

ed. Ac. 111693
R. 54000085

IDÁLIA MARIA BRASIL BURLAMAQUI

EFEITO DA DIETA HIPERCALÓRICA E HIPERLIPÍDICA RICA EM GORDURA POLIINSATURADA, ÔMEGA 3 E 9, NA FORMAÇÃO DE CRIPTAS ABERRANTES EM MUCOSA CÓLICA, INDUZIDAS POR AZOXIMETANO EM RATOS

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

Orientador: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues.

1
616.994347
39742
Ex. 1

**FORTALEZA – CEARÁ
2008**

() Burlamaqui, Idália Maria Brasil

Efeito da dieta hipercalórica e hiperlipídica rica em gordura poliinsaturada, ômega 3 e 9, na formação de criptas aberrantes em mucosa cólica, induzidas por azoximetano em ratos / Idália Maria Brasil Burlamaqui. – Fortaleza, 2008.

71f

Orientador: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Cirurgia). Universidade Federal do Ceará. Departamento de Cirurgia.

1. Dieta hipercalórica e hiperlipídica
2. Criptas aberrantes
3. Azoximetano
4. Câncer colorretal. I Rodrigues, Lusmar Veras. II. Título

()

IDÁLIA MARIA BRASIL BURLAMAQUI

EFEITO DA DIETA HIPERCALÓRICA E HIPERLIPÍDICA RICA EM GORDURA POLIINSATURADA, ÔMEGA 3 E 9, NA FORMAÇÃO DE CRIPTAS ABERRANTES EM MUCOSA CÓLICA, INDUZIDAS POR AZOXIMETANO EM RATOS

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

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Rodrigo Dornfeld Escalante
Universidade de Fortaleza- UNIFOR

Prof. Dr. Roberto da Silveira Moraes
Universidade Federal do Paraná - UFPR

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

Guizat

DEDICATÓRIA

Aos meus pais NEWTON e AGNESI,
Pela formação moral, ética e profissional. Cujo amor e carinho,
nunca deixaram de estar presentes.

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 GERALDO CARNEIRO,
Companheiro de todas as horas, principal apoio para a
realização deste trabalho, por sua ajuda, carinho e amor sempre
presentes.

***In Memoriam,* aos meus avós, EDSON, LUIS ALBERTO E
MAGNÓLIA,**
Sei que se sentiriam orgulhosos e felizes ao meu lado neste
momento.

Ao meu neto LUIS ALBERTO e minha nora MAGGY
Pela vibração e apoio nesta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Em especial,

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

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **LUSMAR VERAS RODRIGUES**, Professor Livre-Docente 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. Minha eterna gratidão.

Ao Professor Doutor **PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS**, Professor Associado e Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade em participar como mestranda no Programa, apoio durante o curso, possibilitando a minha titulação.

Ao Professor **RENAN MAGALHÃES MONTENEGRO**, Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, o meu mais sincero agradecimento pela sua confiança, amizade, credibilidade e ensinamentos construtivos que muito me ajudaram.

Ao Doutor **FRANCISCO VAGNALDO FECHINE JAMACARU**, Pesquisador da Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio, orientação, disponibilidade, compromisso e valiosas sugestões que foram decisivas na condução desta pesquisa.

Ao Professor Doutor **JOÃO ARAGÃO XIMENES FILHO**, Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela contribuição na orientação e avaliação estatística dos dados obtidos no estudo. •

Ao Professor Doutor **JOSÉ TELMO VALENÇA JÚNIOR**, Professor Adjunto do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio e colaboração para execução deste trabalho.

À mestra e pesquisadora **CONCEIÇÃO APARECIDA DORNELAS**, pela dedicação, estímulo incansável, apoio incondicional, permanente disponibilidade, amizade, incentivo, competência e valiosos ensinamentos em todas as etapas deste trabalho, sem os quais, certamente este trabalho não teria sido concluído.

Aos Profs. Drs **ROBERTO DA SILVEIRA MORAES** e **RODRIGO DORNFELD ESCALANTE**, pela disponibilidade, contribuição científica e por fazerem parte da minha banca examinadora.

Ao Professor Doutor **RENAN MAGALHÃES MONTENEGRO JUNIOR**, Professor Adjunto do Departamento de Medicina Comunitária da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela colaboração com idéias e críticas, valorizando este trabalho.

Ao Prof Doutor **SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃES**, Professor Associado II do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela contribuição e disponibilidade, sempre presentes.

À nutricionista **MARIA WILMA FERNANDES CARDOSO**, pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos Estudantes de Medicina **FRANCISCO JOSÉ CABRAL MESQUITA, DANIEL MAGALHÃES COUTINHO MOTA, VICTOR JOSÉ TIMBÓ GONDIM, WILHELM MACHADO SILVEIRA E EDUARDO REBOUÇAS CARVALHO** dedicados colaboradores em todas as fases do experimento, com empenho e disciplina contribuindo para 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 permanente disponibilidade, incentivam e tornam menos áridos os caminhos trilhados pelos alunos da pós-graduação.

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 Amigos do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, **DENISE DE ALBUQUERQUE ANDRADE, MARINILA CALDERARO MUNGUBA MACEDO, SIULMARA CRISTINA GALERA**, que durante as dúvidas, dificuldades e incertezas no andamento do projeto, souberam dar apoio e indicar caminhos de forma sincera, tornando o trabalho menos árduo. ■

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 ministraram as disciplinas.

A **TODOS** que contribuíram de forma direta ou indireta, durante todas as etapas na elaboração, desenvolvimento e conclusão deste trabalho os meus agradecimentos sinceros. Obrigada.

Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro ao projeto, aprovado no Edital MCT/CNPq 15/2007 - Universal - Faixa B.

RESUMO

Efeito da dieta hipercalórica e hiperlipídica rica em gordura poliinsaturada, ômega 3 e 9, na formação de criptas aberrantes em mucosa cólica, induzidas por azoximetano em ratos. **IDÁLIA MARIA BRASIL BURLAMAQUI. Pós-Graduação *Stricto Sensu*, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de Mestre em Cirurgia). Novembro, 2008. Orientador: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues.**

O câncer colorretal (CCR) é a quinta neoplasia mais incidente no Brasil e sua frequência vem aumentando em países industrializados. A lesão pré-neoplásica mais precoce com presença de displasia é o foco de cripta aberrante (FCA), estando relacionada como lesão precursora de adenomas colorretais e câncer em humanos. O entendimento destas lesões é fundamental para esclarecer os mecanismos da carcinogênese colorretal e sua prevenção. O objetivo foi verificar se a dieta hipercalórica (DH), hiperlipídica, interfere na formação de criptas aberrantes na mucosa cólica induzida por azoximetano (AOM), em ratos. Foram usados 36 ratos Wistar, machos, com peso médio inicial de 180g a 250g e 8 semanas de idade. Foram distribuídos em 04 grupos com 09 animais cada: GI- Grupo com ratos submetidos à DH e não expostos ao AOM, GII- Grupo com ratos submetidos à dieta padrão (DP) e não expostos ao AOM, GIII- Grupo com ratos submetidos à DH e expostos ao AOM, GIV- Grupo com ratos submetidos à DP e expostos ao AOM. Utilizou-se, a partir da 8ª semana, nos grupos I e III uma dieta hipercalórica (4.250cal/kg), rica em gordura poliinsaturada, relação ω -6: ω -3 = 3:1, acrescida de fibras, minerais e vitaminas. Os grupos II e IV receberam uma dieta padrão (3.000cal/kg). Na 16ª semana, GIII e GIV receberam injeção de AOM 15mg/kg, intraperitoneal (IP), 01 vez por semana, por 02 semanas, enquanto GI e GII receberam solução salina a 0,9%. Foram mortos na 15ª semana após a indução com carcinógeno ou administração IP de solução estéril. Avaliaram-se os animais quanto ao peso, alteração clínica, presença de adenomas, FCA e o número de criptas por foco (multiplicidade) de acordo com a localização cólica (proximal, medial e distal). Os resultados foram submetidos aos testes de análise de variância e estabelecido o nível de 5% ($p < 0,05$) para a rejeição da hipótese de nulidade. Verificou-se que a dieta hipercalórica hiperlipídica promoveu um incremento no peso no grupo III, quando comparado ao grupo IV e não apresentou aumento significativo no número total de FCA nos segmentos médio ($p = 0,985$) e distal ($p = 0,854$). Analisando ambos os grupos em relação à multiplicidade de FCA, não houve predominância da presença de 01 a 04 criptas nos segmentos médio ($p = 0,499$) e distal ($p = 0,244$), como também, de 05 ou mais criptas nos segmentos médio ($p = 0,371$) e distal ($p = 0,820$). Verificando a presença do número total de criptas por foco em toda a mucosa cólica, o teste do qui-quadrado mostrou que o grupo IV apresenta, em proporção, um maior número de focos com 05 ou mais criptas do que o grupo III ($P = 0,043$). Conclui-se que a dieta usada aumenta o peso corporal, porém não interfere na quantidade de FCA, contudo reduz o aparecimento de criptas aberrantes, quando ≥ 5 criptas por foco, no colo de ratos Wistar, induzido por azoximetano.

DESCRITORES: Dieta hipercalórica hiperlipídica, Azoximetano, Câncer colorretal, Criptas aberrantes.

ABSTRACT

Effect of a hypercaloric and hyperlipidic diet, rich in polyunsaturated fat, ω -3 and ω -9, aberrant crypt on formation in colonic mucosa, azoxymethane-induced in rats. **IDÁLIA MARIA BRASIL BURLAMAQUI**. *Stricto Sensu* Pos-Graduation, Department of Surgery, Medical School, Federal University of Ceara, (Degree of Master in Surgery). November, 2008. Advisor: Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues.

Colorectal cancer is the fifth most common type of cancer in Brazil and the incidence is growing in developed countries. The earliest preneoplastic lesion presenting dysplasia is aberrant crypt foci (ACF), a precursor of colorectal adenoma and cancer in humans. Knowledge of ACF formation is crucial to understanding the mechanisms involved in colorectal cancer and their inhibition. The objective of this study was to determine whether a hypercaloric, hyperlipidic diet (HCD) affects azoxymethane (AOM)-induced ACF formation in rat colonic mucosa. Thirty-six 8-week old male Wistar rats weighing 180-250g were distributed into 4 groups of 9 animals each: Group I: HCD without AOM; Group II: normocaloric diet (NCD) without AOM; Group III: HCD and AOM; Group IV: NCD and AOM. From the eighth week onwards the animals in Groups I and III were fed HCD (4,250 cal/kg; rich in polyunsaturated fat; ratio ω 6: ω 3=3:1, with addition of fiber, minerals and vitamins). The animals in Groups II and IV were fed NCD (3,000 cal/kg). At 16 weeks, the animals in Groups III and IV were injected i.p. with 15 mg/kg AOM once a week for 2 weeks, while the animals in Groups I and II received 0.9% physiological saline. At 15 weeks after AOM or saline administration, the animals were euthanized and their weight, clinical changes, adenomas, ACF and number of crypts per focus (multiplicity) according to colon section (proximal, middle or distal) were registered. The findings were submitted to variance analysis and the level of statistical significance was set at 5% ($p < 0.05$). HCD was found to promote weight increase in Group III compared to Group IV. No significant increase in the total number of ACF was observed for the middle and distal segments ($p = 0.985$ and $p = 0.854$, respectively). The multiplicity of foci with 1-4 aberrant crypts was similar for the middle and distal segments ($p = 0.499$ and $p = 0.244$, respectively). The corresponding figures for foci with ≥ 5 aberrant crypts were $p = 0.371$ and $p = 0.820$. The total number of ACF in the colonic mucosa differed significantly between Group IV and Group III ($\chi^2 = 4.091$; $p = 0.043$). It may thus be concluded that HCD promotes weight increase and, while not affecting the total number of ACF, reduces the proportion of foci with ≥ 5 aberrant crypts, thereby indirectly preventing the emergence of preneoplastic lesions in rat colonic mucosa.

Key words: hypercaloric hyperlipidic diet, azoxymethane, colorectal cancer, aberrant crypts.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Modelo de Carcinogênese Cólica.....	21
FIGURA 2 - Progressão histológica da mucosa normal para carcinoma.....	21
FIGURA 3 - Delineamento do experimento.....	27
FIGURA 4 - Azoximetano (15mg/Kg,) IP, 2x semana. Rato 8, GIII.....	28
FIGURA 5 – Alimento Padrão X Alimento Hipercalórico e Hiperlipídico	28
FIGURA 6 - Laparotomia com incisão mediana xifo-púbica. Rato 9, GIII.....	31
FIGURA 7 - Coleta de 5ml de sangue da aorta abdominal. Rato 3, GIV.....	31
FIGURA 8 - Exposição longitudinal do colo aberto em papel “kraft”. Rato 5, GIV.....	32
FIGURA 9 - Espécime em papel “kraft”, após ser dobrada em seu eixo de forma concêntrica. Rato 5, GIV	32
FIGURA 10 - Mucosa cólica ao microscópio estereoscópico com magnificação de 40X. Rato 8, GIV.....	32
FIGURA 11 – Esquema de segmento cólico corado com azul de metileno 0,1 % de acordo com a localização cólica.....	33
FIGURA 12 - Segmento cólico subdividido em fragmentos de 0,5cm. Rato 3, GIII.....	33
FIGURA 13 - Representação gráfica da média de peso (g) dos grupos I e II	35
FIGURA 14 - Representação gráfica da média de peso (g) dos grupos III e IV	36
FIGURA 15 - Focos de criptas aberrantes. Rato 3, GIV.....	37
FIGURA 16 - Média do número total de focos de criptas aberrantes nos segmentos intestinais proximal, médio e distal nos diferentes grupos	38
FIGURA 17 - Média do número total de focos de criptas aberrantes nos grupos III e IV em relação aos segmentos proximal, médio e distal	38
FIGURA 18 - Número total de focos de criptas aberrantes nos grupos III e IV	39
FIGURA 19 - Número total de criptas aberrantes nos grupos III e IV	39
FIGURA 20 - Avaliação da multiplicidade dos focos de cripta, comparando o número de focos de criptas aberrantes com até 04 e com 05 ou mais criptas, no segmento medio, nos grupos III e IV	40
FIGURA 21 - Avaliação da multiplicidade dos focos de cripta, comparando o número de focos de criptas aberrantes com até 04 e com 05 ou mais criptas, no segmento distal, nos grupos III e IV	41

FIGURA 22 - Avaliação da multiplicidade dos focos de cripta, comparando o número de focos de criptas aberrantes com até 04 e com 05 ou mais criptas, em todo o colo, nos grupos III e IV	41
FIGURA 23 – Cripta Aberrante, Rato 5, GIII.....	42
FIGURA 24 – Adenoma Tubular, Rato 7, GIV.....	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição da dieta padrão.....	29
TABELA 2 - Composição da dieta hipercalórica e hiperlipídica	29
TABELA 3 - Perfil Lipídico da Dieta Padrão e da Dieta Hipercalórica e Hiperlipídica	30
TABELA 4 - Relação ω 3, 6 e 9, na Dieta Padrão e da Dieta Hipercalórica e Hiperlipídica.....	30
TABELA 5 - Distribuição do peso (g) no início da dieta, na administração da solução salina, e no final (eutanásia) nos grupos I e II.....	35
TABELA 6 - Distribuição do peso (g) no início da dieta, na administração do azoximetano, e no final (eutanásia) nos grupos III e IV.....	36
TABELA 7 - Média e desvio padrão do número total de foco de cripta aberrante por segmento intestinal em cada grupo.....	37
TABELA 8 - Avaliação da multiplicidade dos focos de criptas, comparando até 04 criptas por foco em relação 05 ou mais criptas por foco nos grupos III e IV.....	40
TABELA 9 - Média, desvio padrão e teste de significância dos exames bioquímicos de GI e GII.....	43
TABELA 10 - Média, desvio padrão e teste de significância dos exames bioquímicos de GIII e GIV.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS / SÍMBOLOS

- AA – Ácido araquidônico
- AHRQ – “Agency for Healthcare Research and Quality”
- ALA – Ácido Alfa-linolênico
- AOM – Azoximetano
- APC – “Adenomatous Polyposis Coli”
- BCAC – “ β -catenin-accumulated crypts”
- CA – Cripta aberrante
- CCR – Câncer Colorretal
- CEPA/UFC - Comitê de Ética de Pesquisas em Animais da UFC
- DCC – “Deleted Colo-rectal Câncer”
- DH – Dieta hipercalórica
- DHA – Ácido Doicosaexaenóico
- DMH – 1,2 dimetilhidrazina
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- DP – Dieta padrão
- EPA – Ácido Eicosapentaenóico
- EUA – Estados Unidos da América
- FCA – Focos de Criptas Aberrantes
- GAMA GT – Gama glutamil transferase
- GI - Grupo com ratos submetidos à DH e não induzidos com AOM
- GII - Grupo com ratos submetidos à DP e não induzidos com AOM
- GIII - Grupo com ratos submetidos à DH e induzidos com AOM
- GIV - Grupo com ratos submetidos à DP e induzidos com AOM
- HC – Hidrato de carbono
- HDL – “High-density Lipoprotein”
- HNPCC - Câncer Colorretal Hereditário Não-Polipóide
- IARC - Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
- IGF-1 – Fator de crescimento insulina-símile
- IP – Intraperitoneal
- LIP – Lipídio
- MCFA – Ácidos graxos de cadeia média

MDF – “Mucin depleted foci”

NF κ B – “Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”

ω -3 – Ômega-3

ω -6 – Ômega-6

ω -9 – Ômega-9

PBS - Solução tamponada fosfatada

PCR – Proteína C reativa

PPAR – “Peroxisome proliferator-activated receptor”

PTN - Proteína

RCBP - Registros de Câncer de Base Populacional

RNA – Ácido ribonucléico

SCFA – Ácidos graxos de cadeia curta

SF – Solução salina (NaCl) a 0,9%

TGO – Transaminase oxalacética

TGP – Transaminase pirúvica

TNF- α – Fator de necrose tumoral

UFC – Universidade Federal do Ceará

UFPR – Universidade Federal do Paraná

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS / SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVO.....	24
3 MÉTODO.....	25
3.1 AMOSTRA.....	25
3.2 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO.....	25
3.3 PROCEDIMENTOS.....	27
4 RESULTADOS.....	35
4.1 ACHADOS CLÍNICOS.....	35
4.2 DISTRIBUIÇÃO DO PESO.....	35
4.3 ACHADOS À MACROSCOPIA	37
4.4 ACHADOS À MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA.....	37
4.4.1 FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES	37
4.4.1.1 CONTAGEM TOTAL DOS FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES.....	37
4.4.1.2 DISTRIBUIÇÃO SEGMENTAR DOS FOCOS.....	38
4.4.1.3 MÉDIA DO NÚMERO TOTAL DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES E DO TOTAL DE CRIPTAS ABERRANTES EM TODOS OS SEGMENTOS.....	39
4.4.1.4 MULTIPLICIDADE DOS FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO COM CARCINÓGENO.....	40
4.5 ACHADOS À MICROSCOPIA ÓTICA.....	42
4.6 ACHADOS LABORATORIAIS.....	42
5 DISCUSSÃO.....	44
6 CONCLUSÃO.....	51
7 REFERÊNCIAS.....	52

APÊNDICES

ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR), uma das neoplasias malignas mais frequentes no ocidente, é considerado a quarta causa mais comum de câncer no mundo (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2005), e a terceira causa de incidência e mortalidade em ambos os sexos nos Estados Unidos da América (MAHAYRI; MOREIRA FILHO, 2002). Em 2007, foi diagnosticado em 153.760 norte-americanos, e aproximadamente 52.180 morreram por esta afecção (JEMAL *et al.*, 2003; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2007). No Brasil, ele representa a quinta neoplasia mais diagnosticada e a quarta causa de óbitos, sendo que cerca de metade dos pacientes morre em menos de cinco anos, após o tratamento (BIN, 2002). Evidências epidemiológicas indicam que essas diferenças são influenciadas fortemente pela área geográfica, cultura e hábitos alimentares (FORTUNATO; TRIGUEIRO; GÓES, 2003; DOMÍNGUEZ; GÓMEZ; LEÓN, 2003).

A incidência do câncer colorretal apresenta padrões bastante diferenciados entre as distintas regiões mundiais, o que sugere uma forte influência de fatores locais (PINHO *et al.*, 2003). Nos Estados Unidos da América, pode haver diferenças, quando se compara população urbana com a rural, imigrantes japoneses com americanos ou imigrantes japoneses com japoneses que vivem no Japão. Os japoneses imigrantes têm menor incidência de CCR em relação aos americanos, no entanto é maior quando comparados àqueles que vivem em sua terra natal (CORMAN, 2002). 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 sócioeconômico (PINHO *et al.*, 2003).

Mais de 90% dos cânceres de colo e reto ocorrem em indivíduos com idade superior a 50 anos, e 75% atingem indivíduos sem outros fatores de risco além da idade (MALLMANN, *et al.*, 2003).

A taxa de sobrevida em 5 anos, no caso de doença localizada, é de 90,5%, mas, para doença metastática, essa taxa fica em torno de 10% (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2007). Mais de 90% dos tumores cólicos são adenocarcinomas, e a maior parte das lesões surge de pólipos adenomatosos. A transformação pólipo-câncer passa por uma seqüência de várias mutações genéticas. Esse processo de transformação geralmente é lento e pode levar

mais de 10 anos. Deste modo, a história natural do câncer propicia condições ideais à sua prevenção e detecção precoces (ARAÚJO; ALVES; HABR-GAMA, 2001).

A etiologia do CCR ainda é desconhecida, porém o aumento na incidência e mortalidade pode estar relacionado com envelhecimento das populações e modificações no estilo de vida, tanto em relação à maior presença do sedentarismo, como utilização de dietas industrializadas. Alguns autores enfatizam que o aumento da prevalência da obesidade nos últimos anos poderá estar relacionado a fatores ambientais, em especial à dieta e à atividade física que, interagindo com fatores genéticos, poderiam explicar o acúmulo de gordura corporal na população, levando a uma epidemia mundial. (WHO, 1998; POPKIN, 1998; HILL, 1998).

No Brasil, as mudanças demográficas, sócioeconômicas e epidemiológicas, ao longo do tempo, permitiram que ocorresse a denominada transição nos padrões nutricionais, com a diminuição progressiva da desnutrição e o aumento da obesidade, tornando-se um problema de saúde pública (MONTEIRO *et al.*, 1995; FRANCISCHI; PEREIRA; LANCHA JÚNIOR, 2001). As conseqüências da obesidade são muitas e variam do risco aumentado de morte prematura a graves doenças que afetam diretamente a qualidade de vida, como dislipidemia, hipertensão arterial, diabetes melito tipo II e vários tipos de câncer, dentre eles, o colorretal (DEFRONZO; FERRANNINI, 1991). Atualmente, existe a hipótese de que a hiperinsulinemia, ou fatores associados à resistência à insulina, tais como obesidade, hiperglicemia ou hipertrigliceridemia, podem ter um papel na carcinogênese colorretal (McKEOWN-EYSSEN, 1994).

Estudos epidemiológicos realizados na década de 70 mostraram que a obesidade contribui para o aumento da incidência e/ou mortalidade por câncer de colo, mama, endométrio, rim, esôfago, estômago, pâncreas, vesícula biliar e fígado. Atualmente, acredita-se que a obesidade seja a causa de 15% a 20% de todos os cânceres nos Estados Unidos da América, constituindo-se no principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer em indivíduos não fumantes (CALLE; KAAKS, 2004).

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) realizou uma extensa revisão com base em estudo epidemiológico e concluiu que evitar o aumento de peso reduz o risco de desenvolver câncer de colo, mama, endométrio, rim e esôfago. Esse estudo foi realizado em indivíduos com sobrepeso e obesos, comparados a magros. (IARC, 2002).

Os mecanismos que relacionam a obesidade com o risco aumentado de desenvolver câncer envolvem os efeitos endócrinos e metabólicos da obesidade e as conseqüentes alterações que eles induzem na produção de peptídeos e hormônios esteróides.

Neste contexto, destacam-se a hiperinsulinemia crônica, alteração na secreção de hormônios esteróides sexuais e esteatohepatite não-alcóolica (CALLE; KAAKS, 2004).

A associação entre obesidade e câncer é clara, uma vez que o excesso de insulina promove o crescimento de tumores. Os efeitos da hiperinsulinemia podem ser mediados diretamente nos receptores de insulina das células pré-neoplásicas e neoplásicas, estimulando o seu crescimento. Conseqüentemente, indivíduos muito acima do peso apresentam risco aumentado de contrair câncer. Outro mecanismo comum é a resistência à insulina, ocasionando uma inflamação crônica subclínica com o aumento de citocinas inflamatórias, as quais atuam como agente promotor do crescimento tumoral (CARVALHEIRA; SAAD, 2006).

A ocorrência de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no colo e reto está associada com a biotransformação, bem como à ativação ou detoxicação de produtos químicos exógenos ingeridos na dieta. O entendimento destas relações torna-se fundamental para o esclarecimento dos mecanismos da carcinogênese colorretal e de sua prevenção (MORI *et al.*, 2004).

Alguns componentes da dieta são conhecidos como moduladores do desenvolvimento de tumores em modelos experimentais. Estudos epidemiológicos demonstraram que uma ingesta alta em folato, micronutriente abundante em vegetais e frutas, reduz o risco de CCR. Dietas ricas em gorduras saturadas e carnes vermelhas aumentam a produção de ácidos biliares, os quais podem causar a proliferação do epitélio colorretal e promover a formação de tumores. O cálcio apresenta um efeito protetor, porque age diretamente nas células epiteliais do colo, diminuindo sua proliferação, e também se liga aos ácidos biliares e gordurosos do lúmen intestinal, inibindo a carcinogênese (PASI; MAYER, 2000).

A relação entre o risco do desenvolvimento de CCR e hábitos dietéticos é importante. Pesquisas sugerem que dieta rica em fibras reduz o risco desta afecção. Os mecanismos de ação das fibras, especialmente as fermentáveis envolvem eventos físicos, tais como alteração do tempo de trânsito intestinal, diluição do bolo fecal, aderência física ou química a agentes mutagênicos e efeitos secundários (geração de produtos da fermentação bacteriana, especialmente ácidos graxos de cadeia curta, e alteração do pH luminal) (CAMPOS *et al.*, 2005; WEICKERT; PFEIFFER, 2008).

Em países ocidentais, o consumo excessivo de calorias (gorduras saturadas e carboidratos refinados) é fortemente relacionado com altos índices de CCR. Os mecanismos incriminados são: aumento do tempo de trânsito intestinal, aumento das concentrações de

ácidos biliares fecais, aumento da proliferação epitelial, hiperinsulinemia e o desenvolvimento da resistência à insulina. As altas concentrações de insulina sérica circulante apresentam ação mitogênica para colonócitos, proliferação celular e apoptose, além de aumentar a biodisponibilidade do fator de crescimento insulina-símile (IGF-1), promotor de proliferação celular (GIOVANNUCI, 2002).

Em países com alta incidência de CCR, o teor de gorduras da dieta representa cerca de 40% do total de calorias, em contraste com regiões de baixa incidência onde este teor é de apenas 15% a 20%. Evidências sugerem que dietas gordurosas parecem estar associadas ao CCR, no entanto esta correlação não depende somente da quantidade, como também da composição de ácidos graxos específicos (CAMPOS *et al.*, 2005).

Existem três importantes famílias de ácidos graxos insaturados, cuja nomenclatura refere-se à posição da primeira dupla ligação, a partir do terminal metil da cadeia carbônica: ômega 3 (ω -3), ômega 6 (ω -6) e ômega 9 (ω -9).

Os principais ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) da família ω -3 são: ácido α -linolênico (α -LNA, 18:3 ω -3), ácido eicosapentanóico (EPA, 20:5 ω -3), e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22: 6 ω -3). O organismo humano não consegue sintetizar o ácido α -linolênico e o ácido linoléico (18:2 ω -6) em virtude da ausência das enzimas delta-15 e delta-12 dessaturases, que são capazes de inserir duplas ligações no terceiro e sexto carbono, respectivamente, contados a partir do terminal metil. Dessa maneira, é necessário obtê-los através da dieta para manter um pool adequado no organismo, sendo denominados como ácidos graxos “essenciais”.

A proporção de ω -6 e ω -3 na dieta é importante, embora ainda não se tenha determinado uma relação ótima. Ao longo do tempo tem ocorrido um aumento da ingestão de gordura e substituição dos ácidos graxos alimentares com maior consumo do ω -6 em relação ao ω -3 (BARTSCH; NAIR; OWEN, 1999). A Organização Mundial da Saúde (2003), em seu relatório sobre dieta, nutrição e prevenção de doenças crônicas recomenda uma ingestão de 5% a 8% das calorias totais provenientes do ω -6, enquanto 1% a 2% do ω -3.

Muitos estudos têm demonstrado que os ácidos graxos ω -3, especialmente o EPA e o DHA desempenham um papel protetor no desenvolvimento do câncer colorretal, enquanto os ácidos da série ω -6 promovem carcinogênese. Os estudos experimentais têm contribuído para a compreensão dos mecanismos de ação dos ácidos graxos ω -3 no CCR e as evidências indicam que podem modular a formação dos eicosanóides e influenciar a expressão de genes, moléculas transdutoras de sinais e a atividade de enzimas. Os PPARs

("peroxisome proliferator activating receptors") são receptores nucleares ativados por substâncias lipofílicas como ácidos graxos, esteróides, vitaminas A e D, eicosanóides e drogas. O EPA oxidado é um agonista do PPAR α e γ com ação hipolipêmica e antiinflamatória por inibir o NF κ B. Conseqüentemente, os ácidos graxos ω -3 podem afetar a proliferação e diferenciação celular, apoptose e angiogênese (ROYNETTE *et al.*, 2004).

Atualmente a relação entre ácidos graxos ômega 6 (ω -6)/ ômega 3 (ω -3) deve ser modulada em 2.5:1, para inibir a proliferação celular (efeito antiinflamatório) e promover a apoptose de células cancerígenas. A distorção desta relação interfere na patogênese de doenças cardio-vasculares, câncer, doenças inflamatórias e imunológicas. Em países ocidentais, onde o consumo de ω -3 é deficiente, esta relação varia de 15:1 a 20:1 e a incidência de CCR vem aumentando de forma alarmante (CAMPOS, 2007).

Pesquisas mostram o efeito preventivo dos flavonóides e de outras substâncias, como o chá verde, com atividade biológica, incluindo propriedades anti-oxidantes e anti-inflamatórias na carcinogênese cólica (FORMICA; REGELSON, 1995; TANAKA; KOHNO; MORI, 2001).

A carcinogênese é um processo dinâmico, envolvendo uma gama de alterações celular, molecular e morfológica, 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).

O processo de carcinogênese química pode ser dividido em quatro etapas: iniciação, promoção, progressão e manifestação, sendo esta última diferente das demais, pois se refere à manifestação clínica do câncer (MURAD, 1996).

A iniciação corresponde à interação de uma substância (carcinógeno) com o DNA da célula alvo, levando, após um ciclo de divisão celular, a dano permanente e irreversível, que se caracteriza por alteração do material genético (mutação), resultando em mudanças no genoma, o que leva a um crescimento seletivo das células. Nesta etapa, não há alterações fenotípicas evidentes (MURAD, 1996).

A promoção caracteriza-se pela expressão fenotípica da mutação induzida na iniciação. A célula modificada prolifera sem controle do crescimento como resultado das alterações genéticas sofridas na etapa anterior. Desta forma, os agentes promotores estimulam a proliferação celular, o que resulta em expansão clonal das células iniciadas (WARGOVICH; PUREWAL, 1995). A expansão clonal de uma população de células é geralmente denominada lesão pré-neoplásica (BIRD; GOOD, 2000).

Na progressão, a neoplasia maligna é expressa fenotipicamente, caracterizando-se pela instabilidade do genoma. As alterações estruturais do genoma verificadas nesta fase estão diretamente relacionadas à taxa elevada de proliferação, à invasividade, à capacidade de produzir metástases e a determinadas alterações bioquímicas (BIRD, 1995).

Dentre os modelos propostos para carcinogênese colorretal, a progressão histológica da mucosa normal para adenomas de fase precoce foi sugerida no modelo de Fearon e Vogelstein em 1990. Estes autores demonstraram que o surgimento de tumores colorretais é o resultado de um acúmulo seqüencial de quatro a cinco mutações distintas correspondendo a um estágio diferente na seqüência adenoma-carcinoma. Neste modelo ocorrem mutações do gene APC (*adenomatous polyposis coli*), ativação da proteína k-ras e mutação das proteínas DCC e p53 (FEARON; VOGELSTEIN, 1990). (Figuras 1 e 2)

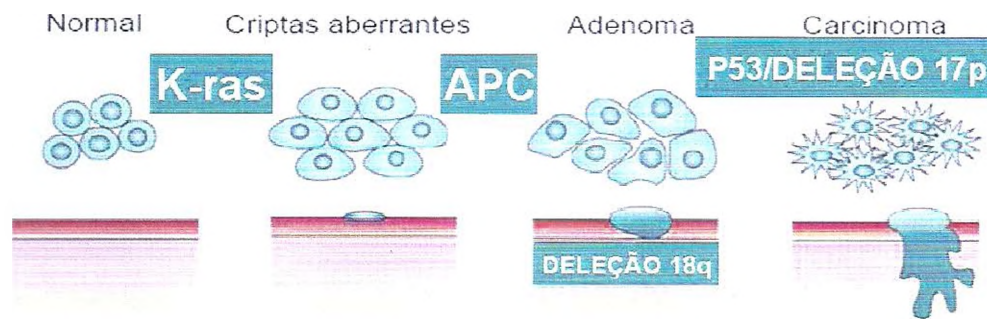


FIGURA 1 – Modelo de carcinogênese cólica

MUCOSA NORMAL → ADENOMA → CARCINOMA

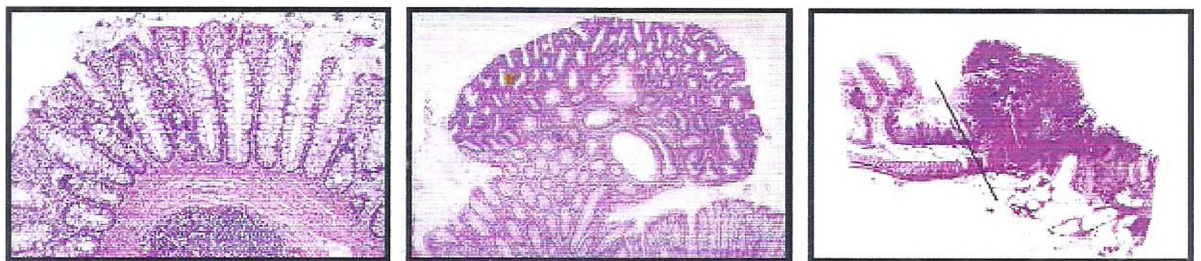


FIGURA 2 - Progressão histológica da mucosa normal para carcinoma.

Um outro modelo descrito são os encontrados em pacientes portadores de câncer colorretal hereditário não-polipóide (HNPCC). Estes apresentam mutações nos genes reparadores de defeitos de replicação de DNA (“mismatch repair genes”), conhecidos como hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 e hMSH6. Existem evidências de que além dos pacientes portadores de HNPCC, cerca de 15% dos carcinomas colorretais esporádicos são formados a partir deste mesmo caminho (ROSSI; PINHO, 1999). Apesar das duas vias descritas para explicar a carcinogênese colorretal, alguns autores descrevem que carcinomas colorretais podem também se desenvolver a partir de áreas de mucosa desprovidas de alterações macroscópicas prévias compatíveis com adenomas, conhecidos como carcinomas “de novo”. Essas áreas foram estudadas, e identificou-se mucosa colorretal com discreta elevação acompanhada de coloração avermelhada e, ocasionalmente, contendo uma depressão central compatível histologicamente com adenoma tubular, apresentando atipias significativas denominadas adenomas planos. Atribui-se a existência de uma transmissão familiar como síndrome do adenoma plano hereditário, embora com índice de malignização elevado, ainda existem controvérsias quanto a sua real incidência e importância na carcinogênese colorretal. Evidências sugerem mutações relacionadas ao gene APC em portadores desta síndrome, mas não são capazes de explicar esse processo de carcinogênese “de novo” em bases de biologia molecular (MUTO; KAMIYA; LANSPA, 1985; LYNCH; SMYRK; LANSPA, 1988).

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 dos processos displásicos em humanos e em modelos animais (FEMIA; DOLARA; CADERNI, 2004).

A lesão pré-neoplásica mais precoce com presença de displasia é o foco de cripta aberrante (FCA); esta alteração está relacionada como lesão precursora de adenomas colorretais e câncer em humanos (CUMMINGS, 2000; RONCUCCI *et al.*, 2000; TAKAYAMA *et al.*, 2001; ADLER *et al.*, 2002).

Focos de criptas aberrantes (FCA), inicialmente identificados na mucosa colorretal de roedores expostos à ação de substâncias carcinogênicas (BIRD, 1987), foram também reconhecidos e identificados em humanos (PRETLOW *et al.*, 1991) e desde então considerados como um marcador biológico confiável de lesões pré-cancerosas ou pré-neoplásicas do intestino grosso (MORI *et al.*, 2004).

Os 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 *et al.*, 1992). Os FCA aumentam com os indutores carcinogênicos em mucosa

cólica de hamsters e camundongos, mas são praticamente evidenciados no colo de todos os animais expostos a carcinógenos específicos (PRETLOW *et al.*, 1991).

A 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e o azoximetano (AOM) são agentes carcinogênicos que induzem câncer cólico em roedores, em um processo de múltiplos passos, caracterizado pela formação sequencial de lesões histopatológicas similares àquelas observadas na carcinogênese espontânea em humanos (CADERNI *et al.*, 2003). O AOM é um metabólito da 1,2-dimetilhidrazina, cujo mecanismo de indução de lesões pré-neoplásicas é atribuído ao aumento da expressão do gene c-fos e à diminuição do gene c-myc, assim como à mutação do gene k-ras. (STOPERA; DAVIE; BIRD, 1992).

Recentemente, identificaram-se novos marcadores biológicos específicos para carcinogênese cólica, em roedores tratados com AOM ou DMH, denominados “mucin depleted foci” (MDF) ou foco depletado de mucina, caracterizada pela formação de criptas com ausência ou escassez na produção de muco. Segundo alguns autores, esta lesão mostra claramente características displásicas nos cortes histológicos (CADERNI *et al.*, 2003; FEMIA; DOLARA; CADERNI, 2004) e “ β -catenin-accumulated crypts” (BCAC) ou criptas com acúmulo de β -catenina; o acúmulo desta proteína no núcleo e/ou citoplasma abriga mutações genéticas freqüentes, tendo um importante papel na carcinogênese (YAMADA *et al.*, 2000; YAMADA *et al.*, 2001; HIROSE *et al.*, 2003; HATA *et al.*, 2004).

O AOM é ativado metabolicamente no fígado, 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 é geralmente preferido em relação à DMH por ser mais potente, baseado na sua molaridade e pelo realce na estabilidade química das soluções (PAPANIKOLAOU *et al.*, 1998).

Neste contexto, torna-se essencial o desenvolvimento de modelos experimentais que permitam o estudo da carcinogênese, favorecendo a identificação de fatores de risco que auxiliem na detecção precoce do câncer e de estratégias preventivas.

Sabe-se que a obesidade e dietas hipercalóricas constituem fatores de risco no aparecimento do câncer colorretal, portanto faz-se necessário um estudo para verificar se uma dieta hipercalórica e hiperlipídica, rica em gordura poliinsaturada (ômega 3 e 9), interfere no desenvolvimento do câncer colorretal, em modelo de carcinogênese induzida pelo AOM, em ratos Wistar.

2 OBJETIVO

Verificar se uma dieta hipercalórica e hiperlipídica, rica em gordura poliinsaturada (ômega 3 e 9), interfere na formação de focos de criptas aberrantes induzidos por azoximetano na mucosa cólica de ratos Wistar.

3 MÉTODO

A pesquisa foi realizada após avaliação do Comitê de Ética de Pesquisas em Animais da Universidade Federal do Ceará (CEPA/UFC) sob número de protocolo 11/06 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 (Anexo A).

3.1 Amostra

Foram utilizados 36 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Mammalia Rodentia*, *Muridae*) da linhagem Wistar, machos, adultos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, com 8 semanas de vida e peso entre 180 e 250g. Os animais foram mantidos no laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará e separados individualmente em gaiolas de polipropileno com tampa de arame galvanizado com zinco, forradas com maravalhas. Permaneceram alojados sob umidade relativa do ar em torno de 50%, e temperatura média de 25° C, iluminação com turno de 12h claro/escuro e ventilação mantida por ventiladores axiais. Receberam água e ração *ad libitum*. Durante o período de adaptação, todos os animais foram previamente tratados com anti-helmíntico de uso veterinário, 1ml/Kg de peso do animal (Basken®- Pamoato de Pirantel e Pamoato de Oxantel).

3.2 Delineamento do experimento

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos contendo 9 animais cada, identificados e pesados previamente, e foram denominados:

GRUPO I - (GI): Grupo estudo com ratos que receberam dieta hipercalórica e hiperlipídica e não expostos ao azoximetano – Com 8 semanas de vida, foram separados individualmente e colocados em gaiolas. Foi administrada dieta hipercalórica e hiperlipídica, composta de 15g de dieta padrão + 20g de Nutri Diabetic® + 5ml de óleo de canola,

perfazendo um total de 4250kcal/kg. Com 16 semanas (4 meses), receberam injeção de 1,0ml de solução salina 0,9% estéril (SF), intraperitoneal (IP), 1 vez por semana por 2 semanas (15^a e 16^a semanas) e continuaram recebendo a dieta citada até os dias estabelecidos para a eutanásia. Os animais foram mortos na 31^a semana do experimento (15 semanas após a administração de salina).

GRUPO II – (GII): Grupo controle com ratos que receberam dieta padrão e não expostos ao azoximetano – Os animais, desde o desmame, foram alimentados com dieta padrão, da Biobase Bio-tec Ratos e Camundongos®, com 3000kcal/kg, e com 8 semanas de vida, foram separados e cada animal colocado em uma gaiola. Com 16 semanas, receberam injeção de 1.0ml de solução salina 0,9% estéril (SF), intraperitoneal (IP), 1 vez por semana por 2 semanas (15^a e 16^a semanas) e continuaram recebendo a dieta citada até os dias estabelecidos para a eutanásia. Os animais foram mortos na 31^a semana do experimento (15 semanas após a administração de salina).

GRUPO III – (GIII): Grupo estudo com ratos que receberam dieta hipercalórica e hiperlipídica e expostos ao azoximetano – Com 8 semanas de vida, foram separados e cada animal colocado em uma gaiola. Foi administrada dieta hipercalórica e hiperlipídica, composta de 15g de dieta padrão + 20g de Nutri Diabetic® + 5ml de óleo de canola, perfazendo um total de 4250kcal/kg. Com 16 semanas, receberam injeção de azoximetano na dose de 15mg/kg, intraperitoneal (IP), 1 vez por semana por 2 semanas (15^a e 16^a semanas) e continuaram recebendo a dieta citada até os dias estabelecidos para a eutanásia. Os animais foram mortos na 31^a semana do experimento (15 semanas após a indução com o carcinógeno).

GRUPO IV – (G IV): Grupo controle com ratos que receberam dieta padrão e expostos ao azoximetano - Os animais, desde o desmame, foram alimentados com dieta padrão, da Biobase Bio-tec Ratos e Camundongos®, com 3000kcal/kg, e com 8 semanas de vida, foram separados individualmente em gaiola. Com 16 semanas, receberam injeção de azoximetano na dose de 15mg/kg, intraperitoneal (IP), 1 vez por semana por 2 semanas (15^a e 16^a semanas) e continuaram recebendo a dieta citada até os dias estabelecidos para a eutanásia. Os animais foram mortos na 31^a semana do experimento (15 semanas após a indução com o carcinógeno). (Figura 3)

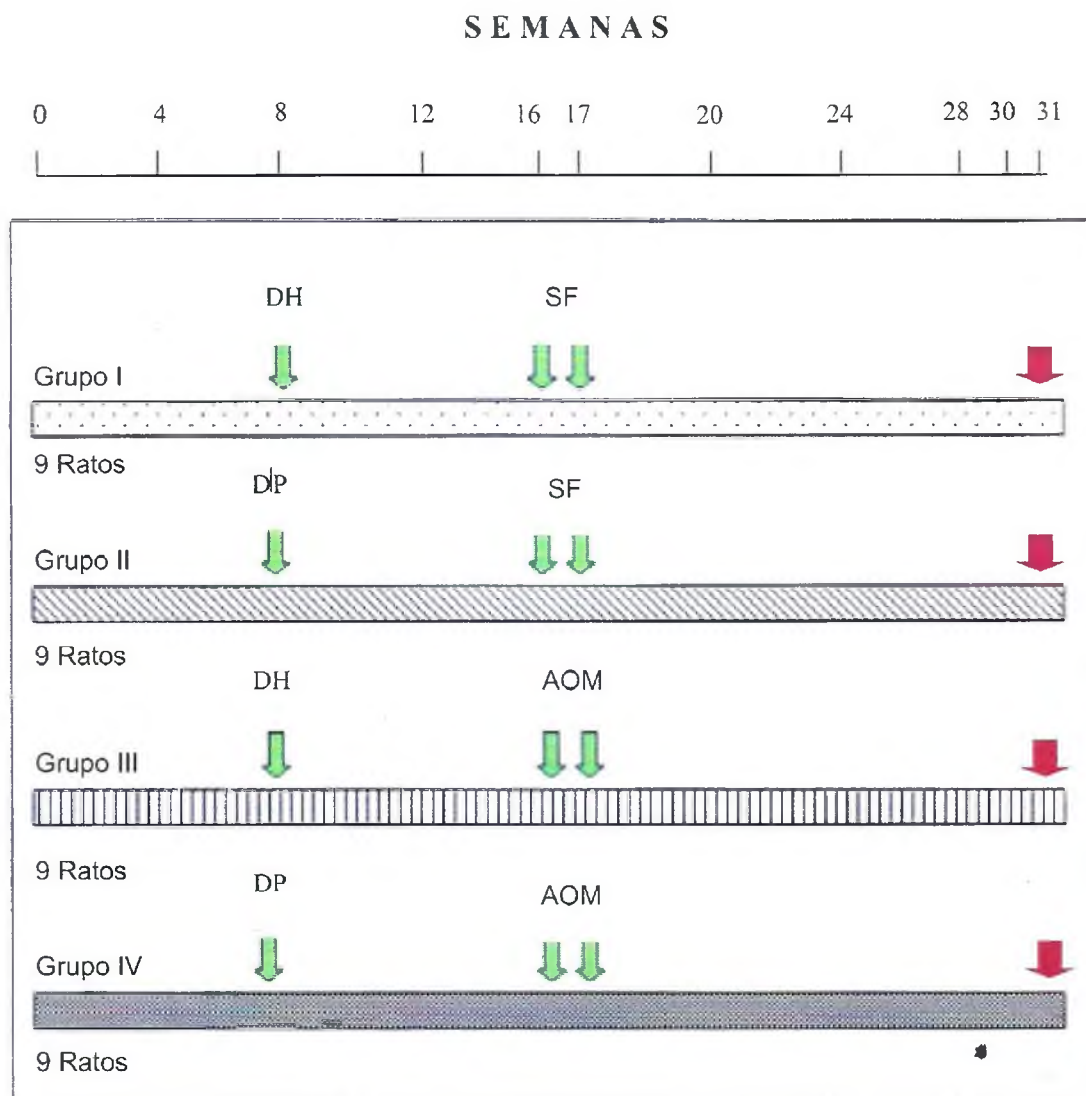


FIGURA 3 – Delineamento do experimento: Grupo I - Dieta Hipercalórica e Hiperlipídica (DH) + Solução Salina (SF) a 0,9%; Grupo II - Dieta Padrão (DP) + Solução Salina (SF) a 0,9%; Grupo III - Dieta Hipercalórica e Hiperlipídica (DH) + Exposição ao Azoximetano (AOM) 15mg/kg; Grupo IV - Dieta Padrão (DP) + Exposição ao Azoximetano (AOM) 15mg/kg ↓ ; Eutanásia ↑

3.3 Procedimentos

- Carcinógeno

O Azoximetano (Wako Chemicals USA) foi adquirido na apresentação de frasco-ampola (100mg) e diluído em água para injeção estéril, a fim de obter a dose de 15mg/kg de peso do animal, sendo administrado por via intraperitoneal uma vez por semana por duas semanas (Figura 4).



FIGURA 4 - AOM (15mg/Kg,) IP, 2x semana. Rato 8, GIII.

- Pesagem dos animais

Todos os animais foram pesados duas vezes por semana até o dia determinado para a eutanásia. Este procedimento foi realizado por um único examinador, que utilizou a mesma balança (balança analítica Ohaus AS 2600).

- Alimentação

Os animais alimentaram-se das dietas hipercalórica e hiperlipídica, padrão e água “*ad libidum*” (Figura 5 e Tabelas 1 e 2).



FIGURA 5 – Alimento Padrão X Alimento Hipercalórico e Hiperlipídico
(3.000 Kcal /Kg) (4.250 Kcal/Kg)

TABELA 1 – Composição da dieta padrão (Biobase Bio-tec®): normoglicídica, hiperprotéica e hipolipídica.

ALIMENTO	QUANT.(g)	KCAL	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)
Biobase Bio-tec®	40	120	17,6	8,8	1,6
TOTAL	40	120	17,6	8,8	1,6
Distrib.Total Calorias			70,4	35,2	14,4
Calorias (%)			58,66%	29,34%	12,00%

TABELA 2 – Composição da dieta hipercalórica e hiperlipídica: normoprotéica, hiperlipídica e hipoglicídica.

ALIMENTO	QUANT.(g)	KCAL	CHO (g)	PTN (g)	LIP (g)
Biobase Bio-tec®	15	45	6,6	3,3	0,6
Nutri Diabetic®	20	80	11	3,2	2,6
Óleo de Canola	5	45	0	0	5
TOTAL	40	170	16,6	6,5	8,2
Distrib.Total Calorias			70,4	26	73,8
Calorias (%)			41,36%	15,28%	43,36%

TABELA 3 – Perfil Lipídico da Dieta Padrão e da Dieta Hipercalórica e Hiperlipídica.

Gordura	Dieta Padrão	Dieta Hipercalórica Hiperlipídica
Poliinsaturada	54%	19%
Monosaturada	24%	29%
Saturada	15%	6%

TABELA 4 – Relação entre ômega 3, 6 e 9, na Dieta Padrão e da Dieta Hipercalórica e Hiperlipídica.

	Dieta Padrão	Dieta Hipercalórica Hiperlipídica
$\omega 6:\omega 3$	8 : 1	3 : 1
$\omega 9:\omega 6$	0,4 : 1	1,5 : 1
Poli:Sat	5,2 : 1	7,6 : 1
	> 60% de $\omega 6$	> 50% de $\omega 9$

- Avaliação clínica

Os animais foram avaliados do ponto de vista clínico diariamente. Foram observadas mudanças no peso (2 vezes por semana), comportamento (reatividade, imobilidade), contrações involuntárias, respiração, diarreia, anorexia, piloereção, queda de pêlos e ulcerações.

- Procedimento operatório

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 a laparotomia por incisão mediana xifo-púbiana com exposição da cavidade abdominal (Figura 6). Inicialmente, realizou-se coleta de 5ml de sangue da aorta abdominal para análise bioquímica (Figura 7). Posteriormente, realizou-se a proctocolectomia. Esse segmento foi medido e pesado. A peça foi aberta na borda anti-mesocólica, lavada com solução salina e distendida sobre uma superfície plana para avaliação macroscópica. Os animais foram mortos por choque hipovolêmico após secção da aorta abdominal.

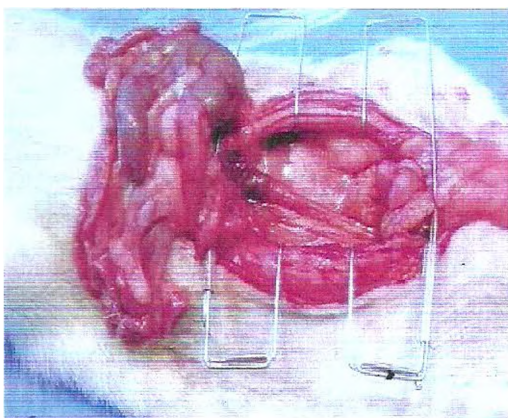


FIGURA 6 - Laparotomia com incisão mediana xifo-púbica. Rato 9, GIII.

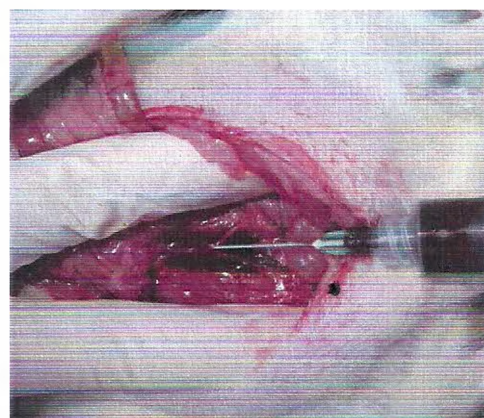


FIGURA 7 - Coleta de 5ml de sangue da aorta abdominal. Rato 3, GIV.

- Avaliação macroscópica

Após a remoção do colo, este foi aberto longitudinalmente na borda anti-mesocólica e lavado com solução salina. O mesmo foi cuidadosamente estendido em papel tipo "kraft", tendo sido avaliada a presença de adenomas ou tumores cólicos (Figura 8).

Posteriormente, o colo foi dobrado em seu eixo de forma concêntrica, no intuito de reduzir a presença de pregas na mucosa cólica, o que interferiria na visualização das criptas. O material foi submerso em solução de formalina a 10% para fixação (Figura 9).

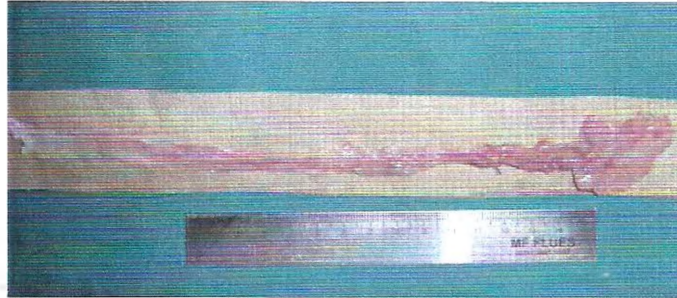


FIGURA 8 - Exposição longitudinal do colo aberto em papel "kraft". Rato 5, GIV.

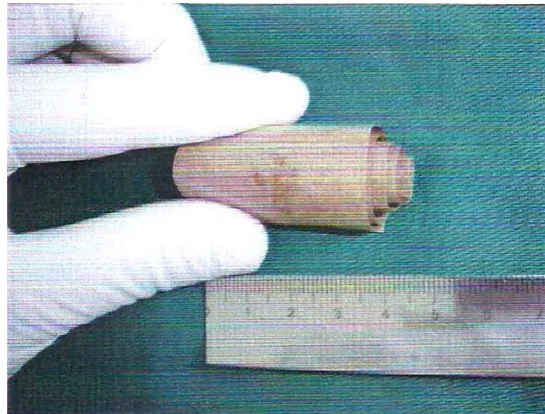


FIGURA 9 - Espécime em papel "kraft", após ser dobrada em seu eixo de forma concêntrica. Rato 5, GIV.

- Avaliação microscópica

Os focos de cripta aberrante foram quantificados de acordo com Bird (1987). A peça foi corada com azul de metileno a 0,1% em PBS (solução tamponada fosfatada) por 2 min previamente à contagem (Figura 10). A mucosa cólica foi avaliada por dois examinadores utilizando-se do microscópio estereoscópico (M90 VASCONCELLOS da DF VASCONCELLOS S.A.) com magnificação de 40X.



FIGURA 10 - Mucosa cólica ao microscópio estereoscópico com magnificação de 40X. Rato 8 GIV

O número de focos de cripta aberrante e o número de criptas por cada foco (multiplicidade) foram avaliados de forma contínua de acordo com a localização cólica. O colo, após desprezar-se 1 cm proximal ao ânus, foi dividido em três segmentos iguais: distal, médio e proximal (região cecal) (Figura 11).

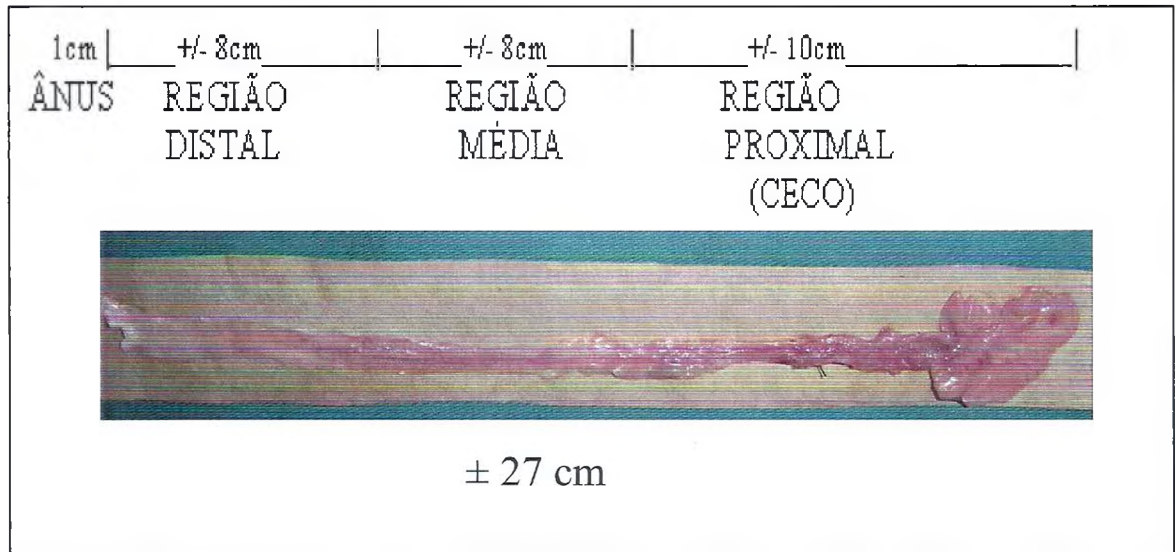


FIGURA 11 – Esquema de segmento cólico corado com azul de metileno 0,1 % de acordo com a localização.

Cada segmento cólico foi subdividido em fragmentos de 0,5cm e encaminhado para o laboratório de Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para rotina de cortes histológicos e coloração pela Hematoxilina-Eosina (Figura 12).



FIGURA 12 - Segmento cólico subdividido em fragmentos de 0,5cm. Rato 3, GIII.

- Avaliação bioquímica

No dia da eutanásia, os animais foram avaliados através das dosagens séricas de glicose, proteína C reativa (PCR), transaminase oxalacética (TGO), transaminase pirúvica (TGP), gama-glutamil-transferase (gama-GT), triglicerídeos, colesterol total, “High-density Lipoprotein” (HDL) e ácido úrico. A glicose foi dosada utilizando fitas reativas, “One Touch Ultra®”, usando 1 gota de sangue fresco colhido da cauda do animal. Todos os outros marcadores foram analisados pelo equipamento modular P 800/ ROCHE HITACHI e pelos seguintes métodos de análise: TGO e TGP – cinético; ácido úrico - cinético enzimático; gama-GT, triglicerídeos e colesterol total - calorimétrico enzimático; HDL – enzimático; PCR - imunoturbidimetria.

- Avaliação estatística

A análise estatística foi realizada com o software estatístico SPSS v16.0 “for Windows”. Realizou-se a análise descritiva das diversas variáveis, utilizando-se a média como medida de tendência central e o desvio padrão como medida de dispersão. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para verificar a normalidade da distribuição dos pesos e dos números de focos de criptas aberrantes nos diversos grupos.

Foi utilizado o teste t de Student para comparação da média de peso entre dois grupos de ratos quando os mesmos apresentavam distribuição normal. Na análise de 3 ou mais amostras emparelhadas com distribuição normal, utilizou-se o teste ANOVA para medidas repetidas. Esse teste foi utilizado para a avaliação da média do número de focos de criptas nos segmentos intestinais em cada grupo de ratos. No caso de 3 ou mais amostras emparelhadas que não apresentavam distribuição normal, foi utilizado o teste ANOVA de Friedman. Realizou-se o teste Kruskal-Wallis para a análise de 3 ou mais amostras não-emparelhadas que não apresentavam distribuição normal, sendo utilizado para comparação do número de focos de criptas nos diversos grupos em cada segmento intestinal. O teste de comparações múltiplas foi realizado quando necessário, e utilizou-se o teste de Scheffé na presença de homogeneidade de variâncias e o teste de Tamhane nos casos de ausência da mesma. O teste do qui-quadrado foi empregado para testar a homogeneidade dos grupos III e IV em relação à multiplicidade de focos de criptas.

Estabeleceu-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para rejeição da hipótese de nulidade, assinalando com asterisco os valores significantes.

4 RESULTADOS

Foram realizados estudos comparativos entre os grupos em relação ao peso, achados clínicos, macroscópicos e microscópicos, quantificando focos de cripta aberrante e sua multiplicidade.

4.1 Achados Clínicos

Não foram observadas mudanças espontâneas no comportamento dos animais (reatividade, imobilidade), contrações involuntárias, piloereção, ptose ou alterações na respiração.

4.2 Distribuição do peso

TABELA 5 - Distribuição do peso (em gramas) dos grupos I e II no início da dieta, com 2 meses, na administração do SF com 4 meses e no final (eutanásia) com 8 meses

Grupos	n	Média do Peso (g) \pm Desvio Padrão		
		Inicial	Administração de SF	Final
I	9	203,4 \pm 17,0	363,2 \pm 27,6*	431,6 \pm 20,1 [#]
II	9	200,8 \pm 11,1	335,6 \pm 15,2	385,0 \pm 16,4

* O grupo I apresentou maior média de peso do que o grupo II no momento da indução $P=0,022$

[#] O grupo I apresentou maior média de peso do que o grupo II no fim do experimento $P=0,000$

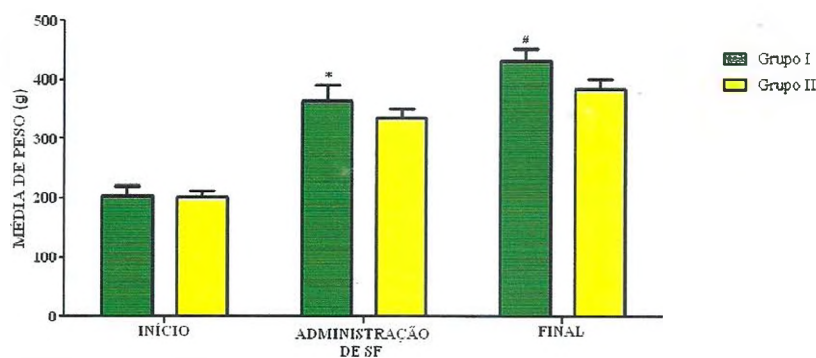


FIGURA 13 - Média de peso (g) dos grupos I e II durante as diversas fases do estudo

O grupo I recebeu dieta hipercalórica e hiperlipídica enquanto o grupo II foi alimentado com dieta padrão.

Realizou-se o teste t de student para amostras independentes e constatou-se que o grupo I apresentou maior média de peso do que o grupo II no momento da administração do SF $P=0,022$ e no fim do experimento $P=0,000$. No início do experimento não houve diferença significativa na média de peso entre os grupos $P=0,711$.

TABELA 6 - Distribuição do peso (em gramas) dos grupos III e IV no início da dieta com 2 meses, na indução com AOM com 4 meses e no final (eutanásia) com 8 meses

Grupos	n	Média do Peso (g) \pm Desvio Padrão		
		Inicial	Indução (AOM/SF)	Final
III	9	245,7 \pm 19,9	391,5 \pm 44,4	468,8 \pm 58,8*
IV	9	253,0 \pm 16,6	368,6 \pm 20,9	417,1 \pm 26,2

O grupo III apresentou maior média de peso do que o grupo IV no fim do experimento $P=0,028$

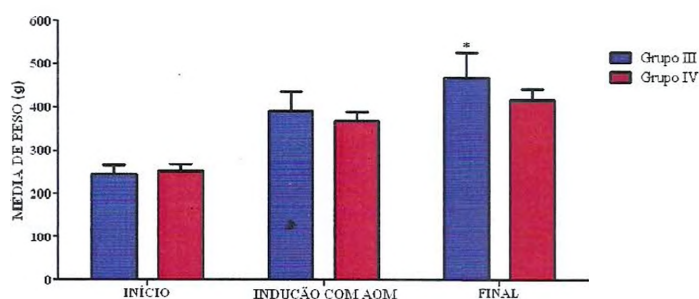


FIGURA 14 - Média de peso (g) dos grupos III e IV durante as diversas fases do estudo

Ambos os grupos foram expostos ao AOM, sendo que o grupo III recebeu dieta hipercalórica e hiperlipídica, enquanto que o grupo IV, a dieta padrão.

Utilizando-se o teste t, verificou-se que o grupo III apresentou maior média de peso, com diferença significativa, no fim do experimento $P=0,028$. No início do experimento $P=0,417$ e no momento da indução com AOM $P=0,181$, não houve diferença significativa na média de peso.

4.3 Achados à macroscopia

Não foram observadas lesões polipóides em quaisquer segmentos da mucosa cólica.

4.4 Achados à microscopia estereoscópica

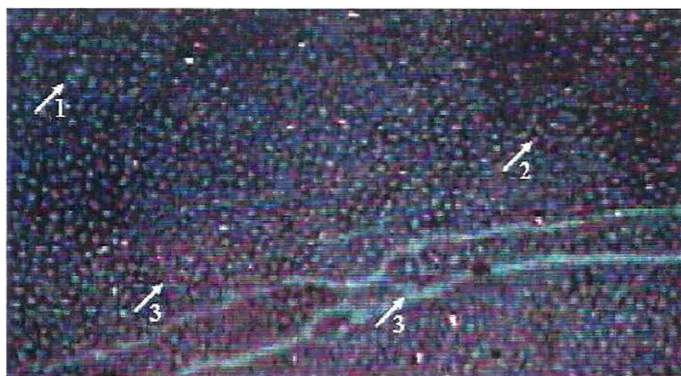


FIGURA 15 - Focos de criptas aberrantes (setas indicam – FCA com 1, 2 e 3 criptas aberrantes). Rato 3, GIV.

4.4.1 Focos de criptas aberrantes

4.4.1.1 Contagem total dos focos de criptas aberrantes:

TABELA 7 - Média e desvio padrão do número total de FCA por segmento intestinal em cada grupo

	Segmentos Intestinais		
	Proximal	Médio	Distal
Grupo I	0	0	0,22 ± 0,44
Grupo II	0,67 ± 1,32	0	0,22 ± 0,66
Grupo III	2,22 ± 2,63	47,78 ± 20,45 *	42,44 ± 14,4 #
Grupo IV	0,33 ± 1	57,44 ± 27,5 •	33,22 ± 19,63 † ∂

* O grupo III apresentou diferença significativa $P=0,000$ entre os segmentos proximal e médio

O grupo III apresentou diferença significativa $P=0,000$ entre os segmentos proximal e distal

• O grupo IV apresentou diferença significativa $P=0,000$ entre os segmentos proximal e médio

† O grupo IV apresentou diferença significativa $P=0,006$ entre os segmentos proximal e distal

∂ O grupo IV apresentou diferença significativa $P=0,048$ entre os segmentos médio e distal

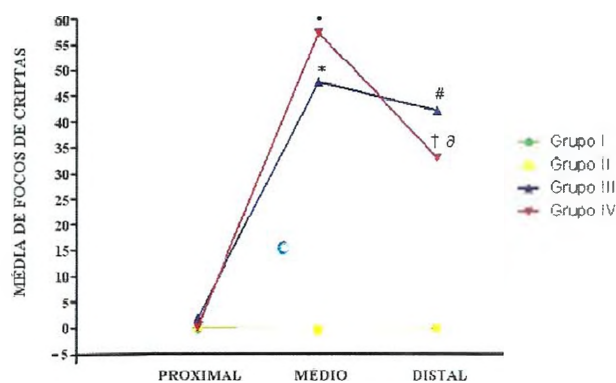


FIGURA 16 - Média do número total de FCA nos segmentos intestinais proximal, médio e distal nos diferentes grupos.

- * O grupo III apresentou diferença significativa $P=0,000$ entre os segmentos proximal e médio.
- # O grupo III apresentou diferença significativa $P=0,000$ entre os segmentos proximal e distal.
- O grupo IV apresentou diferença significativa $P=0,000$ entre os segmentos proximal e médio.
- † O grupo IV apresentou diferença significativa $P=0,006$ entre os segmentos proximal e distal.
- ∂ O grupo IV apresentou diferença significativa $P=0,048$ entre os segmentos médio e distal.

4.4.1.2 Distribuição segmentar dos focos:

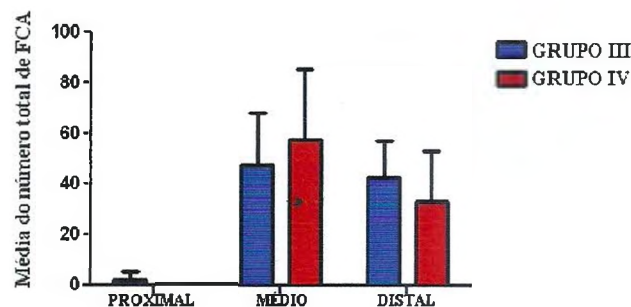


FIGURA 17 - Média do número total de FCA nos grupos III e IV em relação aos segmentos proximal, médio e distal.

Não há diferença significativa entre os grupos III e IV em relação ao número médio de FCA no segmento proximal $P=0,359$.

Não há diferença significativa entre os grupos III e IV em relação ao número médio de FCA no segmento médio $P=0,985$.

Não há diferença significativa entre os grupos III e IV em relação ao número médio de FCA no segmento distal $P=0,854$.

4.4.1.3. Média do número total de focos de cripta aberrante (NTFCA) e do total de criptas aberrantes (NTCA) em todos os segmentos.

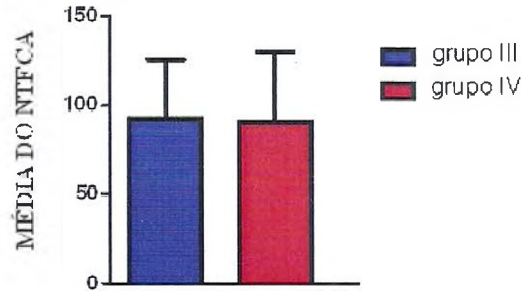


FIGURA 18 – Média do número total de focos de criptas aberrantes (NTFCA).

O NTFCA no grupo III variou de 37 a 144, com média de 92,44 e desvio padrão de 33,38.
 O NTFCA no grupo IV variou de 44 a 167, com média de 91,00 com desvio padrão de 38,47.
 Não há diferença significativa no valor médio de NTFCA nos dois grupos $P= 0,933$.

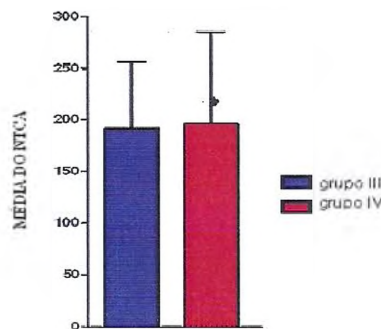


FIGURA 19 – Média do número total de criptas aberrantes (NTCA).

O NTCA no grupo III variou de 76 a 291, com média de 191,44 com desvio padrão de 64,76.
 O NTCA no grupo IV variou de 89 a 363, com média de 196,44 com desvio padrão de 89,04.
 Não há diferença significativa na média do NTCA nos grupos III e IV. $P=0,893$.

4.4.1.4 Multiplicidade dos focos de criptas aberrantes entre os grupos de estudo com carcinógeno

TABELA 8 - Avaliação da multiplicidade dos focos de cripta, comparando o número de FCA com até 04 criptas em relação ao número de FCA com 05 ou mais criptas nos grupos III e IV

Número de Criptas por Foco	Grupo III	Grupo IV	TOTAL
Até 04 criptas	792	762	1554
05 ou mais criptas	40 (4,81%)	60 (7,30%)*	100
Total	832	822	1644

Teste do qui-quadrado com correção de Yates mostra que grupo IV apresenta, em proporção, um maior número de focos com 5 ou mais criptas do que o grupo III ($\chi^2_{cc} = 4,091$ e $P = 0,043^*$)

Não foi possível realizar o teste do qui-quadrado no segmento proximal nos grupos III e IV, por que não foi encontrado foco com 5 ou mais criptas.

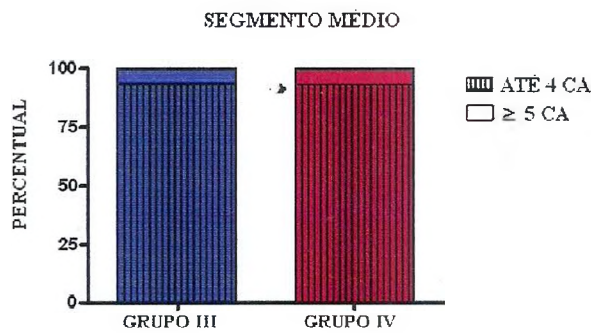


FIGURA 20 - Avaliação da multiplicidade dos focos de cripta, comparando o número de FCA com até 04 criptas ($P=0,499$) em relação ao número de FCA com 05 ou mais criptas ($P=0,371$) no segmento médio, nos grupos III e IV.

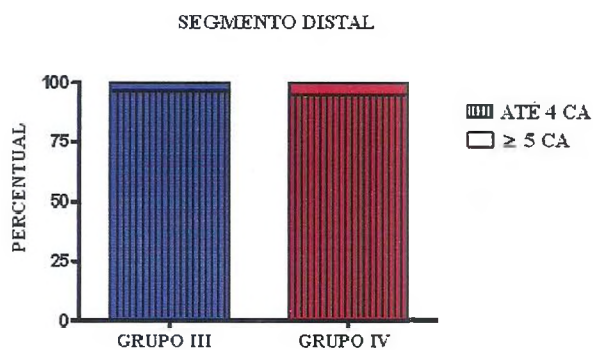


FIGURA 21 - Avaliação da multiplicidade dos focos de cripta, comparando o número de FCA com até 04 criptas ($P=0,244$) em relação ao número de FCA com 05 ou mais criptas ($P=0,820$) no segmento distal, nos grupos III e IV.

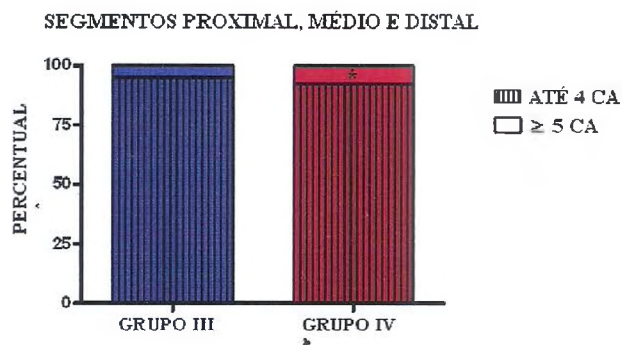


FIGURA 22 - Avaliação da multiplicidade dos focos de cripta, comparando o número de FCA com até 04 criptas em relação ao número de FCA com 05 ou mais criptas nos grupos III e IV. ($P=0,043$)

Constatou-se que a proporção de focos com 5 ou mais criptas aberrantes no Grupo IV (7,30%) foi significativamente maior ($P = 0,043$) que no Grupo III (4,81%) (Teste do qui-quadrado com correção de Yates).

4.5 Achados à microscopia óptica

Na análise histopatológica pela hematoxilina e eosina dos grupos III e IV foram observadas várias criptas aberrantes hiperplásicas e exuberante quantidade de tecido linfóide (Figura 23). No grupo III, observaram-se 2 pólipos adenomatosos (Figura 24).

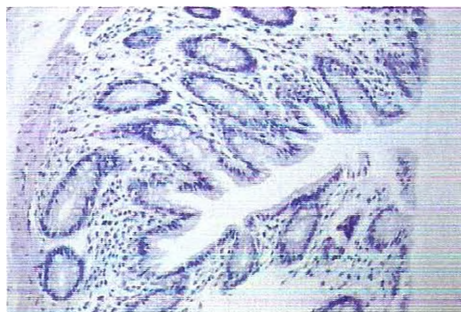


FIGURA 23 – Cripta Aberrante, Rato 5, GIII.

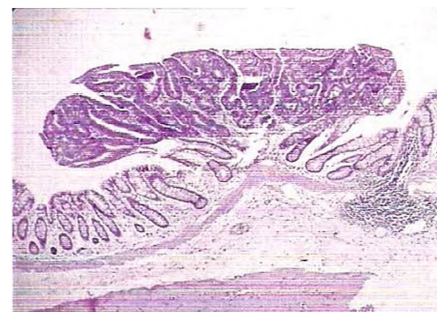


FIGURA 24 – Adenoma tubular, Rato 7, GIV.

4.6 Achados laboratoriais

A média dos valores de triglicérides, colesterol total e HDL foi maior no grupo II em relação ao grupo I, com diferença significativa $P=0,039$; $P=0,015$; $P=0,005$, respectivamente.

A média dos valores de colesterol total e de HDL foi maior no grupo IV em relação ao grupo III, com diferença significativa $P= 0,001$ e $P= 0,004$, respectivamente.

Os ratos de todos os grupos apresentaram valores de PCR < 0,5 mg/dL e Gama-GT < 3 U/L.

TABELA 9 - Média, desvio padrão e teste de significância dos exames bioquímicos de GI e GII.

Exames Laboratoriais	Grupo I Média ± Desvio padrão	Grupo II Média ± Desvio padrão	valor p
ÁCIDO ÚRICO (mg/dL)	1,15 ± 0,36	1,39 ± 0,36	0,165
TGO (U/L)	66,64 ± 19,1	87,54 ± 35,27	0,129
TGP (U/L)	33,36 ± 11,71	42,31 ± 12,39	0,117
TRIGLICERÍDEOS (mg/dL)	59,44 ± 18,1	80,09 ± 22,36	0,039*
COLESTEROL TOTAL (mg/dL)	53,44 ± 8,12	70,91 ± 18,08	0,015*
HDL (mg/dL)	48,22 ± 7,25	62,55 ± 11,75	0,005*

* Representa valor de significância menor que 5% ($P < 0,05$)

TABELA 10 - Média, desvio padrão e teste de significância dos exames bioquímicos de GIII e GIV

Exames Laboratoriais	Grupo III Média ± Desvio padrão	Grupo IV Média ± Desvio padrão	valor p
GLICEMIA (mg/dL)	90,42 ± 9,97	78,45 ± 9,09	0,007*
ÁCIDO ÚRICO (mg/dL)	0,9 ± 0,71	0,818 ± 1,04	0,832
TGO (U/L)	95,09 ± 69,14	80 ± 12,82	0,485
TGP (U/L)	41,49 ± 13,25	41,37 ± 6,29	0,979
TRIGLICERÍDEOS (mg/dL)	57,45 ± 24,38	74,45 ± 36,19	0,211
COLESTEROL TOTAL (mg/dL)	55,91 ± 7,24	71,82 ± 11,19	0,001*
HDL (mg/dL)	53,27 ± 5,71	64,55 ± 9,92	0,004*

* Representa valor de significância menor que 5% ($P < 0,05$)

5 DISCUSSÃO

A lesão pré-neoplásica da mucosa cólica pode ser caracterizada por alterações morfológicas e histoquímicas. O foco de cripta aberrante (FCA) tem sido implicado como a lesão pré-neoplásica mais precoce, estando relacionada como lesão precursora de adenomas colorretais e câncer em humanos (BIRD, 1995; ADLER; DOLARA; CADERNI, 2002).

Inicialmente descritas por Bird (1987), em experimentos com colos de roedores corados com azul de metileno e tratados com carcinógenos específicos, as criptas aberrantes revelam-se com uma tonalidade mais escura que as criptas normais e encontram-se aumentadas de tamanho, isoladas ou em grupos de duas ou mais criptas formando os FCA. A morfologia da cripta aberrante é variada, podendo ser arredondada, fusiforme ou côncava e são mais largas que as criptas adjacentes. Apresentam como características serem induzidas por agente carcinogênico específico de modo dose-dependente e são vistas na mucosa cólica precocemente, de 2 a 4 semanas após a dose de iniciação. A ocorrência espontânea de FCA em ratos tem uma frequência baixa. Cada FCA evolui de uma cripta alterada e exibe características pré-neoplásicas (displasia, padrão proliferativo anormal, mutação k-ras). O tamanho e multiplicidade das criptas aumentam com o tempo e características como crescimento e número predizem o desfecho tumoral (BIRD; GOOD, 2000).

Considerando a relevância da doença neoplásica e a importância das propostas preventivas, assim como a necessidade de entender o surgimento destas lesões precoces na carcinogênese colorretal, surgiram vários modelos experimentais (FEARON; VOGELSTEIN, 1990; BIRD, 1995). O uso de modelos animais apresenta-se como oportunidade para o estudo biológico da doença e para testes de hipóteses ligadas a fatores ambientais na etiologia e prevenção do CCR (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; ANDRADE, 2007).

O desenvolvimento de estratégias para quimioprevenção do câncer colorretal tem sido facilitado pelos relevantes modelos em animais de experimentação, que mimetizam os processos neoplásicos que ocorrem em humanos, incluindo similaridades na histopatologia e nas lesões moleculares e genéticas, durante os estágios iniciais de promoção e manutenção da carcinogênese (REDDY, 2004).

Pesquisas que envolveram formação de FCA por carcinógenos químicos se mostraram adequadas utilizando várias espécies de roedores (hamsters, ratos e camundongos). O rato foi escolhido para este estudo por ser de baixo custo, fácil obtenção e

manutenção, pequeno porte e elevada resistência à infecção e ao trauma, adequando-se assim às condições da pesquisa (MORI *et al.*, 2005; MARTINEZ-FERRER *et al.*, 2006).

A escolha do modelo de formação de cripta aberrante por azoximetano foi pela sua simplicidade, reprodutibilidade e fácil aplicação aos animais de pequeno porte, sendo amplamente utilizado em pesquisas experimentais (BIRD, 1987; BIRD, 1995; BIRD; GOOD, 2000; MORI *et al.*, 2005; MARTÍNEZ-FERRER *et al.*, 2006). Nas lesões induzidas por AOM, mutações k-ras são freqüentes de modo semelhante ao câncer em humanos, enquanto mutações *Apc* e *p53* são raramente observadas (CADERNI *et al.*, 1997; BIRD; GOOD, 2000).

Estudos com azoximetano em ratos têm mostrado que determinadas substâncias naturais ou sintéticas podem influir de modo decisivo no aparecimento de lesões pré-neoplásicas, diminuindo ou abolindo suas manifestações. Estas substâncias devem combinar benefícios clínicos com mínima toxicidade. A história natural do câncer colorretal, desde as criptas aberrantes displásicas até adenomas e adenocarcinomas, oferece múltiplas oportunidades para avaliar e intervir (REDDY, 2004).

O CCR ocupa papel de destaque por apresentar distribuição universal e incidência crescente, principalmente nos países desenvolvidos e industrializados; sofre a influência do estilo de vida e de hábitos alimentares em populações de diferentes culturas (CAMPOS, 2007).

Investigações sobre a ação dos componentes de uma dieta, através da seleção de substâncias tóxicas e não-tóxicas, consistem no primeiro passo para a quimioprevenção. Muitos carcinógenos estão presentes nos alimentos diários. Os efeitos desses agentes, moduladores da carcinogênese do colo, devem ser cuidadosamente estudados e identificados para obter um significativo impacto na redução da mortalidade do CCR (TANAKA; KOHNO; MORI, 2001).

Há uma grande variedade de agentes cancerígenos presentes nos alimentos, os quais foram identificados no desenvolvimento do câncer de colo em animais. Isto sugere que o CCR em humanos pode ser consequência da diversificação do padrão alimentar, uma vez que determinadas substâncias presentes na dieta, como gorduras saturadas e ácidos graxos ω -6 que favorecem o aparecimento de displasia nas criptas da mucosa cólica e promovem a carcinogênese. Por outro lado, dietas ricas em gordura poliinsaturada, ácidos graxos ômega 3 (ω -3) e 9 (ω -9), fibras insolúveis, algumas vitaminas (D, A, C, E e β -caroteno), minerais (cálcio, selênio) e anti-oxidantes (folatos, flavonóides) podem reduzir a sua incidência (TANAKA; KOHNO; MORI, 2001). Estima-se que 80% dos casos de CCR têm relação

causal com fatores ambientais, principalmente aqueles relacionados à dieta (HIGGINSON, 1993).

Gordura saturada correspondente a mais de 20% das calorias ingeridas resulta em um elevado risco para câncer e a ingestão aumentada de açúcar refinado predispõe ao aparecimento de adenomas (MACQUART-MOULIN; RIBOLI; CORNÉE, 1987).

A dieta rica em carboidrato refinado (sacarose e dextrina) promoveu o desenvolvimento de FCA, aumentando o número de lesões pré-neoplásicas em ratos iniciados com AOM (KRISTIANSEN; THORUP; MEYER, 1995; THORUP; MEYER; KRISTIANSEN, 1995).

A ingestão de fibras insolúveis e cálcio parecem proteger contra CCR, segundo alguns estudos (BURKITT, 1971; STEMMERMANN; NOMURA; CHYYOU, 1990).

A obesidade está relacionada a um risco aumentado de desenvolver câncer em vários órgãos, inclusive o colorretal. O mecanismo fisiopatológico envolvido é a hiperinsulinemia agindo diretamente nos receptores de insulina presentes nas células pré-neoplásicas, estimulando, assim, o seu crescimento. A resistência à insulina, secundária à hiperinsulinemia, gera uma inflamação crônica subclínica com o aumento de algumas interleucinas, prostaglandinas e várias citocinas, destacando-se o TNF α , por ser um importante agente promotor do crescimento tumoral, contribuindo, também, para o surgimento do câncer (CARVALHEIRA; SAAD, 2006).

Carvalho (2006) verificou essa associação entre resistência à insulina (hiperinsulinemia) e a maior propensão ao desenvolvimento de CCR em experimento com dois grupos de camundongos. Os dois grupos receberam injeções de azoximetano; um deles consumiu uma dieta hipercalórica, rica em gordura saturada e o outro recebeu uma dieta balanceada e normocalórica. No final, o grupo que se alimentou com a dieta hipercalórica mostrou-se 50% mais susceptível a desenvolver tumores, os quais eram 1,5 vezes maiores.

Um outro estudo comparou a mortalidade de quase 8 mil obesos submetidos à gastroplastia redutora, passando a comer com moderação, com outros 8 mil que não foram operados. No primeiro grupo, a mortalidade caiu 92% por diabetes e 60% por câncer (ADAMS *et al.*, 2007).

Na presente pesquisa, foi utilizado azoximetano na dose de 15 mg/kg, administrado por via IP, com intervalo de 1 semana entre as 2 administrações. A dose de 15 mg/kg teve como base os trabalhos de Bird (1987) e Boateng *et al.*, (2006) que utilizaram entre 10 mg/kg a 20 mg/kg do carcinógeno, com efetiva produção de FCA. A utilização de 2 administrações baseia-se em Bird (1995), que questionou sobre o efeito de uma ou múltiplas

administrações na indução da carcinogênese cólica e no aspecto dos FCA. Verificou-se que múltiplas exposições do colo incrementaram a incidência de tumores e sua multiplicidade.

O tempo do experimento utilizado neste estudo foi de 31 semanas. Os grupos foram submetidos às diferentes dietas a partir da 8ª semana e, na 16ª, foi administrado SF aos grupos I e II e AOM aos grupos III e IV. Após 15 semanas da iniciação, os animais foram mortos para avaliação. Optou-se pelo modelo de Bird (1995) devido à facilidade de realização, ao desenvolvimento rápido das lesões de FCA (2 a 4 semanas após a indução com carcinógeno) e ao pequeno número de animais envolvidos nos testes de modulação de efeitos químicos e/ou dietéticos para carcinogênese (CADERNI *et al.*, 1997).

No presente estudo, utilizou-se nos grupos I e III uma dieta hipercalórica (4.250 kcal/kg), hiperlipídica, rica em gordura poliinsaturada, relação ω -6: ω -3 = 3:1, ω -9: ω -6 = 1,5:1, poli : sat = 7,6:1, acrescida de fibras, minerais e vitaminas (Tabelas 2 e 4). Os grupos II e IV receberam uma dieta padrão, normocalórica (3.000 kcal/kg) da Biobase Bio-tec Ratos e Camundongos¹ relação ω -6: ω -3 = 8:1, ω -9: ω -6 = 0,4:1, poli : sat = 5,2:1 (Tabelas 1 e 4). A dieta hipercalórica e hiperlipídica empregada se assemelha à dieta do Mediterrâneo (rica em ácidos graxos ω -3, mais de 50% em ω -9 e limitada em gordura saturada), isenta de toxicidade e eficaz na proteção do risco cardiovascular, figurando como uma opção atraente nas estratégias de prevenção e tratamento do câncer ou na melhora da qualidade de vida em pacientes com metástases ou em tratamento com quimioterapia. (Tabelas 3 e 4)

A “Agency of Healthcare Research and Quality” (AHRQ) estudou os efeitos dos ácidos graxos ω -3 no câncer e concluiu que uma dieta enriquecida com ω -3 parece ter um papel favorável inibindo a proliferação de células cancerígenas e promovendo apoptose em alguns modelos animais. Verificou-se também que o consumo aumentado de EPA e DHA diminui a ocorrência e a progressão de tumores em colo, mamas e próstata. Porém, em humanos, poucos estudos têm demonstrado uma significativa associação entre ácidos graxos ω -3 e a incidência de câncer (AHRQ, 2005).

Recente estudo associou uma manipulação nutricional rica em ácidos graxos ω -3 à radio e quimioterapia e observou efeito preventivo no CCR, pois reduziu a angiogênese, inflamação e indução de metástase (DUPERTIUS; MEGUID; PICHARD, 2007).

¹ ®BaseQuímica Produtos Químicos Ltda

Calviello, Serini e Piccioni (2007) verificaram que ácidos graxos poliinsaturados ω -3 apresentam atividade anti-neoplásica por inibir proliferação celular e apoptose, dificultando o desenvolvimento e a progressão do CCR.

Liang *et al.* (2008) mostraram que a suplementação parenteral de ácidos graxos ω -3 no pós-operatório de pacientes com CCR diminuiu a magnitude da resposta inflamatória e modulou a resposta imune.

Neste trabalho a média dos valores de triglicerídeos, colesterol total e HDL foi menor nos grupos que se alimentaram da dieta hipercalórica e hiperlipídica. O efeito positivo da dieta rica em ácidos graxos ω -3 na redução dos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol total também foi constatado em outros trabalhos, tanto em animais quanto em humanos (AGUILERA *et al.*, 2004; ROBERT, 2005). Os ácidos ω -3 podem inibir a atividade da diacilglicerol aciltransferase, enzima catalisadora na síntese de triglicerídeos (RUSTAN *et al.*, 1988). Foi demonstrado que ratos alimentados com ω -3 apresentaram menor concentração sérica de colesterol total devido ao aumento na excreção de colesterol pela bile.

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína produzida no fígado, sendo sua concentração no soro um marcador não específico de inflamação. Helzlsouer *et al.* (2006) encontraram uma associação entre o nível de PCR e o desenvolvimento do câncer de colo em humanos, acumulando evidências de que a inflamação está envolvida na etiologia do câncer de colo. Os animais de todos os grupos apresentaram valores de PCR < 0,5 mg/dL, mas o esperado seria a PCR maior no grupo mais pesado, onde está presente mais inflamação, porém o efeito antiinflamatório dos ácidos graxos ω -3 predominou e não se verificou alteração deste marcador.

Os resultados referentes à evolução ponderal dos animais mostraram um ganho de peso em todos os grupos, uma vez que se tratavam de animais adultos jovens (a partir de 02 meses de idade) e que normalmente ganham peso até por volta do 6º mês de vida. A média da evolução ponderal teve diferença significativa nos grupos I(DH) e III (DH + AOM) quando comparada à dos grupos II (DP) e IV(DP + AOM) no meio da avaliação (iniciação com AOM) e no final do experimento (eutanásia). Deste modo, pode-se inferir que o AOM nas doses empregadas não interferiu na ingestão alimentar destes animais e, conseqüentemente, no peso corporal final. A média da avaliação ponderal também teve diferença significativa entre os grupos I (DH) e II (DP) e entre os grupos III (DH + AOM) e IV (DP + AOM), confirmando que a dieta utilizada no experimento promoveu aumento de peso. Os ratos do grupo III apresentam peso significativo maior que os do grupo IV (Tabelas

5 e 6), mas não se verificou um aumento do número de FCA, apesar de os resultados na literatura mostrarem que a obesidade é fator de risco para vários tipos de câncer, inclusive para o CCR. Verificou-se no presente estudo que a dieta hipercalórica e hiperlipídica, rica em gordura poliinsaturada, promoveu um incremento no peso no grupo III, quando comparado ao grupo IV e não apresentou aumento significativo no número total de FCA nos segmentos médio ($P = 0,985$) e distal ($P = 0,854$), como também no número total de FCA e no total de criptas em toda a mucosa cólica, entre os grupos ($P = 0,933$ e $P = 0,893$ respectivamente).

Provavelmente a dieta empregada rica em ácidos graxos ω -3 que é constituída pelos ácidos Alfa-linolênico (ALA), Eicosapentaenóico (EPA) e Doicosahexaenóico (DHA), os quais são poliinsaturados com ações antiinflamatórias e imunorreguladoras, pelo seu efeito inibitório do NF κ B, e o EPA, quando oxidado, é um agonista do PPAR α e γ com efeito hipolipidêmico.

Como a proporção de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares determina o tipo dos eicosanóides gerados, a redução de ácido araquidônico (AA) e da relação de AA/EPA leva à formação dos eicosanóides, derivados do EPA e suprime a formação dos eicosanóides derivados do AA, como a prostaglandina E2 (PGE2). Os eicosanóides derivados do EPA estão associados a um aumento da apoptose e redução do crescimento tumoral e são menos reativos que os eicosanóides pró-inflamatórios derivados do AA (ROYNETTE *et al.*, 2004). A PGE2 pode promover a carcinogênese através da inibição da apoptose e indução da proliferação celular e da angiogênese (LEAHY *et al.*, 2002; PAI *et al.*, 2003).

Tem sido demonstrado que os ácidos graxos ω -3 e ω -6 possuem efeitos regulatórios opostos das proteínas k-ras (DAVIDSON, *et al.*, 1999), Bcl-2 (LLOR, *et al.*, 2003) e Bax (CHENG *et al.*, 2003) envolvidas na regulação da proliferação celular e apoptose, além de efeitos na atividade da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (ROYNETTE *et al.*, 2004). A iNOS possui correlação positiva com a expressão da COX-2 e com a angiogênese (CIANCHI *et al.*, 2003; CIANCHI *et al.*, 2004). A ativação de iNOS com excesso na produção de óxido nítrico pode ainda, inibir a atividade das enzimas de reparo do DNA e modular a atividade das caspases e da p53 (JAISWAL *et al.*, 2000). O DHA pode reduzir a expressão da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) *in vitro* (NARAYANAN *et al.*, 2003).

Em diversos estudos em humanos e em animais, os FCA foram identificados mais freqüentemente no colo distal, sendo este, também, o segmento preferencial para o

desenvolvimento de carcinomas (BIRD, 1995; BONONI *et al.*,1999). Ao contrário dos trabalhos citados, verificou-se mais FCA no segmento médio do que no distal dos animais dos grupos III e IV, sendo o grupo IV com diferença significativa ($P=0,048$).

Analisando os grupos III e IV em relação à multiplicidade de FCA, não houve diferença significativa, quando as criptas foram agrupadas de 1 a 4 nos segmentos médio ($P=0,4969$) e distal ($P=0,244$), como também, de 5 ou mais criptas nos segmentos médio ($P=0,371$) e distal ($P=0,820$). Porém, quando se avaliou a multiplicidade de FCA em todos os segmentos, verificou-se uma maior proporção de 5 ou mais criptas nos grupo IV em relação ao grupo III ($P=0,043$).

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, o risco para o desenvolvimento tumoral (CORPET *et al.*,1990; PRETLOW *et al.*,1992).

Desse modo, demonstrou-se que a dieta usada, apesar de aumentar o peso corporal, não interferiu no surgimento e na proliferação dos FCA em toda a mucosa cólica, mas diminuiu de modo significativo o aparecimento de focos com 5 ou mais criptas, sugerindo uma ação protetora contra o aparecimento das células neoplásicas.

Nas condições e modelo do estudo realizado, a administração de dieta enriquecida com ácidos graxos poliinsaturados ω -3 e ω -9, não foi capaz de interferir na formação de FCA, contudo foi capaz de reduzir sua multiplicidade, exercendo, pois, algum efeito benéfico, ou seja, atenuador da carcinogênese colorretal.

No entanto, faz-se necessário a realização de mais estudos, inclusive com a utilização de dietas similares e outros modelos animais, no sentido de identificar a real ação das dietas na carcinogênese, podendo no futuro contribuir para a prevenção do aparecimento do câncer colorretal.

6 CONCLUSÃO

1. A dieta hipercalórica e hiperlipídica, rica em gordura poliinsaturada (ω -3 e ω -9) favoreceu o ganho de peso dos animais, porém não interferiu no número total de focos de criptas aberrantes no colo de ratos Wistar, induzido por azoximetano.

2. A dieta hipercalórica e hiperlipídica, rica em gordura poliinsaturada (ω -3 e ω -9) reduziu o número de criptas aberrantes, quando maior ou igual a 5 criptas por foco, no colo de ratos Wistar, induzido por azoximetano.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, T.D.; GRESS, R.E.; SMITH, S.C.; HALVERSON, R.C.; SIMPER, S. C.; ROSAMOND, W.D.; LAMONTE, M.J.; STROUP, A.M.; HUNT, S.C. Long-term mortality after gastric bypass surgery. **N. Engl. J. Med.**, v. 357, n. 8, p.753-761, 2007.

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.

AGENCY FOR HEALTHCARE RESEARCH AND QUALITY (AHRQ). **Effects of Omega-3 Fatty Acids on Cancer**. Evidence Report/ Technology Assessment, nº 113. AHRQ Publication, nº 05-E010-2, February, 2005. Disponível em: <<http://www.ahrq.gov/downloads/pub/evidence/pdf/o3cancer/o3cancer.pdf>>.

AGUILERA A.A.; DÍAZ G.H.; BARCELATA, M.L.; GUERRERO, 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.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2007. Atlanta. American Cancer Society, 2007. Disponível em: <<http://www.cancer.org/download/STT/CAFF2007PWSecured.pdf>>. Acesso em: 06 fev. 2007.

ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (Org.). **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. 388 p.

ANDRADE, D.A. **Ação da *Euphorbia tirucalli* L. na formação de focos de cripta aberrante na mucosa cólica induzida por azoximetano em ratos**. 2007. 62f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Ceará, Departamento de Cirurgia, Fortaleza, 2007.

ARAÚJO, S.E.A.A.; ALVES, P.R.A.; HABR-GAMA, A. Role of colonoscopy in colorectal câncer. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Méd. S. Paulo**, v. 56, n.1, p. 25-35, 2001.

BARTSCH, H.; NAIR, J.; OWEN, R.W. 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. 2209-18, 1999.

BIN, F.C. Rastreamento para câncer colorretal. **Rev Assoc Med Bras.**; v. 48, n. 4, p. 275-96, 2002.

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, 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.112-113, 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 344 male rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 1667-1673, 2006.

BONONI, A.P.; CAETANO, C.S.; ROCHA, N.S.; OLIVEIRA, S.V.; SALVADORI D.M.F.; CAMARGO, J.L.V. Lesões da bexiga e do cólon de ratos Wistar submetidos à carcinogênese química de duas etapas. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 45, n. 4, 1999.

BURKITT, D.P. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. **Cancer**, v. 28, p. 3-13, 1971.

CADERNI, G.; FILIPPO, D.; LUCERI, C.; FAZI, M.; DOLARA, P.; BAZZICALUPO, M. Apc mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors induced by azoxymethane in rats. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, v. 38, n. 3122, p. 467 – 472, 1997.

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

CALLE, E.E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 579-591, 2004.

CALVIELLO, G.; SERINI, S.; PICCIONI, E. n-3 polyunsaturated fatty acids and the prevention of colorectal cancer: molecular mechanisms involved. **Curr. Med. Chem.**, v. 14, n. 29, p. 3059-3069, 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, p. 1, p. 18-25, 2005.

CAMPOS, F.G. **Dieta e câncer colorretal: evidências atuais.** ProctoSite – Portal Interativo de Coloproctologia. Edição nº 1 - Julho 2007 Disponível em: <http://www.proctosite.com/newsletter/conteudo.php?id_conteudo=19&id_informativo=6&id_informativo_edicao=6>. Acesso em: 06 nov. 2007.

CARVALHEIRA, J.B.C.; SAAD, M.J.A. Doenças associadas à resistência à insulina/hiperinsulinemia, não incluídas na síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, nº 2, 2006.

CIANCHI, F.; CORTESINI, C.; FANTAPPIE, O.; MESSERINI, L.; SCHIAVONE, N.; VANNACCI, A.; NISTRÌ, S.; SARDI, I.; BARONI, G.; MARZOCCA, C.; PERNA, F.; MAZZANTI, R.; BECHI, P., MASINI E. Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer. **Am J. Pathol.**, v. 162, n. 3, p. 793-801, 2003.

CIANCHI, F.; CORTESINI, C.; FANTAPPIE, O.; MESSERINI, L.; SARDI, I.; LASAGNA, N.; PERNA, F.; FABBRONI, V.; FELICE, A.D.; PERIGLI, G.; MAZZANTI, R.; MASINI, E. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. **Clin Cancer Res.**, v. 10, n. 8, p. 2694-2704, 2004.

CHENG, J.; OGAWA, K.; KURIKI, K.; YOKOYAMA, Y.; KAMIYA, T.; SENO, K.; OKUYAMA, H.; WANG, J.; LUO C.; FUJII, T.; ICHIKAWA, H.; SHIRAI, T.; TOKUDOME, S. Increase intake of n-3 polyunsaturated fatty acids elevates the level of apoptosis in the normal sigmoid colon of patients polypectomized for adenomas/tumors. **Cancer Lett.**, v. 193, n. 1, p. 17-24, 2003.

CORMAN, M.L.; ALLISON, S.I.; KUEHNE, J.P. **Handbook of colon & rectal surgery.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. 391 p.

CORPET, D.E.; STAMP, D.; MEDLINE, A.; MINKIN, S.; ARCHER, M.C.; BRUCE, W.R. Promotion of colonic microadenoma growth in mice and rats fed cooked sugar and cooked casein and fat. **Cancer Res.**, v. 50, p. 6955-6958, 1990.

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

DAVIDSON, L.A.; LUPTON, J.R.; JIANG, Y.H.; CHAPKIN, R.S. Carcinogen and dietary lipid regulate ras expression and localization in rat colon without affecting farnesylation kinetics. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 5, p. 785-791, 1999.

DEFRONZO, R.A.; FERRANNINI, E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diab. Care**, v. 14, p. 173-194, 1991.

DOMÍNGUEZ, B.M.; GÓMEZ, M.V.I.; LEÓN, F.R. Phytic acid: nutritional aspects and analytical implications. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 52, n. 3, p. 219-231, 2003.

DUPERTUIS, Y.M.; MEGUID, M.M.; PICHARD, C. Colon cancer therapy: new perspectives of nutritional manipulations using polyunsaturated fatty acids. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 10, n. 4, p. 427-432, 2007.

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

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.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem. Toxicol.**, v. 33, p. 1061-1080, 1995.

FORTUNATO, D.M.N.; TRIGUEIRO, I.N.S.; GÓES, J.A.W. Fitatos na alimentação humana: uma visão abrangente. **Hig. Aliment.**, v. 17, n. 107, p. 16-20, 2003.

FRANCISCHI, R.P; PEREIRA, L.O; LANCHÁ JÚNIOR, A.H. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. **Rev. Paul. Educ. Fis.**, v. 15, n. 2, p. 117-140, 2001.

GIOVANNUCCI, E. Modifiable risk factors for colon cancer. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 31, n. 4, p. 925-943, 2002.

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, Apr. 2004.

HELZLSOUER, K.J.; ERLINGER, T.P.; PLATZ, E.A. C-reactive protein levels and subsequent cancer outcomes: Results from a prospective cohort study. **Eur. J. Cancer**, v. 42, n. 6, p.704-707, 2006.

HIGGINSON, J. Environmental carcinogenesis. **Cancer**, v. 72, p. 971-977, 1993.

HILL, J.O.; PETERS, J.C. Environmental contributions to the obesity epidemic. **Science**, v. 280, p. 1371-1374, 1998.

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.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC handbooks of cancer prevention, weight control and physical activity**. Lyon, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005.

JAISWAL, M.; LARUSSO, N.F.; BURGART, L.J.; GORES, G.J. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. **Cancer Res.**, v. 60, n. 1, p. 184-190, 2000.

JEMAL, A.; MURRAY, T.; SAMUELS, A.; GHAFOR, A.; WARD, E.; THUN, M.J. Cancer statistics 2003. **CA Cancer J. Clin.**, v. 53, p. 5-26, 2003.

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

KRISTIANSEN, E.; THORUP, I.; MEYER, O. Influence of different diets on development of DMH-induced aberrant crypt foci and colon tumor incidence in Wistar rats. **Nutr. Cancer**, v. 23, n. 2, p. 151-159, 1995.

LEAHY, K.M.; ORNBERG, R.L.; WANG, Y.; ZWEIFEL, B.S.; KOKI, A.T.; MASFERRER, J.L. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. **Cancer Res.**, v. 62, n. 3, p. 625-631, 2002.

LIANG, B.; WANG, S.; YE, Y.J.; YANG, X.D.; WANG, Y.L.; QU, J.; XIE, Q.W.; YIN, M.J. Impact of postoperative omega-3fatty acids supplemented parenteral nutrition on clinical outcomes and immunomodulations in colorectal cancer patients. **World J. Gastroenterol.**, v.14, n. 15, p. 2434-2439, 2008.

LLOR, X.; PONS, E.; ROCA, A.; ALVAREZ, M.; MANE, J.; FERNÁNDEZ-BANARES, F.; GASSULL, M.A. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. **Clin. Nutr.**, v. 22, n. 1, p. 71-79, 2003.

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.

MACQUART-MOULIN, G.; RIBOLI, E.; CORNÉE, J. Colorectal polyps and diet: a case-control study in Marseilles. **Int. J. Cancer**, v. 40, p. 179-181, 1987.

MAHAYRI, N.; MOREIRA FILHO, D.C. A importância dos registros de câncer de base populacional para identificar casos de câncer ginecológico relacionados com câncer colorretal em população de risco. **Rev Bras Cancerol.** v.48, n. 3, p. 349-56, 2002.

MALLMANN, A.C.M.; KOSHIMIZU, R.T.; CARVALHO, L.P.; MUXFELDT, R.A. Rastreamento do câncer colorretal. **Rev Técnico-Científica do Grupo Hospitalar Conceição.**, v. 16, n. 1, p. 13-15, 2003

MARTÍNEZ-FERRER, M.; VERGHESE, M.; WALKER, L.T.; SHACKELFORD, L.; CHAWAN, C.B.; JHALA, N. Lycopene reduces azoxymethane-induced colon tumors in Fisher 344 rats. **Nutr. Res.**, v. 26, p. 84-91, 2006.

McKEOWN-EYSSSEN, G. Epidemiology of colorectal cancer revisited: are serum triglycerides and/or plasma glucose associated with risk? **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 3, p. 687-695, 1994.

MONTEIRO, C.A.; MONDINI, L.; SOUZA, A.L.M.; POPKIN, B.M. Da desnutrição para a obesidade a transição nutricional no Brasil. In: MONTEIRO, C.A. (Ed.). **Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças.** São Paulo: Heitec – NUPENS/USP. p. 247-255, 1995.

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.

MORI, H.; HATA, K.; YAMADA, Y.; KUNO, T.; HARA, A. Significance and role of early lesions in experimental colorectal carcinogenesis. **Chemico-Biological Inter.**, v. 155, p. 1-9, 2005.

MURAD, A.M. Avanços da biologia molecular aplicada à oncologia. **Rev. Med. Minas Gerais**, v. 6, p. 104-106, 1996.

MUTO, T.; KAMIYA, J.; SAWADA, T. Small "flat adenoma" of the large bowel with special reference to its clinico-pathologic features. **Dis. Colon Rectum**, v. 28, p. 847-851, 1985.

NARAYANAN, B.A.; NARAYANAN, N.K.; SIMI, B.; REDDY, B.S. Modulation of inducible nitric oxide synthase and related proinflammatory genes by the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in human colon cancer cells. **Cancer Res.**, v. 63, n. 5, p. 972-979, 2003.

PAI, R.; NAKAMURA, T.; MOON, W.S.; TARNAWSKI, A.S. Prostaglandins promote colon cancer cell invasion; signaling by cross-talk between two distinct growth factor receptors. **FASEB J.**, v. 17, n. 12, p.1640-1647, 2003.

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.

PASI, A.J.; MAYER, R.J. Chemoprevention of Colorectal Cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, n. 26, p. 1960-1968, 2000.

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

POPKIN, B.M.; DOAK, C.M. The obesity epidemic is a world-wide phenomenon. **Nutr. Rev.** v. 56, p. 106-114, 1998.

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.

REDDY, B.S. Studies with the azoxymethane-rat preclinical model for assessing colon tumor development and chemoprevention. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 44, n. 1, p. 26-35, 2004.

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. **Genética e biologia molecular para o cirurgião**. São Paulo: Lemar, 1999.

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

RUSTAN, A.C.; NOSSEN, J.O.; CHRISTIANSEN, E.N.; DREVON, C.A. Eicosapentaenoic acid reduces hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreasing the activity of acyl-coenzyme A:1,2-diacylglycerol acyltransferase. **J. Lipid Res.**, v. 29, p. 1417-1426, 1988.

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.

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

STEMMERMANN, G.N.; NOMURA, A.; CHYYOU, P.H. The influence of dairy and non-dairy calcium on subsite large bowel cancer risk. **Dis. Colon Rectum**, v. 22, p. 190-194, 1990.

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.

TANAKA, T.; KOHNO, H.; MORI, H. Chemoprevention of Colon Carcinoma by Dietary Non-nutritive Compounds. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 2, p. 1-13, 2001.

THORUP, I.; MEYER, O.; KRISTIANSEN, E. Effect of potato starch, cornstarch and sucrose on aberrant crypt foci in rats exposed to azoxymethane. **Anticancer Res.** v. 15, n. 5B, p. 2101-2105, 1995.

WARGOVICH, M.J.; PUREWAL, M. Biomarkers of gastrointestinal neoplasia. In: RUSTGI, A. K. (Ed.). **Gastrointestinal cancers: biology, diagnosis, and therapy**. Philadelphia: Lippincott-Raven. p. 77-87, 1995.

WEICKERT, M.O.; PFEIFFER, A.F.H.; Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. **J. Nutr.**, v. 138, p. 439-442, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity: preventing and managing the global epidemic.** Geneva, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diet, nutrition 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.**, vol. 60, p. 3323-3327, Jul. 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, Mar. 2001.

APÊNDICE A- PROTOCOLO CLÍNICO

GRUPO _____ RATO _____

A	SEMANAS/DAT	PESO (g)	ALTERAÇÕES CLÍNICAS
	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
	6		
	7		
	8		
	9		
	10		
	11		
	12		
	13		
	14		
	15		
	16		

ALTERAÇÕES CLÍNICAS: PILOEREÇÃO, MUDANÇAS ESPONTÂNEAS NO COMPORTAMENTO (REATIVIDADE, IMOBILIDADE), CONTRAÇÕES INVOLUNTÁRIAS, PTOSE, RESPIRAÇÃO, CANIBALISMO.

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) 3366-8338 Fax (85) 3366-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 11/06, sobre o projeto intitulado: **“Obesidade como fator de risco de câncer colorretal em ratos wistar induzidos por azoximetano”** 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 17 de maio de 2006.

Fortaleza, 23 de maio de 2006

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Gisela'.

Prof. Dra. Gisela Costa Camarão
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

ANEXO B – COMPOSIÇÃO DO NUTRI DIABETIC® PÓ

Nutrientes	Informação Nutricional
	Porção de 20g
Valor Energético	80kcal
Carboidratos (g)	11
Proteínas (g)	3,2
Gorduras Totais (g)	2,6
Gorduras Saturadas (g)	0,56
Gorduras Trans (g)	0
Colesterol (mg)	0
Fibra Alimentar (g)	1,2
Sódio (mg)	60
Cálcio (mg)	90
Ferro (mg)	0,62
Cloro (mg)	101
Potássio (mg)	114
Fósforo (mg)	68
Magnésio (mg)	24
Iodo (mcg)	9
Cobre (mcg)	0,12
Zinco (mg)	0,9
Manganês (mg)	0,3
Selênio (mcg)	6,6
Cromo (mcg)	6,2
Molibdênio (mcg)	7,8
Vitamina A (mcg RE)	90
Vitamina D (mcg)	0,6
Vitamina E (mg)	1,4
Vitamina K (mcg)	7,4
Vitamina C (mg)	4,2
Vitamina B1 (mg)	0,09
Vitamina B2 (mg)	0,1
Niacina (mg)	1,2
Vitamina B6 (mg)	0,12
Ácido Fólico (mcg)	24
Ácido Pantotênico (mg)	0,6
Vitamina B12 (mcg)	0,2
Biotina (mcg)	6
Colina (mg)	16
Carnitina (mg)	9,4
Taurina (mg)	9,4

ANEXO C – PERFIL LIPÍDICO DO NUTRI DIABETIC® PÓ

DIABETIC – 2,6g de Lipídeo					
NUTRI DIABETIC®	2,6	100	---	---	---
TCM	17	0,442	---	---	---
Óleo de Canola	71	1,846	---	---	---
Óleo de Girassol	12	0,312	---	---	---
	Total (g)	2,6	---	---	---
Gordura		Poliinsaturada		Monoinsaturada (g)	Saturada (g)
		Total (g)	Ω-6(g)		
TCM	0,442	0	0	0	0,442
	Total (g)	Ω-6(g)	Ω-3 (g)	Monoinsaturada (g)	Saturada (g)
Óleo de Canola	1,846	0,47996	0,1846	1,07068	0,11076
	Total (g)	Ω-6 (g)	Ω-3 (g)	Monoinsaturada (g)	Saturada (g)
Óleo de Girasol	0,312	0,21528	0	0,0624	0,03432
Gordura	---	Poliinsaturada		Monoinsaturada	Saturada
Total (g)	2,6	0,69524	0,1846	1,13308	0,58708
Total (g)	---	0,87984		1,13308	0,58708
Total em Calorias	---	7,91856		10,19772	5,28372
% Gordura					
Saturada		Monoinsaturada		Poliinsaturada	
80	100%	80	100%	80	100%
5,28372	6,60%	10,19772	12,75%	7,91856	9,90%
Valores de referência	(<7%) Saturada		(10 - 15%) Monoinsaturada		(<10%) Saturada

ANEXO D – COMPOSIÇÃO DO ÓLEO DE CANOLA

Nutrientes	Informação Nutricional – Porção 5ml
Valor energético	45 kcal
Gordura total (g)	5
Gorduras Saturadas (g)	0,3
Gorduras Trans (g)	0
Colesterol (mg)	0

ANEXO E – PERFIL LIPÍDICO DO ÓLEO DE CANOLA

Óleo de Canola - 5ml de Lipídeo					
Gordura	Total (g)	Poliinsaturada		Monoinsaturada (g)	Saturada (g)
		Ω-6 (g)	Ω-3 (g)		
Óleo de Canola	5	1,3	0,5	2,9	0,3
Total (g)	5	1,3	0,5	2,9	0,3
Total (g)		1,8		2,9	0,3
Total em Calorias		16,2		26,1	2,7
% Gordura					
Saturada		Monoinsaturada		Poliinsaturada	
45	100%	45	100%	45	100%
2,7	6,00%	26,1	58,00%	16,2	36,00%
	(<7%)		(10 - 15%)		(<10%)
Valores de referência	(<7%) Saturada		(10 - 15%) Monossaturada		(<10%) Saturada

**ANEXO F – COMPOSIÇÃO DA DIETA PADRÃO
BIOBASE BIO-TEC RATOS E CAMUNDONGOS ®**

Dieta Padrão			
Nutrientes	Informação Nutricional		
	Em 40 g de Dieta Padrão		
Valor Energético	120	Calorias	Percentual
Carboidratos (g)	17,6	70,4	58,66%
Proteínas (g)	8,8	35,2	29,34%
Gorduras Totais (g)	1,6	14,4	12,00%
		12,0	100%

ANEXO G – PERFIL LIPÍDICO DO NUTRI DIABETIC® + ÓLEO DE CANOLA +
DIETA PADRÃO

Gordura		Poliinsaturada (g)		Monoinsaturada (g)	Saturada (g)
Total Lipídio (g)	7,6	2,67984		4,03308	0,88708
Total em Calorias	---	24,11856		36,29772	7,98372
% Gordura					
Saturada		Monoinsaturada		Poliinsaturada	
125g	100%	125g	100%	125g	100%
7,98372	6,39%	36,29772	29,04%	24,11856	19,29%
0,18		0,15		0,27	
Valores de referência	(<7%) Saturada		(10 - 15%) Monossaturada		(<10%) Saturada

Relação ω-6 : ω-3 NUTRI DIABETIC® + Óleo de Canola + Dieta Padrão	
Total ω -6	1,99524
Total ω -3	0,6846
Relação ω -6 : ω -3	3:01

ANEXO H – PERFIL LIPÍDICO DA DIETA PADRÃO
 BIOBASE BIO-TEC RATOS E CAMUNDONGOS ®

40g de Dieta Padrão - 0,6g de Óleo de Soja							
---	Gordura Total (g)	ω -6(g)	ω -3 (g)	Monossaturada (g)		Saturada (g)	
	1,6	20	25	25		30	
	---	0,32%	0,4%	0,4%		0,48%	
---	---	Poliinsaturada		Monossaturada		Saturada	
Total (g)	1,6	0,32	0,4	0,4		0,48	
Total (g)	---	0,72		0,4		0,48	
Total em calorias	---	6,48		3,60		4,32	
% e (g) de Gordura							
---	---	Poliinsaturada		Monossaturada		Saturada	
---	---	120g	100%	120g	100%	120g	100%
---	---	6,48g	5,40%	3,6g	3,00%	4,32g	3,60%
---	---	---	(<10%) Saturada	---	(10 - 15%) Monossaturada	Valores de referência	(<7%) Saturada