas com baixa razão ω -6: ω -3 e alta ω -9: ω -6 reduzem a ingesta, massa corporal e peroxidação lipídica; elevam a capacidade antioxidante e protegem contra a carcinogênese cólica.

Palavras Chaves: Neoplasias Colorretais. Azoximetano. Dieta Hiperlipídica. Criptas Aberrantes. Ratos.

ABSTRACT

Hyperlipidic, normolipidic and hypolipidic diets with low ω -6: ω -3 ratio and high ω -9: ω -6 ratio on colorectal carcinogenesis in rats. **IDÁLIA MARIA BRASIL BURLAMAQUI. Post-Graduation *Stricto Sensu*, Department of Surgery, School of Medicine, Universidade Federal do Ceará (Ph.D. in Surgery Medical Sciences). February, 2014. Advisor: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues.**

Colorectal cancer has a high incidence and is known to be influenced by dietary factors. The fatty acids ω -3, ω -6 and ω -9 are believed to be involved in its genesis and prevention. The objective was to evaluate the effect of hyperlipidic, normolipidic and hypolipidic diets with low ω -6: ω -3 ratio and high ω -9: ω -6 ratio on azoxymethane (AOM) induced colorectal carcinogenesis in rats. Sixty 3-week-old male Wistar rats weighing 40-50g 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 were analyzed for tumors, aberrant crypt foci, number of crypts per focus, incidence, differentiation, invasion and carcinoma multiplicity. The levels of total and fractionated cholesterol, triglycerides, glycemia, ALT, AST, glutathione, TBARS, interleukins were determined in plasma. Apoptosis, mitosis, NF κ B, COX-2 and K-Ras were measured in tumor tissue. Body mass was greater in GI and GII than in GIII, GIV and GV. Ingestion was greater in GI and GII than in GIII, GIV and GV. The number of aberrant crypts and the total number of foci with <5 and >5 crypts decreased in GIV and GV compared to GII. In GV, the incidence of tumors was reduced. The index of carcinogenesis was higher in GII than in GV. Glutathione was higher and TBARS was lower in GV. GIII was higher than in GI with regard to IL-10. IFN γ was higher in GII than in GIII and GV. TNF- α was higher in GIV and GV than in GI. Apoptosis increased in GV, GIV and GIII in relation to GII and GI. The mitotic index was lower in GV than in GII, GIII and GIV. 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 and lipid peroxidation; increase the antioxidant capacity and offer protection against colorectal carcinogenesis.

Key words: Colorectal neoplasm. Azoxymethane. Hyperlipidic diet. Aberrant crypts. Rats.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Delineamento do experimento.....	37
FIGURA 2 – Média de massa corpórea (g) dos ratos em cada grupo	43
FIGURA 3 – Média de massa corpórea (g) dos ratos com e sem câncer	44
FIGURA 4 – Média de ingesta (g) dos ratos em cada grupo	45
FIGURA 5 – Tumor vegetante e intussuscepção.....	48
FIGURA 6 – Intussuscepção.....	49
FIGURA 7 – Carcinoma colorretal.....	49
FIGURA 8 – Tumor de intestino delgado.....	50
FIGURA 9 – Dilatação de alça intestinal	51
FIGURA 10 – Lesões hepáticas.....	51
FIGURA 11 – Número de criptas aberrantes forma clássica.....	53
FIGURA 12 – Número de criptas aberrantes forma displásica.....	53
FIGURA 13 – Número de focos com menos de 5 criptas aberrantes.....	54
FIGURA 14 – Número de focos com 5 ou mais criptas aberrantes.....	55
FIGURA 15 – Corte histológico de tumoração de colo	56
FIGURA 16 – Corte histológico de tumoração entre alças intestinais.....	57
FIGURA 17 – Corte histológico de tumoração vegetante de colo distal.....	58
FIGURA 18 – Corte histológico de “rocambolé” de alça de colo médio	59
FIGURA 19 – Número de carcinomas por rato.....	63
FIGURA 20 – Índice de carcinogênese.....	63
FIGURA 21 – Níveis de Interleucina 1 β	66
FIGURA 22 – Níveis de Interleucina 6.....	66
FIGURA 23 – Níveis de Interleucina 10	67
FIGURA 24 – Níveis de Interleucina 18	67
FIGURA 25 – Níveis de Interferon- γ	68
FIGURA 26 – Níveis de fator de necrose tumoral	69
FIGURA 27 – Níveis de VEGF	69
FIGURA 28 – Níveis de glutathiona reduzida	70
FIGURA 29 – Níveis de TBARS	71

FIGURA 30 – Contagem de células TUNEL+.....	71
FIGURA 31 – Marcação de células TUNEL +.....	72
FIGURA 32 – Contagem de células KI-67+	72
FIGURA 33 – Marcação de células KI-67 +.....	73
FIGURA 34 – Média de glicemia por grupo.....	73
FIGURA 35 – Média de colesterol total por grupo.....	74
FIGURA 36 – Média de colesterol LDL por grupo.....	74
FIGURA 37 – Média de colesterol HDL por grupo	75
FIGURA 38 – Média de triglicérides por grupo	75
FIGURA 39 – Média de ALT e AST por grupo.....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição das dietas.....	35
TABELA 2 - Perfil lipídico e relação entre os ômega 3, 6 e 9.....	35
TABELA 3 - Sinais clínicos.....	46
TABELA 4 - Achados macroscópicos.....	47
TABELA 5 - Achados da microscopia estereoscópica.....	52
TABELA 6 - Achados da microscopia óptica.....	60
TABELA 7 - Número de animais com CCR.....	61
TABELA 8 - Presença de invasão nos CCR.....	61
TABELA 9 - Grau de atipia celular do CCR.....	62
TABELA 10 - Estadiamento dos CCR.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS/SÍMBOLOS

- AA – Ácido araquidônico
- AG – Ácido graxo
- AGE – Ácidos graxos essenciais
- AJCC – “American Joint Committee on Cancer”
- AL – Ácido linoléico
- ALA – Ácido alfa-linolênico
- ALT – Alanina aminotransferase
- AMPK – 5-mono fosfato de adenosina proteína quinase ativada
- AO – Azeite de oliva
- AOM – Azoximetano
- APC – “*Adenomatous polyposis coli*”
- Apo-A – Apo lipoproteína A
- AST – Aspartato aminotransferase
- ATA – Ácido tricloroacético
- BCAC – “ β -catenin-accumulated crypts”
- BSA – Albumina de soro bovino
- CA – Cripta aberrante
- CCR – Câncer colorretal
- CDKI – Proteína Inibidora da quinase dependente de ciclina
- CEPA – Comitê de Ética de Pesquisas em Animais
- CHO - Carboidratos
- COX – Ciclo-oxigenase
- DCC – “Deleted in colorectal cancer”
- DAB - Diaminobenzidina
- DAPI – 4,6-diamidino-2-fenilindole
- DH – Dieta hiperlipídica
- Dh – Dieta hipolipídica
- DN – Dieta normolipídica
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- DHA – Ácido doicosahexaenóico
- DMH – 1,2 dimetilhidrazina
- DP – Dieta padrão

DTNB – 2-ácido nitrobenzóico
EDTA – Ácido etileno diamino tetracético
EPA – Ácido eicosapentaenóico
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FCA – Focos de cripta aberrante
FIO₂ – Fração inspirada de oxigênio
FITC - Fluoresceína
Gadd45 – Proteína envolvida na regulação e reparo do DNA
GAMA GT – Gama glutamil transferase
GSH - Glutathiona
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
G1 – Fase de síntese de proteínas,enzimas e RNA
G2 – Fase caracterizada pela síntese de moléculas necessárias à divisão celular
HC – Hidrato de carbono
HDL –“High-density lipoprotein”
HE – Hematoxilina-Eosina
hMLH1 – Proteína com função de reparo ao DNA
hMSH2 – Proteína com função de reparo ao DNA
hMSH6 – Proteína com função de reparo ao DNA
hPMS1 – Proteína com função de reparo ao DNA
hPMS2 – Proteína com função de reparo ao DNA
HNPCC – Câncer colorretal hereditário não-polipóide
HO₂ – Espécie reativa de oxigênio
H₃PO₄ – Ácido fosfórico
IARC – Agência internacional para pesquisa em câncer
IFN- γ – Interferon gama
IGFBP – Fator de crescimento ligado á proteína
IGF – Fator de crescimento “insulin-like”
IL - Interleucina
IMC – Índice de massa corpórea

INCA – Instituto nacional do câncer
IP – Intraperitoneal
KCL – Cloreto de sódio
KI-67 – Proteína associada à proliferação celular
K -RAS – Proteína reguladora de divisão celular
LDL – “Low-density lipoprotein”
LIP – Lipídio
LOX – Lipo-oxigenase
LT – Leucotrienos
MCFA – Ácidos graxos de cadeia média
MDA – Reagente determinador de aldeídos
MDF – “Mucin depleted foci”
MDM2 – Proteína reguladora do p53
Min - Minutos
MUFA – Ácidos graxos monoinsaturados
NCA – Número de criptas aberrantes
NFCA – Número de focos de criptas aberrantes
NO2 – Espécie reativa de oxigênio
OHs – Radicais hidroxilas
 ω -3 – Ômega -3
 ω -6 – Ômega -6
 ω -9 – Ômega -9
PAF – Polipose adenomatosa familiar
PBS – Solução tamponada fosfatada
PG – Prostaglandinas
PCR – Proteína C reativa
PI – Iodeto de propídio
PKC – Proteína C quinase
PPAR – Receptores ativados por proliferador de peroxissomo
PTN – Proteína
PUFA - Ácidos graxos poliinsaturados
P21 – Proteína reguladora da fase G1 para S
P53 – Proteína supressora tumoral

RCBP – Registros de câncer de base populacional
RER – Erro de replicação
RNA – Ácido ribonucléico
RO – Espécie reativa de oxigênio
RO2 – Espécie reativa de oxigênio
rpm – Rotação por/min
SCFA – Ácidos graxos de cadeia curta
Seg - Segundos
SOD – Superóxido dismutase
SS – Solução salina a 0,9%
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TBARS – Substâncias reagentes do ácido tiobarbitúrico
TdT – Desoxinucleotidil terminal transferase
TNF- α – Fator de necrose tumoral
TNM – Classificação dos tumores malignos
TRIS – Hidroximetilaminometano
TUNEL – Método para detectar apoptose
TX – Tromboxano
UFC – Universidade Federal do Ceará
UICC – “International Union Against Cancer”
VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular
xg - Eixo baricêntrico

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTAS DE ABREVIATURAS / SIGLAS / SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVO.....	33
3 MÉTODO.....	34
3.1 AMOSTRA.....	34
3.2 INDUÇÃO DA CARCINOGENESE CÓLICA.....	35
3.3 DELINEAMENTOS DO EXPERIMENTO.....	36
3.3.1 GRUPOS CONTROLES.....	36
3.3.2 GRUPOS EXPERIMENTOS.....	36
3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	37
3.5 PARÂMETROS AVALIADOS.....	38
3.5.1 MASSA CORPÓREA.....	38
3.5.2 INGESTA.....	38
3.5.3 SINAIS CLÍNICOS.....	38
3.5.4 MACROSCOPIA.....	38
3.5.5 MICROSCOPIA.....	39
3.5.6 CITOCINAS.....	41
3.5.7 ESTRESSE OXIDATIVO.....	41
3.5.7.1 DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DAS TBARS.....	41
3.5.7.1 DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DA GLUTATIONA.....	41
3.5.8 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	41
3.5.9 ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	42
3.5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1 MASSA CORPÓREA.....	43
4.2 INGESTA.....	44
4.3 SINAIS CLÍNICOS.....	45
4.4 MACROSCOPIA.....	46

4.5 MICROSCOPIA.....	52
4.5.1 MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA.....	52
4.5.1.1 CA FORMA CLÁSSICA E DISPLÁSICA.....	52
4.5.1.2 MULTIPLICIDADE DO FCA.....	54
4.5.2 MICROSCOPIA ÓPTICA.....	55
4.6 CARCINOGENESE CÓLICA.....	61
4.6.1 INCIDÊNCIA.....	61
4.6.2 INVASÃO.....	61
4.6.3 ATIPIAS.....	62
4.6.4 MULTIFOCALIDADE.....	62
4.6.5 ÍNDICE DE CARCINOGENESE.....	63
4.6.6 ESTADIAMENTO TMN.....	64
4.7 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	65
4.7.1 INTERLEUCINA- 1 β	65
4.7.2 INTERLEUCINA- 6.....	66
4.7.3 INTERLEUCINA-10.....	66
4.7.4 INTERLEUCINA-18.....	67
4.7.5 INTERFERON γ	68
4.7.6 FATOR DE NECROSE TUMORAL α	68
4.7.7 FATOR DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS VASCULARES.....	69
4.8 ESTRESSE OXIDATIVO.....	70
4.8.1 GLUTATIONA	70
4.8.2 TBARS.....	70
4.9 ACHADOS IMUNOHISTOQUÍMICOS.....	71
4.9.1 TUNEL.....	71
4.9.2 KI-67.....	72
4.10 ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	73
4.10.1 GLICEMIA.....	73
4.10.2 PERFIL LIPÍDICO.....	74
4.10.2.1 COLESTEROL TOTAL.....	74
4.10.2.2 COLESTEROL LDL.....	74
4.10.2.3 COLESTEROL HDL.....	75
4.10.2.4 TRIGLICERÍDEOS.....	75
4.10.3 ENZIMAS HEPÁTICAS.....	76

5 DISCUSSÃO.....	77
6 CONCLUSÃO.....	88
7 REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICES	
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) está entre as neoplasias malignas mais frequentes no mundo desenvolvido. É o terceiro câncer mais diagnosticado no sexo masculino e o segundo no feminino. Tem alta incidência na Austrália, Nova Zelândia, Europa e América do Norte numa proporção de 30/100.000 habitantes. Na Ásia, América do Sul e Oceania é de 13-14/100.000 habitantes, enquanto que na África (exceto África do Sul), ocorrem baixas incidências, em torno de 1/100.000 habitantes (AHMEDIN; BRAY; CENTER *et al.*, 2011). O CCR representa a terceira neoplasia mais diagnosticada nos Estados Unidos em ambos os sexos, com 142.820 casos novos ao ano e mortalidade prevista em torno de 50.830 para o ano de 2013, representando 9% das mortes para todos os tipos de câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos novos de câncer colorretal estimados para o Brasil, em 2014, é de 15.070 para homens e 17.530 para mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15 casos novos a cada 100 mil homens e 17 a cada 100 mil mulheres. É o terceiro tipo de câncer mais frequente em ambos os sexos, excluindo câncer de pele não melanoma (INCA, 2013).

A prevalência do CCR apresenta 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; FERREIRA; BRIGO *et al.*, 2003). As taxas brutas estimadas para 2014 são maiores na região Sudeste, com 23 casos a cada 100 mil habitantes para homens e 25 casos por 100 mil para mulheres, ocupando a segunda colocação no país, seguida pela região Sul com 20 casos no sexo masculino e 22 no feminino. Já na região Nordeste, as estimativas para o ano de 2014 são de 6 casos por 100 mil para homens e 8 para as mulheres e na região Norte, 4 em homens e 5 em mulheres (INCA, 2013).

A etiologia do CCR é resultado de uma complexa interação de variáveis externas, como agentes ambientais e dietéticos, assim como fatores internos de natureza genética ou hereditária (SANTOS JR, 2007). Outros fatores de risco incluem o etilismo, o tabagismo, a obesidade, o sedentarismo e a exposição a determinados agentes viróticos, bacterianos e parasitários, além do contato frequente com algumas substâncias carcinogênicas (defumados e agrotóxicos) (GARÓFOLO; AVESANI; CAMARGO *et al.*, 2004; DAVIES;

BATEHUP; THOMAS, 2011). São também considerados fatores de risco dieta com alto teor de gordura, condimentos, carne vermelha e o baixo consumo de fibras, vitamina D, selênio, antioxidantes, ácido fólico e cálcio (ZANDONAI; SONOBE; SAWADA, 2012). São considerados fatores de risco de natureza endógena: idade acima de 50 anos, história familiar positiva para CCR, assim como o câncer colorretal não relacionado à polipose (HNPCC), os pólipos intestinais, polipose adenomatosa familiar (PAF), doenças inflamatórias intestinais (Retocolite ulcerativa e Doença de Crohn), diabetes e antecedentes de câncer de ovário, mama ou útero (SANTOS JR, 2007).

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).

A progressão histológica da mucosa normal para adenomas de fase precoce foi sugerida por Fearon e Vogelstein (1990). Estes autores demonstraram que o surgimento de tumores colorretais é o resultado de um acúmulo sequencial de quatro a cinco mutações distintas (gene APC, ativação da proteína K-Ras e mutação das proteínas p53 e DCC), correspondendo a um estágio diferente na sequência adenoma-carcinoma (FEARON; VOGELSTEIN, 1990; FEMIA; LUCERI; TOTI *et al.*, 2010).

O gene da polipose adenomatosa do colo (APC) localiza-se no cromossomo 5 e é encontrado em todas as células de indivíduos que desenvolvem a doença de forma hereditária, porém suas mutações estão intimamente relacionadas à gênese das neoplasias esporádicas (MORIN; VOGELSTEIN; KINZLER, 1996).

O gene APC apresenta-se mutado tanto em adenomas como em formas mais avançadas do CCR e a incidência dessas mutações aumenta quanto mais avançada for a lesão. Em adenomas tubulares, o aparecimento de mutações situa-se em torno de 30%; esse número aumenta em adenomas vilosos e pode chegar a 80% nos casos de câncer colorretal. A proteína APC desempenha um papel crítico no equilíbrio do ciclo proliferativo do epitélio intestinal e sua disfunção resultante de mutações do gene APC, herdadas ou adquiridas, representa possivelmente um dos primeiros fatores na cascata de alterações genéticas que levam ao surgimento das neoplasias colorretais (PINHO; ROSSI, 1998; ROSSI; PINHO, 1999).

A proteína K-Ras (proteína reguladora da divisão celular) possui a função de desencadear o processo de crescimento e diferenciação celular, responsável por receber estímulos extracelulares, como fatores de crescimento, hormônios, neurotransmissores e citocinas, e pela transmissão desses estímulos pelo citoplasma até o núcleo. A mutação do

gene K-Ras pode estimular continuamente o núcleo, ocasionando permanente proliferação celular.

O gene K-Ras é um proto-oncogene e está localizado no cromossomo 12. Considera-se que este gene encontra-se presente em cerca de 40% a 60% dos carcinomas colorretais ou adenoma maior que 1,0 cm. Essa mutação representa um passo inicial importante no desenvolvimento da neoplasia colorretal, aumentando a incidência de mutações de acordo com a progressão do tamanho e grau da neoplasia em especial na transição de adenomas pequenos para intermediários, podendo, no entanto, apresentar uma tendência a uma menor ativação em carcinomas em estágios mais avançados (PINHO; ROSSI, 1998; ROSSI; PINHO, 1999).

O p53 (proteína protetora tumoral) é de todas as proteínas envolvidas na carcinogênese, a de maior importância e é formada a partir da codificação contida no gene p53 situado no braço curto do cromossomo 17. Mutações desta proteína são encontradas em cerca de 50% de todos os tumores malignos humanos, ocorrendo em 63% de 164 casos de adenocarcinoma colorretal (THEODOROPOULOS; KARAFOKA; PAPAILIOU *et al.*, 2009). A proteína p53 desempenha a função de detectar eventuais falhas existentes no DNA (ácido desoxirribonucleico) de células prestes a se dividir e impedir que estas se propaguem à linhagem celular subsequente. Esta proteína, quando identifica a existência de uma anormalidade no DNA da célula em divisão, promove uma parada do ciclo celular na fase G2, proporcionando reparo da lesão no DNA ou a indução da morte celular por apoptose (morte celular programada) (VOGELSTEIN; SUR; PRIVE, 2010).

Há pelo menos três mecanismos pelo qual a p53 é ativada. O primeiro é através do dano ao DNA, como o causado por radiação ionizante. A segunda via de ativação é desencadeada por fatores de crescimento como os produtos dos oncogenes Ras. O terceiro caminho é induzido por quimioterápicos, luz ultravioleta e inibidores de proteína-quinase (MEEK, 2009). Todas essas vias inibem a degradação de p53, resultando em altas concentrações desta proteína (VOGELSTEIN; SUR; PRIVE, 2010).

A pesquisa da proteína p53 em neoplasias colorretais por técnicas de imunohistoquímica tem sido amplamente utilizadas e estabelece relação entre sua detecção e fatores diagnósticos ou prognósticos (FELIN; ROCHA; FELIN *et al.*, 2008). Pelo fato da forma mutante dessa proteína ter uma meia-vida longa quando comparada à sua forma

normal, também chamada de “selvagem”, essa técnica quase exclusivamente detecta a primeira forma, ou seja, a mutante (HORIUCHI; KAWAMATA; OMOTEHARA *et al.*, 2004).

Tem sido relatada uma correlação significativamente positiva demonstrando que os tumores com elevada incidência de mutações na proteína p53 apresentam uma maior probabilidade de recidivas e menores índices de sobrevivência. Assim, essa proteína se destaca como elemento decisivo no processo de carcinogênese colorretal e um grande número de evidências aponta para sua crescente utilização na prática clínica (PINHO; ROSSI, 1998).

Embora a proteína DCC (“deleted in colorectal cancer”) possa ser encontrada em vários tecidos do organismo, apresenta-se em cerca de 70% dos tumores colorretais malignos. O gene DCC, considerado supressor de tumor, está localizado no cromossomo 18 e possui importante função relacionada à adesão celular. Acredita-se que a proteína transmembrana do DCC quando inativada compromete seriamente a adesão celular, o que proporciona aumento no potencial metastático do tumor e, conseqüentemente, piora do prognóstico (PINHO; ROSSI, 1998; ROSSI; PINHO, 1999).

Outra via genética descrita é a encontrada em mais de 95% dos pacientes portadores de CCR hereditário não-polipóide (HNPCC). Estes apresentam mutações nos genes capazes de sintetizar proteínas com a função de reparo do DNA (“mismatch repair genes”), conhecidos como hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 e hMSH6 (proteínas com função de reparo). Estas proteínas possuem a capacidade de remoção de segmentos alterados de DNA e inserção de um novo segmento contendo a sequência correta. Existem evidências de que além dos pacientes portadores de HNPCC, cerca de 20% dos CCR esporádicos apresentam esta característica genética (GEIERSBACH; SAMOWITZ, 2011).

O HNPCC, conhecido como Síndrome de Lynch, ocorre em 3% a 5% de todos os cânceres colorretais, é autossômico dominante e causado por uma mutação germinativa em um dos genes de reparo de DNA. É caracterizado por um aumento do risco de vários tipos de câncer, principalmente o colorretal (60% a 80%) (MEYER; BROADDUS; LU, 2009). A instabilidade de microssatélites, mutações nas sequências de microssatélites no tecido tumoral com perda de nucleotídeos é o achado característico de um funcionamento deficiente das proteínas de reparo (“mismatch repair genes”). Nestes casos, o tumor é descrito como sendo RER(+) para erros de replicação. Estes tumores apresentam aspectos bastante característicos

como uma tendência à localização em colo direito e uma maior incidência em pacientes mais jovens. Além disso, são mais frequentemente carcinomas pouco diferenciados e produtores de muco com índice de sobrevida melhores quando CCR RER(+) (ARMAGHANY; WILSON; CHU *et al.*, 2012).

Além das duas vias descritas para explicar carcinogênese colorretal, alguns autores descrevem que CCR pode também se desenvolver a partir de áreas de mucosas desprovidas de alterações macroscópicas prévias compatíveis com adenomas, conhecidos como carcinomas “de novo”. Nessas áreas, identificou-se mucosa colorretal com discreta elevação de cor avermelhada e, ocasionalmente, uma depressão central compatível histologicamente com adenoma tubular, apresentando atipias significativas e displasias de moderadas a graves, denominadas adenomas planos. Atribui-se a existência de uma transmissão familiar como síndrome do adenoma plano hereditário e que apresenta mutações relacionadas ao gene APC (MUTO; KAMIYA; SAWADA *et al.*, 1985; LYNCH; SMYRK; LANSPA, 1988). A síndrome do adenoma plano é assim chamada porque os portadores tendem a desenvolver múltiplas lesões, em média de cinco a dez, planas e elevadas principalmente na mucosa do colo proximal (LYNCH; SMYRK; WATSON, 1992).

Dentre os modelos experimentais de câncer cólico, a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e o seu metabólito, o azoximetano (AOM), são agentes carcinogênicos que induzem CCR em roedores, por processo com múltiplos passos, caracterizado pela formação sequencial de lesões histopatológicas similares àquelas observadas na carcinogênese espontânea em humanos (CADERNI; FEMIA; GIANNINI *et al.*, 2003).

O AOM induz lesões pré-neoplásicas por aumento da expressão do gene c-fos e diminuição do gene c-myc, assim como à mutação do gene K-Ras (STOPERA; DAVIE; BIRD, 1992). 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). O AOM causa proliferação de hepatócitos. Estes podem ser pré-neoplásicos, quando não apresentam nenhum grau de crescimento autônomo, designados por focos de hepatócitos alterados, espongiões e pelioses e também neoplásicos como colangiomas, adenomas e carcinomas (BURLAMAQUI; DORNELAS; RODRIGUES *et al.*, 2013). O AOM é geralmente preferido em relação ao DMH por ser mais potente e

requerer poucas reações para sua ativação (PAPANIKOLAOU; WANG; DELKER *et al.*, 1998).

As lesões pré-neoplásicas, com seus vários graus de displasia, representam um passo obrigatório na carcinogênese do colo, e muito esforço tem sido dedicado para identificação e caracterização desses processos displásicos em humanos e modelos animais (WASHINGTON; POWELL; SULLIVAN *et al.*, 2013).

Os focos de criptas aberrantes (FCA) são conceituados como criptas simples e múltiplas que possuem a abertura luminal alterada, epitélio mais espesso e são maiores que as criptas adjacentes (PRETLOW; O'RIORDAN; SOMICH *et al.*, 1992; BIRD, 1995). FCA é a lesão pré-neoplásica mais precoce com presença de displasia e é considerada precursora de adenomas e carcinomas colorretais em humanos (CUMMINGS, 2000; RONCUCCI; PEDRONI; VACCINA *et al.*, 2000; TAKAYAMA; OHI; HAYASHI *et al.*, 2001; ADLER; GOSTOUT; SORBI *et al.*, 2002).

Os FCA foram inicialmente identificados na mucosa colorretal de roedores expostos à ação de substâncias carcinogênicas no modelo experimental de Bird (1987). Posteriormente, foram reconhecidos e identificados em humanos (PRETLOW; BARROW; ASHTON *et al.*, 1991) e desde então considerados como marcador biológico confiável de lesões pré-neoplásicas e cancerosas no intestino grosso (MORI; YAMADA; TOSHIYA *et al.*, 2004).

Shirtliff e Bird (1996) sugeriram que os focos com maior número de criptas aberrantes possuem maior risco de se transformar em neoplasia de colo, pois refletem o processo de proliferação das lesões iniciais. Desta maneira, o número de criptas por foco é um parâmetro que pode indicar, com certa precisão, risco para o desenvolvimento tumoral (PRETLOW; O'RIORDAN; SOMICH *et al.*, 1992).

Foram identificados marcadores biológicos específicos para carcinogênese cólica, em roedores tratados com AOM ou DMH, o “mucin depleted foci” (MDF) ou foco depletado de mucina, caracterizado pela formação de criptas com ausência ou escassez na produção de muco, mostrando características displásicas nos cortes histológicos (CADERNI; FEMIA; GIANNINI *et al.*, 2003; FEMIA; DOLARA; CADERNI, 2004). E também, “ β -catenin-accumulated crypts” (BCAC) ou criptas com acúmulo de β -catenina abrigando mutações genéticas frequentes, com importante papel na carcinogênese (YAMADA; YOSHIMI;

HIROSE *et al.*, 2000; YAMADA; YOSHIMI; HIROSE *et al.*, 2001; HIROSE; KUNO; YAMADA *et al.*, 2003; HATA; YAMADA; KUNO *et al.*, 2004; MORI; YAMADA; TOSHIYA *et al.*, 2004; TAKETO; EDELMANN, 2009).

O modelo de câncer colorretal em roedores continua sendo um valioso instrumento para elucidar vias moleculares desta neoplasia. Isso permite identificar novos biomarcadores com elaboração de estratégias inovadoras para prevenir e tratar o câncer colorretal. Na última década, desde o consenso de 2000, foram criados novos modelos de CCR, com múltiplas alterações genéticas que reproduzem tumores semelhantes aos homólogos humanos na morfologia, localização e evolução da doença. Alguns avanços foram possíveis nestes modelos como, por exemplo, a possibilidade de estudar metástase a distância e o desenvolvimento de tumores em outros órgãos (WASHINGTON; POWELL; SULLIVAN *et al.*, 2013).

Atualmente, se aceita que a inflamação crônica desempenha um papel importante no desenvolvimento de neoplasias envolvendo mecanismos celulares e moleculares. O aumento da síntese de mediadores imunológicos de resposta pró-inflamatória, com produção exacerbada de citocinas, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucinas-1 β e 6 (IL-1 β e IL-6) e eicosanoides, tais como leucotrienos (LTB₄), tromboxanos A₂ e B₂ (TXA₂ e TXB₂) e prostaglandinas E₂ e I₂ (PGE₂ e PGI₂) afeta o metabolismo das células causando danos estruturais ou até mesmo alterações no DNA (TERZIC; GRIVENNIKOV; KARIN *et al.*, 2010; HONG; LEE; KIM *et al.* 2010).

Em torno de 20% dos cânceres humanos podem ser causados por inflamação crônica incluindo úlcera gástrica (*helicobacter pylori*), carcinoma de colo uterino (vírus do papiloma humano), hepatite crônica (vírus da hepatite B e C) e infecções parasitárias crônicas (*leishmania mansoni*) (RAKOFF-NAHOUM, 2006). As doenças inflamatórias intestinais favorecem reação imune contra a flora intestinal e esta inflamação crônica pode aumentar o risco de carcinoma colorretal (EADEN; ABRAMS; MAYBERRY, 2001).

Obesidade atua como fator de risco independente e significativa na carcinogênese colorretal, sendo vários os mecanismos implicados como hiperinsulinemia, “insulin-like growth factor” (IGF-1), leptina, adiponectina, microbiota e citocinas inflamatórias. Portanto, portadores de CCR que são obesos apresentam normalmente um pior prognóstico (NA; MYUNG, 2012).

Atualmente, a obesidade é uma enfermidade caracterizada por uma inflamação crônica no tecido adiposo, detectada por presença de macrófagos infiltrados neste tecido e elevação de marcadores e citocinas inflamatórias.

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. Ocorreria então, 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-inflamatória (WOOD; DE HEREDIA; WANG *et al.*, 2009).

Evidências epidemiológicas sugerem que a obesidade abdominal, representada por aumento da circunferência abdominal e aumento da relação cintura-quadril pode ser mais preditiva para o risco de CCR do que a obesidade universal, evidenciada por um alto IMC (LIU; HSU; LI *et al.*, 2010). A incidência deste câncer em pacientes obesos tem características específicas em gênero e localização, sendo mais alta em homens que em mulheres e no colo que no reto. A relação entre IMC e CCR foi similar para a localização proximal e distal. Quanto ao câncer do reto, o risco aumentado se correlacionou com o aumento do IMC em homens, enquanto nenhuma associação foi observada nas mulheres (LARSSON; WOLK, 2007).

Alguns autores afirmam que a perda de peso e mudanças no estilo de vida, tais como alterações dietéticas podem reduzir o risco de CCR. É muito importante o conhecimento que a obesidade é um fator de risco potencialmente modificável e que pode alterar a incidência e o desfecho do CCR (NA; MYUNG, 2012).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) também está envolvida na etiologia de várias neoplasias incluindo a colorretal. O epitélio do colo é um tecido susceptível à ação das EROs, principalmente dos radicais hidroxila gerados a partir de microorganismos da flora bacteriana e que atuam como promotores da carcinogênese (ROSE, 1997).

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, levando à constante estresse oxidativo e geração de espécies reativas de oxigênio, as quais podem causar dano ao DNA. Ocorre também formação de eicosanoides, lipídios de vida curta que derivam

principalmente do ácido araquidônico geradores de radicais livres; efeitos sobre a proliferação celular e sobre as vias de transdução de sinais, levando à expressão alterada de genes; efeito sobre enzimas, como o citocromo P450 e redução da atividade da superóxido dismutase (SOD) com aumento das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS); alterações estruturais e funcionais nas membranas celulares, resultando em alterações nos receptores de hormônios e fatores de crescimento (MARTINS; GRUENZO, 2009).

O persistente estresse oxidativo e a aumentada peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, conduzindo ao dano macromolecular e interrupção das vias de sinalização, são conhecidos por estimular o desenvolvimento de malignidades. A peroxidação lipídica gera diversos reativos que podem formar promutagênicos. O malonaldeído, um produto da peroxidação lipídica, gerado a partir de danos nas membranas celulares, apresenta capacidade de reação com proteínas e DNA, mostra-se mutagênico em bactérias e células de mamíferos e carcinogênico em ratos (LOUREIRO; MASCIO; MARISA *et al.*, 2002).

O organismo humano está bem adaptado para se proteger dos danos oxidativos induzidos pela fração inspirada de oxigênio (FIO₂) de 21% à pressão atmosférica normal e em condições fisiológicas. Os mecanismos de proteção utilizados pelo organismo incluem os oxidantes não enzimáticos, como a glutatona, vitamina E, vitamina C, β -caroteno, N-acetilcisteína, proteínas de ligação da heme, e EPA/DHA, entre eles. Os sistemas enzimáticos endógenos removedores de resíduos incluem superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase, com seus fatores associados, selênio, zinco, manganês e ferro (HEYLAND; DHALIWAL; DAY *et al.*, 2006).

O azeite de oliva (AO) é rico em ácido graxo ômega-9 e vitamina E, conhecidos por suas propriedades antioxidantes. O fato de a estrutura elementar do AO ter somente uma dupla ligação, juntamente com a presença da vitamina E, confere uma maior proteção contra a peroxidação lipídica (GRIMBLE, 2001). O AO reduz o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (OH; LEE; LEE *et al.*, 2009).

O efeito da gordura no metabolismo e na carcinogênese não depende somente da quantidade, como também da composição de ácidos graxos específicos (CAMPOS; WAITZBERG; LOGULLO *et al.*, 2005). Muitos estudos têm demonstrado que os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (ω -3) e monoinsaturado ômega-9 (ω -9) desempenham um papel protetor no desenvolvimento do câncer colorretal, enquanto os ácidos graxos saturados e os poliinsaturados ômega-6 (ω -6) promovem a carcinogênese (NORAT; BINGHAM; FERRARI *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 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 e em nozes (ANDRADE; DO CARMO, 2006).

Atualmente, a adequação do balanço dietético de lipídeos tem como propósito controlar a resposta inflamatória exacerbada, por meio da relação entre os tipos de ácidos graxos poliinsaturados e monoinsaturados ingeridos (CALDER, 2003). Os AG são importantes componentes dos fosfolípidos nas membranas celulares de plantas e de animais e são liberados pela enzima fosfolipase A2 para as reações de desaturação e alongação, onde o ALA precede o EPA e o DHA, e o ácido araquidônico procede do AL. Tanto os ômegas-3 como o ômega-6 não podem ser diretamente desaturados, porém podem ser alongados e depois desaturados; e eles utilizam os mesmos tipos de enzimas. Importante saber que os 3 principais ácidos graxos ômega-3: ALA, EPA e DHA, suprimem a produção de Ácido Araquidônico (AA) a partir do AL por competição mais eficaz que o AL pelas enzimas delta-5 desaturase e delta-6 desaturase. O ALA e o AL possuem efeitos opostos, tendo o primeiro, ação antiinflamatória e o segundo, em altas concentrações, pode induzir resposta inflamatória (CALDER; YAQOUB; THIES *et al.*, 2002; TAPIERO; BA; COUVREUR *et al.*, 2002; RUXTON; REED; SIMPSON *et al.*, 2004).

Os PUFAs (EPA e AA) são precursores de eicosanoides: prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) e leucotrienos (LT); os quais são gerados, respectivamente, pelas vias da enzima ciclooxigenase (COX) da lipooxigenase (LOX) e do citocromo 450. O EPA produz as séries ímpares, PG/TX série 3 e LT série 5, com propriedades antiinflamatórias, e o AA as séries pares, PG/TX2 e LT4, pró-inflamatórias. Os EPA e DHA também podem elevar mediadores lipídicos antiinflamatórios como as resolvinas e as protectinas. Esses mediadores

podem direta ou indiretamente suprimir a atividade de alguns fatores de transcrição nuclear como o NF- κ B. Os eicosanóides pares agem ao contrário promovendo a ativação desses fatores de transcrição. A ativação desses fatores de transcrição pode elevar as citocinas IL-1 β , TNF- α e a IL-6 que exercem importante papel na promoção da resposta inflamatória (CALDER, 2006; CALDER, 2007; KANG; WEYLANDT, 2008).

Dietas enriquecidas de ácidos graxos ω -9 apresentam efeito protetor no desenvolvimento tumoral por regular a expressão e atividade de proteínas-chave envolvidas na biossíntese das prostaglandinas e na indução de apoptose (SCHWARTZ; BIRK; RAZ *et al.*, 2004). Controle glicêmico, redução da inflamação sistêmica, diminuição do risco cardiovascular pela melhora do perfil lipídico e pela queda da pressão arterial vem sendo frequentemente relatados com o uso do AO (BUCKLAND; MAYEN; AGUDO *et al.*, 2012).

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 ácido oleico 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 substância anti e pró-inflamatórias ainda não está claramente elucidada (MORANI; TORSONI; ANHÊ *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; CALDER; DUPERTUIS *et al.*, 2004). Conseqüentemente, 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; KIM; KANG *et al.*, 2000; GARÓFOLO; PETRILLI, 2006).

A proporção de ácidos graxos (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 Organização Mundial da Saúde 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).

Considerando que essas duas famílias de ácidos graxos competem pelas mesmas enzimas, o balanço entre ω -6 e ω -3 na dieta é de grande importância. Como consequência das mudanças no padrão dietético humano, a relação entre ácidos graxos 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).

Há vários trabalhos que têm abordado aspectos dietéticos passíveis de interferir no desenvolvimento do câncer colorretal, favorecendo de certa forma à sua detecção precoce e possíveis estratégias preventivas. Assim, Simopoulos (2006) realizou um estudo clínico sobre a importância da razão entre ácidos graxos ω -6 e ω -3 e concluiu que a baixa razão ω -6: ω -3 foi capaz de reduzir o risco de doenças crônicas. Burlamaqui *et al.* (2012) estudaram o efeito de uma dieta hiperlipídica rica em ômega 3, 6 e 9 na formação de criptas aberrantes em mucosa cólica de ratos induzidos com AOM e concluíram que esta dieta exerceu redução nos FCA com 5 ou mais criptas aberrantes, exercendo efeito atenuador na carcinogênese. Padidar e colaboradores (2012) verificaram em ratos que dietas ricas em gorduras alteram múltiplos fatores moleculares aumentando o risco de câncer colorretal associado com obesidade. Higurashi *et al.* (2012) mostraram que o ácido eicosapentaenoico (EPA) suprimiu a formação de FCA e a atividade proliferativa celular na mucosa normal em pacientes portadores de pólipos colorretais.

Visto que o CCR tem alta prevalência e depende de fatores intrínsecos e ambientais, sendo a alimentação inadequada um fator de risco importante, e como não se detectou na literatura consultada estudo que utilizasse dietas com diferentes concentrações de lipídios,

ricas em gordura insaturadas e com alta razão ω -9: ω -6 e baixa ω -6: ω -3, decidiu-se verificar se essas dietas interferem na carcinogênese colorretal induzida por azoximetano em ratos.

2 OBJETIVO

Verificar efeitos das dietas hiperlipídica, normolipídica e hipolipídica com baixa relação ω -6/ ω -3 e alta ω -9/ ω -6 na carcinogênese colorretal induzida por azoximetano em ratos

Analisar a ação das diferentes dietas estudadas na ingesta e evolução da massa corporal 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 o número de protocolo 09/09 em 27/05/2009 (Anexo A) e de acordo com as Normas Internacionais para Pesquisa Biomédica em Animais (Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciências Médicas, 1990) e de acordo com a Lei Federal nº. 6.638 que estabelece normas para prática didático-científica da vivisseção de animais, de 8 de maio de 1979/27/05/2009.

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). Peso médio entre 40-50g e com 3 semanas de vida. Os animais 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).

Tabela 1 - Composição das dietas

COMPOSIÇÃO	PADRÃO	HIPER	NORMO	HIPO
Percentual em g/dia/cada rato	46,84 g	38,64 g	41,04 g	46,84 g
Percentual de carboidratos	58%	45%	40%	58%
Percentual de proteínas	30%	30%	30%	30%
Percentual de lipídios	12%	45%	30%	12%
Total em calorias da dieta (Kcal)	176,17	176,57	171,11	176,17

Tabela 2 - Perfil lipídico e relação entre os ômega 3, 6 e 9

DIETAS	PADRÃO	HIPERLIPÍDICA	NORMOLIPÍDICA	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 w 3, 6 e 9				
w6:w3	8 : 1	1,4 : 1	1,4 : 1	1,4 : 1
w9:w6	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

3.2 Indução da carcinogênese cólica

O azoximetano (Wako Chemicals USA) foi adquirido na apresentação em frasco-ampola (100mg) e diluído em água destilada para injeção estéril, a fim de obter a dose de 20mg/kg de peso do animal, sendo administrado por via intraperitoneal (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).

3.3 Delineamento do experimento

3.3.1 Grupos controle

Grupo I (SALINA) – grupo controle 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 (Figura 1).

Grupo II (PADRÃO) – grupo controle 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 (Figura 1).

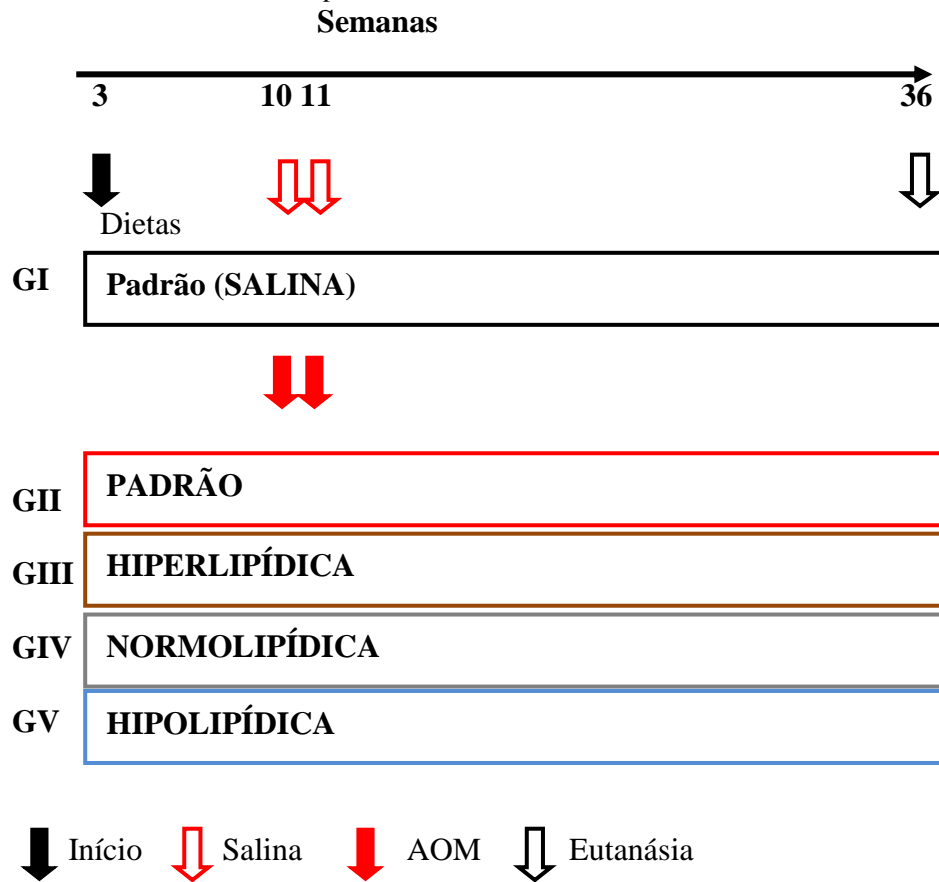
3.3.2 Grupos experimentos

Grupo III (HIPERLIPÍDICO) – grupo estudo 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 (Figura 1).

Grupo IV (NORMOLIPÍDICO) - grupo estudo 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 (Figura 1).

Grupo V (HIPOLIPÍDICO) - grupo estudo 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 (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.



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 5 ml de sangue da aorta abdominal para análise bioquímica e dosagem de citocinas inflamatórias. Logo após, foi realizada proctocolectomia total. O espécime foi medido e aberto em sua borda antimesocólica. Lavado com soro fisiológico e distendido sobre uma superfície plana para avaliação macroscópica. Posteriormente, os animais foram mortos por choque hipovolêmico após secção da aorta abdominal.

3.5 Paramêtros avaliados

3.5.1 Massa corpórea

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

3.5.2 Ingesta

A ingesta de todos os animais foi avaliada pela diferença entre o alimento oferecido e a sobra, a qual foi pesada pelo mesmo examinador, utilizando a mesma balança (balança analítica Ohaus AS 2600) no início do experimento e em dias alternados até a eutanásia.

3.5.3 Sinais Clínicos

Foram avaliadas, em dias alternados, manifestações intestinais como prolapso retal e diarreia, esta classificada conforme escore de Kurita *et al.*, 2000.

3.5.4 Macroscopia

Logo após a laparotomia, fez-se inventário da cavidade peritoneal, anotando-se a presença de tumores intestinais e extraintestinais, intussuscepção, dilatação de alças intestinais e metástases. Posteriormente, realizou-se proctocolectomia. O colon foi medido e aberto em sua borda antimesocólica. Lavado com soro fisiológico e estendido sobre papel tipo “Kraft”. Os tumores existentes eram anotados, mensurados e ressecados e postos em solução de formalina a 10% e enviados 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).

O colo restante foi dobrado em seu eixo longitudinal, de forma concêntrica, tipo “rocambole” e fixado em solução de formalina tamponada a 10%. Vinte e quatro horas após, o espécime foi distendido e dividido em três partes iguais (distal, médio, proximal), desprezando-se 1cm proximal ao ânus e encaminhado para quantificação dos FCA pelo método de Bird (1987).

3.5.5 Microscopia

O colo foi corado com azul de metileno a 0,1% em PBS (solução tamponada fosfatada) por 2 min. previamente à contagem das CA e dos FCA (BIRD, 1987; BURLAMAQUI; DORNELAS; RODRIGUES, *et al.*, 2010). A mucosa cólica foi avaliada por dois examinadores utilizando microscópio estereoscópico (M90 VASCONCELLOS da DF VASCONCELLOS S.A.) com magnificação de 40X.

O número de FCA e o número de criptas por cada foco (multiplicidade) foram avaliados de forma contínua de acordo com a localização cólica.

Após análise estereoscópica, os seguimentos cólicos e tumores foram encaminhados para rotina de preparo histológico, sendo feitos cortes de 5 μ e coloração pelo HE. A análise das lâminas foi feita por dois patologistas nos aumentos de 10, 50, 100 e 200X, procurando-se classificar os tumores em adenomas hiperplásicos, tubulares ou adenocarcinomas (Quadro 1), empregando-se escores para definir o grau de atipia, número de mitoses, diferenciação e invasão (Quadros 2, 3). Após, análises histopatológicas, os tumores malignos foram estadeados conforme a classificação TNM da “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) e da “International Union Against Cancer” (UICC) publicados em 2009 (7ª edição) para câncer colorretal (ANEXO D) e tabulados conforme o Índice de Carcinogênese (DORNELAS modificado, 2009).

Índice de Carcinogênese:

Para cada lesão histopatológica evolutiva sequencial foi estabelecido um escore de forma que sempre a lesão subsequente recebesse um escore inicial igual ao somatório máximo possível de ser obtido nas lesões anteriores (Tabela 1).

Quadro 1- Escore por lesão histopatológica cólica

Lesões Histopatológicas	Escore Inicial
Adenoma Hiperplásico	0
Adenoma tubular	3
Carcinoma	9

DORNELAS modificado, 2009

Gradação Histológica (GH) – Diferenciação + Atipia + Número de mitoses = Máximo 9

Diferenciação:

Bem diferenciado - 1

Moderadamente diferenciado - 2

Indiferenciado 3

Atipia Celular

Baixo grau - 1

Alto grau - 2 a 3

Número de Mitoses

Até 10 - 1

10 a 20 - 2

>20 -

Invasão -Máximo 6

Intramucosa - 1

Submucosa - 2

Muscular - 3

Serosa - 4

Peritônio - 5

Metástase - 6

Escore Total: Escore inicial + [GH (Diferenciação+ Atipia + Numero de mitoses) x invasão]

Após classificação das lesões elas foram introduzidas em tabelas individuais para cada colon .

A lesão que obteve maior escore foi computada como índice de carcinogênese alcançado pelo colo. Uma vez analisada todos os colos de um grupo os índice foram introduzidos em tabelas individuais por grupo.

Tabela 2- Critério para avaliação do grau de atipia

Critérios para definir grau de atipia	Baixo grau (1)	Alto Grau (2 e 3)
Aumento de celularidade	Se apresentar um único critério	2- Se mais de um critério ou se todos de leve a moderada intensidade 3- Se todos de intensidade acentuada
Células gigantes		
Hipercromasia nuclear		
Nucléolo proeminente		
Pleomorfismo celular		
Pleomorfismo nuclear		
Presença de mitose atípica		

3.5.6 Citocinas

Para avaliação do processo inflamatório, foram dosadas as seguintes citocinas pelo kit “Milliplex Rat Cytokine”: IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-18, TNF- α e VEGF.

Coletadas amostras de sangue da aorta abdominal, sendo 1,5 ml do sangue colocado em tubo de eppendorf com EDTA (3 gotas). Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1000xg. O plasma foi removido e imediatamente estocado à -80°C para posteriormente seguir as técnicas padronizadas (Anexo G).

3.5.7 Estresse oxidativo

3.5.7.1 Dosagem da concentração das substâncias reagentes do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação de peroxidação lipídica foi realizada pela reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) (BERNHEIM; BERNHEIM; WILBUR, 1948). Com esse fim, 5 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 F).

3.5.7.2 Dosagem da concentração da glutatona

Durante a eutanásia foram colhidos 5 ml de sangue, centrifugados e congelados em nitrogênio líquido a -70°C, para posterior determinação da concentração de glutatona. 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 F).

3.5.8 Imunohistoquímica

Para avaliação do processo inflamatório foram analisados o NFkB e COX-2, da morte celular, o TUNEL, da proliferação, o Ki-67 e da mutação do oncogene Ras, o K-Ras.

Cortes de 4 μ dos blocos de parafina estocados das peças cirúrgicas foram seguidos para procedimentos de imunohistoquímica (Anexo H), utilizando-se anticorpo monoclonal anti-NFkB (anticorpo C-20, 200UG/ML, código SC-372, Santa Cruz), anti-COX-2 (anticorpo M-19, 200UG/ML, código SC-1747, Santa Cruz), anti-Ki-67 (anticorpo M-19,

200UG/ML, código SC-7846, Santa Cruz) e anti-K-Ras (anticorpo F234, 100UG/ML, código SC-30, Santa Cruz) (Anexo E).

O TUNEL é uma técnica utilizada para visualizar e localizar a presença de morte celular representada pela inserção de PI (iodeto de propídio) ou DAPI nas cadeias de DNA danificadas pelo processo de morte celular. As lâminas foram obtidas de emblocados em parafina e montadas em lâminas de vidro específica para este fim (Anexo I).

3.5.9 Análise bioquímica

No dia da eutanásia foi colhido sangue para realizar as 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, TBARS e Glutathione reduzida.

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

3.5.10 Análise Estatística

Os dados quantitativos (expressos em forma de média e erro-padrão da média) 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 imuno-expressão de COX) foram expostos em forma de Mediana (mínima - máxima) e analisados por meio do teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn.

Variáveis qualitativas (incidência de metástases, estadiamento, entre outros) foram expressas em forma de frequência absoluta e percentual e analisadas por meio dos testes Exato de Fisher ou Qui-quadrado.

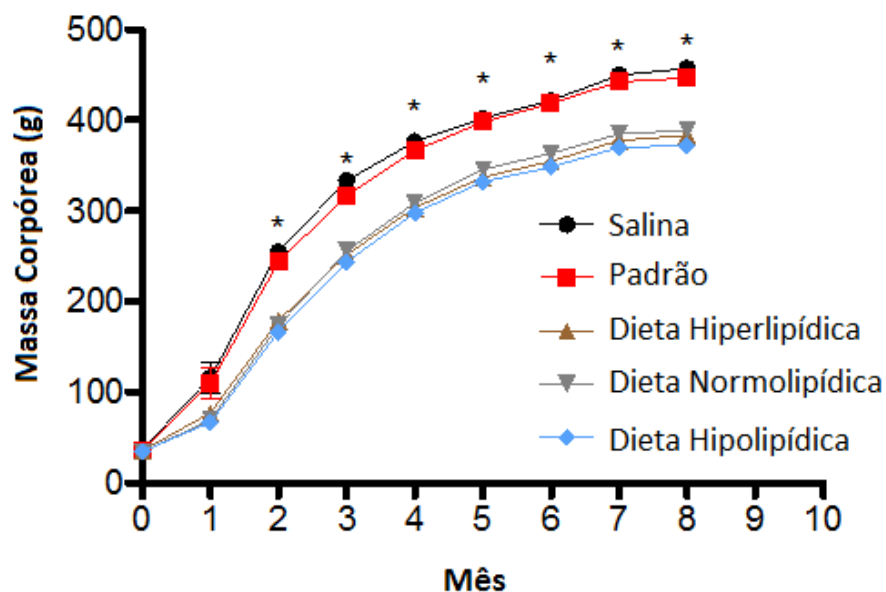
Todas as análises foram realizadas no software estatístico GraphPad Prism 5.0 para Windows e adotou-se uma confiança de 95% para todas as avaliações.

4 RESULTADOS

4.1 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 2).

Figura 2 – Média de massa corpórea (g) em cada grupo durante todo o experimento. * $p < 0.05$, Salina e Padrão *versus* Hiper, Normo e Hipolipídico. Os animais alimentados com dieta Padrão, expostos ou não ao AOM tiveram aumento significativo da massa corpórea em relação aos animais que receberam dietas Hiper, Normo e Hipolipídica



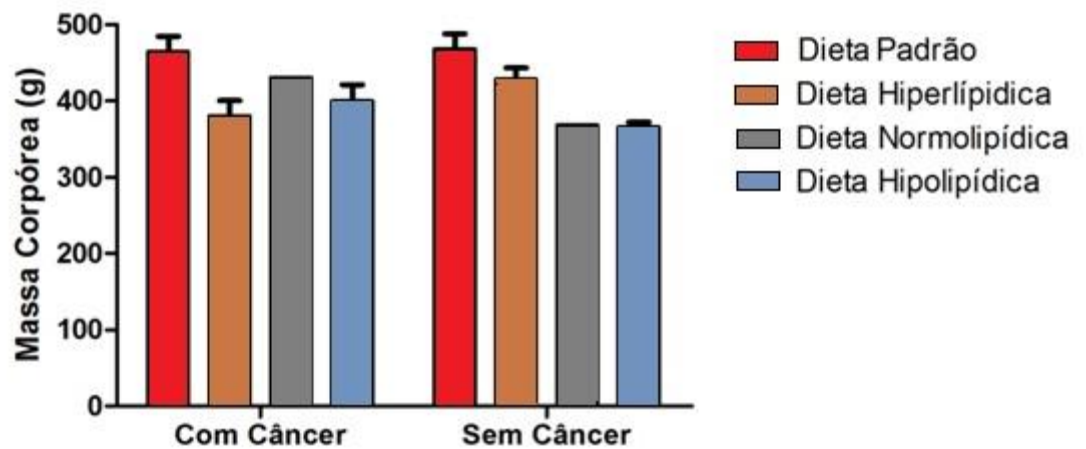
* $p < 0.05$, (ANOVA multifatorial para medidas repetidas /Bonferroni, média \pm EPM)

4.1.1 Média da massa corpórea dos ratos com e sem câncer por grupos no final do experimento

No final do experimento, foi avaliada a média da massa corpórea dos ratos com câncer e sem câncer dentro do mesmo grupo e não houve diferença significativa entre os animais com câncer e sem câncer nos grupos Padrão (com câncer: $464,6 \pm 20,1$; sem câncer:

468±19,6); Hiper (com câncer: 380,5±20,1; sem câncer 428,9±14,6); Normo (com câncer: 431,3±4,7; sem câncer: 368,5±16,4) e Hipolipídica (com câncer: 400±21,6; sem câncer: 366,6±5,8) ($p=0.165$) (Figura 3).

Figura 3 – Média de massa corpórea (g) dos ratos com e sem câncer em cada grupo experimental. Os animais alimentados com dietas Padrão, Hiper, Normo e Hipolipídica não mostraram diferença significativa na massa corpórea dos ratos com câncer e sem câncer dentro do mesmo grupo.

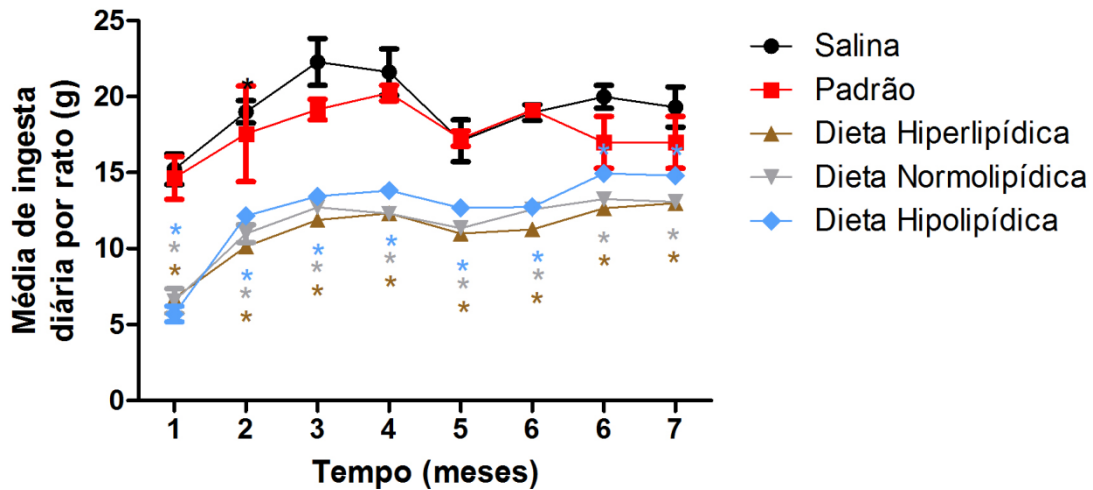


* $p<0.05$, ANOVA/Bonferroni, média ± EPM.

4.2 Ingesta

A ingesta dos animais dos grupos experimentais foi significativamente menor quando comparada à ingesta dos animais dos grupos controles (Padrão e Salina) do início ao final do experimento. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre as ingestas dos animais dos grupos controles. . Apenas nos dois últimos meses a média de ingesta não mostrou diferença significativa entre o grupo Hipolipídico e o Padrão com ($p<0.001$) (Figura 4).

Figura 4 – Média de ingesta em cada grupo durante todo o experimento. A ingesta mostrou média superior nos animais alimentados com dieta Padrão, expostos ou não ao AOM em relação aos animais que receberam dietas Hiper, Normo e Hipolipídica. Apenas nos dois últimos meses a média das ingestas não mostrou diferença significativa entre o grupo Hipolipídico e o Padrão.



ANOVA multifatorial para medidas repetidas/Bonferroni, média \pm EPM

4.3 Sinais Clínicos

No decorrer do experimento, observou-se que todos os ratos dos grupos Salina e Padrão apresentaram escore de diarreia grau 0. Por sua vez, os animais alimentados com dieta Hiperlipídica apresentaram diarreia grau 3, valor significativamente superior aos grupos Salina, Padrão, Normo e Hipolipídica. Os animais dos grupos Normo e Hipolipídico apresentaram diarreia grau 2, valores significativamente superiores aos grupos Salina e Padrão ($p < 0.001$) (Tabela 3).

Com relação ao prolapso retal, ocorreu em apenas um animal no grupo Padrão, sem diferença significativa com os demais grupos ($p = 0.561$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Sinais clínicos apresentados pelos animais em todos os grupos. Os animais alimentados com diferentes dietas lipídicas apresentaram aumento significativo dos escores de diarreia em relação aos grupos Padrão e Salina. O grupo alimentado com dieta Hiperlipídica apresentou aumento do grau de diarreia em relação aos grupos com dieta Normo e Hipolipídica. Não houve diferença significativa no número de animais com prolapso retal.

Grupos	Número de Ratos	Diarreia/Grau	Prolapso Retal**
Salina	12	0 (0-0)	0 (0.0%)
Padrão	12	0 (0-0)	1 (8.3%)
Hiperlipídica	11	3 (3-3)*	0 (0.0%)
Normolipídica	10	2 (2-2)*†	0 (0.0%)
Hipolipídica	11	2 (2-2)*†	0 (0.0%)
p-Valor		<0.001	0.561

*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).

4.4 Macroscopia

Os achados macroscópicos foram tumores intestinais (delgado e grosso), intussuscepções, dilatações de alças intestinais e lesões hepáticas com alguns nódulos endurecidos e numerosos cistos, na grande maioria deles coalescentes (Tabela 4).

Tabela 4 - Achados Macroscópicos. Houve aumento significativo no grupo Padrão na frequência de tumores cólicos, intussuscepção e lesão hepática em relação ao grupo Salina. Ocorreu redução significativa da intussuscepção nos grupos Hiper e Normolipídico e de lesão hepática no grupo Hipolipídico em relação ao Padrão.

Grupos	N	Tumores Intestinais			Outros Achados	
		Cólico	Delgado	Intussuscepção	Dilatação de alças	Lesões Hepáticas
Salina	12	1 (8.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (8.3%)
Padrão	12	11 (91.7%)†	1 (8.3%)	5 (41.7%)†	1 (8.3%)	10 (83.3%)†
Hiperlipídica	11	6 (54.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)‡	0 (0.0%)	7 (63.6%)
Normolipídica	10	9 (90.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)‡	0 (0.0%)	5 (50.0%)
Hipolipídica	11	6 (54.5%)	1 (9.1%)	1 (9.1%)	0 (0.0%)	4 (36.4%)‡
p-Valor*		<0.001	0.560	0.003	0.432	0.004

*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.

Com relação aos achados macroscópicos, houve aumento da frequência de animais com tumores cólicos no grupo Padrão (11, 91,7%) em relação ao grupo Salina (1, 8,3%). Frequência 121,0 vezes (intervalo de confiança 6,7 – 2190,0) superior a este (p<0.001). Não houve diferença entre os grupos alimentados com dietas Hiper (6, 54,5%, p=0,069), Normo (9, 90,0%, p=1,000) e Hipolipídica (1, 9,1%, p=0,069) e o grupo Padrão (Tabela 4 e Figura 5).

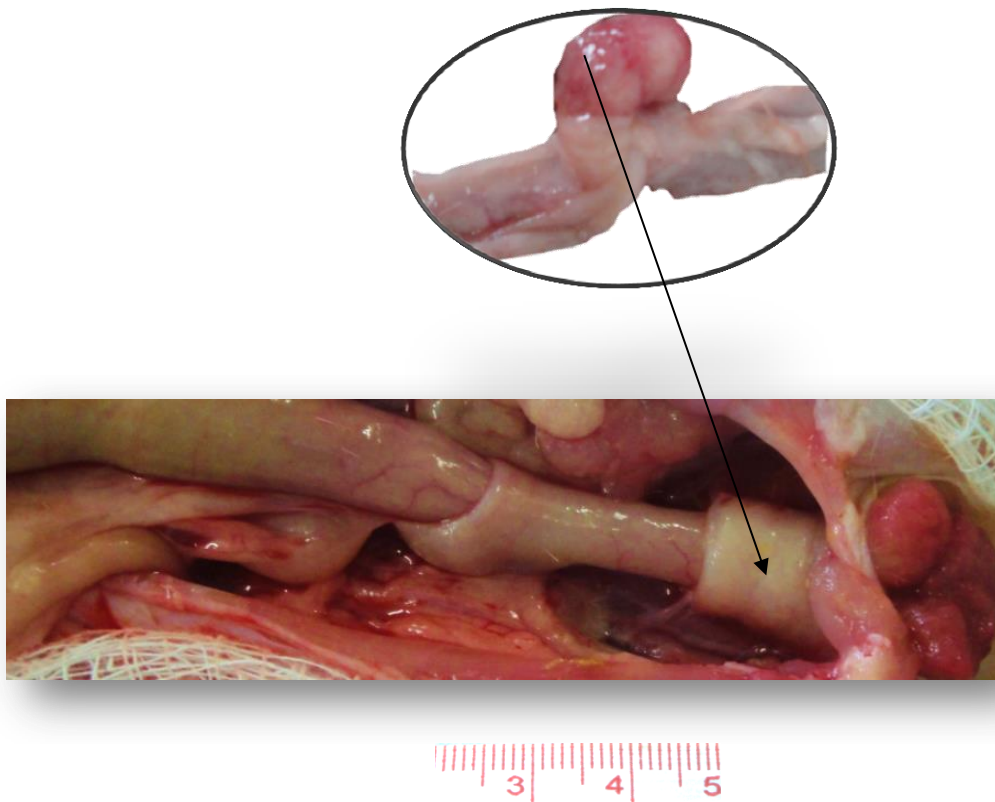
O número de animais com tumores no intestino delgado nos grupos Salina (0, 0.0%), Padrão (1, 8.3%), Hiper (0, 0.0%), Normo (0, 0.0%) e Hipolipídica (1, 9.1%) não diferiu significativamente entre si (p=0,560) (Tabela 4 e Figura 8).

A presença de intussuscepção mostrou variação significativa nos quatro grupos estudados (p=0,003). Houve aumento de 18,3 vezes (intervalo de confiança = 0,9 – 381,0) no grupo Padrão (5, 41,7%) em relação ao grupo Salina (0, 0,0% p=0.037). Não houve diferença significativa entre os grupos Padrão e Hipolipídico (1, 9,1%, p=0.155), porém, houve redução de sua frequência em 16,7 vezes (intervalo de confiança = 0,8 – 352,1) no grupo Hiper (0, 0,0% p=0.037) e 15,4 vezes (intervalo de confiança = 0,7 – 323,1), no grupo Normolipídico (0, 0,0% p=0.040) (Tabela 4 e Figuras 5, 6 e 7).

Com relação à dilatação de alças, não houve diferença significativa entre o número de animais dos grupos estudados ($p=0.432$) (Tabela 4 e Figura 9).

Houve variação significativa no número de animais exibindo lesões hepáticas ($p=0.004$). O aumento foi de 55,0 vezes (intervalo de confiança = 4,3 – 703,9) na frequência de lesão hepática no grupo Padrão (10, 83,3%) em relação ao Salina (1, 8,3%, $p=0.001$) e redução significativa de 8,7 vezes (intervalo de confiança = 1,2 – 61,7) no grupo de dieta Hipolipídica (4, 36,4%, $p=0.036$) em relação ao Padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos Hiper (7, 63,6%, $p=0.371$) e Normolipídico (5, 50,0%, $p=0.172$) em relação ao Padrão (Tabela 4 e Figura 10).

Figura 5- Tumor vegetante e intussuscepção



Duas intussuscepções - Lesões tumorais vegetantes prolapsadas na região anal. Grupo Padrão, Rato 10

Figura 6 – Intussuscepção



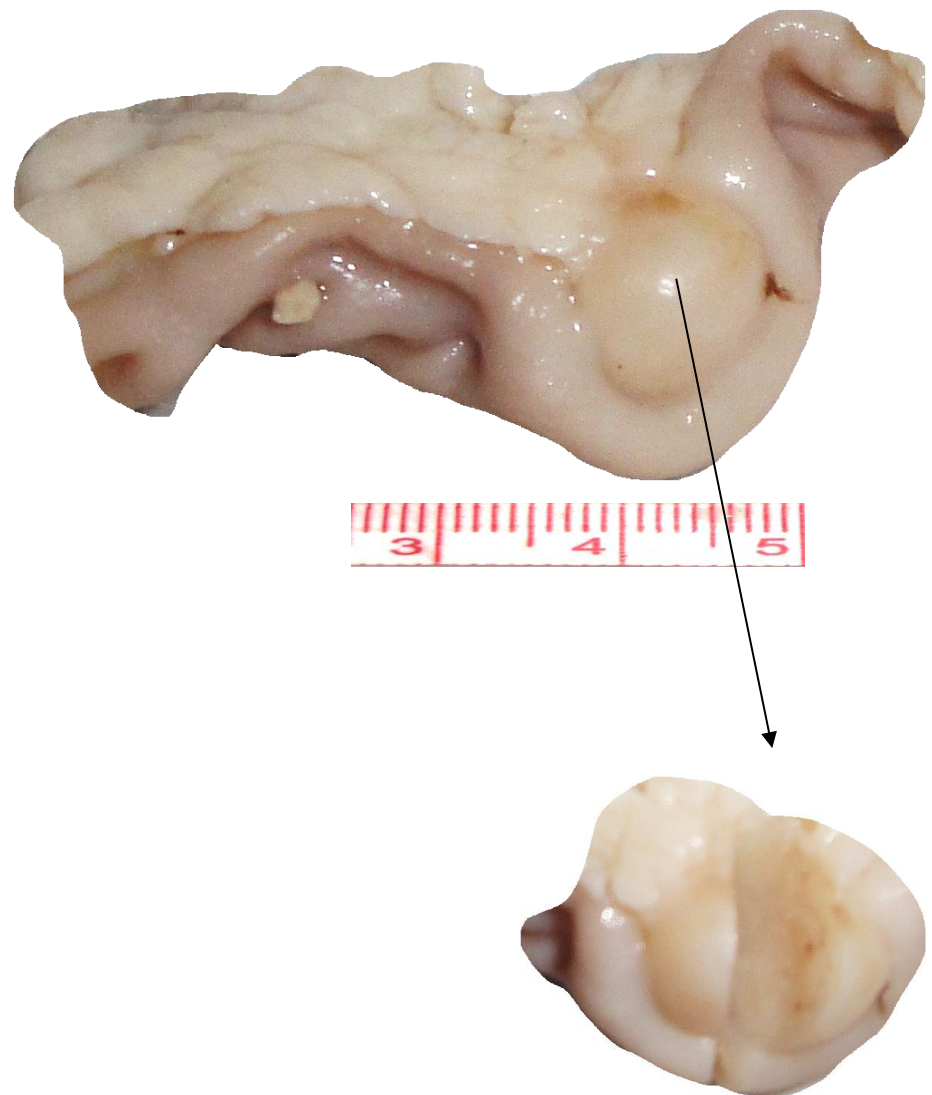
Intussuscepção – Grupo Padrão, Rato 7.

Figura 7- Carcinoma colorretal



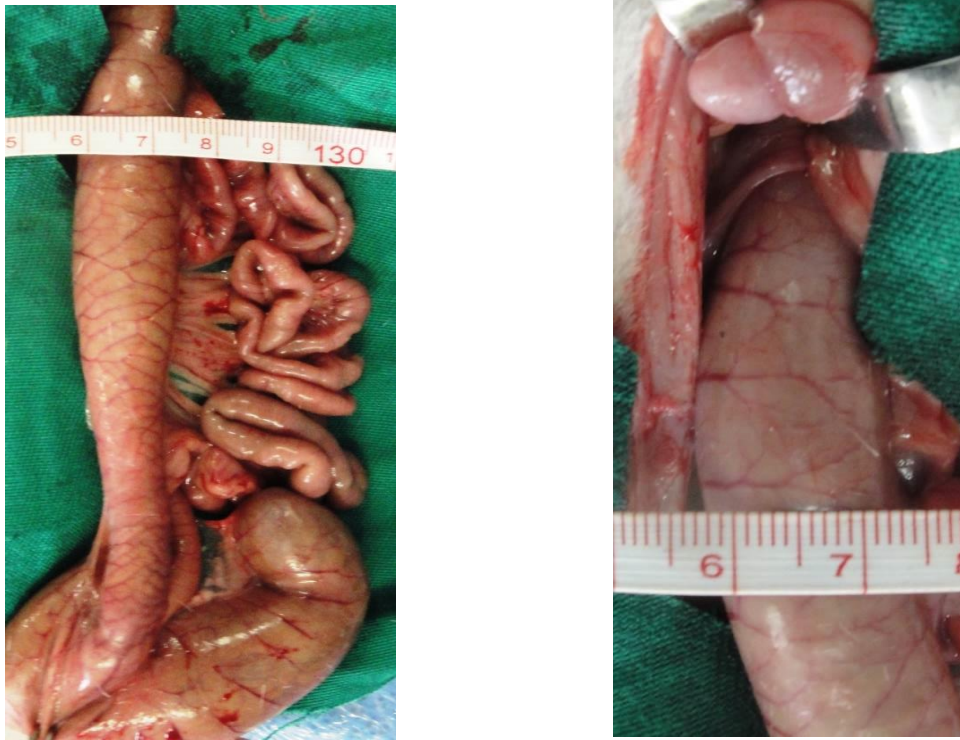
CCR - Lesão vegetante, medindo 1,5 x 1,0 x 0,4 cm , localizada no colo médio. Grupo Padrão, Rato 11

Figura 8 – Tumor de intestino delgado



Lesão tumoral sólida, endurecida, arredondada, esbranquiçada, medindo 0,8cm, localizada em alça de intestino delgado infiltrando a parede. Grupo Hipolipídico, Rato 1.

Figura 9- Dilatação de alça intestinal



Dilatação de alça de colo com intussuscepção distal. Grupo Padrão, Rato 10.

Figura 10 – Lesões hepáticas



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

4.5 Microscopia

4.5.1 Microscopia Estereoscópica

4.5.1.1 Criptas aberrantes forma clássica e displásica

O grupo Salina ($0,2\pm 0,1$) mostrou-se significativamente menor quanto ao número de CA dos grupos Padrão ($44,6\pm 7,4$) e Hiperlipídico ($35,5\pm 6,4$). Houve redução significativa do número de CA na forma clássica no grupo Normolipídico ($8,9\pm 4,3$) em relação ao Padrão, não apresentando diferença significativa com os grupos Hiper ($35,5\pm 6,4$) e Hipolipídico ($10,9\pm 3,5$) ($p < 0.001$) (Tabela 5)

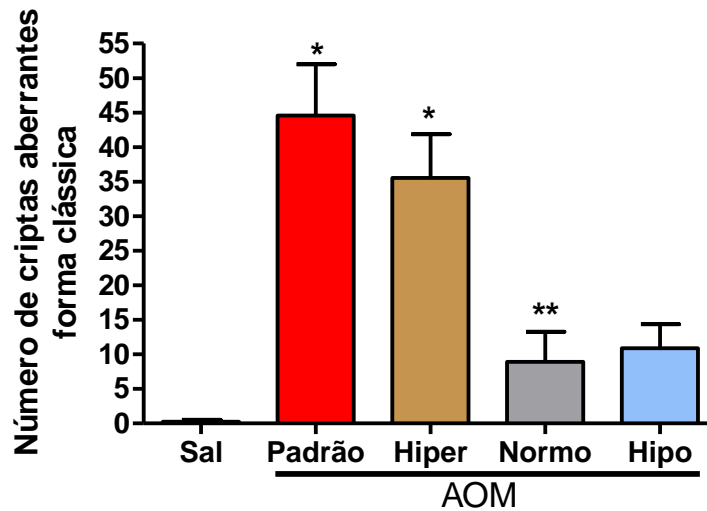
O grupo Padrão ($1,0\pm 0,3$) também apresentou significativo aumento do número CA na forma displásica em relação ao grupo Salina ($0,0\pm 0,0$). Houve redução significativa do número de criptas aberrantes na forma displásica dos grupos com dietas Normo ($0,1\pm 0,1$) e Hipo ($0,0\pm 0,0$) em relação ao Padrão, o qual não apresentou diferença significativa com o grupo Hiperlipídico ($0,2\pm 0,1$) ($p < 0.001$) (Tabela 5).

Tabela 5- Achados da Microscopia Estereoscópica. O grupo Padrão apresentou aumento significativo do número de criptas aberrantes na forma clássica e displásica em relação ao grupo Salina. Houve redução do número de criptas aberrantes na forma clássica no grupo Normolipídico em relação ao Padrão e também redução de criptas aberrantes na forma displásica nos grupos Normo e Hipolipídico.

Grupos	N	Criptas aberrantes	
		Forma clássica	Forma displásica
Salina	12	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0
Padrão	12	$44.6\pm 7.4^\dagger$	$1.0\pm 0.3^\dagger$
Hiperlipídica	11	$35.5\pm 6.4^\dagger$	0.2 ± 0.1
Normolipídica	10	$8.9\pm 4.3^\ddagger$	$0.1\pm 0.1^\ddagger$
Hipolipídica	11	10.9 ± 3.5	$0.0\pm 0.0^\ddagger$
p-Valor*		$<0.001^\dagger$	$<0.001^\dagger$

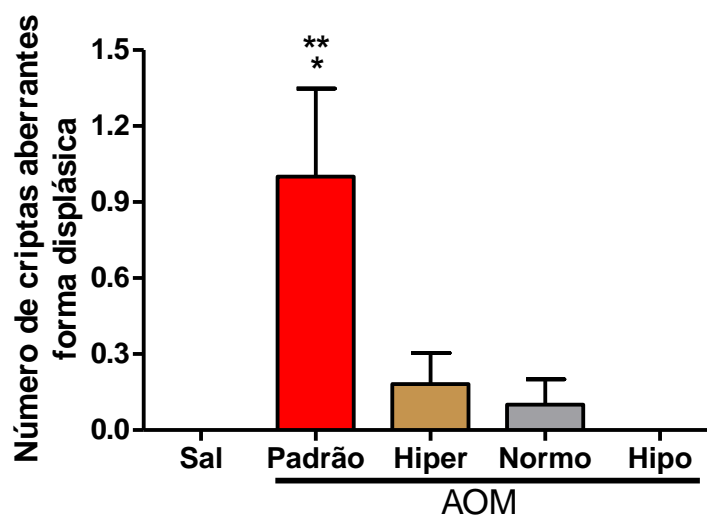
* $p < 0.05$, Kruskal-Wallis/Dunn (Média \pm EPM); $^\dagger p < 0.05$ em relação ao Salina, $^\ddagger p < 0.05$ em relação ao Padrão

Figura 11 – Número de criptas aberrantes (NCA) forma clássica. Os grupos Padrão e o Hiperlipídico apresentaram aumento significativo do NCA na forma clássica em relação ao grupo Salina. Houve redução do número de criptas aberrantes no grupo Normolipídico em relação ao Padrão.



* $p < 0.05$, em relação a Salina; ** $p < 0.05$ em relação ao Padrão (Kruskal-Wallis/Dunn, Média±Erro Padrão da Média)

Figura 12 – Número de criptas aberrantes (NCA) forma displásica. O grupo Padrão apresentou aumento significativo no NCA na forma displásica em relação ao grupo Salina. Houve redução do número de criptas aberrantes nos grupos Normo e Hipolipídico em relação ao Padrão.

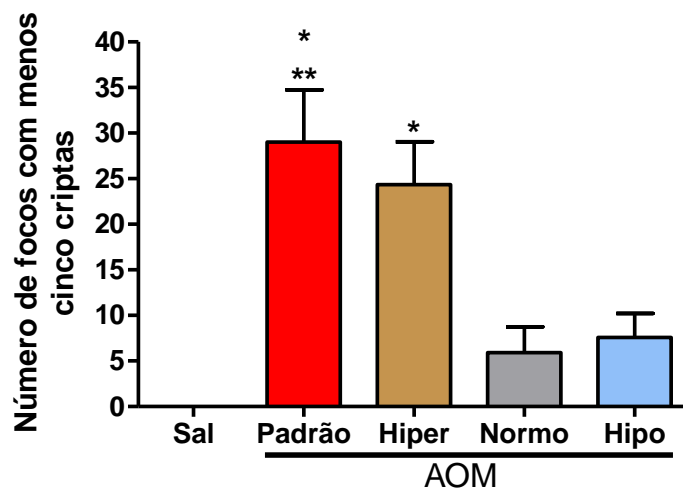


* $p < 0.05$, em relação a Salina; ** $p < 0.05$ em relação a Normo e Hipolipídico (Kruskal-Wallis/Dunn, Média±Erro Padrão da Média).

4.5.1.2 Multiplicidade dos FCA

O número FCA com menos de cinco criptas no grupo Padrão ($29,0 \pm 5,7$) se mostrou significativamente superior aos grupos Salina ($0,0 \pm 0,0$), Normo ($5,9 \pm 2,8$) e Hipolipídico ($7,6 \pm 2,6$). O grupo Hiperlipídico ($24,4 \pm 4,7$) mostrou também aumento significativo de FCA com menos de cinco criptas em relação ao grupo Normolipídico ($5,9 \pm 2,8$). Não houve diferença significativa entre os animais com dieta Normo e Hipolipídica ($p < 0.001$) (Tabela 6).

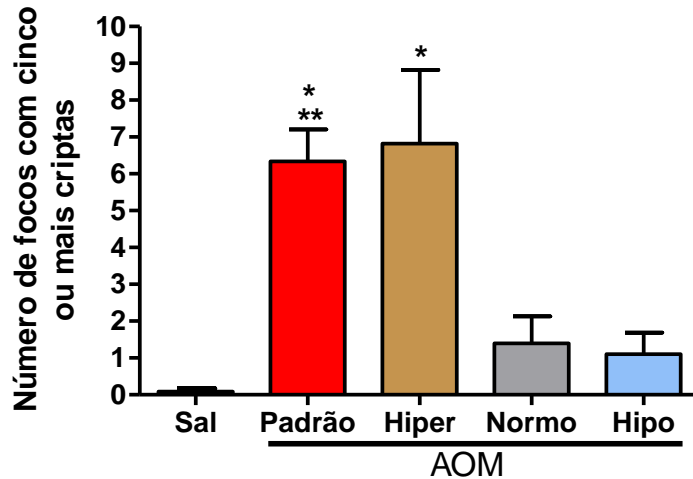
Figura 13 – NFCA com menos de 5 criptas aberrantes. O Padrão se mostrou significativamente superior aos grupos Salina, Normo e Hipolipídico. Hiperlipídico mostrou aumento significativo de FCA com menos de cinco criptas em relação ao Normolipídico.



* $p < 0.05$ em relação a Salina, Normo e Hipolipídico; ** $p < 0.05$ em relação a Normolipídico (Kruskal-Wallis/Dunn, Média ± Erro Padrão da Média).

O número FCA com 5 ou mais criptas aberrantes ($p < 0.001$) no grupo Salina ($0,1 \pm 0,1$) se mostrou significativamente inferior ao Padrão ($6,3 \pm 0,9$) e Hiperlipídico ($6,8 \pm 2,0$). Não houve diferença entre o grupo Salina e os grupos com dieta Normo ($1,4 \pm 0,7$) e Hipolipídica ($1,1 \pm 0,6$), porém o Padrão mostrou número de focos com 5 ou mais criptas aberrantes superior nos animais dos grupos Normo e Hipolipídico ($p < 0.0001$) (Tabela 6).

Figura 14 - Número de focos com 5 ou mais criptas aberrantes. Grupo Salina se mostrou significativamente inferior ao Padrão e Hiperlipídico. Não houve diferença entre Salina e os grupos Normo e Hipolipídico. Padrão mostrou FCA com 5 ou mais criptas aberrantes superior aos grupos Normo e Hipolipídico.

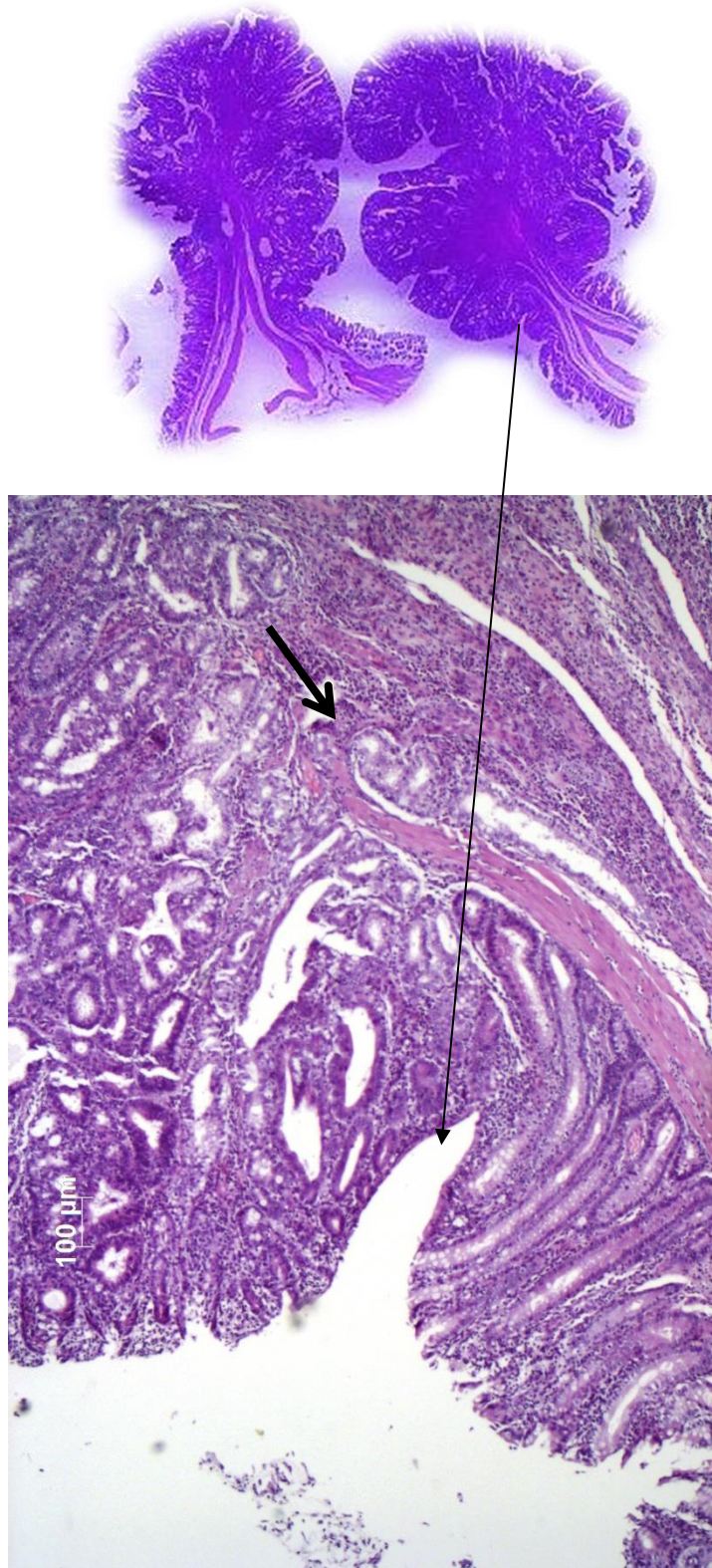


* $p < 0.05$ em relação a Salina; ** $p < 0.05$ em relação a Normo e Hiperlipídico (Kruskall-Wallis/Dunn, Média \pm Erro Padrão da Média).

4.5.2. Microscopia óptica

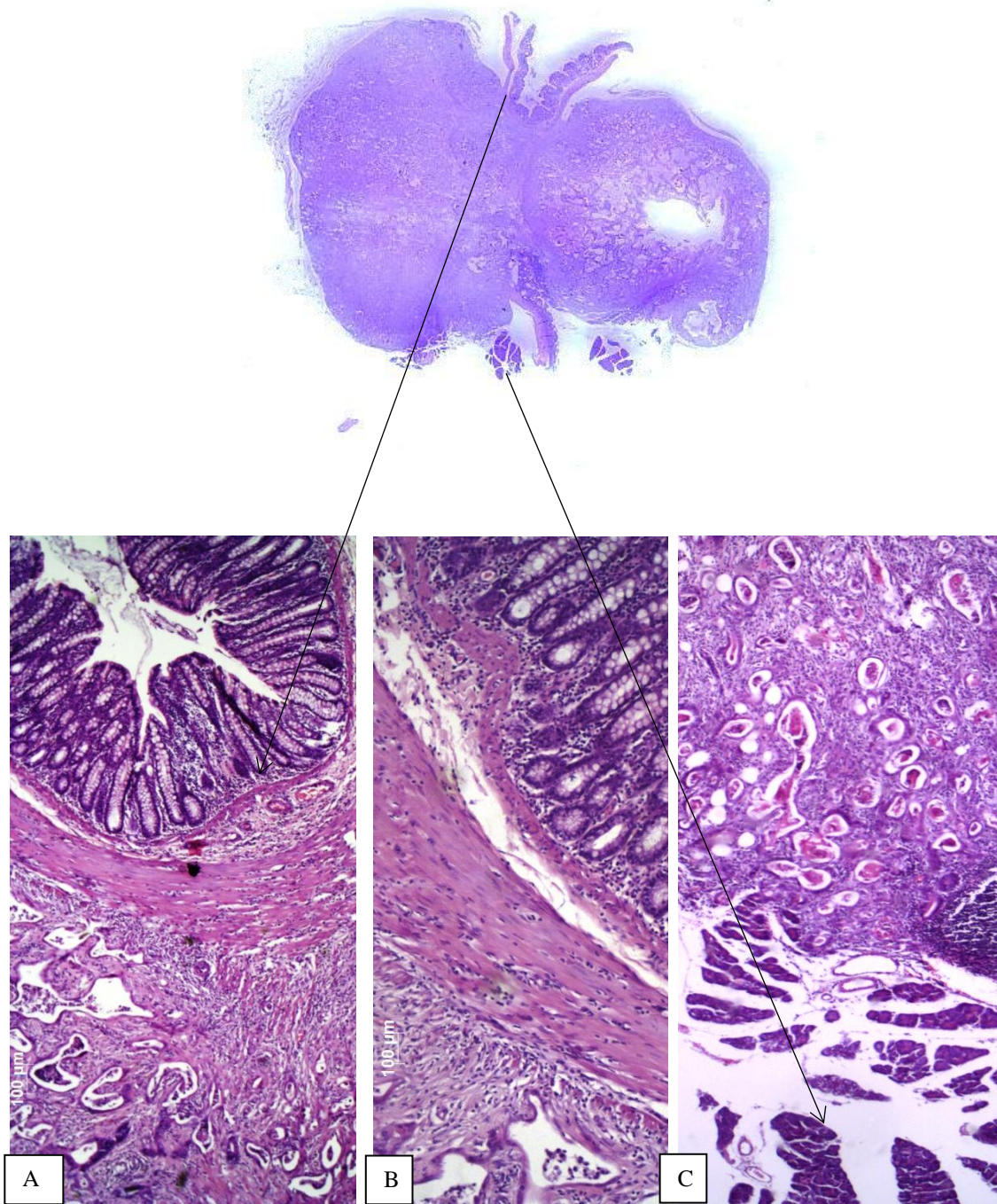
Os achados microscópicos consistiram de adenomas, microadenomas, microcarcinomas e adenocarcinomas de colo e delgado, moderadamente diferenciados e lesões hepáticas dos tipos esteatose (leve, moderada e grave), focos de células alteradas (clara, vacuolada, anfófila, oncocítica, basofílica, tigróide), espongirose, peliose, colangioma, adenoma e hepatocarcinoma (Figuras 15, 16, 17 e 18 e Apêndice M).

Figura 15 – Corte histológico de tumoração de colo distal



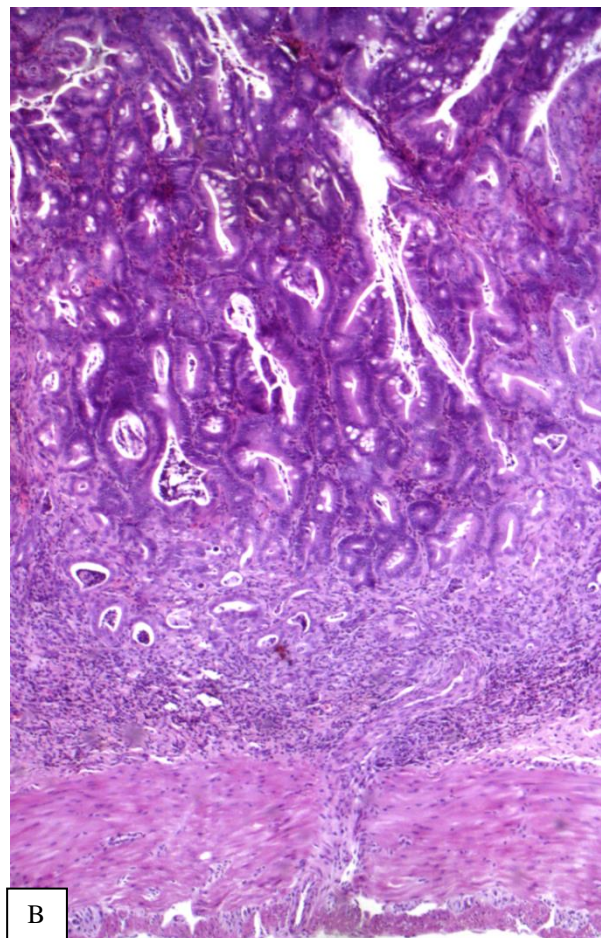
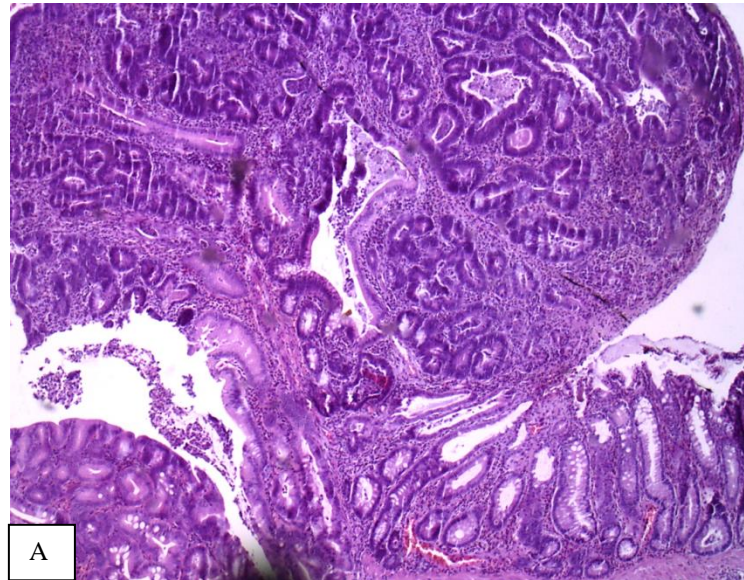
Adenocarcinoma polipoide, moderadamente diferenciado, invadindo a muscular (seta menor). HE – 50x - Grupo Padrão, Rato 10.

Figura 16 - Corte histológico de tumoração entre alças intestinais.



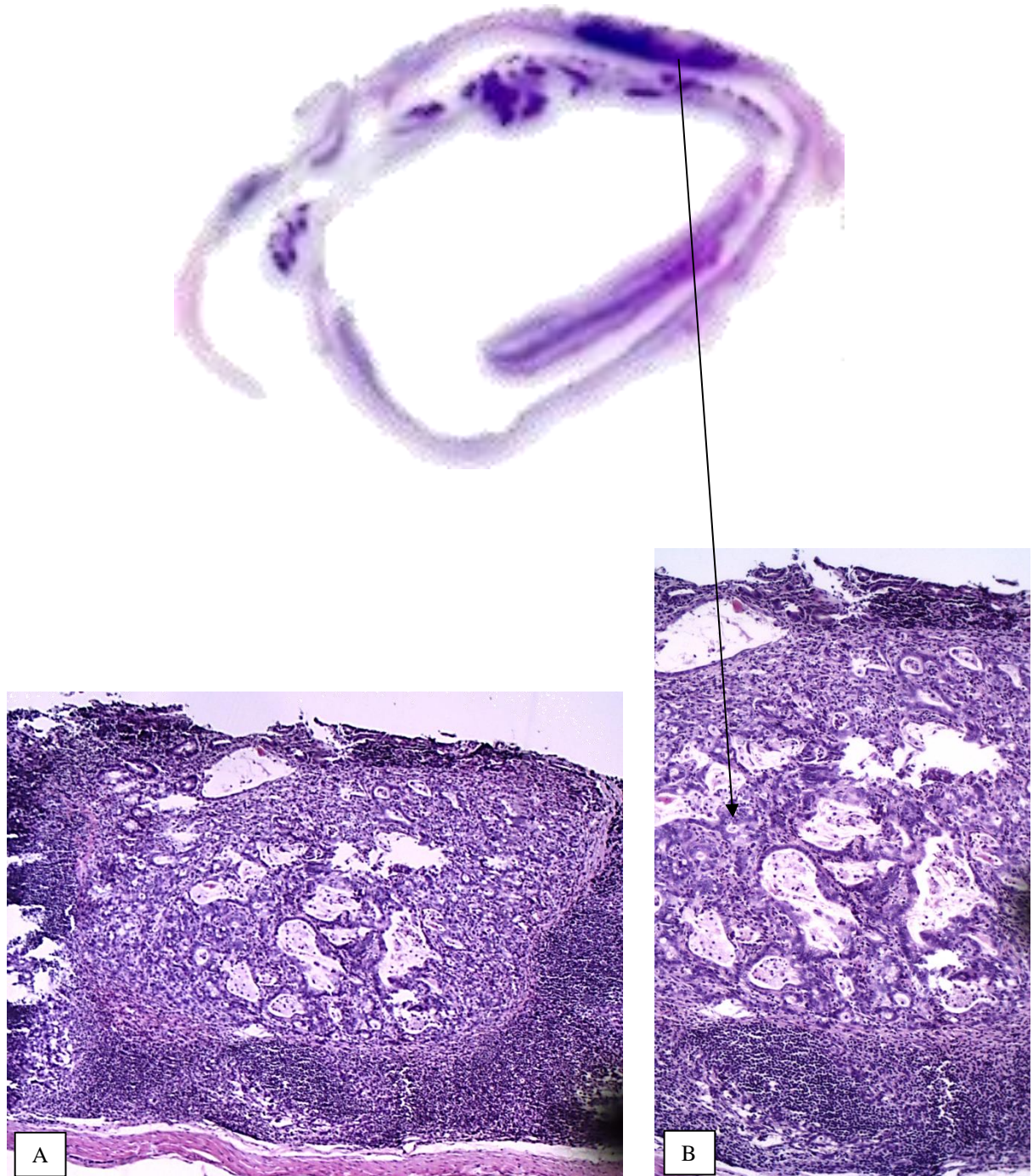
Adenocarcinoma moderadamente diferenciado, invadindo muscular, serosa (A e B), peritônio e pâncreas (C)
HE- 50x – Grupo Hiperlipídico, Rato 8.

Figura 17 - Corte histológico de tumoração vegetante de colo distal.



Adenocarcinoma moderadamente diferenciado, invadindo submucosa e muscular – HE – 50x (A), 100x (B)
Grupo Hipolípídico, Rato 9.

Figura 18 - Corte histológico de “rocambolo” de alça de colo médio



Adenocarcinoma moderadamente diferenciado, invadindo tecido linfoide até a submucosa – HE – 50x (A), 200x (B). Grupo Hipolípídico, Rato 9.

Tabela 6 - Achados Microscópicos. Houve aumento significativo do número de FCA com menor e maior ou igual a 5 criptas nos grupos Padrão e Hiperlipídico em relação ao Salina e redução significativa da média de FCA <5 no grupo com dieta Normo em relação ao Padrão e redução dos FCA ≥ 5 no grupo Hipolipídico em relação ao Padrão. Houve aumento significativo do número de animais com adenomas nos grupos Normo e Hipolipídico em relação ao Salina e de CCR do grupo Hipo em relação ao Padrão. Não houve diferença significativa entre os o número de animais exibindo hiperplasia, GIN e carcinoma em intestino delgado.

Grupos	Hiperplasia		FCA		GIN	Adenoma	Carcinoma	
			< 5	≥ 5			CCR	Delgado
Salina	12	1 (8.3%)	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Padrão	12	1 (8.3%)	29.0 \pm 5.8‡	6.3 \pm 0.9‡	1 (8.3%)	2 (16.7%)	7 (58.3%)‡	1 (8.3%)
Hiperlipídica	11	0 (0.0%)	24.4 \pm 4.7‡	6.8 \pm 2.0‡	1 (9.1%)	1 (9.1%)	4 (36.4%)	0 (0.0%)
Normolipídica	10	1 (10.0%)	5.9 \pm 2.8§	1.4 \pm 0.7§	1 (10.0%)	5 (50.0%)‡	2 (20.0%)	0 (0.0%)
Hipolipídica	11	0 (0.0%)	7.6 \pm 2.6	1.1 \pm 0.6§	0 (0.0%)	5 (45.4%)‡	1 (9.1%)§	1 (9.1%)
p-Valor		0.719*	<0.001†	<0.001†	0.692*	0.016*	0.009*	0.560*

*p<0.05, Qui-Quadrado (Frequência absoluta e percentual); †Kruskall-Wallis/Dunn (média \pm EPM).‡p<0.05 em relação ao salina; §p<0.05 em relação ao Padrão; teste Exato de Fisher.

Não houve diferença significativa na frequência de animais com hiperplasia (p=0.719), neoplasia intra-epitelial gastrointestinal (GIN) (p=0.692) ou carcinoma em intestino delgado (p=0.560) (Tabela 6).

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 (2, 16,7%) e Salina (0, 0,0%, p=0.478), nem diferença entre os grupos Hiperlipídico (1, 9,1%) e Padrão (p=0.478). Houve diferença entre os animais com adenomas nos grupos Normo (5, 50,0%, p=0.001) e Hipolipídico (5, 45,4%, p=0.014), respectivamente, 25,0 (intervalo de confiança = 1,2 – 535,6) e 21,1 (intervalo de confiança = 1,0 – 445,3) vezes superior ao grupo Salina (Tabela 6).

O número de animais com CCR (p=0.009) do grupo Padrão (7, 58,3%) mostrou-se 34,1 (intervalo de confiança = 1,6 – 708,4) vezes superior ao grupo Salina (0, 0,0%, p=0.005). Não houve diferença entre o padrão e os grupos Hiper (4, 46,4, p=0.414) e Normo (2, 20,0%, p=0.099), porém, houve redução significativa de 14,0 vezes (intervalo de confiança = 1,3 – 147,5) de CCR em ratos com dieta Hipolipídica (1, 9,1%, p=0.027) em relação ao grupo Padrão (Tabela 6).

4.6 Carcinogênese Cólica

4.6.1 Incidência

No grupo Padrão cinco ratos (41,7%) apresentaram CCR. No grupo Hiperlipídico quatro ratos (36,4%) e nos grupos Normo e Hipolipídico apresentaram respectivamente 2 (20,0%) e 1 (9,1%). Não houve diferença significativa entre os quatro grupos estudados ($p=0.282$) (Tabela 7).

Tabela 7- Número de animais com CCR. Não houve diferença significativa no número de animais com diagnóstico de CCR nos grupos estudados.

Grupo	N	TU ausente	TU presente	p-Valor
Padrão (12)	12	7 (58.3%)	5 (41.7%)	0.282
Hiperlipídico(11)	11	7 (63.6%)	4 (36.4%)	
Normolipídico(10)	10	8 (80.0%)	2 (20.0%)	
Hipolipídico(11)	11	10 (90.1%)	1 (9.1%)	

* $p<0.05$, Teste Qui-Quadrado (Frequência absoluta e percentual).

4.6.2 Invasão

A presença de invasão por continuidade dos CCR diagnosticados no grupo Padrão foi de 2 ratos (28,7 %), no Hiper 1 rato (25,0%) e Normo e Hipolipídico de 0 (0,0%). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0.787$) (Tabela 8).

Tabela 8- Presença de invasão nos CCR. Não houve diferença significativa no número de tumores que exibiram invasão nos quatro grupos experimentais.

Grupo(CCR)	Invasão ausente	Invasão presente	p-Valor
Padrão (7)	5 (71.4%)†	2 (28.7%)	0.787
Hiperlipídica (4)	3 (75,0%)‡	1 (25.0%)	
Normolipídica (2)	2 (100.0%)	0 (0.0%)	
Hipolipídica (1)	1 (100.0%)	0 (0.0%)	

* $p<0.05$, Qui-Quadrado(Frequência absoluta e percentual)

†Pâncreas/Peritônio. ‡Pâncreas.

4.6.3 Atipias

Com relação ao grau de atipia dos CCR diagnosticados não houve diferença significativa entre alto e moderado e baixo grau observados nos grupos Hiper (4, 100,0%, $p=1.000$) e Normo (2, 100,0%, $p=1.000$) em relação ao Padrão (7, 100,0%). Porém o grupo Hipolipídico (0, 0,0%) apresentou 45,0 vezes menos tumores com alto grau de atipia em relação ao grupo Padrão (intervalo de confiança = 0,6 – 3300,0) ($p=0.003$) (Tabela 9).

Tabela 9: Grau de atipia celular do CCR. O grupo com dieta Hipolipídica apresentou redução significativa do número de tumores com alto grau em relação ao grupo Padrão.

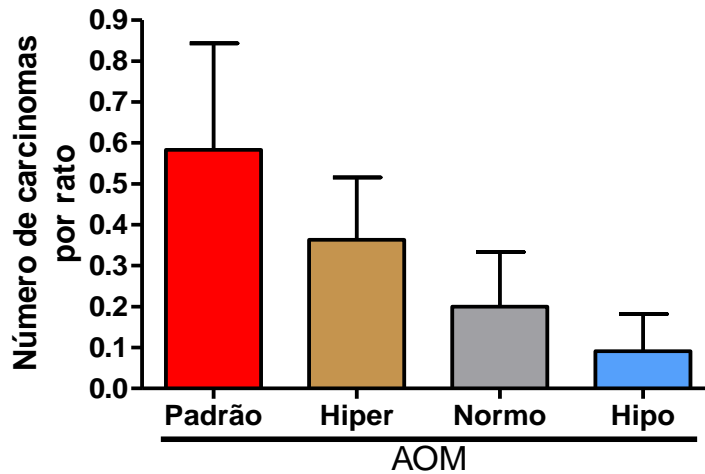
Grupo	Baixo grau	Alto grau	p-Valor
Padrão	0 (0.0%)	7 (100.0%)	0.003
Hiperlipídico	0 (0.0%)	4 (100.0%)	
Normolipídico	0(0.0%)	2 (100.0%)	
Hipolipídico	1(100.0%)	0 (0.0%)*	

* $p<0.05$, Qui-quadrado (Frequência absoluta e percentual)

4.6.4 Multifocalidade

O número de carcinomas por rato dos grupos Padrão ($0,6\pm 0,2$), Hiper ($0,4\pm 0,1$), Normo ($0,2\pm 0,1$) e Hipolipídico ($0,1\pm 0,1$) não mostrou diferença significativa entre si ($p=0.294$) (Figura 19).

Figura 19 – Número de carcinomas por rato. Não houve diferença estatisticamente significativa no número de carcinomas por rato nos quatro grupos experimentais.

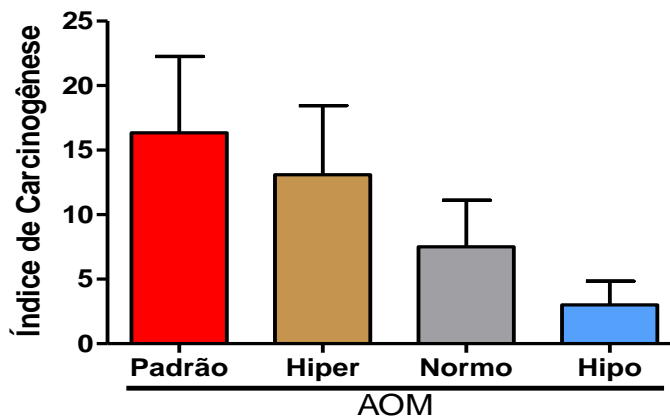


* $p < 0.05$ (Kruskall-Wallis/Dunn, Média \pm EPM)

4.6.5 Índice de Carcinogênese

O índice de carcinogênese do grupo Padrão ($16,3 \pm 5,9$) não foi significativamente diferente dos grupos Hiper ($13,1 \pm 5,3$), Normo ($7,5 \pm 3,6$) e Hipolipídico ($3,0 \pm 1,8$) ($p = 0.546$) (Figura 20).

Figura 20 – Índice de carcinogênese. Não houve diferença estatisticamente significativa no índice de carcinogênese entre os grupos estudados.



* $p < 0.05$ (Kruskall-Wallis/Dunn, Média \pm EPM)

4.6.6 Estadiamento TNM

Com relação ao estadiamento do CCR não houve diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos estudados. Um animal (12,5%) do grupo Padrão apresentou tumor Tis, um (12,5%) T1, quatro ratos apresentaram tumores T2 (50,0%) e dois (25,0%) tumores T4. No grupo da dieta Hiperlipídica, teve um animal com tumor Tis (20,0%), um com T1 (20,0%), outro com T4 (20,0%) e dois ratos (40,0%) com tumores T2. No grupo com dieta Normolipídica, teve um rato (33,3%) com tumor T2 e dois (66,7%) com tumores T1; no grupo com dieta Hipolipídica, ocorreu apenas um rato com tumor T1 (100%) ($p=0.698$) (Tabela 10).

Com relação ao acometimento dos linfonodos no grupo Padrão apenas um animal (14,3%) apresentou um linfonodo acometido. Os demais grupos não apresentaram acometimento linfonodal (0, 0,0%) ($p=0.747$) (Tabela 10).

Por sua vez, dois animais (28,6%) do grupo Padrão apresentaram metástase à distância, assim como um animal (16,7%) do grupo Hiperlipídico. Nenhum animal dos grupos Normo e Hipolipídico (0, 0,0%), apresentou metástases à distância ($p=0.697$) (Tabela 10).

O grupo Padrão apresentou um animal (12,5%) com estágio 0, cinco (62,5%) com estágio 1 e dois (25,0%) com estágio 4. O grupo com dieta Hiperlipídica apresentou um animal (20,0%) com estágio 0, três (60,0%) com estágio 1 e um animal (20,0%) com estágio 4. O grupo com dieta Normolipídica apresentou dois animais (100%) com estágio 1 e o grupo com dieta Hipolipídica apenas um animal (100%) com estágio 1 ($p=0.932$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Estadiamento dos CCR. Não houve diferença estatisticamente significativa no estadiamento tumoral considerando o tamanho do tumor, acometimento linfonodal, metástase e estágio dos CCR em todos os grupos do experimento.

Estadiamento	Padrão	Hiperlipídica	Normolipídica	Hipolipídica	p-Valor
Tamanho					
Tis	1 (12.5%)	1 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.698
T1	1 (12.5%)	1 (20.0%)	2 (66.7%)	1 (100.0%)	
T2	4 (50.0%)	2 (40.0%)	1 (33.3%)	0 (0.0%)	
T3	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
T4	2 (25.0%)	1 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Linfonodo					
N0	6 (85.7%)	4 (100.0%)	3 (100.0%)	1 (100.0%)	0.747
N1	1 (14.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Metástase					
M0	5 (71.4%)	5 (83.3%)	3 (100.0%)	1 (100.0%)	0.697
M1	2 (28.6%)	1 (16.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Estágio					
0	1 (12.5%)	1 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.932
1	5 (62.5%)	3 (60.0%)	2 (100.0%)	1 (100.0%)	
2	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
3	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
4	2 (25.0%)	1 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	

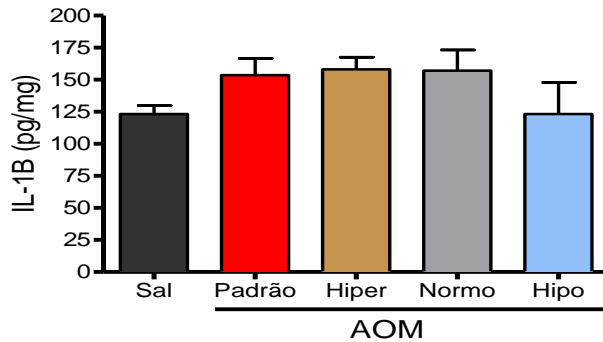
* $p < 0.05$, Qui-Quadrado (Frequência absoluta e percentual).

4.7 Citocinas

4.7.1 *IL-1 β*

A concentração de *IL-1 β* não diferiu significativamente entre os grupos Salina (123,2 \pm 6,5), Padrão (153,6 \pm 13,2), Hiper (158,0 \pm 9,5), Normo (157,2 \pm 16,1) e Hipolipídico (123,3 \pm 24,7) ($p=0.1869$)(Figura 21).

Figura 21 – Níveis de Interleucina 1 β . Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL- β nos grupos estudados.

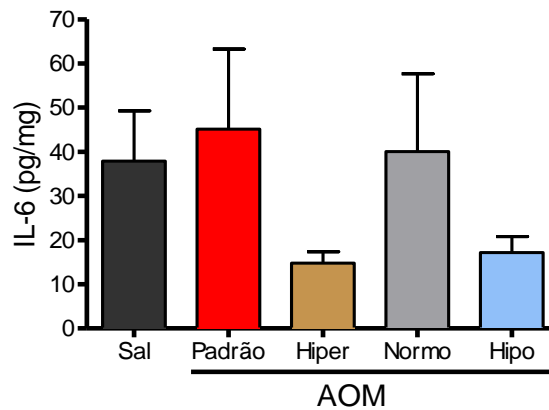


* $p < 0.05$, ANOVA / Bonferroni (Média \pm EPM).

4.7.2 IL-6

A concentração de IL-6 não diferiu significativamente entre os grupos Salina (38,9 \pm 11,4), Padrão (45,1 \pm 18,1), Hiper (14,8 \pm 2,6), Normo (40,0 \pm 17,8) e Hipolipídico (17,2 \pm 3,6) ($p=0.3336$)(Figura 22).

Figura 22 – Níveis de Interleucina 6. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL-6 nos grupos estudados.

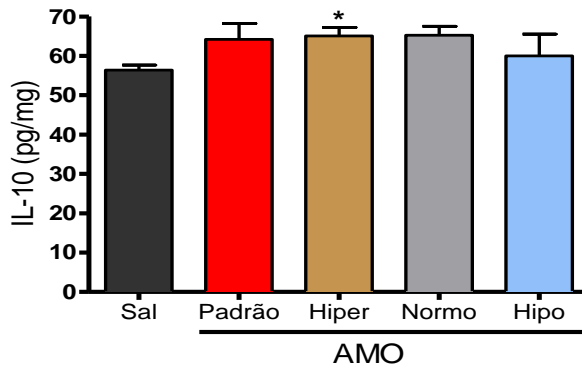


* $p < 0.05$, Kruskal-Wallis / Dunn (Média \pm EPM).

4.7.3 IL-10

Os níveis de IL-10 no grupo Hiperlipídico (65,1 \pm 2,1) mostraram-se significativamente superiores aos níveis de IL-10 no grupo Salina (56,4 \pm 1,3) embora sem diferença significativa com os grupos Padrão (64,2 \pm 4,0), Normo (65,2 \pm 2,3) e Hipolipídico (60,0 \pm 5,5) ($p=0.0077$)(Figura 23).

Figura 23 – Níveis de Interleucina 10. Os níveis de IL-10 do grupo hiperlipídico se mostraram significativamente superiores ao grupo Salina, sem diferença com os demais grupos.

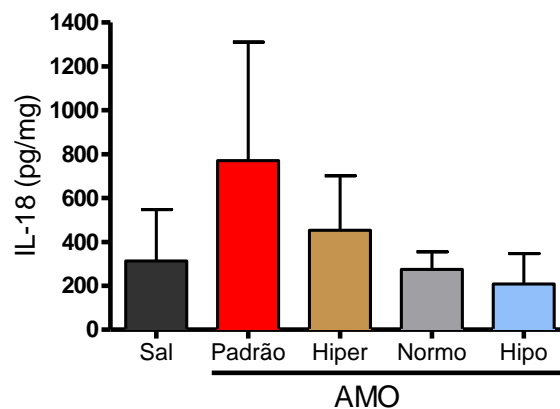


* $p < 0.05$ em relação ao grupo Salina (Kruskall-Wallis/Dunn (Média±EPM))

4.7.4 IL-18

Os níveis de IL-18 não diferiram significativamente entre os grupos Salina (313,2±234,9), Padrão (770,3±540,3), Hiper (453,4±248,3), Normo (274,8±80,3) e Hipolipídico (207,8±138,9) ($p=0.0855$)(Figura 24).

Figura 24 – Níveis de Interleucina 18. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL-18 nos grupos estudados.

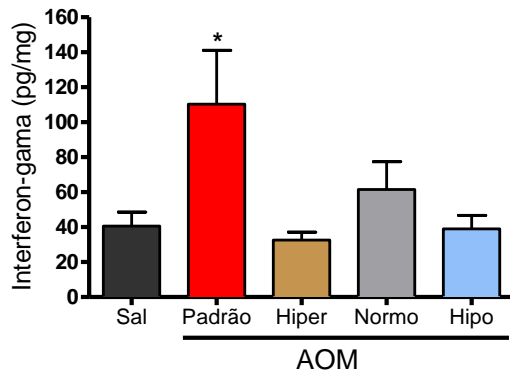


* $p < 0.05$, Kruskal-Wallis / Dunn (Média±EPM).

4.7.5 Interferon- λ

Os níveis de Interferon- λ mostraram-se significativamente elevados no grupo Padrão ($110,3 \pm 30,8$) em relação ao grupo Hiper ($32,6 \pm 4,5$) e Hipolipídico ($39,0 \pm 7,7$), porém não diferiu significativamente com os grupos Salina ($40,6 \pm 8,0$) e Normolipídico ($61,5 \pm 15,9$) ($p=0.0094$)(Figura 25).

Figura 25 – Níveis de Interferon-gama. O grupo Padrão apresentou níveis de IFN- λ significativamente superiores aos grupos Hiper e Hipolipídico.

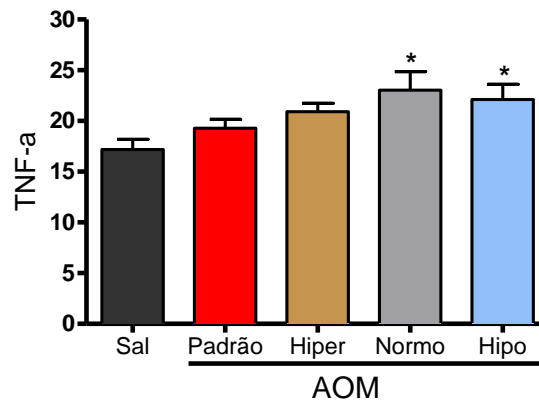


* $p < 0.05$ versus Hiper e Hipolipídico, ANOVA/Bonferroni (Média \pm EPM).

4.7.6 Fator de necrose tumoral- α

A expressão de TNF- α mostrou-se significativamente aumentada nos grupos Normo ($23,0 \pm 1,8$) e Hipolipídico ($18,0 \pm 1,5$) em relação ao grupo Salina ($17,2 \pm 1,0$), embora sem diferença significativa com os grupos Padrão ($19,3 \pm 0,9$) e Hiperlipídico ($20,9 \pm 0,8$) ($p=0.0082$)(Figura 26).

Figura 26 – Níveis de fator de necrose tumoral. Os níveis de TNF- α mostraram-se significativamente maiores nos grupos Normo e Hipolipídico que no grupo Salina.

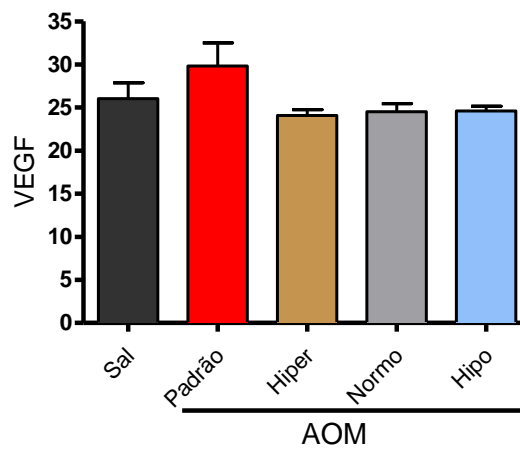


* $p < 0.05$ versus Salina, ANOVA/Bonferroni (Média ± EPM).

4.7.7 Fator de crescimento de células vasculares

Não houve diferença significativa entre a expressão de VEGF entre os grupos Salina (26,0 ± 1,8), Padrão (29,8 ± 2,7), Hiper (24,1 ± 0,7), Normo (24,5 ± 0,9) e Hipolipídico (24,6 ± 0,6) ($p = 0.1102$) (Figura 27).

Figura 27 – Níveis de VEGF. Não houve diferença nos níveis de VEGF nos grupos do estudo.



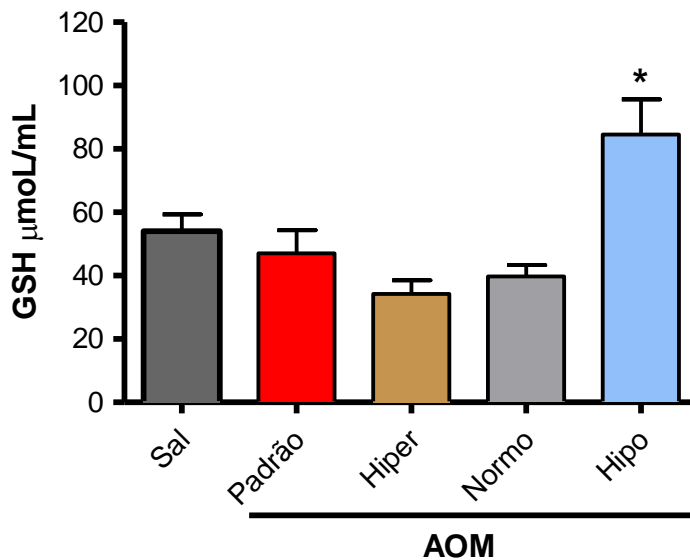
* $p < 0.05$, ANOVA/Bonferroni (Média ± EPM).

4.8 Estresse oxidativo

4.8.1 Glutathiona

A média de glutathiona reduzida no grupo Hipolipídico ($84,5 \pm 11,2$) foi significativamente superior a 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 28).

Figura 28 – Níveis de glutathiona reduzida. Apenas o grupo Hipolipídico apresentou aumento significativo dos níveis de GSH em relação aos demais grupos.

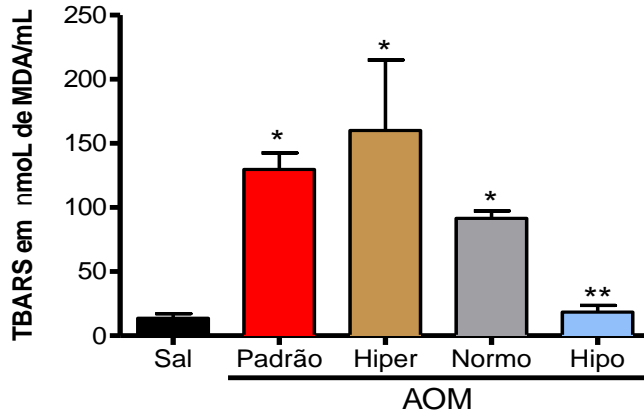


* $p < 0,05$ em relação aos demais grupos (ANOVA/Bonferroni, Média ± EPM)

4.8.2 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 ($18,3 \pm 5,2$) ($p < 0.0001$)(Figura 29).

Figura 29 – Níveis de TBARS. Houve aumento significativo dos níveis de TBARS nos grupos Padrão, Hiper e Normolipídico em relação ao Salina e redução dos níveis de TBARS no grupo Hipolipídico em relação aos grupos Padrão, Hiper e Normolipídico.



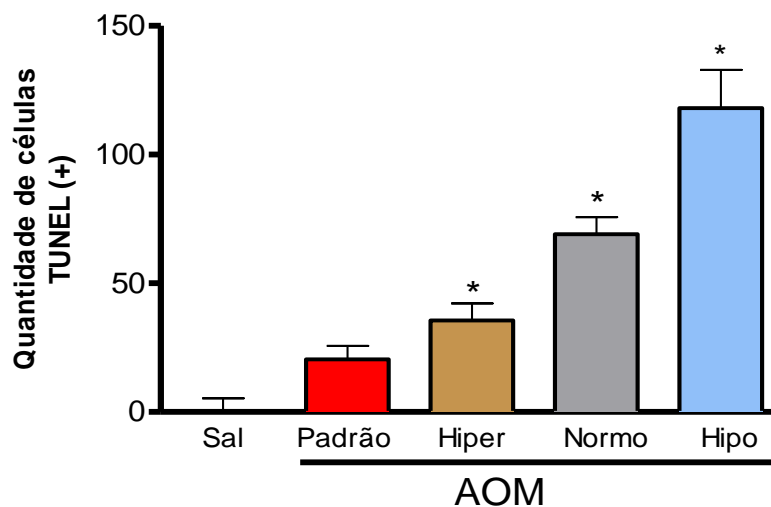
* $p < 0.05$ versus Salina; ** $p < 0.05$ versus Padrão, Hiper e Normolipídico (Kruskall-Wallis/Dunn, Média \pm EPM).

4.9 IMUNOHISTOQUÍMICA

4.9.1 TUNEL

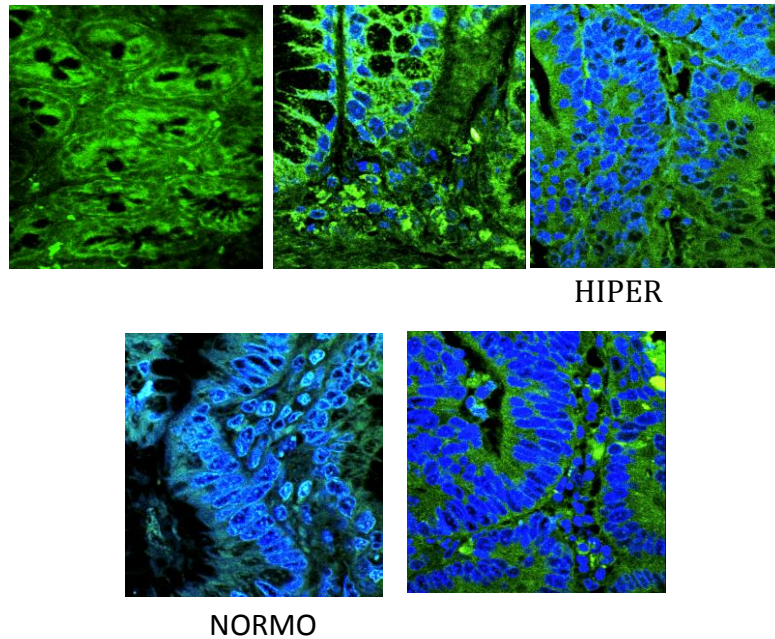
A contagem de células TUNEL(+) no colo normal no grupo Salina e no tecido tumoral nos demais grupos mostrou aumento significativo no grupo Hipo (118,0 \pm 15,0), Normo (69,0 \pm 6,7) e Hiperlipídico (35,6 \pm 2,9) em relação ao Padrão (20,4 \pm 5,3) e ao grupo Salina (0,0 \pm 0,0) ($p < 0.001$)(Figura 30).

Figura 30 – Contagem de células TUNEL(+). Os grupos Hiper, Normo e Hipolipídica apresentaram quantidade de células TUNEL+ significativamente superiores aos grupos Salina e Padrão.



* $p < 0.05$ versus Salina e Padrão, ANOVA/Bonferroni (Média \pm EPM).

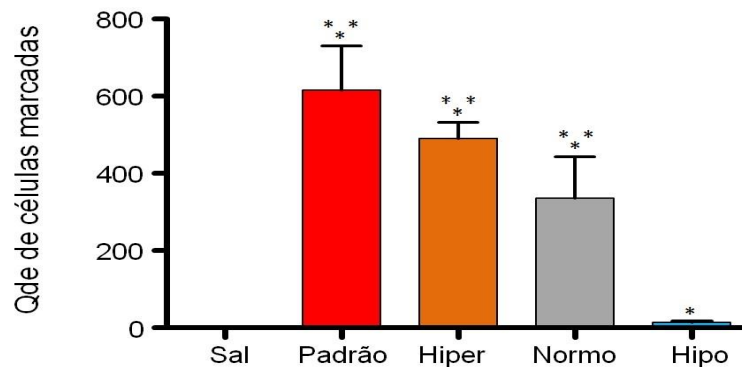
Figura 31 – Marcação de células TUNEL +



4.9.2 KI-67

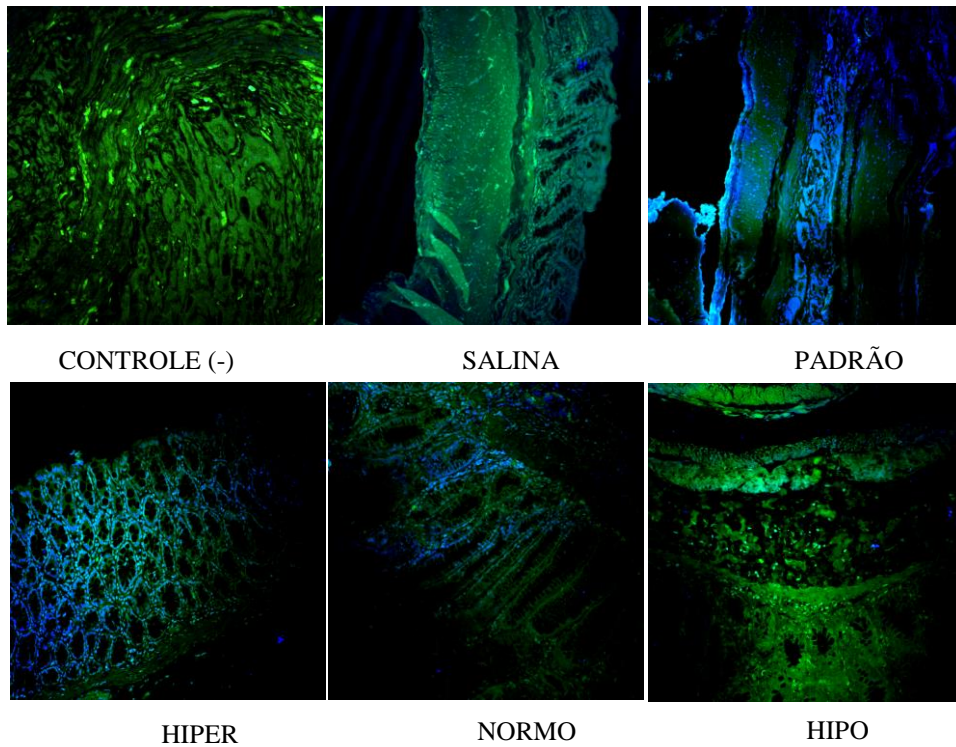
A contagem de células KI-67 no colo normal do grupo Salina mostrou redução significativa em relação ao tecido tumoral nos demais grupos ($p < 0.001$). O grupo Hipolipídico também mostrou diminuição significativa desta marcação quando comparado aos grupos Padrão, Hiper e Normolipídico ($p < 0.05$) (Figura 32).

Figura 32 – Contagem de células KI-67+. Grupo Salina mostrou redução significativa em relação aos demais grupos. Grupo Hipolipídico apresentou quantidade de células KI-67+ significativamente reduzidas em relação aos grupos Padrão, Normo e Hiperlipídico.



* $p < 0.001$ em relação ao Salina; ** $p < 0.05$ em relação ao Hipolipídico; ANOVA/Bonferroni (Média±EPM).

Figura 33 - Marcação de células KI-67 +



4.9.3 *K-RAS*- Apendice I

4.9.4 *NFκB*- Apendice I

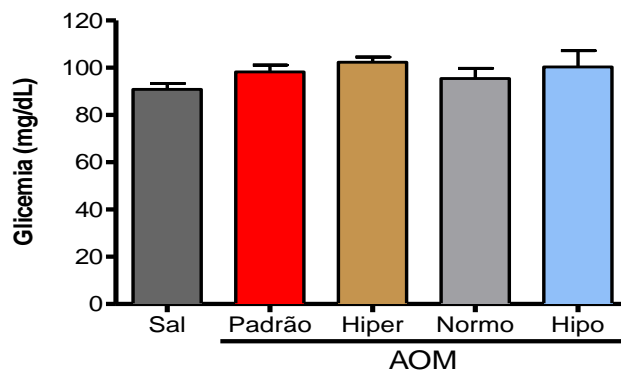
4.9.5 *COX-2*- Apendice I

4.10 Avaliação bioquímica

4.10.1 Glicemia

A média da glicemia foi não significativa na comparação entre os grupos (Figura 34).

Figura 34 – Média de glicemia por grupo. Não houve diferença significativa nos índices glicêmicos nos grupos



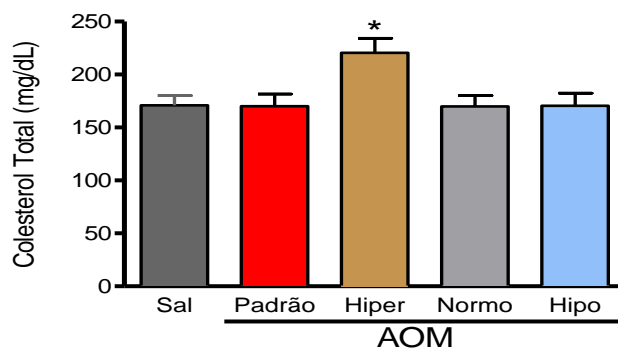
* $p < 0.05$ ANOVA/Bonferroni (Média±EPM).

4.10.2 Perfil lipídico

4.10.2.1 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 35).

Figura 35 – Média de colesterol total por grupo. O grupo Hiperlipídico apresentou média de colesterol total significativamente mais elevada em relação aos demais grupos.

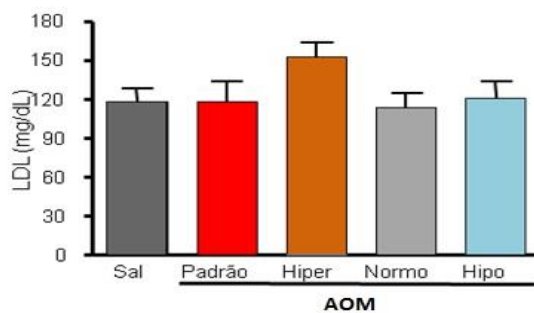


* $p < 0,05$ em relação aos demais grupos, ANOVA/Bonferroni (Média ± EPM).

4.10.2.2 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 36).

Figura 36 – Média de colesterol LDL por grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa na média de colesterol LDL nos grupos experimentais.

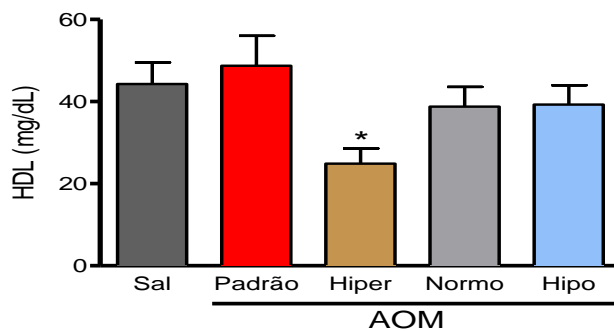


* $p < 0.05$, ANOVA/Bonferroni (Média ± EPM).

4.10.2.3 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 36).

Figura 37 – Média de colesterol HDL por grupo. O grupo hiperlipídico apresentou redução significativa da média de HDL em relação aos demais grupos do estudo.

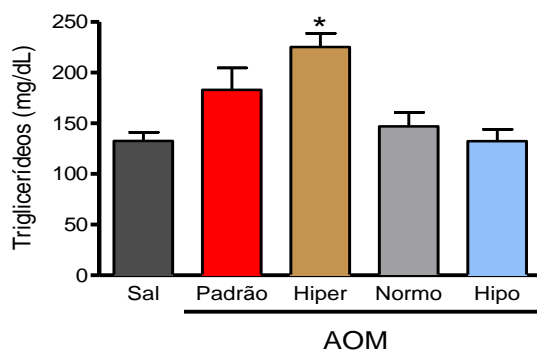


* $p < 0.05$ em relação ao Padrão (ANOVA/Bonferroni, média ± EPM).

4.10.2.4 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 37).

Figura 38 – Média de triglicerídeos por grupo. A média de triglicerídeos do grupo Hiperlipídico apresentou-se significativamente mais elevada em relação aos grupos Salina, Normo e Hipolipídico, porém, não houve diferença significativa com o grupo Padrão.

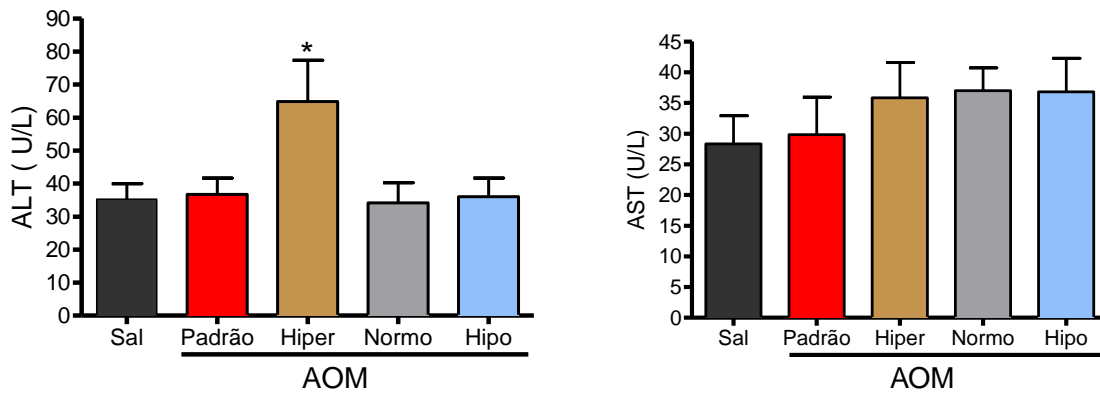


* $p < 0.05$ em relação ao Salina, Normo e Hipolipídico (ANOVA/Bonferroni, média ± EPM).

4.10.3 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 38)..

Figura 39 – Média de ALT e AST por grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de AST nos grupos estudados, porém, os níveis de ALT do grupo Hiperlipídico se mostraram significativamente superiores aos demais grupos.



* $p < 0.05$ em relação aos demais grupos (ANOVA/Bonferroni, média ± EPM).

5 DISCUSSÃO

O CCR é causa importante de mortalidade por câncer no mundo, afetando igualmente homens e mulheres. Sua incidência pode ser reduzida quando os fatores de risco, tais como genética, estilo de vida e fatores ambientais são modificados. Fatores ambientais, especialmente alimentos com alto conteúdo de gordura, foram epidemiologicamente mostrados estar intimamente associados ao CCR humano (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

Estudos antropológicos, epidemiológicos e moleculares indicam que os seres humanos evoluíram de uma dieta com uma proporção de ômega-6/ômega-3 de aproximadamente 1, enquanto que nas dietas atuais esta relação é de 15/1 até 20/1, promovendo a patogênese de muitas doenças, incluindo a doença cardiovascular, câncer, osteoporose e doenças inflamatórias e autoimunes (SIMOPOULOS, 2006).

Considerando a relevância da doença neoplásica e a importância de uma dieta saudável com baixa razão ômega-6/ômega-3 e alta ômega-9/ômega-6, como proposta preventiva no surgimento de lesões precoces na carcinogênese colorretal, houve necessidade da utilização de modelos experimentais para sua comprovação (FEARON; VOGELSTEIN, 1990; CAMPOS, 2007).

O modelo de carcinogênese com AOM, descrito por Bird (1987, 1995), utilizou roedores por sua semelhança genética, morfológica e histopatológica 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; POWELL; SULLIVAN *et al.*, 2013).

Dietas ricas em lipídios saturados e monoinsaturados do tipo ômega-6 favorecem a carcinogênese (NORAT; BINGHAM; FERRARI *et al.*, 2005), porém não há pesquisas que demonstrem que dietas com diferentes concentrações lipídicas (Hiper, Normo e Hipolipídica) e com a mesma baixa relação ômega-6/ômega-3 e alta relação ômega-9/ômega-6 apresentem alguma proteção contra a carcinogênese colorretal, o que motivou a utilização do modelo descrito por Bird para o presente estudo.

Desde o início do experimento até a eutanásia, observou-se que a massa corpórea dos animais dos grupos Salina e Padrão foi significativamente maior quando comparada a massa dos animais dos grupos Hiper, Normo e Hipolipídico. 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 2). Concluiu-se que o AOM não interferiu na ingestão dos animais e conseqüentemente na massa corporal final.

Uma explicação para o achado de baixo peso nos grupos das dietas experimentais é que a quantidade da ingestão foi superior nos grupos alimentados com dieta padrão (Salina e Padrão) que nos grupos das dietas Hiper, Normo e Hipolipídica (Figura 2 e 4). Provavelmente, isto ocorreu porque estas dietas fugiam do paladar comum aos roedores, já que eram de manipulação caseira e, principalmente no grupo Hiperlipídico, a dieta continha grande quantidade de lipídeos favorecendo a saciedade (Apêndice F) (SANDE-LEE, VELLOSO, 2012).

Estudo recente demonstrou que dietas ricas em gorduras saturadas lesionam o hipotálamo e provocam uma inflamação local que pode causar a morte de neurônios e conseqüente perda da capacidade de percepção entre o momento de sinalizar para o organismo a estocagem ou queima de energia. A ingestão de ômega-3 e ômega-9 recupera o controle neural da fome e aumenta o gasto energético, promovendo perda de peso. Demonstrou-se também que os animais que receberam dietas com menores concentrações de ômega-3 e ômega-9 foram os que apresentaram maior redução na inflamação hipotalâmica, possivelmente restaurando os desarranjos metabólicos, alimentares e termogênicos (CINTRA; ROPELLE; MORAES *et al.*, 2012). Esses achados foram semelhantes aos encontrados nos animais do grupo Hipolipídico, que apresentou ingestão superior aos grupos Hiper e Normolipídico (Figura 4), onde em valores absolutos possuíram menores quantidades de ômega-3 e ômega-9 apesar da relação entre os ômegas (baixa ω -6: ω -3 e alta ω -9: ω -6) se manter constante em todos os grupos estudados (Apêndice E e H).

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. A ação da adiponectina é mais acentuada na gordura epididimal no abdômen do que na gordura subcutânea, contribuindo para aumentar a sensibilidade à insulina (KOPECKY; ROSSMEISL; FLACHS *et al.*, 2009).

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

Quando é comparada a ingesta dos 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 os grupos Hiper e Normolipídico também houve diferença significativa ($p < 0,001$), porém nos dois últimos meses do experimento a média da ingesta do grupo Hipolipídico não mostrou diferença significativa com o Padrão ($p > 0.05$) (Figura 4).

Os ratos portadores de CCR não apresentaram diminuição do peso em relação aos animais sem essa afecção dentro do mesmo grupo no final do experimento Padrão ($p = 0,887$); Hiper ($p = 0,098$); Normo ($p = 0,204$); e Hipolipídico ($p = 0,221$) (Figura 3). Esse achado é concordante com a literatura, pois o câncer colorretal, em fase inicial, é assintomático e não compromete o estado geral dos indivíduos afetados (CONTINENTE; PLUVIUS; MARTINEZ, 2002; BURLAMAQUI; DORNELAS; RODRIGUES, 2013).

Dados antropométricos indicaram prevalência de eutrofia (45,71%), sobrepeso (35,71%), obesidade (12,86%) e magreza (5,71%) em portadores de câncer colorretal (FORTES; RECÔVA; MELO *et al.*, 2007). Os achados do presente estudo vão de encontro à literatura, uma vez que desnutrição não é frequente nesta afecção, o que pode ser explicado pelo não comprometimento da ingestão alimentar, ausência de distúrbios absorptivos e de fatores obstrutivos.

Os achados macroscópicos consistiram em tumores nos cólons e intestino delgado, intussuscepções colóclicas, dilatação de alças e lesões hepáticas sólidas e císticas (Tabela 4).

Os tumores cólicos foram mais frequentes nos animais do grupo Padrão (11, 91,7%) em relação ao grupo Salina (1, 8,3%) ($p < 0.001$). Não houve diferença entre o grupo Padrão e os grupos alimentados com dietas Hiper (6, 54,5%, $p = 0,069$), Normo (9, 90,0%, $p = 1,000$) e Hipolipídica (1, 9.1%, $p = 0,069$) (Tabela 4). Estes achados comprovam o valor do modelo de carcinogênese utilizado, onde todos os animais expostos ao AOM apresentaram aumento significativo na frequência de tumores em relação ao grupo Salina.

O número de animais com tumores no intestino delgado nos grupos Salina (0, 0.0%), Padrão (1, 8.3%), Hiper (0, 0.0%), Normo (0, 0.0%) e Hipolipídica (1, 9.1%) não diferiu significativamente entre si ($p=0,560$) (Tabela 4). O achado de tumores isolados no intestino delgado comprova o descrito em outros estudos, que o AOM atua além dos cólons em outros órgãos como intestino delgado, fígado e peritônio (BÉMEUR; DESJARDINS; BUTTERWORTH, 2010; BURLAMAQUI; DORNELAS; RODRIGUES *et al.*, 2013).

A intussuscepção teve variação significativa nos quatro grupos estudados ($p=0,003$). Grupo Padrão (5, 41,7%) apresentou aumento significativo em relação aos grupos Salina (0, 0,0%; $p=0.037$), Hiper (0, 0,0%; $p=0.037$) e Normolipídico (0, 0,0% $p=0.040$), porém não houve diferença significativa entre os grupos Padrão e Hipolipídico (1, 9,1%; $p=0.155$) (Tabela 4). A intussuscepção é uma complicação de tumores intestinais, localizada com mais frequência nas junções dos segmentos móveis (região ileocecal) e ocorre proporcionalmente ao tamanho dos tumores. Quando está presente no intestino grosso, do tipo colocólica, ao contrário do delgado, sugere etiologia maligna (LUCENA; APEL; SILVA, 2005).

Com relação à dilatação de alças, não houve diferença significativa entre os grupos estudados ($p=0.432$) (Tabela 4), mas sabe-se que é decorrente de obstrução causada pelos próprios tumores ou por intussuscepção decorrente dos mesmos. Nesta pesquisa é provável que, no decorrer do tempo, com o crescimento tumoral maior número de alças dilatadas ocorreriam (MAIA; FERREIRA-JUNIOR; VIEGAS *et al.*, 2013).

As lesões hepáticas encontradas consistiram em esteatose leve, moderada e grave, lesões pré-neoplásicas (focos de células anofílicas, oncócicas, claras, vacuoladas, espongiase e peliose), lesões neoplásicas benignas (colangiomas e adenomas) e malignas (carcinomas *in situ* e hepatocarcinomas) (BURLAMAQUI; DORNELAS; RODRIGUES, *et al.*, 2011 e Apêndice M). Encontrou-se variação significativa entre os grupos ($p=0.004$), com aumento na frequência no grupo Padrão (10, 83,3%) em relação aos grupos Salina (1, 8,3%; $p=0.001$) e Hipolipídico (4, 36,4%; $p=0.036$), porém não houve diferença significativa entre os grupos Hiper (7, 63,6%; $p=0.371$) e Normolipídico (5, 50,0%; $p=0.172$) (Tabela 4).

O AOM é metabolicamente ativado no fígado por oxidação, gerando compostos reativos essenciais para a carcinogênese química sendo levado ao colo pela corrente sanguínea ou via biliar como glucoronídeo conjugado. O AOM causa proliferação de hepatócitos, que pode ser pré-neoplásica, quando não apresenta nenhum grau de crescimento autônomo, designada por focos de hepatócitos alterados, espongiases e pelioses e também neoplásica como colangiomas, adenomas e carcinomas (BANNASCH; ZERBAN, 1990;

MELO; SANTOS; KIMURA *et al.*, 2010; PADIDAR; FARQUHARSON; WILLIAMS *et al.*, 2012; BURLAMAQUI; DORNELAS; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Os achados microscópicos que resultaram de análise estereoscópica foram as criptas aberrantes clássicas e displásicas e os focos de criptas aberrantes com $<$ de 5 criptas e \geq 5 criptas por foco.

O grupo Salina apresentou redução significativa no número de criptas aberrantes na forma clássica em relação ao Padrão e Hiperlipídico, embora sem diferença estatística com Normo e Hipolipídico. No grupo Padrão foi significativamente maior que no Normolipídico (Tabela 5 e Figura 11). Na forma displásica o número de criptas aberrantes no grupo Salina persistiu significativamente reduzido em relação ao Padrão e este apresentou aumento significativo em relação aos grupos Normo e Hipolipídico (Tabela 5 e Figura 12). Todos os grupos expostos ao AOM apresentaram maior número de CA clássicas e displásicas.

As criptas aberrantes têm como características serem induzidas por agente carcinogênico específico de modo dose dependente e são vistas na mucosa cólica, de 2 a 4 semanas após a dose de iniciação. A ocorrência espontânea em ratos tem uma frequência baixa (BIRD; GOOD, 2000; BURLAMAQUI; DORNELAS; RODRIGUES *et al.*, 2012).

Os FCA com $<$ de 5 e \geq 5 criptas por foco foram ambos significativamente menores no grupo Salina quando comparados aos grupos Padrão e Hiperlipídico. Esses grupos também tiveram maior quantidade desses focos que os grupos Normo e Hipolipídico (Tabela 6 e Figuras 13 e 14). Desta forma, demonstrou-se que as dietas manipuladas somente diminuíram o aparecimento de FCA com $<$ 5 ou \geq 5 criptas por foco nos grupos onde a quantidade de lipídeos foi menor, embora a razão ideal entre os ômega permanecesse a mesma. O maior número de criptas por foco é um parâmetro que indica risco para desenvolvimento tumoral (PRETLOW, T.P.; O'RIORDAN, M.A.; SOMICH, G.A. *et al.*, 1992; RAO; STEELE; SWAMY. *et al.*, 2009; VENNING; CLAESSON; KISSOW, 2013).

Os achados à microscopia óptica foram hiperplasias, neoplasias intra-epitelial gastrointestinal (GIN), adenomas e adenocarcinomas de colo e de intestino delgado. Não houve diferença significativa na frequência de animais com hiperplasia ($p=0.719$), GIN ($p=0.692$) ou carcinoma em intestino delgado ($p=0.560$) (Tabela 6).

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 (2, 16,7%) e Salina (0, 0,0%, $p=0.478$), nem diferença entre os grupos Hiperlipídico (1, 9,1%) e Padrão ($p=0.478$). Porém, houve diferença entre os animais com

adenomas nos grupos Normo (5, 50,0%, $p=0.001$) e Hipolipídico (5, 45,4%, $p=0.014$), respectivamente, superior ao grupo Salina (Tabela 6).

O número de CCR ($p=0.009$) presente no grupo Padrão (7, 58,3%) mostrou-se superior ao grupo Salina (0, 0,0%, $p=0.005$). Não houve diferença entre o Padrão e os grupos Hiper (4, 46,4, $p=0.414$) e Normo (2, 20,0%, $p=0.099$), porém, houve redução significativa nos ratos com dieta Hipolipídica (1, 9,1%, $p=0.027$) em relação ao grupo Padrão (Tabela 6).

Ocorreu CCR em cinco ratos (41,7%) no grupo Padrão, em quatro no grupo Hiperlipídico (36,4%), em dois no grupo Normo (20,0%) e um no Hipolipídico (9,1%). Não houve diferença significativa entre os quatro grupos estudados ($p=0.282$) (Tabela 7).

Houve invasão por continuidade dos CCR em dois ratos no grupo Padrão (28,7%), em um no Hiper (25,0%) e nenhum nos grupos Normo e Hipolipídico. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0.787$) (Tabela 8).

Com relação ao grau de atipia do CCR diagnosticado não houve diferença significativa entre alto e moderado e baixo grau observados no grupo Padrão (7, 100,0%) em relação aos grupos Hiper (4, 100,0%, $p=1.000$) e Normo (2, 100,0%, $p=1.000$). Porém, o grupo com dieta Hipolipídica (0, 0,0%) apresentou redução dos tumores de alto grau em relação ao grupo Padrão ($p=0.003$) (Tabela 9).

O número de carcinomas por rato (Multiplicidade) nos grupos Padrão ($0,6\pm 0,2$), Hiper ($0,4\pm 0,1$), Normo ($0,2\pm 0,1$) e Hipolipídico ($0,1\pm 0,1$) não mostrou diferença significativa entre si ($p=0.294$) (Figura 19).

O índice de carcinogênese no grupo Padrão ($16,3\pm 5,9$) não foi significativamente diferente dos grupos Hiper ($13,1\pm 5,3$), Normo ($7,5\pm 3,6$) e Hipolipídico ($3,0\pm 1,8$) ($p=0.546$) (Figura 20).

De todos os parâmetros analisados nos animais portadores de CCR nenhum se mostrou significativo, porém no grupo Padrão verificou-se uma maior incidência de câncer, de multiplicidade e disseminação tumoral com atipias de alto grau, enquanto que o grupo Hipolipídico foi o que apresentou mais proteção contra carcinogênese. Possivelmente, este fato ocorreu devido à alta relação $\omega-6:\omega-3$ e uma baixa relação $\omega-9:\omega-6$ presente no grupo Padrão, a qual poderia interferir no processo de carcinogênese, principalmente nos estágios mais iniciais (CALDER, 2006; CALDER, 2007).

O grupo alimentado com dieta Hipolipídica apresentou todos os índices avaliados reduzidos e assim conseguiu uma visível tendência à proteção contra a carcinogênese colorretal, possivelmente porque além da menor quantidade absoluta de ácidos graxos $\omega-3$, $\omega-$

6 e ω -9, apresentava também baixa razão ω -6/ ω -3 e alta ω -9/ ω -6, características consideradas antineoplásicas (Apêndices E e H).

Estudos relacionam o ω -6 como fator de risco e o ω -3 como fator de proteção para o CCR (ROYNETTE; CALDER; DUPERTUIS *et al.*, 2004; MARTINS; GRUEZO, 2009). 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 eicosanoides pró-inflamatórios (HARDMAN, 2004). Os ácidos graxos ω -3 diminuem a capacidade das células mononucleares de produzir TNF- α , sendo a chave dos efeitos antiinflamatórios, prevenindo assim o desenvolvimento tumoral (CARMO; CORREIA, 2009).

A carcinogênese colorretal é um processo complexo e multifatorial incluindo até mesmo um microambiente inflamatório envolvendo principalmente mediadores biológicos como as citocinas (MEYDANI, 1996).

No presente estudo, as dietas com alta razão ω -9: ω -6 e baixa ω -6: ω -3 diminuíram a produção de IL-1 β (p=0.1869), IL-6 (p=0.3336), IL-18 (p=0.0855), VEGF (p=0.1102) e INF γ (p=0.0094) somente no grupo Hipolipídico, porém sem valor significativo em relação ao grupo Padrão, com exceção e do INF γ . Houve aumento da IL-10 (p=0.0077) no grupo Hiperlipídico em relação ao grupo Salina, mas sem diferença significativa com os demais grupos. A expressão de TNF- α mostrou-se significativamente aumentada nos grupos Normo e Hipolipídico em relação ao grupo Salina (p=0.0082), embora sem diferença significativa com os grupos Padrão e Hiperlipídico (Figuras 21 a 27).

As dietas manipuladas apresentavam a mesma relação ω -6/ ω -3= 1,4:1, ω -9/ ω -6= 3,2:1 e Poli:Saturada=3,3:1, mesmo percentual de gordura poliinsaturada (26,50%), monoinsaturada (50,20%) e saturada (23,30%). A diferença estava no total de gorduras (g) saturadas e insaturadas, presente em cada grupo: Hiperlipídico (Sat=2,2; Insat=7,3)=9,5g; Normolipídico (Sat=1,4; Insat=4,8)=6,2g e Hipolipídico (Sat=0,6; Insat=1,9)=2,5g (Apêndices E, F, G e H). A menor quantidade no total de gorduras apresentada na dieta Hipolipídica, possivelmente foi responsável por uma menor inflamação e conseqüentemente redução nas citocinas presentes deste grupo.

A dieta utilizada pelo grupo Padrão 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 e Anexo B). Apesar de esta dieta ter apresentado baixo percentual de lipídeos (12%), semelhante ao grupo Hipolipídico, a sua alta relação de ω -6/ ω -3 e a baixa ω -9/ ω -6 pode ter favorecido aos maiores índices de carcinogênese apresentados por este grupo.

A produção das citocinas sofre a influência da ingestão aumentada de ácidos graxos insaturados. Estudos recentes indicaram que fatores de transcrição nuclear induzidos por genes de citocinas são regulados por esses mediadores lipídicos e por produtos de sua peroxidação. O sinal de transdução e a subsequente expressão gênica podem ser modificados pelos níveis aumentados de EPA e DHA. O excesso de ácidos graxos saturados na alimentação também está associado ao aumento de vários marcadores inflamatórios pela ativação do fator de transcrição NF κ B e consequente aumento da expressão dos marcadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β e IL-6 e pela diminuição da expressão do PPAR γ , outro fator de transcrição, e da adiponectina (GERALDO; ALFENAS, 2008; BRESSAN, 2009).

Em pacientes com alterações das respostas metabólicas, o equilíbrio entre os lipídios da dieta tem como propósito controlar o estresse oxidativo e a resposta inflamatória exacerbada, por meio da relação entre os tipos de ácidos graxos insaturados ingeridos, que afetam a síntese de eicosanóides, atuando como mensageiros intermediários de fatores de crescimento, controlando a proliferação e a diferenciação celular (CALDER, 2003).

O estresse oxidativo, fenômeno também envolvido na carcinogênese e influenciado por dieta com equilíbrio entre os lipídios, foi mensurado pela dosagem da glutathiona reduzida e do ácido tiobarbitúrico (TBARS). A glutathiona foi maior nos animais do grupo Hipolipídico, sendo este significativo quando comparado com todos os outros grupos (Figura 28). Embora a relação entre os ômega 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 no grupo Padrão.

O ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi significativamente mais alto nos grupos de maior incidência de carcinogênese (Padrão, Hiper e Normolipídico) em relação ao grupo Salina e Hipolipídico. No entanto, entre Salina e Hipolipídico não houve diferença significativa (Figura 29). Concluindo-se que a dieta pobre em gordura do grupo Hipolipídico com alta razão ω -9: ω -6 e baixa ω -6: ω -3 foi eficaz na prevenção de carcinogênese cólica por diminuir a peroxidação lipídica.

O mecanismo no qual os ácidos graxos poliinsaturados induzem efeitos genotóxicos, envolve vários intermediários reativos. Os radicais hidroxila (OHs) e outras espécies reativas de oxigênio (HO $_2$, NO $_2$, RO, RO $_2$) são gerados durante o processo de peroxidação lipídica ou aumentam diretamente a partir da decomposição do ácido linoléico. Esses radicais livres formados podem ser mediadores do processo de dano de biomembranas, enzimas ou outras proteínas e ácidos nucleicos. Essa oxidação desencadeia uma cascata

autocatalítica que gera várias substâncias genotóxicas com grandes implicações para a integridade do DNA (MEYDANI, 1996; SIMOPOULOS, 2010).

Os ácidos graxos poliinsaturados aumentam a geração do radical superóxido (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células tumorais provocando a sua morte por apoptose ou necrose, dependendo da potência oxidante. Os radicais livres e os peróxidos lipídicos suprimem a expressão do Bcl-2, ativam as caspases e encurtam os telômeros e assim induzem apoptose das células neoplásicas (FELIPPE, 2005).

Os ácidos graxos ω -3 apresentam efeito modulador sobre as citocinas pró-inflamatórias, as proteínas hepáticas de fase aguda, eicosanóides e sistema enzimático endógeno, como superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase. Uma dieta rica em gordura insaturada apresenta diminuição da atividade da catalase e aumento da glutathione, enquanto uma dieta rica em gordura saturada ocorre o inverso (HEYLAND; DHALIWAL; DAY *et al.*, 2006).

Os ácidos graxos poliinsaturados, por serem essenciais, são indispensáveis na alimentação, mas o consumo excessivo ou mais importante ainda, uma alta relação entre ω -6: ω -3 e uma baixa relação ω -9: ω -6 vem sendo investigada como participante do processo de carcinogênese, principalmente nos estágios mais iniciais. Os lipídios, especificamente os ácidos graxos ω -6, podem ser coadjuvantes no processo de carcinogênese a partir da produção de eicosanóides, derivados das vias da lipoxigenase (LOX) e ciclooxigenase (COX); da formação de radicais livres e outros compostos reativos liberados de uma intensa peroxidação lipídica que podem causar dano ao DNA (PINOTTI; SILVA; SUGIZAKI *et al.*, 2007).

Os ácidos ω -3 suprimem a biossíntese dos eicosanóides derivados do ácido araquidônico, modulando a inflamação com impacto na proliferação celular e apoptose. Os produtos das COX e LOX derivados do AA estimulam a mitose, proliferação celular e angiogênese, enquanto que os produtos dessas duas enzimas sobre o EPA e DHA não somente impedem a estimulação da angiogênese, como provocam a sua diminuição, aumentam a apoptose e reduzem o crescimento tumoral (LOUREIRO; MASCIO; MARISA *et al.*, 2002; WEN; DEUTSCH; OPOLON *et al.*, 2003).

O estudo da carcinogênese envolve também proliferação celular e apoptose, mensuradas na presente pesquisa pela utilização da expressão imunohistoquímica do TUNEL e Ki-67. TUNEL é um método para detectar a fragmentação do DNA, que resulta da cascata apoptótica, e é expresso pela marcação da extremidade terminal de ácidos nucleicos. Os ratos alimentados com a dieta Hipolipídica, com menor concentração de gordura, possivelmente apresentaram menor hiperinsulinemia, inflamação, concentração circulante de IGFs,

proliferação celular e conseqüentemente maior apoptose. Por outro lado, os ratos alimentados com dieta Padrão e induzidos com AOM, com alta relação ω -6: ω -3 e baixa ω -9: ω -6, apresentaram maior inflamação e proliferação celular e menor apoptose.

As dietas normolipídica e hipolipídica aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a apoptose de células tumorais do colo dependendo mais da quantidade de gordura existente em cada uma das dietas do que da alta relação ω -9: ω -6 e baixa ω -6: ω -3. Os tecidos tumorais do colo de ratos alimentados com dieta hipolipídica mostraram os mais altos índices de apoptose celular quando comparados aos ratos alimentados com dieta padrão, no entanto, a dieta hiperlipídica não aumentou significativamente a apoptose em relação ao grupo Padrão. Um aumento significativo de células apoptóticas também foi observado em ratos alimentados com dieta hipolipídica em relação com a hiperlipídica e a normolipídica (Figura 30 e 31). O DHA inativa a família Bcl-2 de genes antiapoptóticos e aumenta a transcrição de genes e fatores de transcrição que induzem a apoptose. O DHA ativa fosfatases protéicas envolvidas na inativação do Bcl-2 e na ativação da caspase-3, fatores que de forma independente promovem o aumento de apoptose (SIDDQUI; SHAIKH; SECH *et al.*, 2004).

A contagem de células KI-67 no colo normal do grupo Salina mostrou redução significativa em relação ao tecido tumoral nos demais grupos ($p < 0,001$). O grupo Hipolipídico também mostrou diminuição significativa desta marcação quando comparado aos grupos Padrão, Hiper e Normolipídico ($p < 0,05$) (Figuras 32 e 33, Apêndice I). A dieta rica em EPA e DHA diminui a mitose celular por reverter a atividade da proteína C kinase (PKC) na carcinogênese do colo, diminui a atividade dos oncogenes Ras e da proteína ativadora 1 (AP-1), que frequentemente estão ativos nos tumores malignos humanos e estimulam a mitose, suprimir a ativação do fator de transcrição nuclear NFkB de um modo dose dependente e diminuir também a proliferação celular e angiogênese e aumentar a apoptose (FELIPPE JR, 2011).

No que diz respeito ao perfil lipídico, o grupo Hiperlipídico apresentou os maiores índices de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides e o menor de colesterol HDL em relação aos grupos Salina, Padrão, Normo e Hipolipídico. A média da glicemia e AST não diferiram entre os grupos do estudo, mas ALT foi significativamente maior no grupo Hiperlipídico em relação aos demais grupos (Figuras 34, 35, 36, 37, 38 e 39).

Estes resultados não foram os encontrados em outros trabalhos, onde uma dieta rica em ácidos graxos ômega 3 reduz os níveis séricos de colesterol total, triglicérides e aumenta o colesterol HDL (AGUILERA; DÍAZ; BARCELATA *et al.*, 2004; ROBERT, 2005). Buckland *et al.* (2012) mostraram que dietas com alta concentração de ω -9 controlava a

glicemia, reduzia a inflamação sistêmica, diminuía 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 e Anexo B).

Nas condições e modelo do estudo realizado, a administração de dietas hiperlipídicas, normolipídicas e hipolipídicas, com baixa razão ω -6/ ω -3 e alta razão ω -9/ ω -6 reduziu a formação de CA clássicas e displásicas, FCA com $<$ e ≥ 5 criptas por foco, multiplicidade de focos, índice mitótico, atipia e peroxidação lipídica estresse oxidativo e aumentou apoptose de células tumorais do colo e capacidade antioxidante, favorecendo, pois, efeito protetor, ou seja, uma atenuação da carcinogênese cólica. Contudo, essas ações benéficas parecem ter sofrido mais influência da quantidade de gordura existente em cada uma das dietas do que das razões ideais entre os ácidos graxos ômega 3, 6 e 9.

Mais estudos serão necessários, inclusive com a utilização de dietas similares em outros modelos com maior número de animais, no sentido de identificar a real ação dessas dietas na carcinogênese colorretal, podendo vir a contribuir no futuro para medidas preventivas do CCR.

6 CONCLUSÃO

1. As dietas hiperlipídicas, normolipídicas e hipolipídicas com baixa relação ω -6/ ω -3 e alta ω -9/ ω -6 reduzem a ingesta e massa corporal dos animais.
2. As dietas hiperlipídicas, normolipídicas e hipolipídicas com baixa relação ω -6/ ω -3 e alta ω -9/ ω -6 reduzem a peroxidação lipídica e elevam a capacidade antioxidante.
3. As dietas hiperlipídicas, normolipídicas e hipolipídicas com baixa relação ω -6/ ω -3 e alta ω -9/ ω -6, no modelo estudado, protegem contra a carcinogênese cólica.

7 REFERÊNCIAS

ADLER, D.G.; GOSTOUT, C.J.; SORBI, D.; BURGART, L.J.; WANG, L.; HARMSSEN, W.S. Endoscopic identification and quantification of aberrant crypt foci in the human colon. **Gastrointest. Endosc.** v. 56, n.5, p. 657-662, 2002.

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 JEMAL, 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.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts&Figures 2008.** Atlanta: American Cancer Society, 2008.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Colorectal Cancer Facts&Figures 2013.** Atlanta: American Cancer Society, 2013.

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.

ARMAGHANY, T.; WILSON,J.D.; CHU, Q.; MILLS,G.Genetic Alterations in Colorectal Cancer. **Gastrointest Cancer Res.** v.5, n.1, p. 19–27, 2012.

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

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.

BÉMEUR, C.; DESJARDINS, P.; BUTTERWORTH, R.F. Antioxidant and anti-inflammatory effects of mild hypothermia in the attenuation of liver injury due to azoxymethane toxicity in the mouse. **Metab Brain Dis.** v.25, n.1, p.23-29, 2010.

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.

BIRD, R.P.; GOOD, C.K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicol Lett**, v.15, n.112, p.395-402, 2000.

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.

BODDAERT, A.S.; GERRITSEN, W.R.; PINEDO, H.M. On our way to targeted therapy for cachexia in cancer? **Current Opinion on Oncology.** v.18, p. 335-340, 2006.

BRESSAN, J. Impacto hormonal e inflamatório de diferentes composições dietéticas: ênfase em padrões alimentares e fatores dietéticos específicos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 5, p. 572-581, 2009.

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.

BURLAMAQUI, I.M.B.; DORNELAS, C.A.; ESCALANTE, R. D.; MOTA, D.M.C.; MESQUITA, F. J. C.; CARVALHO, E. R.; VERAS, L. B.; RODRIGUES, L.V. Optimization

of visibility and quantification of aberrant crypt foci in colonic mucosa in Wistar rats. **Acta Cir. Bras.** v. 25, n.2, p.148-152, 2010.

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.; 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.

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.

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, p. 2388-2392, May, 2003.

CALDER, P. C.; YAQOUB, P.; THIES, F; WALLACE F. A.; MILES E. A. Fatty acids and lymphocyte functions. **BJM.** v. 87 n.1, p. 31-48, 2002.

CALDER, P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Braz j Medbiol Res.** v.36, p.433, 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: 06 nov.2007.

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.

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.

CONTINENTE, A.J.C.; PLUVIUS, C.C.; MARTINEZ, C.V. Nutricion y neoplasias digestivas. **Rev Bras Nutr Clin**. v.17, p. 53-63, 2002.

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.

DAVIES, N.J.; BATEHUP, L.; THOMAS, R.; The role of diet and physical activity in breast, colorectal, and prostate cancer survivorship: a review of the literature. **Br J Cancer**. v. 105, n. 11, p. 52-73, 2011.

DORNELAS, C.A. **Efeitos da própolis verde na carcinogênese e angiogênese de tumores de bexiga induzidos pelo BBN em ratas wistar.** 332f. Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Ceará, Departamento de Cirurgia, Fortaleza, 2009.

EADEN, J.A.; ABRAMS, K.R.; MAYBERRY, J.F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. **Gut**, v. 48, p. 526-535, 2001.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**. v. 61, n. 5, p.759-767, 1990.

FELIN, C.R.; ROCHA, A.B.; FELIN, I.P.D.; REGNER, A.; GRIVICICH, I. Expressão das proteínas p53 e Cox-2 em Adenocarcinoma Intestinal e Mucosa Adjacente. **Rev bras Coloproct.** v.28, n.1, p. 19-25, 2008.

FELIPPE J.J. Efeito dos Ácidos Graxos Poli Insaturados no câncer: indução de apoptose, inibição da proliferação celular e antiangiogênese. **Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar.** Disponível em: www.medicinacomplementar.com.br. Acesso em 2005.

FELIPPE JR. Óleo de peixe ômega-3 e câncer: diminuição da proliferação celular maligna, aumento da apoptose, indução da diferenciação celular e diminuição da neoangiogênese **Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar.** Disponível em: www.medicinacomplementar.com.br. Acesso em: 4/10/2011.

FEMIA, A.P.; DOLARA, P.; CADERNI, G. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. **Carcinogenesis.** v.25, n. 2, p. 277-281, 2004.

FEMIA, A.P.; LUCERI, C.; TOTI, S.; GIANNINI, A.; DOLARA, P.; CADERNI, G. Gene expression profile and genomic alterations in colonic tumors induced by 1,2- dimethyldrazine (DMH) in rats. **Cancer.** v. 11, n.10, p.194, 2010.

FORTES, R.C.; RECÔVA, V.L.; MELO, A.L.; NOVAES, M.R.C.G. Hábitos Dietéticos de Pacientes com Câncer Colorretal em fase Pós-operatória. **Rev Bras Cancer**. v.53, n.3, p. 277-289, 2007.

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

FUJIMOTO, K.; FUKAGAWA, K.; SAKATA, T.; TSO, P. Suppression of food intake by apolipoprotein A-IV is mediated through the central nervous system in rats. **J Clin Invest**. v.91, n. 4, p.1830–1833, 1993.

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.

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

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.

GARTEL, A.L.; TYNER, A.L. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. **Mol Cancer Ther**. v.1, p. 639–649, 2002.

GEIERSBACH, K.B.; SAMOWITZ, W.S. Microsatellite instability and colorectal cancer. **Arch Pathol Lab Med**. v.135, n.10, p.1269–1277, 2011.

GERALDO, J. M.; ALFENAS, R. C. G. Papel da Dieta na Prevenção e no Controle da Inflamação Crônica – Evidências Atuais. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 52, n.6, p.951-967, 2008.

GRIMBLE, R.F. Antioxidantes e radicais livres. In: Nutrição oral, enteral e parenteral na pratica clinica. **Atheneu**. p.1481-1494, 2001.

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

HATA, K.; YAMADA, Y.; KUNO, T.; HIROSE, Y.; HARA, A.; QIANG, S.H.; MORI, H. Tumor formation is correlated with expression of β -catenin-accumulated crypts in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. **Cancer Sci**. v. 95, n. 4, p. 316-320, April, 2004.

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.

HIGURASHI, T.; HOSONO, K.; ENDO, H.; TAKAHASHI, H.; LIDA, H.; UCHIYAMA, T.; EZUKA, A.; UCHIYAMA, S.; YAMADA, E.; OHKUBO, H.; SAKAI, E.; MAEDA, S.; MORITA, S.; NATSUMEDA, Y.; NAGASE H.; NAKAJIMA, A. Eicosapentaenoic acid (EPA) efficacy for colorectal aberrant crypt foci (ACF): a double-blind randomized controlled Trial. **BMC Cancer**.v.12, n.413, p.3-9, 2012.

HIROSE, Y.; KUNO, T.; YAMADA, Y.; SAKATA, K.; KATAYAMA, M.; YOSHIDA, K.; QIAO, Z.; HATA, K.; YOSHIMI, N.; MORI, H. Azoxymethane-induced beta-catenin-accumulated crypts in colonic mucosa of rodents as an intermediate biomarker for colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**. v. 24, n. 1, p.107-111, 2003.

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.

HORIUCHI, H.; KAWAMATA, H.; OMOTEHARA, F.; FUJJI, S.; FUJIMORE, T. Negative Immunohistochemical staining of p53 protein does not always reflect wild-type p53 gene in cancer cells. **J Gastroenterol**. v. 39, p. 801-806, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (INCA). MINISTERIO DA SAUDE. BRASIL. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Cancer. – Rio de Janeiro: INCA, 2013.

KANG, J.X.; WEYLANDT, K.H. Modulation of inflammatory cytokines by omega-3 fatty acids. **Sub Cell Biochem.** v. 49, p.133-143, 2008.

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

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.

KOJIMA, M.; WAKAI, K.; TOKUDOME, S.; SUZUKI, K.; TAMAKOSHI, K.; WATANABE, Y. Serum levels of polyunsaturated fatty acids and risk of colorectal cancer: a prospective study. **Am J Epidemiol.** v.161, n.5, p.462-471, 2005.

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.

LARSSON, S.C.; WOLK, A. Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. **Am J Clin Nutr.** v. 86, n. 3, p. 556-565, 2007.

LIU, M.; DOI, T.; SHEN, L.; WOODS, S.C.; SEELEY, R.J.; ZHENG, S.; JACKMAN, A.; TSO, P. Intestinal satiety protein apolipoprotein AIV is synthesized and regulated in rat hypothalamus. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v.280, n.5, p.1382-1387, 2001.

LIU, C.S.; HSU, H.S.; LI, C.I.; JAN, C.I.; LI T.C.; LIN, W.Y.; LIN, T.; CHEN, Y.C.; LEE, C.C.; LIN, C.C. Central obesity and atherogenic dyslipidemia in metabolic syndrome are associated with increased risk for colorectal adenoma in a Chinese population. **BMC Gastroenterology**. v.10, p.1-7, 2010.

LOUREIRO, A.P.M.; MASCIO, P.; MARISA, H. G.; MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutosexocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**. v.25, n.5, p.777-793, 2002.

LUCENA, M.T.; APEL, A.; SILVA, M.J.M. Intussuscepção no Adulto. **Rev bras Coloproct**. v.25, n.2, p.158-161, 2005.

LYNCH, H.T.; SMYRK, T.; LANSPA, S.J. Flat adenoma in a colon cancer-prone kindred. **J. Natl. Cancer Inst**. v. 80, p. 278-282, 1988.

LYNCH, H.T.; SMYRK, T.C.; WATSON, P. Hereditary flat adenoma syndrome: A variant of familiar adenomatous polyposis. **Dis. Colon Rectum**. v.35, p.411-421, 1992.

MAIA, D.S.; FERREIRA-JUNIOR, M.; VIEGAS, R.G.; SILVA, E.E.C.; OLIVEIRA, P.T.V.; SILVA, R.C.A.; CAETANO, A.J.; FERREIRA, N.G. Obstrução intestinal por divertículo de Meckel. **Arq Bras Dig**. v.26, n.3, p.244-245, 2013.

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-JUNIOR, 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.

MEEK, D.W. Tumor suppression by p53: A role for the DNA damage response? **Nat Rev Cancer**. v.9, p.714–723, 2009.

MEYDANI, S.N. Effect of (n3) polyunsaturated fatty acids on cytokine production and their biologic function. **Nutrition**. v.12, n.1, p.8-14, 1996.

MEYER, L.A.; BROADDUS, R.R.; LU, K.H. Endometrial cancer and Lynch syndrome: clinical and pathologic considerations. **Cancer Control**. v.1, n.1, p.14-22, 2009.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem**. v. 86, n.1, p.271-278, 1978.

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.

MORI, H.; YAMADA, Y.; TOSHIYA, K.; YOSHINOBU, H. Aberrant crypt foci and β -catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis. **Mut. Res.** v. 566, n. 3, p. 191-208, 2004.

MORIN, P.J.; VOGELSTEIN, B; KINZLER, K.W. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.93, n.15, p.7950-7954, 1996.

MORITA, S.; NATSUMEDA, Y.; NAGASE, H.; NAKAJIMA, A. Eicosapentaenoic acid (EPA) efficacy for colorectal aberrant crypt foci (ACF): a double-blind randomized controlled trial. **BMC Cancer**. v. 12, n. 414, p. 2407-2413, 2012.

MUTO, T.; KAMIYA, J.; SAWADA, T.; KONISHI, F.; SUGIHARA, K.; KUBOTA, Y.; ADACHI, M.; AGAWA, S.; SAITO, Y.; MORIOKA, Y.; TANPRAYOON M.D.T. Small "flat adenoma" of the large bowel with special reference to its clinic pathologic features. **Dis. Colon Rectum**. v.28, n.11, p.847–851, 1985.

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

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.

OH, Y.T.; LEE, J.Y.; LEE, J.; KIM, H.; YOON, K.S.; CHOE, W.; KANG, I. Oleic acid reduces lipopolysaccharide-induced expression of INOS and COX-2 in BV2 murine microglial cells: possible involvement of reactive oxygen species, p38 MAPK, and IKK/NF- κ B signaling pathways. **Neuro Sci Lett.** v.464, n.2, p.93-97, 2009.

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, O.; DELKER, D.A.; ROSENBERG, D.W. Azoxymethane-induced colon tumors and aberrant crypt foci in mice of different genetic susceptibility. **Cancer Lett.** v. 130, n. 1-2, p. 29-34, 1998.

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.

PINHO, M.S.L; ROSSI, B.M. As proteínas envolvidas na carcinogênese colorretal . **Ver Bras Coloproct.** v.18. n.4. p.278-282,1998.

PINOTTI, M. F.; SILVA, M. D. ; SUGIZAKI, M. M.; NOVELLI, Y. S. D.; SANT'ANA L. S.; ARAGON, F. F; PADOVANI, C.R.; NOVELLI, E.L.B.; CICOGNA, A. C. Influências de dietas ricas em ácidos graxos saturados e insaturados sobre o miocárdio de ratos. **Arq. Bras. Cardiol.** v.88, n.3, p.346-353, 2007.

PRETLOW,T.P.; BARROW, B.J.; ASHTON, W.S.; O' RIORDAN, M.A.; PRETLOW, T.G.; JURCISEK, J.A.; STELLATO, T.A. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. **Cancer Res.**, V. 51, p. 1564-1567, 1991.

PRETLOW, T.P.; O'RIORDAN, M.A.; SOMICH, G.A.; AMINI, S.B.; PRETLOW, T.G. Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate. **Carcinogenesis.** v. 13, p.1509-1512, 1992.

RAKOFF-NAHOUM, S. Why cancer and inflammation? **Yale J. Biol. Med.**, v.79, p.123-130, 2006.

RAO, C.V.; STEELE, V.F.; SWAMY, M.V.; PATLOLLA, J.M.R.; GURUSWAMY, S.; KOPELOVICH, L. Inhibition of azoxymethane-induced colorectal cancer by CP-31398, a TP53 modulator, alone or in combination with low doses of celecoxib in male F344 rats. **Cancer Res.** v.69, n. 20, p.8175-8182, 2009.

RAO, C.V.; STEELE, V.F.; JANAKIRAM, N.B.; MOHAMMED, A.; ZHANG, Y.; CHOI, C.; WOODWARD, C.; COLLIN, P. Chemopreventive effects of frondanol A5, a *Cucumaria frondosa* extract, against rat colon carcinogenesis and inhibition of human colon cancer cell growth. **Cancer Prev Res.** v.3, n.1, p. 82-91, 2010.

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.

ROSSI, B.M.; PINHO, M.S.L. **Genética e biologia molecular para o cirurgião.** São Paulo: Lemar, p.143-166, 1999.

ROSE, D. P. Dietary fatty acids and cancer. **Am J Clin Nutr.** v.66, n.4, p.998-1003, 1997.

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.

RUXTON, C.H.S.; REED, S.C.; SIMPSON, M.J.A.; MILLINGTON, K.J. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **J Hum Nutr Diet.** v.17, p. 449-459, 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.

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

SANTOS JR, J.C.M. Cancer Ano-Reto-Cólico: Aspectos Atuais II –Cancer Colorretal – Fatores de risco e Prevenção. **Rev Bras Coloproct.** v. 27, n. 4, p.459-473, 2007.

SCHWARTZ, B.; BIRK, Y.; RAZ, A.; MADAR, Z. Nutritional-pharmacological combinations: A novel approach to reducing colon cancer incidence. **Eur J Nutr.** v. 43, p. 221-229, 2004.

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.

SHIROTA, T; HAJI, S.; YAMASAKI, M.; IWASAKI, T.; HIDAKA, T.; TAKEYAMA, Y.;SHIOZAKI, H.; OHYANAGI, H. Apoptosis in human pancreatic cancer cells induced by eicosapentaenoic acid. **Nutrition.** v. 21, n.10, p.1010-1017, 2005.

SHIRTLIFF, N.; BIRD, R.P. Growth features of aberrant crypt foci that resist modulation by cholic acid. **Carcinogenesis.** v. 17, p. 2093-2096, 1996.

SIDDIQUI, R A.; SHAIKH, S. R.; SECH, L. A.; YOUNT, H. R.; STILLWELL, W.; ZALOGA, G. P. Omega-3 fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action. **Mini Rev Med Chem.** v.4, n.8, p.859-871, 2004.

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.

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, p.573-578, 1992.

TAKAYAMA, T.; OHI, M.; HAYASHI, T.; MIYANISHI, K.; NOBUOKA, A.; NAKAJIMA, T.; SATOH, T.; TAKIMOTO, R.; KATO, J.; SAKAMAKI, S.; NIITSU, Y. Analysis of K-Ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. **Gastroenterology**. v.121, n. 3, p. 599-611, 2001.

TAKETO, M.M.; EDELMANN, W. Reviews in Basic and Clinical Gastroenterology-Mouse Models of Colon Cancer. **Gastroenterology**, v. 136, p.780-798, 2009.

TAPIERO, H.; BA, G. N.; COUVREUR, P.; TEW, K. D. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomed Pharmacother**. v.56, p.215–222, 2002.

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

THEODOROPOULOS, G.E.; KARAFOKA, E.; PAPAILIOU, J.G.; STAMOPOULOS, P.; ZAMBIRINIS, C.P.; BRAMIS, K.; PANOUSSOPOULOS, S.G.; LEANDROS, E.; BRAMIS, J. P53 and EGFR expression in colorectal cancer: a reappraisal of old tissue markers in patients with long follow-up. **Anticancer Res**. v.29, n.2, p.785-791, 2009.

VEENNING, F.A.; CLAESSION, M.H.; KISSOW, H. The carcinogenic agent azoxymethane (AOM) enhances early inflammation-induced colon crypt pathology. **J Cancer Sci Ther**. v. 5, n.11, p.377-383, 2013.

VOGELSTEIN, B.; SUR, S.; PRIVES, C. p53: The Most Frequently Altered Gene in Human Cancers. **Nature Education**. v.3, n.9, p.6, 2010.

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.

WEIHUA Z.; MÄKELÄ S.; ANDERSSON L. C.; SALMI S.; SAJI S.; WEBSTER J. I.; JENSEN E V.; NILSSON S.; WARNER M. & GUSTAFSSON J. Ä. A role for estrogen receptor b in the regulation of growth of the ventral prostate. **Proc Natl Acad Sci U.S.A**. v.98 p.6330-6335, 2001.

WEN B.; DEUTSCH E.; OPOLON P.; AUPERIN A.; FRASCOGNA V.; CONNAULT E.; BOURHIS J. N-3 polyunsaturated fatty acids decrease mucosal/epidermal reactions and enhance antitumor effect of ionizing radiation with of tumor angiogenesis. **Br J Cancer**. v.89, n.6, p.1102-1107, 2003.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diet, nutrition and prevention of chronic diseases. Report of a joint **WHO/FAO** expert consultation. Geneva, 2003.

YAMADA, Y.; YOSHIMI, N.; HIROSE, Y.; KAWABATA, K.; MATSUNAGA, K.; SHIMIZU, M.; MORI, H. Frequent β -catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. **Cancer Res**. v.60, p.3323-3327, 2000.

YAMADA, Y.; YOSHIMI, N.; HIROSE, Y.; MATSUNAGA, K.; KATAYAMA, M.; SAKATA, K.; SHIMIZU, M.; KUNO, T.; MORI, H. Sequential analysis of morphological and biological properties of β -catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat carcinogenesis. **Cancer Res**. v.61, p.1874-1878, 2001.

ZANDONAI, A.P.; SONOBE, H.M.; SAWADA, N.O.; The dietary risk factors for colorectal cancer related to meat consumption. **Rev Esc Enferm**. v.46, n.1, p. 234-239, 2012.

APÊNDICE A – COMPOSIÇÃO DAS DIETAS

Alimento	Quantidade(g)	Calorias	Carboidratos(g)	Proteínas(g)	Lípidios(g)
Dieta Padrão					
BiobaseBio-tec	27	120	17,6	8,8	1,6
Total	27	120	17,6	8,8	1,6
					14,4
Total de calorias (%)			70,4 (58,7%)	35,2 (29,3%)	(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
					78,9
Total de calorias (%)			44,84 (25,4%)	52,8 (29,9%)	(44,7%)
Dieta Normolipídica					
Nutri dextrin	18	68,4	17,1	0	0
Óleos (mix)	6,2	51,51	0	0	5,7
Nutri Protein HWP	16	51,2	0	12,8	0
Total		171,11	17,1	12,8	5,7
					51,5
Total de calorias (%)			68,4 (40,0%)	51,2 (29,9%)	(30,1%)
Dieta Hipolipídica					
Nutri dextrin	27	102,6	25,65	0	0
Óleos (mix)	2,5	20,77	0	0	2,31
Nutri Protein HWP	16,5	52,8	0	13,2	0
Total		176,17	25,65	13,2	2,31
					20,8
Total de calorias (%)			102,6 (58,2%)	52,8 (30%)	(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)	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 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	0
Óleos (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 $\omega 6:\omega 3$	1,4				
Relação $\omega 9:\omega 6$	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 ômeças
	0,958768	0,685534	3,1155	4,8
Relação $\omega 6:\omega 3$	1,4			
Relação $\omega 9:\omega 6$	3,2			
Total 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%

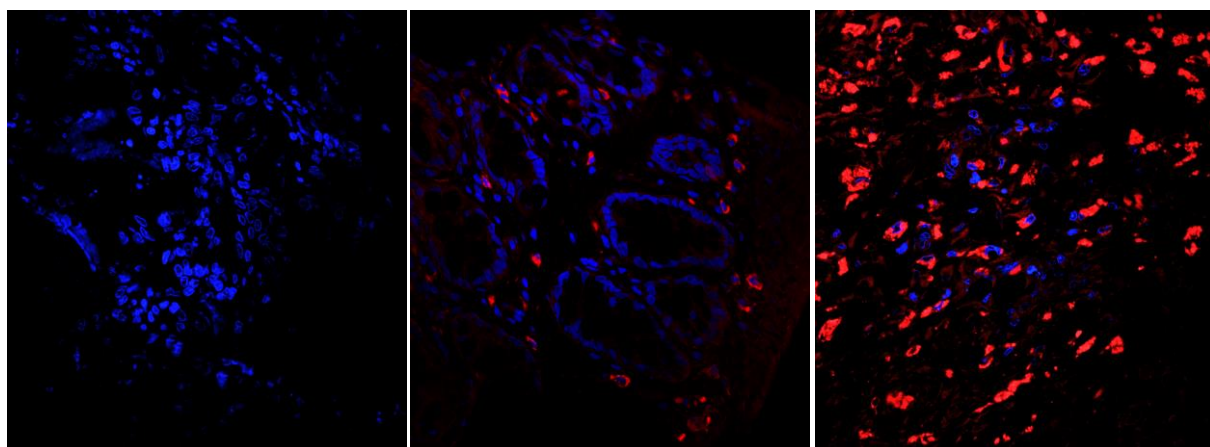
	Gramas	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Gordura saturada
Total em gramas	2,5	0,387	0,276425	1,25625	0,58
Total em gramas		0,663025		1,25625	0,58
Total em Calorias		5,967225		11,30625	5,22
		POLI		MONO	SATURADA

	ômega 6	ômega 3	ômega 9	Total de ômegas	
	0,3866	0,276425	1,25625	1,9	
Relação $\omega 6:\omega 3$	1,4				
Relação $\omega 9:\omega 6$	3,2				

Total de Gorduras: | 2,5

APÊNDICE I - IMUNOHISTOQUÍMICA

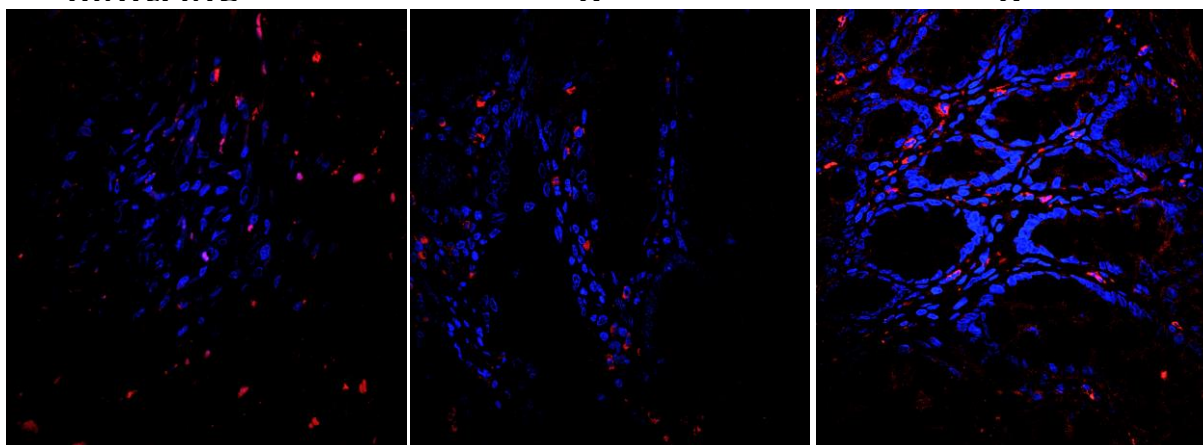
1. K-RAS



Controle

G

G



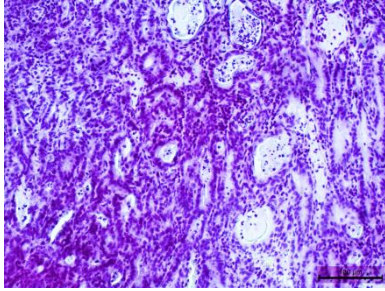
GI

GI

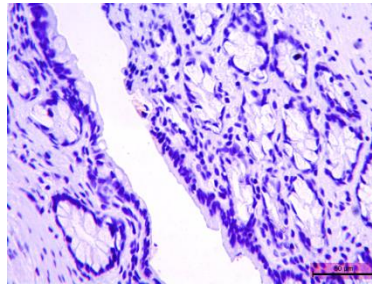
G

2.NFkB

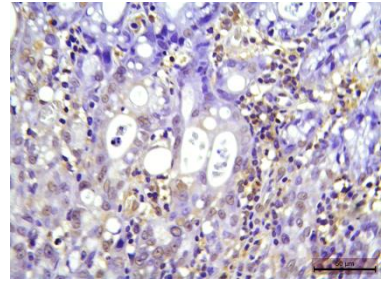
Controle Negativo



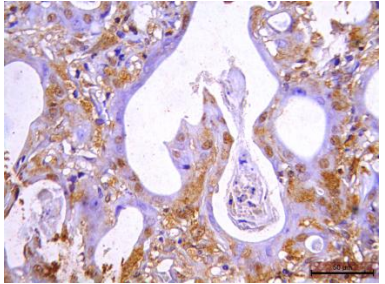
GI



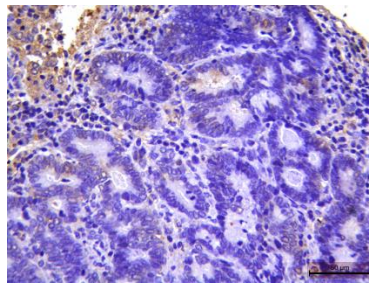
GII



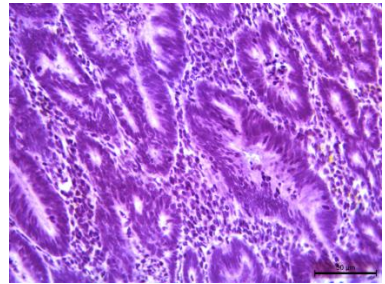
GIII



GIV



GV



3. Expressão de COX-2

A expressão imunohistoquímica de COX-2 mostrou que apenas o grupo hipolipídico (10, 8-12) mostrou maior intensidade de marcação em relação ao grupo salina (0, 0-0). Não houve diferença significativa entre os demais grupos padrão (8, 8-8) e com dietas hiper (8, 8-8) e normolipídica (4, 4-9) ($p=0.0224$, Kruskal-Wallis/Dunn)

Tabela 8: Expressão imuno-histoquímica de COX-2.

Grupo	Expressão de COX	p-Valor
Salina	0 (0-0)	0.0224
Padrão	8 (8-8)	
Dieta Hiperlipídica	8 (8-8)	
Dieta Normolipídica	4 (4-9)	
Dieta Hipolipídica	10 (8-12)*	

* $p<0.05$ em relação a Salina, Kruskal-Wallis/Dunn.

APENDICE J – LESÕES MALIGNAS

ESTUDO DA CARCINOGENESE COLORRETAL DE RATOS WISTAR INDUZIDOS COM AZOXIMETANO ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM ÔMEGA 3 e 9
 GRUPO _____ RATO _____

LESÕES MALIGNAS

		Carcinomas														Invasão						Nº Total de Tu	Observações Subtipos/outros				
		Gradação Histopatológica Adenocarcinomas							Gradação Histopatológica Subtipos/outros							IM <i>(in situ)</i>	SM	MUS	S	P	M						
		Diferenciação			atipia		mitoses		diferenciação			atipia		mitoses													
		Be	Mo	In	Ba	Al	<10 a 20	>20	Be	Mo	In	Ba	Al	<10 a 20	>20												
P R O X I M A L	1																										
	2																										
	3																										
	4																										
M É D I O	1																										
	2																										
	3																										
	4																										
D I S T A L	1																										
	2																										
	3																										
	4																										

Be – Bem diferenciado, Mo – Moderadamente, In – Indiferenciado, Ba - baixo grau, Al- alto grau, IM – intramucoso, SM – submucoso, MUS – muscular, S Serosa, P- Peritonia, M- Metástase.
 Observações:

APENDICE K – LESÕES BENIGNAS

ESTUDO DA CARCINOGENESE COLORRETAL DE RATOS WISTAR INDUZIDOS COM AZOXYMETANO ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM ÔMEGA 3 e 9

GRUPO _____ RATO _____

LESÕES BENIGNAS

	Estereoscopia			Histopatologia										
	Focos de Críptas Aberrantes													
	Clássicas	Displásicas	Multiplicidade de Focos de Críptas	Críptas Aberrantes		Pólipo Hiperplásico	Adenoma							
				Clássicas	Displásicas		Tubular		Túbulo/Viloso		Viloso		Plano	
						SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	
P R O X I M A L	1													
	2													
	3													
	4													
	5													
M É D I O	1													
	2													
	3													
	4													
	5													
D I S T A L	1													
	2													
	3													
	4													
	5													

SD – sem displasia, CD – Com displasia, Observações:

APENDICE L - CARCINOGENESE

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 M – LESÕES HEPÁTICAS

1. GRUPO PADRÃO

Grupo: II Padrão com QCoC

lesões pré-neoplásicas

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		X			
	F.C. Vacuoladas	X	X			X		X					X
	F.C. Basofílicas	X						X				X	
	F.C. Intermediárias							X					X
	F.C. Anfofílicas	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 - glitoxênio + vacuolado
 Rato 7 - glitoxênio + oncocito
 Rato 11 - glitoxênio + vacuolado
 => onfirose

2. GRUPO HIPERLIPÍDICO

Grupo.....

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	
	F.C. Vacuoladas	X						X					
	F.C. Basofílicas	X				X							
	F.C. Intermediárias												
	F.C. Anofílicas												
	F.C. Tigroide	X			X		X	X					
	F.C. Oncocítica	X				X							
	F.C. Pequenas	X		X		X			X		X	X	
	F.C. Acidófilas												
Espongiose	X	X	X			X		X	X	X			
Peliose	X	X		X	X			X			X		
Colangioma	X				X	X			X	X			
Adenoma	X				X								
Atipias L		X	X		X				X	X			
Atipias M	X												
Atipias S													
Núcleos vacuolados	X												
Displasia BG													
Displasia AG													
Carcinoma in situ													
Hepatocarcinoma													
Infiltrado de eosinófilos													
Microabscessos													
Outros													

↑ hiperlipídico

↓
 raro: leucócitos
 áreas de necrose
 focos colangiocelulares
 => conferida:

↓
 ↑ Proliferação
 ductular
 biliar esclerosante
 com dilatações
 luminais

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>acentuada</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
lindo.

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 <i>abptok ne ctoic</i>	X												

espongiose e peliose

*Hofeolac
 qeclora
 bira
 esclerose
 com dda
 lumia*

*esclerosante
 doctores
 bira
 esclerosante*

*esclerose
 lesão completa
 coado des
 hormônio tiroideos
 un... coad...*

ANEXO A
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.


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

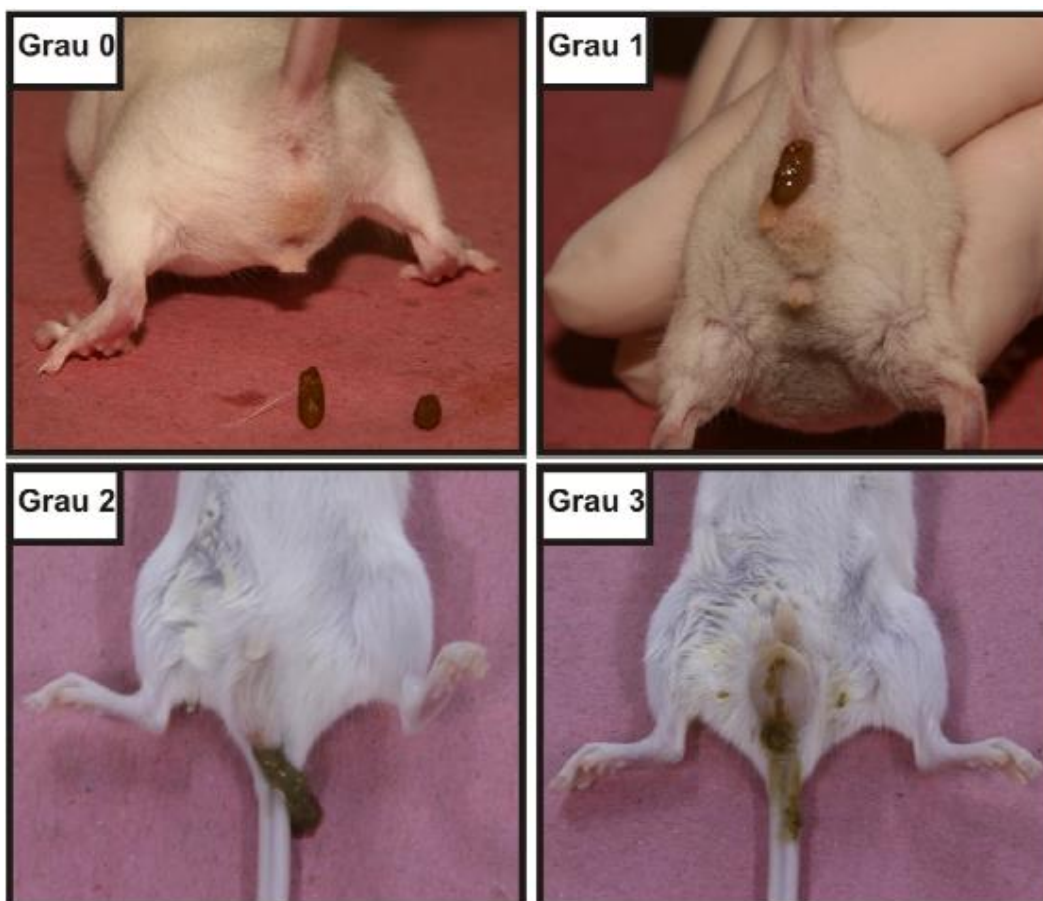
ANEXO B – COMPOSIÇÃO DA DIETA PADRÃO

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 - CLASSIFICAÇÃO DA DIARREIA

À diarreia são atribuídos escores de acordo com a intensidade. 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 (Kurita *et al.*, 2000).



Representação dos graus de diarreia

ANEXO D: Estadiamento TNM (AJCC/UICC, 2009)

Tumor Primário (T)	Linfonodos Regionais (N)	Metástases à Distância (M)
(TX) Tumor primário Inacessível	(NX) Linfonodos regionais Inacessíveis	(MX) Presença de metástases a distância não pode ser observada
(T0) Sem evidências do Tumor primário	(N0) Sem evidência de Linfonodos regionais	(M0) Sem metástases à distância
(Tis) Carcinoma <i>in situ</i> intraepitelial ou invasão da lâmina própria		
(T1) Tumor invadindo a Submucosa	(N1) Metástases em até três linfonodos pericólicos ou perirretais	(M1) Metástase à distância
(T2) Tumor invadindo a muscular própria	(N2) Metástases em quatro ou mais linfonodos pericólicos/ perirretais	
(T3) Tumor invadindo através da muscular própria até a subserosa	(N3) Metástase em qualquer linfonodo ao longo da cadeia vascular	
(T4) Tumor invadindo diretamente outros órgãos		

- Estádio 0 – TisN0M0
- Estádio I - T1N0M0/ T2N0M0
- Estádio II- T3N0M0/ T4N0M0
- Estádio III- Qualquer TN1M0/ N2M0
- Estádio IV- Qualquer T/qualquer NM1

ANEXO E : ANTICORPOS UTILIZADOS

1. Ki-67

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

Ki-67 (M-19): sc-7846

ANTICORPO PRIMARIO

SANTA CRUZ®
BIOTECHNOLOGY
The Power to Question

BACKGROUND

Ki-67 is a nuclear protein that is expressed in proliferating cells and may be required for maintaining cell proliferation. Ki-67 has been used as a marker for cell proliferation of solid tumors and some hematological malignancies. A correlation has been demonstrated between Ki-67 index and the histopathological grade of neoplasms. Assessment of Ki-67 expression in renal and ureter tumors shows a correlation between tumor proliferation and disease progression, thus making it possible to differentiate high-risk patients. Ki-67 expression may also prove to be important for distinguishing between malignant and benign peripheral nerve sheath tumors.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: Mki67 (mouse) mapping to 7 F3.

SOURCE

Ki-67 (M-19) is an affinity purified goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping near the C-terminus of Ki-67 of mouse origin.

PRODUCT

Each vial contains 200 µg IgG in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

Blocking peptide available for competition studies, sc-7846 P, (100 µg peptide in 0.5 ml PBS containing < 0.1% sodium azide and 0.2% BSA).

Available as phycoerythrin (sc-7846 PE), PerCP (sc-7846 PerCP) or PerCP-Cy5.5 (sc-7846 PCPC5) conjugates for flow cytometry, 100 tests; as fluorescein (sc-7846 FITC) or rhodamine (sc-7846 TRITC) conjugates for immunofluorescence, 200 µg/ml; as Alexa Fluor® 405 (sc-7846 AF405), Alexa Fluor® 488 (sc-7846 AF488) or Alexa Fluor® 647 (sc-7846 AF647) conjugates for immunofluorescence; 100 µg/2 ml.

Alexa Fluor® is a trademark of Molecular Probes, Inc., Oregon, USA

APPLICATIONS

Ki-67 (M-19) is recommended for detection of Ki-67 of mouse, rat and, to a lesser extent, human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation (1-2 µg per 100-500 µg of total protein (1 ml of cell lysate)), immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500), flow cytometry (1 µg per 1 x 10⁶ cells) and solid phase ELISA (starting dilution 1:30, dilution range 1:30-1:3000).

Suitable for use as control antibody for Ki-67 siRNA (h): sc-37613, Ki-67 siRNA (m): sc-37614, Ki-67 shRNA Plasmid (h): sc-37613-SH, Ki-67 shRNA Plasmid (m): sc-37614-SH, Ki-67 shRNA (h) Lentiviral Particles: sc-37613-V and Ki-67 shRNA (m) Lentiviral Particles: sc-37614-V.

Molecular Weight of Ki-67 isoforms: 395/345 kDa.

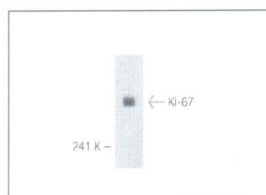
Positive Controls: MCF7 nuclear extract: sc-2149, Raji whole cell lysate or K-562 whole cell lysate: sc-2203.

RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

STORAGE

Store at 4° C, ****DO NOT FREEZE****. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

DATA

Ki-67 (M-19) sc-7846. Western blot analysis of Ki-67 expression in Raji whole cell lysate.


SELECT PRODUCT CITATIONS

- Weihua, Z., et al. 2000. Estrogen receptor (ER) β , a modulator of ER α in the uterus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 5936-5941.
- Eggan, K., et al. 2004. Mice cloned from olfactory sensory neurons. Nature 428: 44-49.
- Hill, R., et al. 2005. Selective evolution of stromal mesenchyme with p53 loss in response to epithelial tumorigenesis. Cell 123: 1001-1011.
- Wagner, N., et al. 2005. A splice variant of the Wilms' tumour suppressor Wt1 is required for normal development of the olfactory system. Development 132: 1327-1336.
- Iyengar, P., et al. 2005. Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression *in vivo*, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. J. Clin. Invest. 115: 1163-1176.
- Grimm, S., et al. 2005. Abstract cell cycle defects contribute to a block in hormone-induced mammary gland proliferation in CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP β)-null mice. J. Biol. Chem. 280: 36301-36309.
- Schwertfeger, K., et al. 2006. A critical role for the inflammatory response in a mouse model of preneoplastic progression. Cancer Res. 66: 5676-5685.
- Aonurm-Helm, A., et al. 2008. Depression-like behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM)-deficient mice and its reversal by an NCAM-derived peptide, FGL. Eur. J. Neurosci. 28: 1618-1628.
- Srsen, V., et al. 2009. Centrosome proteins form an insoluble perinuclear matrix during muscle cell differentiation. BMC Cell Biol. 10: 28.
- Lu, J., et al. 2010. α cell-specific Men1 ablation triggers the transdifferentiation of glucagon-expressing cells and Insulinoma development. Gastroenterology 138: 1954-1965.
- Chen, L.P., et al. 2010. Rapamycin inhibits cholangiocyte regeneration by blocking interleukin-6-induced activation of signal transducer and activator of transcription 3 after liver transplantation. Liver Transpl. 16: 204-214.

2.K-Ras

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

K-Ras (F234): sc-30 *rate*



BACKGROUND

The mammalian Ras (also designated v-Ha-Ras, Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, HRAS1, K-Ras, N-Ras, RASH1 or c-bas/HAS) gene family consists of the Harvey and Kirsten Ras genes (c-H-Ras1 and c-K-Ras2), an inactive pseudogene of each (c-H-Ras2 and c-K-Ras1) and the N-Ras gene. The three Ras oncogenes, H-Ras, K-Ras and N-Ras, encode proteins with GTP/GDP binding and GTPase activity. Ras proteins alternate between an inactive form bound to GDP and an active form bound to GTP, activated by a guanine nucleotide-exchange factor (GEF) and inactivated by a GTPase-activating protein (GAP). Ras nomenclature originates from the characterization of human DNA sequences homologous to cloned DNA fragments containing oncogenic sequences of a type C mammalian retrovirus, the Harvey strain of murine sarcoma virus (HaMSV), derived from the rat. Under normal conditions, Ras family members influence cell growth and differentiation events in a subcellular membrane compartmentalization-based signaling system. Oncogenic Ras can deregulate processes that control both cell proliferation and apoptosis. The Ras superfamily of GTP hydrolysis-coupled signal transduction relay proteins can be subclassified into Ras, Rho, Rab and ARF families.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: KRAS (human) mapping to 12p12.1; Kras (mouse) mapping to 6 G3.

SOURCE

K-Ras (F234) is a mouse monoclonal antibody raised against recombinant encompassing amino acids 54-189 of K-Ras protein of rat origin.

PRODUCT

Each vial contains 100 µg IgG_{2a} in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

APPLICATIONS

K-Ras (F234) is recommended for detection of c-K-Ras and v-K-Ras of mouse, rat and human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation [1-2 µg per 100-500 µg of total protein (1 ml of cell lysate)] and immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500); may cross-react with c-H-Ras and c-N-Ras.

Suitable for use as control antibody for K-Ras siRNA (h): sc-35731, K-Ras siRNA (m): sc-43876, K-Ras shRNA Plasmid (h): sc-35731-SH, K-Ras shRNA Plasmid (m): sc-43876-SH, K-Ras shRNA (h) Lentiviral Particles: sc-35731-V and K-Ras shRNA (m) Lentiviral Particles: sc-43876-V.

Molecular Weight of K-Ras: 21 kDa.

Positive Controls: K-Ras (h): 293 Lysate: sc-111225, KNRK whole cell lysate: sc-2214 or HeLa whole cell lysate: sc-2200.

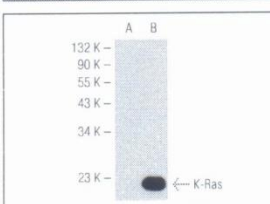
STORAGE

Store at 4° C, ****DO NOT FREEZE****. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

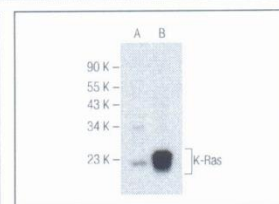
RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

DATA



K-Ras (F234) sc-30. Western blot analysis of K-Ras expression in non-transfected sc-110760 (A) and human K-Ras transfected sc-111225 (B) 293 whole cell lysates.



K-Ras (F234) sc-30. Western blot analysis of K-Ras expression in NRK (A) and KNRK (B) whole cell lysates.


SELECT PRODUCT CITATIONS

- Ashar, H.R., et al. 2000. Farnesyl transferase inhibitors block the farnesylation of CENP-E and CENP-F and alter the association of CENP-E with the microtubules. *J. Biol. Chem.* 275: 30451-20457.
- Giehl, K., et al. 2000. Growth factor-dependent activation of the Ras-Raf-MEK-MAPK pathway in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 carrying activated K-Ras: implications for cell proliferation and cell migration. *Oncogene* 19: 2930-2942.
- Esteban, L.M., et al. 2001. Targeted genomic disruption of H-Ras and N-Ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol. Cell. Biol.* 21: 1444-1452.
- Villalonga, P., et al. 2001. Calmodulin binds to K-Ras, but not to H- or N-Ras, and modulates its downstream signaling. *Mol. Cell. Biol.* 21: 7345-7354.
- Lundberg, A.S., et al. 2002. Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. *Oncogene* 21: 4577-4586.
- Smakman, N., et al. 2006. K-Ras(D13) Promotes apoptosis of human colorectal tumor cells by Reovirus3d and oxaliplatin but not by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res.* 66: 5403-5408.
- Ibiza, S., et al. 2008. Endothelial nitric oxide synthase regulates N-Ras activation on the Golgi complex of antigen-stimulated T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 10507-10512.
- Rubio, I., et al. 2010. TCR-induced activation of Ras proceeds at the plasma membrane and requires palmitoylation of N-Ras. *J. Immunol.* 185: 3536-3543.
- Cepero, V., et al. 2010. MET and KRAS gene amplification mediates acquired resistance to MET tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res.* 70: 7580-7590.
- Vidic, S., et al. 2010. MicroRNAs targeting mutant K-ras by electrotransfer inhibit human colorectal adenocarcinoma cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Gene Ther.* 17: 409-419.

3.NFκB

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

NFκB p65 (C-20): sc-372



The Power to Question

BACKGROUND

Proteins encoded by the v-Rel viral oncogene and its cellular homolog, c-Rel, are members of a family of transcription factors that include the two subunits of the transcription factor NFκB (p50 and p65) and the *Drosophila* maternal morphogen, dorsal. Both proteins specifically bind to DNA sequences that are the same or slight variations of the 10 bp κB sequence in the immunoglobulin κ light chain enhancer. This same sequence is also present in a number of other cellular and viral enhancers. The DNA binding activity of NFκB is activated and NFκB is subsequently transported from the cytoplasm to the nucleus in cells exposed to mitogens or growth factors. cDNAs encoding precursors for two distinct proteins of the same size have been described, designated p105 and p100. The p105 precursor contains p50 at its N-terminus and a C-terminal region that when expressed as a separate molecule, designated pΔ, binds to p50 and regulates its activity.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: RELA (human) mapping to 11q13.1; Rela (mouse) mapping to 19 A.

SOURCE

NFκB p65 (C-20) is available as either rabbit (sc-372) or goat (sc-372-G) polyclonal affinity purified antibody raised against a peptide mapping at the C-terminus of NFκB p65 of human origin.

PRODUCT

Each vial contains 200 μg IgG in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

Blocking peptide available for competition studies, sc-372 P, (100 μg peptide in 0.5 ml PBS containing < 0.1% sodium azide and 0.2% BSA).

Available as agarose conjugate for immunoprecipitation, sc-372 AC, 500 μg/0.25 ml agarose in 1 ml; and as TransCruz reagent for Gel Supershift and ChIP applications, sc-372 X, 200 μg/0.1 ml.

APPLICATIONS

NFκB p65 (C-20) is recommended for detection of NFκB p65 of mouse, rat and human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation [1-2 μg per 100-500 μg of total protein (1 ml of cell lysate)], immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and solid phase ELISA (starting dilution 1:30, dilution range 1:30-1:3000).

NFκB p65 (C-20) is also recommended for detection of NFκB p65 in additional species, including equine, canine, bovine and porcine.

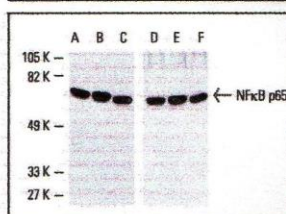
Suitable for use as control antibody for NFκB p65 siRNA (h): sc-29410, NFκB p65 siRNA (m): sc-29411, NFκB p65 shRNA Plasmid (h): sc-29410-SH, NFκB p65 shRNA Plasmid (m): sc-29411-SH, NFκB p65 shRNA (h) Lentiviral Particles: sc-29410-V and NFκB p65 shRNA (m) Lentiviral Particles: sc-29411-V.

NFκB p65 (C-20) X TransCruz antibody is recommended for Gel Supershift and ChIP applications.

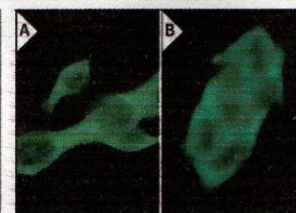
Molecular Weight of NFκB p65: 65 kDa.

STORAGE

Store at 4° C. ****DO NOT FREEZE****. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

DATA

Western blot analysis of NFκB p65 in NIH/3T3 (A,D), A-431 (B,E) and K-562 (C,F) whole cell lysates. Antibodies tested include NFκB p65 (C-20): sc-372 (A-C) and NFκB p65 (C-20)-G: sc-372-G (D-F).



NFκB p65 (C-20): sc-372. Immunofluorescence staining of methanol-fixed NIH/3T3 cells showing cytoplasmic staining (A). Immunofluorescence staining of methanol-fixed A-431 cells showing cytoplasmic staining (B).

SELECT PRODUCT CITATIONS

- Kheradmand, F., et al. 1998. Role of Rac 1 and oxygen radicals in Collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 280: 898-902.
- Djordjevic, A., et al. 2012. Effects of fluoxetine on plasticity and apoptosis evoked by chronic stress in rat prefrontal cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 693: 37-44.
- Liu, F., et al. 2012. NF-κB directly regulates Fas transcription to modulate Fas-mediated apoptosis and tumor suppression. *J. Biol. Chem.* 287: 25530-25540.
- Tan, G., et al. 2012. NF-κB-dependent microRNA-125b up-regulation promotes cell survival by targeting p38α upon ultraviolet radiation. *J. Biol. Chem.* 287: 33036-33047.
- Khan, S., et al. 2012. A novel cyano derivative of 11-keto-β-boswellic acid causes apoptotic death by disrupting PI3K/AKT/Hsp-90 cascade, mitochondrial integrity, and other cell survival signaling events in HL-60 cells. *Mol. Carcinog.* 51: 679-695.
- Velickovic, N., et al. 2012. Time-course of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and inflammation in juvenile rat brain after cranial irradiation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32: 1175-1185.
- Ortis, F., et al. 2012. Differential usage of NF-κB activating signals by IL-1β and TNF-α in pancreatic beta cells. *FEBS Lett.* 586: 994-999.
- Garcia-Garcia, F.J., et al. 2012. Signal transduction pathways (MAPKs, NF-κB, and C/EBP) regulating COX-2 expression in nasal fibroblasts from asthma patients with aspirin intolerance. *PLoS ONE* 7: e51281.
- Djordjevic, A., et al. 2012. Fluoxetine affects hippocampal plasticity, apoptosis and depressive-like behavior of chronically isolated rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 36: 92-100.


RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

4.COX-2

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

Cox-2 (M-19): sc-1747



The Power to Question

BACKGROUND

Prostaglandins are a diverse group of autocrine and paracrine hormones that mediate many cellular and physiologic processes. Prostaglandin H₂ (PGH₂) is an intermediate molecule in formation of the prostaglandins. Cyclooxygenase-1 (Cox-1) and cyclooxygenase-2 (Cox-2) are prostaglandin synthases that catalyze the formation of PGH₂ from arachidonic acid (AA). Cox-1 and Cox-2 are isozymes of prostaglandin-endoperoxidase synthase (PTGS). Cox-1 is constitutively expressed in most tissues and is thought to serve in general "housekeeping" functions. Cox-2 is efficiently induced in migratory cells responding to pro-inflammatory stimuli and is considered to be an important mediator of inflammation. Both enzymes are targets for the nonsteroidal therapeutic anti-inflammatory drugs, NSAIDs.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: PTGS2 (human) mapping to 1q31.1; Ptgs2 (mouse) mapping to 1 G1.

SOURCE

Cox-2 (M-19) is available as either goat (sc-1747) or rabbit (sc-1747-R) polyclonal affinity purified antibody raised against a peptide mapping at the C-terminus of Cox-2 of mouse origin.

PRODUCT

Each vial contains 200 µg IgG in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

Blocking peptide available for competition studies, sc-1747 P, (100 µg peptide in 0.5 ml PBS containing < 0.1% sodium azide and 0.2% BSA).

Available as PE conjugate for flow cytometry, sc-1747 PE, 100 tests.

APPLICATIONS

Cox-2 (M-19) is recommended for detection of Cox-2 of mouse, rat and human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation [1-2 µg per 100-500 µg of total protein (1 ml of cell lysate)], immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and immunohistochemistry (including paraffin-embedded sections) (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500).

Suitable for use as control antibody for Cox-2 siRNA (h): sc-29279, Cox-2 siRNA (m): sc-29278, Cox-2 shRNA Plasmid (h): sc-29279-SH, Cox-2 shRNA Plasmid (m): sc-29278-SH, Cox-2 shRNA (h) Lentiviral Particles: sc-29279-V and Cox-2 shRNA (m) Lentiviral Particles: sc-29278-V.

Molecular Weight of Cox-2: 70-72 kDa.

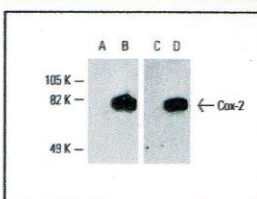
Positive Controls: CCD-1064Sk cell lysate: sc-2263, A549 cell lysate: sc-2413 or RAW 264.7 + LPS/PMA cell lysate: sc-2212.

STORAGE

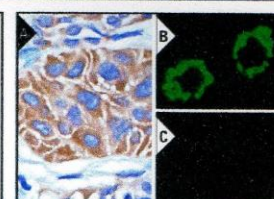
Store at 4° C, **DO NOT FREEZE**. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

DATA

Western blot analysis of Cox-2 expression in uninduced (A,C) and LPS + PMA-treated (B,D) RAW 264.7 whole cell lysates. Antibodies tested include Cox-2 (C-20): sc-1745 (A,B) and Cox-2 (M-19): sc-1747 (C,D).



Cox-2 (M-19): sc-1747. Immunoperoxidase staining of formalin-fixed, paraffin-embedded human lung tumor showing membrane and cytoplasmic staining (A). Immunofluorescence staining of methanol-fixed RAW 264.7 cells induced with LPS and PMA showing cytoplasmic vesicle localization (B) and untreated control RAW 264.7 cells (C).

SELECT PRODUCT CITATIONS

- Newberry, R., et al. 2001. Spontaneous and continuous cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E₂ production by stromal cells in the murine small intestine lamina propria: directing the tone of the intestinal immune response. *J. Immunol.* 166: 4465-4472.
- Rehn, M., et al. 2005. Upregulation of cyclooxygenase-2 and thromboxane A₂ production mediate the action of tumor necrosis factor- α in isolated rat myenteric ganglia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289: G586-G591.
- Ling, H., et al. 2010. Pachymic acid inhibits cell growth and modulates arachidonic acid metabolism in nonsmall cell lung cancer A549 cells. *Mol. Carcinog.* 49: 271-282.
- Hassan, A., et al. 2010. An α -linolenic acid-rich formula reduces oxidative stress and inflammation by regulating NF κ B in rats with TNBS-induced colitis. *J. Nutr.* 140: 1714-1721.
- Damm, J., et al. 2011. Spatiotemporal nuclear factor interleukin-6 expression in the rat brain during lipopolysaccharide-induced fever is linked to sustained hypothalamic inflammatory target gene induction. *J. Comp. Neurol.* 519: 480-505.
- Mbodji, K., et al. 2011. Alanyl-glutamine restores maternal deprivation-induced TLR4 levels in a rat neonatal model. *Clin. Nutr.* 30: 672-677.
- Ibrahim, A., et al. 2011. Anti-inflammatory and anti-angiogenic effect of long chain η -3 polyunsaturated fatty acids in intestinal microvascular endothelium. *Clin. Nutr.* 30: 678-687.
- Gerbe, F., et al. 2011. Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* 192: 767-780.
- Agouni, A., et al. 2011. Microparticles from patients with metabolic syndrome induce vascular hypo-reactivity via Fas/Fas-ligand pathway in mice. *PLoS ONE* 6: e27809.

ANEXO F - 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.

ANEXO G - CITOCINAS

Preparo dos reagentes para imunoenensaio (Milliplex Map Kit)

Os anticorpos imobilizados em Beads: o frasco com os anticorpos (anti-IL-1 β , anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IL-18, anti-TNF- α , anti-INF- γ e anti-VEGF) imobilizado no Beads por 30 seg e agitado vigorosamente por 1 min antes do uso. Adicionado 60 μ L da solução contendo de Beads em 2.58 mL de diluente para Beads.Reconstituído controle de qualidade 1 e 2 em 250 μ L de água deionizada.Diluído 30 mL de Wash Buffer (solução estoque 10x) em 270 mL de água deionizada.

Reconstituído o frasco Standard com 250 μ L água deionizada para uma concentração final de 20.000 pg/mL. Preparados 6 tubos de microcentrífugas com 120 μ L de Assay Buffer e adicionado solução Standard reconstituída conforme quadro abaixo.

Diluição da curva padrão

Solução Standard (Adicionar)	Vol. de Assay Buffer (Adiciononar)	Concentração Standard (pg/mL)
40 μ L do original	120 μ L	1:4
40 μ L de 1:4	120 μ L	1:16
40 μ L de 1:16	120 μ L	1:64
40 μ L de 1:64	120 μ L	1:256
40 μ L de 1:256	120 μ L	1:1.024
40 μ L de 1:4.096	120 μ L	1:4.096

Procedimento para imunoenensaio

Descongeladas as amostras uma única vez, foi centrifugada a 3000xg por 5 min antes de iniciar as reações. As amostras foram diluídas na proporção de 1:4 de soro diluente (disponível no kit).

Montada a placa de filtro com 200 μ L de Assay Buffer em cada poço. Selado e misturado no agitador para placa por 10 min na temperatura ambiente.Removido o Assay Buffer em câmara com vácuo, adicionado 25 μ L de cada amostra padrão (Standard disponível

no kit) ou controle de reação (disponível no kit) em cada poço apropriado. Poço sem standard ou controle contendo Assay Buffer foi considerado como 0 pg/mL standard (Background).

Foram adicionados 25 μ L de Assay Buffer em todos os poços das amostras, colocados 25 μ L da amostra diluída em cada poço correspondente. Acrescentados 25 μ L de solução com Beads em cada poço. Foi vedada a placa e colocada em agitador para placas, deixando-a em incubação “overnight” por 18 horas. Removido o conteúdo líquido com vácuo e lavado a placa 2 vezes com 200 μ L/poços de solução de lavagem apropriada, removida a solução de lavagem à vácuo. Foram adicionados 25 μ L/poço de detector de anticorpo. Foram vedados e incubados em agitação por 2 h à temperatura ambiente. Acrescentados 25 μ L/poço de Streptavidin-Phycoerythrine incubado por 30 min à temperatura ambiente. Foi removido todo excesso a vácuo, lavada a placa 2 vezes com 200 μ L/poço com líquido de lavagem, filtrado a vácuo em cada lavagem. Foram adicionados 150 μ L/poço de solução contendo no kit denominado “Sheath Fluid”, reconstituindo os “beads” na placa e agitando por 5 min.

A leitura da placa foi realizada na plataforma Luminex 100TM v 2.3 (Bio-Plex) e se baseia na tecnologia de detecção simultânea de múltiplos analitos com pequena quantidade de amostras baseadas na combinação de diferentes conceitos tecnológicos de comprovada resolução, sendo analisada a mediana da intensidade de fluorescência de cada analito usando o método de curva de calibração (parâmetro logarítmico).

Utilizou-se o kit Lincoplex para as dosagens plasmáticas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18, INF- γ , TNF- α e VEGF por imunoensaio Multiplex.

Trata-se de um processo exclusivo de imunoensaio tipo “sanduíche” que cora internamente micro esferas de poliestireno (anticorpos) com dois fluoro cromos espectrais distintos. Cada esfera é conjugada a um anticorpo analito específico e tem um “código de cor” e sua assinatura. O plasma é incubado com as micro esferas e depois se adiciona ao conjunto o anticorpo de detecção biotinilado (conjugado com biotina, uma vitamina com alta afinidade por estreptoavidina, que emite sinal fluorescente). As micro esferas são lidas no equipamento chamado Luminex® através de um sistema duplo de lasers que incide sob as micro esferas à medida que essas fluem pelo fluxo celular (citometria de fluxo). Um feixe de laser detecta a micro esfera (pelo código de cor específico para o ensaio) e o outro quantifica o sinal em cada micro esfera e faz a contagem das variáveis separadamente. O teste tem controle de qualidade e, para cada variável, tem curva controle diferente.

ANEXO H – IMUNOHISTOQUÍMICA

Procedimentos: Sequência do 1º dia: Aqueceram-se as lâminas na estufa (temperatura em torno de 60°C) por 3 h. Primeiro esperou-se a estufa chegar à temperatura desejada para somente então começar a colocar as lâminas, as quais foram postas separadas no xilol. Bateria de hidratação: 3 banhos de xilol à temperatura ambiente por 3 min cada, 2 banhos no álcool a 100% de 5 min cada, 1 banho no álcool 70% de 5 min). Banho em água corrente (10 min). Aplicação da proteinase K por 30min (700µL da solução stock + 175 ml de PBS). Bloqueio da peroxidase endógena (peróxido de hidrogênio a 3% - 180mL de água destilada + 20mL de água oxigenada 30%) 2 banhos de 10 min cada. Lavou-se em PBS por 5 min. Diluição do anticorpo primário (1:200):-12 µL foram diluídos em 2.400 µL de BSA a 5%. O controle negativo recebeu apenas o BSA. Antes de aplicar o anticorpo primário, secaram-se as lâminas com papel de filtro recortados. Foi feita incubação “overnight” com anticorpo primário. Sequência do 2º dia: Retiraram-se as lâminas da geladeira e esperou-se 10 min antes de incubar com o anticorpo secundário. Diluição do anticorpo secundário rabbit santa cruz biotechnology (1:200): 13µL diluídos em 2.600 µL de BSA. O controle negativo também recebeu o anticorpo secundário. Lavado em PBS por 5 min. Foi feita a secagem das lâminas com papel de filtro, aplicação do anticorpo secundário e incubação por 30 min. Preparação do complexo ABC (Immuno Cruz rabbit ABC Staining System: SC-2018): 2,5mL PBS + 50 µLA +50 µLB e deixou-se descansar por 30 min. Lavou-se em PBS por 5 min e fez-se a incubação com o complexo ABC por 30 min. Antes de aplicar o ABC, as lâminas foram secas com papel de filtro. Em seguida, lavadas com PBS por 3 min. Secagem das lâminas para a aplicação do DAB peroxidase, e colocadas sobre papel branco para observar melhor a marcação acastanhada do DAB. Preparação do DAB: retiraram-se 2ml e adicionaram-se 15 µL de água oxigenada 3%, a qual foi adicionada imediatamente antes do uso e preparada com 10µL de água oxigenada + 90 µL de água destilada. A luz foi protegida com papel alumínio. Esse passo não teve tempo estipulado, porém foi monitorado no microscópico. Contra coloração com Metilgreen por 10min + controle negativo: 3 banhos de água destilada, mergulhando 10x no 1º e 2º, seguido de 30 seg sem agitação na 3ª lavagem. 3 trocas de 100% N-Butanol, mergulhando 10x na 1ª e 2ª e deixando 30 seg, sem agitação no 3º banho. Montagem das lâminas- 3 banhos de xilol (2 min cada), retirada do xilol para montagem das lâminas sem deixar secar.

ANEXO I – IMUNOFLUORESCÊNCIA

O procedimento utilizou os reagentes Equilibration Buffer, Working Strenght TdT, Anti-Digoxigenin-Fluorescein e Anti-Digoxigenin-Rhodamine, a enzima de trabalho (TdT) fornecida em um buffer estabilização para preservar a atividade, a qual foi diluída com tampão de reação antes da utilização. Os reagentes foram misturados numa proporção de Tampão de reação de 70% a 30% da enzima TdT em um tubo de microcentrífuga fresco. Este reagente pode ser preparado antecipadamente e guardado em gelo durante não mais do que 6 horas. Além destes reagentes, a enzima digestão proteína ou proteinase K foi utilizada diluindo-se o estoque 200 ug / mL de Proteinase K (N. ° de Catálogo 21627) e 20 ug / mL em PBS imediatamente antes de usar na jarra Coplin. Esse passo foi realizado em um frasco Coplin, adicionando-se 3,9 mL da solução de 200 mg / mL estoque de Proteinase K (N. ° de Catálogo 21627) e 35 mL de PBS suficientes para um volume da diluição apropriada. A quantidade total de 35 mL foi suficiente para tratar (aplicação direta) 5 slides em uma jarra de Coplin. Este reagente pode ser preparado antecipadamente e guardado em um recipiente de vidro ou de plástico a 4 ° C. Usou-se uma nova porção para cada experimento. A solução de anticorpo fluoresceína foi fornecida em um tampão de estabilização para preservar a atividade e teve de ser diluída com solução de bloqueio antes de ser utilizada. Para preparar foi necessário, adicionar em um tubo de microcentrífuga fresco: 68 µL de solução de bloqueio e 62 µL de anti-digoxigenina conjugado perfazendo um total de 130 µL. Misturou-se bem e manteve-se no gelo. Evitou-se a exposição à luz. Este reagente pode ser preparado antecipadamente e guardado em gelo por até 3 horas. Contra coloração nuclear com iodeto de propídio ou DAPI: o Iodeto de propídio (PI) ou DAPI foi usado com fluoresceína (FITC). O brilho do contra corante foi igual ou menor do que a do FITC. A concentração ideal do corante variou no intervalo de 0,5-1 µg / mL em meio de montagem, após preparada foi imediatamente espalhada na lâmina até cobrir toda a área do tecido. Foram utilizadas lamínulas de plástico com a finalidade de espalhar uniformemente os reagentes pela ação da capilaridade sobre uma área definida. Câmara úmida: foi utilizada nos momentos necessários à proteção contra a luz. Tempo Total: o tempo total do protocolo foi cerca de 3,5 h. Desparafinizou-se secção de tecido (em um frasco Coplin): lavou-se a amostra em 3 mudanças de xileno, durante 5 min cada lavagem; lavou-se a amostra com 2 mudanças de etanol absoluto para 5 min cada lavagem; lavou-se a amostra uma vez em etanol a 95% e uma

vez em 70% por 3 min cada lavagem; lavou-se a amostra com uma mudança de PBS durante 5 min. Pré-tratamento de tecido: aplicou-se a solução contendo a enzima recentemente diluída de Proteinase K (20 ug / mL) para a amostra de 15 min, em temperatura ambiente diretamente no slide; lavou-se a amostra com duas mudas de PBS em um frasco Coplin, durante 2 min cada lavagem. Aplicou-se o Tampão de Equilíbrio: bateu-se suavemente para retirar o excesso de líquido e cuidadosamente, aspirou-se ao redor da secção com um papel toalha ou bomba de vácuo; aplicou-se imediatamente 75 uL do tampão de equilíbrio diretamente sobre o espécime; incubou-se durante pelo menos 10 seg à temperatura ambiente. Aplicou-se a solução de trabalho da enzima TdT: bateu-se suavemente para retirar o excesso de líquido e cuidadosamente aspirou-se ao redor da secção com um papel toalha ou bomba de vácuo e imediatamente pipetou-se para a secção de 55µL da solução de trabalho da enzima TdT; incubou-se em uma câmara umidificada a 37 ° C durante 1 h. Aplicou-se o tampão de Parada / Tampão de lavagem: colocou-se a solução de parada de trabalho sobre a amostra, e incubou-se por 10 min, à temperatura ambiente; removeu-se uma alíquota da solução de anti-digoxigenina conjugada dos frascos de estoque; esperou-se descongelar à temperatura ambiente, evitando-se a exposição à luz. Aplicou-se a solução de trabalho anti-digoxigenina: lavou-se a amostra em três lavagens de PBS durante 1 min de cada lavagem; removeu-se o excesso de líquido e cuidadosamente aspirou-se ao redor da secção; aplicou-se a solução de trabalho anti-digoxigenina conjugada no slide e usou-se cerca de 65 µL em cada amostra; incubou-se em câmara úmida durante 30 min à temperatura ambiente. Evitou-se a exposição à luz. Lavou-se a amostra com 4 mudanças de PBS em um frasco Coplin, durante 2 min por lavagem, à temperatura ambiente. Após a contra coloração, montou-se a coloração de fluoresceína: aplicou-se o meio de montagem contendo 0,5-1,0 mg / mL de iodeto de propídio ou DAPI. Utilizaram-se 15 µL em sob uma lamínula de vidro e armazenou-se a -20 ° C no escuro. Para ver Fluoresceína e contra coloração, utilizou-se microscópio adequado de fluorescência com excitação adequada e filtros de emissão.

Interpretação dos resultados - A marcação ocorreu em virtude da incorporação das bases nitrogenadas marcadas no DNA de células que sofreram processo de morte celular devido à desorganização dos núcleos e cromatina.