

**ANA PAULA BORONI MOREIRA**

**INTERFERÊNCIAS DE ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 E VITAMINA E NA  
CARCINOGENESE EXPERIMENTAL DO CÓLON**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

2006

**ANA PAULA BORONI MOREIRA**

**INTERFERÊNCIAS DE ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 E VITAMINA E NA  
CARCINOGENESE EXPERIMENTAL DO CÓLON**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de julho de 2006

---

Prof<sup>a</sup>. Céphora Maria Sabarensê

(Co-orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Cristina Maria Ganns Chaves Dias

(Co-orientadora)

---

Prof. Antônio José Natali

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Beatriz Abreu Glória

---

Prof<sup>a</sup>. Maria do Carmo Gouveia Peluzio

(Orientadora)

Dedico esta dissertação aos meus pais, Vicente e Rita, que sempre se doaram inteiros aos filhos. Obrigada pela dedicação, apoio, incentivo, confiança, alegria, carinho e pelo amor sempre presente em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por tornar tudo possível.

À minha família: meus pais Vicente e Rita e meus irmãos Marco Antônio e Eduardo, que são muito especiais em minha vida.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pela confiança, atenção, apoio, amizade e por todo o ensinamento.

Às conselheiras, Prof<sup>ª</sup>. Cristina Maria Ganns Chaves Dias e Prof<sup>ª</sup>. Céphora Maria Sabarense por terem contribuído na realização deste trabalho e pelos conhecimentos transmitidos.

À Prof<sup>ª</sup>. Maria Beatriz Abreu Glória pela participação na banca e por abrir as portas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos (FAFAR/UFMG) para as análises das aminas bioativas, permitindo o enriquecimento deste trabalho.

Ao Prof. Antônio José Natali pelas colaborações e participação na banca.

Ao Wellington Lunz pelo carinho, apoio e presença durante esses dois anos. E pela nossa amizade conquistada.

À Prof<sup>ª</sup>. Helena Maria Pinheiro Sant'Ana que muito contribuiu na minha formação durante a graduação e para o meu ingresso no mestrado.

À Monise, Josi, Pamela, Carina, Vanessa, Joseane, Damiana, Ana Cristina e ao André pelas valiosas contribuições ao longo do experimento e pela boa convivência.

Ao Marquinho, Cris, Luciana, Meire, Rose, Aline, Angélica e Tati pela amizade e carinho.

A Universidade Federal de Viçosa. A CAPES, pela concessão da bolsa.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
ARTIGO I: Influência dos ácidos graxos polinsaturados $\omega$ -3 no câncer colorretal	1
Resumo	1
1. Introdução	2
2. Câncer Colorretal	3
Fatores de Risco	4
3. Ácidos Graxos $\omega$ -3	5
4. Ácidos Graxos $\omega$ -3 e Câncer Colorretal	7
5. Possíveis Mecanismos de Ação dos Ácidos Graxos $\omega$ -3 no Câncer Colorretal	10
6. Conclusões	15
7. Referências	16
ARTIGO II: Ácidos graxos $\omega$ -3 e vitamina E: efeitos na carcinogênese experimental do cólon induzida por 1,2-dimetilhidrazina	24
Resumo	24
1. Introdução	26
2. Materiais e Métodos	29
2.1. Animais e Dietas	29
2.2. Indução da Carcinogênese Colorretal	31
2.3. Contagem e Categorização dos FCA	33
2.4. Análise dos Tumores	34
2.5. Extração dos Lipídios e Análise dos Ácidos Graxos	34
2.6. Determinação das Aminas Bioativas	36
2.7. Determinação de $\alpha$ -Tocoferol	37

2.8. Análises Bioquímicas	37
2.9. Análise Estatística	38
3. Resultados	39
3.1. Consumo das Dietas e Peso dos Animais	39
3.2. Focos de Criptas Aberrantes	40
3.3. Tumores	43
3.4. Perfil de Ácidos Graxos	45
3.5. Aminas Bioativas	50
3.6. $\alpha$ -Tocoferol	50
3.7. Análises Bioquímicas	51
4. Discussão	53
5. Conclusões	61
6. Referências	62

## RESUMO

MOREIRA, Ana Paula Boroni. M.S. Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2006.

**Interferências de ácidos graxos ômega-3 e vitamina E na carcinogênese experimental do cólon.** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-Orientadoras: Cristina Maria Ganns Chaves Dias e Céphora Maria Sabarense.

O câncer colorretal ocupa um lugar de destaque mundial devido à sua alta incidência, sendo um dos tipos de câncer mais afetado pela dieta. Estudos experimentais sustentam a hipótese de que ácidos graxos  $\omega$ -6 contribuem para o desenvolvimento do câncer colorretal, enquanto os ácidos graxos da série  $\omega$ -3 possuem ação protetora. Entretanto, ácidos graxos polinsaturados (AGPI)  $\omega$ -3 são particularmente suscetíveis ao ataque de radicais livres o que pode exacerbar o estresse oxidativo. Antioxidantes como a vitamina E têm sido utilizados para impedir a peroxidação lipídica. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do óleo de peixe, rico em AGPI  $\omega$ -3 (ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico), e da vitamina E na carcinogênese colorretal. Foram utilizados ratos Wistar adultos tratados com 1,2-dimetilhidrazina, na dose de 40 mg/Kg de peso corporal. Os animais foram divididos em quatro grupos: óleo de peixe e vitamina E (OPE), óleo de peixe (OP), óleo de soja e vitamina E (OSE) e óleo de soja (OS). Cada dieta continha 18% de óleo e a vitamina E foi oferecida na dose de 400 mg/Kg de dieta. As dietas e água foram consumidas *ad libitum* pelos animais durante 36 semanas, incluindo o período de indução da carcinogênese. O peso corporal e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente. Foram analisados os focos de criptas aberrantes (FCA), tumores formados no intestino grosso e o perfil de ácidos graxos do cólon, tecido hepático e fezes. Aminas bioativas foram investigadas no tecido hepático dos grupos OPE e OSE. Foram ainda determinadas as concentrações de  $\alpha$ -tocoferol no plasma, fígado e fezes e parâmetros bioquímicos (colesterol total e frações, triacilgliceróis, proteína C reativa e fosfatase

alcalina) no soro. O peso e consumo alimentar dos quatro grupos não apresentaram diferenças significativas ao longo do experimento. Houve redução no número total de FCA, sendo de 53.3% para OP e de 49.2% para OPE comparados ao grupo OS. Em relação ao OSE, a redução foi de 51.2% para OP e 47.1% para OPE. A incidência (%) e multiplicidade de tumores totais (média  $\pm$  desvio-padrão) foram menores nos grupos OP (30% e  $0.40 \pm 0.69$ ) e OPE (30% e  $0.40 \pm 0.69$ ) em relação ao grupo OSE (100% e  $1.50 \pm 0.97$ ). Houve uma tendência na redução da incidência e da multiplicidade de tumores nos grupos OPE e OP quando comparados ao grupo OS (60% e  $1.20 \pm 1.30$ ). O tamanho dos tumores foi similar entre os grupos experimentais. A adição da vitamina E não alterou os FCA, incidência e multiplicidade dos tumores formados entre os grupos que receberam o mesmo tipo de óleo. O perfil de ácidos graxos do cólon e tecido hepático demonstraram maior incorporação dos AGPI  $\omega$ -3 nos grupos OPE e OP, enquanto nos grupos OSE e OS ocorreu aumento na concentração dos AGPI  $\omega$ -6. A excreção dos AGPI  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 foi semelhante entre os grupos. As aminas bioativas espermidina, espermina e triptamina, detectadas no tecido hepático, foram semelhantes entre os grupos OPE e OSE. A concentração de  $\alpha$ -tocoferol no plasma foi semelhante entre os grupos, enquanto no fígado verificou-se maior concentração nos grupos OPE e OSE. A maior excreção fecal do  $\alpha$ -tocoferol ocorreu no grupo OSE. Os parâmetros colesterol total e triacilgliceróis foram menores nos grupos OPE e OP. Já proteína C reativa e fosfatase alcalina foram semelhantes entre os grupos experimentais. Esses resultados sugerem que o óleo de peixe pode atuar de forma protetora na carcinogênese colorretal entretanto, a vitamina E, na quantidade oferecida, não demonstrou efeito. O óleo de peixe também reduziu a concentração sérica de colesterol total e triacilgliceróis.

## ABSTRACT

MOREIRA, Ana Paula Boroni. M.S. Universidade Federal de Viçosa, July, 2006.

**Interference of omega-3 fatty acids and vitamin E with experimental colon carcinogenesis.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-Advisers: Cristina Maria Ganns Chaves Dias and Céphora Maria Sabarense.

The colorectal cancer has a high incidence in the world population as it is a type of cancer affected by diet. Experimental studies support the hypothesis that  $\omega$ -6 fatty acids promotes the development of colorectal cancer, while  $\omega$ -3 fatty acids provide protective actions. However  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) are particularly susceptible to free radical attacks, promoting oxidative stress. Antioxidants such as vitamin E have been used to hinder lipid peroxidation. The aim of this study was to evaluate the effects of fish oil (rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids) and vitamin E on colorectal carcinogenesis. Wistar adult male rats were treated with 1,2-dimethylhydrazine (40 mg/Kg body). The animals were divided into four groups: fish oil and vitamin E (FOE), fish oil (FO), soybean oil and vitamin E (SOE) and soybean oil (SO). Each diet containing 18% oil and vitamin E was offered at 400 mg/Kg of diet. Animals had free access to water and diet during 36 weeks, including the carcinogenesis induction period. Body weight and dietary consumption were monitored weekly. Aberrant crypt foci (ACF) and tumors formed in the large intestine, fatty acids profile of the colon, liver and feces were analyzed. Bioactive amines were investigated in the liver of the FOE and SOE groups. The plasma, liver and feces  $\alpha$ -tocopherol concentrations and the serum biochemical parameters (total cholesterol and fractions, triacylglycerol, C-reactive protein and alkaline phosphatase) were determined. The results showed that body weight and dietary consumption did not differ statistically between groups during the experiment. The total reduction of ACF was of 53.3% for FO and 49.2% for FOE as compared to FOE group and of 51.2% for FO and 47,1% for FOE as

compared to OSE group. The incidence (%) and tumor multiplicity (means  $\pm$  standard error) were lower in FO (30% and  $0.40 \pm 0.69$ ) and FOE groups (30% and  $0.40 \pm 0.69$ ) than in SOE group (100% and  $1.50 \pm 0.97$ ). There was a trend in the reduction of incidence and tumor multiplicity in FOE and FO groups when compared with those of OS group (60% and  $1.20 \pm 1.30$ ). The tumor size was similar among the experimental groups. The vitamin E addition did not modify the ACF, incidence and tumor multiplicity in the groups that received the same oil. The colon and liver fatty acid profile revealed a greater incorporation of  $\omega$ -3 PUFA in FOE and FO groups, while in SOE and SO groups occurred an increase in the  $\omega$ -6 PUFA concentration. The excretion of  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 PUFA was similar among groups. The liver spermidine, spermine and tryptamine contents were similar in the OPE and SOE groups. The plasma  $\alpha$ -tocopherol concentrations were similar in the experimental groups, while in the liver it was higher in FOE and SOE groups. The highest  $\alpha$ -tocopherol excretion occurred in OSE group. The total cholesterol and triacylglycerol were lower in the FOE and FO groups. Protein C reactive and alkaline phosphatase were similar among the experimental groups. These results suggest that fish oil may act as a protection factor in the colorectal carcinogenesis. However, vitamin E did not demonstrate any effect. The fish oil also reduced the serum levels of total cholesterol and triacylglycerol.

**ARTIGO I:****Influência dos ácidos graxos polinsaturados  $\omega$ -3 no câncer colorretal****Resumo**

O câncer colorretal ocupa um lugar de destaque no Brasil e no mundo. A etiologia deste câncer é complexa, porém a sua ocorrência tem grande correlação com fatores nutricionais. O baixo consumo de vegetais frescos, cereais, peixe e o consumo elevado de calorias, gorduras e carnes vermelhas estão associados ao maior risco de desenvolvimento do câncer colorretal. O efeito da gordura na carcinogênese depende não somente da quantidade mas, também, da sua composição em ácidos graxos. Muitos estudos têm demonstrado que os ácidos graxos  $\omega$ -3, especialmente o ácido eicosapentaenóico e o ácido docosahexaenóico, desempenham um papel protetor no desenvolvimento do câncer colorretal, enquanto os ácidos graxos da série  $\omega$ -6 promovem a carcinogênese. Os estudos experimentais têm contribuído para a compreensão dos mecanismos de ação dos ácidos graxos  $\omega$ -3 no câncer colorretal 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. Conseqüentemente, os ácidos graxos  $\omega$ -3 podem afetar a proliferação e diferenciação celular, apoptose e angiogênese. Esta revisão tem como objetivo abordar aspectos relevantes dos ácidos graxos  $\omega$ -3, bem como os mecanismos de ação desses nutrientes no desenvolvimento do câncer colorretal.

**Termos de indexação:** tumores colorretais, óleo de peixe, ácido eicosapentaenóico, ácido docosahexaenóico, ácido araquidônico.

## 1. Introdução

O câncer colorretal é a quarta causa mais comum de câncer no mundo, sendo a segunda em países desenvolvidos, com destaque para os países ocidentais. Os tumores malignos que acometem o cólon e o reto a cada ano somam cerca de 945 mil casos novos e a sobrevivência média mundial estimada é de 44%. No Brasil, o número de casos novos de câncer de cólon e reto estimado em 2006 pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) é de 11.390 casos em homens e de 13.970 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 12 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2005). Existe uma marcante heterogeneidade na frequência deste câncer entre as regiões brasileiras por causa das características físicas, econômicas e sociais próprias de cada região, havendo discrepâncias em relação à expectativa de vida, exposição aos fatores de risco e acesso aos serviços de saúde.

A prevenção do câncer colorretal tem tomado uma dimensão importante no campo da ciência, uma vez que a sua ocorrência tem grande correlação com fatores nutricionais. As evidências indicam que o elevado consumo de calorias, gorduras, carnes vermelhas e processadas e o baixo consumo de frutas, hortaliças, cereais e peixes associam-se ao aumento no risco de desenvolvimento do câncer colorretal (Reddy, 1993; WHO, 2003; INCA, 2005; Norat et al., 2005; Roberts & Barnard, 2005).

Alguns nutrientes, especificamente os ácidos graxos da família  $\omega$ -3, têm recebido atenção especial como possíveis agentes protetores na carcinogênese colorretal. Considerando a importância desses ácidos graxos na dieta, pretende-se com esta revisão apresentar possíveis mecanismos por meio dos quais os ácidos graxos  $\omega$ -3 interferem no processo de carcinogênese colorretal.

## 2. Câncer Colorretal

Neoplasia é definida como uma massa de tecido anormal, que não responde adequadamente aos sinais que regulam o crescimento e diferenciação celulares cujo crescimento, portanto, ocorre de forma desregulada em comparação com o tecido normal. O termo câncer engloba as neoplasias ou tumores malignos que além da desregulação do crescimento e diferenciação celulares apresentam a capacidade de invadir tecidos vizinhos e de crescer à distância gerando as metástases.

No intestino grosso, podem ocorrer tanto neoplasias benignas (adenomas), quanto neoplasias malignas (carcinomas). A seqüência adenoma-carcinoma é a base para o desenvolvimento do câncer colorretal que origina-se a partir do epitélio das glândulas intestinais após acúmulo de mutações em seu material genético. Em um trabalho de revisão, Cotti et al. (2000) citam alguns genes envolvidos com a carcinogênese colorretal: supressores de tumores (APC, DCC, p53 e MCC), oncogenes (K-*ras*, *src*, *c-myc*), genes de reparo do DNA (hMSH2, hMLH1, hMSH6, hPMS1, hPMS2) e outros genes (CD44v e COX-2).

As primeiras alterações epiteliais na seqüência adenoma-carcinoma experimental foram denominadas criptas aberrantes (Bird, 1987). Os focos de criptas aberrantes (FCA) são lesões pré-neoplásicas localizadas na mucosa colônica que exibem alterações morfológicas como displasia e proliferação anormal. Os FCA podem ser observados e quantificados microscopicamente, sendo a contagem destes focos um marcador para o risco de desenvolvimento do câncer colorretal (Bird, 1995).

Com o crescimento, as criptas aberrantes podem originar uma lesão polipóide visível que com o tempo pode apresentar alterações morfológicas, tornando-se menos diferenciada

e mais displásica até adquirir o fenótipo de um carcinoma, apresentando metástases. A progressão da doença é, geralmente, lenta, podendo levar décadas para que os tumores sejam detectáveis. O câncer colorretal ocorre com maior frequência nos segmentos distais do cólon, e a maioria dos casos é diagnosticada em fases avançadas da doença (Saad-Hossne et al., 2005). Nesta fase, as células cancerosas podem expandir através da camada muscular e formar metástase em outros tecidos, como fígado, pulmão e linfonodos (Kato et al., 2004). Aproximadamente 80% dos casos de câncer colorretal são esporádicos e os outros 20% são hereditários (Casimiro, 2002).

### **Fatores de Risco**

Apesar da existência de fatores de risco de natureza hereditária na carcinogênese colorretal, a variabilidade mundial na sua incidência e mortalidade sugerem a existência de outros fatores de grande impacto, como: idade (acima da quinta década de vida), dieta, obesidade e sedentarismo. Entre esses fatores, o de origem alimentar apresenta-se como o principal determinante de risco (Sachse et al., 2002; INCA, 2003; Lima & Gomes-da-Silva, 2005).

Alguns aspectos da chamada “dieta ocidental”, tais como alto consumo de calorias, gorduras, carnes vermelhas, ácidos graxos *trans* e baixo consumo de frutas e hortaliças, estão relacionados com o risco de desenvolvimento do câncer colorretal (Terry et al., 2001a; Slattery et al., 2002), justificando o alto índice desta doença em países ocidentais.

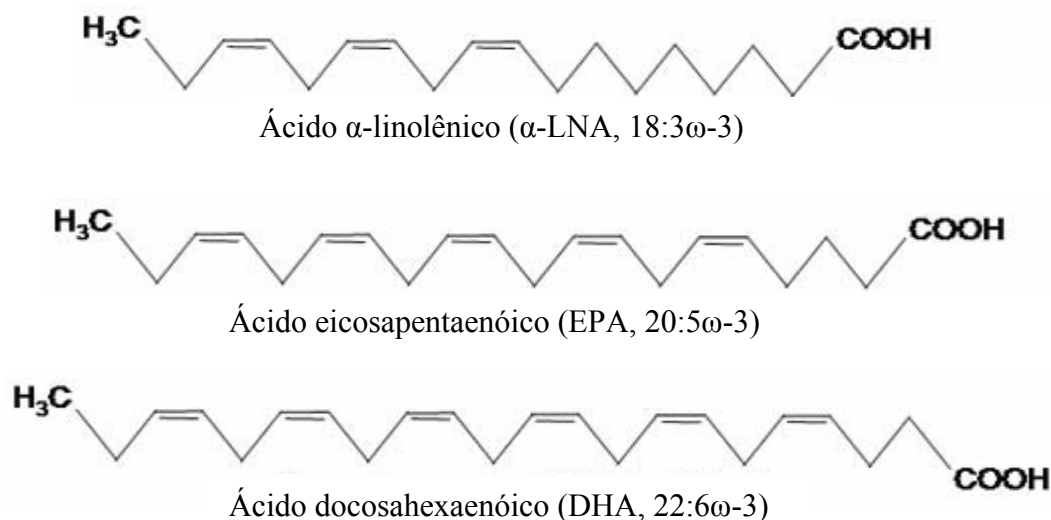
A gordura vem recebendo considerável atenção como um possível fator de risco na etiologia do câncer colorretal. A gordura contribui com uma parte importante na alimentação humana e pode suprir cerca de 40% da ingestão energética na dieta ocidental.

Contudo, o efeito da gordura depende não somente da quantidade, mas também da sua composição, pois evidências científicas sugerem que certos ácidos graxos têm um papel importante na etiologia do câncer colorretal (Reddy, 1993; Nkondjock et al., 2003a).

### **3. Ácidos Graxos $\omega$ -3**

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 (n-3), ômega-6 (n-6) e ômega-9 (n-9). A letra grega  $\omega$  também é utilizada no lugar da letra n, para descrever a contagem a partir da terminação metil.

Os principais ácidos graxos polinsaturados (AGPI) da família  $\omega$ -3 são: ácido  $\alpha$ -linolênico ( $\alpha$ -LNA, 18:3 $\omega$ -3), ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 $\omega$ -3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 $\omega$ -3) (Figura 1). O organismo humano não consegue sintetizar o ácido  $\alpha$ -linolênico e o ácido linoléico (18:2 $\omega$ -6) devido a 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 forma, é necessário obtê-los através da dieta para manter um pool adequado no organismo, sendo denominados como ácidos graxos “essenciais”. Esta capacidade de síntese pertence ao reino vegetal.



**Figura 1** - Estrutura química dos principais ácidos graxos da família  $\omega$ -3.

O óleo de peixe possui elevada concentração dos ácidos graxos EPA e DHA. Peixes e frutos do mar também são fontes desses AGPI. As várias espécies de peixes possuem diferenças quanto às concentrações dos ácidos graxos  $\omega$ -3, devido às influências ambientais (temperatura, salinidade e profundidade na qual vivem), sendo um reflexo também da sua alimentação. Peixes com maior conteúdo de EPA e DHA são aqueles de água fria e profunda (Rose & Connolly, 1999; Larsson et al., 2004). Já o ácido  $\alpha$ -linolênico é encontrado em sementes de linhaça, vegetais folhosos de coloração verde-escuro, óleos de oliva, soja, canola e perila. Os óleos vegetais como o de milho, girassol, açafrão e soja têm o ácido graxo linoléico como componente principal (Bartsch et al., 1999; Roynette et al., 2004).

Quando ingeridos, os ácidos graxos essenciais podem ser alongados até cadeias de pelo menos 20 ou 22 carbonos e dessaturados pela introdução de dupla ligação na cadeia

carbônica, dando origem a outros ácidos graxos de cadeia longa. Estas reações são mediadas pelas enzimas elongases e dessaturases. O ácido linoléico é precursor do ácido  $\gamma$ -linoléico (GLA, 18:3 $\omega$ -6), ácido dihomo- $\gamma$ -linoléico (DGLA, 20:3 $\omega$ -6) e do ácido araquidônico (AA, 20:4 $\omega$ -6), enquanto o ácido  $\alpha$ -LNA pode ser convertido em EPA e DHA.

A proporção de  $\omega$ -6 e  $\omega$ -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  $\omega$ -6 em relação ao  $\omega$ -3 (Bartsch et al., 1999). Entre os ácidos graxos da família  $\omega$ -3, o ácido  $\alpha$ -LNA é o mais consumido na dieta ocidental, sendo 1-5 g/dia (Burdge & Wootton, 2002). 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  $\omega$ -6, enquanto 1% a 2% oriundas do  $\omega$ -3.

Tem sido sugerida a combinação de AGPI  $\omega$ -3 com a vitamina E, um dos principais antioxidantes lipossolúveis, como forma de evitar a peroxidação lipídica, uma vez que esses AGPI são propensos ao ataque de radicais livres. A peroxidação lipídica está associada ao desenvolvimento do câncer por acentuar o estresse oxidativo, causando danos ao DNA (Gasche et al., 2001; Fang et al., 2002). Contudo, são necessários estudos que avaliem essa interação entre AGPI  $\omega$ -3 e vitamina E na prevenção do câncer colorretal.

#### **4. Ácidos Graxos $\omega$ -3 e Câncer Colorretal**

Diversos estudos já foram conduzidos com o objetivo de verificar o efeito dos ácidos graxos  $\omega$ -3 no desenvolvimento do câncer colorretal. A 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e o

azoximetano (AOM) são drogas que têm sido freqüentemente utilizadas em modelos de carcinogênese colorretal em roedores. Essas substâncias podem interferir no processo de metilação do DNA e são capazes de induzir tumores no cólon e reto semelhantes aos encontrados em seres humanos (Pories et al., 1993).

Chang et al. (1997) constataram uma menor incidência de adenocarcinomas em ratos tratados com óleo de peixe (56,1%) em relação ao óleo de milho (70,3%), durante 36 semanas após a administração do AOM. O efeito do óleo de peixe também foi examinado por Latham et al. (1999) em ratos Wistar após administração da DMH. Houve um aumento da apoptose no tecido colônico, supressão da proliferação das criptas colônicas e redução no número e multiplicidade dos FCA nos animais pertencentes ao grupo óleo de peixe, quando comparados aos animais que receberam óleo de milho.

Rao et al. (2001) demonstraram que uma dieta tipicamente ocidental com 20% de lipídio rico em ácidos graxos saturados e AGPI  $\omega$ -6 tem um potencial quatro vezes maior de promover a formação de câncer no cólon de roedores, submetidos à administração de AOM, do que dietas com uma quantidade equivalente de lipídio proveniente do óleo de peixe.

Coleman et al. (2002) avaliaram o efeito da combinação de diferentes tipos de fibras com óleo de peixe e o óleo de semente de girassol. Ao término do experimento, foi verificado que o óleo de peixe associado à  $\alpha$ -celulose forneceram maior proteção aos ratos submetidos à carcinogênese colorretal com AOM. Davidson et al. (2004) estudaram o efeito de três dietas em ratos submetidos às aplicações de AOM. Cada dieta continha um tipo de óleo (óleo de peixe, oliva ou milho). O menor número de FCA encontrado foi no

grupo que recebeu óleo de peixe, sendo significativamente diferente do óleo de milho e do óleo de oliva.

Llor et al. (2003) suplementaram as células humanas Caco-2 e HT-29 (células cancerosas do cólon) com óleo de oliva, óleo de peixe, ácido oléico e o ácido linoléico. A suplementação com óleo de peixe ou de oliva resultou na indução da apoptose e diferenciação celular. O ácido oléico e linoléico também induziram esses efeitos, porém de forma mais discreta. Redução na proliferação das células foi promovida somente pelo óleo de peixe.

Cheng et al. (2003) realizaram uma intervenção dietética em pacientes polipectomizados com câncer colorretal. Os pacientes do grupo experimental foram recomendados a reduzir a ingestão de gordura para 20% do total de energia ingerida, diminuir o consumo de alimentos ricos em ácidos graxos  $\omega$ -6 e aumentar a ingestão de alimentos que são fontes dos ácidos graxos  $\omega$ -3, além de consumirem cápsulas de óleo de peixe. O grupo controle recebeu o aconselhamento para reduzir a ingestão de gordura para 20% do total. Após 2 anos, foi constatado no grupo experimental um aumento significativo da apoptose na mucosa colônica.

Estudos observacionais como os de Fernandez et al. (1999), Nkondjock et al. (2003b), Kojima et al. (2005) e Norat et al. (2005) encontraram associações entre o consumo de ácidos graxos  $\omega$ -3 e a redução no risco de desenvolvimento do câncer colorretal. Entretanto, Slattery et al. (1997), Terry et al. (2001b) e Lin et al. (2004) não encontraram nenhuma associação entre os ácidos graxos  $\omega$ -3 e o risco do câncer colorretal.

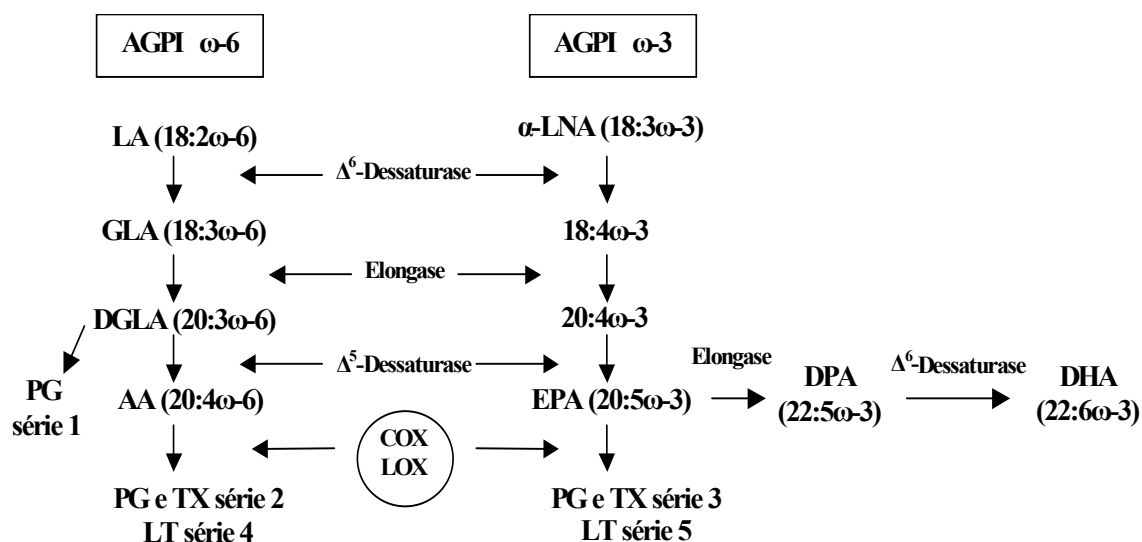
Estudos experimentais têm contribuído para a compreensão da relação entre nutrição e câncer e mostram evidências de que os ácidos graxos  $\omega$ -3 podem inibir a carcinogênese

colorretal através de diversos mecanismos. Entretanto, os estudos observacionais que tentam associar ácidos graxos  $\omega$ -3 e câncer colorretal são muitas vezes inconclusivos e não encontram nenhuma associação. É importante ressaltar que alguns destes estudos possuem limitações que devem ser consideradas ao se analisar os seus resultados. Larsson et al. (2004) citam estas limitações envolvendo ácido graxo  $\omega$ -3 e a prevenção do câncer, entre as quais: a idade da população estudada, a quantidade de ácido graxo  $\omega$ -3 ingerida e a variabilidade na ingestão dentro de uma população. Alguns trabalhos avaliaram a quantidade total de peixe ingerida e não o seu conteúdo de  $\omega$ -3. Existe uma grande variação no teor de  $\omega$ -3 entre as espécies e até na parte do peixe que é consumida. Em um estudo realizado por Visentainer et al. (2000) com peixes marinhos da costa brasileira, pode-se constatar essa variação. Outra limitação seria o consumo de nutrientes como por exemplo, o AGPI  $\omega$ -6, a relação  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 e as vitaminas antioxidantes que não são considerados e que podem influenciar a ação do  $\omega$ -3.

### **5. Possíveis Mecanismos de Ação dos Ácidos Graxos $\omega$ -3 no Câncer Colorretal**

Vários mecanismos têm sido propostos para a ação protetora do  $\omega$ -3 na carcinogênese colorretal. Os AGPI possuem funções importantes no organismo humano, uma vez que compõem e modulam a fluidez das membranas, sinalização e interações celulares. Os AGPI são mobilizados dos fosfolipídios que compõem as membranas celulares pela ação das fosfolipases  $A_2$  e  $C$ , e subsequentemente metabolizados em eicosanóides pelas cicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX). Os eicosanóides como os prostanóides (prostaglandinas e tromboxanos) e os leucotrienos são moduladores potentes das respostas inflamatória e imune, desempenhando um papel crítico na agregação plaquetária, no

crescimento e na diferenciação celular. As COX dão origem às prostaglandinas e tromboxanos, enquanto as LOX aos leucotrienos. Os eicosanóides são derivados de ácidos graxos com 20 átomos de carbono como o DGLA, AA e EPA (Larsson et al., 2004) (Figura 2).



**Figura 2** - Metabolismo dos AGPI  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6. LA (ácido linoléico), GLA (ácido  $\gamma$ -linoléico), DGLA (ácido dihomog $\gamma$ -linoléico), AA (ácido araquidônico),  $\alpha$ -LNA (ácido  $\alpha$ -linolênico), EPA (ácido eicosapentaenóico), DPA (ácido docosapentaenóico), DHA (ácido docosahexaenóico), PG (prostaglandina), TX (tromboxano) e LT (leucotrieno).

Existe uma competição entre  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 pelas enzimas dessaturases e alongases que são comuns tanto na via metabólica do  $\omega$ -6 quanto na do  $\omega$ -3. Uma outra competição entre os AGPI ocorre na presença das COX e LOX. Entretanto, essas enzimas possuem uma maior afinidade pelos AGPI  $\omega$ -3 que serão preferencialmente metabolizados e conseqüentemente formarão eicosanóides da série 3 (prostaglandinas e tromboxanos) e 5 (leucotrienos) que estão associados a um aumento da apoptose e redução no crescimento tumoral e são menos

reativos que os eicosanóides pró-inflamatórios derivados do AA (Roynette et al., 2004). Lee et al. (1984) demonstraram que o leucotrieno B<sub>5</sub> possui somente 5 a 10% da atividade do leucotrieno B<sub>4</sub>, um fator quimiotático e de agregação para os neutrófilos.

As isoformas da COX incluem a COX-1, constitutivamente expressa em muitos tecidos, e a COX-2, forma induzida da enzima. A expressão da COX-2 é baixa ou nula, porém após estímulos pode aumentar consideravelmente (Zha et al., 2004). Níveis elevados de COX-2 têm sido observados em tumores do cólon em humanos e em animais submetidos quimicamente à carcinogênese (Shao et al., 1999; Ceccarelli et al., 2005). Essa elevação da COX-2 indica um aumento na capacidade para a produção de PGE<sub>2</sub> na presença do AA. A PGE<sub>2</sub> 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). Rao et al. (2001) constataram redução na expressão de COX-2 em tumores colorretais de animais tratados com óleo de peixe.

A proporção de AGPI nas membranas celulares é o fator primário na regulação de quais eicosanóides serão gerados, sendo que essa proporção reflete a quantidade ingerida pela alimentação (Rose & Connolly, 1999). Assim, o aumento na ingestão de  $\omega$ -3 resulta na diminuição dos eicosanóides pró-inflamatórios derivados do AA.

Os ácidos graxos  $\omega$ -3 também podem afetar a atividade de enzimas, moléculas transdutoras de sinais ou a expressão de genes que estão associados com funções vitais das células. Expressão da proteína ras foi 13% maior na mucosa colônica de ratos tratados com AOM e alimentados com dieta contendo óleo de milho em comparação aos animais que receberam o óleo de peixe (Davidson et al., 1999). As proteínas ras ativadas desempenham um papel importante na regulação da mitose, ativando em cadeia os reguladores da

proliferação celular. Uma maior expressão da proteína ras normal está relacionada com o desenvolvimento de tumores (Mangues et al., 1992).

A expressão da proteína Bcl-2 foi reduzida nas células Caco-2 e HT-29 pela utilização do óleo de peixe (Llor et al., 2003). Essa proteína está envolvida com a inibição da apoptose. Cheng et al. (2003) constataram uma elevação na expressão da proteína Bax em indivíduos com câncer colorretal que fizeram uso do óleo de peixe. Essa proteína associa-se ao aumento da atividade apoptótica das células.

Narayanan et al. (2003) demonstraram que o DHA pode reduzir a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) *in vitro*. Uma significativa correlação foi encontrada entre expressão de iNOS e COX-2. A produção de PGE<sub>2</sub> também correlacionou com a atividade de iNOS (Cianchi et al., 2004). Outra correlação encontrada foi entre expressão de iNOS e angiogênese em pacientes com carcinoma colorretal (Cianchi et al., 2003). Essa enzima é responsável pela síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina. O óxido nítrico é um mediador de processos intra e extracelulares, no entanto, é potencialmente tóxico, pois pode reagir com o oxigênio ou superóxidos, resultando em danos aos tecidos e ao DNA. 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 p53 (Jaiswal et al., 2000).

O óleo de peixe também tem demonstrado influenciar a atividade da enzima ornitina decarboxilase (ODC). Bartram et al. (1993) observaram redução na atividade da ODC no cólon de indivíduos saudáveis que fizeram uso do óleo de peixe. Rao & Reddy (1993) constataram que o óleo de peixe suprimiu a atividade da ODC no fígado e cólon de ratos submetidos à carcinogênese colorretal com AOM, quando comparados aos animais do

grupo óleo de milho. A ODC é uma enzima limitante na biossíntese das poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) que, por sua vez, estão envolvidas com o crescimento, renovação e metabolismo celular. Poliaminas têm sido encontradas em concentrações elevadas nos tumores colorretais de ratos tratados com DMH e de humanos devido ao aumento na atividade da ODC (Lamuraglia et al., 1986; Shigesawa et al., 1998).

Kim et al. (2000) encontraram um efeito dos ácidos graxos  $\omega$ -3 sobre o fator de crescimento semelhante à insulina-II (IGF-II). O tratamento das células Caco-2 com EPA ou DHA levou a uma diminuição na secreção do fator de crescimento semelhante à insulina-II (IGF-II) e aumento na secreção da proteína ligadora do IGF-6 (IGFBP-6), com uma inibição da proliferação celular. Já o ácido linoléico aumentou o nível de IGF-II sem alteração na secreção de IGFBP-6, resultando em uma estimulação da proliferação das células Caco-2. Os IGF promovem o crescimento de várias células com ações autócrinas e parácrinas, enquanto as proteínas ligadoras do IGF (IGFBP) modulam as ações dos IGF. Um aumento na expressão de IGF-II foi demonstrada por Freier et al. (1999) em pacientes com câncer colorretal.

Os AGPI  $\omega$ -3, EPA e DHA, têm demonstrado uma ação protetora contra o desenvolvimento do câncer colorretal por meio de vários mecanismos, afetando diversas fases da carcinogênese. Como a formação de tumores colorretais pode levar décadas para acontecer, torna-se necessário um consumo adequado e freqüente desses AGPI e desde idades mais jovens para que possam proteger no desenvolvimento do câncer. Vale ressaltar que o consumo do ácido  $\alpha$ -LNA pode dar origem ao EPA e DHA no organismo, mas esta conversão é limitada no homem (Hussein et al., 2005), sendo assim, importante o consumo de alimentos que são fontes de EPA e DHA.

## 6. Conclusões

Diversos mecanismos de ação dos ácidos graxos  $\omega$ -3, EPA e DHA, têm sido descritos na carcinogênese colorretal. Esses AGPI podem modular a biosíntese dos eicosanóides, influenciar a expressão de genes, moléculas transdutoras de sinais e a atividade de enzimas. Como consequência, podem afetar a proliferação e diferenciação celular, apoptose e angiogênese, sugerindo um ação protetora desses nutrientes no desenvolvimento do câncer colorretal. Assim, é importante um consumo adequado e freqüente de AGPI  $\omega$ -3, principalmente na forma de EPA e DHA. Esse consumo deve ser estimulado, uma vez que tem ocorrido um aumento na ingestão de gordura com forte predomínio dos AGPI  $\omega$ -6 em relação aos AGPI  $\omega$ -3.

Considerando que grande parte dos estudos envolvendo AGPI  $\omega$ -3 e câncer colorretal tem sido realizada com modelos animais ou *in vitro*, há necessidade de mais trabalhos que avaliem os mecanismos de ação desses AGPI  $\omega$ -3 em humanos e a interação com outros nutrientes.

## 7. Referências

- Bartram HP, Gostner A, Scheppach W, Reddy BS, Rao CV, Dusel G, Richter F, Richter A, Kasper H. Effects of fish oil on rectal cell proliferation, mucosal fatty acids and prostaglandin E<sub>2</sub> release in healthy subjects. *Gastroenterology*. 1993; 105(5):1317-22.
- Bartsch H, Nair J, Owen RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*. 1999; 20(12):2209-18.
- Bird RP. Observations and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett*. 1987; 37(2):147-51.
- Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett*. 1995; 93(1):55-71.
- Burdge GC, Wootton SA. Conversion of  $\alpha$ -linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr*. 2002; 88(4):411-20.
- Casimiro C. Factores etiopatogénicos en el cáncer colorrectal. Aspectos genéticos y clínicos (primera de dos partes). *Nutr Hosp*. 2002; 17(2):63-71.
- Ceccarelli C, Piazzini G, Paterini P, Pantaleo MA, Taffurelli M, Santini D, Martinelli GN, Biasco G. Concurrent EGFr and COX-2 expression in colorectal cancer: proliferation impact and tumour spreading. *Annals Oncol*. 2005; 16(4):iv74-iv79.
- Chang WCL, Chapkin RS, Lupton JR. Predictive value of proliferation, differentiation and apoptosis as intermediate markers for colon tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 1997; 18(4):721-30.

- 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. Increased 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.* 2003; 193(1):17-24.
- Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, Messerini L, Schiavone N, Vannacci A, Nistri 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.* 2003; 162(3):793-801.
- Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, Messerini L, Sardi I, Lasagna N, Perna F, Fabbroni V, Felice AD, Perigli G, Mazzanti R, Masini E. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(8):2694–704.
- Coleman LJ, Landström EK, Royle PJ, Bird AR, McIntosh GH. A diet containing  $\alpha$ -cellulose and fish oil reduces aberrant crypt foci formation and modulates other possible markers for colon cancer risk in azoxymethane-treated rats. *J Nutr.* 2002; 132(8):2312-8.
- Cotti GCC, Santos FPSS, Sebastianes FM, Habr-Gama A, Seid VE, Martino RB. Genética do câncer colorretal. *Rev Med.* 2000; 79(2/4):45-64.
- Davidson LA, Lupton JR, Jiang YH, Chapkin RS. Carcinogen and dietary lipid regulate ras expression and localization in rat colon without affecting farnesylation kinetics. *Carcinogenesis.* 1999; 20(5):785–91.
- Davidson LA, Nguyen DV, Hokanson RM, Callaway ES, Isett RB, Turner ND, Dougherty ER, Wang N, Lupton JR, Carroll RJ, Chapkin RS. Chemopreventive n-3

- polyunsaturated fatty acids reprogram genetic signatures during colon cancer initiation and progression in the rat. *Cancer Res.* 2004; 64(18):6797–804.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition.* 2002; 18(10):872–9.
- Fernandez E, Chatenoud L, Vecchia C, Negri E, Franceschi S. Fish consumption and cancer risk. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70(1):85-90.
- Freier S, Weiss O, Eran M, Flyvbjerg A, Dahan R, Nephesh I, Safra T, Shiloni E, Raz I. Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in adenocarcinoma of the colon. *Gut.* 1999; 44(5):704–8.
- Gasche C, Chang CL, Rhees J, Goel A, Boland CR. Oxidative stress increases frameshift mutations in human colorectal cancer cells. *Cancer Res.* 2001; 61(20):7444–8.
- Hussein N, Ah-Sing E, Wilkinson P, Leach C, Griffin BA, Millward DJ. Long-chain conversion of [<sup>13</sup>C]linoleic acid and α-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. *J Lipid Res.* 2005; 46(2):269-80.
- Instituto Nacional de Câncer (INCA). Normas e recomendações do INCA: prevenção do câncer do intestino. *Rev Bras Cancerol.* 2003; 49(4):207.
- Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2005.
- Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2000; 60(1):184–90.
- Kato H, Semba S, Miskad UA, Seo Y, Kasuga M, Yokozaki H. High expression of PRL-3 promotes cancer cell motility and liver metastasis in human colorectal cancer: a

- predictive molecular marker of metachronous liver and lung metastases. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(21):7318–28.
- Kim EJ, Kim WY, Kang YH, Ha YL, Bach LA, Park JHY. Inhibition of caco-2 cell proliferation by (n-3) fatty acids: possible mediation by increased secretion of insulin-like growth factor binding protein-6. *Nutrition Res.* 2000; 20(10):1409-21.
- Kojima M, Wakai K, Tokudome S, Suzuki K, Tamakoshi K, Watanabe Y, Kawado M, Hashimoto S, Hayakawa N, Ozasa K, Toyoshima H, Suzuki S, Ito Y, Tamakoshi A. Serum levels of polyunsaturated fatty acids and risk of colorectal cancer: a prospective study. *Am J Epidemiol.* 2005; 161(5):462-71.
- Lamuraglia GM, Lacaine F, Malt RA. High ornithine decarboxylase activity and polyamine levels in human colorectal neoplasia. *Ann Surg.* 1986; 204(1):89-93.
- Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(6):935-45.
- Latham P, Lund EK, Johnson, IT. Dietary n-3 PUFA increases the apoptotic response to 1,2-dimethylhydrazine, reduces mitosis and suppresses the induction of carcinogenesis in the rat colon. *Carcinogenesis.* 1999; 20(4):645–50.
- Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res.* 2002; 62(3):625-31.
- Lee TH, Mencia-Huerta JM, Shih C, Corey EJ, Lewis RA, Austen KF. Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid,

- including leukotriene B<sub>5</sub> and the double lipoxygenase product. *J Biol Chem.* 1984; 259(4):2383-9.
- Lima MPC, Gomes-da-Silva MHG. Colorectal cancer: lifestyle and dietary factors. *Nutr Hosp.* 2005; 20(4):235-41.
- Lin J, Zhang SM, Cook NR, Lee IM, Buring JE. Dietary fat and fatty acids and risk of colorectal cancer in women. *Am J Epidemiol.* 2004; 160(10):1011-22.
- Llor X, Pons E, Roca A, Alvarez M, Mane J, Fernández-Banares F, Gassull MA. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clin Nutr.* 2003; 22(1):71-9.
- Mangues R, Seidman I, Gordon JW, Pellicer A. Overexpression of the N-ras proto-oncogene, not somatic mutational activation, associated with malignant tumors in transgenic mice. *Oncogene.* 1992; 7(10):2073-6.
- Narayanan BA, Narayanan NK, Simi B, Reddy BS. 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.* 2003; 63(5):972-9.
- Nkondjock A, Shatenstein B, Maisonneuve P, Ghadirian P. Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. *Cancer Detect Prev.* 2003a; 27(1):55-66.
- Nkondjock A, Shatenstein B, Maisonneuve P, Ghadirian P. Assessment of risk associated with specific fatty acids and colorectal cancer among French-Canadians in Montreal: a case-control study. *Int J Epidemiol.* 2003b; 32(2):200-9.
- Norat T, Bingham S, Ferrari F, Slimani N, Jenab M, Mazuir M. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(12):906-16.

- Pai R, Nakamura T, Moon WS, Tarnawski AS. Prostaglandins promote colon cancer cell invasion; signaling by cross-talk between two distinct growth factor receptors. *FASEB J.* 2003; 17(12):1640–7.
- Pories SE, Ramchrren N, Summerhayes I, Steele G. Animal models for colon carcinogenesis. *Arch Surg.* 1993; 128(6):647-53.
- Rao CV, Reddy BS. Modulation effect of amount and types of dietary fat on ornithine decarboxylase, tyrosine protein kinase and prostaglandins production during colon carcinogenesis in male F344 rats. *Carcinogenesis.* 1993; 14(7):1327-33.
- Rao CV, Hirose Y, Indranie C, Reddy BS. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. *Cancer Res.* 2001; 61(5):1927–33.
- Reddy BS. Dietary fat, calories and fiber in colon cancer. *Prev Med.* 1993; 22(5):738-49.
- Roberts CK, Barnard RJ. Effects of exercise and diet on chronic disease. *J Appl Physiol.* 2005; 98(1):3-30.
- Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as chemopreventive agents. *Pharmacol Ther.* 1999; 83(2):217-44.
- Royette CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C. N-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin Nutr.* 2004; 23(2):139-51.
- Saad-Hossne R, Prado RG, Neto AB, Lopes PS, Nascimento SM, Santos CRV, Pracucho EM, Chaves FRP, Ioriatti ES, Siqueira JM. Estudo retrospectivo de pacientes portadores de câncer colorretal atendidos na Faculdade de Medicina de Botucatu no período de 2000-2003. *Rev Bras Coloproct.* 2005; 25(1):31-7.

- Sachse C, Smith G, Wilkie MJV, Barrett JH, Waxman R, Sullivan F, Forman D, Bishop DT, Wolf CR. A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2002; 23(11):1839–49.
- Shao J, Sheng H, Aramandla R, Pereira MA, Lubet RA, Hawk E, Grogan L, Kirsch IR, Washington MK, Beauchamp RD, DuBois RN. Coordinate regulation of cyclooxygenase-2 and TGF- $\beta$ 1 in replication error-positive colon cancer and azoxymethane-induced rat colonic tumors. *Carcinogenesis*. 1999; 20(2):185–91.
- Shigesawa A, Onoda N, Chung YS, Yano Y, Otani S, Fukushima S, Sowa M. Elevation in putrescine level and spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity coincide with tumor development in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon. *Oncol Rep*. 1998; 5(1):125-9.
- Slattery ML, Potter JD, Duncan DM, Berry TD. Dietary fats and colon cancer: assessment of risk associated with specific fatty acids. *Int J Cancer*. 1997; 73(5):670–7.
- Slattery ML, Curtin K, Ma K, Edwards S, Schaffer D, Anderson K, Samowitz W. Diet, activity, and lifestyle associations with p53 mutations in colon tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002; 11(6):541–8.
- Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L, Wolk A. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001a; 93(7):525-33.
- Terry P, Bergkvist L, Holmberg L, Wolk A. No Association between fat and fatty acids intake and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001b; 10(8): 913–4.

Visentainer JV, Carvalho P, Ikegaki M, Park YK. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. *Cienc Tecnol Alim.* 2000; 20(1):90-3.

World Health Organization. Diet, nutrition and prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. Geneva; 2003.

Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett.* 2004; 215(1):1–20.

**ARTIGO II:****Ácidos graxos  $\omega$ -3 e vitamina E: efeitos na carcinogênese experimental do cólon induzida por 1,2-dimetilhidrazina****Resumo**

O câncer colorretal ocupa um lugar de destaque mundial devido à sua alta incidência, sendo um dos tipos de câncer mais afetado pela dieta. O consumo da vitamina E e dos óleos de peixe e soja foi avaliado na formação de focos de criptas aberrantes (FCA) e tumores em ratos Wistar submetidos à carcinogênese colorretal pela aplicação da 1,2-dimetilhidrazina. Os animais foram divididos em quatro grupos: óleo de peixe e vitamina E (OPE), óleo de peixe (OP), óleo de soja e vitamina E (OSE) e óleo de soja (OS). Cada dieta continha 18% de óleo e a vitamina E foi oferecida na dose de 400 mg/Kg de dieta. As dietas foram consumidas pelos animais durante 36 semanas. Os grupos OPE e OP apresentaram redução no número total de FCA quando comparados aos grupos OSE e OS. A incidência e multiplicidade de tumores formados foram menores nos grupos OP e OPE, em relação ao grupo OSE. Houve uma tendência na redução da incidência e multiplicidade de tumores nos grupos OPE e OP quando comparados ao grupo OS. A adição da vitamina E não alterou os FCA, incidência e multiplicidade dos tumores entre os grupos que receberam o mesmo tipo de óleo. O perfil de ácidos graxos do cólon e tecido hepático demonstraram maior incorporação dos AGPI  $\omega$ -3 nos grupos OPE e OP, enquanto nos grupos OSE e OS ocorreu aumento na concentração dos AGPI  $\omega$ -6. A excreção dos AGPI  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 foi semelhante entre os grupos experimentais. As aminas bioativas espermidina, espermina e triptamina, detectadas no tecido hepático, foram semelhantes entre os grupos OPE e OSE.

Verificou-se maior concentração de  $\alpha$ -tocoferol no tecido hepático dos grupos OPE e OSE. Os parâmetros colesterol total e triacilgliceróis foram menores nos grupos OPE e OP. A proteína C reativa e a fosfatase alcalina foram semelhantes entre os grupos estudados. Esses resultados sugerem que o óleo de peixe pode atuar de forma protetora no desenvolvimento do câncer colorretal, independente da vitamina E.

**Termos de indexação:** focos de criptas aberrantes, tumores, óleo de peixe, ácidos graxos polinsaturados, vitamina E.

## 1. Introdução

O câncer colorretal destaca-se mundialmente pela morbidade e mortalidade elevadas porém, situa-se entre os cânceres mais passíveis de prevenção por meio do rastreamento e da adoção de hábitos alimentares adequados. A ocorrência deste câncer tem grande correlação com fatores nutricionais (Reddy, 1993; Slattery et al., 2002; WHO, 2003; Roberts & Barnard, 2005). Estudos indicam que ácidos graxos específicos podem modular o desenvolvimento do câncer colorretal (Nkondjock et al., 2003; Fernandez et al., 1999). Em geral, dietas ricas em ácidos graxos polinsaturados (AGPI)  $\omega$ -6 promovem o desenvolvimento do câncer, enquanto dietas contendo principalmente  $\omega$ -3 podem atenuar o processo (Bartsch et al., 1999; Rose & Connolly, 1999; Larsson et al., 2004; Roynette et al., 2004). Isso é preocupante, uma vez que dietas tipicamente ocidentais são ricas em AGPI  $\omega$ -6 e pobres em  $\omega$ -3.

O óleo de peixe é rico em AGPI  $\omega$ -3 e os mais comuns são o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 $\omega$ -3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 $\omega$ -3). Esses AGPI estão envolvidos em vários processos biológicos e podem proteger contra o desenvolvimento do câncer colorretal, uma vez que modulam a resposta inflamatória e imune (Lands, 1992). A composição de ácidos graxos nos tecidos é reflexo do tipo de lipídio presente na alimentação (Hendrickse et al., 1995). Conseqüentemente, a proporção de AGPI nas membranas celulares será o fator primário na regulação de quais eicosanóides serão gerados (Rose & Connolly, 1999). Assim, aumento na ingestão de  $\omega$ -3 resulta na diminuição da formação dos eicosanóides pró-inflamatórios derivados do ácido araquidônico (AA, 20:4 $\omega$ -6). Os AGPI  $\omega$ -3 também podem influenciar a expressão de genes, moléculas transdutoras de sinais e a atividade de enzimas como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a ornitina

decarboxilase (ODC) (Lamuraglia et al., 1986; Davidson et al., 1999; Narayanan et al., 2003; Cheng et al., 2003; Llor et al., 2003).

A enzima ODC promove a decarboxilação da ornitina, originando a putrescina e que por sua vez, pode ser convertida em espermidina e espermina. Essas aminas são essenciais para o crescimento, renovação e metabolismo celular (Medina et al., 2003) e tem sido sugerido que no ciclo celular regulam a degradação de ciclinas (Thomas & Thomas, 2001) e os “checkpoints” (Kramer et al., 2001; Oredsson, 2003). Células cancerosas têm apresentado concentrações elevadas de putrescina, espermidina e espermina devido ao aumento da ODC e a inibição na biossíntese dessas aminas tem sido utilizada como estratégia de tratamento do câncer (Wallace et al., 2003)

Como os ácidos graxos  $\omega$ -3 possuem insaturações na molécula, tornam-se propensos à peroxidação que se inicia pelo ataque de algumas espécies reativas, levando à formação de radicais de ácidos graxos que ao reagirem espontaneamente com o oxigênio originam radicais peroxila. A propagação da reação em cadeia da peroxidação lipídica pode ocorrer pela retirada dos átomos de hidrogênio e formação de hidroperóxidos e novos radicais de ácidos graxos. Assim, ocorre oxidação de mais moléculas de ácidos graxos, acentuando o estresse oxidativo (Fang et al., 2002). O estresse oxidativo tem sido considerado um fator importante no desenvolvimento do câncer por causar danos ao DNA (Guyton & Kensler, 1993; Gasche et al., 2001).

A vitamina E atua como um dos principais antioxidantes lipossolúveis ao transferir seu hidrogênio fenólico para o radical peroxila do AGPI peroxidado. Desta forma, essa vitamina pode impedir a reação em cadeia e prevenir a peroxidação de outros AGPI nas membranas celulares (Fang et al., 2002).

O desenvolvimento do câncer colorretal envolve vários processos de alterações genotípicas e fenotípicas, que morfologicamente podem se apresentar como alterações microscópicas discretas da mucosa, denominadas focos de criptas aberrantes (FCA). Os FCA são considerados lesões pré-neoplásicas da mucosa colônica, utilizados como marcadores para o risco de desenvolvimento do câncer colorretal e podem ser induzidos, quimicamente, pela administração dos carcinógenos 1,2-dimetilhidrazina (DMH) ou azoximetano (AOM) em animais de experimentação (Bird, 1987; Bird, 1995).

Este estudo investigou o efeito do óleo de peixe e vitamina E na carcinogênese colorretal induzida pela DMH em ratos Wistar, comparado com o do óleo de soja em quantidades isocalóricas. Foram feitas análises dos FCA e dos tumores. O perfil de ácidos graxos do cólon, fígado e fezes foi traçado e aminas bioativas e outros biomarcadores foram avaliados

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Animais e Dietas

Foram utilizados no estudo 36 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, Rodentia), com 11 semanas de idade e peso médio de  $248,5 \pm 5,20$  g. Os animais permaneceram no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa durante todo o período experimental, recebendo dieta e água *ad libitum*. Foram mantidos em gaiolas coletivas de polietileno, contendo 3 a 4 animais por gaiola, em ciclos de claro/escuro de 12 horas à temperatura de  $23,7 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $70,2 \pm 7,5\%$ .

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais de acordo com a dieta recebida:

- óleo de peixe + vitamina E: OPE (n=10);
- óleo de peixe: OP (n=10);
- óleo de soja + vitamina E: OSE (n=10);
- óleo de soja: OS (n=6).

A composição das dietas experimentais (Tabela 1) foi baseada no American Institute of Nutrition (Reeves et al., 1993), seguindo o protocolo AIN-93M, recomendado para a manutenção de animais adultos. O conteúdo de AGPI  $\omega$ -3 baseou-se na recomendação da Organização Mundial da Saúde (2003) de 1% das calorias totais provenientes desses ácidos graxos, correspondendo a 2 g de  $\omega$ -3. Todas as dietas apresentaram o mesmo percentual lipídico, 18%, simulando a dieta ocidental. O  $\omega$ -3 foi obtido na forma de cápsulas de 500 mg de óleo de peixe (All Chemistry<sup>®</sup>, Brasil). A composição de ácidos graxos dos óleos utilizados (peixe e soja) é mostrada na Tabela 2. Para os grupos que receberam vitamina E, foram acrescentados 400 mg/Kg de dieta da vitamina (All Chemistry<sup>®</sup>, Brasil). A vitamina

E e os óleos foram adicionados às dietas na ausência de luz ultravioleta. Após a confecção das dietas na forma de *pellets*, estas foram armazenadas entre 0 a 4°C, protegidas da luz até o momento de sua utilização. As dietas foram consumidas por um período de 36 semanas. O consumo das dietas e o peso dos animais foram monitorados semanalmente, ao longo de todo o experimento.

**Tabela 1.** Composição das dietas experimentais utilizadas (g/100 g de dieta)

<b>Ingredientes</b>	<b>g/100 g</b>
Amido de milho (qsp)	31,47
Amido dextrinizado	15,5
Sacarose	10,0
Caseína	15,1
Óleo (peixe ou soja)	18,0
Celulose	5,0
Mistura de vitaminas	1,0
Mistura de minerais	3,5
L-cistina	0,18
Bitartarato de colina	0,25

Fonte: Reeves et al., (1993).

**Tabela 2.** Composição de ácidos graxos dos óleos de peixe e soja (%)

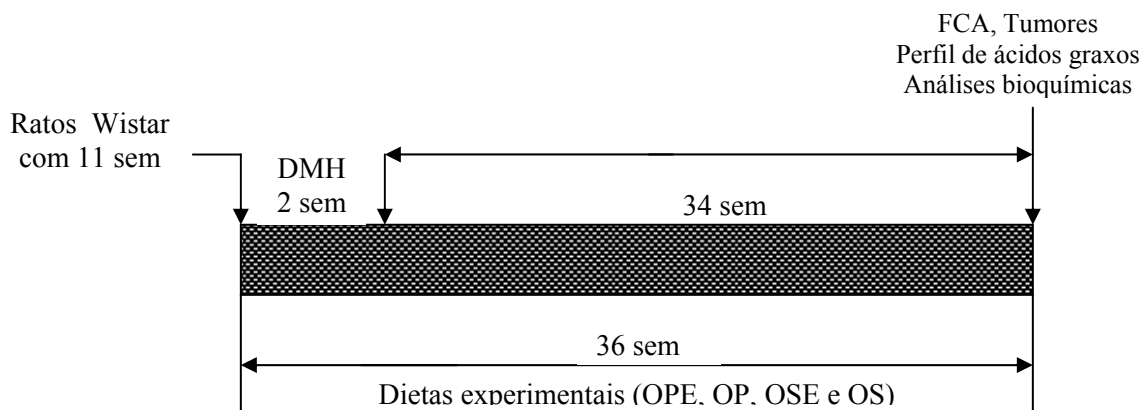
Ácidos graxos	Óleo de Peixe	Óleo de Soja
<b>C14:0</b>	5,86 ± 0,06	NI
<b>C15:0</b>	0,22 ± 0,00	NI
<b>C16:0</b>	10,76 ± 0,30	7,75 ± 0,16
<b>C17:0</b>	0,50 ± 0,01	NI
<b>C18:0</b>	3,60 ± 0,10	3,01 ± 0,07
<b>C20:0</b>	0,48 ± 0,03	NI
<b>C22:0</b>	NI	0,34 ± 0,00
<b>C16:1</b>	6,60 ± 0,15	NI
<b>C18:1<math>\omega</math>-9</b>	9,98 ± 0,56	21,36 ± 0,50
<b>C20:1</b>	1,08 ± 0,20	NI
<b>C20:2</b>	3,05 ± 0,17	NI
<b>C18:2<math>\omega</math>-6</b>	2,78 ± 0,09	60,75 ± 1,79
<b>C20:4<math>\omega</math>-6</b>	0,73 ± 0,04	NI
<b>C22:2<math>\omega</math>-6</b>	0,87 ± 0,02	NI
<b>C18:3<math>\omega</math>-3</b>	0,80 ± 0,04	6,93 ± 0,11
<b>C20:5<math>\omega</math>-3</b>	24,01 ± 1,07	NI
<b>C22:6<math>\omega</math>-3</b>	19,82 ± 1,15	NI
<b>Total <math>\omega</math>-6</b>	4,37 ± 0,15	60,75 ± 1,79
<b>Total <math>\omega</math>-3</b>	44,63 ± 2,24	6,93 ± 0,11

A composição de ácidos graxos foi determinada conforme descrito em Materiais e Métodos. Resultados expressos como média ± desvio-padrão de 3 repetições. NI = Não identificado.

## 2.2. Indução da Carcinogênese Colorretal

O agente químico utilizado para a indução da carcinogênese colorretal foi 1,2-dimetilhidrazina – DMH (Aldrich<sup>®</sup>, EUA), preparado imediatamente antes do uso, sendo dissolvido em solução de NaCl 0,9% com 1,5% de EDTA e o pH final ajustado para 6,5

com uma solução de NaOH 1 N (Larangeira et al., 1998). Todos os animais receberam quatro injeções subcutâneas de DMH, em doses de 40 mg/kg de peso corporal, sendo duas aplicações por semana em dias alternados (Rodrigues et al., 2002). Os animais foram eutanasiados na trigésima quarta semana contada a partir da última aplicação da DMH, após jejum de 12 horas, por asfixia com gás carbônico. O desenho experimental está esquematizado na Figura 1.



Dietas experimentais: OP, 18% de óleo de peixe;  
 OS, 18% de óleo de soja;  
 OPE, 18% de óleo de peixe + vitamina E (400 mg/Kg de dieta);  
 OSE, 18% de óleo de soja + vitamina E (400 mg/Kg de dieta).

**Figura 1** – Desenho experimental. Ratos Wistar com 11 semanas, foram divididos nos grupos OPE (n=10), OP (n=10), OSE (n=10) e OS (n=6). A DMH foi administrada durante duas semanas em quatro aplicações de 40 mg/kg de peso corporal cada.

O intestino grosso e o fígado foram removidos dos animais. Foi retirado um fragmento de 1,5 cm do intestino grosso para a análise do perfil de ácidos graxos. Esse fragmento do intestino e o fígado foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a 80 °C negativos,

até as análises. O sangue foi coletado para obtenção do soro e plasma. As fezes foram coletadas durante cinco dias que antecederam a eutanásia e mantidas a 20 °C negativos.

### **2.3. Contagem e Categorização dos FCA**

O intestino grosso foi removido para quantificação e categorização dos FCA. Após a retirada, o intestino foi lavado em solução salina fisiológica, aberto longitudinalmente pela banda contra mesentérica, colocado em placas de parafina, com a mucosa voltada para a parte superior da placa, tendo as extremidades fixadas por alfinetes, e então o intestino foi fixado em formol a 10%, por 24 horas. Após a fixação, o intestino foi medido e dividido em três segmentos iguais denominados de segmento proximal, médio e distal em relação ao ceco. Para a contagem dos FCA, os segmentos foram corados em solução de azul de metileno a 0,1%, por dois minutos e lavados em tampão fosfato. A contagem das lesões foi realizada por microscopia óptica com aumento de 10X, de acordo com a técnica de Bird (1987). Os FCA foram contados em toda a superfície mucosa do intestino grosso, do ceco ao reto, por dois observadores de maneira duplo-cega. A categorização dos FCA foi com base no número de criptas aberrantes por foco, ou seja, focos com três ou menos criptas e focos com mais de três criptas.

O percentual de redução dos FCA foi obtido pela seguinte fórmula: Percentual de Redução =  $100 - (100/\text{Potência de redução})$ , sendo a potência de redução dos FCA calculada, dividindo-se a média do número de FCA do grupo OS ou OSE pela média de FCA do grupo OP ou OPE.

#### **2.4. Análise dos Tumores**

Os tumores foram computados e medidos (tamanho = altura + diâmetros), utilizando-se um paquímetro. Os tumores intestinais fixados em formol foram preparados para análise histopatológica de forma convencional, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em blocos de parafina para a realização dos cortes de 4  $\mu\text{m}$ . Em seguida, as lâminas obtidas foram coradas com hematoxilina e eosina e examinadas em microscópio óptico, nos aumentos de 10, 20 e 40X. Os tumores foram classificados em adenomas ou carcinomas, de acordo com Pozhariski (1975).

#### **2.5. Extração dos Lipídios e Análise dos Ácidos Graxos**

Foi utilizado o método de Folch et al. (1957) para a extração dos lipídios totais do cólon, fígado e fezes. A porção do cólon analisada refere-se à região entre os segmentos médio e distal. Os extratos obtidos e os óleos utilizados na confecção das dietas foram saponificados e esterificados, segundo o método de Hartman & Lago (1973), sendo acrescentado nesta etapa o ácido tridecanoico - C13:0 (Sigma-aldrich<sup>®</sup>, EUA) como padrão interno.

A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa pela comparação dos tempos de retenção dos ésteres das amostras com padrões de referência (Sigma-aldrich<sup>®</sup>, EUA), utilizando o cromatógrafo a gás GC 17 A Shimadzu/Class GC 10, equipado com coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 de 100 m e 0,25 mm de diâmetro interno e detector de ionização de chama. Os parâmetros de programação utilizados foram:

- Temperatura do detector: 270 °C;
- Temperatura do injetor: 250 °C;
- Temperatura da coluna: aquecimento a 10 °C/minuto de 180 a 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos.

O gás de arraste foi o nitrogênio, fluxo da coluna de 0,6 mL/minuto, velocidade linear de 14 cm/segundo, razão da divisão da amostra no injetor de 1:75, fluxo total de 52 mL/minuto e pressão da coluna de 167 Kpa.

A quantificação de cada ácido graxo nas amostras foi realizada, utilizando-se as seguintes equações (Satchithanandam et al., 2002):

$$R_i = (A(i))(Peso_{13:0})/(A_{13:0})(Peso(i))$$

$R_i$  é o fator resposta para cada ácido graxo do padrão de referência;  $A(i)$  = área do ácido graxo do padrão;  $Peso_{13:0}$  = peso (mg) do padrão interno (C13:0);  $A_{13:0}$  = área do padrão interno (C13:0) e  $Peso(i)$  = peso (mg) do ácido graxo no padrão.

$$AG_i = (A(i))(Peso_{13:0})(1.006)/(A_{13:0})(R_i)$$

$AG_i$  é a quantidade do éster metílico do ácido graxo na amostra;  $A(i)$  = área do ácido graxo na amostra;  $Peso_{13:0}$  = peso (mg) do padrão interno (C13:0) na amostra;  $A_{13:0}$  = área do padrão interno (C13:0) na amostra.

$$AG = (AG_i)(F_{AG})$$

Multiplicou-se  $AG_i$  pelo  $F_{AG}$  (fator de conversão teórico), convertendo o éster metílico em seu correspondente ácido graxo livre. O conteúdo de ácidos graxos foi expresso como mg/100 mg de lipídio total presente nos óleos, tecidos e nas fezes.

## 2.6. Determinação das Aminas Bioativas

O perfil e os teores de aminas bioativas (putrescina, cadaverina, tiramina, histamina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina, 2-feniletilamina e triptamina) foram investigados no tecido hepático de animais pertencentes aos grupos OPE e OSE. A extração das aminas foi realizada de acordo com Vale & Glória (1997). As aminas bioativas foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por pareamento de íons em coluna de fase reversa e quantificadas por fluorimetria após derivação pós coluna com *o*-ftaldialdeído e detectadas por fluorescência a 340 e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente (Vale & Glória, 1997). O cromatógrafo utilizado consistiu em equipamento Shimadzu. Foi utilizada coluna  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> de fase reversa (3,9 x 300 mm, 10  $\mu$ m) e pré-coluna  $\mu$ Bondapak. Foram empregadas duas fases móveis no processo: A, composta por solução tampão contendo acetato de sódio 0,2 M e octanossulfonato de sódio 15 mM, com pH ajustado para 4,9 com ácido acético glacial; e B, constituída por acetonitrila. As fases móveis foram utilizadas num fluxo de 0,8 mL/minuto e o gradiente de eluição (tempo (minuto)/ % B) foi 0,01/11; 13/11; 19/26; 24/11; 45/11 e término aos 55 minutos. A identificação das aminas foi feita por comparação entre o tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com os da solução padrão, contendo as dez aminas. A quantificação foi feita por interpolação em curva padrão para cada amina. Para a obtenção das concentrações finais, os valores foram multiplicados pelo fator de correção correspondente a cada amina para o fígado, obtidos a partir dos percentuais de recuperação das aminas.

## 2.7. Determinação de $\alpha$ -Tocoferol

A extração do  $\alpha$ -tocoferol presente no plasma, fígado e fezes foi baseada no método de Ueda & Igarashi (1990), e o procedimento de determinação do  $\alpha$ -tocoferol foi realizado em aparelho para CLAE com detector espectrofotométrico UV-visível de arranjos de diodos (Shimadzu). Foi utilizada coluna Lichrospher, RP-18 (4,0 x 250 mm, 5  $\mu$ m). A fase móvel utilizada consistiu de uma mistura de acetonitrila, metanol e hexano na proporção de 3:95:2 e o fluxo foi 1 mL/minuto com tempo de corrida de 10 minutos. O comprimento de onda utilizado no detector correspondeu à absorvância máxima do  $\alpha$ -tocoferol, 295 nm.

Para o preparo do padrão vitamínico, foram utilizados 10 mg de  $\alpha$ -tocoferol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA), que foi dissolvido em etanol a 96%, resultando numa solução estoque de 100  $\mu$ g/mL. Em seguida, foi efetuada a varredura do espectro de absorção da solução padrão na faixa ultravioleta, utilizando os comprimentos de onda de 190 a 350 nm. Para o cálculo da concentração real da solução padrão, utilizou-se o coeficiente de absorvância molar ( $E_{1\%1cm}$ ) = 70,8. A partir das equações de regressão linear calculou-se os valores das concentrações de  $\alpha$ -tocoferol nas amostras provenientes do plasma, fígado e fezes.

## 2.8. Análises Bioquímicas

Amostras de sangue coletadas no momento da eutanásia foram centrifugadas (3500 rpm) por 15 minutos e o soro foi imediatamente utilizado para a análise de proteína C reativa (PCR), fosfatase alcalina, triacilgliceróis e colesterol total e frações. Todos os parâmetros foram determinados por kits comerciais (Bioclin<sup>®</sup>, Brasil).

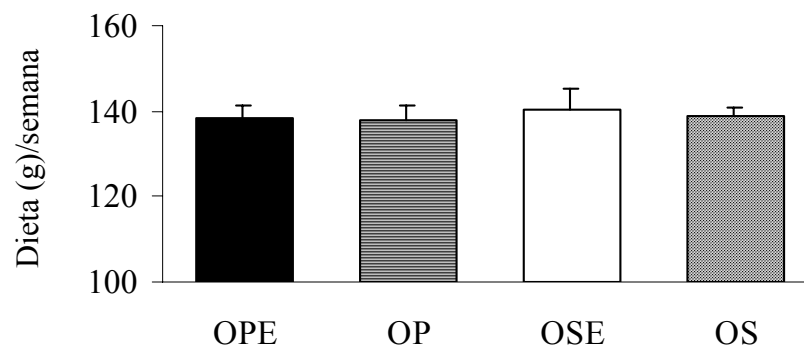
## **2.9. Análise Estatística**

Foi utilizado o software SigmaStat, na versão 3.0, para análise estatística. As comparações entre três ou mais grupos independentes foram realizadas por análise de variância (ANOVA) para dados com a distribuição normal e pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis para os dados sem distribuição normal. Quando houve diferença estatística, utilizaram-se os testes de comparações múltiplas de Tukey (ANOVA) ou de Dunn (Kruskal Wallis) para detectar os grupos que diferiram. O teste t foi utilizado para comparação do teor de amins bioativas e percentual de ácidos graxos entre dois grupos independentes. O teste exato de Fisher foi empregado na análise de incidência de tumores. O valor de p foi fixado até 5% com o intuito de obter uma confiabilidade de 95% nas comparações. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão e os dados sem distribuição normal foram apresentados também como mediana.

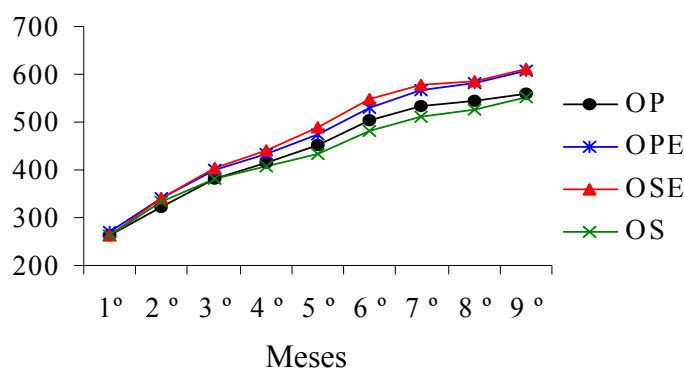
### 3. Resultados

#### 3.1. Consumo das Dietas e Peso dos Animais

A adição da vitamina E e o tipo de óleo (em quantidades isocalóricas) não afetaram a ingestão alimentar e o peso dos animais, uma vez que não houve diferença significativa no consumo alimentar entre os grupos OP, OPE, OSE e OS ( $p>0,05$ ) e a evolução do peso também foi semelhante ( $p>0,05$ ) ao longo do experimento. O consumo das dietas e a evolução do peso dos animais estão apresentados na Figura 2 e 3, respectivamente. Ocorreu perda de um animal do grupo OS.



**Figura 2** - Consumo semanal médio das dietas por animal. O consumo alimentar não diferiu ( $p=0,813$ ) entre os grupos submetidos à carcinogênese colorretal pela administração da DMH. Óleo de peixe e vitamina E (OPE), óleo de peixe (OP), óleo de soja e vitamina E (OSE) e óleo de soja (OS).



**Figura 3** - Evolução do peso médio mensal dos animais tratados com DMH. O peso foi semelhante ( $p>0,05$ ) entre os grupos óleo de peixe e vitamina E (OPE), óleo de peixe (OP), óleo de soja e vitamina E (OSE) e óleo de soja (OS).

### 3.2. Focos de Criptas Aberrantes

O número total e a categorização dos FCA são apresentados na Tabela 3. A distribuição dos FCA, por segmento, é apresentada na Tabela 4.

**Tabela 3.** Média do número de FCA totais e categorização das criptas no intestino grosso de animais tratados com DMH

Focos de Criptas Aberrantes			
Grupo	Total	$\leq 3$	$>3$
OPE	$113,55 \pm 22,04^b$	$90,55 \pm 14,99^b$	$23,00 \pm 10,16^{ab}$
OP	$104,50 \pm 35,67^b$	$87,05 \pm 30,81^b$	$17,45 \pm 11,34^b$
OSE	$214,60 \pm 58,85^a$	$184,35 \pm 46,50^a$	$30,25 \pm 18,37^{ab}$
OS	$223,70 \pm 35,40^a$	$183,10 \pm 25,80^a$	$40,60 \pm 14,11^a$

<sup>a,b</sup> Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 4.** Média do número de FCA, por segmento do intestino grosso, dos animais tratados com DMH

Grupo	FCA/segmento		
	Proximal	Médio	Distal
OPE	10,80 ± 5,79 <sup>aby</sup>	56,45 ± 16,27 <sup>bx</sup>	46,30 ± 22,26 <sup>bx</sup>
OP	8,00 ± 3,08 <sup>by</sup>	46,60 ± 26,19 <sup>bx</sup>	49,90 ± 18,11 <sup>bx</sup>
OSE	18,80 ± 11,34 <sup>ay</sup>	87,40 ± 27,27 <sup>ax</sup>	108,40 ± 39,50 <sup>ax</sup>
OS	18,50 ± 5,99 <sup>aby</sup>	94,20 ± 13,15 <sup>ax</sup>	111,00 ± 31,31 <sup>ax</sup>

<sup>a,b</sup> Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

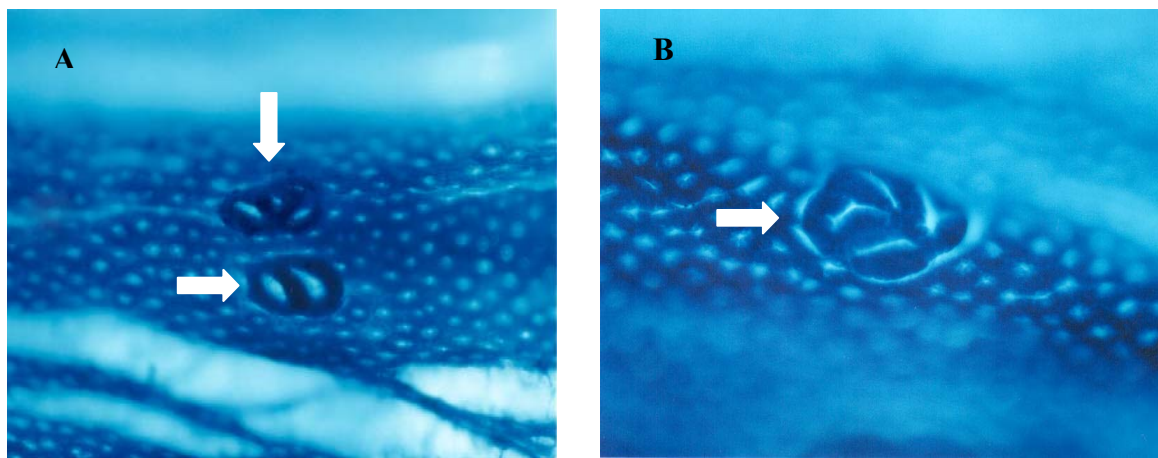
<sup>x,y</sup> Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se que houve redução no número total de FCA nos grupos tratados com óleo de peixe (OP e OPE) em relação aos grupos pertencentes ao óleo de soja (OS e OSE). A redução de FCA totais foi 53,3% para OP e 49,2% para OPE comparados ao grupo OS. Também houve uma redução importante nos FCA totais dos grupos OP e OPE em relação ao OSE, 51,2% e 47,1%, respectivamente. Os segmentos médio e distal, de todos os grupos experimentais, apresentaram maior número de FCA quando comparados ao proximal ( $p < 0,05$ ).

Os grupos OP e OPE apresentaram redução no número de FCA com menos e mais de três criptas comparados aos grupos OS e OSE. Para o grupo OP, a redução foi de 52,4% (FCA $\leq$ 3) e 57,1% (FCA $>$ 3) em relação ao grupo OS e de 52,8% (FCA $\leq$ 3) e 42,2% (FCA $>$ 3) em relação ao OSE. O grupo OPE apresentou redução de 50,7% (FCA $\leq$ 3) e

43,2% (FCA>3) em relação ao grupo OS e de 50,7% (FCA $\leq$ 3) e 23,7% (FCA>3) em relação ao OSE.

A adição da vitamina E na concentração de 400 mg/Kg de dieta não acarretou diferença significativa entre os grupos OP e OPE e nem entre OS e OSE, uma vez que os FCA totais e o número de FCA por segmento foram semelhantes ( $p>0,05$ ). A vitamina E também não acarretou diferença significativa na incidência dos focos com mais de três criptas aberrantes entre os grupos com o mesmo tipo de óleo. A Figura 4 apresenta FCA observados na mucosa colônica dos animais.



**Figura 4** – Focos de criptas aberrantes (FCA) observados na superfície da mucosa colônica corada com azul de metileno (0,1%) de ratos submetidos à carcinogênese colorretal. Aumento de 100X. A - Dois FCA: um foco com quatro criptas aberrantes e um foco com duas criptas aberrantes; B - Um foco com quatro criptas aberrantes (Oliveira & Chaves-Dias, 2003).

### 3.3. Tumores

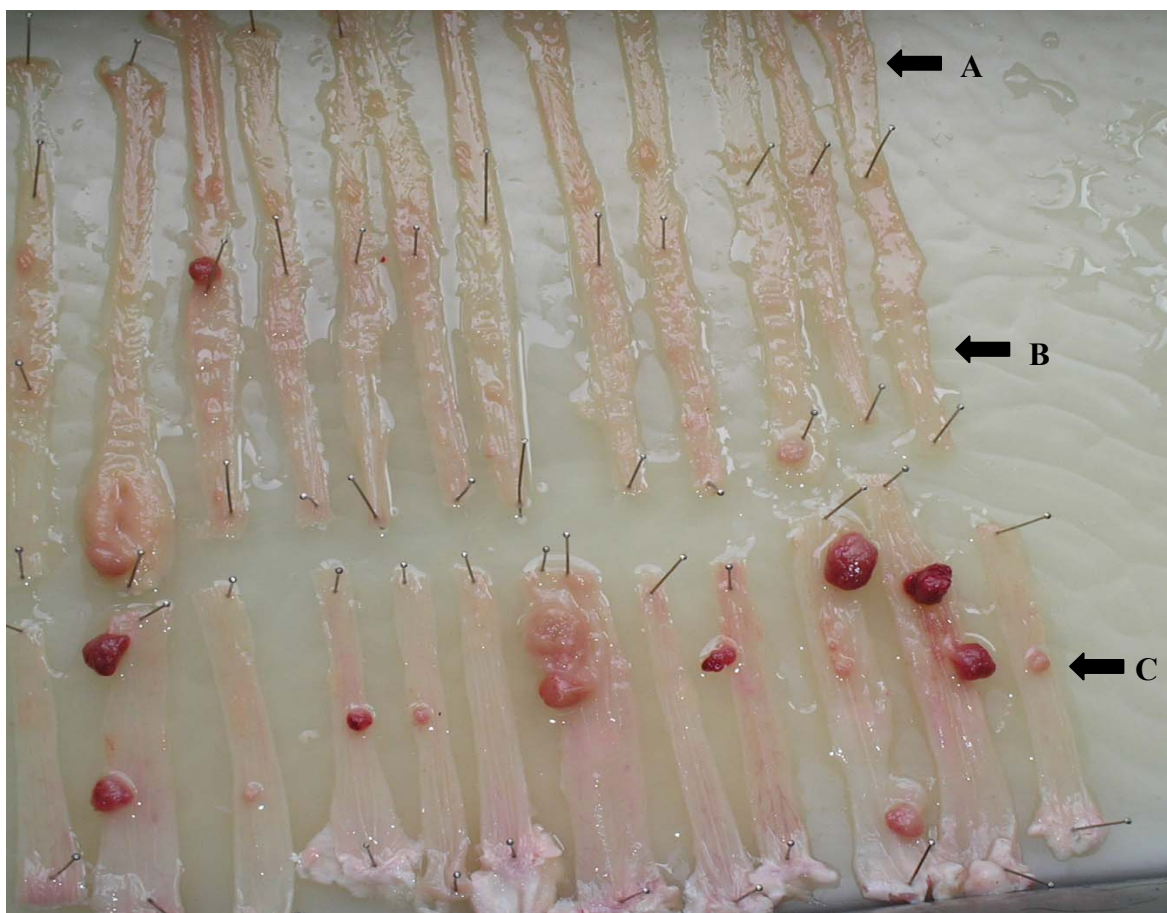
A incidência de tumores e a multiplicidade (tumor/animal) são apresentadas na Tabela 5. A incidência de tumores no grupo OSE foi maior que nos grupos OP e OPE ( $p < 0,05$ ). A multiplicidade de tumores também foi significativamente maior no grupo OSE em relação aos grupos OP e OPE. Esse aumento na incidência e multiplicidade de tumores no grupo OSE foi devido à formação de adenomas. O grupo OS apresentou maior incidência e multiplicidade de tumores em relação aos grupos OP e OPE, entretanto, essa diferença não foi significativa ( $p > 0,05$ ). A incidência de carcinomas não apresentou diferença entre os quatro grupos. A Figura 5 apresenta tumores formados no intestino grosso dos animais. O tamanho dos tumores (cm) não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos OPE ( $1,19 \pm 0,25$ ), OP ( $1,20 \pm 0,32$ ), OSE ( $1,12 \pm 0,49$ ) e OS ( $1,18 \pm 0,37$ ).

**Tabela 5.** Incidência e multiplicidade de tumores em ratos Wistar submetidos à carcinogênese colorretal pela DMH

Grupo	Incidência de tumor (% de animais com tumor)			Multiplicidade de tumor*
	Total	Adenoma	Carcinoma	
OPE (n=10)	30 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>	20 <sup>a</sup>	0 <sup>y</sup> ( $0,40 \pm 0,69$ )
OP (n=10)	30 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>y</sup> ( $0,40 \pm 0,69$ )
OSE (n=10)	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	1 <sup>x</sup> ( $1,50 \pm 0,97$ )
OS (n=5)	60 <sup>ab</sup>	60 <sup>ab</sup>	40 <sup>a</sup>	1 <sup>xy</sup> ( $1,20 \pm 1,30$ )

<sup>a,b</sup> Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste exato de Fisher.

\*Teste de Kruskal-Wallis para comparação da multiplicidade de tumores entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ). <sup>x,y</sup> Medianas (média  $\pm$  desvio-padrão) seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 5** – Ilustração fotográfica dos tumores formados no intestino grosso de animais submetidos à carcinogênese pela administração de DMH. Segmentos: (A) proximal, (B) médio e (C) distal.

### 3.4. Perfil de Ácidos Graxos

A composição de ácidos graxos do cólon, tecido hepático e fezes nos diferentes grupos experimentais, encontram-se nas Tabelas 6, 7 e 8, respectivamente. Os grupos que receberam óleo de peixe apresentaram maior concentração ( $p < 0,05$ ) de ácidos graxos  $\omega$ -3 no cólon e no tecido hepático quando comparados aos grupos pertencentes ao óleo de soja. O inverso ocorreu para os ácidos graxos  $\omega$ -6. A excreção de ácidos AGPI  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 foi semelhante entre os grupos estudados (Figura 6).

O ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3 $\omega$ -3) apresentou-se em maior quantidade no tecido hepático dos grupos OSE e OS comparados aos animais dos grupos OP e OPE ( $p < 0,05$ ). Também foi observada maior quantidade do AA no fígado e cólon dos grupos OSE e OS ( $p < 0,05$ ). O EPA foi identificado somente no cólon e fígado dos grupos OPE e OP, enquanto o DHA foi encontrado no tecido de todos os grupos experimentais, inclusive nas fezes. Entretanto, a concentração de DHA foi maior ( $p < 0,05$ ) nos tecidos dos animais que receberam óleo de peixe (OP e OPE).

**Tabela 6.** Perfil de ácidos graxos no cólon de ratos Wistar submetidos à carcinogênese colorretal

Ácidos graxos	Percentual de ácidos graxos			
	OPE	OP	OSE	OS
<b>C14:0</b>	1,37 ± 0,36 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,56 <sup>a</sup>	NI	NI
<b>C15:0</b>	0,15 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,05 <sup>a</sup>	NI	NI
<b>C16:0</b>	8,06 ± 1,20 <sup>a</sup>	6,95 ± 0,59 <sup>a</sup>	3,83 ± 0,41 <sup>b</sup>	3,97 ± 0,19 <sup>b</sup>
<b>C18:0</b>	4,02 ± 0,79 <sup>a</sup>	3,09 ± 1,25 <sup>a</sup>	4,21 ± 1,13 <sup>a</sup>	4,08 ± 0,60 <sup>a</sup>
<b>C16:1</b>	2,65 ± 0,56 <sup>a</sup>	2,60 ± 0,55 <sup>a</sup>	NI	NI
<b>C18:1<math>\omega</math>-9</b>	7,75 ± 1,87 <sup>a</sup>	8,71 ± 1,49 <sup>a</sup>	4,39 ± 0,65 <sup>b</sup>	5,02 ± 1,75 <sup>b</sup>
<b>C20:1</b>	0,32 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,08 <sup>a</sup>	NI	NI
<b>C18:2<math>\omega</math>-6</b>	2,12 ± 0,34 <sup>b</sup>	2,24 ± 0,56 <sup>b</sup>	5,43 ± 1,94 <sup>a</sup>	5,18 ± 0,23 <sup>a</sup>
<b>C20:3<math>\omega</math>-6</b>	NI	NI	0,81 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,14 <sup>a</sup>
<b>C20:4<math>\omega</math>-6</b>	1,71 ± 0,55 <sup>b</sup>	1,58 ± 0,43 <sup>b</sup>	4,19 ± 1,39 <sup>a</sup>	4,44 ± 0,87 <sup>a</sup>
<b>C20:5<math>\omega</math>-3</b>	2,71 ± 0,64 <sup>a</sup>	2,89 ± 0,40 <sup>a</sup>	NI	NI
<b>C22:6<math>\omega</math>-3</b>	5,47 ± 0,83 <sup>a</sup>	5,59 ± 0,29 <sup>a</sup>	1,71 ± 0,54 <sup>b</sup>	1,96 ± 0,47 <sup>b</sup>

ANOVA ou teste t. <sup>a,b</sup> Valores (média ± desvio-padrão) seguidos da mesma letra, na linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade. Grupos: óleo de peixe e vitamina E (OPE, n=6), óleo de peixe (OP, n=6), óleo de soja e vitamina E (OSE, n=6) e óleo de soja (OS, n=5). NI = Não identificado.

**Tabela 7.** Perfil de ácidos graxos no tecido hepático de ratos Wistar submetidos à carcinogênese colorretal

Ácidos graxos	Percentual de ácidos graxos			
	OPE	OP	OSE	OS
<b>C14:0</b>	0,54 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,16 <sup>a</sup>	NI	NI
<b>C15:0</b>	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,03 <sup>a</sup>	NI	NI
<b>C16:0</b>	10,79 ± 0,99 <sup>a</sup>	9,96 ± 2,11 <sup>a</sup>	11,09 ± 0,94 <sup>a</sup>	11,05 ± 1,51 <sup>a</sup>
<b>C18:0</b>	5,99 ± 1,07 <sup>a</sup>	5,53 ± 1,14 <sup>a</sup>	4,40 ± 1,11 <sup>a</sup>	5,23 ± 0,80 <sup>a</sup>
<b>C16:1</b>	2,56 ± 0,92 <sup>a</sup>	2,71 ± 0,92 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,23 <sup>b</sup>	0,54 ± 0,19 <sup>b</sup>
<b>C18:1<math>\omega</math>-9</b>	9,82 ± 0,83 <sup>a</sup>	10,48 ± 0,94 <sup>a</sup>	12,28 ± 0,88 <sup>a</sup>	11,73 ± 1,29 <sup>a</sup>
<b>C20:1</b>	0,25 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,09 <sup>a</sup>	NI	NI
<b>C20:2</b>	0,46 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,10 <sup>a</sup>	NI	NI
<b>C18:2<math>\omega</math>-6</b>	4,23 ± 0,98 <sup>b</sup>	3,52 ± 0,71 <sup>b</sup>	32,99 ± 2,87 <sup>a</sup>	29,28 ± 6,99 <sup>a</sup>
<b>C18:3<math>\omega</math>-6</b>	NI	NI	0,97 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,19 <sup>a</sup>
<b>C20:3<math>\omega</math>-6</b>	NI	NI	0,64 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,11 <sup>a</sup>
<b>C20:4<math>\omega</math>-6</b>	3,86 ± 0,88 <sup>b</sup>	3,08 ± 0,65 <sup>b</sup>	7,50 ± 1,03 <sup>a</sup>	7,66 ± 1,18 <sup>a</sup>
<b>C22:2<math>\omega</math>-6</b>	0,64 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,16 <sup>a</sup>	NI	NI
<b>C18:3<math>\omega</math>-3</b>	0,69 ± 0,24 <sup>b</sup>	0,69 ± 0,25 <sup>b</sup>	1,99 ± 0,29 <sup>a</sup>	2,08 ± 0,10 <sup>a</sup>
<b>C20:5<math>\omega</math>-3</b>	9,80 ± 2,65 <sup>a</sup>	10,04 ± 2,24 <sup>a</sup>	NI	NI
<b>C22:6<math>\omega</math>-3</b>	23,91 ± 1,69 <sup>a</sup>	19,60 ± 3,93 <sup>b</sup>	4,47 ± 0,83 <sup>c</sup>	4,24 ± 1,14 <sup>c</sup>

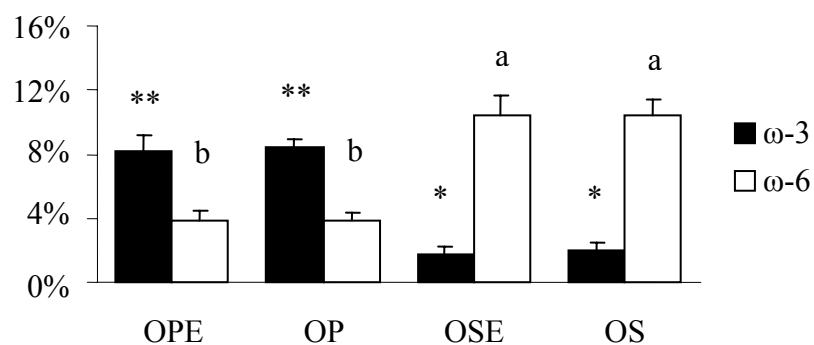
ANOVA ou teste t. <sup>a,b</sup> Valores (média ± desvio-padrão) seguidos da mesma letra, na linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade. Grupos: óleo de peixe e vitamina E (OPE, n=6), óleo de peixe (OP, n=6), óleo de soja e vitamina E (OSE, n=6) e óleo de soja (OS, n=5). NI = Não identificado.

**Tabela 8.** Perfil de ácidos graxos nas fezes de ratos Wistar submetidos à carcinogênese colorretal

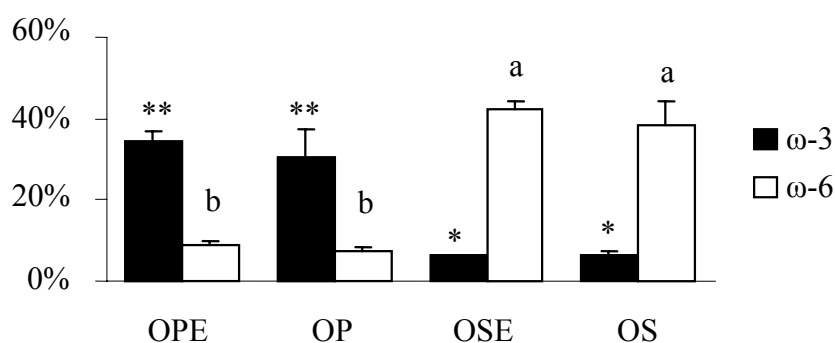
Ácidos graxos	Percentual de ácidos graxos			
	OPE	OP	OSE	OS
<b>C14:0</b>	1,03 ± 0,16 <sup>b</sup>	1,38 ± 0,50 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,27 ± 0,00 <sup>c</sup>
<b>C15:0</b>	0,35 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,03 <sup>b</sup>
<b>C16:0</b>	7,50 ± 1,03 <sup>a</sup>	9,23 ± 0,43 <sup>b</sup>	7,20 ± 0,55 <sup>b</sup>	7,41 ± 1,00 <sup>b</sup>
<b>C17:0</b>	0,59 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,70 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>c</sup>
<b>C18:0</b>	5,61 ± 0,43 <sup>a</sup>	6,44 ± 0,16 <sup>a</sup>	7,33 ± 0,26 <sup>a</sup>	7,40 ± 1,49 <sup>a</sup>
<b>C20:0</b>	0,60 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,59 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,77 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,11 ± 0,18 <sup>a</sup>
<b>C22:0</b>	0,49 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,39 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,24 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,24 ± 0,02 <sup>a</sup>
<b>C24:0</b>	1,10 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,06 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,08 <sup>a</sup>
<b>C16:1</b>	0,34 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,03 <sup>a</sup>	NI	NI
<b>C18:1<math>\omega</math>-9</b>	1,39 ± 0,24 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,37 <sup>a</sup>	2,11 ± 0,39 <sup>a</sup>	2,33 ± 0,25 <sup>a</sup>
<b>C18:2<math>\omega</math>-6</b>	0,62 ± 0,06 <sup>bc</sup>	0,57 ± 0,07 <sup>c</sup>	1,75 ± 0,34 <sup>a</sup>	1,34 ± 0,13 <sup>ab</sup>
<b>C20:4<math>\omega</math>-6</b>	NI	NI	0,22 ± 0,04	NI
<b>C24:1<math>\omega</math>-6</b>	1,75 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,90 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,45 <sup>a</sup>	1,29 ± 0,12 <sup>a</sup>
<b>C22:6<math>\omega</math>-3</b>	0,84 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,38 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,13 <sup>a</sup>

ANOVA ou teste t. <sup>a,b,c</sup> Valores (média ± desvio-padrão) seguidos da mesma letra, na linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade. Análises feitas por gaiola. Óleo de peixe e vitamina E (OPE, n=3), óleo de peixe (OP, n=3), óleo de soja e vitamina E (OSE, n=3) e óleo de soja (OS, n=2). NI = Não identificado.

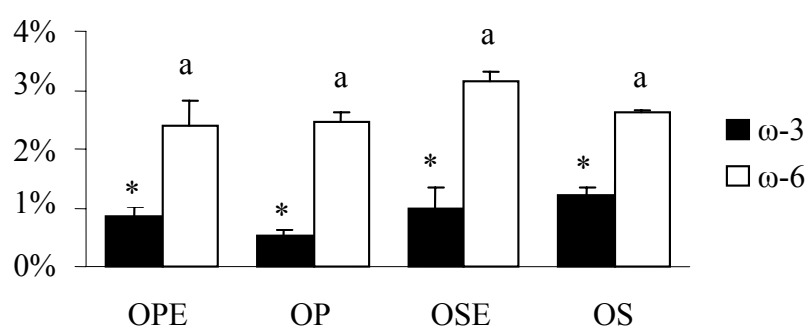
## (A) Cólon



## (B) Fígado



## (C) Fezes



**Figura 6** - Percentual de AGPI ω-6 e ω-3 no cólon (A), tecido hepático (B) e fezes (C) dos animais tratados com DMH. Valores expressos como média ± desvio-padrão. Barras com mesma letra ou \* não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade. Óleo de peixe e vitamina E (OPE), óleo de peixe (OP), óleo de soja e vitamina E (OSE) e óleo de soja (OS).

### 3.5. Aminas Bioativas

Foram detectadas nas amostras de tecido hepático dos grupos OPE e OSE as aminas bioativas espermina, espermidina e triptamina. Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 9. Não foi observada diferença significativa nos teores destas aminas entre os grupos.

**Tabela 9.** Tipos e teores de aminas bioativas no tecido hepático dos grupos óleo de peixe e vitamina E (OPE) e óleo de soja e vitamina E (OSE) submetidos à carcinogênese colorretal pela DMH.

Aminas	Concentração de aminas (mg/100 g)	
	OPE	OSE
Espermidina	3,08 ± 1,15	3,15 ± 0,50
Espermina	4,08 ± 1,86	5,42 ± 0,51
Triptamina	0,95 ± 0,30	1,11 ± 0,55

Teste t ( $p > 0,05$ ). Valores expressos como média ± desvio-padrão de análise em duplicata. OPE (n=6) e OSE (n=6). Limite de detecção: 0,04mg/100g.

### 3.6. $\alpha$ -Tocoferol

Os valores de  $\alpha$ -tocoferol do plasma, fígado e fezes estão apresentados na Tabela 10. Foram observados níveis hepáticos mais elevados de  $\alpha$ -tocoferol nos grupos que receberam adição da vitamina E ( $p < 0,05$ ). Animais do grupo OSE excretaram maior quantidade de  $\alpha$ -tocoferol, enquanto o grupo OP apresentou menor excreção ( $p < 0,05$ ). No plasma não foi encontrada diferença significativa entre os grupos.

**Tabela 10.** Níveis de  $\alpha$ -tocoferol determinados por CLAE no plasma, fígado e fezes de ratos Wistar submetidos à carcinogênese colorretal

Grupos	Teores de $\alpha$ -tocoferol		
	Plasma ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fígado ( $\text{mg}/100\text{ g}$ )	Fezes ( $\text{mg}/100\text{ g}$ )
OPE	$4,31 \pm 0,68^a$	$1,48 \pm 0,50^a$	$2,23 \pm 0,42^b$
OP	$3,88 \pm 0,87^a$	$0,59 \pm 0,15^b$	$0,90 \pm 0,08^c$
OSE	$4,92 \pm 1,12^a$	$1,34 \pm 0,39^a$	$3,86 \pm 0,33^a$
OS	$4,65 \pm 0,76^a$	$0,61 \pm 0,42^b$	$1,93 \pm 0,04^b$

As médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.7. Análises Bioquímicas

Valores de colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL) e triacilgliceróis no soro dos animais encontram-se na Tabela 11. As concentrações médias do colesterol total e triacilgliceróis foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) nos grupos OPE e OP em relação aos grupos OSE e OS. As frações HDL e VLDL foram menores nos grupos OPE e OP quando comparados ao OSE. O grupo OS apresentou maior concentração sérica de LDL em relação aos grupos OP e OPE.

**Tabela 11.** Colesterol total e frações e triacilgliceróis de ratos Wistar submetidos à carcinogênese colorretal

	Valores expressos em mg/dL			
	OPE	OP	OSE	OS
CT	37,00 ± 9,16 <sup>c</sup>	58,78 ± 14,05 <sup>b</sup>	81,80 ± 16,56 <sup>a</sup>	82,75 ± 8,54 <sup>a</sup>
HDL	10,80 ± 2,10 <sup>c</sup>	16,11 ± 4,99 <sup>bc</sup>	26,30 ± 8,56 <sup>a</sup>	22,75 ± 4,72 <sup>ab</sup>
LDL	14,88 ± 7,30 <sup>c</sup>	30,51 ± 11,63 <sup>b</sup>	34,84 ± 7,52 <sup>ab</sup>	46,45 ± 3,40 <sup>a</sup>
VLDL	11,32 ± 2,78 <sup>b</sup>	12,16 ± 4,14 <sup>b</sup>	20,66 ± 6,48 <sup>a</sup>	13,55 ± 4,65 <sup>ab</sup>
TG	56,65 ± 13,80 <sup>b</sup>	60,78 ± 20,70 <sup>b</sup>	103,30 ± 32,40 <sup>a</sup>	117,75 ± 41,31 <sup>a</sup>

CT = colesterol total; TG = triacilglicerol. Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O óleo de peixe e a vitamina E não afetaram a concentração sérica de PCR, nem a enzima fosfatase alcalina, uma vez que não foi encontrada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos experimentais. Os valores de PCR e fosfatase alcalina no soro dos animais, estão apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Mediana (média ± desvio-padrão) de PCR e fosfatase alcalina dos animais submetidos à carcinogênese colorretal.

Grupos	PCR (mg/L)	Fosfatase alcalina (U/L)
OPE	12,0 (9,60 ± 5,06)	88,0 (103,10 ± 33,59)
OP	12,0 (10,67 ± 4,00)	99,0 (115,33 ± 32,71)
OSE	12,0 (10,80 ± 3,79)	111,0 (102,30 ± 28,85)
OS	12,0 (9,00 ± 6,00)	80,0 (93,25 ± 30,80)

Teste de Kruskal-Wallis. PCR ( $p = 0,854$ ) e Fosfatase alcalina ( $p = 0,399$ ).

#### 4. Discussão

O presente estudo avaliou o efeito do consumo diário da vitamina E e  $\omega$ -3, administrado sob a forma de óleo de peixe, comparado com o óleo de soja na carcinogênese colorretal induzida pela DMH. A DMH, por interferir no processo de metilação do DNA é capaz de induzir a formação de tumores no cólon e reto, semelhantes aos encontrados em seres humanos (Pories et al., 1993).

O óleo de peixe, consumido pelo período de trinta e seis semanas, incluindo as duas semanas de indução do câncer, levou a uma redução significativa no número total de FCA nos grupos OPE e OP em relação aos grupos OSE e OS, variando entre 47,1% a 53,3%. Essa redução foi devida principalmente à diminuição dos focos com menos de três criptas. A multiplicidade das criptas, ou seja, o grau de malignidade das lesões foi menor no grupo OP comparado ao OS. A vitamina E não interferiu no número total de FCA e nem no processo de malignização dos FCA nos grupos que receberam o mesmo tipo de óleo. Os segmentos médio e distal dos quatro grupos estudados apresentaram maior número de FCA conforme já descrito por Rao et al. (2001) e Larangeira et al. (1998).

Para incidência e multiplicidade de adenomas, os resultados demonstraram que o óleo de peixe, adicionado ou não da vitamina E, possuiu ação protetora quando comparado ao óleo de soja mais a vitamina E (OSE). Em relação ao óleo de soja puro (OS), houve uma tendência na redução da incidência e multiplicidade de adenomas nos grupos OP e OPE, mas sem diferença estatística. A incidência de carcinomas não foi afetada pelo tipo de dieta consumida. A adição da vitamina E não interferiu no desenvolvimento de tumores nos grupos com o mesmo tipo de óleo.

Diversos trabalhos em modelos experimentais avaliaram o efeito do óleo de peixe na carcinogênese colorretal, induzida quimicamente, pela DMH ou AOM. Chang et al. (1997) constataram menor incidência de adenocarcinomas em ratos que receberam óleo de peixe (56,1%) em relação ao óleo de milho (70,3%) durante 34 semanas, após o tratamento com AOM. A dieta com óleo de peixe continha 11,5% de óleo de peixe e 3,5% de óleo de milho, enquanto a outra dieta possuía 15% de óleo de milho.

O efeito do óleo de peixe também foi examinado por Latham et al. (1999) em ratos Wistar. Foram administradas três injeções de DMH em doses de 30 mg/Kg de peso corporal, com intervalos de uma semana. Os ratos que receberam dieta com óleo de peixe numa concentração de 8%, por 48 horas, após cada aplicação de DMH e mantidos desde então, com dieta contendo óleo de milho na concentração de 8%, por 18 semanas, apresentaram redução de 50% no número total de FCA no cólon distal comparados com os ratos que não receberam o óleo de peixe.

Rao et al. (2001) demonstraram que uma dieta tipicamente ocidental, contendo 20% de lipídio rico em ácidos graxos saturados e AGPI  $\omega$ -6, tem um potencial quatro vezes maior de promover a formação de adenocarcinomas em roedores do que dietas com uma quantidade equivalente de lipídio porém, proveniente do óleo de peixe. As dietas foram fornecidas durante duas semanas que antecederam a aplicação do AOM e por mais 39 semanas, incluindo o período de indução da carcinogênese. O número total e a multiplicidade dos FCA e a incidência de tumores foram menores no grupo óleo de peixe.

Coleman et al. (2002) avaliaram o óleo de peixe e o óleo de semente de girassol no processo de carcinogênese colorretal. Foi fornecida dieta com 10% de óleo de peixe ou óleo de semente de girassol, além de mais 10% de banha de porco para todas as dietas,

---

totalizando 20% de gordura. As dietas foram consumidas por um período de treze semanas, incluindo as quatro semanas anteriores à indução da carcinogênese com AOM. Verificou-se que o óleo de peixe provocou uma redução de 19% no número de FCA, em relação à outra fonte de lipídeos.

Davidson et al. (2004) forneceram três tipos de dietas para ratos tratados com AOM, sendo: dieta  $\omega$ -6 (15% de óleo de milho), dieta  $\omega$ -3 (11,5% de óleo de peixe mais 3,5% de óleo de milho) e dieta  $\omega$ -9 (11,5% de óleo de oliva mais 3,5% de óleo de milho). Os animais receberam as dietas durante três semanas anteriores à administração da droga e por mais 10 semanas após a primeira aplicação do AOM. O grupo que recebeu óleo de peixe apresentou redução no número total e na multiplicidade dos FCA em relação aos demais grupos.

Esses trabalhos utilizaram diversas concentrações do óleo de peixe, comparando sempre com óleos ricos em AGPI  $\omega$ -6. O período de experimentação também variou entre os trabalhos. No entanto, os resultados encontrados sugerem uma ação protetora do óleo de peixe na carcinogênese colorretal conforme foi constatado pelo presente estudo.

A vitamina E, isoladamente, também tem sido investigada no desenvolvimento do câncer colorretal. Chung et al. (2003) realizaram um trabalho com camundongos jovens e velhos submetidos à administração de AOM e tratados com 500 mg de vitamina E/Kg de dieta durante 16 semanas. A vitamina E não teve nenhum efeito no número de FCA formado, tanto nos camundongos jovens quanto nos mais velhos.

Yao et al. (1996) constataram que a adição da vitamina E (200 mg/Kg de dieta) não inibiu a indução e o crescimento dos FCA em ratos que receberam aplicações de AOM. Reddy & Tanaka (1986), Temple & el-Khatib (1987) e Maziere et al. (1998) também não

encontraram nenhum efeito da vitamina E na formação de FCA e tumores induzidos quimicamente em roedores. No presente trabalho, a vitamina E adicionada aos óleos de peixe ou soja também não demonstrou efeito no desenvolvimento do câncer colorretal. Já o estudo de Toth & Patil (1983) demonstrou que a vitamina E aumentou a incidência de tumores no cólon e reto de camundongos tratados com DMH.

Ao contrário dos demais trabalhos, Cook & McNamara (1980) observaram que camundongos alimentados com uma dieta rica em vitamina E (600 mg/Kg de dieta) tiveram menor multiplicidade de tumores colorretais em relação aos camundongos alimentados com uma dose de 10 mg/Kg de dieta da vitamina, após tratamento com DMH.

Os grupos que receberam óleo de peixe (OP e OPE) apresentaram maior incorporação de AGPI  $\omega$ -3 na mucosa colônica e no tecido hepático. Como a proporção de AGPI presentes nas membranas celulares determina o tipo dos eicosanóides gerados, a redução de AA e da relação de AA/EPA leva à formação dos eicosanóides, série ímpar, derivados do EPA e suprime a formação dos eicosanóides provenientes do AA, como a PGE<sub>2</sub>. Os eicosanóides derivados do EPA estão associados a um aumento da apoptose e redução no crescimento tumoral e são menos reativos que os eicosanóides pró-inflamatórios derivados do AA (Roynette et al., 2004). A PGE<sub>2</sub> 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).

Apesar do óleo de peixe possuir maior teor de EPA do que DHA, o cólon e o tecido hepático dos grupos OP e OPE apresentaram maiores concentrações de DHA, sugerindo que o EPA foi convertido a DHA pela enzima delta-6-dessaturase. As enzimas dessaturases e elongases, que são comuns nas vias metabólicas dos AGPI, possuem uma maior afinidade

pelo  $\omega$ -3 e, desta forma, o consumo destes ácidos graxos pode provocar uma inibição no metabolismo dos AGPI  $\omega$ -6 (Teitelbaum & Walker, 2001).

Não foi encontrado EPA nos tecidos e fezes dos animais dos grupos OSE e OS entretanto, foi constatada a presença do DHA. Esses animais receberam óleo de soja que contém o ácido  $\alpha$ -linolênico e que através de elongações e dessaturações pode originar o EPA e, conseqüentemente, o DHA. Os tecidos hepáticos dos grupos OSE e OS apresentaram maiores concentrações do ácido  $\alpha$ -linolênico em relação aos grupos OPE e OP, devido ao maior teor desse ácido graxo no óleo de soja quando comparado ao óleo de peixe.

O perfil de ácidos graxos nas fezes demonstrou que a excreção de AGPI  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 foi semelhante entre os grupos experimentais, sugerindo grande aproveitamento dos AGPI presentes nas dietas experimentais pelos animais.

Tem sido demonstrado que os AGPI  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 possuem efeitos regulatórios opostos na expressão das proteínas 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). Narayanan et al. (2003) demonstraram que o DHA pode reduzir a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) *in vitro*.

Neste estudo, o perfil e os teores das aminas bioativas foram investigados no tecido hepático dos grupos OPE e OSE, uma vez que estes grupos apresentaram diferença

significativa na incidência de tumores. As concentrações de espermidina e espermina foram semelhantes entre OPE e OSE, enquanto a putrescina não foi detectada nos grupos. A concentração da triptamina, uma amina bioativa que pode elevar a pressão sanguínea, também não apresentou diferença entre os grupos. Estes resultados demonstraram que o óleo de peixe não alterou o perfil e os teores das aminas bioativas no tecido hepático de animais submetidos à carcinogênese colorretal. Bartram et al. (1993) constataram que o óleo de peixe reduziu a atividade da enzima ornitina decarboxilase (ODC) no cólon de indivíduos saudáveis. Rao & Reddy (1993) observaram redução na atividade da ODC no tecido hepático e no cólon de ratos submetidos à carcinogênese colorretal com AOM e alimentados com uma dieta rica em óleo de peixe (20,5%) e óleo de milho (3,0%). O grupo controle recebeu somente óleo de milho (23,5%). As dietas foram consumidas por quatro semanas, sendo que nas duas últimas semanas foi administrado o AOM. A atividade da ODC foi avaliada no quinto dia após a última aplicação da droga. A ODC é uma enzima limitante na biossíntese das aminas putrescina, espermidina e espermina, que por sua vez, estão envolvidas com o crescimento e funções celulares. Têm sido encontradas concentrações elevadas destas aminas em tumores colorretais de ratos tratados com DMH e de humanos devido ao aumento na atividade da ODC (Lamuraglia et al., 1986; Shigesawa et al., 1998).

O  $\alpha$ -tocoferol proveniente da dieta é armazenado em vários tecidos, especialmente no fígado, justificando os níveis hepáticos mais elevados nos grupos que receberam adição da vitamina E. Apesar dessa maior incorporação da vitamina pelos grupos OPE e OSE, não foi observado um efeito da vitamina E adicionada ao óleo de peixe ou de soja, ricos em AGPI, na carcinogênese colorretal. A maior excreção fecal do  $\alpha$ -tocoferol pelo grupo OSE pode

ser explicada pela adição da vitamina E à dieta, além do próprio óleo de soja ser fonte da vitamina. No plasma não foi encontrada diferença entre os grupos, pois o processo de incorporação do  $\alpha$ -tocoferol no plasma é um processo saturável, ocorrendo uma limitação na sua concentração independente da ingestão alimentar (Traber et al., 1998).

O efeito positivo do óleo de peixe na modulação dos níveis séricos de triacilgliceróis e colesterol total encontrado neste trabalho, também foi constatado por outros estudos, tanto em animais quanto em humanos (Ide et al., 2000; Aguilera et al., 2004; Robert, 2005). Os AGPI  $\omega$ -3 podem inibir a atividade da diacilglicerol aciltransferase, enzima catalisadora na síntese de triacilgliceróis (Rustan et al., 1988). Balasubramaniam et al. (1985) demonstraram que ratos alimentados com óleo de peixe apresentaram menor concentração sérica de colesterol total devido ao aumento na excreção de colesterol pela bile.

A redução no valor de colesterol total dos grupos OP e OPE foi devido à diminuição na quantidade de colesterol presente nas frações HDL, LDL e VLDL. O grupo OS apresentou maior concentração sérica de LDL em relação aos grupos OP e OPE. Aguilera et al. (2004) também encontraram redução na fração LDL em ratos Wistar alimentados com óleo de peixe na dieta, em relação ao grupo controle que recebeu uma mistura de óleo de milho e canola. Uma maior concentração de LDL pode levar a um aumento na formação de LDL oxidada. Suzuki et al. (2004) encontraram uma relação positiva entre o nível de LDL oxidada no soro e o risco de desenvolvimento do câncer colorretal, uma vez que LDL oxidada eleva a concentração de radicais livres e produtos da peroxidação lipídica.

A Proteína C reativa é uma proteína de fase aguda 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 no soro e desenvolvimento do câncer de

cólon em humanos, acumulando evidências de que a inflamação está envolvida na etiologia do câncer de cólon. No presente estudo o tipo de óleo consumido e a vitamina E não acarretaram diferenças significativas nas concentrações séricas de PCR entre os grupos experimentais. A enzima fosfatase alcalina tem sido utilizada como parâmetro de diagnóstico para doenças no fígado, sendo um tecido que pode desenvolver metástase decorrente do câncer colorretal (Kato et al., 2004). A adição da vitamina E e o tipo de óleo utilizado nas dietas também não provocaram diferenças significativas nas concentrações dessa enzima entre os quatro grupos estudados no presente experimento.

## **5. Conclusões**

Os resultados dessa investigação evidenciam que dietas à base de óleo de peixe possui um potencial maior de proteção na carcinogênese colorretal comparadas às dietas contendo óleo de soja com teor equivalente. Entretanto, a vitamina E na quantidade oferecida aos animais não influenciou o processo. Houve maior incorporação de EPA e DHA no cólon e tecido hepático, o que pode modular a biossíntese dos eicosanóides e, conseqüentemente, a gênese do câncer colorretal. Em adição, o óleo de peixe reduziu os valores de colesterol total e triacilgliceróis, justificando a presença destes AGPI na dieta.

**6. Referências**

- Aguilera AA, Díaz GH, Barcelata ML, Guerrero OA, Ros RMO. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem*. 2004; 15(6):350–7.
- Balasubramaniam S, Simons LA, Chang S, Hickie JB. Reduction in plasma cholesterol and increase in biliary cholesterol by a diet rich in n-3 fatty acids in the rat. *J Lipid Res*. 1985; 26(6):684-9.
- Bartram HP, Gostner A, Scheppach W, Reddy BS, Rao CV, Dusel G, Richter F, Richter A, Kasper H. Effects of fish oil on rectal cell proliferation, mucosal fatty acids and prostaglandin E<sub>2</sub> release in healthy subjects. *Gastroenterology*. 1993; 105(5):1317-22.
- Bartsch H, Nair J, Owen RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*. 1999; 20(12):2209-18.
- Bird RP. Observations and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett*. 1987; 37(2):147-51.
- Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett*. 1995; 93(1):55-71.
- Chang WCL, Chapkin RS, Lupton JR. Predictive value of proliferation, differentiation and apoptosis as intermediate markers for colon tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 1997; 18(4):721–30.
- 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. Increased 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.* 2003; 193(1):17-24.
- Chung H, Wu D, Han SN, Gay R, Goldin B, Bronson RE, Mason JB, Smith DE, Meydani SN. Vitamin E supplementation does not alter azoxymethane-induced colônica aberrant crypt foci formation in young or old mice. *J Nutr.* 2003; 133(2):528-32.
- Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, Messerini L, Schiavone N, Vannacci A, Nistri 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.* 2003; 162(3):793-801.
- Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, Messerini L, Sardi I, Lasagna N, Perna F, Fabbroni V, Felice AD, Perigli G, Mazzanti R, Masini E. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(8):2694–704.
- Coleman LJ, Landström EK, Royle PJ, Bird AR, McIntosh GH. A diet containing  $\alpha$ -cellulose and fish oil reduces aberrant crypt foci formation and modulates other possible markers for colon cancer risk in azoxymethane-treated rats. *J Nutr.* 2002; 132(8):2312-8.
- Cook MG, McNamara P. Effect of dietary vitamin E on dimethylhydrazine-induced colonic tumors in mice. *Cancer Res.* 1980; 40(4):1329-31.
- Davidson LA, Lupton JR, Jiang YH, Chapkin RS. Carcinogen and dietary lipid regulate ras expression and localization in rat colon without affecting farnesylation kinetics. *Carcinogenesis.* 1999; 20(5):785–91.

- Davidson LA, Nguyen DV, Hokanson RM, Callaway ES, Isett RB, Turner ND, Dougherty ER, Wang N, Lupton JR, Carroll RJ, Chapkin RS. Chemopreventive n-3 polyunsaturated fatty acids reprogram genetic signatures during colon cancer initiation and progression in the rat. *Cancer Res.* 2004; 64(18):6797–804.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition.* 2002; 18(10):872–9.
- Fernandez E, Chatenoud L, Vecchia C, Negri E, Franceschi S. Fish consumption and cancer risk. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70(1):85-90.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957; 226(1):497-509.
- Gasche C, Chang CL, Rhees J, Goel A, Boland CR. Oxidative stress increases frameshift mutations in human colorectal cancer cells. *Cancer Res.* 2001; 61(20):7444–8.
- Guyton KZ, Kensler TW. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Br Med Bull.* 1993; 49(3):523-44.
- Hartman L, Lago BCA. A rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* 1973; 22(6):475-6.
- Helzlsouer KJ, Erlinger TP, Platz EA. C-reactive protein levels and subsequent cancer outcomes: Results from a prospective cohort study. *Eur J Cancer.* 2006; 42(6):704-7.
- Hendrickse CW, Keighley MRB, Neoptolemos JP. Dietary  $\omega$ -3 fats reduce proliferation and tumor yields at colorectal anastomosis in rats. *Gastroenterology.* 1995; 109(2):431-9.
- Ide T, Kobayashi H, Ashakumary L, Rouyer IA, Takahashi Y, Aoyama T, Hashimoto T, Mizugaki M. Comparative effects of perilla and fish oils on the activity and gene

- expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1485(1):23-35.
- Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2000; 60(1):184–90.
- Kato H, Semba S, Miskad UA, Seo Y, Kasuga M, Yokozaki H. High expression of PRL-3 promotes cancer cell motility and liver metastasis in human colorectal cancer: a predictive molecular marker of metachronous liver and lung metastases. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(21):7318–28.
- Kramer DL, Chang BD, Chen Y, Diegelman P, Alm K, Black AR, Roninson IB, Porter CW. Polyamine depletion in human melanoma cells leads to G<sub>1</sub> arrest associated with induction of p21<sup>WAF1/CIP1/SDI1</sup>, changes in the expression of p21-regulated genes, and a senescence-like phenotype. *Cancer Res*. 2001; 61(21):7754–62.
- Lamuraglia GM, Lacaine F, Malt RA. High ornithine decarboxylase activity and polyamine levels in human colorectal neoplasia. *Ann Surg*. 1986; 204(1):89-93.
- Lands WE. Biochemistry and physiology of n-3 fatty acids. *FASEB J*. 1992; 6(8):2530-6.
- Larangeira LLS, Taha MO, Ferme A, Lemos R, Plapler H. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. *Acta Cir Bras* [on line]. 1998; 13(3). Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86501998000300008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86501998000300008&lng=en&nrm=iso) [Acessado em novembro de 2004].

- Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(6):935-45.
- Latham P, Lund EK, Johnson, IT. Dietary n-3 PUFA increases the apoptotic response to 1,2-dimethylhydrazine, reduces mitosis and suppresses the induction of carcinogenesis in the rat colon. *Carcinogenesis.* 1999; 20(4):645-50.
- Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res.* 2002; 62(3):625-31.
- Llor X, Pons E, Roca A, Alvarez M, Mane J, Fernández-Banares F, Gassull MA. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clin Nutr.* 2003; 22(1):71-9.
- Maziere S, Meflah K, Tavan E, Champ M, Narbonne JF, Cassand P. Effect of resistant starch and/or fat-soluble vitamins A and E on the initiation stage of aberrant crypts in rat colon. *Nutr Cancer.* 1998; 31(3):168-77.
- Medina MA, Urdiales JL, Rodríguez-Caso C, Ramírez FJ, Sánchez-Jiménez F. Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2003; 38(1):23-59.
- Narayanan BA, Narayanan NK, Simi B, Reddy BS. 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.* 2003; 63(5):972-9.

- Nkondjock A, Shatenstein B, Maisonneuve P, Ghadirian P. Assessment of risk associated with specific fatty acids and colorectal cancer among French-Canadians in Montreal: a case-control study. *Int J Epidemiol.* 2003; 32(2):200-9.
- Oliveira EC, Chaves-Dias CMG. Efeito do exercício físico moderado em modelo de carcinogênese de cólon em ratos Wistar. Viçosa; 2003. [Monografia apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do curso de Educação Física].
- Ordesson SM. Polyamine dependence of normal cell-cycle progression. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31(2):366–70.
- Pai R, Nakamura T, Moon WS, Tarnawski AS. Prostaglandins promote colon cancer cell invasion; signaling by cross-talk between two distinct growth factor receptors. *FASEB J.* 2003; 17(12):1640–7.
- Pozharisski KM. Morphology and morphogenesis of experimental epithelial tumors of the intestine. *J Natl Cancer Inst.* 1975; 54(5):1115-35.
- Pories SE, Ramchrren N, Summerhayes I, Steele G. Animal models for colon carcinogenesis. *Arch Surg.* 1993; 128(6):647-53.
- Rao CV, Reddy BS. Modulation effect of amount and types of dietary fat on ornithine decarboxylase, tyrosine protein kinase and prostaglandins production during colon carcinogenesis in male F344 rats. *Carcinogenesis.* 1993; 14(7):1327-33.
- Rao CV, Hirose Y, Indranie C, Reddy BS. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. *Cancer Res.* 2001; 61(5):1927–33.

- Reddy BS, Tanaka T. Interactions of selenium deficiency, vitamin E, polyunsaturated fat, and saturated fat on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *J Natl Cancer Inst.* 1986; 76(6):1157-62.
- Reddy BS. Dietary fat, calories and fiber in colon cancer. *Prev Med.* 1993; 22(5):738-49.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123(11):1939-51.
- Robert O. Practical applications of fish oil ( $\Omega$ -3 fatty acids) in primary care. *J Am Board Fam Pract.* 2005; 18(1):28-36.
- Roberts CK, Barnard RJ. Effects of exercise and diet on chronic disease. *J Appl Physiol.* 2005; 98(1):3-30.
- Rodrigues MAM, Silva LAG, Salvadori DMF, Camargo JLV, Montenegro MR. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short-and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(3):351-5.
- Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as chemopreventive agents. *Pharmacol Ther.* 1999; 83(2):217-44.
- Roynette CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C. N-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin Nutr.* 2004; 23(2):139-51.
- Rustan AC, Nossen JO, Chistiansen EN, Drevon CA. Eicosapentaenoic acid reduces hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreasing the activity of acyl-coenzyme A:1,2-diacylglycerol acyltransferase. *J. Lipid Res.* 1988; 29:1417-26.

- Satchithanandam S, Fritsche J, Rader JJ. Gas chromatographic analysis of infant formulas for total fatty acids, including *trans* fatty acids. *J AOAC Int.* 2002; 85(1):87-94.
- Shigesawa A, Onoda N, Chung YS, Yano Y, Otani S, Fukushima S, Sowa M. Elevation in putrescine level and spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity coincide with tumor development in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon. *Oncol Rep.* 1998; 5(1):125-9.
- Slattery ML, Curtin K, Ma K, Edwards S, Schaffer D, Anderson K, Samowitz W. Diet, activity, and lifestyle associations with p53 mutations in colon tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11(6):541-8.
- Suzuki K, Ito Y, Wakai K, Kawado M, Hashimoto S, Toyoshima H, Kojima M, Tokudome S, Hayakawa N, Watanabe Y, Tamakoshi K, Suzuki S, Ozasa K, Tamakoshi A. Serum oxidized low-density lipoprotein levels and risk of colorectal cancer: A case-control study nested in the Japan collaborative cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004; 13(11):1781-7.
- Teitelbaum JE, Walker WA. Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. *J Nutr Biochem.* 2001; 12(1):21-32.
- Temple NJ, el-Khatib SM. Cabbage and vitamin E: their effect on colon tumor formation in mice. *Cancer Lett.* 1987; 35(1):71-7.
- Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58(2):244-58.
- Toth B, Patil K. Enhancing effect of vitamin E on murine intestinal tumorigenesis by 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. *J Natl Cancer Inst.* 1983; 70(6):1107-11.

- Traber MG, Rader D, Acuff RV, Ramakrishnan R, Brewer HB, Kayden HJ. Vitamin E dose-response studies in humans with use of deuterated *RRR*- $\alpha$ -tocopherol. *Am J Clin Nutr*. 1998; 68(4):847–53.
- Ueda T, Igarashi O. Determination of vitamin E in biological specimens and foods by HPLC – pretreatment of samples and extraction of tocopherols. *J Micronutr Anal*. 1990; 7:79-96.
- Vale SR, Glória MBA. Methodology for the determination of biogenic amines in cheese. *J AOAC Int*. 1997; 80(5):1006-12.
- Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J*. 2003; 376(1):1–14.
- World Health Organization. Diet, nutrition and prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. Geneva; 2003.
- Yao K, Latta M, Bird RP. Modulation of colonic aberrant crypt foci and proliferative indexes in colon and prostate glands of rats by vitamin E. *Nutr Cancer*. 1996; 26(1):99-109.