DAMIANA DINIZ ROSA

LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS, PERFIL LIPÍDICO, MARCADORES INFLAMATÓRIOS E ASPECTO HISTOLÓGICO INTESTINAL DE RATOS WISTAR ALIMENTADOS COM DIETAS À BASE DE DIFERENTES ÓLEOS

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da Biblioteca Central da UFV

T
R788L
2010

Rosa, Damiana Diniz, 1983-
Lesões pré-neoplásticas perfil lipídico, marcadores inflamatórios e aspecto histológico intestinal de ratos Wistar alimentados com dietas à base de diferentes óleos / Damiana Diniz Rosa. – Viçosa, MG, 2010.
xvii, 127f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.
Orientador: Maria do Carmo Gouveia Peluzio.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Lipídios na nutrição humana. 2. Óleos vegetais. 3. Cólon (Anatomia) - Câncer. 4. Rato como animal de laboratório. 5. Histologia. 6. Citocinas. 7. Lipídios. 8. Ácidos graxos Ômega-3. 9. Óleos de peixe. I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 22.ed. 613.284

DAMIANA DINIZ ROSA

LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS, PERFIL LIPÍDICO, MARCADORES INFLAMATÓRIOS E ASPECTO HISTOLÓGICO INTESTINAL DE RATOS WISTAR ALIMENTADOS COM DIETAS À BASE DE DIFERENTES ÓLEOS

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: 18 de fevereiro de 2010.

Profª. Josefina Bressan

Profª. Céphora Maria Sabarense

Profª. Sônia Machado Rocha Ribeiro
(Coorientadora)

Profª. Cristina Maria Ganns Chaves Dias

Profª. Maria do Carmo Gouveia Peluzio
(Orientador)

"... a mente que se abre a uma nova idéia...
... jamais voltará ao seu tamanho original..."

Albert Einstein

"Todo homem deve ser um aprendiz da natureza. Se realmente desejar cumprir o seu dever, deve tratar de conhecer as relações que existem entre a saúde do homem e sua alimentação."

Hipócrates 460 a.C – 377 a.C

Dedico esta dissertação aos meus pais Jairo e Helena, aos meus irmãos e ao meu amor, Keller com carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, saúde, sabedoria e presença constante em minha vida.

Aos meus pais Jairo e Helena pelo apoio incondicional, amor e pelos ensinamentos dos mais importantes valores da vida: o amor ao próximo, persistência e humildade.

Aos meus irmãos, pela compreensão e carinho.

Ao Keller, pelo amor, carinho, paciência, companheirismo, incentivo, suporte técnico e científico em todos estes anos de convivência.

À minha querida orientadora Prof[a]. Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pelos ensinamentos, orientação, amizade e confiança desde o início da graduação. Muito obrigada por tudo!

À professora Céphora pela amizade, ensinamentos e valiosos conselhos.

À professora Sônia pelo carinho, ensinamentos, co-orientação e apoio dentro e fora da universidade.

Ao professor Clóvis pelo apoio, disponibilidade e co-orientação deste trabalho.

Ao grupo Laboratório de Bioquímica Nutricional, em especial à Fabíola e Luis Fernando, que participaram ativamente na execução deste trabalho.

Aos amigos do mestrado, em especial Vanessa Moraes, Monise Abranches, Érica, Josie, Luiz, pela amizade e carinho.

Ao Professor Sérgio de Paula pela parceria científica estabelecida e pelos ensinamentos. Ao Alípio, pelo apoio, atenção e disponibilidade.

À Professora Maria Beatriz Glória pelo apoio às análises.

Aos amigos, em especial Regiane Sales, Otaviana, Conceição, Jofran e toda família Ambiagro pelo carinho e amizade.

Aos funcionários, membros e parceiros do Laboratório de Bioquímica Nutricional (DNS), Laboratório de Análise de Alimentos (DNS), Laboratório de Nutrição Experimental (DNS), Laboratório de Imunovirologia (CCB), Laboratório de Biologia Estrutural (CCB) por toda atenção e apoio no período das análises.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição científica ao avaliarem este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde, pela amizade e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e à FAPEMIG pela concessão do financiamento do projeto.

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

BIOGRAFIA

Damiana Diniz Rosa, filha de Jairo Rosa e Helena Maria Diniz Rosa, nasceu em Aiuruoca, estado de Minas Gerais, em 18 de fevereiro de 1983.

Em março de 2003, ingressou no curso de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, obtendo seu título de graduação em janeiro de 2008.

Em março de 2008, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, do Departamento de Nutrição e Saúde - Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Valor Nutricional, Funcional e Controle de Qualidade de Alimentos e Dietas, submetendo-se à defesa de dissertação, requisito indispensável para obtenção do título de *Magister Scientiae*, em fevereiro de 2010.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ..... **x**
LISTA DE TABELAS ..... **xi**
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS ..... **xii**
RESUMO ..... **xiv**
ABSTRACT ..... **xvi**
1. INTRODUÇÃO **1**
2. REVISÃO DE LITERATURA **3**
2.1. Ácidos graxos- uma visão geral 3
2.1.1. PUFA e Doença Cardiovascular 10
2.1.2. PUFA e Doença Inflamatória Intestinal 11
2.1.3. PUFA e o câncer de cólon 12
2.2. Caracterização das fontes lipídicas 14
2.2.1. Óleo de Peixe 14
2.2.2. Óleo de Linhaça 15
2.2.3. Óleo de Soja 16
2.2.4. Azeite de Oliva 17
2.3. Câncer de Cólon 19
2.3.1. Modelo animal e agente carcinogênico utilizado 23
2.3.2. Sistema Imune e o câncer de cólon 25
2.3.3. Biomarcadores 27
2.4. Referências: 31
3. OBJETIVOS **39**
3.1. Objetivo Geral 39
3.2. Objetivos Específicos 39
4. METODOLOGIA GERAL **40**
4.1. Animais e dietas 40
4.1.1. Desenho Experimental 40
4.1.2. Experimento I 41
4.1.3. Experimento II 41
4.1.4. Composição das dietas experimentais 42
4.2. Indução de pré-lesões neoplásicas 43
4.3. Análise da Composição Corporal 43

4.4. Contagem dos focos de criptas aberrantes 43
4.5. Análise Histológica 44
4.5.1. Análise quantitativa dos linfócitos 44
4.5.2. Morfometria das vilosidades e criptas intestinais 45
4.6. Extração de lipídios totais 46
4.6.1. Saponificação e Esterificação 47
4.6.2. Cromatografia Gasosa 47
4.7. Análises Bioquímicas 48
4.8. Determinação das Aminas Bioativas 48
4.9. Análise dos mediadores do processo inflamatórios 49
4.9.1. Extração do RNA 49
4.9.2. Confecção do DNA complementar 50
4.9.3. Análise quantitativa dos genes alvo 50
4.10. Análise estatística 51
4.11. Aspectos éticos 52
4.12. Referências 53
5. ARTIGO I 54
5.1. Introduction 56
5.2. Methods and Materials 57
5.3. Results 60
5.4. Discussion 63
5.5. References 66
6. ARTIGO II 70
6.1. Introdução 73
6.2. Materiais e Métodos 76
6.2.1. Animais e dietas 76
6.2.2. Protocolo de Carcinogênese Experimental 77
6.2.3. Parâmetros analisados 77
6.2.4. Análise Estatística 80
6.2.5. Aspectos éticos 80
6.3. Resultados 81
6.3.1. Perfil de ácidos graxos nos óleos e tecidos 82
6.3.2. Contagem de FCA na mucosa do cólon 84
6.3.3. Concentração de aminas bioativas no fígado 86

6.3.4. Mediadores inflamatórios 86
6.4. Discussão 88
6.5. Conclusão 92
6.6. Referências 93
7. ARTIGO III 97
7.1. Introdução 99
7.2. Materiais e métodos 102
7.2.1. Animais e dietas 102
7.2.2. Indução do Câncer 103
7.2.3. Perfil e teor de ácidos graxos dos óleos e tecidos. 103
7.2.4. Análise Histológica 104
7.2.5. Análise quantitativa dos linfócitos 104
7.2.6. Morfometria das vilosidades e criptas intestinais 105
7.2.7. Aspectos éticos 105
7.2.8. Análise Estatística 106
7.3. Resultados 106
7.3.1. Análise quantitativa dos linfócitos 112
7.3.2. Morfometria das vilosidades e criptas intestinais 112
7.4. Discussão 114
7.5. Conclusão 117
7.6. Referências 119
8. CONCLUSÃO GERAL 123
ANEXOS 124
8.1. Anexo I 124
8.2. Anexo II 125
8.3. Anexo III 126
8.4. Anexo IV 127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo dos ácidos graxos essenciais. TX- tromboxanos; PG-Prostaglandinas; LT-Leucotrienos; 5

Figura 2 - Representação do modelo genético da sequência adenoma-carcinoma no câncer colorretal, apontando as mutações e alterações genéticas..... 21

Figura 3 - Desenho experimental de ratos Wistar tratados com diferentes fontes lipídicas com e sem indução de lesões pré-neoplásicas. 41

Figura 4 - Fotomicrografia de secção histológica da mucosa ileal de rato Wistar, com sobreposição de uma matriz quadrada padrão. 45

Figura 5 - Fotomicrografia das vilosidades intestinais de ratos Wistar, coloração HE. 46

Figure 6 - Photograph of the histological sections of the ileal mucosa of Wistar rats. 59

Figura 7 – Desenho Experimental. 77

Figura 8 **-** Evolução do peso semanal de ratos Wistar. 81

Figura 9 - Valores médios do número de FCA na mucosa colônica de ratos Wistar tratados com as diferentes fontes lipídicas. 85

Figura 10 - Valores médios de FCA na mucosa colônica de ratos Wistar 85

Figura 11 - Variação na expressão de mediadores inflamatórios. 87

Figura 12 **-** Desenho experimental de ratos Wistar. 103

Figura 13 – Fotomicrografia de secção histológica da mucosa ileal de rato Wistar,..... 105

Figura 14 – Evolução do peso semanal de ratos Wistar. 107

Figura 15 - Contagem média de linfócitos na mucosa ileal de ratos Wistar. .. 112

Figura 16 - Valores médios (µm) de altura de vilosidade, profundidade de cripta e largura de vilosidade da mucosa ileal de ratos Wistar induzidos ao câncer colorretal. 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Efeitos Pro-Inflamatório de PGE_2 e LT série 4 7

Tabela 2 – Principais séries de Ácidos Graxos: 8

Tabela 3 - Composição das dietas experimentais: 42

Table 4 - Concentration of fatty acids in the oils used in the diets (per cent). ... 61

Table 5 - Average of the values of TC, HDL-C, TG and HDL-C/TC serum of the different experimental groups (mg/dL) 61

Table 6 – Morphometry of the intestinal villosities and crypts of Wistar rats fed with different lipid sources. 62

Table 7 – Average counted number of lymphocytes in the intestinal mucosa .. 62

Tabela 8 - Concentração de ácidos graxos dos óleos utilizados nas dietas e a relação ω6/ω3. 82

Tabela 9 - Perfil de ácidos graxos no tecido hepático de ratos Wistar submetidos à carcinogênese colorretal* 83

Tabela 10 - Perfil de ácidos graxos da gordura intra-abdominal de ratos Wistar submetidos à carcinogênese colorretal* 84

Tabela 11-Tipos e teores de aminas bioativas no tecido hepático de ratos Wistar alimentados com diferentes fontes lipídicas tratados com carcinógeno. 86

Tabela 12 - Concentração de ácidos graxos dos óleos utilizados nas dietas . 108

Tabela 13 - Perfil e teor de ácidos graxos no soro e no tecido hepático de ratos Wistar induzidos à lesões pré-neoplásicas* 110

Tabela 14 - Perfil e teores de ácidos graxos do tecido adiposo intra-abdominal e nas fezes de ratos Wistar induzidos à lesões pré-neoplásicas * 111

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ω3 ..... Ácidos graxos da série ômega-3
ω6 ..... Ácidos graxos da série ômega-6
AA .....Ácido Araquidônico
AGS.....Ácido graxo saturado
AHA ..... American Heart Association (Associação Americana do Coração)
AI ..... Adequate Intake (Ingestão Adequada)
ALA.....Alpha- Linolenic Acid (Ácido α- linolênico)
AOM .....Azoximetano
CLAE ..... Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COX..... Ciclooxigenase
CCR..... Câncer Colorretal
Ct..... Cycle Threshold
DHA..... Docosahexaenoic Acid (Ácido docosahexaenóico)
DMH .....Dimetilhidrazina
DRI .....Dietary Reference Intakes (Ingestão Dietética de Referência)
DCV..... Doença Cardiovascular
EPA ..... Eicosapentaenoic Acid (Ácido Eicosapentanóico)
FCA ..... Focos de Criptas Aberrantes
GALT ..... Gut-Associated Lymphoid Tissue
(Tecido Linfóide Associado ao Trato Gastrointestinal)
HE .....Hematoxilina e Eosina
IFN .....Interferon
IL .....Interleucina
iNOS..... Óxido Nítrico Sintase Induzida
LA..... Linoleic Acid (Ácido linoléico)
LOX ..... Lipoxigenase
LT ..... Leucotrieno
MAM .....Metilazoximetanol
MUFA ..... Monounsaturated Fatty Acids (Ácidos Graxos Monoinsaturados)
NF .....Fator Nuclear
NK ..... Natural killer
ODC ..... Ornitina descarboxilase
PG ..... Prostaglandina

PIF..... Proteolysis-Inducing Factor (Fator Indutor de Proteólise)

PUFA..... Polyunsaturated fatty acids (Ácidos graxos poliinsaturados)

RDA..... Recommended Dietary Allowances (Ingestão diária recomendada)

TNF .....Tumor Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral)

TX..... Tromboxano

RESUMO

Rosa, Damiana Diniz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Lesões pré-neoplásicas, perfil lipídico, marcadores inflamatórios e aspecto histológico intestinal de ratos Wistar alimentados com dietas à base de diferentes óleos.** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-Orientadores: Clóvis Andrade Neves e Sônia Machado Rocha Ribeiro.

A ação de óleos e gorduras na nutrição humana tem sido amplamente pesquisada e discutida nas últimas décadas. Atenção tem sido dada à qualidade nutricional destes óleos, sendo importante a quantidade e composição dos ácidos graxos. Os ácidos graxos essenciais têm grande importância por seus papéis farmacológicos e como mediadores de reações inflamatórias, diretamente relacionadas à resistência imunológica, distúrbios metabólicos, processos trombóticos e doenças neoplásicas. Estudos experimentais sustentam a hipótese que os ácidos graxos da série ω6 contribuem para o desenvolvimento a progressão de lesões neoplásicas enquanto que os ácidos graxos da série ω3 possuem uma ação protetora. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da adição à dieta de diferentes óleos (soja, oliva, peixe, linhaça) na prevenção de lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos Wistar. Avaliou-se ainda, o seu efeito no perfil lipídico, marcadores inflamatórios, migração de células inflamatórias e análise histológica da mucosa intestinal dos animais. Foram realizados dois experimentos. No primeiro, um estudo exploratório foi realizado com ratos Wistar adultos alimentados com dietas normolipídicas AIN-93M (4g/100g dieta). Os animais foram divididos em quatro grupos e receberam dietas à base de óleo de soja (controle), oliva, peixe e linhaça *ad libitum*, por um período de 9 semanas. Foram avaliados os parâmetros bioquímicos (colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídeos), contagem de linfócitos na mucosa intestinal e morfometria das vilosidades. O grupo alimentado com óleo de peixe apresentou menores valores de colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídeos ($p<0,05$). Os grupos tratados com óleo de peixe e oliva apresentaram melhor preservação das vilosidades intestinais. Menor deposição de linfócitos na mucosa ileal foi verificada no grupo linhaça ($p<0.001$). A partir destes resultados foi desenvolvido um segundo experimento com o intuito de responder a hipótese do efeito quimiopreventivo dos óleos (oliva, peixe e linhaça) presentes nas dietas normolipídicas e administradas agora à animais

induzidos a lesões pré-neoplásicas. Neste experimento, ratos Wistar adultos foram tratados com 1,2-dimetilhidrazina, na dose de 40mg/kg peso corporal, mantidos nas mesmas condições experimentais anteriores. Foi avaliado o perfil de ácidos graxos do soro, tecido hepático, gordura intra-abdominal e nas fezes; investigada a presença de aminas bioativas no tecido hepático, mediadores inflamatórios (IL-8, MCP-1 e TGF-β) na mucosa colônica, realizada a contagem de linfócitos na mucosa intestinal e morfometria das vilosidades. Verificou-se que o grupo alimentado com óleo de peixe apresentou maiores níveis de EPA ($p=0,004$) e DHA ($p<0,001$) no fígado e maiores níveis do ácido linolênico ($p=0,003$) e EPA ($p=0,011$) no tecido adiposo intra-abdominal em relação aos demais tratamentos. Nestes tecidos, menor relação $\omega6/\omega3$ foi verificada nos grupos alimentados com óleos poliinsaturados (peixe e linhaça). Maiores níveis de ácido α-linolênico foi excretado pelo grupo linhaça ($p=0,014$). Não foi encontrada diferença no número de FCA entre os grupos alimentados com as diferentes fontes lipídicas ($p>0,05$). Não houve diferença na expressão de IL-8, TGF-β, e MCP-1 em relação ao controle ($p>0,05$). Ao avaliar comparativamente a expressão das citocinas, verificamos que o grupo peixe expressou duas vezes mais TGF-β e oito vezes menos IL-8 em relação aos demais tratamentos).O grupo oliva apresentou menores níveis de espermidina ($p=0,008$) em relação aos demais tratamentos. O grupo alimentado com óleo de peixe apresentou menor deposição de linfócitos na mucosa ileal ($p<0,001$). A análise morfométrica mostrou que os tratamentos apresentaram altura de vilosidade, profundidade de cripta e largura de vilosidade menores que o controle ($p<0,001$). Este estudo demonstrou que os óleos de linhaça, oliva e peixe apresentam diferentes respostas em relação ao óleo de soja na preservação da mucosa intestinal e proliferação de linfócitos em ratos Wistar saudáveis. Em animais tratados com carcinógeno, o óleo de peixe apresentou um importante efeito protetor a mucosa colônica. Os ácidos graxos α-linolênico, EPA e DHA apresentaram um metabolismo diferenciado em relação à incorporação nos tecidos hepático e intra-abdominal, à formação de pré-lesões neoplásicas e à expressão de citocinas inflamatórias no cólon. A maior incorporação de PUFA da série $\omega3$ no grupo peixe sugere um efeito modulador da resposta inflamatória, em função da menor migração de linfócitos na mucosa intestinal deste grupo.

ABSTRACT

ROSA, Damiana Diniz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2010. **Pre-neoplastic lesion, lipid profile, inflammatory makers and intestinal histological aspects of Wistar rats fed with diets based on different oils.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-Advisers: Clóvis Andrade Neves and Sônia Machado Rocha Ribeiro.

The action of oils and fats in human nutrition has been amply studied and discussed in recent decades. Attention has been given to the nutritional quality of these oils, where quantity and composition of fatty acids is important. Essential fatty acids are important due to the their pharmacological roles and as mediators of inflammatory reactions, directly related to immunological resistance, thrombotic processes and neoplastic diseases. Experimental studies support the hypothesis that ω6 fatty acids contribute to progressive development of neoplastic wounds while ω3 fatty acids possess a protective action. The objective of the present study was to evaluate the effects of adding different oils to the diet (soy, olive, fish, flaxseed) for prevention of pre-neoplastic wounds on the colon of Wistar rats. Also evaluated was its effect on the lipid profile, inflammatory markers, migration of inflammatory cells and histological analysis of intestinal mucus of the animals. Two experiments were performed. In the first, and exploratory study was performed on adult Wistar rats fed with normolipid diets AIN-93M (4g/100g diet). The animals were divided in four groups and received diets based on soy (control), olive, fish and flaxseed oil *ad libitum*, for a period of 9 weeks. Biochemical parameters (total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides), number of lymphocytes in the intestinal mucus and morphometry of the villi were evaluated. The group fed with fish oil presented the lowest values of total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides ($p<0.05$). The groups treated with fish and olive oil presented the best preservation of the intestinal villi. A smaller deposition of lymphocytes in the ileal mucus was verified in the flaxseed group ($p<0.001$). From these results a second experiment was developed with the intention of confirming the hypothesis of the chemopreventive effect of the oils (olive, fish and flaxseed) present in the normolipid diets and now administered to the animals induced to pre-neoplastic wounds. In this experiment, adult Wistar rats were treated with 1,2-dimethylhydrazine, at the dose of 40 mg/kg body weight, maintained in the same experimental conditions as before. The fatty acid profiles of the serum,

hepatic tissue, intra-abdominal fat and in the feces were evaluated; investigating the presence of bioactive amines in the hepatic tissue, inflammatory mediators (IL-8, MCP-1 and TGF-β) in the colonial mucus, and counting the lymphocytes in the intestinal mucus and mophometry of the villi. It was verified that the group fed with fish oil presented greater levels of EPA ($p=0.004$) and DHA ($p<0.001$) in the liver and greater levels of linolenic acid ($p=0.003$) and EPA ($p=0.011$) in the intra-abdominal adipose tissue in relation to the other treatments. In these tissues, a lower ω6/ω3 ratio was verified in the groups fed with polyunsaturated oils (fish and flaxseed). Greater levels of α-linolenic acid were excreted by the flaxseed group ($p=0.014$). No difference was encountered in the number of FCA between the groups fed with the different lipid sources ($p>0.05$). There was no difference in the expression of IL-8, TGF-β, and MCP-1 in relation to the control ($p>0.05$). When comparatively evaluating expression of the cytokines, it was verified that the fish oil group expressed two times more TGF-β and eight times less IL-8 in relation to the other treatments. The olive oil group presented lower levels of spermidine ($p=0.008$) in relation to the other treatments. The group fed with fish oil presented few deposits of lymphocytes in the ileal mucus ($p<0.001$). A morphmetric analysis showed that the treatments presented height of the villus, depth of the crypt and width of the villi less than that of the control ($p<0.001$). This study demonstrated that flaxseed, olive and fish oil presented different responses in relation to soy oil on the preservation of intestinal mucus and proliferation of lymphocytes in healthy Wistar rats. In animals treated with carcinogens, the fish oil presented an important protective effect on the colonial mucus. The α-linolenic fatty acids, EPA and DHA present a differential metabolism in relation to incorporation in the hepatic and intra-abdominal tissues, formation of pre-neoplastic wounds and expression of inflammatory cytokines in the colon. Greater incorporation of PUFA from the ω3 series in the fish oil group suggests a modular effect on the inflammatory response, in function of the lower migration of lymphocytes in the intestinal mucus of this group.

1. INTRODUÇÃO

A gordura ingerida na dieta tem sido considerada como um importante fator de risco para doenças crônicas e vários esforços vêm sendo feitos com o intuito de ampliar o conhecimento sobre a atuação deste nutriente no organismo humano, desencadeando ou não importantes alterações.

Nos países ocidentais, a ingestão de gordura compreende majoritariamente de fontes ricas em ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos poliinsaturados, como peixes, nozes e óleos vegetais. Nos últimos 20 anos, mudanças significativas ocorreram no consumo das diferentes fontes lipídicas, com redução do uso de gordura animal e aumento do consumo de óleos vegetais, ricos em ácido linoléico (ω6) e ácido linolênico (ω3).

Muita atenção tem sido dada aos óleos utilizados na alimentação humana, sendo importante a quantidade e sua composição em ácidos graxos. Os óleos são constituintes densamente energéticos e com o processo de industrialização dos alimentos, representam importante contribuição para o aumento do valor calórico da dieta.

O ácido linoléico (ω6) e ácido linolênico (ω3) são essenciais para o organismo humano e desempenham importantes funções na estrutura das membranas celulares, nos processos metabólicos e têm grande importância atualmente pelo seu papel farmacológico, como mediadores de reações inflamatórias (relacionados com a conversão enzimática em eicosanóides), resistência imunológica, distúrbios metabólicos, processos trombóticos e doenças neoplásicas.

Os lipídios, de maneira geral, são metabolicamente significativos no desenvolvimento e proliferação de células alteradas, podendo culminar em algumas situações, no desenvolvimento da carcinogênese colorretal (CCR). Grande parte dos casos de desenvolvimento de CCR estão envolvidos fatores ambientais, sendo a dieta um dos principais fatores no desenvolvimento do CCR.

A carcinogênese experimental no cólon é um processo que envolve três estágios distintos. A iniciação, que altera a mensagem molecular de uma célula normal, seguida de promoção e progressão, que finalmente transforma fenotipicamente a célula. Para este fim, são utilizadas substâncias

cancerígenas, como por exemplo, a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) que é capaz de induzir alterações macroscópicas no epitélio colônico, como alterações na secreção de mucina e na taxa de proliferação de criptas. A avaliação das alterações morfológicas, como os focos de criptas aberrantes (FCA), que são pré-lesões neoplásicas, constitui um importante biomarcador da carcinogênese do cólon em modelos experimentais e humanos.

Várias vias bioquímicas são alteradas nas células com câncer de cólon, para sustentar a alta proliferação celular observada nos tumores. Um exemplo importante é a via de biossíntese de poliaminas que são necessárias para o crescimento e proliferação celular.

Alguns marcadores do câncer estão associados à inflamação, como a presença de infiltrado de leucócitos no micro-ambiente do tumor e outros mediadores, como citocinas, quimiocinas (IL-8, MCP-1), fatores de crescimento (TGF-β), espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e conseqüentemente, a ativação do fator de transcrição nuclear (NF$\kappa\beta$) e outras moléculas envolvidas na inflamação e carcinogênese.

Apesar de ser grande o número de estudos a respeito do consumo dos ácidos graxos, há ainda muita controvérsia a respeito do assunto. Portanto, faz-se mister que se desenvolvam mais pesquisas a fim de melhor definir o nível médio de consumo desses ácidos graxos de acordo com as funções que desempenham no organismo, com seu efeito protetor relacionado às doenças crônicas. Os óleos componentes da dieta apresentam um importante efeito promissor na prevenção de doenças crônicas. Mas, ainda há divergências de opiniões baseadas em dados ainda insuficientes quanto sua ingestão adequada.

Diante do exposto, o presente estudo busca esclarecer os efeitos de diferentes fontes lipídicas no processo inflamatório e na formação de lesões pré-neoplásicas no cólon induzido, avaliando-se em modelos animais o efeito de dietas normolipídicas constituídas por óleos de diferentes origens (oliva, peixe e linhaça).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ácidos graxos- uma visão geral

A ação de óleos e gorduras na nutrição humana tem sido amplamente pesquisada e discutida nas últimas décadas. Vêm sendo enfatizados a importância da ingestão de ácidos graxos ômega-3, a redução de ácidos graxos saturados e o controle da ingestão de ácidos graxos trans (Wortman *et al.*, 2009).

Nos países ocidentais, a ingestão de gordura compreende aproximadamente 25-35% das calorias totais, com a maioria das fontes ricas em ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) encontrados em peixes, nozes e óleos vegetais. Nos últimos 20 anos, mudanças significativas ocorreram no consumo das fontes lipídicas, com redução do uso de gordura animal e aumento do consumo de óleos vegetais, ricos em ácido linoléico (C18:2n-6, LA) e ácido α-linolênico (C18:3n3, ALA). Na Europa, nas últimas duas décadas, houve um aumento de 50% no consumo de LA, passando de 10 para 15g/dia, enquanto o consumo de ALA dobrou, passando de 1 para 1,9 g/dia. Os ácidos graxos desempenham importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos (Russo, 2009).

O'keefe *et al*. (2007) estudaram estes grupos e verificaram que, o maior risco de câncer colorretal e taxa de proliferação da mucosa estavam associado com maior ingestão de alimentos de origem animal (rica em lipídios) e maior concentração colônica de algumas bactérias, que desconjugam os sais biliares a sais biliares secundários, considerados citotóxicos ao intestino. A incidência do câncer colorretal é muito maior nos americanos de origem africana quando comparados com africanos nativos, e um pouco maior que os americanos caucasianos. Estas diferenças são atribuídas principalmente aos fatores dietéticos.

Em humanos, os ácidos graxos LA e ALA são necessários para manter as condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e transmissão de impulsos nervosos, transferência de oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, além da síntese de hemoglobina e divisão celular. São

considerados essenciais por não serem sintetizados pelo organismo (Martin *et al.*, 2006).

Os ácidos graxos essenciais têm grande importância por seus papéis farmacológicos e como mediadores de reações inflamatórias diretamente relacionados à resistência imunológica, distúrbios metabólicos, processos trombóticos e doenças neoplásicas (Hirayama *et al.*, 2006).

Os ω3 e ω6 distinguem-se pela localização da primeira dupla ligação contida na molécula a partir do grupo metil terminal do ácido graxo, sendo ácidos graxos amplamente distribuídos na natureza. As algas e fito-plânctons são responsáveis pela síntese do PUFA da série ω3, especialmente o ácido α-linolênico. Os peixes incorporam e alongam estes ácidos graxos, sintetizando o EPA e DHA (Ziboh *et al.*, 2000).

Os ácidos graxos de cadeia longa das famílias ω3 e ω6 são transformados LA e ALA, pela ação de enzimas elongases, que atuam adicionando dois átomos de carbono à parte inicial da cadeia do ácido graxo e as dessaturases que agem oxidando dois carbonos na cadeia do ácido graxo, originando uma dupla ligação na configuração *cis (*Martin *et al., 2006)*.

Nos vegetais, há a síntese de LA e sua posterior conversão em ALA, pela ação da enzima dessaturase Δ15, e, entre os mamíferos, as dessaturases são capazes de inserir duplas ligações nas posições Δ5, Δ6 e Δ9. Esta última atua predominante na síntese de MUFA a partir do ácido esteárico, que é precursor do ácido oléico (18:1 Δ9) e palmitoleico (16:1Δ7). A partir destes, pelos processos de dessaturação e elongação, são formados os PUFA.

Já os ácidos ALA e LA, precursores PUFA das famílias ω3 e ω6, respectivamente, são definidos como ácidos graxos essenciais por não serem sintetizados endogenamente nos seres humanos e em alguns animais, devido a carência das enzimas dessaturases e hidrogenases, sendo sintetizados exclusivamente no reino vegetal (Schaefer, 2002).

Os PUFA podem ser modificados pelos mamíferos, com alongamento, inserção de insaturação ou descarboxilação de pares da cadeia. As séries de ácidos graxos ω3, ω6 e ω9 competem entre si, pela enzima Δ6 dessaturase, que é uma enzima chave na via metabólica clássica e comum para ambas as vias metabólicas que apresenta maior afinidade pelos substratos mais altamente insaturados com maior probabilidade de síntese dos ácidos graxos

poliinsaturados (PUFA) da família ω3 (Figura 1). Portanto, a atuação destas enzimas segue uma ordem preferencial iniciada com os ácidos graxos ω3 seguida do ω6 e ω9 (Martin *et al.*, 2006).

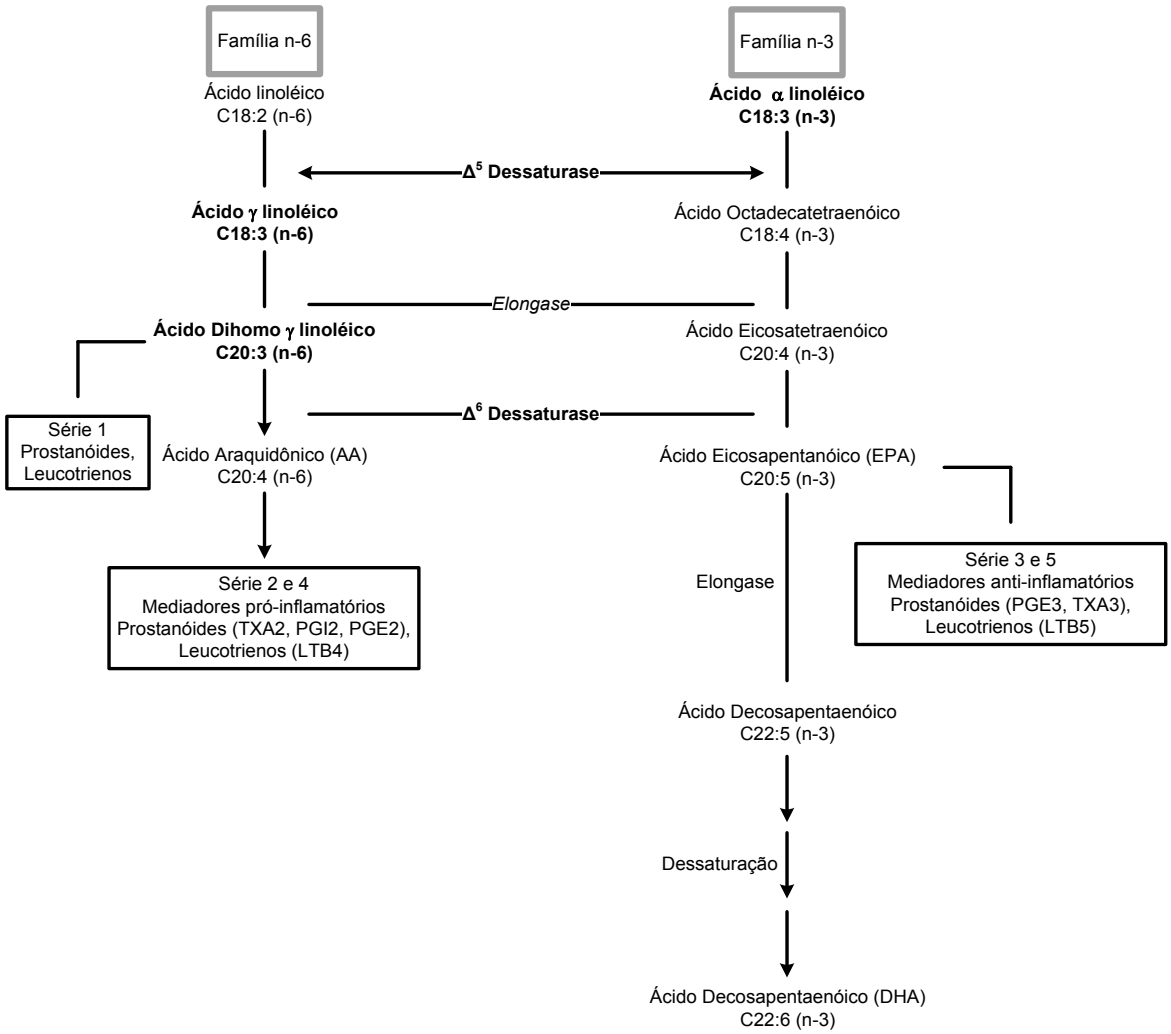


Figura 1 - Metabolismo dos ácidos graxos essenciais. TX- tromboxanos; PG- Prostaglandinas; LT-Leucotrienos;
(Adaptado de Garófolo e Petrili, 2006).

Assim, devido a essa natureza competitiva, cada ácido graxo pode interferir no metabolismo do outro, apresentando implicações nutricionais. Um excesso de ω6 irá reduzir o metabolismo de ω3, levando possivelmente a um déficit de seus metabólitos, incluindo o ácido eicosapentanóico (EPA, C20:5ω3) (Hirayama *et al.*, 2006).

O consumo elevado de LA favorece o aumento do conteúdo de ácido araquidônico (AA) nos fosfolipídios das membranas celulares, aumentando,

conseqüentemente, a produção de prostaglandina (PG) E_2 e leucotrieno (LT) B_4, por meio das vias enzimáticas da ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), respectivamente (Russo, 2009).

A ingestão de alimentos fonte de ALA, como o óleo de peixe, faz com que seja introduzido EPA nos fosfolipídeos de membrana, o que inibe o metabolismo do AA por competição pelas mesmas vias enzimáticas (COX e 5-LOX), promovendo a formação de PGE_3, em vez de PGE_2, e LTB_5, em vez de LTB_4, que são mediadores inflamatórios menos ativos (Figura 1). Em geral, os cientistas concordam que o LA é precursor da síntese de eicosanóides da série par, como o tromboxano A_2 (TXA_2), as PGI_2 e PGE_2 e os LTB_4, que apresentam características pró-inflamatórias (Garófolo e Petrilli, 2006).

O processo inflamatório é um mecanismo de defesa normal que protege o organismo contra infecção e outros agravos, que inicia com a morte do patógeno aliada a processos de reparação dos tecidos e restauração da homeostase em locais contaminados ou danificados. Caracteriza-se por vermelhidão, inchaço, calor, dor e perda da função, e envolve interações entre os vários tipos de células na produção de respostas por mediadores químicos. Geralmente, a resposta inflamatória é auto-limitada e rapidamente finalizada, sem causar danos excessivos. Esta regulação envolve ativação negativa dos mecanismos de *feedback*, secreção de citocinas anti-inflamatórias e inibição de cascatas pró-inflamatórias. A inflamação crônica pode conduzir a uma perda da tolerância e ou nos processos de regulação e com isso, podendo ocasionar danos irreparáveis ao tecido com o surgimento de um agravo clínico (Calder, 2009).

A PGE_2 e os LTB_4 são os mediadores que possuem o maior potencial pró-inflamatório. A PGE_2 induz à febre, promove vasodilatação, aumenta a permeabilidade vascular e potencializa a dor e o edema causados por outros agentes, como bradicinina e histamina. Por outro lado, a PGE_2 inibe a produção de fator de necrose tumoral (TNF-α) e interleucina-1 (IL-1), apresentando, nesse aspecto, característica antiinflamatória. Tem potencial imunossupressor, pois inibe a proliferação de linfócitos, a atividade das células *natural killer* (NK) e a produção de IL-2 e interferon-γ (IFN-γ). O LTB_4 aumenta a permeabilidade vascular, o fluxo sangüíneo e a quimiotaxia dos leucócitos, induz à liberação de enzimas lisossomais e aumenta a produção de espécies

reativas de oxigênio e de TNF-α, IL-1 e IL-6. Em todos esses aspectos, o LTB_4 é pró-inflamatório. A Tabela 1 apresenta um resumo dos efeitos pró-inflamatórios de PGE_2 e LT série 4. Como citado, os tromboxanos (TX) também derivam do metabolismo dos eicosanóides. Entre eles, o TXA_2 é o principal subproduto do AA, promovendo agregação plaquetária, adesão leucocitária e contração da musculatura lisa (Calder, 2003).

Tabela 1- Efeitos Pro-Inflamatório de PGE_2 e LT série 4

Efeitos Pro-Inflamatórios		
PGE_2	LTB_4	LTC_4 D_4 e E_4
Induz febre	↑ Permeabilidade vascular	↑ Permeabilidade vascular
↑ Permeabilidade vascular	↑ Fluxo sanguineo local	Broncoconstritores
Vasodilatação	Agente de quimiotaxia para leucócitos	↑ Secreção Mucosa
Causa dor	Induz a liberação de enzimas lizossomais	↑ Hipersensibilidade
↑ dor por outros agentes	Induz a liberação de espécies reativas de oxigênio nos granulócitos	
↑ Produção de IL-6	↑ a produção de TNF, IL-1 e IL-6	

Abreviações usadas: IL (Interleucina); TNF (Fator de necrose tumoral). Adaptado de Russo, (2009)

Os efeitos dos ácidos graxos sobre o metabolismo dos eicosanóides parecem ser dose-dependentes, demonstrando que elevações de pequena magnitude na PGE_2 e no LTB_4 têm a capacidade de causar um efeito estimulador sobre a produção de citocinas, aumentando a atividade do sistema imune, mas elevações maiores poderiam apresentar efeitos opostos, predispondo o organismo a infecções (Kelley, 2001).

Os ácidos graxos ω3 favorecem a produção de prostaciclinas, que têm os efeitos opostos ao ω6, isto é, previne a formação de coágulos e causa a vasodilatação. Por esse motivo, considera-se que o ω3 tem papel maior no mecanismo de defesa do sistema imune enquanto que o ω6 participa de forma mais efetiva do processo inflamatório (Hirayama *et al.*, 2006).

A dieta ocidental é rica em ácido linoléico (ω6), presente, entre outros alimentos, nos óleos de milho, girassol e soja. Em uma dieta típica norte americana, por exemplo, consome-se 89% do total de ácidos graxos poliinsaturados como ácido linoléico, enquanto 9% de ácido linolênico. O alto consumo implica no aumento da relação ω6: ω3, principalmente quando a

ingestão de peixe ou de óleo de peixe é baixa. Segundo Russo,(2009) algumas civilizações modernas do ocidente apresentam uma relação ω6:ω3 de 15:1 a 20:1. Esse perfil é desfavorável, especialmente nas situações em que existe uma resposta inflamatória exacerbada (Garófolo e Petrilli, 2006).

Em mamíferos, os ácidos graxos essenciais podem ser convertidos a EPA e docosahexaenóico (DHA), mas esta taxa de conversão endógena é desconhecida. Acredita-se que a proporção desta conversão seja pequena, de aproximadamente 5 - 10% de ALA é convertido em EPA e 2 - 5% pode ser convertido em DHA em indivíduos adultos saudáveis (He, 2009). As principais séries dos ácidos graxos e suas fontes se encontram na Tabela 2.

Tabela 2 – Principais séries de Ácidos Graxos:

Principais Clásses			
Família	Ácido Graxos	Fórmula*	Fontes
ômega-9	Ácido oléico	C18:1	Óleos vegetais (canola, oliva); gordura animal
ômega-6	Ácido Linoléico	C18:2	Óleos vegetais (milho, girassol, soja);
	Ácido araquidônico	C20:4	carnes
ômega-3	α - Ácido Linoléico	C18:3	Óleos vegetais (linhaça, canola)
	EPA	C20:5	Peixe e óleos marinhos
	DHA	C22:6	Peixe e óleos marinhos
gordura saturada	Ácido Palmítico	C16:0	Óleos vegetais e animal
	Ácido esteárico	C18:0	Manteiga, óleo de palma, óleo de côco e gordura animal

* A notação mostra o número total de átomos de carbono e as duplas ligações. DHA=ácido docosahexanóico; EPA=ácido eicosapentanoico. Adaptado de Russo (2009).

O DHA e o EPA interferem no sistema imune competindo com o ácido araquidônico (AA) no metabolismo da cicloxigenase na membrana celular. O AA em altas concentrações (1,5g/dia por 50 dias) compromete o sistema imunológico destacando-se alterações na proliferação linfocitária, produção de citocinas e atividade de células NK aumentadas. (Oliveira, 2004) Mais uma família de mediadores lipídicos derivados de EPA e DHA, chamados de resolvinas (séries D e E) também foi descrita com potente atividade antiinflamatória (Calder, 2009).

Estudos em cultura de células demonstraram que EPA e DHA podem inibir a produção de citocinas inflamatórias como TNF-α, IL-1, IL-6 e IL-8 por monócitos, macrófagos e células endoteliais (Babcock *et al.*, 2002). Em roedores, a adição de óleo de peixe à dieta diminuiu a produção de TNF-α, IL-1

e IL-6 nos macrófagos dos ratos. A suplementação da dieta de voluntários humanos saudáveis com óleo de peixe diminuiu a produção de TNF-α, IL-1 ou IL-6 em células mononucleares (Kelley *et al.*, 1999). Uma significativa correlação inversa entre o teor de EPA de células mononucleares e da capacidade dessas células para produzir TNF-α e IL-1 em resposta ao lipopolissacarídeo foi observada em humanos (Caughey *et al.*, 1996).

Os ácidos graxos ω3 também inibem a enzima dessaturase, que diminui a produção de ácido araquidônico e, conseqüentemente, de tromboxano A_2. Logo, o aumento exagerado de ω3 reduz a relação desses ácidos graxos (ω6:ω3) a níveis abaixo de 3:1, propiciando alterações indesejáveis na coagulação sangüínea (como aumento do tempo de hemorragia, diminuição da agregação plaquetária, viscosidade do sangue e fibrinogênese, aumento da deformidade eritrocitária, diminuindo a tendência para formação de trombos) e na própria resposta inflamatória e liberação de citocinas (Mahan e Escott-Stump, 2003).

É possível perceber, então, que a dieta e o consumo de gorduras influenciam na composição lipídica da membrana celular. O consumo elevado de poliinsaturados pode aumentar os teores de ω6 da membrana. O mesmo pode ocorrer com ácidos graxos ω3, embora em tempo mais lento e relacionado à quantidade de ω3 ingerido (Waitzberg e Borges, 2002).

O maior consumo de ácidos graxos poliinsaturados causa mudanças na composição dos ácidos graxos dos fosfolípidios das membranas celulares. Essa alteração é responsável pelo aumento na fluidez da membrana, podendo interferir nas interações intracelulares, expressão de receptores de membrana, transporte de nutrientes e sinais de transdução, influenciando o crescimento celular (Kelley, 2001).

Níveis de ingestão adequada (AI) de ácidos graxos essenciais foram estabelecidos pelo Institute of Medicine, por meio das *Dietary Reference Intakes* (DRIs), baseadas na ingestão média da população americana. Esses valores preconizados de consumo são de 17g e 12g/dia de ácido linoléico (ω6) e 1,6g e 1,1g/dia de ácido linolênico (ω3) para homens e mulheres, respectivamente. Por falta de dados suficientes, o *Institute of Medicine* não estabeleceu AI ou RDA para AA, EPA ou DHA (Institute of Medicine, 2002).

Encontramos também na literatura muitos trabalhos que relatam a importância dos alimentos fontes de ácidos graxos monoinsaturados, como o azeite de oliva, muito utilizado na dieta Mediterrânea e que contribui com menor incidência de doenças coronarianas, câncer de próstata e cólon (Tuck e Hayball, 2002). O MUFA mais comum é o oléico (ω-9). A substituição na dieta dos ácidos graxos saturados pelos monoinsaturados resulta em um aumento da HDL; diminuição dos níveis séricos da LDL e triglicerídeos, além de apresentarem LDL menos susceptíveis à oxidação (Yu-Poth *et al.*, 2000). Dados sugerem que os MUFAs diminuem a agregação plaquetária, aumentam a fibrinólise e o tempo de coagulação, protegendo assim contra trombogênese (Bird e Good, 2000; Llor *et al.*, 2003).

2.1.1. **PUFA e Doença Cardiovascular**

Evidências sugerem que o aumento na ingestão de ω3 reduz fortemente a incidência de Doença Cardiovascular (DCV), mas ainda há divergência de opiniões se o mesmo efeito pode ser obtido através da diminuição dos níveis de ω6. Vale a pena notar que as diferenças étnicas no percentual de óbitos por DCV na Europa e Estados Unidos contra o Japão é de 45% e 12%, respectivamente, correspondendo a uma diferença significativa na concentração de EPA nos fosfolipídios plaquetários (0,5% versus 1,6%), enquanto o percentual de AA é semelhante nos dois grupos (26% versus 21%) (Russo, 2009).

O consumo moderado de óleo de peixe exerce um importante papel na redução do risco de DCV, como infarto do miocárdio, morte cardíaca súbita, doença coronária e falência cardíaca. Considerável atenção tem sido direcionada para avaliar a ação destes ácidos graxos, em especial ALA, EPA e DHA na prevenção e tratamento dessas doenças. A *American Heart Association* (AHA) preconiza o uso de 1g/dia de PUFA da série ω3 combinado com EPA e DHA, advindo de óleo de peixe ou gordura de peixe ou na forma de suplementos (cápsulas ou forma líquida) para pacientes com DCV (Lavie *et al.*, 2009).

Von Schacky e Harris (2007) propuseram o “indice ω3” como um novo fator de risco para doença cardíaca. Este índice é definido como a porcentagem de EPA + DHA do total dos ácidos graxos nos eritrócitos, e deve

refletir o estado de ω3 em um indivíduo. Embora os autores apontem evidências que justifiquem a eficácia clínica e preventiva do "*índice ω3*", este biomarcador ainda não foi validado.

2.1.2. **PUFA e Doença Inflamatória Intestinal**

O processo inflamatório na mucosa pode ser um ponto de partida para o câncer colorretal. A mucosa do trato gastrointestinal representa uma interface entre o organismo e as substâncias ingeridas, pois o organismo necessita tolerar os componentes da dieta e ao mesmo tempo regular a passagem de substâncias ou microorganismos que sejam nocivos a saúde. O trato gastrointestinal não tem apenas a função de digestão e absorção de nutrientes, sendo também um importante órgão imunológico (Spahn e Kucharzik, 2004).

Os linfócitos são amplamente distribuídos na mucosa intestinal, especialmente onde ocorre a absorção dos lipídios. A ativação dos linfócitos usualmente é inibida por ácidos graxos, em especial os da série ω3. Esses ácidos graxos presentes na dieta são incorporados aos fosfolipídios de membrana em maior proporção do que as demais séries. Estudos prévios mostram haver um papel benéfico dos ácidos graxos poliinsaturados da série ω3 na preservação da mucosa intestinal (Calder, 2006).

No intestino, há o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) que modula a produção de citocinas antiinflamatórias e a interação entre linfócitos T regulatórios e células apresentadoras de antígenos. O GALT é constituído por células de defesa, como os linfócitos, plasmócitos, macrófagos e células dendríticas, que podem formar agregados de nódulos, com as placas de Payer, tonsilas e apêndice ou nódulos isolados. Os linfócitos intra-epiteliais e as células M também fazem parte do GALT (Abbas e Lichtman, 2005). Os linfócitos intra-epiteliais são em sua maioria (90%) CD8+, pertencente a resposta imune inata. Há evidências que os linfócitos intra-epiteliais são células que migraram da placa de Payer para as criptas e vilosidades, onde as células T sofrem desenvolvimento extratímico. As células provenientes do timo podem migrar para o epitélio intestinal, onde se diferenciam e proliferam, adquirindo fenótipo de linfócitos intraepiteliais residentes (Spahn e Kucharzik, 2004; Abbas e Lichtman, 2005).

Estudos epidemiológicos com Esquimós revelam menor incidência de doenças inflamatórias intestinais, quando comparados com populações ocidentais e o efeito protetor é atribuído à elevada ingestão de ω3. Pacientes com desordens inflamatórias intestinais apresentam menores níveis de ω3 plasmático em relação a indivíduos normais. Sua propriedade antiinflamatória está associada à sua habilidade de modular mediadores pró-inflamatórios, como os eicosanóides (Camuesco *et al.*, 2005).

Em roedores, a administração de ω3 em animais com doença inflamatória intestinal resultou em redução na produção de LTB_4, que é um potente agente quimiotático de neutrófilos, induz a aderência de neutrófilos à parede vascular e potencializa a ação de outros mediadores, promovendo assim, a migração de neutrófilos pela parede vascular e aumento de sua permeabilidade (Camuesco *et al.*, 2005).

2.1.3. **PUFA e o câncer de cólon**

A composição de ácidos graxos na dieta, principalmente dos níveis PUFA da série ω3 e ω6 interferem no desenvolvimento do tumor do cólon em estudos com animais. Moreira *et al*. (2009) avaliaram o efeito dos PUFA da série ω3, na prevenção da carcinogênese em ratos Wistar induzidos ao câncer de cólon, alimentados com óleo de soja e peixe com e sem o acréscimo de vitamina E. Verificaram que os animais alimentados com óleo de peixe apresentaram redução no número de focos de criptas aberrantes (FCA), menor incidência e multiplicidade de tumores formados em relação ao grupo alimentado com óleo de soja, sugerindo um efeito protetor dos PUFA da série ω3.

Estudos epidemiológicos e experimentais sugerem que o consumo elevado se lipídios está relacionado com maior risco de câncer de cólon, e há evidências que indicam que a gordura da dieta, dependendo da fonte (animal ou vegetal) e a composição dos ácido graxos (saturado, monoinsaturado e poliinsaturado) provavelmente poderá reduzir a incidência destas neoplasias (Boateng *et al.*, 2006).

Segundo Dwived *et al*. (2005) menor progressão do tumor no cólon é influenciada pelo consumo de ω3 e maior pelo consumo de ω6. Os pesquisadores encorajam que, em roedores, o efeito do ω3 presente no óleo de

linhaça reduz a incidência e multiplicidade dos tumores no cólon, quando comparados com óleo de milho.

Já para Llor *et al*. (2003), o efeito do ω3 se deve à indução à apoptose celular. Em estudo com cultura de células cancerosas humanas (Caco 2 e HT-29) suplementadas com óleo de oliva, óleo de peixe, ácido oléico e ácido linoléico, verificou-se indução da apoptose e diferenciação celular no grupo rico em ω3.

Revasco *et al*. (2009) observaram que pacientes com elevada ingestão de proteína animal, carboidrato refinados, gordura saturada, PUFA da série ω6 e álcool, típica dieta ocidental, apresentaram maior expressão de NFκβ (fator nuclear κβ) e histologia do tumor mais agressiva. Já pacientes com ingestão mais elevada de PUFAs ω3, fibras, vitamina E, isoflavonóides, β-caroteno e selênio apresentaram mucosa normal e uma menor expressão de NFκβ.

Os efeitos supressivos nos tumores pelos PUFA da série ω3 de origem marinha (EPA e DHA) são consistentemente verificados, mas os de origem vegetal apresentam efeitos ainda controversos. No entanto, muitos estudos têm mostrado que óleo de linhaça apresenta atividade anti-câncer em modelos animais. Em animais Apc $^{Min/+}$, o efeito protetor é verificado somente pelo EPA e DHA, não tendo efeito protetor o LA. Esta inconsistência pode estar relacionada à pequena conversão do LA a EPA e DHA, o que requer futuras investigações (Berquin *et al.*, 2008).

Na Escócia, um estudo avaliou associações entre câncer colorretal e ingestão dos ácidos graxos, de indivíduos adultos com adenomocarcinoma colorretal, incluindo 1455 casos e 1455 controles nas unidades cirúrgicas hospitalares por um período de 7 anos. Indivíduos com adenocarcinomas apresentavam um maior consumo de ácidos graxos trans, ácidos graxos saturados (palmítico, esteárico), MUFA (oleico), PUFA (linoléico), e baixo consumo de PUFA da série ω-3, EPA e DHA (Theodoratou *et al.*, 2007).

Courtney *et al*.(1996) avaliaram o efeito da utilização de EPA purificado (2g/dia) em pacientes com adenomas no cólon. Após 3 meses de suplementação, verificaram menor proliferação de criptas, menor atividade de COX-2 e aumento da apoptose na mucosa tratada com EPA.

Kojima *et al*. (2005) avaliaram a relação entre os níveis séricos de ácidos graxos e o risco de câncer colorretal no Japão. No estudo caso-controle, constituído de 169 casos com câncer colorretal e 481 controles, pareados por idade e região geográfica, não foram verificados efeitos adversos entre o consumo de PUFA ω6 e o risco de câncer colorretal.

Efeitos colaterais relacionados à suplementação com ω3 também não têm sido apresentados como relevantes. Destaca-se em alguns casos a ocorrência do aumento nos níveis de LDL-colesterol, aumento no tempo de sangramento e piora do perfil glicêmico em diabéticos. Recomenda-se monitoramento em indivíduos que recebem doses superiores a 3g por dia (Oh, 2005).

Considerando que, os PUFA da série ω3 apresentam maior número de duplas ligações, o que torna a membrana celular mais suscetível à peroxidação lipídica, se um aumento concomitante de nutrientes antioxidantes não for instituído. Desta forma, recomenda-se um aumento na ingestão de vitaminas antioxidantes para compensar o aumento no consumo de ácido graxo poliinsaturado, a fim de estabilizar as duplas ligações (Institute of Medicine, 2000). O consumo de produtos alimentares com alto teor de ácidos graxos poliinsaturados deve ser acompanhado de, no mínimo, 0,4mg a 0,6mg de vitamina E por grama de PUFA (Garófolo e Petrilli, 2006).

Segundo Calder (2009), considerar que todos os mediadores formados a partir do AA são pró-inflamatórios, que os eicosanóides produzidos a partir do EPA são sempre menos potentes do que os formados a partir do AA, e ainda que o EPA é o principal e talvez o único PUFA ω3 anti-inflamatório podem estar incorretos. As ações dos PUFA ω6 e ω3 e seus derivados sobre o processos inflamatórios envolvem mecanismos mais complexos do que os anteriormente reconhecidos e requerem mais estudos para esclarecer seus mecanismos e efeitos.

2.2. Caracterização das fontes lipídicas

2.2.1. **Óleo de Peixe**

O óleo de peixe possui elevada concentração dos ácidos graxos EPA e DHA. Peixes e frutos do mar também são ricas fontes de ácidos graxos poliinsaturados. As várias espécies de peixes possuem diferenças quanto às

concentrações dos ácidos graxos ω3, devido às influências ambientais: temperatura, salinidade e profundidade das águas na qual vivem, e, conseqüentemente reflexo da sua alimentação. Peixes com maior conteúdo de EPA e DHA são aqueles de água fria e profunda. O óleo de peixe apresenta em média na sua composição 17,6% de ácidos graxos monoinsaturados, 21,4% de ácidos graxos saturados e 52,1% de ácidos graxos poliinsaturados (Larsson *et al.*, 2004).

Niu *et al*. (2006) num estudo de meta-análise utilizando os resultados de 47 pesquisas, verificaram que a suplementação com óleo de peixe foi efetiva em reduzir os níveis séricos de triglicerídeos em 0,34mmol/L por um período médio de 24 semanas, em pacientes que apresentavam hipertrigliceridemia. Além disso, Larson *et al*. (2004) verificaram que os PUFA da série ω3 pode exercer também alguns de seus efeitos antitumorais afetando tanto a expressão gênica quanto a atividade de algumas moléculas transdutoras de sinais, envolvidas no controle do crescimento celular, diferenciação, apoptose, angiogênese e metástases.

A utilização de óleo de peixe na dieta de roedores em laboratório, ou seu uso como suplemento na dieta de seres humanos, tem sido relacionado a uma menor produção de eicosanóides, como PGE_2, TXB_2, LTB_4 e LTE_4 por células inflamatórias (Calder, 2009).

Diversos estudos experimentais têm sugerido a possibilidade dos ácidos graxos ω3 terem um papel preventivo na carcinogênese colorretal (Cheng *et al.*, 2003; Llor *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2009) sendo mais efetivos para a proteção nos estágios iniciais da carcinogênese, ou logo após sua manifestação (Curi *et al.*, 2002; Larsson *et al.*, 2004). Vários mecanismos são propostos para a ação do ω3 na carcinogênese, seja na promoção ou supressão do crescimento tumoral e os efeitos podem resultar da associação de vários eventos.

2.2.2. **Óleo de Linhaça**

A semente de linhaça (*Linum usitatissimum*) é utilizada industrialmente para a produção do óleo de linhaça, porém ainda pouco difundida e conhecida como grão comestível. Consiste em uma excelente fonte do ácido graxo alfa-

linolênico, sendo este, constituinte de mais de 50% do seu óleo, junto com cerca de 15% do ácido graxo linoléico (Banerjee *et al.*, 2002) .

O óleo de linhaça em sua composição centesimal apresenta em média 18,0% de ácidos graxos monoinsaturados, 10,8% de ácidos graxos saturados e 71,2% de ácidos graxos poliinsaturados (Taco, 2006)

Experiências têm relatado que o consumo de ácido alfa-linolênico pode aumentar a concentração dos ácidos EPA e DHA e reduzir o ácido araquidônico no plasma e nos tecidos. Em virtude da sua composição nutricional, a linhaça e o óleo de linhaça vem sendo estudados como uma possível aliada na redução de risco de doenças crônicas não-transmissíveis.

Trabalhos anteriores já relataram vários benefícios associados ao consumo constante de linhaça, entre eles efeitos hipocolesterolemiantes (Vijaimohan *et al.*, 2006), anticancerígenos (Yang *et al.*, 2006), antioxidantes (Brooks et al., 2004), hipoglicêmicos (Prasad, 2005), redução da inflamação (Zhao *et al.*, 2007) e laxante (Cunnane *et al.*, 1994).

Williams *et al*. (2007) avaliaram os efeitos da adição dietética do óleo e semente de linhaça em ratos Fischer 344 induzidos ao câncer. Verificaram que a semente e o óleo de linhaça reduziram a incidência de FCA no cólon dos roedores em 87,5% e 84%, respectivamente. A composição da linhaça rica em PUFA da série ω3 exerce uma importante função quimiopreventiva no desenvolvimento de tumores no cólon.

Bommareddy *et al*.(2009) investigaram os efeitos quimiopreventivos da semente e do óleo da linhaça, sobre o desenvolvimento de tumores intestinais de roedores induzidos ao câncer. Verificaram que a semente linhaça reduziu significativamente multiplicidade e o tamanho do tumor no intestino delgado e cólon dos roedores, e o grupo que recebeu a semente junto com o óleo de linhaça, houve uma redução na expressão de COX-1 e COX-2 na mucosa colônica.

2.2.3. **Óleo de Soja**

A soja (*Glycine Max)* é uma das plantações mais cultivadas há mais tempo no mundo, e constitui também o óleo vegetal mais consumido no mundo, que representa 18-22% do grão de soja. O óleo de soja em sua composição centesimal apresenta 23,3% de ácidos graxos monoinsaturados,

14,4% de ácidos graxos saturados e 57,9% de ácidos graxos poliinsaturados (Taco, 2006) Sua composição pode variar de acordo com a variedade de soja usada no plantio, época de colheita e fatores climáticos.

A alta concentração de ácidos graxos insaturados torna o óleo de soja bastante suscetível à degradação oxidativa. O consumo de óleos vegetais, destacando o óleo de soja, ricos em PUFA da série ω6, como o ácido linoléico e araquidônico, podem favorecer o aparecimento de um quadro pró-inflamatório, predispondo a doenças, como o câncer de cólon. Podem exercer efeitos pró-cancerígenos, relacionados a elevada peroxidação de lipídios estruturais, efeitos mediados pelos eicosanóides, alterações na taxa de apoptose e expressão de genes relacionados ao tumor (Schwartz *et al.*, 2004).

Moreira *et al*. (2009) avaliaram o efeito da adição na dieta do óleo de soja e peixe com e sem o acréscimo de vitamina E em ratos induzidos ao câncer, e encontraram efeitos protetores na incidência e multiplicidades dos tumores no grupo peixe, não encontrando efeitos protetores no óleo de soja.

Zhou *et al*. (2000) mostraram que a incidência e o volume do tumor em ratos induzidos ao câncer era significativamente maior nos animais tratados com óleo de soja em relação aos que receberam óleo de peixe. Óleos ricos em ácido linolênico (ω6), como o óleo de soja e girassol, não apresentam apresentam efeitos quimiopreventivos no desenvolvimento de câncer de cólon, mama e rim, quando comparados com óleos ricos em ácido α-linolênico (ω3), como o óleo de perila (Hirose *et al.*, 1990).

2.2.4. **Azeite de Oliva**

Dentre os óleos vegetais comestíveis comercializados mundialmente, o azeite de oliva é um dos mais importantes e antigos do mundo, sendo muito usado nos países que margeiam o Mediterrâneo. É raro existir, dentre os óleos vegetais não refinados, um *flavor* mais apreciado do que o do azeite de oliva virgem (Goodacre *et al.*, 1993).

O azeite extraído de olivas contém o ácido oléico, um ácido graxo monoinsaturado, que foi por muito tempo, considerado fundamental pelas propriedades benéficas na redução da oxidação do LDL-colesterol. O azeite extra virgem é o único que não é extraído por solventes, mas é obtido por compressão da oliva a frio, o que não altera a natureza de seus componentes.

Portanto, os principais efeitos benéficos do azeite de oliva estão relacionados ao consumo do extravirgem, especialmente por seu conteúdo de MUFA e polifenóis os quais podem agir como: (1) potente inibidor de radicais livres; (2) inibidores da oxidação de LDL-colesterol; (3) inibidores de agregação plaquetária; (4) antitrombóticos. Os efeitos protetores do azeite de oliva estão correlacionados ao seu conteúdo de MUFA e aos compostos bioativos nele contidos (Angelis, 2001).

O azeite de oliva, em sua composição centesimal, apresenta 73,7% de ácidos graxos monoinsaturados, 13,5% de ácidos graxos saturados e 8,4% de ácidos graxos poliinsaturados (Taco, 2006). Ainda, o azeite de oliva apresenta uma proporção ideal de entre a 'série ω6 e:ω3, ou seja, uma proporção 6:1-10:1 (Moreira e Mancini-Filho, 2004).

O azeite de oliva apresenta muitos efeitos benéficos à saúde, em especial na modificação da resposta imune e inflamatória. Cunesco *et al*. (2005) avaliaram o efeito do azeite de oliva, com e sem o acréscimo de óleo de peixe, rico em PUFA da série ω3, em ratos induzidos a colite. Verificaram que os animais alimentados com azeite de oliva apresentaram menor resposta inflamatória quando comparado com grupo controle, alimentado com óleo de soja, e, este efeito benéfico, foi aumentado após a adição de óleo de peixe. A incorporação de ω3 ao azeite de oliva reduziu significativamente os níveis de TNF-α e LTB_4, e estes resultados sugerem os efeitos benéficos do azeite de oliva na doença inflamatória intestinal, com efeito potencializado pela suplementação com ω3.

Stoneham *et al.* (2000) avaliaram os padrões dietéticos de 28 países, em especial o consumo de óleo de oliva e sua correlação com a incidência de câncer colorretal e verificaram que, a carne e o peixe estavam positivamente associada à incidência de câncer de cólon, e negativamente associada ao óleo de oliva. O efeito protetor do óleo do óleo de oliva pode estar ligado aos ácidos biliares secundários, metabolismo das poliaminas nos enterócitos e redução da progressão do adenoma a carcinoma na mucosa colônica.

Há evidências que os óleos vegetais comestíveis possuem um relativo grau de proteção contra o câncer de cólon. A composição em ácidos graxos define diferentes respostas e podem estar relacionados a variação na taxa de

apoptose e impactos na expressão gênica associados com menor desenvolvimento do tumor no cólon e menor formação de FCA.

2.3. Câncer de Cólon

Câncer é caracterizado pelo aumento desordenado e incontrolado do número de células que, ao alcançarem determinada massa, acabam por invadir e comprimir os tecidos vizinhos. Esse processo ocorre por meio de alterações nos genes que controlam a proliferação e o crescimento celular. As células geradas são propensas ao rápido crescimento, formando tumores. Os tumores formados podem ser benignos ou malignos. Os tumores benignos são revestidos por cápsula fibrosa que garantem sua retirada sem maiores danos ao organismo. Entretanto, os tumores malignos têm a propriedade de entrar na corrente sanguínea e vasos linfáticos, expressando formas secundárias de tumor ou metástases em outros sítios do corpo (Alberts *et al.*, 1997).

A carcinogênese, no entanto, é um processo complexo que envolve vários estágios, onde ocorrem eventos celulares, moleculares e morfológicos. O processo da carcinogênese é divido em três estágios. No primeiro, chamado de “iniciação”, as células sofrem efeitos de agentes cancerígenos ou carcinógenos, que provocam modificações permanentes e irreversíveis em alguns genes, como mutações simples, amplificações gênicas, rearranjos cromossômicos, translocações, deleções e aneuploidias. Neste estágio, não há a detecção clínica do tumor. A eficiência da iniciação depende da síntese de DNA e da divisão celular. No segundo estágio, a “promoção”, proporciona a expressão fenotípica da alteração do genoma. Ao sofrer efeito de agentes cancerígenos classificados como oncopromotores, as células geneticamente alteradas originam focos de proliferação celular tranformando-se em malignas, de forma lenta e gradual. Nesta transformação, geralmente há um longo e contínuo contato com o agente cancerígeno promotor, podendo ocorrer reversibilidade na suspensão do contato com o cancerígeno promotor. O terceiro e último estágio, denominada “progressão”, é caracterizado pela instabilidade progressiva do cariótipo, multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Neste estágio, os focos de multiplicação resultam em neoplasias malignas com capacidade invasiva e metastática, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clinicas da doença (Anderson, 1995).

No cólon, 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 mutação em seu material genético.

Várias mutações e alterações no DNA celular devem-se ao controle da divisão celular nos genes relacionados. Os genes mutados que podem estar envolvidos na transformação maligna da célula são. Os *oncogenes* (K-ras, src, c-myc), correspondem às formas mutadas dos pró-oncogene, envolvidos na regulação da divisão celular, na codificação de fatores de crescimento e seus receptores, proteínas envolvidas na transdução de sinais e regulação da transcrição gênica. Os *genes supressores de tumores* (APC, DCC, p53 e MCC), codificam proteínas que inibem a proliferação celular, além dos genes de reparo do DNA (hMSH2, hMLH1, hMSH6, hPMS1, hPMS2). A mutação genética mais comum neste tipo de gene é a do *p53,* que é responsável por codificar uma proteína nuclear, e está associado a mais de 50% dos casos de câncer de cólon. Em roedores, a p53 raramente se encontram alteradas (Parham, 2001; Wang *et al.*, 2009).

As primeiras alterações na mucosa na sequência adenoma-carcinoma são os focos de criptas aberrantes (FCA). Com o tempo, os FCA podem gerar uma lesão poliplóide visível, com alterações morfológicas, sendo menos diferenciada e mais displásica, até adquirir fenótipo de carcinoma (Figura 2). Esta progressão geralmente é lenta, podendo levar décadas para que os tumores sejam detectáveis (Saad-Hossne *et al.*, 2005). Os estágios do desenvolvimento histopatológico no tumor de câncer colorretal é marcado por aumento de tamanho e displasia, até a formação do carcinoma invasivo (Gordon e Nivatvongs, 2007).

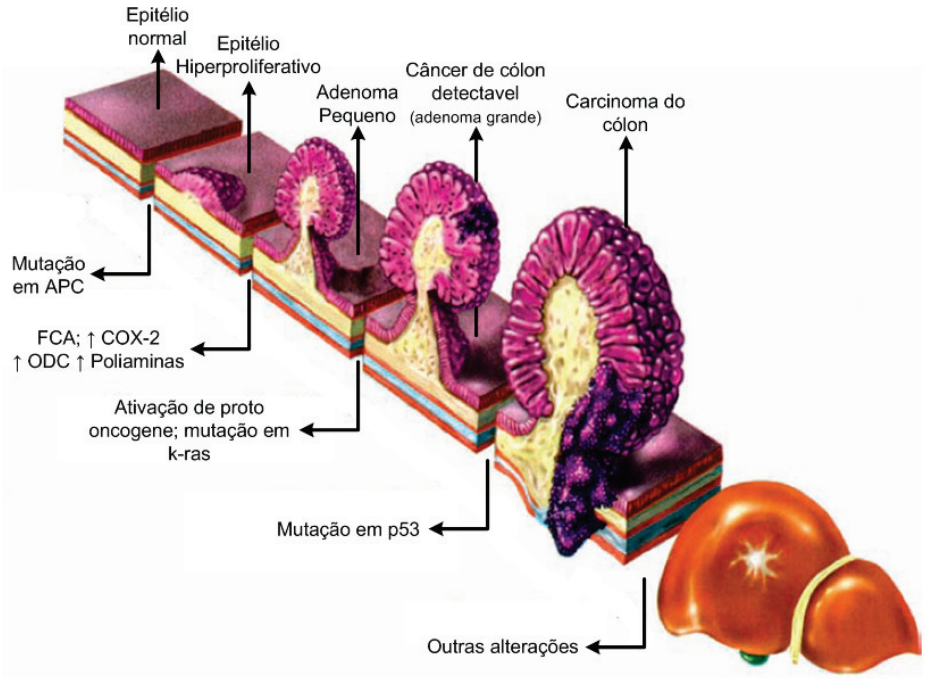


Figura 2 - Representação do modelo genético da sequência adenoma- carcinoma no câncer colorretal, apontando as mutações e alterações genéticas.
APC=gene supressor do tumor; FCA= focos de criptas aberrantes; K-ras= oncogene, p53 = gene supressor do tumor; Cox-2= cicloxigenase da classe 2; ODC= ornitina descaboxilase. Adaptado de Gordon (2007).

O câncer consiste em uma importante causa de morte no mundo. No Brasil desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados no Sistema de Informações sobre Mortalidade. Compreender e controlar as doenças malignas requer conhecimentos científicos dos complexos mecanismos de regulação molecular intracelular e às escolhas individuais do estilo de vida (Instituto Nacional De Câncer, 2010).

Nos Estados Unidos e na Europa, são diagnosticados entre 130.000 a 180.000 novos casos, respectivamente, todos os anos. Estima-se que, em 2020, a incidência de novos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo que 60% desses ocorrerão em países em desenvolvimento. É também conhecido que pelo menos um terço dos novos casos de câncer que ocorrem anualmente no mundo poderia ser prevenido.

O câncer de cólon e reto configura-se como a terceira causa mais comum de câncer no mundo em ambos os sexos e a segunda causa em países desenvolvidos. No Brasil em 2010, são esperados 236.240 novos casos no sexo masculino e 253.030 para sexo feminino. Estima-se que o câncer de

cólon e reto, quarto tipo de câncer mais incidente, ocorra aproximadamente 28 mil novos casos em 2010 (Instituto Nacional De Câncer, 2010).

O câncer colorretal é uma doença multifatorial, sendo que 25% dos casos estão relacionados a fatores hereditários e 75% relacionados a outros fatores de risco, como fumo, obesidade, sedentarismo, envelhecimento e hábitos dietéticos (Wallace e Caslake, 2001).

As influências mais significantes no desenvolvimento do câncer colorretal, são sem dúvida, os fatores ambientais, sendo a dieta um importante fator na iniciação e progressão do câncer de cólon. O elevado consumo de frutas, hortaliças frescas, cereais, peixes, baixo consumo de carnes vermelhas processadas e de bebidas alcoólicas, bem como a prática de atividade física estão associados a um baixo risco de desenvolvimento do câncer colorretal. Entre os hábitos dietéticos, a quantidade de gordura na dieta tem sido associada com elevada incidência de câncer colorretal (Wallace e Caslake, 2001; Martins e Gruezo, 2009).

A gordura da dieta tem relação positiva com aumento do risco de desenvolvimento do câncer de mama e colorretal, mais especificamente os ácidos graxos ω6. O ácido araquidônico leva à formação de eicosanóides (mediadores do processo inflamatório) através das vias da lipoxigenase e cicloxigenase. Estes estão relacionados com a iniciação e promoção do câncer, a proliferação celular e a metástase tumoral (Mantovani e Pierotti, 2008).

Desde 1960, estudos epidemiológicos apontaram para os efeitos do consumo elevado de lipídios sobre o desenvolvimento da carcinogênese. Há uma correlação entre os tipos de ácidos graxos consumidos e a ocorrência de cânceres de diversas etiologias, o processo metastático e a caquexia decorrente do crescimento tumoral. Os ácidos graxos são mais efetivos nos estágios iniciais da carcinogênese, ou imediatamente após a sua manifestação, o que representa as fases de promoção e progressão da neoplasia, respectivamente (Martins e Gruezo, 2009).

Os PUFA da série ω3 e ω6 afetam vários passos do processo de carcinogênese, podendo ter efeitos diretos ou indiretos que incluem: (1) peroxidação das ligações duplas dos AGPIs, levando ao estresse oxidativo constante e à geração de espécies reativas que podem causar dano ao DNA;

(2) Formação de eicosanoides, lipídios de vida curta que derivam principalmente do ácido araquidônico; (3) Efeitos sobre a proliferação celular e sobre as vias de transdução de sinais, levando à expressão alterada de genes; (4) Efeito sobre enzimas, como o citocromo P450; (5) Alterações estruturais e funcionais nas membranas celulares, resultando em alterações nos receptores de hormônios e fatores de crescimento (Martins e Gruezo, 2009).

Existe baixa incidência de câncer de cólon na Finlândia e outras áreas do mediterrâneo. Estas populações tem uma dieta rica em gorduras originadas de peixes e óleos de peixes, uma das principais fontes de ácidos graxos poliinsaturados, pertencentes à família ω3 (Llor *et al.*, 2003).

Fitzpatrick e Soberman (2001) relataram que uma alta ingestão de óleo de milho e outras fontes de AGPI ω6 exercem diferentes efeitos fisiológicos e metabólicos, incluindo: mudanças na microflora intestinal; aumento dos níveis de prostaglandinas; aumento da concentração de ácidos biliares no lúmem colônico que são tóxicos ao epitélio, e, atividade aumentada da ornitina descarboxilase na mucosa colônica. Esta resulta no aumento das poliaminas no epitélio, exacerbando a proliferação celular nas criptas do cólon.

2.3.1. **Modelo animal e agente carcinogênico utilizado**

Estudos experimentais empregando modelos animais têm demonstrado valor inestimável para testar e aprimorar hipóteses relacionando a dieta com o câncer colorretal. A prevenção está relacionada à regressão, inibição ou eliminação de lesões pré-neoplásicas, com conseqüente redução da incidência de câncer (Bird e Good, 2000).

Os roedores, como modelo experimental, é mais comumente utilizado para o estudo do câncer colorretal esporádico induzido pelo uso de substâncias carcinogênicas do cólon, como a 1,2 dimetil-hidrazina (DMH) e azoximetano (AOM) (Rosenberg *et al.*, 2009).

O estudo da patogênese do câncer do cólon induzido por substância carcinogênica em modelos de roedores apresenta vantagens, tais como os modelos são altamente reprodutíveis, podem ser facilmente testados em animais de diferentes origens genéticas e a patogênese permite reproduzir o CRC humano, pelo menos nas fases iniciais. A elevada freqüência de tumores gerados dentro do cólon distal dos roedores, bem como, a histogênese de

múltiplos adenomas com subseqüente desenvolvimento de adenocarcinomas, reforça a importância desta espécie para o estudo do câncer de cólon. Há uma ampla disponibilidade da informação genética de alguns modelos animais, como em animais recombinantes, *knockout* e *knockin* disponíveis para estudo (Rosenberg *et al.*, 2009).

A indução do câncer de cólon, por meio do uso da droga DMH, constitui uma boa ferramenta para explorar a relação entre focos de criptas aberrantes (FCA) e câncer de cólon. A DMH induz a proliferação de tumores no cólon, especialmente no sigmóide e reto, podendo também ocorrer ao redor da junção duodeno-jejuno. O mecanismo de ação dessa droga provavelmente interfere no processo de metilação do DNA, via citocromo P450. A DMH é um dos agentes mais empregados em modelos experimentais de carcinogênese de cólon em roedores (Larangeira *et al.*, 1998).

DMH e seu metabólito o AOM que são pró-carcinogênicos requerem ativação metabólica para formar produtos reativos que interagem com o DNA. O metabolismo destes compostos envolve várias enzimas xenobióticas de metabolização, que procede por meio de várias etapas de N-oxidação e hidroxilação, incluindo a formação do metilazoximetanol (MAM) e seguinte hidroxilação da AOM. O metabólito reativo MAM, que é prontamente convertido ao íon metildiazônio poderá alquilar macromoléculas no fígado e cólon, incluindo adição de grupos metil na posição N7 ou O6 da guanina (O6-metil-desoxiguanosina e N7-metil-desoxiguanosina). É interessante notar que o maior número de células inflamatórias está presentes em modelos animais mais sensíveis à droga, sugerindo uma forte relação entre o componente inflamatório e a fisiopatologia dos tumores encontrados neste modelo (Rosenberg *et al.*, 2009).

A utilização de AOM pode aumentar a expressão da COX-2 e, conseqüentemente, a PGE_2 nos adenocarcinomas. Foram identificados cinco mecanismos pelos quais a COX-2 contribui para a tumorigênese, incluindo a inibição da apoptose, o aumento da angiogênese, maior invasividade, conversão de pró-carcinógenos a agentes cancerígenos e modulação da inflamação/imunossupressão. O papel da COX-2 como agente inflamatório envolvido na formação de tumores é reforçado pela ação de drogas anti-

inflamatórioas não esteróides ou inibidores específicos da COX-2 (Evans *et al.*, 2006).

2.3.2. **Sistema Imune e o câncer de cólon**

O papel do sistema imune no câncer sempre foi objeto de estudo. O sistema imune protege o organismo contra agressões de patógenos e pode ser dividido em dois tipos: o inato e o adaptativo (Sansonetti, 2004). As células são chamadas geralmente de leucócitos, as quais estão divididas em duas categorias, os fagócitos (neutrófilos, macrófagos, monócitos, eosinófilos e basófilos) e os linfócitos. A comunicação entre os dois sistemas acontece por contato direto entre as células ou pela produção de mensageiros químicos, as citocinas (Calder, 2002).

A inflamação facilita a progressão das células normais a células malignas, por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-6, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e consequentemente, todos estes fatores ativam as moléculas de sinalização envolvidas na inflamação e carcinogênese, como fator de transcrição nuclear (NF$\kappa\beta$), ativador de proteína 1 (AP-1), induzindo óxido nítrico sintase (iNOS) e COX-2 (Lee e Lim, 2008). Segundo Chapkin *et al.*(2008), o risco de desenvolver o câncer colorretal aumenta cerca 0,5-1% a cada ano, em pacientes com inflamação intestinal crônica que apresentam a doença por um período maior que sete anos.

A palavra citocina (cito, que significa célula e cinina, que significa hormônio) são proteínas semelhantes a hormônios que permite a comunicação entre a célula e o ambiente externo. O termo citocina é usado para designar várias substâncias como: linfocinas, monocinas, interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF) e quimiocinas (Tayal e Kalra, 2008). Apresentam diversas funções como: mediar e regular respostas imunitárias, inflamação e hematopoiese (Dunlop e Campbell, 2000). O sistema imunitário tem papel relevante no desenvolvimento tumoral, pois além de produzir citocinas também atua na imunovigilância. E, apenas quando as células tumorais conseguem sobrepujar as barreiras do sistema imunitário, é que ocorre a progressão tumoral e a morte do hospedeiro (Zitvogel *et al.*, 2008).

2.3.2.1. **Mediadores do processo inflamatório:**

O fator de crescimento transformador (TGF-β) e outras citocinas podem ter um efeito complexo sobre o câncer de cólon. O TGF-β desempenha um papel importante na modulação da carcinogênese de cólon em humanos. No cólon normal, TGF-β tem um efeito antiproliferativo sobre células epiteliais, induzindo a parada do crescimento em G1 e apoptose. Este efeito antiproliferativo é mediado através dos receptores tipo I e II, que dimerizam a ligação TGF-β, conduzindo à ativação de proteínas regulatórias transcricionais SMAD 2, 3 e 4. O TGF-β também pode influenciar o desenvolvimento do câncer de cólon através de sua potente atividade imunossupressora (Rosenberg *et al.*, 2009).

O TGF-β é um peptídio multifuncional que regula a proliferação celular, diferenciação, adesão, apoptose, angiogênese e outros processos celulares. Geralmente, ele inibe o crescimento de células do epitélio intestinal normal, mas pode mudar para um estimulador de crescimento com a progressão do tumor, aumentando a transformação maligna. Nos estágios mais avançados do desenvolvimento tumoral, o TGF-β é ativamente secretado pelas células tumorais ou células do estroma e contribui para o crescimento celular, invasão e metástase, e diminui a resposta imune anti-tumor (Evans *et al.*, 2006).

Os níveis de TGF-β se correlacionam com o estadiamento de Dukes e têm sido relacionado à invasão vascular de tumores, comprometimento nos nódulos linfáticos e mestástases distantes (Evans *et al.*, 2006). Segundo Becker *et al.*,(2006), ratos deficientes em TGF-β desenvolvem múltiplas mudanças inflamatórias por todo corpo levando a morte com 2 semanas de vida.

A interleucina 8 (IL-8) é produzida por uma grande variedade de células normais e tumorais, e sua principal função está relacionada com a iniciação e amplificação das reações inflamatórias agudas. A IL-8 também está envolvida no processo inflamatório crônico e doenças, como o câncer. O aumento da expressão de IL-8 tem sido verificado em vários tumores, e alguns estudos correlacionam os níveis de IL-8 sérico e ou presente nos tecidos com a progressão e metástização dos tumores. A IL-8 atua como fator de atração e ativação de monócitos, desencadeando uma série de doenças inflamatórias

(Hsieh *et al.*, 2001; Cacev *et al.*, 2008). A IL-8 pode aumentar o processo inflamatório, proliferação de células tumorais e migração de células epiteliais no cólon. A IL-8 tem sido relacionado a indução da migração de células tumorais, e, sua expressão está relacionada com o crescimento do tumor, angiogênese e potencial metastático em vários carcinomas humanos e em modelos animais. A expressão de IL-8 nas linhagens de células humanas está associada com potencial metastático e atua como fator de crescimento autócrino e parácrino na progressão e metástase no câncer de cólon (Rubie *et al.*, 2007).

A proteína de quimioatração de monócitos 1 (MCP-1) tem sido muito relacionada com o início de doenças inflamatórias crônicas. Entre as quimiocinas, o MCP-1 é um dos mais potentes fatores de recrutamento de macrófagos, produzido por células endotelias, fibroblastos, células musculares lisas e monócitos/macrófagos (Hsieh *et al.*, 2001).

As citocinas são um componente essencial e orquestrador do microambiente inflamatório dos tumores. Como tal, representam hoje um alvo principal dos esforços terapêuticos com o intuito de esclarecer os fatores inflamatórios relacionados ao câncer. Por muitos anos, as pesquisas com a indução do câncer têm focado na destruição/inibição das células tumorais, buscando estratégias para modular e oferecer um microambiente desfavorável a estas células alteradas. As pesquisas, no entanto, têm buscado na dieta, nutrientes capazes de exercer esse papel modulador das doenças crônicas e os possíveis mecanismos de ácidos graxos no câncer de cólon.

2.3.3. **Biomarcadores**

2.3.3.1. **Aminas Bioativas**

A indução da carcinogênese em roedores com agentes químicos resultam em defeitos celulares e bioquímicos. Estes defeitos incluem desregulação no metabolismo do ácido araquidônico e alterações na ornitina descarboxilase (ODC) e nos níveis de poliaminas, além da maior síntese de citocinas pró-inflamatórias (Rosenberg *et al.*, 2009).

Várias vias bioquímicas são alteradas nas células com câncer de cólon para sustentar a alta proliferação celular observada nos tumores. Um exemplo importante é a via de biossíntese de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) que são necessárias para o crescimento e proliferação celular.

Elas existem primariamente complexadas com o RNA e seu efeito na proliferação celular está relacionado ao estímulo na síntese de proteínas. ODC é uma enzima limitante na síntese de poliaminas, gerando putrescina a partir da ornitina. A ODC está intimamente envolvida na proliferação celular normal, mas também se relaciona com a carcinogênese no cólon, na medida em que o aumento da atividade da ODC e síntese de poliaminas é um fenômeno que ocorre em células com rápida proliferação, incluindo o câncer de cólon (Rosenberg *et al.*, 2009).

Em humanos, o câncer de cólon também apresenta elevada síntese de poliaminas e atividade ODC, e, a inibição desta última por agentes, como diflurometilornitina, pode suprimir o desenvolvimento de câncer de cólon.

No câncer colorretal, o conteúdo de poliaminas é aumentado de 3-4 vezes em relação a mucosa normal, e por isso tem sido considerada um importante biomarcador da proliferação neoplásica no cólon. As células do câncer de cólon, diferentes das outras células neoplásicas, são constantemente expostos a alta concentração da putrescina, advinda do lúmem fecal, originadas da microflora colônica. Algumas espécies de bactérias não só aumentam a síntese de poliaminas, mas também favorece a proliferação de células neoplásicas no cólon. A putrescina exógena é rapidamente convertida em espermina e espermidina, e as células cancerosas do cólon são hábeis a utilizar todo *pool* de poliaminas disponíveis. As poliaminas são envolvidas em quase todos os passos da carcinogênese, atuando na hiperproliferação e migração celular. Recentes evidências sugerem que a modificação na sinalização da ODC depende da expressão de APC.

Acredita-se que as poliaminas também estabilizam o DNA, mas podem ocorrer distorções e alterar a conformação do DNA e conseqüentemente mudança na transcrição de alguns genes; interagem com a membrana alterando sua fluidez, e recentemente, as poliaminas, em especial a espermina, pode exercer um papel de antioxidante natural, protegendo as células de danos oxidativos (Wallace e Caslake, 2001).

Considerando todas as funções das poliaminas no câncer colorretal, parece provável que a privação de poliaminas, modulação da sua via metabólica bem como a insuficiência na captação de poliaminas em células neoplásicas, pode ser um objetivo específico de quimioprofilaxia e

quimioterapia de câncer colorretal. Específicas enzimas inibitórias de poliaminas, em particular, da ODC tem sido alvo das técnicas quimiopreventivas e quimioterapias (Milovic e Turchanowa, 2003).

As células cancerosas têm apresentado maiores níveis de putrescina, espermidina e espermina devido ao aumento da ODC. Para esse fim, a utilização de análogos de poliaminas tem mostrado ser uma alternativa interessante, uma vez que os análogos competem com as poliaminas pela absorção intestinal e inibição endógena da biossíntese por mecanismo de *feedbck* (Wallace e Caslake, 2001).

2.3.3.2. **Focos de Cripta Aberrante (FCA)**

Estudiosos verificaram que carcinógenos químicos poderiam também induzir alterações macroscópicas no epitélio colônico, como alterações na secreção de mucina e na taxa de proliferação de criptas. Delapierre *et al.,* (1981) monitorou o cólon descendente de ratos por microscopia eletrônica de transmissão e observou lesões pré-neoplásicas após três semanas com tratamento com DMH. Bird (1987) desenvolveu uma metodologia que poderia facilmente identificar e quantificar as alterações macroscópicas na superfície do cólon, denominadas focos de criptas aberrantes – FCA, utilizando o corante azul de metileno. Estas são lesões morfológicas iniciais na evolução gradual do câncer de cólon, que freqüentemente aparecem na superfície do cólon distal dentro de duas semanas de tratamento carcinogênico. Claramente, a diversidade dos FCA identificados em modelos de roedores proporciona aos pesquisadores novas ferramentas para estudar as primeiras fases do CRC. Lesões caracterizadas nestes modelos podem finalmente tornarem-se útteis para predizer o risco de câncer em seres humanos (Rosenberg *et al.*, 2009).

O foco de cripta evolui de uma cripta alterada exibindo características pré-neoplásicas, como displasia, proliferação anormal, mutação de genes. A multiplicidade e o tamanho das criptas aumentam conforme aumenta o duração do experimento (Bird e Good, 2000; Rodrigues *et al.*, 2002).

2.3.3.3. **Composição Corporal**

A presença da doença neoplásica, freqüentemente induz a perda de peso, em especial perda de massa magra em função do aumento da síntese

de mediadores inflamatórios de resposta pró-inflamatória e produção de fatores que induzem a degradação protéica. Entre eles, os mais importantes são o TNF-α, IL-1, IL-6 e o Fator Indutor de Proteólise (PIF). Além da redução do apetite estimulam as respostas metabólicas de fase aguda (Garófolo e Petrilli, 2006). Além disso, há também uma desregulação no metabolismo da glicose e dos lipídios, catabolismo protéico acentuado; aumento na taxa metabólica basal, com conseqüente aumento no gasto energético. Aliado a este quadro, há uma proteólise intensa (em função do estímulo do PIF) e perda de massa muscular, o que resulta em uma quadro de emagrecimento e caquexia, alterando a composição corporal (Garófolo e Petrilli, 2006).

Estratégias terapêuticas vêm sendo estudadas para atenuar a resposta inflamatória exacerbada, via medicamentosa ou nutricional, na tentativa de melhorar as chances de cura de pacientes com câncer, em especial o balanço entre a ingestão de lipídios da família ω6 e ω3.

Rao *et al.(2001)* compararam o efeito modulador de diferentes dietas na tumorigênese colorretal. Para isso, utilizaram como modelo ratos F344 induzidos ao câncer e compararam o efeito de três dietas: 1- hiperlipídica contendo um mix de lipídios rico em ácidos graxos saturados (20% lipídios); 2- hiperlipídica, rica em ω3 (17% óleo de peixe e 3% óleo de milho) e o grupo controle, alimentado com óleo de milho (5%). O grupo alimentado com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados apresentou aumento significante no número de FCA, no número do tumor em sua multiplicidade, menor percentual de apoptose nas células epiteliais colônicas, além da maior expressão e atividade de COX-2 nos tumores do cólon.

2.4. Referências:

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier 2005.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Biologia molecular e celular*. Porto Alegre: Artmed, 1997.

ANDERSON, D. Mechanisms of mutagenicity and tumor formation. In: ARINÇ, E. *et al* (Ed.). *Molecular aspects of oxidative drug metabolizing enzymes: their significance in environmental toxicology, chemical carcionogenesis and health*. Berlin: Springer-Verlag p. 261-302. 1995.

ANGELIS, R. C. D. Novos conceitos em nutrição: reflexões a respeito do elo dieta e saúde. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 38, p. 269-271, 2001.

BABCOCK, T. A.; NOVAK, T.; ONG, E.; JHO, D. H.; HELTON, W. S.; ESPAT, N. J. Modulation of Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophage Tumor Necrosis Factor-[alpha] Production by [omega]-3 Fatty Acid Is Associated with Differential Cyclooxygenase-2 Protein Expression and Is Independent of Interleukin-10. *Journal of Surgical Research*, v. 107, n. 1, p. 135-139, 2002.

BANERJEE, D.; KUMAR, P. A.; KUMAR, B.; MADHUSOODANAN, U. K.; NAYAK, S.; JACOB, J. Determination of absolut hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. *Current Science*, v. 83, n. 10, 2002.

BECKER, C.; FANTINI, M. C.; NEURATH, M. F. TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 17, n. 1-2, p. 97-106, 2006.

BERQUIN, I. M.; EDWARDS, I. J.; CHEN, Y. Q. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Letters*, v. 269, n. 2, p. 363-377, 2008.

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

BIRD, R. P.; GOOD, C. K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicology Letters*, n. 112-113, p. 395-402, 2000.

BOATENG, J.; VERGHESE, M.; CHAWAN, C. B.; SHACKELFORD, L.; WALKER, L. T.; KHATIWADA, J.; WILLIAMS, D. S. Red palm oil suppresses the formation of azoxymethane (AOM) induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, n. 10, p. 1667-1673, 2006.

BOMMAREDDY, A.; ZHANG, X.; SCHRADER, D.; KAUSHIK, R.; ZEMAN, D.; MATTHEES, D.; DWIVEDI, C. Effects of dietary flaxseed on intestinal

tumorigenesis in Apc(Min) mouse. *Nutrition and Cancer*, v. 61, n. 2, p. 276-83, 2009.

CACEV, T.; RADOSEVIC, S.; KRIZANAC, S.; KAPITANOVIC, S. Influence of interleukin-8 and interleukin-10 on sporadic colon cancer development and progression. *Carcinogenesis*, v. 29, n. 8, p. 1572-1580, 2008.

CALDER, P. C. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 61, n. 03, p. 345-358, 2002.

CALDER, P. C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, p. 433-446, 2003.

CALDER, P. C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 83, n. 6, p. S1505-1519, 2006.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*, v. 91, n. 6, p. 791-795, 2009.

CAMUESCO, D.; GALVEZ, J.; NIETO, A.; COMALADA, M.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E.; CONCHA, A.; XAUS, J.; ZARZUELO, A. Dietary Olive Oil Supplemented with Fish Oil, Rich in EPA and DHA (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids, Attenuates Colonic Inflammation in Rats with DSS-Induced Colitis. *Journal of Nutrition*, v. 135, n. 4, p. 687-694, 2005.

CAUGHEY, G.; MANTZIORIS, E.; GIBSON, R.; CLELAND, L.; JAMES, M. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 63, n. 1, p. 116-122, 1996.

CHAPKIN, R. S.; SEO, J.; MCMURRAY, D. N.; LUPTON, J. R. Mechanisms by which docosahexaenoic acid and related fatty acids reduce colon cancer risk and inflammatory disorders of the intestine. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 153, n. 1, p. 14-23, 2008.

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 Letters*, v. 193, n. 1, p. 17-24, 2003.

CUNNANE, S. C.; HAMADEH, M. J. L.; IEDE, A. C.; THOMPSON, L. U.; WOLEVER, T. M. S.; JENKINS, D. J. A. Nutritional attributes of traditional flaxseed in healthy young adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 61, p. 62-68, 1994.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCÓPIO, J. Ácidos graxos e câncer.*In:Entendendo a gordura: os ácidos graxos*. São Paulo: Manole, Cap.37. p. 525-36. 2002.

DELAPIERRE, F.; LAUMONIER, R.; TAYOT, J.; HALKIN, E. Preneoplastic changes in epithelium and mesenchyme in colon of rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Detection and Prevention*, v. 4, p. 429-37, 1981.

DUNLOP, R. J.; CAMPBELL, C. W. Cytokines and Advanced Cancer. *Journal of Pain and Symptom Management*, v. 20, n. 3, p. 214-232, 2000.

DWIVEDI, C.; NATARAJAN, K.; DP., M. Chemopreventive effects of dietary flaxseed oil on colon tumor development. *Nutrition and Cancer*, v. 51, n. 1, p. 52-8, 2005.

EVANS, C.; DALGLEISH, A. G.; KUMAR, D. Review article: immune suppression and colorectal cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 24, n. 8, p. 1163-1177, 2006.

FITZPATRICK, F. A.; SOBERMAN, R. Regulated formation of eicosanoids. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 107, n. 11, p. 1347–1351, 2001.

GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A. S. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. *Revista de Nutrição*, v. 19, p. 611-621, 2006.

GOODACRE, R.; KELL, D. B.; BIANCHI, G. Rapid Assessment of the Adulteration of Virgin Olive Oils by Other Seed Oils Using Pyrolysis Mass Spectrometry and Artificial Neural networks. *Journal of Science of Food Agricultural*, v. 63, p. 297-307, 1993.

GORDON, P. H.; NIVATVONGS, S. N. *Neoplasms of the Colon, Rectum, and Anus*. 2. ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2007.

HE, K. Fish, Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Prevention of Cardiovascular Disease--Eat Fish or Take Fish Oil Supplement? *Progress in Cardiovascular Diseases*, v. 52, n. 2, p. 95-114, 2009.

HIRAYAMA, K.; SPERIDIÃO, P.; NETO, U. Ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa. *The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases*, v. 10, n. 3, 2006.

HIROSE, M.; MASUDA, A.; ITO, N.; KAMANO, K.; OKUYAMA, H. Effects of dietary perilla oil, soybean oil and safflower oil on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced mammary gland and colon carcinogenesis in female SD rats. *Carcinogenesis*, v. 11, n. 5, p. 731-735, 1990.

HSIEH, C.-S.; HUANG, C.-C.; WU, J.-J.; CHAUNG, H.-C.; WU, C.-L.; CHANG, N.-K.; CHANG, Y.-M.; CHOU, M.-H.; CHUANG, J.-H. Ascending cholangitis provokes IL-8 and MCP-1 expression and promotes inflammatory cell infiltration in the cholestatic rat liver. *Journal of Pediatric Surgery*, v. 36, n. 11, p. 1623-1628, 2001.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes (DRIs) for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington (DC): National Academy Press, 2000.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary Reference Intakes (DRIs) for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington (DC): National Academy Press, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2010.

KELLEY, D.; TAYLOR, P.; NELSON, G.; SCHMIDT, P.; FERRETTI, A.; ERICKSON, K.; YU, R.; CHANDRA, R.; MACKEY, B. Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men. *Lipids*, v. 34, n. 4, p. 317-324, 1999.

KELLEY, D. S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition*, v. 17, n. 7-8, p. 669-673, 2001.

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.; FOR THE JACC STUDY GROUP. Serum Levels of Polyunsaturated Fatty Acids and Risk of Colorectal Cancer: A Prospective Study. *American Journal of Epidemiology*, v. 161, n. 5, p. 462-471, 2005.

LARANGEIRA, L. L. S.; TAHA, M. O.; 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 Cirurgica Brasileira*, v. 13, 1998.

LARSSON, S. C.; KUMLIN, M.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; WOLK, A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 79, n. 6, p. 935-945, 2004.

LAVIE, C. J.; MILANI, R. V.; MEHRA, M. R.; VENTURA, H. O. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Diseases. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 54, n. 7, p. 585-594, 2009.

LEE, S.-J.; LIM, K.-T. Chemopreventive effect of plant originated glycoprotein on colitis-mediated colorectal cancer in A/J mice. *Journal of Biomedical Science*, v. 15, n. 1, p. 111-121, 2008.

LLOR, X.; PONS, E.; ROCA, A.; ÀLVAREZ, M.; MAÑÉ, J.; FERNÁNDEZ-BAÑARES, F.; GASSULL, M. A. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clinical Nutrition*, v. 22, n. 1, p. 71-79, 2003.

MAHAN, L.; ESCOTT-STUMP, S. Lipídios*Krause: alimentos, nutrição & dietoterapia*. São Paulo: Rocca. p. 51-53. 2003.

MANTOVANI, A.; PIEROTTI, M. A. Cancer and inflammation: A complex relationship. *Cancer Letters*, v. 267, n. 2, p. 180-181, 2008.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V. D.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E. D.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, v. 19, p. 761-770, 2006.

MARTINS, J. M.; GRUEZO, N. D. Ácido graxo w-6 na etiologia do câncer e reto. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 55, n. 1, p. 69-74, 2009.

MILOVIC, V.; TURCHANOWA, L. Polyamines and colon cancer. *Biochemical Society Transactions*, v. 31, n. 2, p. 381-383, 2003.

MOREIRA, A. P. B.; SABARENSE, C. M.; DIAS, C. M. G. C.; LUNZ, W.; NATALI, A. J.; GLÓRIA, M. B. A.; PELUZIO, M. C. G. Fish oil ingestion reduces the number of aberrant crypt foci and adenoma in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 42, p. 1167-1172, 2009.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Revista de Nutrição*, v. 17, p. 411-424, 2004.

NIU, K.; HOZAWA, A.; KURIYAMA, S.; OHMORI-MATSUDA, K.; SHIMAZU, T.; NAKAYA, N.; FUJITA, K.; TSUJI, I.; NAGATOMI, R. Dietary long-chain n-3 fatty acids of marine origin and serum C-reactive protein concentrations are associated in a population with a diet rich in marine products. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 84, n. 1, p. 223-229, 2006.

O'KEEFE, S. J. D.; CHUNG, D.; MAHMOUD, N.; SEPULVEDA, A. R.; MANAFE, M.; ARCH, J.; ADADA, H.; VAN DER MERWE, T. Why Do African Americans Get More Colon Cancer than Native Africans? *Journal of Nutrition* v. 137, n. 1, p. 175S-182, 2007.

OH, R. Practical Applications of Fish Oil (Omega-3 Fatty Acids) in Primary Care. *Journal of the American Board of Family Pract*, v. 18, n. 1, p. 28-36, 2005.

OLIVEIRA, F. L. C. Imunomodulação. *Sociedade Brasileira de Pediatria*. v. 32004. p. 24-27.

PARHAM, P. O câncer e suas interações com o sistema imune*O Sistema Imune*. Porto Alegre: Artmed. p. 358-372. 2001.

RAO, C. V.; HIROSE, Y.; INDRANIE, C.; REDDY, B. S. Modulation of Experimental Colon Tumorigenesis by Types and Amounts of Dietary Fatty Acids. *Cancer Research*, v. 61, n. 5, p. 1927-1933, 2001.

RAVASCO, P.; ARANHA, M. M.; BORRALHO, P. M.; MOREIRA DA SILVA, I. B.; CORREIA, L.; FERNANDES, A.; RODRIGUES, C. M. P.; CAMILO, M.

Colorectal cancer: Can nutrients modulate NF-[kappa]B and apoptosis? *Clinical Nutrition*, 2009.

RODRIGUES, M. A. M.; SILVA, L. A. G.; SALVADORI, D. M. F.; DE CAMARGO, J. L. V.; MONTENEGRO, M. R. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 351-355, 2002.

ROSENBERG, D. W.; GIARDINA, C.; TANAKA, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 30, n. 2, p. 183-196, 2009.

RUBIE, C.; FRICK, V. O.; PFEIL, S.; WAGNER, M.; KOLLMAR, O.; KOPP, B.; GRABER, S.; RAU, B. M.; SCHILLING, M. K. Correlation of IL-8 with induction, progression and metastatic potential of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, v. 13, n. 37, p. 4996-5002, 2007.

RUSSO, G. L. Dietary n - 6 and n - 3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical Pharmacology*, v. 77, n. 6, p. 937-946, 2009.

SAAD-HOSSNE, R.; PRADO, R. G.; BAKONYI, N. A.; LOPES, P. S.; NASCIMENTO, S. M.; SANTOS, C. R. V.; PRACUCHO, E. M.; CHAVES, F. R. P.; IORIATTIES, S. J. M. Estudo retrospectivo de pacientes portadores de câncer colorretal atendidos na Faculdade de Medicina de Botucatu no período de 2000-2003. *Revista Brasileira de Coloproctologia*, v. 25, n. 1, p. 31-37, 2005.

SANSONETTI, P. J. War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews Immunology*, v. 4, n. 12, p. 953-964, 2004.

SCHAEFER, E. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 75, n. 2, p. 191-212, 2002.

SCHWARTZ, B.; BIRK, Y.; RAZ, A.; MADAR, Z. Nutritional-pharmacological combinations. A novel approach to reducing colon cancer incidence. *European Journal of Nutrition*, v. 43, p. 221-229, 2004.

SPAHN, T. W.; KUCHARZIK, T. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut*, v. 53, n. 3, p. 456-465, 2004.

STONEHAM, M.; GOLDACRE, M.; SEAGROATT, V.; GILL, L. Azeite, dieta e cancro colo-rectal: um estudo ecolìgico e uma hipìtese. *Journal of Epidemiology & Community Health*, v. 54, n. 10, p. 756-760, 2000.

TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos n. 2: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA; Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2006. p. 114.

TAYAL, V.; KALRA, B. S. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics - An update. *European Journal of Pharmacology*, v. 579, n. 1-3, p. 1-12, 2008.

THEODORATOU, E.; MCNEILL, G.; CETNARSKYJ, R.; FARRINGTON, S. M.; TENESA, A.; BARNETSON, R.; PORTEOUS, M.; DUNLOP, M.; CAMPBELL, H. Dietary Fatty Acids and Colorectal Cancer: A Case-Control Study. *American Journal of Epidemiology*, v. 166, n. 2, p. 181-195, 2007.

TUCK, K. L.; HAYBALL, P. J. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, n. 11, p. 636-644, 2002.

VIJAIMOHAN, K.; JAINU, M.; SABITHA, K.; SUBRAMANIYAM, S.; ANANDHAN, C.; SHYAMALA, D. C. Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. *Life Science*, v. 79, n. 5, p. 448-54, 2006.

VON SCHACKY, C.; HARRIS, W. Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Cardiovasc Res*, v. 73, p. 310–315, 2007.

WAITZBERG, D. L.; BORGES, V. Gorduras. *In: Nutrição oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica*. São Paulo: Atheneu. p. 59-64. 2002.

WALLACE, H. M.; CASLAKE, R. Polyamines and colon cancer. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, v. 13, p. 1033-39, 2001.

WANG, D.; DUBOIS, R. N.; RICHMOND, A. The role of chemokines in intestinal inflammation and cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 9, n. 6, p. 688-696, 2009.

WILLIAMS, D.; VERGHESE, M.; WALKER, L. T.; BOATENG, J.; SHACKELFORD, L.; CHAWAN, C. B. Flax seed oil and flax seed meal reduce the formation of aberrant crypt foci (ACF) in azoxymethane-induced colon cancer in Fisher 344 male rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, n. 1, p. 153-159, 2007.

WORTMAN, P.; MIYAZAKI, Y.; KALUPAHANA, N.; KIM, S.; HANSEN-PETRIK, M.; SAXTON, A.; CLAYCOMBE, K.; VOY, B.; WHELAN, J.; MOUSTAID-MOUSSA, N. n3 and n6 polyunsaturated fatty acids differentially modulate prostaglandin E secretion but not markers of lipogenesis in adipocytes. *Nutrition & Metabolism*, v. 6, n. 1, p. 5, 2009.

YANG, C.; CHEN, D.; HUANG, K.; ZHANG, H.; XU, D.; TIAN, Y.; ZHANG, J. The expression of chemokine MCP-1 in colorectal carcinoma and its relationship to the infiltration of macrophage. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, v. 5, n. 5, p. 343-346, 2006.

YU-POTH, S.; ETHERTON, T. D.; REDDY, C. C.; PEARSON, T. A.; REED, R.; ZHAO, G.; JONNALAGADDA, S.; WAN, Y.; KRIS-ETHERTON, P. M. Lowering Dietary Saturated Fat and Total Fat Reduces the Oxidative Susceptibility of LDL in Healthy Men and Women. *Journal of Nutrition*, v. 130, n. 9, p. 2228-2237, 2000.

ZHAO, G.; ETHERTON, T. D.; MARTIN, K. R.; GILLIES, P.; WEST, S. G.; KRIS-ETHERTON, P. M. Dietary a-linolenic acid inhibits proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 85, p. 385-91, 2007.

ZHOU, S. B.; WANG, G. J.; ZHU, Y.; CHEN, B. Q. Effect of dietary fatty acids on colon tumorigenesis induced by methyl nitrosourea in rats. *Biomed Environ Sci*, v. 13, n. 2, p. 105-16, 2000.

ZIBOH, V.; MILLER, C.; CHO, Y. K. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: Generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 7, n. 361-6, 2000.

ZITVOGEL, L.; APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F.; KROEMER, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*, v. 8, n. 1, p. 59-73, 2008.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da adição na dieta de diferentes óleos (peixe, linhaça e oliva) na prevenção das lesões pré-neoplásicas.

3.2. Objetivos Específicos

- Identificar os efeitos de diferentes fontes lipídicas sobre o perfil lipídico, hepático, fecal e do tecido adiposo;
- Avaliar os efeitos da adição de diferentes fontes lipídicas na dieta na evolução de lesões pré-neoplásicas;
- Quantificar aminas bioativas presentes no tecido hepático;
- Avaliar a expressão de citocinas inflamatórias envolvidas na carcinogênese colorretal;
- Avaliar os efeitos morfológicos do consumo de diferentes óleos no intestino de animais com e sem indução de lesões pré-neoplásicas;

4. METODOLOGIA GERAL

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Nutrição Experimental, Bioquímica da Nutrição e Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4.1. Animais e dietas

4.1.1. Desenho Experimental

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com setenta e dois dias, provenientes do Biotério do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, com peso médio de 330 ± 13,6g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ciclos claro/escuro de 12 horas e temperatura média de 23ºC. A composição das dietas experimentais foram baseadas no *American Institute of Nutrition* (Reeves *et al.*, 1993), seguindo o protocolo AIN-93M, recomendado para manutenção de animais adultos. Modificou-se para cada grupo apenas a fonte lipídica, por um período de 9 semanas. As dietas foram confeccionadas na forma de "*pellets"*, armazenadas de 0 - 4ºC, protegidas da luz até o momento da sua utilização. Os animais ficaram em gaiolas individuais e receberam comida e água *ad libitum*. O consumo das dietas e o peso dos animais foram monitorados semanalmente, ao longo de todo experimento. O desenho experimental está representado na Figura 3.

Os óleos utilizados foram adquiridos no mercado local. O óleo de soja (Soya, BUNGE®), Azeite de oliva (Andorinha®, extra virgem), O óleo de peixe (Galena®) e óleo de linhaça (Cisbra Alimentos®).

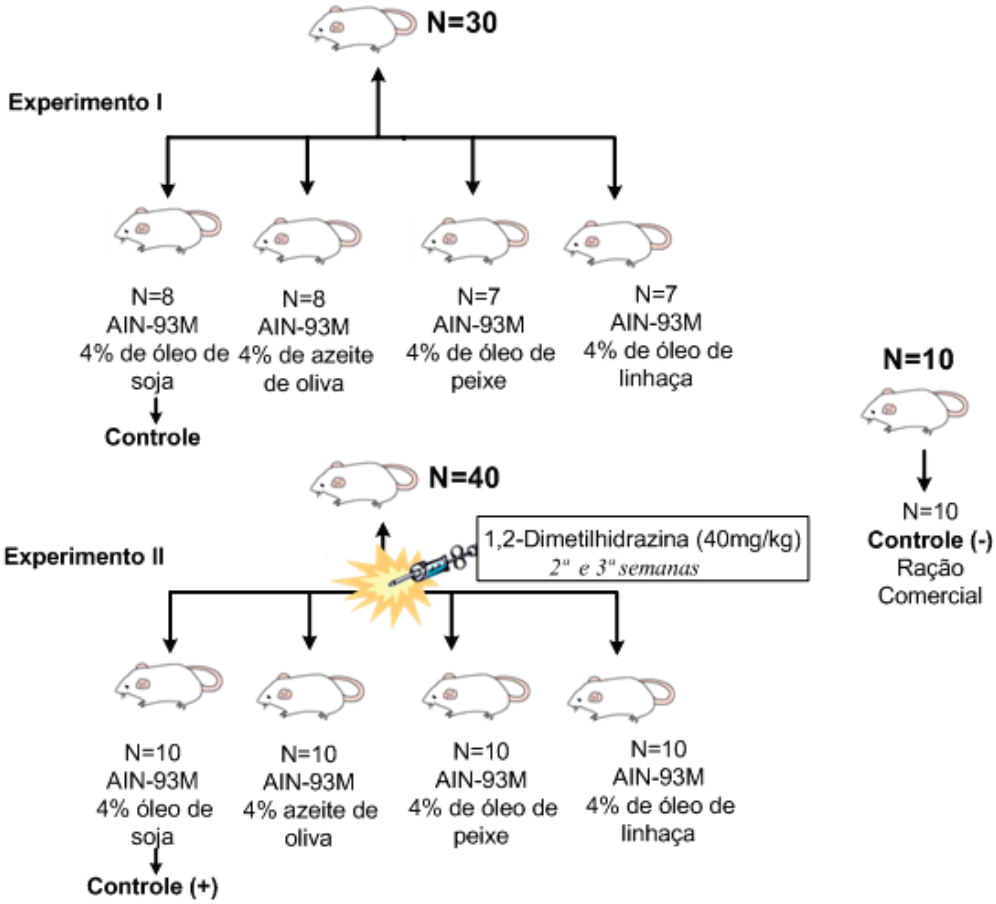


Figura 3 - Desenho experimental de ratos Wistar tratados com diferentes fontes lipídicas com e sem indução de lesões pré-neoplásicas.

4.1.2. **Experimento I**

Foram utilizados 30 animais divididos em quatro grupos, de acordo com o tipo de óleo. O grupo controle, alimentado com óleo de soja (n=8) e os grupos experimentais, tratados com óleo de oliva (n=8), óleo de peixe (n=7) e óleo de linhaça (n=7).

4.1.3. **Experimento II**

Foram utilizados 50 animais divididos em cinco grupos de experimentais. Um grupo (n=10), o controle negativo, recebeu dieta comercial (*Socil*®) e foi mantido nas mesmas condições experimentais que os demais grupos. Este foi considerado o controle (-) para as análises histológicas. Os demais grupos, receberam o carcinógeno Dimetilhidrazina (DMH), na proporção 40mg/Kg peso na segunda e terceira semanas após o início do experimento. Estes grupos receberam dieta semipurificada, seguindo o protocolo AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993). O grupo controle (+) foi alimentado com óleo de soja (n=10) e os grupos

experimentais, tratados com óleo de oliva (n=10), óleo de peixe (n=10) e óleo de linhaça (n=10), por um período de 9 semanas.

4.1.4. **Composição das dietas experimentais**

A Composição das dietas experimentais está demonstrada na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição das dietas experimentais:

INGREDIENTES**	Tratamentos			
	Óleo de Soja	Óleo de Oliva	Óleo de Peixe	Óleo de Linhaça
Caseína (>85%proteína)	140	140	140	140
Sacarose	100	100	100	100
Amido de Milho(qsp*)	465,6	465,6	465,6	465,6
Amido Destrinizado	155	155	155	155
Fibra	50	50	50	50
Mistura Mineral	35	35	35	35
Mistura Vitamínica	10	10	10	10
L-cistina	1,8	1,8	1,8	1,8
Bitartarato de Colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Óleo de Soja	4	0	0	0
Óleo de Oliva	0	4	0	0
Óleo de Peixe	0	0	4	0
Óleo de Linhaça	0	0	0	4

As dietas foram baseadas na AIN-93M (Reeves et al., 1993). ***qsp= quantidade suficiente para **** Dietas (g/ Kg)

Após o período experimental, os animais foram submetidos ao jejum de 12h, anestesiados por inalação de éter etílico e eutanasiados. Foram removidos o fígado, tecido adiposo e intestino, lavados em solução salina fisiológica, pesados e congelados a -80^0 C para análises posteriores.

Em cada grupo, o intestino de 5 animais foram separados de forma aleatória, e colocados em recipientes contendo formalina de Carson (Carson *et al.*, 1973) para posteriores análises histológicas. As amostras de sangue foram obtidas da aorta abdominal de cada animal e centrifugadas, separado o soro e congelado a -80^0 C para as posteriores análises.

O cólon dos animais induzidos ao câncer foram removidos, fragmentados em porção inicial, medial e distal. Aleatoriamente, o tecido de 5 animais foram separados e congelados a -80^0 C para as análises do

marcadores inflamatórios. Os demais, tiveram o cólon fixado em formalina de Carson (Carson *et al.*, 1973) e mantidos em temperatura ambiente para as análises de FCA.

4.2. Indução de pré-lesões neoplásicas

O grupo alimentado com dieta comercial foi considerado o controle negativo, logo, não foi induzido ao câncer. Na segunda semana de experimento, os animais dos demais grupos receberam 4 injeções subcutâneas em 40mg/kg peso corporal de DMH (Sigma, USA) sendo realizadas 2 aplicações em dias não consecutivos por um período de 2 semanas. A DMH era preparada imediatamente antes do uso, dissolvida em 0,9% NaCl e 1,5% de EDTA como veículo, na concentração final de 10mg/mL, sendo o pH final ajustado para 6,5. (Larangeira *et al.*, 1998).

4.3. Análise da Composição Corporal

Após a eutanásia descartaram-se as vísceras, restando apenas ossos, músculos e pele (carcaça vazia) para a análise quantitativa de água, gordura e proteína (Pitts *et al.*, 1983). Para a determinação do conteúdo de água, as carcaças vazias foram colocadas individualmente em pratos de alumínio e introduzidas em estufa à temperatura de 105^{o}C por 24 horas. A umidade foi determinada pela diferença do peso pré e pós-secagem. Após a secagem, as carcaças vazias foram maceradas e inseridas em cartuchos de papel filtro para a extração dos lipídios pelo método de Soxhlet, utilizando-se solvente éter de petróleo, conforme IUPAC (1979). Na amostra seca e desengordurada, determinou-se em triplicada o percentual de proteína, pelo método indireto de determinação do nitrogênio, método de Kjeldahl (1984), utilizando-se o fator 6,25 para conversão em proteína.

4.4. Contagem dos focos de criptas aberrantes

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 formalina

de Carson (Carson *et al.*, 1973) por 24 horas. Após a fixação, o intestino foi medido e dividido em três segmentos iguais identificados como segmentos 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 levados em tampão fosfato. A contagem das lesões foi realizada por microscopia óptica com aumento de 10X, de acordo com a técnica de Bird (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.

4.5. Análise Histológica

No Experimento I, os fragmentos do íleo foram removidos e fixados em formalina de Carson (Carson *et al.*, 1973). Após desidratação em gradiente crescente de etanol, o material foi diafanizado em xilol e incluído em parafina. Secções histológicas com 7 μm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Olympus America Inc., CUT 4055) e coradas com hematoxilina e eosina (HE). No Experimento II, os fragmentos do íleo foram removidos e fixados, por 24 horas, em formalina de Carson em temperatura ambiente. Após fixação foram desidratados em gradiente crescente de etanol e incluídos em resina à base de hidroxietilmetacrilato (Historesin®, Leica). Secções transversais e longitudinais de 2μm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (RM2155, Leica) com navalhas de vidro e coradas com Azul de Toluidina/Borato de Sódio 1% (Bancroft e Gamble, 2007).

4.5.1. **Análise quantitativa dos linfócitos**

Secções histológicas selecionadas aleatoriamente de 3 animais de cada grupo foram utilizadas nas análises. Obteve-se 5 lâminas de cada animal, cada qual com 8 cortes consecutivos com intervalos mínimos de 40 μm entre eles. De cada lâmina foram obtidas 20 imagens (2048 x 1536 pixels) de três cortes não consecutivos (objetiva: 20x), totalizando 900 campos por grupo experimental. As imagens foram obtidas com câmara digital Q-Color 3 (Olympus) acoplada a um microscópio BX-60 (Olympus).

A contagem do número de linfócitos presentes nos campos histológicos foi realizada utilizando-se o aplicativo Image Pro-Plus® versão 4.5 (Media Cybernetics). Padronizou-se a sobreposição de uma matriz quadrada padrão (21 linhas x 21 colunas) nos campos fotografados, e foram contabilizados apenas os linfócitos coincidentes com as interseções (Figura 4).

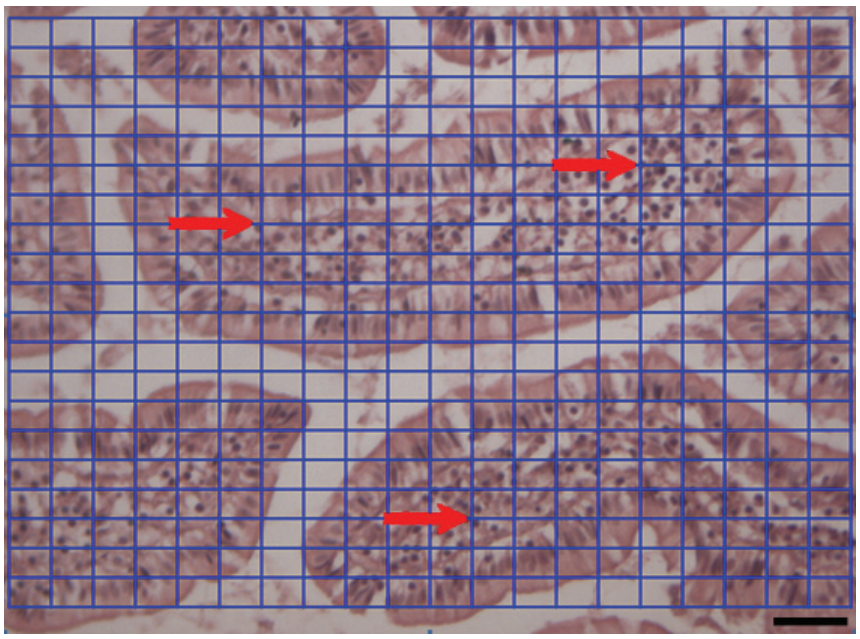


Figura 4 - Fotomicrografia de secção histológica da mucosa ileal de rato Wistar, com sobreposição de uma matriz quadrada padrão.
Apenas os linfócitos coincidentes com as interseções foram contabilizados, como indicado na figura Coloração HE, aumento 200x. Barra = 30 µm

4.5.2. **Morfometria das vilosidades e criptas intestinais**

As imagens das secções histológicas foram capturadas com objetiva de 10X. As seguintes medidas foram tomadas com auxílio do aplicativo Image Pro-Plus® versão 4.5 (Media Cybernetics), Figura 5 (Carlos, 2006).

- *Altura das vilosidades* - foram selecionados 10 campos aleatórios por animal. Foram medidas no mínimo 70 vilosidades por grupo experimental. Apenas as vilosidades com epitélio definido e conjuntivo visível foram utilizadas;
- *Largura das vilosidades*: nas mesmas vilosidades utilizadas na análise de altura tomou-se 3 medidas (região apical, média e basal) e considerou-se em uma mesma vilosidade o valor médio destas três medidas;

- *Profundidade das criptas* – foram tomadas as medidas de 10 campos por animal, onde era possível ver a base e o ápice (abertura) da cripta. Foram medidas no mínimo 70 criptas por grupo experimental.

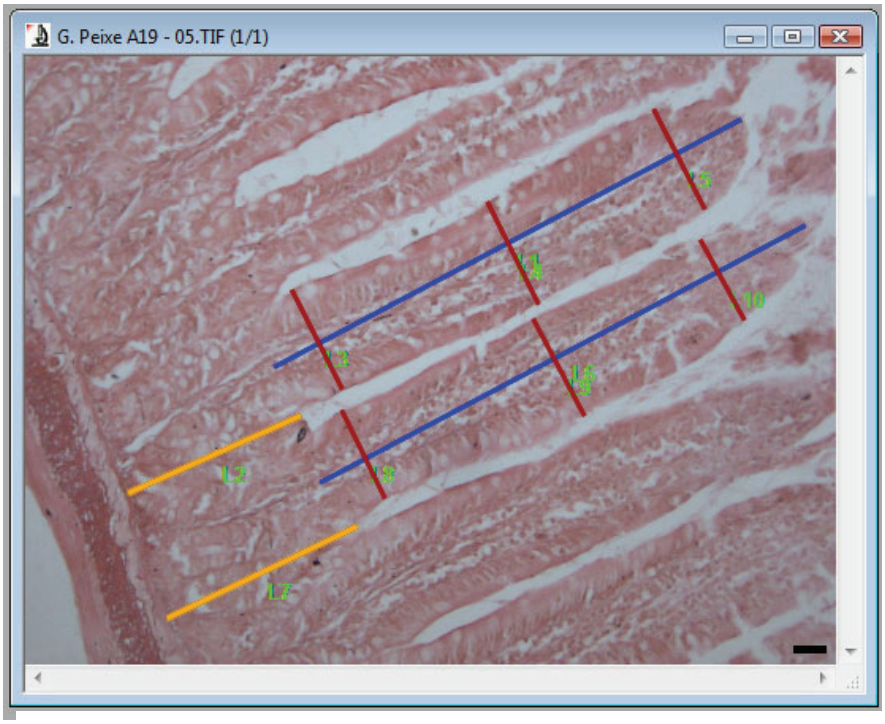


Figura 5 - Fotomicrografia das vilosidades intestinais de ratos Wistar, coloração HE. As linhas indicam as medidas da altura da vilosidade, profundidade da cripta e largura da vilosidade, como aplicativo Image Pro-Plus®. Aumento 100x. Barra = 30 µm

4.6. Extração de lipídios totais

Para a extração de lipídios totais nos tecidos analisados, utilizou-se a técnica proposta por Folch *et al*.(1957), modificada. Para extração dos lipídios totais no soro, fígado, gordura intra-abdominal, fezes e dieta, foram utilizados 300mL de soro e 100, 50, 250 e 100mg das amostras respectivamente. A amostra foi inserida em um tubo de ensaio e adicionado 1,9 de clorofórmio:metanol (2:1) e macerado com bastão de vidro. O tubo posteriormente foi homogenizado em vórtex e adicionado 0,4 mL de metanol puro e centrifugado por 10 minutos a 10.000rpm em centrífuga Quimis®. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e transferido para um tubo seco e previamente pesado. A este conteúdo, foi adicionado 0,8mL de clorofórmio, 0,64 mL de solução NaCl 0,73%, homogenizado e novamente centrifugado a

10.000rpm por 10 minutos. A fase superior foi desprezada e a parede do tubo foi lavada três vezes com 0,3mL de solução de Folch (3% clorofórmio, 48% metanol, 47% de água destilada e 2% NaCl) e novamente foi descartado o sobrenadante. O tubo de ensaio foi seco em estufa à 40^0C e após a secagem, os tubos foram novamente pesados. Por gravimetria, foi determinada a massa de lipídios das amostras analisadas.

4.6.1. **Saponificação e Esterificação**

Para a saponificação dos lipídeos nos tecidos, foi utilizada a técnica descrita por Hartman e Lago (1973). A partir de 50mg de amostra extraída e retida no tubo de ensaio, foi adicionado ao tubo 4mL do reagente de saponificação (NaOH metanólico a 50%). O tubo de ensaio foi agitado em vórtex e deixado em banho-maria a 80ºC por 15 minutos. Imediatamente após a saponificação, realizou-se a esterificação, segundo Hartman e Lago (1973). No mesmo tubo, adicionou-se 10mL do reagente de esterificação. O tubo foi agitado em vórtex e deixado em banho-maria a 80ºC durante15 minutos. Em seguida, resfriado a temperatura ambiente à 40ºC. Após resfriamento, ao tubo foi adicionado 5mL de cloreto de sódio a 20% e 0,5mL de hexano (grau HPLC) e agitado em vórtex. O sobrenadante foi transferido para um frasco âmbar devidamente identificado. Ao restante, foi adicionado mais 0,5mL de hexano HPLC e retirado o sobrenadante e reservado em frasco âmbar. O conteúdo do frasco âmbar foi seco em nitrogênio, para eliminação do solvente e posteriormente mantido refrigerado a –20ºC até análise cromatográfica.

4.6.2. **Cromatografia Gasosa**

A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa, utilizando o modelo CG-17A Shimadzu/Class, equipado com a coluna capilar de sílica fundida de biscianopropil polysiloxane (SP-256), medindo 100 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro com detector de ionização em chama. A programação de análise teve como temperatura inicial de 150°C, isotérmica por 10 minutos e posterior aquecimento de 4°C por minuto até 250°C, permanecendo nesta temperatura por 40 minutos. A temperatura do vaporizador foi de 240°C e o detector em 260°C. O gás de

arraste utilizado foi o nitrogênio em 24 cm/seg., a 175°C. A razão da divisão da amostra no injetor foi de 1/10 e injetou-se 1 µL da solução.

Os picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção de uma mistura de metil ésteres conhecidos (FAME mix Supelco®, EUA) e quantificados por áreas de integração automática, e os resultados expressos em percentual.

4.7. Análises Bioquímicas

Para se obter o soro, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000rpm por 10 minutos em centrífuga modelo Quimis® e congelado a -20°C para as análises de Colesterol Total, HDL e Triacilgliceróis, realizadas com "kits" enzimáticos (Bioclin®, Brasil).

4.8. 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 induzidos ao câncer colorretal, tratados com dietas a base de soja (controle +), oliva, peixe e linhaça. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos, do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A extração das aminas foi realizada de acordo com Vale & Glória (1997). As aminas bioativas foram extraídas do tecido hepático com ácido tricloroacético 5%. O tecido foi macerado, agitado em vórtex e centrifugado a 4^0C a 10.000g por 20 minutos. O sobrenadante foi removido, filtrado em papel filtro quantitativo. Este procedimento foi repetido 3 vezes, até se obter a relação 1g tecido/4mL ácido tricloroacético 5%. O filtrado foi congelado a -20^{o}C para a futura análise cromatográfica.

A aminas 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. O cromatógrafo utilizado consistiu em equipamentos Shimadzu. Foi utilizada coluna µBondapak C_{18} de fase reversa (3,9x300nm, 10 µm) e pré coluna

µBondapak. Foram empregadas duas fases móveis no processo: A, composta por solução tampão contendo acetato de sódio 0,2 M e octanossulfanato de sódio 15 mM, com pH austado 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 encontratos nas amostras com os da solução padrão, contendo as dez aminas. A quantificação foi feita por interporlação 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.

4.9. Análise dos mediadores do processo inflamatórios

A quantificação dos marcadores inflamatórios foi realizada por meio da técnica quantitativa “Real-Time Polymerase Chain Reation” (RT-PCR).

4.9.1. **Extração do RNA**

O RNA mensageiro (mRNA) total das amostras do cólon distal foram extraídos a partir de150mg de amostra. Após a pesagem das amostras, 500 µL de água ultrapura foram adicionados ao tecido e macerado. Posteriormente, foi adicionado 20,0 µL de detergente dodecil sulfato de sódio (SDS 12,5%) e 2,1 µL de Proteinase K (Sigma Aldrich®) e novamente o conteúdo foi macerado.

O material foi levado ao banho Maria a 56^{o}C por 1 hora e a 70^{o}C por 10minutos, para desnaturar a enzima e em seguida, foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogem Life Tecnologies) de acordo com as orientações fornecidas pelo fabricante. O Trizol (1 mL por 150 mg de tecido) foi adicionado à amostra, agitado por 30 segundos em vórtex e incubado à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foram adicionados 150 µL de clorofórmio, agitando manualmente por 15 segundos e incubando à temperatura ambiente por 2 minutos. Após centrifugação (14000rpm por 15 minutos à 4°C), A fase aquosa foi transferida para um novo tubo tipo eppendorf de 2 mL, no qual foram adicionados 380 µL de isopropanol. A amostra foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, e então centrifugada a 12.000 x g por 10

minutos a 4°C. Após este processo, o sobrenadante foi cuidadosamente desprezado, e o precipitado foi lavado com 750 µL de etanol gelado (75%), mantendo esta solução estocada a -80°C *overnight*. Após este período, a amostra foi centrifugada (14.000 rpm por 10 minutos à 20°C), desprezando-se cuidadosamente o sobrenadante e secando precipitado no próprio tubo em estufa (37°C). Na última fase, a amostra foi suspendida em 40 µL de água ultrapura e incubada por 10 minutos a 35°C, a fim de facilitar a solubilização do RNA extraído.

Nesta etapa, foi realizado o teste de concentração, para quantificar o RNA extraído e avaliar sua pureza. Em um tubo tipo eppendorf, 2 µL de RNA extraído foram diluídos em 198 µL de água ultrapura (1:100), e lidos a uma absorvância de 260 e 280nm o ácido nucléico e proteína, respectivamente. A pureza é determinada pela razão entre as absorvâncias, sendo considerada faixa ideal 1,8 a 2,1. Os valores encontrados estão representados no Anexo I**.**

4.9.2. **Confecção do DNA complementar**

O DNA complementar (cDNA) foi confeccionado utilizando 17 µL de mRNA extraído a uma concentração de 200 µg/µL ao qual foi adicionado 1 µL do random primers (Promega®). Em seguida a solução foi aquecida a 70 ºC por 10 minutos em banho-maria, colocada em banho de gelo por 2 minutos e centrifugada a 1300 rpm por 1 minuto. Foram acrescentados 5,3 µL do 5X reaction buffer (Fermentas®), 2 µL do dNTP(Fermentas®) e 1 µL de água ultrapura. As amostras foram incubadas a 37ºC por 5 minutos. Adicionou-se então, 1 µL da enzima M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas®). As amostras foram incubadas a 42ºC por 60 minutos, posteriormente a 70ºC por 10 minutos e armazenadas em freezer a -20ºC até a quantificação dos marcadores.

4.9.3. **Análise quantitativa dos genes alvo**

A quantificação dos genes alvo foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR) no equipamento ABI Prism 5700 *Sequence Detection System*, utilizando o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green. O ciclo da PCR envolveu uma desnaturação inicial de 95ºC (10 minutos) e então 40 ciclos, com 1 minuto de desnaturação (94ºC),

1 minuto de anelamento (56ºC) e 2 minutos de alongamento (72ºC), seguidos da curva padrão de dissociação.

As seqüências dos “primers” (Bionner®) utilizados (sense e antisense) e suas propriedades de reação estão descritas no Anexo II. As condições de PCR foram otimizadas considerando a concentração do “primers”, ausência de formação de dímeros, eficiência na amplificação dos genes alvo e controle dos genes constituintes.

Para cada reação foram utilizados 10 µL de β-actina (1000 nM), 10 µL “primers” (2000 nM), 2,5 µL de cDNA e 12,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Cálculos para determinação do nível relativo de expressão do gene foram feitos de acordo com instruções do usuário - User’s Bulletin from Applied Biosystems – com referência a β-actina da amostra, usando o método “cycle threshold” (Ct). O Ct é o ponto onde um aumento exponencial significativo na quantidade de amplificado (fluorescência) é primeiramente detectado (geralmente 10 vezes o valor inicial). As médias dos valores de Ct das mensurações em duplicata foram usadas para calcular a expressão do gene alvo, com a normalização do controle interno (β-actina). Os valores encontrados nos animais induzidos a pré-lesões neoplássicas foram comparados ao controle negativo, animais tratados com dieta comercial sem indução de câncer, utilizando a fórmula $2 - \Delta Ct$, também de acordo com o Manual do Usuário.

4.10. Análise estatística

As variáveis foram submetidas aos testes de normalidade e posteriormente a análise de variância. As comparações entre três ou mais grupos independentes foram realizadas por análise de variância (ANOVA) para dados com distribuição normal e pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis, para os dados sem distribuição não paramétrica. Quando houve diferença estatística, utilizaram-se os testes de comparação múltiplas de Tukey (ANOVA) ou de Dunn (Kruskal Wallis) para detectar as diferenças entre os grupos. O Teste t foi utilizado em situações que foram comparadas dois grupos independentes. Quando não atenderam às premissas de normalidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico (Mann-Whitney). Foi utilizado o programa SigmaPlot®, versão 11.0

(Systat© Software, Inc), para análise estatística e representação dos dados. O valor de p foi fixado em até 5% com o intuito de obter uma confiabilidade de 95% nas comparações. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Para dados analisados por testes não paramétricos foram apresentados também as medianas.

4.11. Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, processo 12/2008 (Anexo III), e foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (Cobea, 2009).

4.12. Referências

BANCROFT, J.; GAMBLE, M. *Theory and pratice of histological tecniques*. Churchill Livingstone: Elsevier, 2007.

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

CARLOS, J. *Estudo morfológico e morfométrico do instestino delgado de camundongos imunodeprimidos submetidos a dieta enteralcontendo prebiótico e contaminada por klebsiella pneumoniae*. (2006). 77 f. (Mestrado) - Departamento de Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

CARSON, F. L.; MARTIN, J. H.; LYNN, J. A. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 59, p. 365-373, 1973.

COBEA. Ethical Priniples for the use of laboratory animals. *Brazilian College on Animal Experimentation*, 2009.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 226, n. 1, p. 497 - 509, 1957.

HARTMANN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices*, v. 22, p. 475-477, 1973.

LARANGEIRA, L. L. S.; TAHA, M. O.; 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 Cirurgica Brasileira*, v. 13, 1998.

PITTS, G.; USHAKOV, A.; PACE, N.; SMITH, A.; RAHLMANN, D.; SMIRNOVA, T. Effects of weightlessness on body composition in the rat. *Am J Physiol* v. 244, n. 3, p. 332-7, 1983.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing commitee ond the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

VALE, S. R.; GLORIA, M. B. Determination of biogenic amines in cheese. *Journal of AOAC International*, v. 80, p. 1006-1012, 1997.

5. ARTIGO I

Flaxseed, olive and fish oil influence plasmatic lipids, lymphocyte migration and morphometry of the intestinal of Wistar rats[1]

Óleo de linhaça, oliva e peixe influenciam os lipídios plasmáticos, migração de linfócitos e morfometria intestinal de ratos Wistar

(Artigo aceito para publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira, n. 3, maio-junho 2010, Anexo IV)

ABSTRACT

Purpose: Evaluate the effect of flaxseed, olive and fish oil on the lipid profile, preservation of villosities and lymphocyte migration in the intestinal mucosa of Wistar rats**.**

Methods: Thirty Wistar male rats were divided into four groups, which received the AIN-93M diet, with changes only to their lipid source: flaxseed, olive, fish, and soy oil (control group). The serum was separated for the biochemical parameter analysis. A histological evaluation was performed in the ileal portion.

Results: The group which was fed fish oil presented lower values when compared to the other treatments for Total Cholesterol, High-density Lipoprotein Cholesterol and Triacylglycerol ($p<0.05$). The animals treated with fish and olive oils presented better intestinal villosities preservation. Less deposition of lymphocytes was observed in the flaxseed group ($p<0.001$).

Conclusions: This study demonstrated that flaxseed, olive and fish oils present different responses than soy oil for the intestinal mucosa preservation and lymphocyte proliferation in Wistar rats.

Key words: Vegetable Fats. Flaxseed Oil. Soybean Oil. Fish Oils. Morphology. Intestines. Lymphocytes. Rats.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito dos óleos de linhaça, oliva e peixe no perfil lipídico, preservação das vilosidades e migração de linfócitos na mucosa intestinal de ratos Wistar.

Métodos: Trinta ratos Wistar foram divididos em quarto grupos e receberam dieta AIN-93M, modificando para cada grupo apenas a fonte lipídica: óleo de linhaça, oliva, peixe e soja(grupo controle). O soro foi separado para análise dos parâmetros bioquímicos. A análise histológica foi realizada na porção ileal.

Resultados: O grupo que recebeu óleo de peixe apresentou menores valores de colesterol total, lipoproteína de alta densidade e triacilglicerol ($p<0.05$). Os animais tratados com óleo de peixe e oliva apresentaram melhor preservação das vilosidades intestinais. Menor deposição de linfócitos foi observado no grupo tratado com óleo de linhaça ($p<0.001$).

Conclusão: Este estudo demonstrou que os óleos de linhaça, oliva e peixe apresentam diferentes respostas em relação ao óleo de soja na preservação da mucosa intestinal e proliferação de linfócitos em ratos Wistar.

Descritores: Gorduras Vegetais. Óleo de Semente do Linho. Óleo de Soja. Óleos de Peixe. Morfologia. Intestino. Linfócitos. Ratos.

[1] Research performed at the Department of Nutrition and Health, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa, Brazil.

5.1. Introduction

The role diet components in the prevention or in the genesis of diseases, as well as their activity mechanisms, have been the object of studies for decades. Among the macronutrients, lipids exert great influence on the genesis of chronic diseases, such as obesity, atherosclerosis and other cardiovascular diseases (Alfaia *et al.*, 2009).

According to some studies, olive, flaxseed and fish oils, among others, present several beneficial effects to the organism because they are important sources of oleic acid (omega-9), α-linolenic acid (ALA - omega-3) and eicosapentaenoic acid/ docosahexaenoic acid (EPA/DHA) respectively (Vijaimohan *et al.*, 2006) .

The modulation of these fatty acids in the diets plays an important role in the prevention and treatment of coronary heart diseases (Breslow, J., 2006), hypertension (Ueshima *et al.*, 2007), auto-immune disorders and cancer, also presenting good results for inflammatory responses (Simopoulos, 2008). The linoleic acid (LA) is metabolized to arachidonic acid (AA), the precursor of pro-inflammatory eicisanoids, such as, primarily, prostaglandin E2 (PGE2), thromboxane A2 (TXA2) and leukotriene B4 (James *et al.*, 2000), while ALA is metabolized to EPA and DHA, which are precursors of anti-inflammatory eicosanoids, such as PGE3 and PGF3 (Abayasekara e Wathes, 1999).

Inflammation is the strategy organisms use to protect themselves from a lesion in the cell, which is involved in the reparation processes, restoration of the homeostasis in the damaged sites and production of chemical mediators (Calder, 2009). When cell damage occurs, the migration of lymphocytes to the damaged site generates an inflammatory process. Lymphocytes can be found in all parts of the organism, including the intestinal mucosa, where the absorption of lipids takes place (Calder, 2006). The activation of lymphocytes is usually inhibited by fatty acids, mainly those of the omega-3 series. These fatty acids, which are present in the diet, are incorporated in the membrane phospholipids in a higher proportion than the other classes. Previous studies demonstrate that the polyunsaturated fatty acids of the omega-3 series presents a beneficial effect on the preservation of the intestinal mucosa and improvement of the lipid profile (Vijaimohan *et al.*, 2006). Recent investigations have shown

the morphophysiological importance of the intestinal loops associated with the nutrient absorption processes (Abayasekara e Wathes, 1999).

Another issue that still remains incongruent is speculation on the ALA activity. Whether it exerts the same benefits as the long chain omega-3 fatty acids, such as EPA and DHA, in small amounts, since their conversion into EPA and DHA is limited by the amount of omega-6 fatty acids in the diet. Hussein *et a*l., (2005) reported that the conversion of ALA into EPA varies from 0.3 to 8% in men and less than 1% of ALA is converted into DHA. It is not clear yet if ALA alone presents any direct benefits or if they are achieved through its conversion into EPA (Simopoulos, 2002; Breslow, J. L., 2006).

Oils have been widely studied in animal models, with diets supplemented with some kind of lipid or fatty acid in particular (Camuesco *et al.*, 2005). Trying to understand the activity of different oils, this study proposed to compare the effect of soybean oil to the effect of other oils (olive, fish and flaxseed) on the lipid profile, preservation of villosities and lymphocyte migration in the intestinal mucosa of Wistar rats.

5.2. Methods and Materials

Animals and diets: Thirty 72-day old male rats (Ratus norvegicus albinus, Mammalia, Wistar lineage) were used, coming from the Central Animal House of the Biological Sciences Center of the Federal University of Viçosa. All the groups received the AIN-93M diet (Reeves *et al.*, 1993). The animals were separated into four homogeneous groups, with modifications only in their lipid source: soybean (n=8), olive (n=8), fish (n=7) and flaxseed (n=7). The group fed with soybean oil was considered the control group, as recommended by the AIN-93M. The rats were maintained in individual cages at a temperature of 22±1°C, in a controlled environment, with a light/dark cycle, for 12 hours, and received a diet, *ad libitum*, for 8 weeks. After this period, the animals were submitted to a fasting period of 8 hours and anesthetized with ethyl ether. Later, blood and a portion of the small intestine (ileum) were collected.

Profile of the fatty acids of the oils used

Soybean, olive, flaxseed and fish oils were extracted as recommended Folch (1957), and saponified and esterified as recommended Hartmann & Lago

(1973). The identification of the fatty acid methyl esters was performed by gas chromatography using the CG-17A Shimadzu/Class model, with a fused silica column SP-2560 (biscianopropil polysiloxane), 100 m and 0.25 mm diameter and a flame ionization detector. The programming of the analysis presented an initial temperature of 140°C, being isothermic for 5 minutes, and a posterior heating of 4°C per minute up to 240°C, maintaining this temperature for 30 minutes. The temperature of the vaporizer was 250°C and the temperature of the detector was 260°C. The carrier gas used was nitrogen at 20 cm/second, at 175°C. The split of the sample in the injector was 1/50 and 1 µL of the solution was injected. The peaks were identified by comparing the retention times with known methyl ester standards (FAME mix, Supelco®, USA) and quantified per automatic integration area.

Analysis of the plasmatic lipids

The blood samples were centrifuged (Quimis® model centrifuge) at 3000rpm for 10 minutes in order to achieve the serum and were frozen at -20°C for the Total Cholesterol (TC), High-Lipoprotein Cholesterol (HDL-C) and Triacylglycerol (TAG) analyses, with the use of enzymatic “kits” (Bioclin®, Brazil).

Histological analysis:

Fragments of the ileum were removed and fixed in a Carson formalin (Carson *et al.*, 1973). After dehydration in an increasing gradient of ethanol, the material was diaphanized in xylol and included on paraffin. 7 µm-thick histological sections were achieved in a rotary microtome (Olympus America Inc., CUT 4055) and colored with hematoxylin and eosin (HE).

Lymphocyte quantitative analysis:

Histological sections randomly selected from three animals of each group were used in the analyses. Five laminas were achieved from each animal, each of them with 8 consecutive cuts with minimum intervals of 40 µm between them. 20 images (2048 x 1536 pixels) of three non-consecutive cuts (objective: 20x) were achieved from each slide, totaling 900 fields per experimental group. The

images were obtained with a Q-Color 3 (Olympus) digital camera attached to a BX-60 (Olympus) microscope.

The counting of the number of lymphocytes present in the histological field was carried out with the use of the Image Pro-Plus® software system, version 4.5 (Media Cybernetics). The overlapping of the standard square matrix was standardized (21lines x 21 columns) in the photographed fields, and only the lymphocytes coinciding with the intersections were counted (Figure 6)

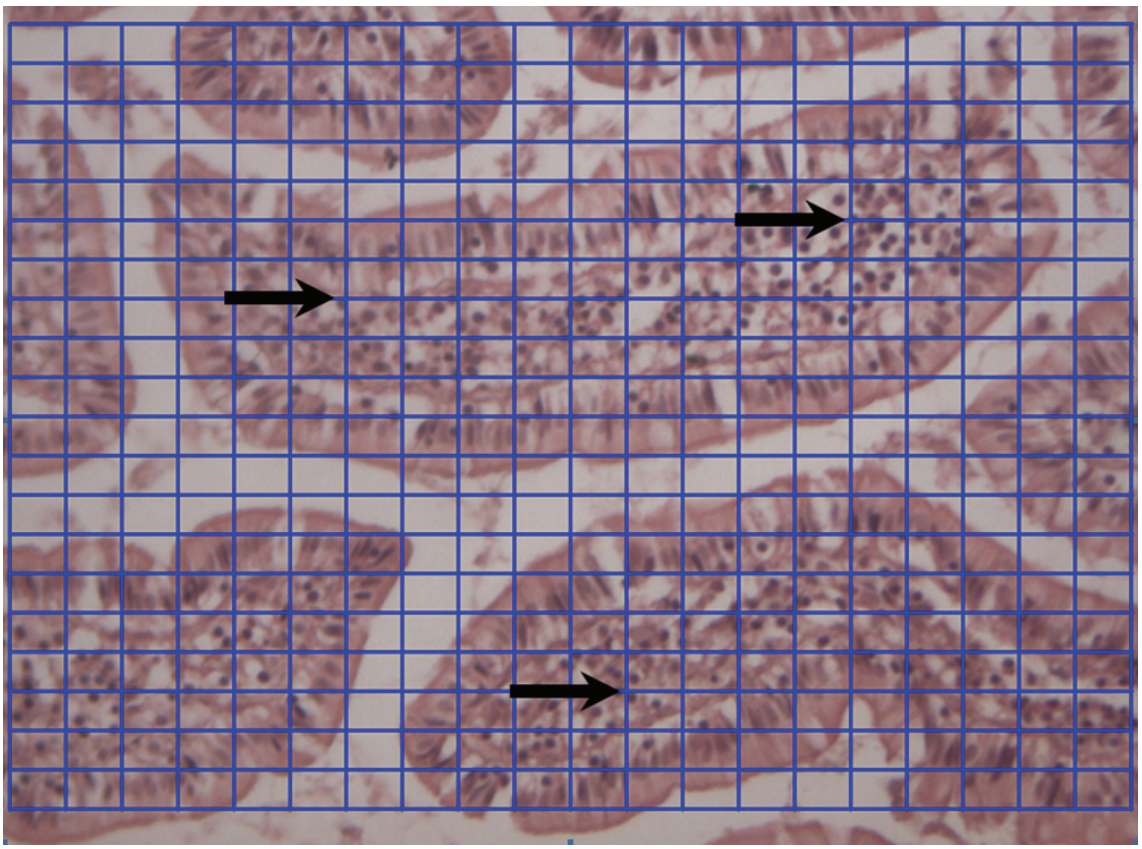


Figure 6 - Photograph of the histological sections of the ileal mucosa of Wistar rats. It was standardized for the counting of the lymphocytes the overlap of a standard square matrix (21lines x 21 columns) in the photographed fields, counting only the lymphocytes which coincided with the intersections, as shown in the figure. Magnification 200x. (Figure: 2048 x 1536 pixels)

Morphometry of the intestinal villosities and crypts:

The images of the histological sections were captured with an objective 10x. The following measures were taken with the use of the Image Pro-Plus® software system, version 4.5 (Media Cybernetics):

Height of villous: 10 random fields were selected per animal. At least 70 villosities per experimental group were measured. Only the villosities with defined epithelium and visible conjunctives were used;

Villous width: in the villosities used in the analysis of height, 3 measures were taken (apical, average and basal regions) and it was considered the average value of these three measures in the same villosity was taken into consideration;

Crypt depth: the measurements of 10 fields per animal were taken, where it was possible to see the basis and the apex (opening) of the crypt. At least 70 crypts were measured per experimental group.

Ethics Committee:

This project was approved by the Ethics Committee of the Department of Veterinary Medicine of the Federal University of Viçosa, processed 12/2008, and the experiment was carried out according to the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (Cobea, 2009).

Statistical Analysis:

The variables were submitted to the normality and homocedasticity tests and, later, to the variance analysis. When necessary, a test to compare averages was performed, Tukey or Dunn`s, depending on the characteristic of the variable. When the data did not meet the premises of normality, even after the proper transformations, they were submitted to the non-parametric test, with the use of the Sigma Stat® statistical software system (version 3.1), at 5% significance.

5.3. Results

The composition of the oils as well as the concentration of fatty acids is listed in Table 4, where the $\omega 6/\omega 3$ relation of the diet offered can also be observed. At the end of the experiment no difference was observed in weight gain, food consumption or food coefficient efficiency (data not shown).

Table 4 - Concentration of fatty acids in the oils used in the diets (per cent).

	Concentrations[a]			
Fatty acids	Soybean oil	Olive oil	Fish oil	Flaxseed oil
C14:0	ND	ND	5.86	ND
C15:0	ND	ND	0.22	ND
C16:0	7.75	11.30	10.76	6.45
C17:0	ND	ND	0.50	ND
C18:0	3.01	2.96	3.60	4.35
C20:0	ND	0.38	0.48	ND
C22:0	0.34	0.12	ND	ND
C16:1	ND	1.09	6.60	ND
C18:1 ω-9	21.36	74.01	9.98	18.00
C20:1	ND	0.25	1.08	ND
C20:2	ND	ND	3.05	ND
C18:2 ω-6	60.75	8.74	2.78	12.71
C20:4 ω-6	ND	ND	0.73	ND
C22:2 ω-6	ND	ND	0.87	ND
C18:3 ω-3	6.96	ND	0.80	58.47
C20:5 ω-3	ND	ND	24.01	ND
C22:6 ω-3	ND	ND	19.86	ND
Total ω-6	60.75	8.74	4.37	12.71
Total ω-3	6.93	0.75	44.63	58.47
ω-6/ω-3	8.77	11.65	0.10	0.22

[a] Fatty acids concentration in soybean. olive, fish and flaxseed oils. The identification of the methyl esters of the fatty acids was performed by gas chromatography. Values are in g/100 g. *ND= undetermined value.

The group fed fish oil presented a significant difference when compared to the group fed olive oil and the control group, for the TC, HDL-C and TAG parameters. Thus, no differences were observed among treatments related with HDL-C/TC ratio (Table 5)

Table 5 - Average of the values of TC, HDL-C, TG and HDL-C/TC serum of the different experimental groups (mg/dL)

		Average values							
		TC[a]		HDL-C[b]		TAG [a]		HDL-C/TC[a]	
Treatment	n	Average	p	Average	p	Average	p	Average	p
Control	8	132.31±36.10a	0.01	80.63±19.14a	-	249.58±95.67a	0.034	0.62±0.11a	-
Olive	8	138.05±37.06a	0.005	83.68±16.85a	-	267.19±55.00a	0.014	0.62±0.09a	-
Fish	7	78.83±26.11b	-	50.87±20.23b	0.003	145.83±40.02b	-	0.64±0.11a	-
Flaxseed	7	100.12±11.85ab	-	53.24±14.24ab	-	198.42±64.70ab	-	0.52±0.10a	-

Data are given as means ±SEM. [a]Averages followed by the same letter in the column do not differ by the Tukey test (P <0.05); [b] Averages followed by the same letter in the column do not differ by the Dunn's test (P <0.05). TC: Total Cholesterol; HDL-C: High-Lipoprotein Cholesterol; TAG: Triacylglycerol; HDL-C/TC: Ratio High-Lipoprotein Cholesterol/ Total Cholesterol.

The villosities of the ileum of the rats fed with the different lipid sources presented significant differences as to the height and width of the villosities and the depth of the crypts. All groups presented a greater villous height and crypt depth besides a smaller villous width than the control group. The groups treated with olive and fish oils presented higher values for the villous height ($p < 0.001$) and crypt depth ($p = 0.002$), indicating an increase in the development of the mucosa. The width of the villosities suffered changes only in the groups treated with olive and flaxseed oils ($p < 0.001$). In these cases, the villosities became thinner than those in the control (Table 6).

Table 6 – Morphometry of the intestinal villosities and crypts of Wistar rats fed with different lipid sources.

Treatment	n	Height of the villous[a]		Villous width[b]		Crypt depth[a]	
		Mean ± SEM	Median(min-max)	Mean ± SEM	Median(min-max)	Mean ± SEM	Median(min-max)
Control	3	317.52 ± 52.26	317.8 (428.5-161.9) a	86.15 ± 16.26 a	86.3(125.5-29.53)	131.55 ± 25.23	129.5(206.0-82.3) a
Olive	3	364.44 ± 63.16	380.4(445.1-170.3) b	79.25 ± 14.65 b	78.9(117.7-49.5)	146.54 ± 25.42	144.8(198.6-73.5) b
Fish	3	381.15 ± 107.51	379.8(575.4-176.9) b	85.82 ± 12.61 a	85.6(110.9-54.1)	142.49 ± 29.85	146.3(189.6-69.2) b
Flaxseed	3	322.19 ± 58.12	323.2(440.9-176.9) a	71.05 ± 12.97 c	69.9(101.8-43.8)	135.55 ± 36.36	131.2(231.6-63.0) a

Average values of villus height, villous width and crypt depth (μm). Data are given as means ±SEM and median (minimum- maximum). [a]Averages followed by the same letter in the column do not differ by the Dunn's test ($P < 0.05$). [b]Averages followed by the same letter in the column do not differ by the Tukey test ($P < 0.05$).

All groups exhibited less lymphocyte deposition in the intestinal mucosa (ileum) than the control group. The deposition of lymphocytes in the intestinal mucosa was statistically lower in the animals that were treated with flaxseed oil ($p=0.001$). Then, lower values were observed in the groups treated with fish and olive oil, respectively (Table 7)

Table 7 – Average counted number of lymphocytes in the intestinal mucosa

Treatment	n	Lymphocytes	
		Average[a]	p
Control	3	16.36 ± 14.82a	0.001
Olive	3	9.38 ± 4.18b	-
Fish	3	7.81 ± 4.19bc	-
Flaxseed	3	4.70 ± 2.31c	0.001

Data are given as means ±SEM.[a] Mean values with same letter in the column do not differ by the Tukey test ($P < 0.05$).

5.4. Discussion

In the present study, the rats fed with diets containing fish oil presented a decrease in the concentration of TC, HDL-C and TAG. The olive and flaxseed oils did not differ from the control as the plasmatic lipids did. The polyunsaturated fatty acids, rich in EPA and DHA derived from sea products, presented a cardioprotective and antiatherogenic role, due to the inhibition of LDL synthesis, acceleration of LDL elimination and reductions of serum triglyceride (Tzang *et al.*, 2009). It can also be observed that the lower ω6/ω3 diet relates to a higher reduction of plasmatic lipids.

The reduction of the HDL fraction in the group treated with fish oil may be related to the fact that this lipoprotein is what is mainly responsible for the transport of cholesterol in rodents (Forti e Diament, 2006). Lower levels of total cholesterol were verified in this group and, therefore, a lower demand of HDL was necessary to transport the cholesterol to the liver for metabolization.

Histology was carried out to corroborate the activity of the different lipid sources on the preservation of the structure of the intestinal mucosa in the ileum portion, which is the main location for lipid absorption. The morphometric analysis allows the measurement of these changes to occur in the mucosa as a response to the different diet components. The fish and olive group presented the highest villous height and crypt depth, while the flaxseed group presented the smallest villosity width, demonstrating that these oils exerted a positive effect on the integrity of the mucosa. These results indicate that a strong hyperplasia process occurred in these groups, aiming to guarantee the cell turnover rate in order to compensate the cell losses in the apical region of the villosities. In the small intestine, enterocytes generated from stem cells in the crypt base differentiate into absorptive cells and are finally lost from the tips of the villus, resulting in the replacement of lining cells every 2-3 days (Turan *et al.*, 2009).

Campos *et al*. (2002) observed less inflammatory alterations in the intestinal wall of the rats treated with lipid emulsions rich in omega-3 fatty acids and greater protection against the development of morphological lesions. Similarly, the preservation of the morphological structure with the use of omega-3 fatty acids was also demonstrated in experimental (Inui *et al.*, 1996) and clinical studies (Stenson *et al.*, 1992). It has been discovered that long-chain

fatty acids appear to be more effective intestinal stimulators and significant trophic effects on small intestinal mucosa in rats (Sukhotnik *et al.*, 2004).

As to the lymphocyte counting, it was observed in this study that the group treated with flaxseed oil presented the lowest deposition of lymphocytes in the ileal portion, followed by the fish and olive groups, demonstrating that the treatments played an important role in the reduction of the migration of this inflammatory cell. Andoh *et al*. (2003) fed rats with diets rich in omega-3 and omega-6 for 12 days after an enteritis induction. They verified significantly more severe histological changes in the animals fed with omega-6 and a greater amount of pro-inflammatory interleukins, in comparison to those fed with omega-3, suggesting a possible mechanism for the suppression of the inflammatory response.

Jeffery *et al*.(1997) demonstrated that the supplementation of EPA and DHA inhibited the proliferation of isolated lymphocytes of the lymphatic nodes, spleen and thymus of rodents as well as their concentration in human blood, which is in accordance with the lower number of lymphocytes found in the intestinal mucosa in the groups treated with the oils which are sources of ALA and EPA/DHA present in this work.

However, the treatments with olive and fish oils provided better preservation of the ileal mucosa and the group treated with flaxseed oil reduced the migration of lymphocytes to the intestinal mucosa. These data suggest that the oils, even in small amounts in the diet, present different metabolic responses from the soybean oil.

The control group, fed with oil rich in LA, presented the greatest number of lymphocytes in the intestinal mucosa, probably due to the inflammatory response to AA, resulting from the LA metabolism (Teitelbaum e Allan Walker, 2001). Although the modulatory role of the inflammatory response depends on the concentrations of $\omega 6/\omega 3$ in the diet, soybean oil presented an inflammatory response superior to olive oil which presented a greater $\omega 6/\omega 3$ relation.

The present study demonstrated that fish, flaxseed and olive oils present different responses from those provided by the soybean oil in the preservation of the intestinal mucosa and the proliferation of lymphocytes in the intestines of rats. It also proved that the fatty acids ALA and EPA/DHA, although belonging to the same omega-3 group, present a different metabolism related to plasmatic

lipids, lymphocyte proliferation and preservation of the intestinal mucosa, evidencing that further studies should be carried out on these fatty acids separately, for better handling of these oils or foods which are sources of ALA or EPA/DHA in a diet, with possible preventive activity against chronic diseases.

5.5. References

ABAYASEKARA, D. R. E.; WATHES, D. C. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 61, p. 275-257, 1999.

ALFAIA, C. P. M.; ALVES, S. P.; MARTINS, S. I. V.; COSTA, A. S. H.; FONTES, C. M. G. A.; LEMOS, J. P. C.; BESSA, R. J. B.; PRATES, J. A. M. Effect of the feeding system on intramuscular fatty acids and conjugated linoleic acid isomers of beef cattle, with emphasis on their nutritional value and discriminatory ability. *Food Chemistry*, v. 114, n. 3, p. 939-946, 2009.

ANDOH, A.; TSUJIKAWA, T.; ISHIZUKA, I. E. A. n-3 fatty acid-rich diet prevents early response of interleukin-6 elevation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced enteritis. *International Journal of Molecular Medicine* v. 12, p. 721-5, 2003.

BRESLOW, J. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.*, v. 83, n. 6, p. S1477-1482, 2006.

BRESLOW, J. L. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 83, n. 6, p. S1477-1482, 2006.

CALDER, P. C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 83, n. 6, p. S1505-1519, 2006.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*, v. 91, n. 6, p. 791-795, 2009.

CAMPOS, F. G.; WAITZBERG, D. L.; LOGULO, A. F.; TORRINHAS, R. S.; TEIXEIRA, W. G. J.; HABR-GAMA, A. Imunonutrição em colite experimental: efeitos benéficos dos ácidos graxos ômega-3. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 39, p. 48-54, 2002.

CAMUESCO, D.; GALVEZ, J.; NIETO, A.; COMALADA, M.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E.; CONCHA, A.; XAUS, J.; ZARZUELO, A. Dietary Olive Oil Supplemented with Fish Oil, Rich in EPA and DHA (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids, Attenuates Colonic Inflammation in Rats with DSS-Induced Colitis. *Journal of Nutrition*, v. 135, n. 4, p. 687-694, 2005.

CARSON, F. L.; MARTIN, J. H.; LYNN, J. A. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 59, p. 365-373, 1973.

COBEA. Ethical Priniples for the use of laboratory animals. *Brazilian College on Animal Experimentation*, 2009.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 226, n. 1, p. 497 - 509, 1957.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 87, p. 671-679, 2006.

HARTMANN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices*, v. 22, p. 475-477, 1973.

HUSSEIN, N.; AH-SING, E.; WILKINSON, P.; LEACH, C.; GRIFFIN, B.; MILLWARD, D. Long-chain conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. *Journal of Lipid Research*, v. 46, p. 269-80, 2005.

INUI, K.; FUKUTA, Y.; IKEDA, A.; KAMEDA, H.; KOKUBA, Y.; SATO, M. The Effect of a-Linolenic Acid-Rich Emulsion on Fatty Acid Metabolism and Leukotriene Generation of the Colon in a Rat Model with Inflammatory Bowel Disease. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 40, n. 3, p. 175-182, 1996.

JAMES, M. J.; GIBSON, R. A.; CLELAND, L. G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr.*, v. 71, n. 1, p. 343S-348, 2000.

JEFFERY, N. M.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. Level of polyunsaturated fatty acids and the n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acid ratio in the rat diet alter serum lipid levels and lymphocyte functions. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 57, n. 2, p. 149-160, 1997.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing commitee ond the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 21, n. 6, p. 495-505, 2002.

SIMOPOULOS, A. P. The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Experimental Biology and Medicine*, v. 233, n. 6, p. 674-688, 2008.

STENSON, W.; CORT, D.; RODGERS, J.; BURAKOFF, R.; DESCHRYVER-KECSKEMETI, K.; GRAMLICH, T.; BEEKEN, W. Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. *Annals of Internal Medicine*, v. 116, p. 609-14, 1992.

SUKHOTNIK, I.; MOR-VAKNIN, N.; DRONGOWSKI, R. A.; MISELEVICH, I.; CORAN, A. G.; HARMON, C. M. Effect of dietary fat on early morphological intestinal adaptation in a rat with short bowel syndrome. *Pediatric Surgery International*, v. 20, n. 6, p. 419-424, 2004.

TEITELBAUM, J. E.; ALLAN WALKER, W. Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 12, n. 1, p. 21-32, 2001.

TURAN, A.; GILL, R.; DUDEJA, P.; MOHAN, H.; MAHMOOD, A. Effect of Fat Feeding on Pro-oxidant and Anti-oxidant Enzyme Systems in Rat Intestine: Possible Role in the Turnover of Enterocytes. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 54, n. 6, p. 1229-1236, 2009.

TZANG, B.-S.; YANG, S.-F.; FU, S.-G.; YANG, H.-C.; SUN, H.-L.; CHEN, Y.-C. Effects of dietary flaxseed oil on cholesterol metabolism of hamsters. *Food Chemistry*, v. 114, n. 4, p. 1450-1455, 2009.

UESHIMA, H.; STAMLER, J.; ELLIOTT, P.; CHAN, Q.; BROWN, I. J.; CARNETHON, M. R.; DAVIGLUS, M. L.; HE, K.; MOAG-STAHLBERG, A.; RODRIGUEZ, B. L.; STEFFEN, L. M.; VAN HORN, L.; YARNELL, J.; ZHOU, B.; FOR THE INTERMAP RESEARCH GROUP. Food Omega-3 Fatty Acid Intake of Individuals (Total, Linolenic Acid, Long-Chain) and Their Blood Pressure: INTERMAP Study. *Hypertension*, v. 50, n. 2, p. 313-319, 2007.

VIJAIMOHAN, K.; JAINU, M.; SABITHA, K.; SUBRAMANIYAM, S.; ANANDHAN, C.; SHYAMALA, D. C. Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. *Life Science*, v. 79, n. 5, p. 448-54, 2006.

Acknowledgement

A special thanks to Jeffrey Ryan Oar from Oregon State University for the revision of the English version of this article.

Conflict of interest: none
Financial source: FAPEMIG and CAPES

Correspondence:
Maria do Carmo Gouveia Peluzio
Department of Nutrition and Health
Av. Peter Henry Rolfs, s/n
36570-000 Viçosa – MG Brazil
Phone: +55 31 3899-1275
Fax: +55 31 3899-2541
mpeluzio@ufv.br

Received: December 14, 2009
Review: February 10, 2010
Accepted: March 15, 2010

How to cite this article
Rosa DD, Sales RL, Moraes LFS, Lourenço FC, Neves CA, Sabarense CM, Peluzio MCG. Flaxseed, olive and fish oil influence plasmatic lipids, lymphocyte migration and morphometry of the intestinal of Wistar rats. Acta Cir Bras. [serial on the Internet] 2010 May-Jun;25(3). Available from URL: http://www.scielo.br/acb

***Color figure available from www.scielo.br/acb**

6. ARTIGO II

Óleo de Peixe reduz citocinas inflamatórias em ratos Wistar induzidos a lesões pré-neoplásicas

Palavras chaves: câncer colon, óleo de peixe, óleo de linhaça, óleo de oliva, ácidos graxos, poliaminas, focos de criptas aberrates, IL-8, TGF-β, MCP-1

Abreviaturas: CCR= câncer colorretal; AGS= Ácidos graxos saturados; MUFA= ácidos graxos monoiinsaturados; PUFA= ácidos graxos poliinsaturados; EPA= ácido eicosapentanóico; DHA= ácido docosahexanóico; DMH= dimetilhidrazina; ODC= ornitina descarboxilase; IL= interleucina; MCP-1= proteína de quimioatração de monócitos 1; TGF-β= fator de crescimento e transformação β; CC= câncer cólon; FCA= focos de criptas aberrantes;

Suporte Financeiro: FAPEMIG, CAPES – Brasil

Introdução: Na dieta, a gordura ingerida tem sido considerada o mais importante constituinte que influencia o desenvolvimento do câncer de cólon. Os óleos ricos em ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) da série ω3 apresentam um importante efeito protetor na progressão do câncer de cólon induzido experimentalmente em roedores, quando comparado com fontes lipídicas ricas em PUFA da série ω6.

Objetivo: Investigar os efeitos quimiopreventivos de diferentes óleos (oliva, peixe e linhaça) em ratos Wistar submetidos ao protocolo de carcinogênese experimental.

Métodos: Ratos Wistar receberam 4 injeções subcutâneas de dimetilhidrazina DMH (40mg/Hg peso) e foram alimentados com dietas normolipídicas contendo 4% de óleo de oliva, peixe, linhaça e óleo de soja (controle). Após a eutanásia, o cólon foi removido para quantificar o número de focos de criptas aberrantes e a determinação dos mediadores inflamatórios, como interleucina 8 (IL-8), a proteína de quimioatração de monócitos (MCP-1) e fator de crescimento e transformação β (TGF-β). As aminas bioativas foram avaliadas no tecido hepático. Foi determinado o perfil lipídico dos óleos utilizados na dieta e do tecido hepático e da gordura intra-abdominal.

Resultados: Não houve diferença entre os tratamentos quanto ao ganho de peso, ingestão alimentar, coeficiente de eficácia alimentar, peso dos fígados e composição corporal dos roedores. O grupo alimentado com óleo de peixe apresentou maiores níveis de EPA ($p=0,004$) e DHA ($p<0,001$) no fígado e maiores níveis ácido linolênico ($p=0,003$) e EPA ($p=0,011$) no tecido adiposo intra-abdominal em relação aos demais tratamentos. Nestes tecidos, menor relação ω6/ω3 foi verificada nos grupos alimentados com óleos peixe e linhaça. Não foi encontrada diferença no número de FCA entre os grupos alimentados com as diferentes fontes lipídicas ($p>0,05$). Não houve diferença na expressão de IL-8, TGF-β, e MCP-1 em relação ao controle ($p>0,05$). Ao avaliar comparativamente a expressão das citocinas, verificou-se que o grupo peixe expressou duas vezes mais TGF-β e oito vezes menos IL-8 em relação aos demais tratamentos. O grupo oliva apresentou menores níveis de espermidina ($p=0,008$) quando comparado com os demais tratamentos.

Conclusão: O óleo de peixe apresentou uma resposta positiva na mucosa colônica de roedores tratados com carcinógeno. Os ácidos graxos α-linolênico, EPA e DHA, apresentaram um metabolismo diferenciado quanto à incorporação nos tecidos hepático e intra-abdominal, à formação de lesões pré-neoplásicas e à expressão de citocinas inflamatórias no cólon.

6.1. Introdução

O câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias mais comuns, sendo um milhão de novos casos identificados a cada ano. Representa a segunda causa de morte por câncer no mundo (De Dosso *et al.*, 2009). No Brasil é o quarto tipo de câncer mais incidente, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) e para o ano de 2010 são esperados 28 mil novos casos de câncer de colon e reto (Instituto Nacional De Câncer, 2010).

O CCR é considerado uma doença multifatorial, sendo que 25% dos casos estão relacionados a fatores hereditários e 75% relacionados a outros fatores de risco, como fumo, obesidade, sedentarismo, envelhecimento e hábitos alimentares (Wallace e Caslake, 2001). Dados da literatura sugerem associação entre o alto consumo de gordura na dieta com o aumento do risco de CCR, sendo que este efeito está intimamente ligado à quantidade e tipo de ácidos graxos consumidos (Dwivedi *et al.*, 2003).

Dentre os nutrientes da dieta, a gordura tem sido considerada o mais importante constituinte nutricional que influencia o desenvolvimento do câncer de cólon (Rao *et al.*, 2001). Dietas ricas em óleo de milho, óleo de girassol, carnes e gordura animal aumentam o número de tumores de cólon quimicamente induzidos em roedores em comparação com dietas contendo baixos níveis de gorduras, reforçando a importância do teor e da composição dos ácidos graxos no desenvolvimento do câncer de cólon (Dwivedi *et al.*, 2003). Estudos epidemiológicos sugerem que dietas ricas em gorduras saturadas aumentam o risco de câncer colorretal e dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) da série ω3, composta por peixe e óleo de peixe, reduzem este risco (Rao *et al.*, 2001).

Os níveis dos ácidos graxos que compõem a dieta, principalmente os níveis de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) da série ω3 e ω6 interferem no desenvolvimento do tumor do cólon em estudos com animais. Moreira *et al.*,(2009) ao analisarem os animais alimentados com 18%(padrão de dieta ocidental) de óleo de peixe ou soja, com e sem a adição de vitamina E em ratos Wistar induzidos ao câncer, verificaram que o grupo peixe apresentaram redução no número de focos de criptas aberrantes (FCA), menor incidência e multiplicidade de tumores formados em relação ao grupo alimentado com óleo de soja, sugerindo um efeito protetor dos PUFA da série ω3.

Há quase 20 anos já haviam verificado que a dieta contendo óleo de peixe (18,5%) e óleo de milho (5%) era capaz de reduzir a carcinogênese nos estágios de iniciação e pós iniciação em ratos F344, quando comparada a uma dieta enriquecida com óleo de milho (23,5%), rica em PUFA da série ω6 (Reddy, 1987).

Como já é sabido, estes últimos favorecem o metabolismo do ácido araquidônico e leva à formação de eicosanóides (mediadores do processo inflamatório) que estão relacionados com a iniciação e promoção do câncer, a proliferação celular e a metástase tumoral (Martins e Gruezo, 2009).

A carcinogênese experimental do cólon é um processo que envolve três estágios distintos. A iniciação, que altera a mensagem molecular de uma célula normal, seguido de promoção e progressão, que finalmente transforma fenotipicamente a célula. Para este fim, substâncias carcinogênicas, como a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) são utilizadas, e são capazes de induzir alterações macroscópicas no epitélio colônico, como alterações na secreção de mucina e na taxa de proliferação de criptas (Kanna *et al.*, 2003). A avaliação das alterações morfológicas, como os focos de criptas aberrantes (FCA), que constituem lesões pré-neoplásicas, constitui um importante biomarcador da carcinogênese do cólon em modelos experimentais e humanos (Raju, 2008).

A alteração de várias vias de regulação e proliferação celular estão presentes nas células tumorais do câncer de colorretal, levando a alta taxa de divisão celular observada nestes tumores. Um exemplo importante é a via de biossíntese de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina), que são necessárias para o crescimento e proliferação celular. Elas existem primariamente complexadas com o RNA e seu efeito na proliferação celular está relacionado ao estímulo na síntese de proteínas. A ornitina descarboxilase (ODC) é uma enzima limitante na síntese de poliaminas, gerando putrescina a partir da ornitina. ODC está intimamente envolvida na proliferação celular normal e se relaciona com a carcinogênese no cólon. O aumento da atividade ODC e síntese de poliaminas é um fenômeno comum nas células em rápida proliferação, incluindo as do câncer de cólon (Rosenberg *et al.*, 2009).

O processo inflamatório persistente e crônico contribui para o desenvolvimento do câncer, por facilitar a transformação das células normais à

células malignas. Coletivamente, estima-se que as infecções subjacentes e as reações inflamatórias estão relacionadas a 15-20% de todas as mortes por câncer (Mantovani e Pierotti, 2008).

Alguns marcadores celulares e moleculares do câncer estão associados à inflamação, como a presença de infiltrado de leucócitos no micro-ambiente do tumor e outros mediadores, como citocinas, quimiocinas (IL-8 , MCP-1), fatores de crescimento (TGF-β), espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e conseqüentemente, a ativação do fator de transcrição nuclear (NFκβ) e outras moléculas envolvidas na inflamação e carcinogênese (Mantovani e Pierotti, 2008; Lee *et al.*, 2010).

As quimiocinas exercem muitos efeitos biológicos, e são conhecidas por recrutar os leucócitos nos sítios de inflamação. A interleucina- 8 (IL-8) promove o crescimento das células tumorais no cólon (Mantovani e Pierotti, 2008) e o aumento da sua expressão tem sido verificado em vários tumores. Alguns estudos correlacionam os níveis de IL-8 presente nos tecidos com progressão e metástases do tumor (Itoh *et al.*, 2005; Cacev *et al.*, 2008). A proteína de quimioatração de monócitos-1 (MCP-1) é considerada um dos mais potentes recrutadores de macrófagos, tendo sido muito relacionada com o início das doenças inflamatórias crônicas (Hsieh *et al.*, 2001). Já atuando como fator de proteção, o fator de crescimento transformador-β (TGF-β), desempenha um papel importante na modulação da carcinogênese de cólon em humanos. No cólon normal, TGF-β tem um efeito antiproliferativo sobre células epiteliais, induzindo a parada do crescimento em G1 e apoptose (Rosenberg *et al.*, 2009).

As alterações decorrentes do processo da carcinogênese além de causar alterações moleculares, causam alterações fisiológicas e metabólicas no organismo. Há uma desregulação no metabolismo da glicose e dos lipídios, catabolismo protéico acentuado; aumento na taxa metabólica basal, com conseqüente aumento no gasto energético. Aliado a este quadro, há uma proteólise intensa e perda de massa muscular, o que resulta em um quadro de emagrecimento e caquexia, alterando a composição corporal (Garófolo e Petrilli, 2006). Os mecanismos destas alterações não estão completamente elucidados e em nível clínico é de grande interesse estudar componentes dietéticos que atenuariam essas alterações metabólicas

A proposta desta investigação foi avaliar o efeito quimiopreventivo da ingestão de diferentes óleos (oliva, peixe e linhaça) em ratos Wistar induzidos ao câncer colorretal com DMH. Para tanto, foi analisado o perfil lipídico dos óleos utilizados e seu padrão de incorporação no tecido hepático e adiposo, e sua relação com a incidência de FCA, a expressão de citocinas inflamatórias na mucosa colônica, a presença de aminas bioativas no tecido hepático e na composição corporal dos roedores.

6.2. Materiais e Métodos

6.2.1. **Animais e dietas**

Foi realizado um estudo do tipo caso controle com duração de 9 semanas. Foram utilizados 40 ratos machos do tipo *Ratus norvegicus albinus*, Mammalia da linhagem *Wistar*, com setenta e dois dias e divididos em 4 grupos, com peso médio inicial de 330 ± 13,6g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa. Cada grupo experimental foi composto de 10 animais e receberam dieta baseada no *American Institute of Nutrition*, seguindo o protocolo AIN-93M, recomendado para manutenção de animais adultos (Reeves *et al.*, 1993). As dietas eram isocalóricas e diferiram apenas na fonte lipídica, a qual foi constituída por óleos de: soja, oliva, peixe e linhaça durante todo o período experimental. O grupo controle (+) foi alimentado com óleo de soja, em função da recomendação da AIN-93M. A partir da segunda semana de experimento, os animais foram tratados com carcinógeno. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais com temperatura de 22±1°C, em ambiente controlado com ciclo claro/escuro por 12 horas e receberam dieta *ad libitum* durante todo o período experimental (Figura 7)

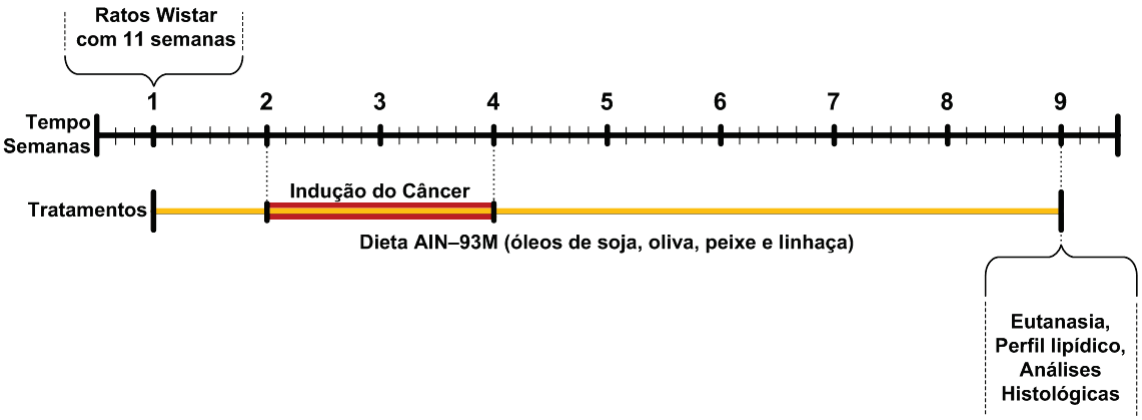


Figura 7 – Desenho Experimental.
Ratos Wistar com 11 semanas tratados com carcinógeno (DMH) e alimentados com dietas à base de óleo de soja (controle +), oliva, peixe e linhaça.

Após o período experimental, os animais ficaram em jejum por 8 horas, submetidos à eutanásia e então foram coletados o sangue, tecido hepático, gordura intra-abdominal e o cólon, além da carcaça (coleta do tecido muscular, ósseo e pele).

6.2.2. **Protocolo de Carcinogênese Experimental**

A partir da segunda semana de experimento, os animais receberam 4 injeções subcutâneas em 40mg/kg peso corporal de DMH (Sigma, USA) sendo realizadas duas aplicações em dias não consecutivos por um período de duas semanas. A DMH era preparada imediatamente antes do uso, dissolvida em 0,9% NaCl e 1,5% de EDTA como veículo, na concentração final de 10mg/mL e pH final ajustado para 6,5 (Larangeira *et al.*, 1998).

6.2.3. **Parâmetros analisados**

6.2.3.1. **Consumo alimentar e análise da composição corporal dos animais**

O consumo alimentar e o peso corporal foram monitorados semanalmente. Após a eutanásia as vísceras foram retiradas restando-se apenas ossos, músculos e pele (carcaça vazia) para a análise quantitativa de água, gordura e proteína (Pitts *et al.*, 1983). Para a determinação do conteúdo de água, as carcaças vazias foram colocadas individualmente em pratos de alumínio e introduzidas em estufa à temperatura de 105^{o}C por 24 horas. A umidade foi determinada pela diferença do peso pré e pós-secagem. Após a

secagem, as carcaças vazias foram maceradas e inseridas em cartuchos de papel filtro para a extração dos lipídios pelo método de Soxhlet, utilizando-se solvente éter de petróleo, conforme IUPAC (1979). Na amostra seca e desengordurada, determinou-se em triplicada o percentual de proteína, pelo método indireto de determinação do nitrogênio, método de Kjeldahl (1984), utilizando-se o fator 6,25 para conversão em proteína.

6.2.3.2. **Perfil de ácidos graxos dos óleos utilizados**

O lipídios dos óleos (soja, oliva, peixe e linhaça), do tecido hepático, gordura intra-abdominal foram extraídos segundo Folch (1957), saponificados e esterificados segundo Hartmann e Lago (1973). A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa, utilizando-se o modelo CG-17A Shimadzu/Class, com a coluna de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polysiloxane), de 100 m e 0,25 mm de diâmetro e detector de ionização em chama. A programação de análise utilizada foi a temperatura inicial de 150°C, isotérmica por 10 minutos e posterior aquecimento de 4°C por minuto até 250°C, permanecendo nesta temperatura por 40 minutos. As temperaturas do vaporizador foi de 240°C e do detector de 260°C. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio em 24 cm/seg., a 175°C. A razão split da amostra no injetor foi de 1/10 e o volume de injeção foi de 1 µL.

Os picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com padrões de metil ésteres conhecidos FAME mix (Supelco®, EUA) e quantificados por áreas de integração automática

6.2.3.3. **Contagem dos focos de criptas aberrantes**

O intestino grosso foi removido, lavado em solução salina fisiológica e fixado em formalina de Carson (Carson *et al.*, 1973) por 24 horas. Após a fixação, o intestino foi dividido em segmentos proximal, médio e distal em relação ao ceco. Para a contagem dos FCA, os segmentos do cólon de 5 animais de cada grupo foram corados com solução de azul de metileno a 0,1%. 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 realizada

com base no número de criptas aberrantes por foco, ou seja, focos com três ou menos criptas e focos com mais de três criptas.

6.2.3.4. **Concentração das Aminas Bioativas**

Os níveis de espermidina, espermina e histamina foram determinados no tecido hepático de 10 animais por grupo. As aminas foram extraídas com 1g de tecido para 4 mL de ácido tricloroacético 5%, segundo o método de Vale e 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 e Gloria, 1997).

6.2.3.5. **Nível de expressão dos mediadores do processo inflamatório**

O RNA mensageiro (mRNA) total das amostras (n=5/grupo) do cólon distal foi extraído a partir de 150mg de amostra. O tecido foi tratado com Proteinase K (Sigma Aldrich®) e o RNA foi extraído com reagente Trizol (Invitrogem Life Tecnologies), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi mantido a -80^{o}C até as análises.

O RNA total (200µg/µL) foi tratado com random primers (Promega®), reaction buffer, dNTP (Sinapse®) e enzima M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas®), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação dos genes alvo foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR) no equipamento ABI Prism 5700 Sequence Detection System, utilizando-se o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green (Applied Biosystems). O ciclo da PCR envolveu uma desnaturação inicial de 95ºC (10 minutos) e então 40 ciclos, com 1 minuto de desnaturação (94ºC), 1 minuto de anelamento (56ºC) e 2 minutos de alongamento (72ºC), seguidos da curva padrão de dissociação. As condições de PCR foram otimizadas considerando a concentração dos “primers”, ausência de formação de dímeros, eficiência na amplificação dos genes alvo e controle dos genes constituintes. As médias dos valores de Ct (“cycle threshold”) das mensurações em duplicata foram usadas para calcular a expressão do gene alvo, com a

normalização do controle interno (β-actina). Os valores encontrados nos animais induzidos à lesões pré-neoplásicas foram comparados ao controle positivo (animais tratados com óleo de soja), utilizando a fórmula $2 - \Delta Ct$, também de acordo com o Manual do Usuário.

As seqüências dos "primers" (Bionner®) utilizados (sense e antisense) e suas propriedades de reação estão descritas a seguir:

β-actina (PCR, 607 pares de base)

5' primer: 5'- ATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGC -3'

3' primer: 5'- AGCATTTGCCCTGCACGATGGAGGG -3'

IL-8 (PCR, 670 pares de base)

5' primer: 5'- CTCCAGCCACACTCCAACAGA -3'

3' primer: 5'- CACCCTAACACAAAACACGAT -3'

TGF-β, (PCR, 400 pares de base)

5' primer: 5'- GACCTGGGCACCATCCATGA -3'

3' primer: 5'- CTGCTCCACCTTGGGCTTGCGACCCAC -3'

MCP-1, (PCR, 407 pares de base)

5' primer: 5'- ATGCAGGTCTCTGTCACGCTTCTGGGC -3'

3' primer: 5'- CTAGTTCTCTGTCATACTGGTCAC -3'

6.2.4. **Análise Estatística**

As variáveis foram submetidas aos testes de normalidade e posteriormente a análise de variância. Quando não atenderam às premissas de normalidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico. As comparações entre três ou mais grupos independentes foram realizadas por análise de variância (ANOVA) para dados com distribuição normal e pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis, para os dados sem distribuição não paramétrica, utilizando o software SigmaPlot®, versão 11.0 (Systat© Software, Inc), para análise estatística e representação dos dados, ao nível de 5% de significância.

6.2.5. **Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, processo 12/2008

(Anexo III). O experimento foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (Cobea, 2009).

6.3. Resultados

Ao fim do experimento, não foi verificado nenhuma diferença entre os tratamentos para ganho de peso corporal dos animais (p>0,05). Na segunda e terceira semana de experimento verificou-se uma redução na velocidade de crescimento em função da administração do carcinógeno (Figura 8). Após 9 semanas, os animais que consumiram dietas com diferentes óleos (oliva, peixe e linhaça) na mesma proporção 4g/100 dieta, não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle + (soja), nos teores de umidade, proteína, lipídio e cinza nas carcaças, não influenciando assim a composição corporal dos animais(dados não mostrados). Os animais não diferiram quanto o peso dos fígados, consumo alimentar e coeficiente de eficácia alimentar (dados não mostrados).

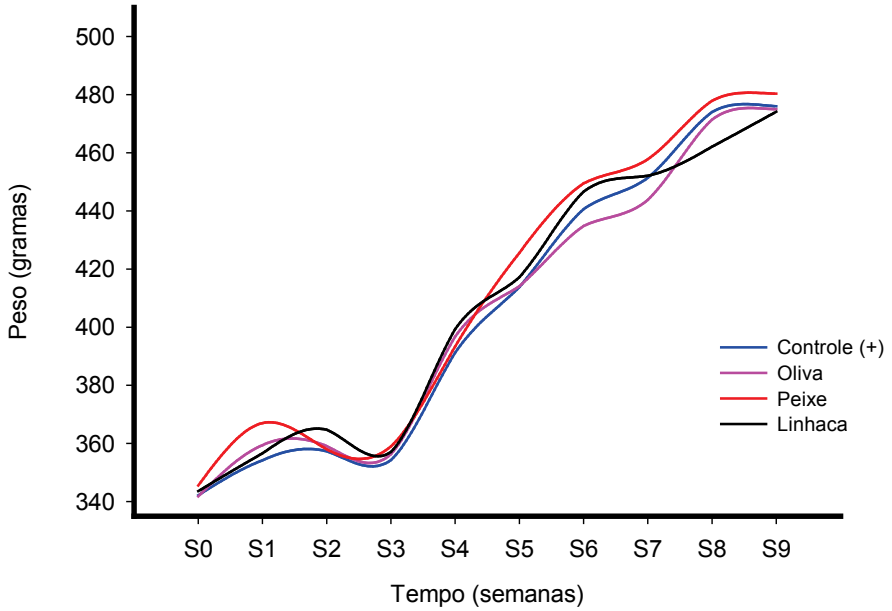


Figura 8 - Evolução do peso semanal de ratos Wistar.
Nota: CTL(-)= controle negativo, sem tratamento com DMH e dieta comercial. CTL (+) = controle positivo (com DMH e dieta AIN-93M com 4% óleo de soja), e os grupos experimentais com tratamento com DMH e dieta AIN-93M contendo 4% de óleo de oliva, peixe e linhaça. As lesões pré-neoplásicas foram induzidas com DMH, 4 aplicações de 40mg/Kg peso na 2ª. e 3ª semana de experimento. O peso foi semelhante (p>0,05) entre os tratamentos.

6.3.1. **Perfil de ácidos graxos nos óleos e tecidos**

A composição dos óleos em relação à concentração de ácidos graxos e a sua relação ω6/ω3 nas dietas oferecidas estão descritas na Tabela 8. A diferença entre as quatro dietas oferecidas aos animais foi notada quanto á sua composição de ácido oléico (18:1ω9), ácido linoléico (18:2ω6), ácido α-linolênico (18:3 ω3), EPA (20:5 ω3) e DHA (22:6 ω3).

Tabela 8 - Concentração de ácidos graxos dos óleos utilizados nas dietas e a relação ω6/ω3.

	Concentrações (%)*			
Ácidos graxos	Óleo de Soja	Óleo de Oliva	Óleo de Peixe	Óleo de linhaça
C14:0	NI	NI	5.86	NI
C15:0	NI	NI	0.22	NI
C16:0	7.75	11.30	10.76	6.45
C17:0	NI	NI	0.50	NI
C18:0	3.01	2.96	3.60	4.35
C20:0	NI	0.38	0.48	NI
C22:0	0.34	0.12	NI	NI
C16:1	NI	1.09	6.60	NI
C18:1 ω9	21.36	74.01	9.98	18.00
C20:1	NI	0.25	1.08	NI
C20:2	NI	NI	3.05	NI
C18:2 ω6	60.75	8.74	2.78	12.71
C20:4 ω6	NI	NI	0.73	NI
C22:2 ω6	NI	NI	0.87	NI
C18:3 ω3	6.96	NI	0.80	58.47
C20:5 ω3	NI	NI	24.01	NI
C22:6 ω3	NI	NI	19.86	NI
Total ω6	60.75	8.74	4.37	12.71
Total ω3	6.93	0.75	44.63	58.47
ω6/ω3	8.77	11.65	0.10	0.22

Perfil lipídico do óleo de soja (Soya, BUNGE®), azeite de oliva (Andorinha®, extra virgem), o óleo de peixe (Galena®) e óleo de linhaça (Cisbra Alimentos®). A identificação dos ésteres metílicos foi realizada por cromatografia gasosa. Os valores são apresentados em g/100g. * NI = não identificado

O perfil de ácidos graxos foi analisado no tecido hepático e adiposo dos animais, e está apresentado nas Tabela 9 e Tabela 10, respectivamente.

No fígado, menor concentração de ácidos graxos saturados foi verificado nos tratamentos em relação ao controle ($p<0,001$). Além disso, maiores níveis de EPA ($p=0,004$) e DHA ($p<0,001$) foi encontrado no grupo tratado com óleo de peixe. O grupo peixe e linhaça apresentaram também menor relação de

PUFA da série ω6/ω3 no tecido hepático, 1,7:1 e 1,9: 1, respectivamente (Tabela 9).

No tecido adiposo intra-abdominal, somente o grupo oliva apresentou menor concentração de AGS em relação ao grupo controle (p=0,04). No grupo peixe e linhaça apresentaram quantidades apreciáveis de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA). Teores mais elevados de ácido linolênico (p=0,003) e EPA (p=0,011) foram encontrados no tecido adiposo do grupo peixe em relação aos demais tratamentos e somente neste grupo foi identificado DHA. A menor relação de PUFA da série ω6/ω3 também encontrada no grupo peixe (9:1), seguido do grupo linhaça (64:1) na gordura intra-abdominal (Tabela 10).

Tabela 9 - Perfil de ácidos graxos no tecido hepático de ratos Wistar submetidos à carcinogênese colorretal*

Ácidos Graxos	Controle (+)	Oliva	Peixe	Linhaça	*p*
C14:0	0,61 ± 0,14	0,64 ± 0,14	0,74 ± 0,26	0,53 ± 0,21	
C17:0	2,60 ± 0,53	3,27 ± 1,55	3,91 ± 0,92	3,88 ± 1,17	
C20:0	20,94 ± 1,58^{a}	5,92 ± 1,11^{b}	5,25 ± 1,41^{b}	10,86 ± 2,59^{c}	*<0,001*
C21:0	1,36 ± 1,14^{ab}	NI	0,41 ± 0,20^{a}	7,43 ± 3,28^{b}	*<0,001*
C23:0	13,79 ± 2,42^{a}	11,79 ± 4,25^{a}	5,69 ± 1,65^{b}	7,20 ± 1,25^{b}	*<0,001*
Total AGS	**39,72 ± 2,41^{a}**	**21,79 ± 4,92^{b}**	**16,12 ± 3,34^{b}**	**29,24 ± 5,38^{c}**	***<0,001***
C15:1	0,29 ± 0,10	NI	0,37 ± 0,01	0,17 ± 0,03	
C16:1	19,96 ± 1,39	20,61 ± 6,13	19,048 ± 5,31	21,99 ± 3,94	
C17:1	0,29 ± 0,15	0,9 ± 0,46	0,84 ± 0,51	0,20 ± 0,01	
C18:1 n9	9,03 ± 1,25	8,60 ± 2,86	8,04 ± 2,64	10,27 ± 2,61	
C20:1	0,45 ± 0,05^{a}	NI	NI	0,18 ± 0,02^{b}	*<0,001*
C22:1 n9	0,42 ± 0,06^{a}	0,55 ± 0,08^{a}	0,77 ± 0,02^{b}	0,48 ± 0,06^{a}	*<0,001*
Total MUFA	**30,49 ± 1,67**	**30,15 ± 7,17**	**28,26 ± 7,51**	**32,98 ± 4,84**	
C18:2 n6	15,65 ± 1,26^{a}	28,28 ± 9,46^{b}	14,68 ± 4,38^{a}	18,59 ± 2,81^{ab}	*0,04*
C18:3 n3	0,25 ± 0,05	0,53 ± 0,22	0,35 ± 0,21	0,21 ± 0,15	
C20:5 n3	0,45 ± 0,35^{a}	NI	9,97 ± 3,37^{b}	6,00 ± 1,42^{ab}	*0,004*
C22:6 n3	3,02 ± 0,48^{a}	1,85 ± 1,15^{a}	10,91 ± 3,14^{b}	4,17 ± 0,53 ^{ab}	*0,002*
Total PUFA	**31,49 ± 9,64**	**20,45 ± 2,09**	**33,84 ± 7,72**	**28,83 ± 1,91**	
Total ω6	15,98	28,87	14,91	18,78	
Total ω3	3,95	3,40	8,71	9,96	
ω6/ω3	4:1	8:1	1,7:1	1,9:1	

*A identificação dos ésteres metílicos foi realizada por cromatografia gasosa. Os valores são apresentados em g/100g. NI = não identificado ^{abc} ANOVA ou Teste t. Valores (média ± DP) seguidos da mesma letra, na linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 10 - Perfil de ácidos graxos da gordura intra-abdominal de ratos Wistar submetidos à carcinogênese colorretal*

Ácidos Graxos	Controle (+)	Oliva	Peixe	Linhaça	*p*
C14:0	1,41 ± 0,14^{a}	1,33 ± 0,14^{a}	2,91 ± 0,30^{b}	1,51 ± 0,10^{a}	*<0,001*
C15:0	0,10 ± 0,025^{ab}	0,09 ± 0,006^{ab}	0,13 ± 0,012^{a}	0,08 ± 0,007^{b}	*<0,01*
C18:0	0,23 ± 0,04^{a}	0,26 ± 0,01^{ab}	0,31 ± 0,05^{b}	0,26 ± 0,03^{ab}	*0,045*
C20:0	25,41 ± 2,77^{a}	8,86 ± 1,13^{bc}	7,04 ± 1,39^{b}	12,00 ± 1,94^{c}	*<0,001*
C21:0	1,86 ± 0,14^{ab}	0,24 ± 0,10^{a}	0,55 ± 0,22^{a}	11,19 ± 2,89^{b}	*0,001*
C22:0	0,23 ± 0,05	NI	0,35 ± 0,07	0,30 ± 0,2	
C23:0	0,20 ±0,03 ^{ab}	N	0,26 ± 0,04^{a}	0,12 ± 0,01^{b}	*0,037*
C24:0	NI	0,10 ± 0,04	0,04 ± 0,008	0,03 ± 0,02	
Total AGS	**30,05 ± 10,80^{a}**	**13,14 ± 4,15^{b}**	**17,16 ± 6,93^{ab}**	**30,15 ± 6,48^{a}**	***0,017***
C15:1	0,23 ± 0,03^{a}	0,20 ± 0,02^{a}	0,33 ± 0,06^{b}	0,24 ± 0,01^{a}	*<0,001*
C16:1	23,85 ± 1,28^{a}	23,06 ± 1,40^{a}	22,18 ± 1,44^{b}	24,29 ± 1,56^{a}	*<0,001*
C17:1	0,17 ± 0,02^{a}	0,15 ± 0,01^{a}	0,27 ± 0,05^{b}	0,17 ± 0,02^{a}	*<0,001*
C18:1 n9	3,14 ± 0,36^{ab}	1,31 ± 0,62^{a}	5,05 ± 0,27^{b}	4,05 ± 0,75^{ab}	*0,025*
C20:1	0,52 ± 0,87	NI	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	
Total MUFA	**27,30 ± 3,02**	**24,05 ± 0,19**	**28,86 ± 3,57**	**27,19 ± 3,35**	
C18:2 n6	30,95 ± 1,71	NI	32,95 ± 4,47	36,71 ± 4,03	
C18:3 n6	0,08 ± 0,03	NI	0,10 ± 0,02	0,08 ± 0,01	
C18:3 n3	0,28 ± 0,02^{a}	0,30 ± 0,02^{a}	1,33 ± 0,21^{b}	0,19 ± 0,04^{a}	*0,003*
C20:5 n3	NI	NI	1,06 ± 0,38 ^{a}	0,16 ± 0,001^{b}	*0,026*
C22:6 n3	NI	NI	1,31 ± 0,75	NI	
Total PUFA	**24,86 ± 13,89**	**11,69 ± 5,45**	**36,89 ± 3,76**	**37,16 ± 4,00**	
Total ω6	31,06	28,28	33,02	36,85	
Total ω3	0,27	0,3	3,63	0,57	
ω6/ω3	115:1	93:1	9:1	64:1	

*A identificação dos ésteres metílicos foi realizada por cromatografia gasosa. Os valores são apresentados em g/100g. NI = não identificado. ^{abc} ANOVA ou Teste t. Valores (média ± DP) seguidos da mesma letra, na linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade

6.3.2. **Contagem de FCA na mucosa do cólon**

A presença de FCA na mucosa colônica dos roedores tratados com o carcinógeno (DMH) é um indicativo da eficácia no processo de indução das lesões pré-neoplásicas. Não foi encontrada diferença no número de FCA entre os grupos alimentados com as diferentes fontes lipídicas (p>0,05). No entanto, os dados nos mostram uma tendência de menor número de FCA na porção proximal, medial e distal no grupo alimentado com óleo de peixe, quando comparado com os demais tratamentos (Figura 9).

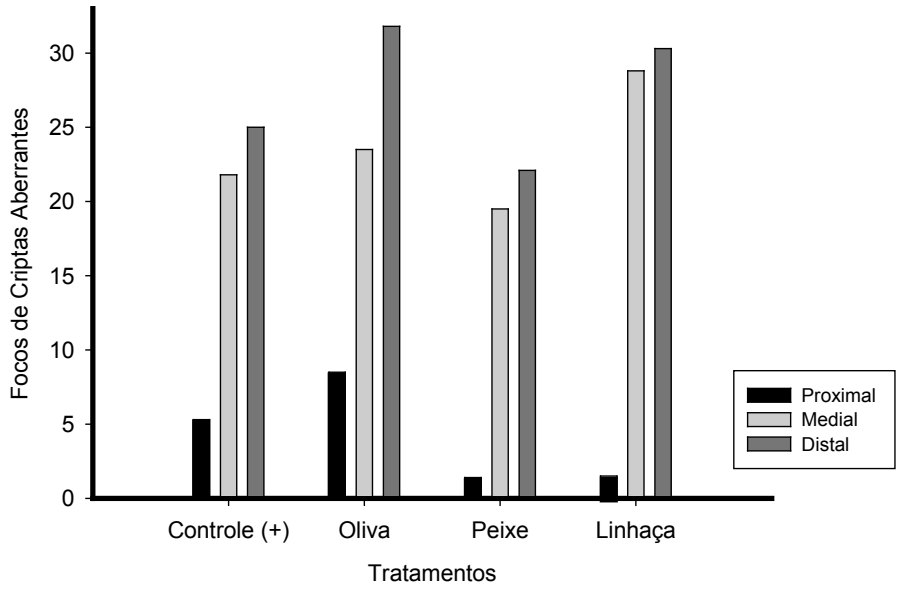


Figura 9 - Valores médios do número de FCA na mucosa colônica de ratos Wistar tratados com as diferentes fontes lipídicas.
Teste Tukey (p>0,05)

Ao categorizarmos a incidência de FCA em ≤ 3 ou > 3 também não verificamos diferenças entre os tratamentos (p>0,05), mas ainda se mantém a tendência de menor formação de pré-lesões neoplásicas no grupo peixe. (Figura 10).

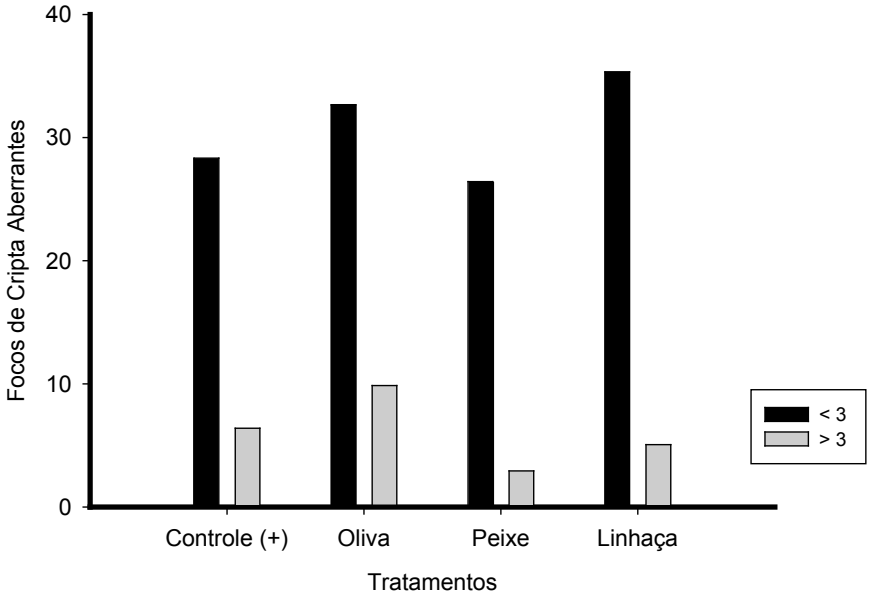


Figura 10 - Valores médios de FCA na mucosa colônica de ratos Wistar categorizados em ≤ 3 ou > 3 FCA, tratados com as diferentes fontes lipídicas (n=5). Tukey (p>0,05).

6.3.3. **Concentração de aminas bioativas no fígado**

Foram detectadas no tecido hepático dos roedores a presença das aminas bioativas espermidina, espermina e histamina. A putrescina, que é o precursor das poliaminas, não foi detectada no fígado dos animais. A espermina foi mais prevalente entre os grupos, mas não diferiu entre os tratamentos (p>0,05). O grupo oliva apresentou menores níveis de espermidina (p=0,008). Os níveis hepáticos de histamina não diferiram entre os tratamentos (p>0,05), Tabela 11.

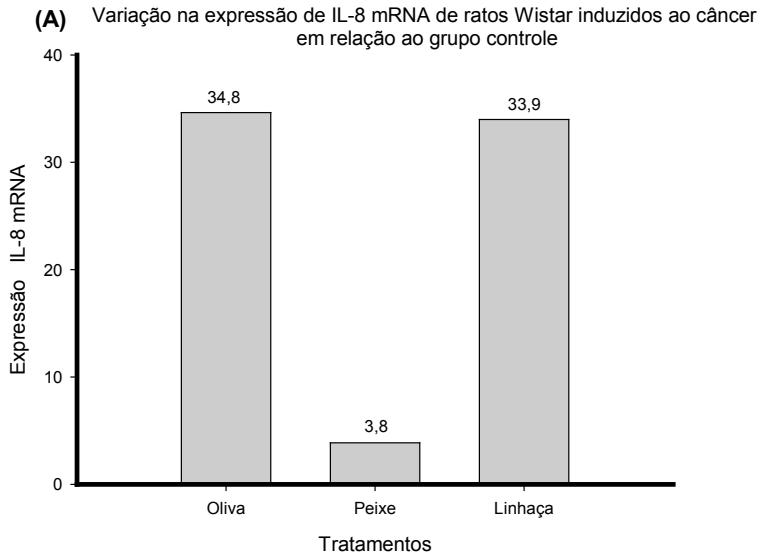
Tabela 11-Tipos e teores de aminas bioativas no tecido hepático de ratos Wistar alimentados com diferentes fontes lipídicas tratados com carcinógeno.

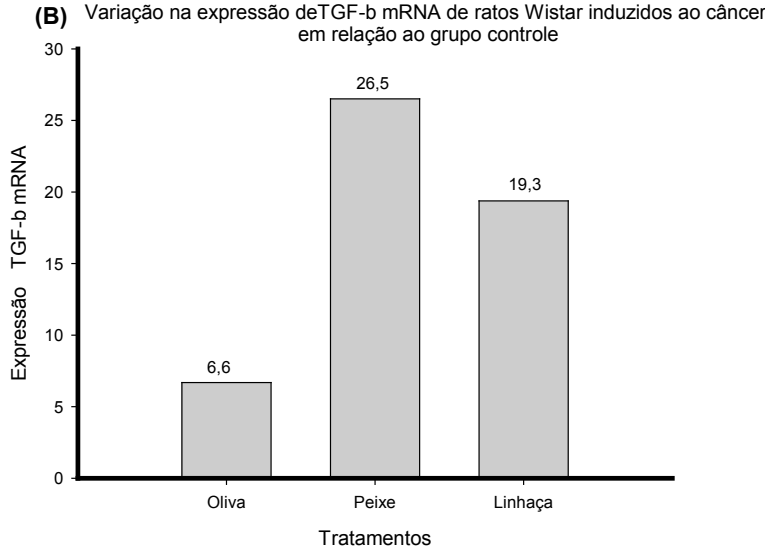
		Concentração de aminas (µg/mL)			
	n	Controle	Oliva	Peixe	Linhaça
Espermidina	10	24,49± 2,81[ab]	21,86 ±3,32[b]	29,40 ± 5,20[a]	28,45 ± 7,60[a]
Espermina	10	35,16 ± 3,71	32,96 ± 3,97	31,057 ± 4,14	35,79 ± 8,96
Histamina	10	0,242 ± 0,06	0,1 ± 0,13	0,148 ± 0,20	0,129 ± 0,13

[ab] Valores (média ± DP) seguidos da mesma letra, na linha, não diferem significativamente entre si, pelo Teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

6.3.4. **Mediadores inflamatórios**

Após 6 semanas da última aplicação de DMH, os mediadores do processo inflamatório foram analisados no cólon distal. Quando avaliado o perfil inflamatório dos roedores induzidos ao câncer, observou-se que não houve diferença na expressão de IL-8 (Figura 11 A), TGF-β (Figura 11 B) e MCP-1 (Figura 11C) em relação ao controle + (p>0,05). Ao se avaliar comparativamente a expressão das citocinas, verificamos que o grupo peixe expressou duas vezes mais TGF-β e oito vezes menos IL-8 em relação aos demais tratamentos. Os dados estão representados na Figura 11.





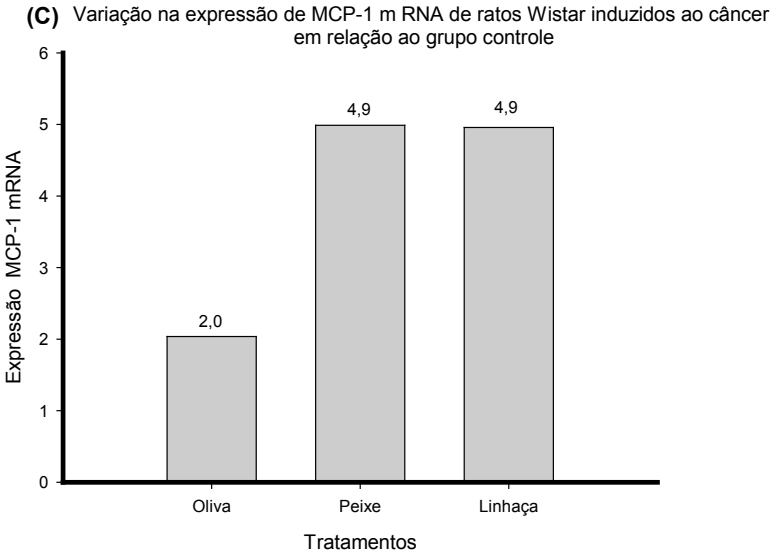


Figura 11 - Variação na expressão de mediadores inflamatórios. IL-8, TGF-β e MCP-1 na mucosa colônica de ratos Wistar tratados com diferentes fontes lipídicas e tratados com carcinógeno. O gráfico representa a média dos grupos em relação ao grupo controle + (n=5). Teste Tukey, p>0,05

6.4. Discussão

Apesar de vários estudos epidemiológicos evidenciarem a relação entre incidência de câncer de cólon e fatores dietéticos, a compreensão sobre os mecanismos moleculares e fisiológicos dos nutrientes e compostos bioativos dos alimentos ainda é incipiente no processo de carcinogênese. Os óleos constituíram nosso elemento de estudo uma vez que, apresentam em sua composição, importantes ácidos graxos que são objeto de estudo em humanos e modelo animal por exercerem efeitos quimiopreventivos na carcinogênese colorretal.

Existem muitas diferenças nos padrões de ingestão lipídica entre populações e nos diversos estudos experimentais. Ainda não temos dados suficientes para estabelecer o melhor nível de consumo dos ácidos graxos de acordo com as funções que desempenham no organismo, e até mesmo, de acordo com seu efeito protetor na carcinogênese do cólon. Para esse fim, utilizamos roedores tratados com DMH por constituir um modelo experimental facilmente reprodutível. Nestes animais, investigamos se dietas normolipídicas, à base de diferentes óleos em uma proporção 4g/100g seria capazes de exercer algum efeito quimiopreventivo, uma vez que, na literatura, encontramos muitos trabalhos que mostram os efeitos quimiopreventivos destas fontes lipídicas, em quantidades de suplementação.

Neste estudo, buscou-se investigar os efeitos dos diferentes óleos na formação de lesões pré-neoplásicas. Os animais induzidos ao câncer não diferiram em relação ao controle (+) quanto ao crescimento e desenvolvimento. Este fato pode ser explicado pelo curto período experimental, insuficiente para alterar o apetite e levar às alterações metabólicas no peso e na composição corporal. Dwivedi *et al*.,(2003), também não encontraram diferença no ganho de peso e coeficiente de eficácia alimentar em ratos induzidos ao câncer e alimentados com diferentes fontes lipídicas. Segundo Machado *et al*.(2004), alterações na composição estrutural foram verificadas em aproximadamente 80% dos animais com câncer no estágio avançado da doença. Em nosso trabalho, com 6 semanas após a administração da última dose da droga, os animais estavam em estágio de lesões pré-neoplásicas, fase na qual a composição corporal ainda não havia sido afetada.

Os lipídios da dieta foram incorporados no tecido hepático e na gordura intra-abdominal, mostrando a influência direta da dieta no padrão dos ácidos graxos presentes nos tecidos. Os óleos poliinsaturados da série ·3 (peixe) favoreceu a menor incorporação de ácidos graxos saturados nos tecidos. No fígado, órgão central do metabolismo dos lipídios e sítio metabólico de moléculas relacionadas ao processo inflamatório, foi encontrado maiores níveis de EPA e DHA no grupo que recebeu dieta com óleo de peixe, sendo coerente com o perfil de ácidos graxos ingerido. O DHA e o EPA podem interferir no sistema imune competindo com o ácido araquidônico (AA) no metabolismo da cicloxigenase na membrana celular, inibindo a síntese de eicosanóides pró-inflamatórios (Calder, 2009), atuando assim, como um protetor à iniciação da lesão neoplásica. No tecido adiposo, maiores concentrações de α-linolênico e EPA também foram encontrados no grupo tratado com óleo de peixe.

A utilização de carcinógenos químicos como a DMH aumenta a taxa de proliferação de criptas (Rosenberg *et al.*, 2009). Os óleos testados não apresentaram efeito protetor quando comparado com o controle quanto a formação de pré-lesões neoplásicas. No entanto, cabe ressaltar uma tendência de menor formação de FCA no grupo peixe, mesmo quando categorizado pela multiplicidade. Em adição, o grupo peixe expressou duas vezes mais TGF-β, importante citocina anti-inflamatória e oito vezes menos IL-8, uma citocina pró-inflamatória, em relação aos demais tratamentos, fato que possivelmente corroborou para a menor incidência observada de FCA neste grupo. Como são lesões pré-neoplásicas, não é possível inferir se o óleo de peixe poderá exercer um efeito protetor na carcinogênese, entretanto, um maior período experimental elucidar os mecanismos preventivos do óleo de peixe.

Segundo Van Beelen *et al*.(2009), a incidência de tumor no cólon quimicamente induzido é significativamente menor em ratos que receberam dieta enriquecida com óleo de peixe em relação ao que receberam gordura saturada ou dieta enriquecida com óleos vegetais, após a indução do câncer colorretal. Moreira *et al*.,(2009) verificaram que dieta enriquecida com óleo de peixe (18%), por 36 semanas, reduziu significativamente a incidência de FCA em ratos após a indução do câncer do DHM. Da mesma forma, Williams *et al*.,(2007) verificaram que a dieta contendo óleo de linhaça (20%) por 13 semanas reduziu a incidência de FCA em ratos Fischer 344. Nossos resultados

mostram ratos induzidos ao câncer e alimentados com 4% de óleo de peixe (recomendação AIN96-M), por 6 semanas após a administração com carcinógeno, não apresentaram diferenças estatísticas no número do FCA na mucosa colônica. Um maior período experimental poderia nos responder se a tendência de menor formação de FCA verificada no grupo peixe poderia proteger a mucosa do processo da carcinogênese.

Com o tratamento do carcinógenos para indução de lesões pré-neoplásicas, algumas vias bioquímicas são alteradas para sustentar a alta proliferação celular das células tumorais. A biossíntese de poliaminas constitui uma importante via, e geralmente encontra-se aumentada 3-4 vezes em relação à mucosa normal. A inibição da biossíntese destas aminas tem sido utilizada como estratégia de tratamento do câncer (Milovic e Turchanowa, 2003). Em nosso trabalho, a espermina é a amina presente em maior concentração no tecido hepático em todos os grupos. A espermidina foi encontrada em maiores níveis no grupo tratado com oliva e pequenas quantidades de histamina foram identificadas. Segundo Stonehan *et al.*,(2000) o azeite de oliva exerce um efeito protetor no câncer de cólon por influenciar os padrões dos ácidos biliares secundários presentes no cólon e conseqüentemente, influencia o enterócitos colônicos, reduzindo a progressão da mucosa normal para adenoma e carcinoma (Stoneham *et al.*, 2000). Um estudo com ratos induzidos ao câncer com DMH e alimentados com dieta pobre em poliaminas resultou em significante redução na proliferação de FCA na mucosa do cólon (Duranton *et al.*, 1997). As poliaminas tem se mostrado essenciais para a manutenção das taxas de crescimento ideais e da diferenciação celular, e em altas concentrações, favorece o rápido crescimento de células e tecidos (Stoneham *et al.*, 2000).

Nesse estudo, foram avaliados mediadores com ação pró e antiinflamatória. A síntese de citocinas constitui uma das formas de ação do sistema imunológico. Na mucosa do cólon dos roedores induzidos a lesões pré-neoplásicas, o grupo peixe expressou e oito vezes menos IL-8 mRNA em relação aos demais tratamentos. A IL-8 é originalmente identificada como um fator quimiostático de neutrófilos, e sua expressão têm sido relacionados a vários tipos de câncer, como o câncer de cólon (Xie, 2001). A IL-8 participa da ativação do sistema imune, agindo em favor da invasão, disseminação

metastática das células malignas e aumento da angiogênese do tumor em crescimento (Chavey *et al.*, 2008). Cacev *et al*. (2008) encontraram significante aumento de IL-8 mRNA no tumor quando comparado com a mucosa normal em humanos e *in vitro* Além disso, o grupo tratado com óleo de peixe apresentou maiores níveis hepáticos de EPA e DHA. No tecido adiposo destes animais, maiores níveis foram encontrados de ácido linolênico e EPA. Estes, são ácidos graxos importantes relacionados à via anti-inflamatória, favorecem a síntese de eicosanóides anti-inflamatórios, que corroboram com estes resultados. Segundo Berquin *et al*.(2008) os efeitos supressores nos tumores pelos PUFA da série ω3 de origem marinha (EPA e DHA) são consistentemente verificados em modelos animais.

O TGF-β, em geral, inibe o crescimento de células do epitélio intestinal normal, mas pode mudar para um estimulador de crescimento com a progressão do tumor, aumentando a transformação maligna. Nos estágios mais avançados do desenvolvimento tumoral, o TGF-β é ativamente secretado pelas células tumorais ou células do estroma e contribui para o crescimento celular, invasão e metástase, e diminui a resposta imune anti-tumor (Evans *et al.*, 2006). Há uma diversidade de células que respondem ao TGF-β no microambiente tumoral, o que resulta em uma rede complexa de fatores que regulam a iniciação, progressão e metástase do câncer. Em nosso trabalho, grupo peixe expressou duas vezes mais TGF-β mRNA em relação aos demais tratamentos. Nesta fase preliminar da carcinogênese colorretal, a maior expressão deste marcador constitui um importante fator de proteção. Segundo Macarthur *et al*.(2005) roedores knocout para o gene TGF-β, apresentam uma inflamação intestinal descontrolada.

O MCP-1 é um dos mais potentes fatores de recrutamento de macrófagos, produzido por células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas e monócitos/macrófagos (Hsieh *et al.*, 2001). É produzida por uma grande variedade de tumores e há evidências que desempenha um importante papel em células imunes infiltrantes no tecido tumoral (Yang *et al.*, 2006). Em nosso trabalho, o óleo de oliva, peixe e linhaça não apresentaram expressão diferenciada de MCP-1mRNA em relação ao grupo controle (+). A presença de MCP-1 e conseqüentemente de macrófagos pró-inflamatórios no tumor podem contribuir para a angiogênese e aumento de citocinas associadas à inflamação,

como IL-8. Bailey *et al*.(2007) avaliaram se o MCP-1 contribui para a progressão do câncer colorretal e a sua influência no número e distribuição de tumores associados a macrófagos, em pacientes com adenocarcinoma colorretal. Verificaram uma maior expressão desta quimiocina com a evolução do tumor.

Em estudo similar, Camuesco *et al*.(2005) avaliaram o efeito do óleo de soja, oliva e oliva associado ao óleo de peixe nas mesmas concentrações que utilizamos (4g/100g) em ratos Wistar induzidos à doença inflamatória intestinal. Os animais alimentados com azeite de oliva apresentaram menor resposta inflamatória quando comparado com grupo controle (óleo de soja) e, este efeito benéfico foi potencializado após a suplementação com ω3 (óleo de oliva adicionado com óleo de peixe).

No presente trabalho, os óleos utilizados (soja, oliva, peixe e linhaça) apresentaram diferenças quanto à incorporação dos ácidos graxos nos tecido hepático e intra-abdominal, quanto à presença e teores de aminas bioativas hepáticas, influenciando diferentemente a formação de FCA e a expressão de mediadores inflamatórios. Os resultados sugerem que, dietas à base de diferentes óleos, contendo o teor de lipídios recomendados pela AIN-93M podem influenciar o processo inflamatório e a evolução da carcinogênese colorretal induzida em roedores. Além disso, os efeitos quimioprotetores do câncer de cólon foram verificados nas fontes lipídicas fontes de ácido linolênico, EPA e DHA, em especial o óleo de peixe.

6.5. Conclusão

Óleos ricos em ácidos graxos poliinsaturados, em especial o óleo de peixe, induziram uma resposta diferenciada na prevenção de lesões pré-neoplásicas. Os ácidos graxos presentes nas fontes lipídicas como α-linolênico, EPA e DHA apesar de pertencerem ao mesmo grupo ômega 3, apresentam uma ação metabólica diferenciada em relação à incorporação nos tecidos, à formação de pré-lesões neoplásicas e à expressão de citocinas inflamatórias no cólon. Há necessidade de maiores estudos sobre esses ácidos graxos separadamente, para melhor manipulação dietética desses óleos ou alimentos fonte, visando efeito quimiprotetor nas lesões pré-neoplásicas no cólon.

6.6. Referências

BAILEY, C.; NEGUS, R.; MORRIS, A.; ZIPRIN, P.; GOLDIN, R.; ALLAVENA, P.; PECK, D.; DARZI, A. Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. *Clinical and Experimental Metastasis*, v. 24, n. 2, p. 121-130, 2007.

BERQUIN, I. M.; EDWARDS, I. J.; CHEN, Y. Q. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Letters*, v. 269, n. 2, p. 363-377, 2008.

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

CACEV, T.; RADOSEVIC, S.; KRIZANAC, S.; KAPITANOVIC, S. Influence of interleukin-8 and interleukin-10 on sporadic colon cancer development and progression. *Carcinogenesis*, v. 29, n. 8, p. 1572-1580, 2008.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*, v. 91, n. 6, p. 791-795, 2009.

CAMUESCO, D.; GALVEZ, J.; NIETO, A.; COMALADA, M.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E.; CONCHA, A.; XAUS, J.; ZARZUELO, A. Dietary Olive Oil Supplemented with Fish Oil, Rich in EPA and DHA (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids, Attenuates Colonic Inflammation in Rats with DSS-Induced Colitis. *Journal of Nutrition*, v. 135, n. 4, p. 687-694, 2005.

CARSON, F. L.; MARTIN, J. H.; LYNN, J. A. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 59, p. 365-373, 1973.

CHAVEY, C.; MÜHLBAUER, M.; BOSSARD, C.; FREUND, A.; DURAND, S.; JORGENSEN, C.; JOBIN, C.; LAZENNEC, G. Interleukin-8 Expression Is Regulated by Histone Deacetylases through the Nuclear Factor-κB Pathway in Breast Cancer. *Molecular Pharmacology*, v. 74, n. 5, p. 1359-1366, November 2008 2008.

COBEA. Ethical Priniples for the use of laboratory animals. *Brazilian College on Animal Experimentation*, 2009.

DE DOSSO, S.; SESSA, C.; SALETTI, P. Adjuvant therapy for colon cancer: Present and perspectives. *Cancer Treatment Reviews*, v. 35, n. 2, p. 160-166, 2009.

DURANTON, B.; NSIEMVO, E.; SCHLEIFFER, R.; GOSSE, F.; GALLUSER, M.; RAUL, F. Suppression of preneoplasic changes in the intestine of rats fed low levels of polyamines. *Cancer Research*, v. 57, p. 573-575, 1997.

DWIVEDI, C.; MULLER, L. A.; GOETZ-PARTEN, D. E.; KASPERSON, K.; MISTRY, V. V. Chemopreventive effects of dietary mustard oil on colon tumor development. *Cancer Letters*, v. 196, n. 1, p. 29-34, 2003.

EVANS, C.; DALGLEISH, A. G.; KUMAR, D. Review article: immune suppression and colorectal cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 24, n. 8, p. 1163-1177, 2006.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 226, n. 1, p. 497 - 509, 1957.

GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A. S. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. *Revista de Nutrição*, v. 19, p. 611-621, 2006.

HARTMANN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices*, v. 22, p. 475-477, 1973.

HSIEH, C.-S.; HUANG, C.-C.; WU, J.-J.; CHAUNG, H.-C.; WU, C.-L.; CHANG, N.-K.; CHANG, Y.-M.; CHOU, M.-H.; CHUANG, J.-H. Ascending cholangitis provokes IL-8 and MCP-1 expression and promotes inflammatory cell infiltration in the cholestatic rat liver. *Journal of Pediatric Surgery*, v. 36, n. 11, p. 1623-1628, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2010.

ITOH, Y.; JOH, T.; TANIDA, S.; SASAKI, M.; KATAOKA, H.; ITOH, K.; OSHIMA, T.; OGASAWARA, N.; TOGAWA, S.; WADA, T.; KUBOTA, H.; MORI, Y.; OHARA, H.; NOMURA, T.; HIGASHIYAMA, S.; ITOH, M. IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine*, v. 29, n. 6, p. 275-282, 2005.

KANNA, P. S.; MAHENDRAKUMAR, C. B.; CHAKRABORTY, T.; HEMALATHA, P.; BANERJEE, P.; CHATTERJEE, M. Effect of vanadium on colonic aberrant crypt foci induced in rats by 1,2 Dimethyl hydrazine. *World Journal of Gastroenterology*, v. 9, n. 5, p. 1020-1027, 2003.

LARANGEIRA, L. L. S.; TAHA, M. O.; 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 Cirurgica Brasileira*, v. 13, 1998.

LEE, J.-S.; BOK, S.-H.; JEON, S.-M.; KIM, H.-J.; DO, K.-M.; PARK, Y.-B.; CHOI, M.-S. Antihyperlipidemic effects of buckwheat leaf and flower in rats fed a high-fat diet. *Food Chemistry*, v. 119, n. 1, p. 235-240, 2010.

MACHADO, A.; COSTA ROSA, L.; SEELAENDER, M. Adipose tissue in Walker 256 tumor-induced cachexia: possible association beetwen decrease leptin concentration and mononuclear cell infiltration. *Cell and Tissue Research*, v. 308, n. 3, p. 503-14, 2004.

MANTOVANI, A.; PIEROTTI, M. A. Cancer and inflammation: A complex relationship. *Cancer Letters*, v. 267, n. 2, p. 180-181, 2008.

MARTINS, J. M.; GRUEZO, N. D. Ácido graxo w-6 na etiologia do câncer e reto. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 55, n. 1, p. 69-74, 2009.

MILOVIC, V.; TURCHANOWA, L. Polyamines and colon cancer. *Biochemical Society Transactions*, v. 31, n. 2, p. 381-383, 2003.

MOREIRA, A. P. B.; SABARENSE, C. M.; DIAS, C. M. G. C.; LUNZ, W.; NATALI, A. J.; GLÓRIA, M. B. A.; PELUZIO, M. C. G. Fish oil ingestion reduces the number of aberrant crypt foci and adenoma in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 42, p. 1167-1172, 2009.

PITTS, G.; USHAKOV, A.; PACE, N.; SMITH, A.; RAHLMANN, D.; SMIRNOVA, T. Effects of weightlessness on body composition in the rat. *Am J Physiol* v. 244, n. 3, p. 332-7, 1983.

RAJU, J. Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: Relevance in studying chemoprevention of colon cancer. *Word Journal of Gastroenterology*, v. 14, n. 43, p. 6632-6635, 2008.

RAO, C. V.; HIROSE, Y.; INDRANIE, C.; REDDY, B. S. Modulation of Experimental Colon Tumorigenesis by Types and Amounts of Dietary Fatty Acids. *Cancer Research*, v. 61, n. 5, p. 1927-1933, 2001.

REDDY, B. S. Dietary fat and colon cancer: Animal models. *Preventive Medicine*, v. 16, n. 4, p. 460-467, 1987.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing commitee ond the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

ROSENBERG, D. W.; GIARDINA, C.; TANAKA, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 30, n. 2, p. 183-196, 2009.

STONEHAM, M.; GOLDACRE, M.; SEAGROATT, V.; GILL, L. Olive oil, diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *Journal of Epidemiology and Community Health*, v. 54, n. 10, p. 756-760, 2000.

VALE, S. R.; GLORIA, M. B. Determination of biogenic amines in cheese. *Journal of AOAC International*, v. 80, p. 1006-1012, 1997.

VAN BEELEN, V. A.; SPENKELINK, B.; MOOIBROEK, H.; SIJTSMA, L.; BOSCH, D.; RIETJENS, I. M. C. M.; ALINK, G. M. An n-3 PUFA-rich microalgal oil diet protects to a similar extent as a fish oil-rich diet against AOM-induced colonic aberrant crypt foci in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 2, p. 316-320, 2009.

WALLACE, H. M.; CASLAKE, R. Polyamines and colon cancer. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, v. 13, p. 1033-39, 2001.

WILLIAMS, D.; VERGHESE, M.; WALKER, L. T.; BOATENG, J.; SHACKELFORD, L.; CHAWAN, C. B. Flax seed oil and flax seed meal reduce the formation of aberrant crypt foci (ACF) in azoxymethane-induced colon cancer in Fisher 344 male rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, n. 1, p. 153-159, 2007.

XIE, K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 12, n. 4, p. 375-391, 2001.

YANG, C.; CHEN, D.; HUANG, K.; ZHANG, H.; XU, D.; TIAN, Y.; ZHANG, J. The expression of chemokine MCP-1 in colorectal carcinoma and its relationship to the infiltration of macrophage. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, v. 5, n. 5, p. 343-346, 2006.

7. ARTIGO III

Perfil lipídico e marcadores histológicos de ratos Wistar induzidos a lesões pré-neoplásicas e tratados com diferentes fontes lipídicas na dieta.

Palavras chaves: câncer cólon, óleo de peixe, óleos vegetais, morfometria intestinal, linfócitos.

Abreviaturas: CCR= câncer colorretal; AGS= Ácidos graxos saturados; PUFA= ácidos graxos poliinsaturados; EPA= ácido eicosapentanóico; DHA= ácido docosahexanóico; AL= ácido linolênico; ALA= ácido -linolênico; AA= ácido araquidônico;COX= ciclooxigenase; LOX= lipoxigenase; PG= prostaglandinas; LT= leucotrieno; DMH= dimetilhidrazina; GALT= sistema imune associado a mucosa.

Suporte Financeiro: FAPEMIG, CAPES – Brasil

Introdução: Os fatores nutricionais, em especial a quantidade e o tipo de gordura ingerida, estão associados com doenças gastrointestinais, como o câncer de cólon. Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) da série ω6 aumentam a inflamação e favorecem a evolução da carcinogênese e os PUFA da série ω3 estão relacionados à redução deste risco.

Objetivo: Investigar a influência de diferentes óleos (oliva, peixe e linhaça) no perfil lipídico, preservação das vilosidades intestinais e migração de linfócitos na mucosa intestinal de ratos Wistar induzidos a lesões pré-neoplásicas.

Métodos: Ratos Wistar receberam 4 injeções subcutâneas de DMH (40mg/Hg peso) e foram alimentados com dietas normolipídicas contendo 4% de óleo de soja (controle+),oliva, peixe e linhaça. O grupo controle (-) não foi tratado com carcinógeno e recebeu dieta comercial. Após a eutanásia, o soro, tecido hepático, gordura intra-abdominal e fezes do ceco foram removidas para análise do perfil lipídico. A porção ileal foi utilizada para as análises histológicas.

Resultados: O grupo alimentado com óleo de peixe apresentou maiores níveis de EPA (p=0,004) e DHA (p<0,001) no fígado e maiores níveis ácido linolênico (p=0,003) e EPA (p=0,011) na gordura intra-abdominal em relação aos demais tratamentos. Nestes tecidos, menor relação ω6/ω3 foi verificada nos grupos alimentados com óleos poliinsaturados (peixe e linhaça)**.** Maiores níveis de ácido α-linolênico foi excretado pelo grupo linhaça (p=0,014). O grupo alimentado com óleo de peixe apresentou menor deposição de linfócitos na mucosa ileal (p<0,001), perfil semelhante a semelhante a mucosa normal. A análise morfométrica mostrou que os tratamentos apresentaram altura de vilosidade, profundidade de cripta e largura de vilosidade menores que o controle+ (p<0,001).

Conclusão: As diferentes fontes lipídicas apresentam uma incorporação diferenciada dos ácidos graxos no tecido hepático e adiposo. O grupo peixe apresentou menor migração de linfócitos na mucosa intestinal em função do efeito modulador da resposta inflamatória proveniente da maior incorporação de PUFA da série ω3 nos tecidos deste grupo. A análise morfométrica mostrou que os óleos testados não influenciaram positivamente na preservação da mucosa intestinal dos roedores induzidos ao câncer.

7.1. Introdução

O Câncer Colorretal (CCR) é a principal causa de morbidade e mortalidade entre as doenças gastrointestinais. Consiste em um dos cânceres mais freqüentes, sendo a segunda principal causa de morte por câncer entre homens e o terceiro entre as mulheres, nos Estados Unidos (Calzolari *et al.*, 2009). No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), para o ano de 2010 são esperados 28 mil novos casos de câncer de cólon e reto, sendo o quarto tipo de câncer mais incidente (Instituto Nacional De Câncer, 2010).

A ocorrência do CCR está fortemente associada a fatores nutricionais, e as recomendações têm sido estabelecidas para encorajar a população a mudar seus hábitos alimentares (Moreira *et al.*, 2009). A gordura ingerida na dieta tem sido considerada o mais importante constituinte nutricional que influencia o desenvolvimento do câncer cólon, sendo importante o tipo e a quantidade consumida (Rao *et al.*, 2001).

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) da série ω6, encontrados nos óleos vegetais, como óleo de soja, milho e girassol (Russo, 2009) estão presentes em grandes concentrações nas dietas ocidentais e a ingestão predominante deste tipo de lipídio pode contribuir para o desenvolvimento do câncer (Ravasco *et al.*, 2009). Dietas ricas em óleo de milho ou outras fontes de PUFA da série ω6 aumentam a inflamação e favorecem a evolução da carcinogênese (Kuratko, 2000). Recentemente, Murff *et al.*,(2009) avaliaram, prospectivamente, a associação entre a ingestão de ácidos graxos poliinsaturados e câncer colorretal em uma coorte de 73.242 mulheres chinesas e verificaram que o consumo de uma dieta com uma alta relação ω6/ω3 foi fortemente associada ao maior risco de câncer colorretal.

Estudos sugerem que o elevado consumo de peixe está associado com a redução do risco de CCR (Cheng *et al.*, 2003; Llor *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2009). Tem sido sugerido que estes efeitos benéficos estão relacionados aos PUFA da série ω3, em especial o ácido eicosapentanóico (EPA 20:5 ω3) e ácido docosahexanóico (DHA 22:6 ω3), presentes nos pescados de águas geladas e profundas. Em países onde há um com consumo elevado de peixes, como Groelândia e Japão são relatadas baixas incidências de câncer de cólon. Além disso, estudos *in vivo* e em roedores mostram os efeitos quimiopreventivos de uma dieta rica em óleo de peixe em comparação com

outros óleos, tal como o óleo de milho. Evidências sugerem que estes compostos são capazes de reduzir a transição dos tumores de adenomas à carcinomas, apesar destes mecanismos desta ação anticancerígena ainda não estarem totalmente esclarecidos (Nina *et al.*, 2009).

Os PUFA da série ω3 são constituídos principalmente pelo ácido α-linolênico (ALA 18:3 ω3), presente em vários óleos vegetais, tais como óleo de linhaça, canola e soja, pelo EPA e DHA presentes em óleos de peixes de águas profundas e algas marinhas (Russo, 2009).

Os PUFA das séries ω3 e ω6 são essenciais (Gurr *et al.*, 2002) e são utilizados como substratos para a produção de eicosanóides (He, 2009). Apresentam uma natureza competitiva, em que cada ácido graxo pode interferir no metabolismo do outro, apresentando implicações nutricionais (Garófolo e Petrilli, 2006). O consumo elevado de LA favorece o aumento do conteúdo de ácido araquidônico (AA) nos fosfolipídios das membranas celulares, aumentando, conseqüentemente, a produção de prostaglandina (PG) E_2 e leucotrieno (LT) B_4, por meio das vias enzimáticas da ciclooxigenase (COX) e 5-lipoxigenase (5-LOX), respectivamente (Hirayama *et al.*, 2006). Por outro lado, o consumo de alimentos fonte de ALA, como o óleo de peixe, faz com que seja introduzido EPA nos fosfolipídeos de membrana, o que inibe o metabolismo do AA promovendo a formação de PGE_3, em vez de PGE_2, e LTB_5, em vez de LTB_4, que são mediadores inflamatórios menos ativos (Garófolo e Petrilli, 2006; Spencer *et al.*, 2009). O ALA pode ser metabolicamente convertido em outros ácidos graxos de cadeia longa da série ω3, como o EPA e o DHA. No entanto, a conversão enzimática entre as espécies varia consideravelmente, sendo insuficiente em humanos (Arterburn *et al.*, 2006). Acredita-se aproximadamente 5 - 10% de ALA é convertido em EPA e 2 - 5% pode ser convertido em DHA em indivíduos adultos saudáveis (He, 2009).

Em estudos com humanos, tem sido demonstrado que os PUFA da série ω3 exercem importante efeito anti-inflamatório em indivíduos com câncer. Em estudos *in vitro* e com pequenos animais, tem-se demonstrado a ação anti-inflamatória, anti-apoptótica, anti-proliferativa e anti-angiogênica desses ácidos graxos (Spencer *et al.*, 2009).

Para avaliar os efeitos quimiopreventivos dos constituintes da dieta no câncer colorretal a utilização de produtos químicos cancerígenos como 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em roedores é um modelo experimental válido, atualmente. Estes modelos são altamente reprodutíveis, podem ser facilmente testados em animais e permitem recapitular CCR humano, pelo menos nas fases iniciais (Karthik Kumar *et al.*, 2010).

O processo inflamatório na mucosa pode ser um ponto de partida para o câncer colorretal. A mucosa do trato gastrointestinal representa uma interface entre o organismo e as substâncias ingeridas, e não está envolvida apenas nas funções de digestão e absorção de nutrientes, sendo um importante órgão imunológico (Spahn e Kucharzik, 2004).

O trato gastrointestinal constitui o maior sítio de população de linfócitos do organismo humano. Alterações na ativação de linfócitos na mucosa intestinal, produção de citocinas inflamatórias ou respostas à produção de citocinas são potenciais mecanismos de doenças inflamatórias intestinais e de tumores no cólon. Os lipídios em especial, são conhecidos como moduladores destas funções (Kuratko, 2000). O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) é constituído por muitas células de defesa, tais como linfócitos, plasmócitos, macrófagos e células dendríticas. Os linfócitos intra-epiteliais são em sua maioria (90%) CD8+, pertencente à resposta imune inata. Há evidências que os linfócitos intra-epiteliais são células que migraram da placa de Payer para as criptas e vilosidades, onde as células T sofrem desenvolvimento extratímico. As células provenientes do timo podem migrar para o epitélio intestinal, onde se diferenciam e proliferam, adquirindo fenótipo de linfócitos intra-epiteliais residentes (Spahn e Kucharzik, 2004; Abbas e Lichtman, 2005).

A ativação dos linfócitos usualmente é inibida por ácidos graxos, em especial os da série ω3 (Pompéia *et al.*, 2000). Estudos epidemiológicos com esquimós revelam menor incidência de doenças inflamatórias intestinais, quando comparados com populações ocidentais, sendo o efeito protetor atribuído à elevada ingestão de ω3. Pacientes com desordens inflamatórias intestinais apresentam menores níveis de ω3 plasmático em relação aos indivíduos normais (Camuesco *et al.*, 2005). Assim, é necessário compreender a relação existente entre os lipídios da dieta e a mucosa intestinal, e os seus

efeitos na incorporação de linfócitos e na preservação da integridade da mucosa, bem como sua relação com a progressão do câncer.

A composição dos ácidos graxos no plasma e nos tecidos tem sido muito utilizada como um instrumento de avaliação do tipo de gordura consumida. Sabe-se que os efeitos dos lipídios são diferenciados conforme sua composição e assim, o nível de cada ácido graxo consumido reflete em algum grau na taxa de distribuição, deposição e interconversão de lipídios no organismo (Arterburn *et al.*, 2006). Isto influencia a composição dos tecidos, que é de certa forma, reflexo do tipo de lipídio ingerido (Moreira *et al.*, 2009).

Sendo a quantidade e o tipo de lipídios na dieta considerados fatores protetores e/ou promotores de doenças, tal como o câncer de cólon, este trabalho teve como objetivo investigar a influência de diferentes óleos (oliva, peixe e linhaça) no perfil lipídico, na preservação das vilosidades intestinais e na migração de linfócitos na mucosa intestinal de ratos Wistar, induzidos ao câncer de cólon.

7.2. Materiais e métodos

7.2.1. Animais e dietas

Foi realizado um estudo do tipo caso controle com duração de 9 semanas. Foram utilizados 50 ratos machos do tipo *Ratus norvegicus albinus*, da linhagem *Wistar*, com setenta e dois dias e divididos em 5 grupos, com peso médio inicial de 330 ± 13,6g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram randomicamente divididos em cinco grupos, cada qual contendo 10 roedores. Quatro grupos foram tratados com o carcinógeno (DMH) e receberam dieta isocalóricas que diferiam apenas a fonte lipídica, a qual foi constituída por óleos de: oliva, peixe e linhaça e soja. Este último foi considerado o controle (+) em função da recomendação da AIN-93M, preconizado para manutenção de animais adultos (Reeves *et al.*, 1993). Um grupo (n=10) recebeu dieta comercial (*Socil*®) e não foi submetido ao protocolo de indução de lesões pré-neoplásicas, sendo assim chamado de controle (-). Este grupo foi um parâmetro comparativo importante nas análises histológicas.

Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais com temperatura de 22±1°C, em ambiente controlado com ciclo claro/escuro por 12 horas e

receberam dieta *ad libitum* durante todo período experimental (Figura 12). Após o período experimental, os animais foram submetidos ao jejum de 8 horas e em seguida procedeu-se à eutanásia. Foram coletados o sangue, excisados o tecido hepático, a gordura intra-abdominal, as fezes do ceco e a porção ileal para as análises histológicas.

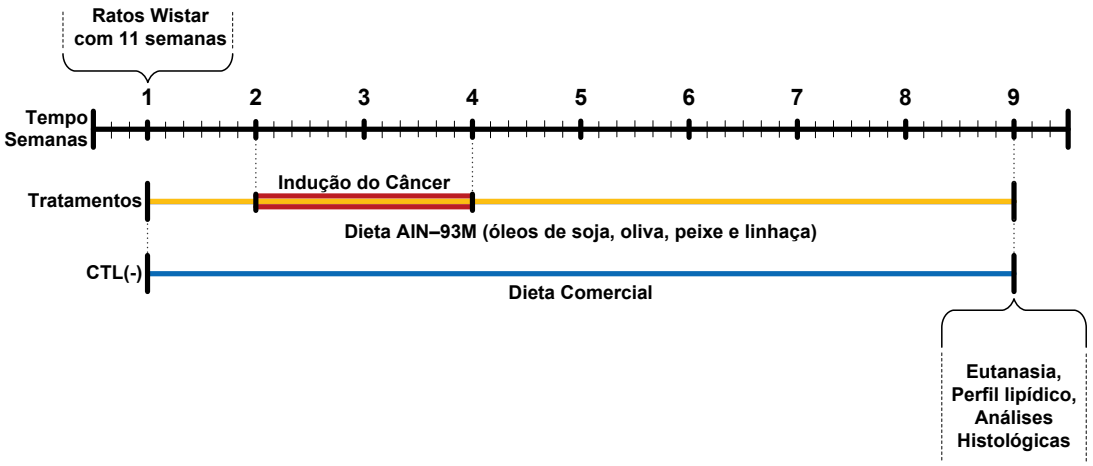


Figura 12 **-** Desenho experimental de ratos Wistar.
Nota: CTL(-)= controle negativo, sem tratamento com DMH e dieta comercial. CTL(+) = controle positivo (com DMH e dieta AIN-93M com 4% óleo de soja), e os grupos experimentais com tratamento com DMH e dieta AIN-93M contendo 4% de óleo de oliva, peixe e linhaça. As lesões pré-neoplásicas foram induzidas com DMH, 4 aplicações de 40mg/Kg peso na 2ª. e 3ª semana de experimento.

7.2.2. **Indução do Câncer**

O grupo alimentado com dieta comercial foi considerado o controle (-), logo, não foi induzido ao câncer. Na segunda semana de experimento, os animais dos demais grupos receberam 4 injeções subcutâneas em 40mg/kg peso corporal de DMH (Sigma, USA) sendo realizadas 2 aplicações em dias não consecutivos por um período de 2 semanas. A DMH era preparada imediatamente antes do uso, dissolvida em 0,9% NaCl e 1,5% de EDTA como veículo, na concentração final de 10mg/mL, sendo o pH final ajustado para 6,5, segundo Larangeira (Larangeira *et al.*, 1998).

7.2.3. **Perfil e teor de ácidos graxos dos óleos e tecidos.**

Os lipídios dos óleos (soja, oliva, peixe e linhaça), do tecido hepático, gordura intra-abdominal, soro e fezes foram extraídos segundo Folch (1957), saponificados e esterificados segundo Hartmann e Lago (1973). A identificação

dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa, utilizando-se o modelo CG-17A Shimadzu/Class, com a coluna de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polysiloxane), de 100 m e 0,25 mm de diâmetro e detector de ionização em chama. A programação de análise utilizada foi a temperatura inicial de 150°C, isotérmica por 10 minutos e posterior aquecimento de 4°C por minuto até 250°C, permanecendo nesta temperatura por 40 minutos. A temperatura do vaporizador foi de 240°C e do detector de 260°C. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio em 24 cm/seg., a 175°C. A razão *split* da amostra no injetor foi de 1/10 e o volume de injeção foi de 1 µL.

Os picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com padrões de metil ésteres conhecidos FAME mix (Supelco®, EUA) e quantificados por áreas de integração automática.

7.2.4. **Análise Histológica**

Fragmentos do íleo foram removidos e fixados, por 24 horas, em formalina de Carson (1973) em temperatura ambiente. Após fixação foram desidratados em gradiente crescente de etanol e incluídos em resina à base de hidroxietilmetacrilato (Historesin®, Leica). Secções transversais e longitudinais de 2µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (RM2155, Leica) com navalhas de vidro e coradas com Azul de Toluidina/Borato de Sódio 1% (Bancroft e Gamble, 2007).

7.2.5. **Análise quantitativa dos linfócitos**

Secções histológicas de três animais por grupo, selecionadas aleatoriamente foram utilizadas nas análises. As imagens foram obtidas em fotomicroscópio (BX-60, Olympus) com câmara digital Q-Color 3 (Olympus), utilizando-se objetiva de 20X e resolução de 2048x1536 pixels. Foram analisadas 900 imagens por grupo com intervalo mínimo de 30 µm entre elas.

A contagem do número de linfócitos presentes nos campos histológicos foi realizada utilizando-se o aplicativo Image Pro-Plus® versão 4.5 (Media Cybernetics). Padronizou-se a sobreposição de uma matriz quadrada (21linhas x 21 colunas) nos campos fotografados, e foram contabilizados apenas os linfócitos coincidentes com as interseções, como destacado na Figura 13.

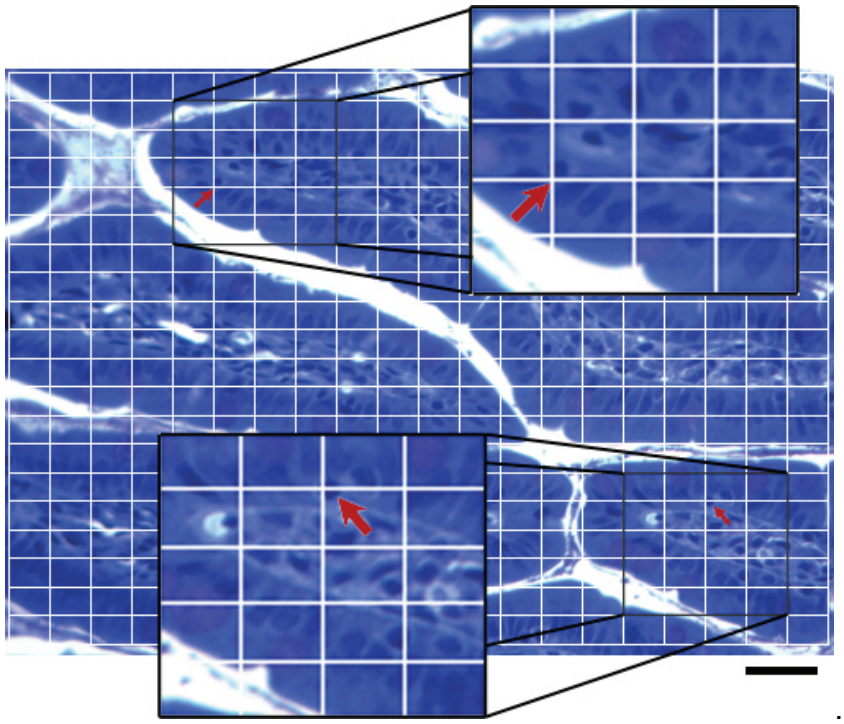


Figura 13 – Fotomicrografia de secção histológica da mucosa ileal de rato Wistar, com sobreposição de uma matriz quadrada padrão (21linhas x 21 colunas). Aumento de 200x, coloração com Azul de toluidina/borato de sódio 1%. Barra = 30 µm.

7.2.6. **Morfometria das vilosidades e criptas intestinais**

As imagens das secções histológicas foram capturadas com objetiva de 10X. As seguintes medidas foram tomadas com auxílio do aplicativo Image Pro-Plus® versão 4.5 (Media Cybernetics), (Carlos, 2006).

- *Altura das vilosidades* - foram selecionados 10 campos aleatórios por animal. Foram medidas no mínimo 70 vilosidades por grupo experimental. Apenas as vilosidades com epitélio definido e conjuntivo visível foram utilizadas;

- *Largura das vilosidades*: nas mesmas vilosidades utilizadas na análise de altura tomou-se 3 medidas (região apical, média e basal) e considerou-se em uma mesma vilosidade o valor médio destas três medidas;

- *Profundidade das criptas* – foram tomadas as medidas de 10 campos por animal, onde era possível ver a base e o ápice (abertura) da cripta. Foram medidas no mínimo 70 criptas por grupo experimental.

7.2.7. **Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, processo 12/2008

(Anexo III), de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, (Cobea, 2009).

7.2.8. **Análise Estatística**

As variáveis foram submetidas aos testes de normalidade e posteriormente à análise de variância. Quando significante, realizou-se o teste de comparação de médias de Tuckey ou Duncan, dependendo da característica da variável. Quando não atenderam às premissas de normalidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico, utilizando o software SigmaPlot®, versão 11.0 (Systat© Software, Inc), para análise estatística e representação dos dados, ao nível de 5% de significância.

7.3. Resultados

Ao fim do experimento, não foi verificado nenhuma diferença entre os tratamentos no ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficácia alimentar dos animais ($p>0,05$), dados aqui não apresentados. No entanto, verifica-se um comportamento diferenciado na evolução do ganho de peso entre os animais tratados com carcinógeno em relação ao controle (-). Nos animais induzidos a pré-lesões neoplásicas, na segunda e terceira semana de experimento verificou-se uma redução na velocidade de crescimento em função da administração do carcinógeno, mas sem diferença estatística em relação ao controle – (Figura 14).

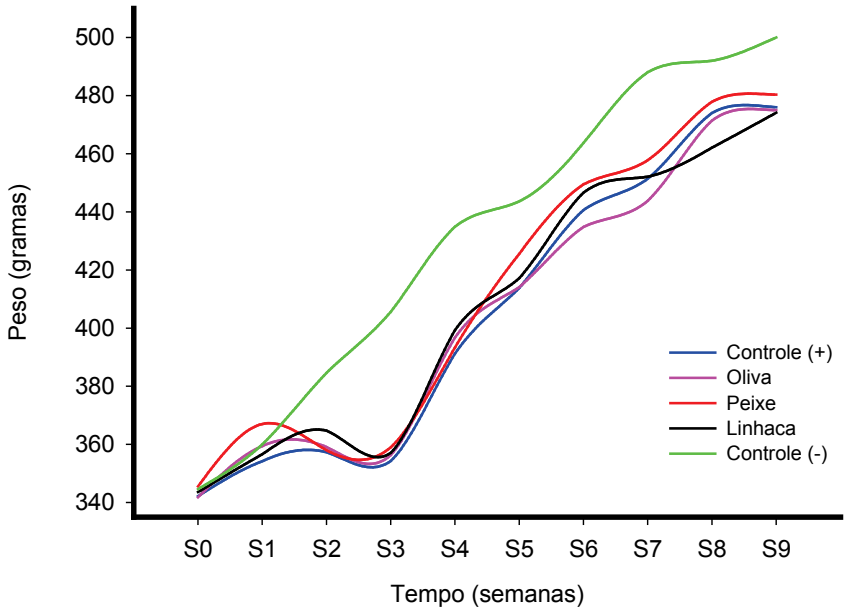


Figura 14 – Evolução do peso semanal de ratos Wistar.
Nota: CTL(-)= controle negativo, sem tratamento com DMH e dieta comercial. CTL(+) = controle positivo (com DMH e dieta AIN-93M com 4% óleo de soja), e os grupos experimentais com tratamento com DMH e dieta AIN-93M contendo 4% de óleo de oliva, peixe e linhaça. As lesões pré-neoplásicas foram induzidas com DMH, 4 aplicações de 40mg/Kg peso na 2ª. e 3ª semana de experimento. O peso foi semelhante (p>0,05) entre os grupos

Perfil de ácidos graxos nos óleos e tecidos

A composição dos óleos em relação à concentração de ácidos graxos e a relação ω6/ω3 da dieta oferecida está descrita na Tabela 12. A diferença entre as 4 dietas oferecidas aos animais está em sua composição de ácido oléico (18:1ω9), ácido linoléico (18:2ω6), ácido α-linolênico (18:3 ω3), EPA (20:5 ω3) e DHA (22:6 ω3).

O perfil e o teor de ácidos graxos no soro, dos tecidos hepático, adiposo e fezes nos diferentes grupos experimentais estão apresentados na Tabela 13 e Tabela 14, respectivamente.

Tabela 12 - Concentração de ácidos graxos dos óleos utilizados nas dietas

	Concentrações (%)*			
Ácidos graxos	Óleo de Soja	Óleo de Oliva	Óleo de Peixe	Óleo de linhaça
C14:0	NI	NI	5.86	NI
C15:0	NI	NI	0.22	NI
C16:0	7.75	11.30	10.76	6.45
C17:0	NI	NI	0.50	NI
C18:0	3.01	2.96	3.60	4.35
C20:0	NI	0.38	0.48	NI
C22:0	0.34	0.12	NI	NI
C16:1	NI	1.09	6.60	NI
C18:1 ω9	21.36	74.01	9.98	18.00
C20:1	NI	0.25	1.08	NI
C20:2	NI	NI	3.05	NI
C18:2 ω6	60.75	8.74	2.78	12.71
C20:4 ω6	NI	NI	0.73	NI
C22:2 ω6	NI	NI	0.87	NI
C18:3 ω3	6.96	NI	0.80	58.47
C20:5 ω3	NI	NI	24.01	NI
C22:6 ω3	NI	NI	19.86	NI
Total ω6	60.75	8.74	4.37	12.71
Total ω3	6.93	0.75	44.63	58.47
ω6/ω3	8.77	11.65	0.10	0.22

* Perfil lipídico do óleo de soja (Soya, BUNGE®), azeite de oliva (Andorinha®, extra virgem), o óleo de peixe (Galena®) e óleo de linhaça (Cisbra Alimentos®). A identificação dos ésteres metílicos foi realizada por cromatografia gasosa. Os valores são dados em g/100g. * NI = não identificado

No soro, os níveis de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados não diferiram entre os tratamentos. O ácido graxo DHA só foi detectado no grupo alimentado com óleo linhaça (Tabela 13). No fígado, menor concentração de ácidos graxos saturados foi verificado nos tratamentos em relação ao controle(+) ($p<0,001$). Além disso, maiores níveis de EPA ($p=0,004$) e DHA ($p<0,001$) foi encontrado no grupo tratado com óleo de peixe.O grupo peixe e linhaça apresentaram também menor relação de PUFA da série ω6/ω3 no tecido hepático, 1,7:1 e 1,9: 1, respectivamente (Tabela 13).

Já no tecido adiposo intra-abdominal, somente o grupo oliva apresentou menor concentração de AGS em relação ao grupo controle(+) ($p=0,04$). No grupo peixe e linhaça apresentaram quantidades apreciáveis de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA). Teores mais elevados de ácido linolênico ($p=0,003$) e EPA ($p=0,011$) foram encontrados no tecido adiposo do grupo peixe em relação aos demais tratamentos e somente neste grupo foi identificado DHA. A menor relação de PUFA da série ω6/ω3 também encontrada no grupo peixe

(9:1), seguido do grupo linhaça (64:1) na gordura intra-abdominal. Nas fezes, não houve diferença na composição de AGS, MUFA e PUFA. Maiores quantidades de ácido α-linolênico foram excretadas pelo grupo linhaça ($p=0,014$). Foram identificados EPA e DHA nas fezes dos roedores, mas sem diferença estatística (Tabela 14).

Tabela 13 - Perfil e teor de ácidos graxos no soro e no tecido hepático de ratos Wistar induzidos à lesões pré-neoplásaicas

Composição de Ácidos Graxos (%)										
Ácidos Graxos	Soro					Fígado				
	Controle	Oliva	Peixe	Linhaça	*p*	Controle	Oliva	Peixe	Linhaça	*p*
C14:0	2,71 ± 1,26	2,42 ± 1,99	2,62 ± 0,65	1,28 ± 1,40		0,61 ± 0,14	0,64 ± 0,14	0,74 ± 0,26	0,54 ± 0,16	
C17:0	2,67 ± 2,34	1,39 ± 0,57	2,71 ± 1,35	1,35 ± 0,209		2,60 ± 0,53	3,27 ± 1,55	3,91 ± 0,92	3,88 ± 1,17	*0,008*
C20:0	8,45 ± 2,44^{ab}	5,85 ± 2,26^{a}	6,33± 2,14^{ab}	12,95±5,23^{a}	*0,002*	20,94 ± 1,58^{a}	5,92 ± 1,11^{b}	5,25 ± 1,41^{b}	10,86 ± 2,59^{c}	*<0,001*
C21:0	2,41 ±0,36	NI	2,95 ± 1,45	1,72 ± 1,56		1,36 ± 1,14^{ab}	NI	0,41 ± 0,20^{a}	7,43 ± 3,28^{b}	*0,005*
C23:0	11,47 ± 11,00	11,17 ± 7,25	2,45 ± 0,58	9,80 ± 3,77		13,79 ± 2,42^{a}	11,79 ± 4,25^{a}	5,69 ± 1,65^{b}	7,20 ± 1,25^{b}	*<0,001*
Total AGS	**20,55 ± 10,97**	**20,24 ± 8,19**	**15,59 ± 7,48**	**26,42 ± 8,89**		**39,72 ± 2,41^{a}**	**21,79 ± 4,92^{b}**	**16,12 ± 3,34^{b}**	**29,24 ± 5,38^{c}**	***<0,001***
C15:1	3,05 ± 0,86	2,48 ± 0,03	2,39 ± 0,61	1,12 ± 0,34		0,29 ± 0,10	NI	0,37 ± 0,01	0,17 ± 0,03	
C16:1	21,04 ± 1,71	21,23 ± 2,08	22,27 ± 9,08	22,66 ± 1,38		19,96 ± 1,39	20,61 ± 6,13	19,04 ± 5,31	21,99 ± 3,94	
C17:1	3,67 ± 2,06	2,98 ± 2,31	4,61 ± 2,10	1,66 ± 2,02		0,29 ± 0,15	0,9 ± 0,46	0,84 ± 0,51	0,20 ± 0,01	
C18:1 ω9	11,99 ± 4,28	14,02 ± 3,22	12,03 ± 3,33	11,94 ± 3,66		9,03 ± 1,25	8,60 ± 2,86	8,04 ± 2,64	10,27 ± 2,61^{ab}	*0,037*
C22:1 ω9	NI	NI	NI	NI		0,42 ± 0,06^{a}	0,55 ± 0,08^{a}	0,77 ± 0,12^{b}	0,48 ± 0,06^{a}	*<0,001*
Total MUFA	**40,09 ± 2,47**	**41,20± 2,96**	**42,44±11,04**	**42,21 ± 1,71**		**30,49 ± 1,67**	**30,15 ± 7,17**	**28,26 ± 7,51**	**32,98 ± 4,84**	
C20:2	3,32 ± 0,68	2,14 ± 1,63	2,63 ± 0,31	1,55 ± 2,04		NI	NI	NI	NI	
C18:2 ω6	15,46 ± 10,7	13,60 ± 2,8	20,46 ± 4,46	9,79 ± 2,36		15,65 ± 1,26^{a}	28,28 ± 9,46^{b}	14,68 ± 4,38^{a}	18,59 ± 2,81^{ab}	
C18:3 ω6	2,79 ± 1,58	2,56 ± 2,12	2,78 ± 0,59	1,61 ± 0,59		NI	NI	NI	NI	
C18:3 ω3	NI	NI	NI	NI		0,25 ± 0,05	0,37 ± 0,22	0,35 ± 0,21	0,21 ± 0,15	
C20:5 ω3	NI	NI	NI	4,27 ± 1,17		0,45 ± 0,35^{a}	NI	9,97 ± 3,37^{b}	6,00 ± 4,80^{ab}	*0,007*
C22:6 ω3	NI	2,6 ± 0,76	3,02 ± 0,47	3,35 ± 0,51		3,02 ± 0,48^{a}	1,85 ± 1,15^{a}	10,91 ± 3,14^{b}	4,17 ± 0,53^{ab}	*0,002*
Total PUFA	**22,18 ±8,84**	**20,30± 2,60**	**27,25 ± 4,79**	**18,47 ± 3,90**		**31,49 ± 9,64**	**20,45 ± 2,09**	**33,84 ± 7,72**	**28,83 ± 1,91**	
Total ω6	18,73	16,65	22,99	11,49		15,98	28,87	14,91	18,78	
Total ω3	1,44	1,49	3,02	6,10		3,85	3,40	7,71	9,96	
ω6/ω3	13:1	11:1	7:1	2:1		4:1	8:1	1,7:1	1,9:1	

*A identificação dos ésteres metílicos foi realizada por cromatografia gasosa. Os valores são apresentados em g/100g. * NI = não identificado.
^{abc} ANOVA ou Teste t. Valores (média ± DP) seguidos da mesma letra, na linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 14 - Perfil e teores de ácidos graxos do tecido adiposo intra-abdominal e nas fezes de ratos Wistar induzidos à lesões pré-neoplásicas*

Composição de Ácidos Graxos (%)										
Ácidos Graxos	Gordura Intra-Abdominal					Fezes				
	Controle	Oliva	Peixe	Linhaça	*p*	Controle	Oliva	Peixe	Linhaça	*p*
C14:0	1,41 ± 0,14^{a}	1,33 ± 0,14^{a}	2,91 ± 0,30^{b}	1,51 ± 0,10^{a}	*<0,001*	0,67 ± 0,23	NI	1,62 ± 0,76	1,51 ± 0,36	
C15:0	0,10 ± 0,025^{ab}	0,09 ± 0,006^{ab}	0,13 ± 0,012^{a}	0,08 ± 0,007^{b}	*0,01*	NI	NI	NI	NI	
C17:0	6,52 ± 0,94	6,09 ± 0,91	8,36 ± 3,88	6,10 ± 0,63		4,27 ± 4,99	1,85 ± 1,72	4,11 ± 2,39	2,03 ± 1,12	
C20:0	25,41 ± 2,77^{a}	8,86 ± 1,13^{bc}	7,04 ± 1,39^{b}	12,00 ± 1,94^{c}	*<0,001*	2,05 ± 1,77	1,47 ± 1,03	2,93 ± 1,77	3,00 ± 0,63	
C22:0	0,23 ± 0,05	NI	0,35 ± 0,07	0,30 ± 0,12		1,02 ± 0,94	1,12 ± 0,23	1,50 ± 0,42	1,72 ± 0,38	
C23:0	0,20 ± 0,03^{ab}	NI	0,26 ± 0,04^{a}	0,12 ± 0,01^{b}	*0,037*	1,79 ± 0,28	1,71 ± 0,35	1,59 ± 0,11	1,61 ± 0,20	
C24:0	NI	0,10 ± 0,04	0,04 ± 0,008	0,03 ± 0,02		8,66 ± 3,65	8,49 ± 1,65	3,82 ± 1,71	3,67 ± 0,40	
Total AGS	**30,05 ± 10,80^{a}**	**13,14 ± 4,15^{b}**	**17,16 ± 6,93^{ab}**	**30,15 ± 6,48^{a}**	*0,017*	**18,12 ± 5,78**	**10,56 ± 6,18**	**16,60 ± 6,83**	**14,03 ± 9,42**	
C15:1	0,23 ± 0,03^{a}	0,20 ± 0,02^{a}	0,33 ± 0,06^{b}	0,24 ± 0,01^{a}	*<0,001*	1,81 ± 0,68^{a}	1,93 ± 0,15^{a}	2,68 ± 1,15^{a}	4,91 ± 0,58^{b}	*<0,001*
C16:1	23,85 ± 1,28^{a}	23,06 ± 1,40^{a}	22,18 ± 1,44^{b}	24,29 ± 1,56^{a}	*<0,001*	10,14 ± 1,26^{a}	10,40 ± 2,97^{a}	16,71 ± 5,17^{b}	16,37 ± 2,26^{a}	*<0,001*
C17:1	0,17 ± 0,02^{a}	0,15 ± 0,01^{a}	0,27 ± 0,05^{b}	0,17 ± 0,02^{a}	*<0,001*	0,65 ± 0,12^{a}	0,70 ± 0,05^{ab}	1,13 ± 0,73^{ab}	1,84 ± 0,45^{b}	*<0,001*
C18:1 ω9	3,14 ± 0,36^{ab}	1,31 ± 1,62^{a}	5,05 ± 0,27^{b}	4,05 ± 0,75^{ab}	*0,025*	6,23 ± 2,99^{a}	1,33 ± 0,43^{a}	6,28 ± 2,05^{a}	12,14 ± 2,57^{b}	*<0,001*
C20:1	0,52 ± 0,87	NI	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01		NI	NI	NI	NI	
C22:1 ω9	NI	NI	NI	NI		1,53 ± 0,86	1,53 ± 0,86	2,19 ± 1,83	1,83 ± 0,39	
Total MUFA	**27,30 ± 3,02**	**24,05 ± 0,19**	**28,86 ± 3,57**	**27,19 ± 3,35**		**20,94 ± 2,46**	**21,24 ± 4,66**	**26,55 ± 5,99**	**32,80 ± 8,92**	
C18:2 ω6	30,95 ± 1,71	NI	32,95 ± 4,47	36,71 ± 4,03		4,07 ± 2,94	6,99 ± 4,57	8,97 ± 6,67	7,17 ± 1,72	
C18:3 ω6	0,08 ± 0,03	NI	0,10 ± 0,02	0,08 ± 0,01		1,86 ± 0,46	1,77 ± 0,31	1,64 ± 1,16	1,82 ± 0,26	
C20:3 ω6	NI	NI	NI	NI		2,01 ± 0,92	2,70 ± 0,14	1,76 ± 0,51	2,05 ± 0,37	
C18:3 ω3	0,28 ± 0,02^{ab}	0,30 ± 0,02^{ab}	1,33 ± 0,21^{a}	0,19 ± 0,04^{b}	*0,003*	1,59 ± 1,11^{a}	1,46 ± 0,17^{a}	1,38 ± 0,37^{a}	6,53 ± 3,14^{b}	*0,014*
C20:5 ω3	NI	NI	1,06 ± 0,38^{a}	0,16 ± 0,001^{b}	*0,011*	7,75 ± 5,46	7,84 ± 0,36	6,25 ± 4,39	2,54 ± 1,71	
C22:6 ω3	NI	NI	1,31 ± 0,75	NI		NI	NI	3,18 ± 1,13	1,82 ± 0,29	
Total PUFAS	**25,18 ± 13,89**	**11,69 ± 5,22**	**36,89 ± 3,76**	**37,16 ± 4,00**		**17,85 ± 5,85**	**21,06 ± 6,11**	**24,33 ± 5,61**	**14,01 ± 8,79**	
Total ω6	31,06	28,28	33, 02	36,85		7,90	10,41	14,03	8,12	
Total ω3	0,27	0,30	3,63	0,57		7,37	9,45	8,72	5,60	
ω6/ω3	115:1	93:1	9:1	64:1		1:1	1:1	1,6: 1	1,4:1	

*A identificação dos ésteres metílicos foi realizada por cromatografia gasosa. Os valores são apresentados em g/100g. * NI = não identificado. ^{abc} ANOVA ou Teste t. Valores (média ± DP) seguidos da mesma letra, na linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade

7.3.1. **Análise quantitativa dos linfócitos**

A contagem de linfócitos na mucosa intestinal foi estatisticamente menor em todos os tratamentos em relação ao controle(+) ($p<0,001$). Entre os tratamentos, o grupo alimentado com óleo de peixe apresentou menor deposição de linfócitos na mucosa ($p<0,001$), semelhante a mucosa normal, representado pelo controle(-) (Figura 15).

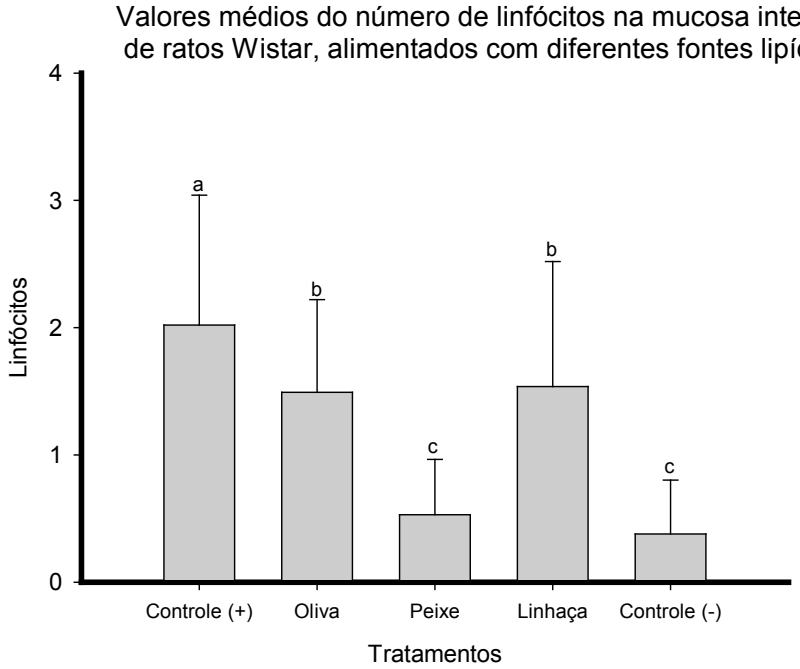


Figura 15 - Contagem média de linfócitos na mucosa ileal de ratos Wistar. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (*p<0.05*).

7.3.2. **Morfometria das vilosidades e criptas intestinais**

As vilosidades do íleo dos ratos alimentados com as diferentes fontes lipídicas apresentaram diferenças significativas nos parâmetros: altura e largura das vilosidades e profundidade das criptas.

A análise morfométrica mostrou que os tratamentos apresentaram altura de vilosidade, profundidade de cripta e largura de vilosidade menores que o controle(+) ($p<0,001$). A altura da vilosidade dos grupos peixe e linhaça foi estatisticamente menor que o grupo oliva ($p<0,001$), e não diferiram do controle (-), demonstrando um menor incremento destes grupos em relação ao controle (+) (Figura 16A). O grupo peixe apresentou menor profundidade de cripta ($p<0,001$, Figura 16B). A largura da vilosidade do grupo oliva, peixe e linhaça não diferiram do controle(-) e ambos tornaram-se menos largas que o controle (+) ($p<0,001$, Figura 16C).

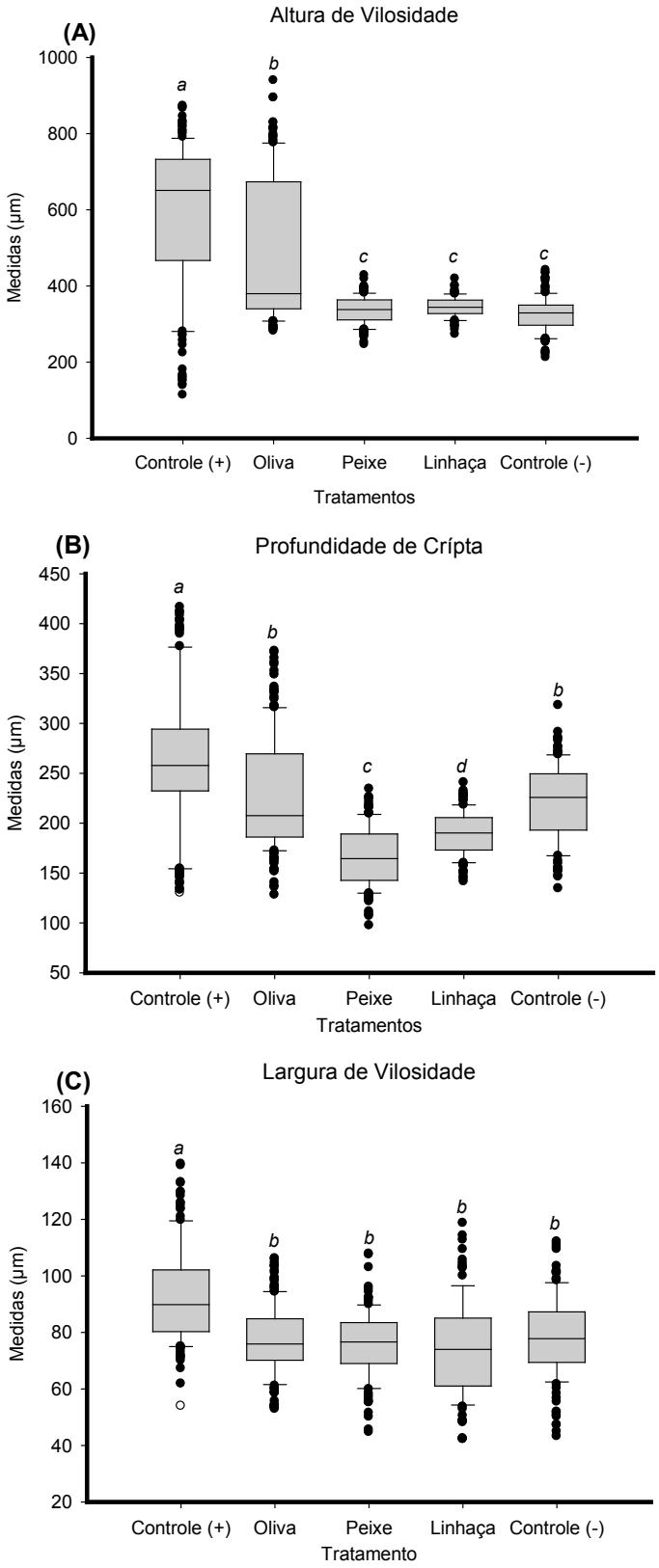


Figura 16 - Valores médios (µm) de altura de vilosidade, profundidade de cripta e largura de vilosidade da mucosa ileal de ratos Wistar induzidos ao câncer colorretal.
Nota: CTL(-)= controle negativo, sem câncer e dieta comercial. CTL(+) = controle positivo (com câncer e dieta AIN-93M com 4% óleo de soja), e os grupos experimentais com câncer e dieta AIN-93M contendo 4% de óleo de oliva, peixe e linhaça. O câncer colorretal foi induzido com DMH. Letras iguais não diferem entre si teste de Tukey, $p < 0.05$).

7.4. Discussão

Os animais induzidos ao câncer não diferiram em relação ao controle (-) quanto ao ganho de peso, ingestão alimentar e coeficiente de eficácia alimentar. Este fato pode ser explicado pelo curto período experimental, insuficiente para alterar o apetite e levar à alterações metabólicas no peso e na composição corporal. Dwivedi *et al*.,(2003), também não encontraram diferenças no ganho de peso e no coeficiente de eficácia alimentar em ratos induzidos ao câncer e alimentados com diferentes fontes lipídicas.

As diferenças na composição dos ácidos graxos no plasma e tecidos hepático e adiposo intra-abdominal refletem a composição da dieta, confirmando a incorporação dos lipídios da dieta nos diferentes compartimentos do corpo.

No soro dos animais, foi identificada a presença de ácidos graxos essenciais advindos da dieta. O EPA e DHA foram encontrados no grupo linhaça. Nestes animais, estes ácidos graxos de cadeia longa são alongado e dessaturado a partir da presença dietética do ácido α-linolênico, presente em altas concentrações no óleo de linhaça ($\cong$58%), com uma conversão de ALA a DHA em torno de 5% e ALA a EPA em torno de 7%. Segundo He (2009), aproximadamente 2 a 5% do ALA é convertido em DHA e 5 a 10% de ALA é convertido em EPA. Schloss *et al*.(1997) avaliaram os fatores dietéticos associados ao menor risco de câncer de cólon em pescadores da costa oeste sul africana. Verificaram que a baixa incidência do câncer correlacionou positivamente com maiores níveis séricos de EPA e DHA e menores níveis de PUFA da série ω6.

Os lipídios da dieta foram incorporados no tecido hepático e na gordura intra-abdominal dos roedores. No fígado, maiores níveis de EPA e DHA foram verificado no grupos peixe, seguido pelo grupo linhaça. Estes ácidos graxos de cadeia muito longa, já fazem parte da composição do óleo peixe, incorporando neste tecido aproximadamente 41% de EPA e 55% de DHA advindo da dieta. Já no grupo linhaça, mesmo sendo considerada pequena a metabolização, este processo ocorreu e foi identificado no tecido hepático. Aproximadamente 10% de EPA e 7% de DHA foram metabolizados neste grupo a partir do ALA advindo da dieta. Nessa situação experimental, talvez seja mais fácil de ocorrer esse processo de elongação porque, em cada tratamento, só foi ofertado uma

fonte lipídica. Na alimentação ocidental rica em ω6, há uma maior competitividade entre os ácidos graxos pelas enzimas na via metabólica clássica, em que um excesso de ω6 interfere no metabolismo do ω3, levando a um déficit de seus metabólitos, incluindo o EPA (Hirayama *et al.*, 2006). Nos tratamentos, os grupos alimentados com óleo de peixe e linhaça apresentaram menor relação ω6/ω3 (1,7:1 e 1,9:1, respectivamente)

O DHA e o EPA podem interferir no sistema imune competindo com o ácido araquidônico (AA) no metabolismo da cicloxigenase na membrana celular, inibindo a síntese de eicosanóides pró-inflamatórios, intimamente ligado a imunomodulação, inflamação e formação do tumor (Calder, 2009; Spencer *et al.*, 2009). Além disso, menor relação ω6/ω3 encontrada no grupo peixe e linhaça são desfavoráveis a via competitiva entre estas famílias pelas enzimas elongases e dessaturases (Garófolo e Petrilli, 2006).

No tecido adiposo, maiores concentrações de ácido α-linolênico e EPA também foram encontrados no grupo tratado com óleo de peixe, e somente neste grupo foi encontrado DHA. Segundo Spenser *et al.*,(2009) os eicosanóides produzidos a partir dos PUFA da série ω3, o EPA e DHA têm atividade anti-inflamatória e não estimula a angiogênese. Quanto aos lipídios excretados e encontrados nas fezes, somente o grupo tratado com óleo de linhaça apresentou maior excreção de ácido α-linolênico.

O estado nutricional tem um profundo efeito na função imune. Os PUFA podem potencializar, manter ou se diminuir a atividade imune. Os PUFA da série ω3 apresentam efeitos anti-inflamatórios no cólon, reduzindo assim o risco de colite, doença inflamatória intestinal e o câncer de cólon. As dietas ricas em PUFA da série ω6, por outro lado, aumentam a inflamação e progressão do tumor neste tecido (Kuratko, 2000). Os PUFA da série ω3, ao alterar a composição lipídica da membrana, podem também afetar diretamente as funções das células do sistema imune, incluindo a atividade de macrófagos, a proliferação e a sinalização das células T (Huwiler e Pfeilschifter, 2009). Assim, é importante compreender os efeitos dos lipídios, de diferente composição em ácidos graxos, na proliferação de células inflamatórias no trato gastrointestinal.

Nosso trabalho apresentou resultados condizentes com a literatura, uma vez que o grupo peixe apresentou menor deposição de linfócitos na porção ileal, principal sítio de absorção de lipídios. Neste grupo, quantidades significativas de EPA e DHA foram incorporados nos tecido hepático e adiposo. Em outro trabalho desenvolvido em nosso laboratório, verificamos que a utilização destes mesmos óleos nas mesmas concentrações em ratos saudáveis, o efeito imunodulador foi verificado no grupo alimentado pelo óleo de linhaça, outra fonte lipídica rica em PUFA da série ω3 (Rosa *et al.*, 2010).

Jeffery *et al*. (1997) demonstraram que a suplementação de EPA e DHA inibiu a proliferação de linfócitos isolados de nódulos linfáticos, baço e timo de roedores, assim como diminuiu a sua concentração no sangue humano. Kuratko (2000) verificaram menor proliferação de linfócitos na mucosa colônica em resposta a citocinas pró-inflamatórias em camundongos BALB/c alimentados com óleo de peixe (19% óleo de peixe e 1% óleo de milho) em relação àqueles tratados com óleo de milho (20%) após um período experimental de 2 semanas.

A resposta inflamatória, no qual os lipídios da dieta estão envolvidos, é uma complexa e regulada seqüência de eventos. Inicia-se com a produção e recrutamento de mediadores e células inflamatórias para os sítios de lesão, incluindo ações como segundo mensageiros ou vias de transdução, influenciando a transcrição de genes pró-inflamatórios e genes promotores do crescimento, eventos relacionados à patogênese de doenças, incluindo o câncer (Huwiler e Pfeilschifter, 2009).

Neste trabalho, ao avaliarmos comparativamente a expressão de citocinas, verificamos que o grupo peixe expressou duas vezes mais TGF-β mRNA e oito vezes menos IL-8 mRNA em relação aos demais tratamentos. A IL-8 é identificada como um fator quimiotático de neutrófilos com efeito pró-inflamatório e sua expressão tem sido relacionada a vários tipos de câncer, incluindo o câncer de cólon (Xie, 2001). O bloqueio do processo inflamatório e de seus mediadores constitui uma importante via para reduzir a promoção e progressão do câncer (Kuratko, 2000).

Em estudo similar, Camuesco *et al*.,(2005) avaliaram o efeito dos óleos de soja, oliva e oliva associados ao óleo de peixe nas mesmas concentrações que utilizamos (4g/100g) em ratos Wistar induzidos à doença inflamatória

intestinal. Os animais alimentados com azeite de oliva apresentaram menor resposta inflamatória, quando comparado com grupo controle (óleo de soja) e, este efeito benéfico foi potencializado após a suplementação com ω3.

Segundo Tramonte *et al*.,(2004) a integridade física da mucosa intestinal constitui a principal linha de defesa do organismo, auxiliado pelos componentes do sistema imune celular e humoral. A análise morfométrica foi realizada com o intuito de confirmar a atuação das diferentes fontes lipídicas na preservação da estrutura da mucosa intestinal na porção do íleo, principal sítio de absorção de lipídios (Costa e Peluzio, 2008), permitindo assim, mensurar as modificações ocorridas na mucosa em resposta aos diferentes constituintes da dieta.

Os tratamentos apresentaram menor altura de vilosidades, profundidade de cripta e largura de vilosidade em comparação com o grupo controle (+), ficando claro que os óleos testados nos animais induzidos ao câncer não exerceram efeitos protetores sobre a integridade da mucosa ileal. Nos tratamentos e no controle (-), o processo de hiperplasia, que visa assegurar a taxa de *turnover* celular com o intuito de repor as perdas celulares na região apical das vilosidades, foi menos intenso quando comparado ao controle (+). Os óleos utilizados, dentro de uma dieta equilibrada para animais induzidos ao câncer de cólon conseguiram influenciar os parâmetros histológicos da mucosa intestinal.

Os óleos, na quantidade utilizada no estudo e durante semanas não promoveram uma melhor preservação da mucosa ileal, em ratos na fase de crescimento, mas o grupo tratado com óleo de peixe reduziu a migração dos linfócitos para a mucosa intestinal. Estes dados sugerem que os óleos, presentes em uma dieta normolipídica, de acordo com os níveis de ingestão recomendado para roedores (AIN93M), apresentam respostas metabólicas positivas quando comparadas ao óleo de soja.

7.5. Conclusão

Em nosso estudo, verificamos que os óleos influenciaram o perfil lipídico, a migração de linfócitos na mucosa intestinal e preservação das vilosidades intestinais em roedores induzidos ao câncer de cólon. Os óleos peixe e linhaça apresentaram uma maior incorporação de EPA e DHA nos tecidos, favorecendo um perfil menos inflamatório no grupo peixe, verificado

pela menor deposição de linfócitos na mucosa intestinal dos animais, efeito imunomodulador dos PUFA da série ω3. A análise morfométrica mostrou que os óleos testados alteraram a altura de vilosidade, largura de vilosidades e profundidade de criptas da mucosa intestinal dos roedores induzidos ao câncer.

7.6. Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier 2005.

ARTERBURN, L. M.; HALL, E. B.; OKEN, H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 83, n. 6, p. 1467-1476, 2006.

BANCROFT, J.; GAMBLE, M. *Theory and pratice of histological tecniques*. Churchill Livingstone: Elsevier, 2007.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*, v. 91, n. 6, p. 791-795, 2009.

CALZOLARI, A.; DEAGLIO, S.; MALDI, E.; CASSONI, P.; MALAVASI, F.; TESTA, U. TfR2 expression in human colon carcinomas. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, v. 43, n. 3, p. 243-249, 2009.

CAMUESCO, D.; GALVEZ, J.; NIETO, A.; COMALADA, M.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E.; CONCHA, A.; XAUS, J.; ZARZUELO, A. Dietary Olive Oil Supplemented with Fish Oil, Rich in EPA and DHA (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids, Attenuates Colonic Inflammation in Rats with DSS-Induced Colitis. *Journal of Nutrition*, v. 135, n. 4, p. 687-694, 2005.

CARLOS, J. *Estudo morfológico e morfométrico do intestino delgado de camundongos imunodeprimidos submetidos ã dieta enteral contendo prébiótico e contaminada Klebsiella pneumoniae*. (2006). 77 f. (Mestrado) - Departamento de Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

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 Letters*, v. 193, n. 1, p. 17-24, 2003.

COBEA. Ethical Priniples for the use of laboratory animals. *Brazilian College on Animal Experimentation*, 2009.

COSTA, N. M. B.; PELUZIO, M. D. C. G. *Nutrição Básica e Metabolismo*. Viçosa: Ed. UFV, 2008.

DWIVEDI, C.; MULLER, L. A.; GOETZ-PARTEN, D. E.; KASPERSON, K.; MISTRY, V. V. Chemopreventive effects of dietary mustard oil on colon tumor development. *Cancer Letters*, v. 196, n. 1, p. 29-34, 2003.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 226, n. 1, p. 497 - 509, 1957.

GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A. S. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. *Revista de Nutrição*, v. 19, p. 611-621, 2006.

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L.; FRAYN, K. N. *Lipid Biochemistry*. 5. ed. Iowa State Press: Blackwell Science Ltd, 2002.

HARTMANN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices*, v. 22, p. 475-477, 1973.

HE, K. Fish, Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Prevention of Cardiovascular Disease--Eat Fish or Take Fish Oil Supplement? *Progress in Cardiovascular Diseases*, v. 52, n. 2, p. 95-114, 2009.

HIRAYAMA, K.; SPERIDIÃO, P.; NETO, U. Ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa. *The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases*, v. 10, n. 3, 2006.

HUWILER, A.; PFEILSCHIFTER, J. Lipids as targets for novel anti-inflammatory therapies. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 124, n. 1, p. 96-112, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2010.

JEFFERY, N. M.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. Level of polyunsaturated fatty acids and the n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acid ratio in the rat diet alter serum lipid levels and lymphocyte functions. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 57, n. 2, p. 149-160, 1997.

KARTHIK KUMAR, V.; VENNILA, S.; NALINI, N. Inhibitory effect of morin on DMH-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in experimental colon carcinogenesis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 29, n. 1, p. 50-57, 2010.

KURATKO, C. N. Proliferation of colonic lymphocytes in response to inflammatory cytokines is lower in mice fed fish oil than in mice fed corn oil. *Cancer Letters*, v. 148, n. 1, p. 27-32, 2000.

LARANGEIRA, L. L. S.; TAHA, M. O.; 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 Cirurgica Brasileira*, v. 13, 1998.

LLOR, X.; PONS, E.; ROCA, A.; ÀLVAREZ, M.; MAÑÉ, J.; FERNÁNDEZ-BAÑARES, F.; GASSULL, M. A. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. *Clinical Nutrition*, v. 22, n. 1, p. 71-79, 2003.

MOREIRA, A. P. B.; SABARENSE, C. M.; DIAS, C. M. G. C.; LUNZ, W.; NATALI, A. J.; GLÓRIA, M. B. A.; PELUZIO, M. C. G. Fish oil ingestion reduces the number of aberrant crypt foci and adenoma in 1,2-dimethylhydrazine-

induced colon cancer in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 42, p. 1167-1172, 2009.

MURFF, H. J.; SHU, X.-O.; LI, H.; DAI, Q.; KALLIANPUR, A.; YANG, G.; CAI, H.; WEN, W.; GAO, Y.-T.; ZHENG, W. A Prospective Study of Dietary Polyunsaturated Fatty Acids and Colorectal Cancer Risk in Chinese Women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 18, n. 8, p. 2283-2291, 2009.

NINA, H.; ELIZABETH, K. L.; BEATRICE, L. P.-Z.; MICHAEL, G. Modulation of gene expression in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid treated human colon adenoma cells. *Genes & Nutrition*, v. 4, p. 73-76, 2009.

RAO, C. V.; HIROSE, Y.; INDRANIE, C.; REDDY, B. S. Modulation of Experimental Colon Tumorigenesis by Types and Amounts of Dietary Fatty Acids. *Cancer Research*, v. 61, n. 5, p. 1927-1933, 2001.

RAVASCO, P.; ARANHA, M. M.; BORRALHO, P. M.; MOREIRA DA SILVA, I. B.; CORREIA, L.; FERNANDES, A.; RODRIGUES, C. M. P.; CAMILO, M. Colorectal cancer: Can nutrients modulate NF-[kappa]B and apoptosis? *Clinical Nutrition*, 2009.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing commitee ond the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

ROSA, D. D.; SALES, R. L.; MORAES, L. F.; LOUREÇO, F. C.; NEVES, C. A.; SABARENSE, C. M.; PELUZIO, M. C. G. P. Flaxseed, olive and fish oil influence plasmatic lipids, lymphocyte migration and morphometry of the intestinal of Wistar rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 3, 2010.

RUSSO, G. L. Dietary n - 6 and n - 3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical Pharmacology*, v. 77, n. 6, p. 937-946, 2009.

SCHLOSS, I.; KIDD, M. S. G.; TICHELAAR, H. Y.; YOUNG, G. O.; O'KEEFE, S. J. D. Dietary factors associated with a low risk of colon cancer in coloured West Coast fishermen. *South African Medical Journal*, v. 87, p. 152-8, 1997.

SPAHN, T. W.; KUCHARZIK, T. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut*, v. 53, n. 3, p. 456-465, 2004.

SPENCER, L.; MANN, C.; METCALFE, M.; WEBB, M. B.; POLLARD, C.; SPENCER, D.; BERRY, D.; STEWARD, W.; DENNISON, A. The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. *European Journal of Cancer*, v. 45, n. 12, p. 2077-2086, 2009.

TRAMONTE, R.; CARVALHO, R. O. M.; FARIAS, D. C. D.; SERAFIM, J. D. M.; ORTELLADO, D. K.; D'ACAMPORA, A. J. Alterações da mucosa intestinal em ratos: estudo morfométrico em três diferentes tratamentos após indução

experimental de sepse abdominal aguda. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 19, p. 120-125, 2004.

XIE, K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 12, n. 4, p. 375-391, 2001.

8. CONCLUSÃO GERAL

No presente estudo, buscamos avaliar os efeitos metabólicos da adição na dieta de diferentes óleos (soja, oliva, peixe e linhaça) em roedores com e sem indução de lesões pré-neoplásicas. O óleo de peixe, oliva e linhaça apresentaram diferentes respostas quando comparado com o controle soja, na preservação da mucosa intestinal, na proliferação de linfócitos, nos parâmentros bioquímicos, no perfil dos ácidos graxos incorporados nos tecidos e na expressão de mediadores do processo inflamatório em animais com e sem indução do carcinógeno. A oferta de dietas normolipídicas ricas em ácidos graxos poliinsaturados da série ω3, como óleo de peixe e linhaça, fontes de α-linolênico, EPA e DHA apesar de pertencerem ao mesmo grupo ω3, apresentaram um efeito quimioprotetor diferenciado. Assim, entre as fontes lipídicas avaliadas, o óleo de peixe exerceu efeito benéfico importante nos roedores com e sem indução de lesões pré-neoplásicas. Há necessidade de maiores estudos sobre esses ácidos graxos separadamente, para melhor manipulação dietética desses óleos ou alimentos fonte, visando conhecer seus benefícios à saúde.

ANEXOS

8.1. Anexo I

Tratamentos	Amostra	Concentração RNA total µg/mL	Razão das Absorvâncias Abs260 /Abs 280*
Controle (-)	1	254,94	2,10
	2	470,57	2,25
	3	6556,59	1,81
	4	460,43	1,69
	5	554,04	1,90
Controle (+)	1	4135,29	1,74
	2	1313,69	1,74
	3	6279,44	1,88
	4	5782,78	1,90
	5	2683,19	1,77
Oliva	1	931,04	1,84
	2	3997,76	1,79
	3	1194,18	2,10
	4	2417,13	1,75
	5	1917,94	1,74
Peixe	1	1450,81	1,88
	2	1607,77	1,79
	3	2160,06	1,74
	4	1183,76	1,82
Linhaça	1	2141,63	1,90
	2	2273,59	1,85
	3	3310,34	1,70
	4	3225,93	1,72
	5	2348,58	1,72

* Razão da absorvância do ácido nucléico (260nm) pela absorvância da proteína (280nm).

8.2. Anexo II

Sequência dos “primers” e propriedades de reação.

Gene	Seqüências Sense e Anti-sense	tA (ºC)[1]	tM (ºC)[2]	pb[3]
B-actina	ATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGC AGCATTTGCCCTGCACGATGGAGGG	56	75	607
TGF-β	GACCTGGGCACCATCCATGA CTGCTCCACCTTGGGCTTGCGACCCAC	58	77	400
IL-8	CTCCAGCCACACTCCAACAGA CACCCTAACACAAAACACGAT	57	68	670
MCP-1	ATGCAGGTCTCTGTCACGCTTCTGGGC CTAGTTCTCTGTCATACTGGTCAC	58	85	407

[1] Temperatura de anelamento
[2] Temperatura de melting
[3] Pares de base

8.3. Anexo III

CERTIFICADO

A Comissão de Ética do DVT / UFV certifica que o processo n. ° 12 / 2008, intitulado "**Avaliação do perfil e peroxidação lipídica em ratos wistar submetidos a dietas à base de óleo de soja, linhaça, oliva e peixe com e sem indução de câncer de cólon**" está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em reunião de 31/07 /2008.

CERTIFICATE

The Ethic Committee of DVT / UFV certify that the process number 12/ 2008, named " Assessement of the profile and lipid peroxidation in Wistar rats fed diets with soil oil, flaxseed, oliva and fish with and without induction of colon cancer" is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation. This Departmental Commission on July 31, 2008 approved this process.

Viçosa, 31 de julho de 2008

Presidente da Comissão de Ética
Depto. de Veterinária / UFV

8.4. Anexo IV

DECLARAÇÃO

DECLARO para os devidos fins que o artigo intitulado:

Flaxseed, olive and fish oil influence plasmatic lipids, lymphocyte migration and morphometry of the intestinal of Wistar rats

dos autores

Damiana Diniz Rosa , Regiane Lopes de Sales, Luis Fernando de Sousa Moraes, Fabíola Cesário Lourenço, Clóvis Andrade Neves, Céphora Maria Sabarense, Sônia Machado Rocha Ribeiro, Maria do Carmo Gouveia Peluzio

Foi aceito para ser publicado no n.3 maio-junho de 2010 da Revista Acta Cirúrgica Brasileira.

Prof. Saul Goldenberg

(Editor)