

ANTÔNIO FREDERICO DE FREITAS GOMIDES

**EFEITO DA FIBRA COMO ALIMENTO FUNCIONAL NA PREVENÇÃO DA
INCIDÊNCIA DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES (FCA) NO CÓLON DE
CAMUNDONGOS INDUZIDA POR 1,2-DIMETILHIDRAZINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

ANTÔNIO FREDERICO DE FREITAS GOMIDES

**EFEITO DA FIBRA COMO ALIMENTO FUNCIONAL NA PREVENÇÃO DA
INCIDÊNCIA DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES (FCA) NO CÓLON DE
CAMUNDONGOS INDUZIDA POR 1,2-DIMETILHIDRAZINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 30 de agosto de 2010.

Prof^o. Leandro Licursi de Oliveira
(Coorientador)

Prof^a. Maria do Carmo G. Peluzio
(Coorientadora)

Prof^a. Jacqueline Isaura A. Leite

Prof^o. Luciano Gomes Fietto

Prof^o. Sérgio Oliveira de Paula
(Orientador)

A caminhada foi longa, passei quatro anos de intensas emoções e dedicação. Os desafios foram grandes, mas sobrava vontade de vencer. Durante esse tempo foram muitas as lutas e as descobertas, mas o mais importante foi à realização do meu sonho. Hoje posso olhar para trás e constatar minha evolução ao longo dos anos e brindar o início de um longo caminho de realizações que ainda está por vir.

“Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar”. O que antes era um sonho, hoje, é realidade. O desejo de acertar me impulsionou e o medo de errar me fortaleceu. A compreensão de alguns me confortou, os obstáculos impostos me desafiou. E aqui cheguei, ciente de que esta é apenas a primeira vitória de inúmeras que conquistarei. Manifesto o meu carinho e gratidão a todos que contribuíram para a realização deste sonho.

"É preciso encontrar as coisas certas da vida para que ela tenha o sentido que se deseja. Assim, a escolha de uma profissão também é a arte de um encontro, porque uma vida só adquire vida quando a gente empresta nossa vida para o resto da vida". (Vinícius de Moraes). O tempo passou... E, hoje, mais uma fase de minha vida chega ao fim, iniciando-se uma nova, cheia de responsabilidades e decisões. Estes quatro anos não serviram apenas para formar um profissional, mas também para me ensinar a lidar com as situações difíceis com criatividade. Dedico esta conquista a todas as pessoas que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

Aos meus Pais

A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu trilhasse sem medo e cheio de esperança, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Pela longa espera e compreensão durante minhas longas viagens, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que me acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras.

Amo vocês!

Mãe (In Memoriam)

"Quando eu defender a minha tese e receber o meu diploma, sentir-te-ei ao meu lado: lindo, sorrindo feliz. Sentirei tua mão carinhosa afagar meus cabelos e, nesse instante, te abraçarei em silêncio, sorrirei para você e deixarei fluir esta emoção em misto de imensa alegria e saudade e hei de ser fiel aos teus princípios, pois tudo o que me ensinaste é fruto de todo este meu trabalho."

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Geral, ao curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural e a Secretaria de Estado de Educação de Minas Gerais pela oportunidade de ter realizado o curso.

Ao professor e orientador Sérgio Oliveira de Paula pela generosidade, amizade, infundável disponibilidade como orientador e a oportunidade dada para prosseguir com essa tese após a aposentadoria do ilustre professor José Mario da Silveira Mezêncio a quem agradeço por ter me orientado durante os dois primeiros anos do doutorado.

A professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio pelo apoio irrestrito na realização dessa tese, aos conselhos e conhecimentos a mim prestados com tanto carinho e dedicação. Teria tantas palavras para dedicar a você Carminha que dariam outra tese sobre o que é uma verdadeira amizade, muito obrigado.

Ao professor Leandro Licursi de Oliveira pela amizade e presteza de seus conhecimentos que acrescentaram para enriquecer esse estudo.

À professora Cristina Dantas Vanetti, pela generosidade de ceder os prebióticos utilizados nesse estudo e presteza de seus conhecimentos.

À professora Célia Lúcia de Lucis Fortes Ferreira que contribuiu nas análises microbiológicas e conhecimentos prestados.

Ao professor e amigo Rogério Pinto da Univiçosa e Sebastião Tavares da UFV pela colaboração das importantes análises estatísticas realizadas nessa tese.

Aos professores do Curso de Biologia Celular e Estrutural que contribuíram para minha formação educacional e pessoal.

À Débora Comastri pela amizade e apoio irrestrito na realização deste trabalho.

Aos funcionários Cassiano, Paulo Monteiro, Antônio de Pádua e João pelo apoio e amizade. Ao Juliano e ao Sr. Adão do Biotério Central da UFV pelo apoio na disponibilização dos camundongos utilizados nessa tese.

Aos colegas Damiana, Karina, Carolina, Cíntia, Tatiana, Luciana, Sandra e Alexandre do Laboratório de Bioquímica Nutricional pela amizade e ajuda na realização dos experimentos. A Karina e Joice do laboratório de Culturas Láticas.

A todos os colegas pelo apoio nos estudos.

Aos meus irmãos amo vocês, sobrinhos e a minha noiva Lucia Xavier pelo carinho e apoio nessa longa jornada. A todos que colaboraram de alguma forma.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

ANTÔNIO FREDERICO DE FREITAS GOMIDES, filho de Edgard de Godoy Gomides e Helena de Freitas Gomides, nasceu em Ponte Nova, Estado de Minas Gerais no dia 06 de agosto de 1972.

Em agosto de 1993 ingressou na Universidade Federal de Ouro Preto onde trabalhou sob orientação do professor Marcelo Eustáquio da Silva como Bolsista PIBIC/CNPQ e em julho de 1998 graduou-se em Nutrição.

Em março de 1999 ingressou na Universidade do Grande Rio onde em janeiro de 2000 concluiu o Programa Especial de Formação Pedagógica para Docentes, habilitação em Química, equivalente a Licenciatura Plena.

Nos anos de 2002 e 2006 assumiu os cargos efetivos de professor de Química do Ensino Médio da Secretaria de Estado de Educação de Minas Gerais na cidade de Ponte Nova, Minas Gerais, onde também leciona na Faculdade Dinâmica do Vale do Piranga (FACIP) a disciplina de Biossegurança. É professor da União de Ensino Superior de Viçosa (UNIVIÇOSA), onde leciona as disciplinas de Biologia Celular, Fisiologia Humana e Imunologia.

Em agosto de 2004, iniciou o Curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa concluindo em agosto de 2006.

Em outubro de 2006, iniciou o Curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
RESUMO (CAPÍTULO I).....	3
CAPÍTULO I: Câncer colorretal (CCR): epidemiologia, fatores de risco, marcadores inflamatórios e a prevenção através do uso de prebióticos.....	4
1. Introdução.....	4
2. Epidemiologia e fatores de risco.....	5
3. Marcadores inflamatórios associados ao CCR.....	7
4. Uso de prebióticos na prevenção do CCR.....	10
5. Conclusão.....	14
6. Referências.....	15
RESUMO (CAPÍTULO II).....	21
CAPÍTULO II: A linhaça e seus efeitos na proteção do câncer colorretal (CCR).....	22
1. Introdução.....	22
2. A linhaça e o CCR.....	24
3. Conclusão.....	28
4. Referências.....	29
RESUMO (CAPÍTULO III).....	32
CAPÍTULO III: Prebióticos e farelo de linhaça desengordurada previnem o aparecimento de focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon de camundongos Balb/C.....	33
1. Introdução.....	33
2. Métodos.....	34
2.1. Animais e dieta.....	34
2.2. Indução do aparecimento de FCA com a administração de DMH e coleta de material.....	34
2.3. Preparação do tecido para contagem de FCA.....	35
2.4. Processamento do baço para quantificação de linfócitos CD4 e CD8.....	35
2.5. Atividade da catalase no fígado e intestino.....	36
2.6. RT-PCR.....	36
2.7. Contagem de <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i> e anaeróbios totais.....	38
2.8. Extração e dosagem de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acético, propiônico e butírico nas fezes do cólon e da gaiola por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).....	38
2.9. Peso dos órgãos.....	39
2.10. Análise estatística.....	39
3. Resultados.....	40
3.1. Contagem de focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon proximal, médio e distal.....	40
3.2. Atividade da catalase no fígado e no cólon distal.....	40
3.3. Citometria de fluxo do baço.....	40
3.4. Peso dos órgãos.....	40
3.5. RT-PCR.....	44
3.6. Quantificação de <i>Bifidobacterium spp.</i> , e <i>Clostridium spp.</i> , anaeróbios totais, medida do pH fecal.....	44
3.7. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acético, propiônico e	

butírico.....	44
4. Discussão.....	46
5. Conclusão.....	54
6. Referências.....	55
RESUMO (CAPÍTULO IV).....	60
CAPÍTULO IV: Farelo de linhaça desengordurado previne o aparecimento de focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon de camundongos Balb/C	61
1. Introdução.....	61
2. Métodos.....	63
2.1. Animais e dieta.....	63
2.2. Indução do aparecimento de FCA com a administração de DMH e coleta de material.....	63
2.3. Preparação do tecido para contagem de FCA.....	64
2.4. Processamento do baço para quantificação de linfócitos CD4 e CD8.....	64
2.5. Atividade da catalase no fígado e intestino.....	65
2.6. RT-PCR.....	65
2.7. Contagem de <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i> e anaeróbios totais.....	67
2.8. Extração e dosagem de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acético, propiônico e butírico nas fezes do cólon e da gaiola por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).....	67
2.9. Peso dos órgãos.....	68
2.10. Análise estatística.....	68
3. Resultados.....	69
3.1. Contagem de focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon proximal, médio e distal.....	69
3.2. Atividade da catalase no fígado e no cólon distal.....	69
3.3. Citometria de fluxo do baço.....	69
3.4. Peso dos órgãos.....	69
3.5. RT-PCR.....	69
3.6. Quantificação de <i>Bifidobacterium spp.</i> , e <i>Clostridium spp.</i> , anaeróbios totais, medida do pH fecal.....	73
3.7. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acético, propiônico e butírico.....	73
4. Discussão.....	75
5. Conclusão.....	81
6. Referências.....	82
RESUMO (CAPÍTULO V).....	87
CAPÍTULO V: Uso do farelo de linhaça desengordurado na avaliação dos focos de criptas aberrantes (FCA) e modificações bioquímicas em camundongos C57BL/6 induzidos a alterações no cólon com 1,2-dimetilhidrazina (DMH).....	88
1. Introdução.....	88
2. Métodos.....	91
2.1. Animais e dieta.....	91
2.2. Indução do aparecimento de FCA com a administração de DMH e coleta de material.....	91
2.3. Preparação do tecido para contagem de FCA.....	92
2.4. Atividade da catalase no fígado e intestino.....	92
2.5. RT-PCR.....	93
2.6. Extração e dosagem de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acético, propiônico e butírico nas fezes do cólon e da gaiola por HPLC (Cromatografia Líquida de Alto desempenho).....	95

2.8. Peso do fígado.....	95
2.9. Análise estatística.....	96
3. Resultados.....	96
3.1. Contagem de focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon proximal, médio e distal.....	96
3.2. Atividade da catalase no fígado e no cólon distal.....	96
3.3. Peso do fígado.....	96
3.4. RT-PCR.....	99
3.5. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acético, propiônico e butírico.....	99
4. Discussão.....	101
5. Conclusão.....	108
6. Referências.....	109
2. CONCLUSÕES GERAIS.....	115

RESUMO

GOMIDES, Antônio Frederico de Freitas, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2010. **Efeito da fibra como alimento funcional na prevenção da incidência de focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon de camundongos induzida por 1,2-dimetilhidrazina.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientadores: Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Leandro Licursi de Oliveira.

A utilização de dietas saudáveis tem sido um grande aliado na prevenção e tratamento de diversas enfermidades, incluindo o câncer colorretal (CCR), uma doença que afeta grande parte da população mundial, configurando-se como um problema de saúde pública. Fatores genéticos e ambientais são apontados como as principais causas do CCR. Dentre os ambientais podemos destacar os dietéticos. O uso de prebióticos como uma das alternativas na prevenção do CCR vem ganhando cada vez mais o apoio da comunidade científica. Prebióticos são fibras solúveis que reduzem o risco de desenvolvimento de CCR pela produção de metabólitos protetores, como por exemplo, os ácidos graxos de cadeia curta como o acetato, propionato e o butirato. Os prebióticos influenciam também no crescimento de bactérias ácido-láticas e bifidobactérias proporcionando efeito inibitório em muitas bactérias que produzem enzimas carcinogênicas. A linhaça também é um alimento benéfico na prevenção do CCR sendo um componente alimentar rico em ácidos graxos essenciais que podem funcionar como antiinflamatório, proporcionar a diminuição da proliferação celular e induzir a apoptose em células cancerosas. Outro componente da linhaça são as fibras e compostos associados que podem ser convertidos em fitoquímicos biologicamente ativos, por bactérias aeróbias facultativas presentes no cólon de mamíferos podendo diminuir a atividade de enzimas pró-carcinogênicas e aumentar a atividade de enzimas que atuam no processo de detoxificação celular e proteção contra o câncer. A linhaça está disponível no mercado na forma de grãos integrais, farelo e similares. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos das fibras (frutooligossacarídeo e inulina) e farelo de linhaça desengordurado no cólon de camundongos Balb/C e do farelo de linhaça desengordurado comparando camundongos C57BL/6 macho e fêmea induzidos ao aparecimento de focos de criptas aberrantes (FCA) com 1,2-dimetilhidrazina (DMH) sendo realizadas técnicas histológicas, bioquímicas e de biologia molecular para a avaliação dos resultados. Nos camundongos Balb/C os resultados desse estudo permitiram concluir que a inulina possui maior eficácia na prevenção do aparecimento de FCA com número menor ou igual a três criptas no cólon proximal, médio e distal. No cólon médio e distal a inulina também mostrou-se eficaz na prevenção da incidência de

FCA com número maior que três criptas. A baixa expressão das proteínas p53, p21 e p16 no cólon distal no tratamento com inulina não afetou o seu efeito preventivo desse prebiótico, sugerindo que outros mecanismos de prevenção de FCA podem estar envolvidos. Para o aparecimento de FCA com número menor ou igual a três criptas no cólon proximal, médio e distal o frutooligossacarídeo foi eficaz. Para FCA com número maior que três criptas no cólon médio e distal o frutooligossacarídeo também mostrou-se eficaz. Essa eficácia pode ser atribuída à expressão aumentada do gene da proteína p16 no cólon distal dos camundongos. Para o cólon médio e distal o farelo de linhaça desengordurado mostrou-se eficaz na prevenção do aparecimento de FCA com número menor ou igual a três criptas. Para a incidência de FCA com número maior que três criptas no cólon médio e distal o farelo de linhaça desengordurado também possui efeitos preventivos. Essa eficácia no cólon distal pode ser atribuída à expressão aumentada do gene da proteína p53. Quando comparamos os diferentes sexos de camundongos C57BL/6 utilizando somente o farelo de linhaça desengordurado, esse alimento apresentou efeitos preventivos no cólon proximal, médio e distal dos camundongos machos diminuindo a incidência de FCA com número menor ou igual a três criptas. Para o cólon distal essa eficácia pode ser atribuída ao aumento da expressão do gene da proteína p53. Nas fêmeas o farelo de linhaça desengordurado não protegeu o cólon distal da incidência de FCA com número menor ou igual a três criptas. Para FCA com número maior que três criptas em ambos os sexos o farelo de linhaça desengordurado não previniu o aparecimento de FCA. Diante de tais evidências encontradas no presente estudo concluímos que os prebióticos frutooligossacarídeo ou inulina e o farelo de linhaça desengordurado são fibras dietéticas efetivas na prevenção do desenvolvimento do CCR, no entanto mais estudos, devem ser realizados para elucidar outros mecanismos que possam estar envolvidos nesse processo tanto na linhagem de camundongos Balb/C que receberam prebióticos e farelo de linhaça desengordurado na dieta, bem como nos camundongos C57BL/6 que foram alimentados com o farelo de linhaça desengordurado.

ABSTRACT

GOMIDES, Antônio Frederico de Freitas, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, august, 2010. **Effect of fiber as a functional food in preventing the incidence of aberrant crypt foci (ACF) in colon of mice induced by 1,2-dimethylhydrazine.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-Advisers: Maria do Carmo Gouveia Peluzio and Leandro Licursi de Oliveira.

The use of healthy diets has been a great ally in the prevention and treatment of various diseases, including colorectal cancer (CRC), a disease that affects much of the world population, configuring it as a public health problem. Genetic and environmental factors are cited as the main causes of the CRC. Among the diet can highlight the environmental. The use of probiotics as an alternative in the prevention of CRC is gaining more support from the scientific community. Prebiotics are soluble fibers that reduce the risk of CRC by the production of protective metabolites, such as the short-chain fatty acids such as acetate, propionate and butyrate. Prebiotics also influence the growth of lactic acid bacteria and bifidobacteria providing inhibitory effect in many bacteria that produce carcinogenic enzymes. Flaxseed is also a food beneficial in preventing the CRC being a food source rich in essential fatty acids that can function as an anti-inflammatory, to the decrease in cell proliferation and induce apoptosis in cancer cells. Another component of flaxseed is associated with the fibers and compounds that can be converted into biologically active phytochemicals, facultative aerobic bacteria present in the colon of mammals and may decrease the activity of pro-carcinogenic and increase the activity of enzymes that act in the process of cellular detoxification and protection against cancer. Flaxseed is available in the market as whole grains, bran and the like. The aim of this study was to investigate the effects of fiber (inulin and fructooligosaccharides) and defatted flaxseed meal in the colon of Balb/C and defatted flaxseed meal compared C57BL 6 male and female induced the appearance of aberrant crypt foci (ACF) with 1,2-dimethylhydrazine (DMH) was performed histological techniques, biochemical and molecular biological evaluation of results. In Balb/C results of this study showed that inulin has a greater efficacy in preventing the onset of ACF with fewer or equal to three crypts in the proximal colon, middle and distal. In the middle and distal colon inulin also was effective in preventing the incidence of ACF with number greater than three crypts. The low expression of p53, p21 and p16 in the distal colon in the treatment with inulin did not affect its preventive effect of prebiotics, suggesting that other mechanisms for the prevention of ACF may be involved. For the appearance of ACF in three equal number memor or crypts in the proximal colon, the

middle and distal fructooligosaccharides was effective. This efficiency can be attributed to increased gene expression of p16 protein in the distal colon of mice. For the middle and distal colon the defatted flaxseed meal was effective in preventing the onset of ACF with fewer or equal to three crypts. For the incidence of ACF in number greater than three crypts in the middle and distal colon the defatted flaxseed meal also has preventive effects. This efficiency in the distal colon can be attributed to increased gene expression of p53 protein. When comparing the different sexes of C57BL/6 using only the defatted flaxseed meal, that food had preventive effects in the proximal colon, middle and distal male mice decreases the incidence of ACF with fewer or equal to three crypts. For distal colon this effectiveness can be attributed to increased gene expression of p53 protein. In females the defatted flaxseed meal did not protect the distal colon in the incidence of ACF with fewer or equal to three crypts. ACF for a number higher than three crypts in both sexes the defatted flaxseed meal not prevented the emergence of ACF. Faced with such evidence found in this study, the prebiotics inulin and fructooligosaccharides or defatted flaxseed bran dietary fibers are effective in preventing the development of CRC, but further studies should be undertaken to elucidate other mechanisms that may be involved in this process both in the line of Balb/C mice receiving prebiotics and defatted flaxseed meal in the diet, as well as in C57BL/6 mice that were fed the defatted flaxseed meal.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Diariamente os indivíduos estão expostos a uma diversidade de fatores ambientais e físicos agressores ao organismo e que acabam influenciando na qualidade de vida. Dentre os fatores ambientais destaca-se uma dieta inadequada. Dessa forma é fundamental que a população se conscientize da importância de alimentos contendo substâncias nutritivas que auxiliam na promoção da saúde e na prevenção de uma diversidade de doenças. Dentre os componentes dietéticos a fibra alimentar constitui um grupo de componentes funcionais importantes que podem auxiliar na melhora do estado nutricional.

Uma ingestão adequada de fibras apresenta efeitos benéficos contra a incidência de uma diversidade de doenças, incluindo o câncer colorretal. Esse tipo de câncer, afeta indivíduos em diversos países, é a terceira neoplasia responsável por óbito na população mundial. Presume-se que uma dieta inadequada seja um fator de predisposição para o câncer colorretal.

Determinados tipos de fibras solúveis e insolúveis geram um efeito protetor contra o câncer em regiões específicas do intestino.

Uma das alternativas de proteção é o uso das fibras não-fermentáveis como a celulose ou as fermentáveis, tais como os prebióticos frutooligossacarídeos e inulina, que podem gerar suplementos alimentares digeríveis por bactérias no cólon e que beneficiam o hospedeiro, proporcionando melhora na saúde do mesmo.

A linhaça também é uma importante fonte de fibras e outros componentes funcionais como os ácidos graxos essenciais e as lignanas, que possuem efeitos benéficos na prevenção de diversas doenças incluindo o câncer colorretal.

Alguns mecanismos para explicar o papel das fibras na prevenção do processo de carcinogênese do cólon incluem os efeitos fisiológicos e mecânicos das fibras, a capacidade físico-química da fibra de se ligar a componentes do suco digestivo bem com de servir como substrato para a fermentação das bactérias presentes no cólon, influenciando a composição da microbiota intestinal e gerando produtos finais fisiologicamente ativos.

Considerando que o câncer colorretal no Brasil é o quarto tipo de câncer que afeta a população e sendo também semelhante à frequência mundial desta doença, e que a prevenção e o diagnóstico precoce, como na maioria das neoplasias, é o melhor investimento quando se trata de saúde, a proposta desse estudo foi utilizar o farelo de linhaça desengordurado e os prebióticos frutooligossacarídeos (FOS) e inulina em

camundongos induzidos ao aparecimento de focos de criptas aberrantes (FCA) ou lesões pré-neoplásicas, para esclarecer o(s) mecanismo(s) em que as fibras como alimentos funcionais poderão atuar na diminuição dessas lesões no cólon, utilizando técnicas histológicas, bioquímicas e de biologia molecular.

RESUMO (CAPÍTULO I)

Gomides, Antônio Frederico de Freitas, D.S. Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2010. **Câncer colorretal (CCR): epidemiologia, fatores de risco, marcadores inflamatórios e a prevenção com o uso dos prebióticos.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientadores: Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Leandro Licursi de Oliveira.

A utilização de dietas saudáveis tem sido um grande aliado na prevenção e tratamento de diversas enfermidades, incluindo o câncer colorretal (CCR), uma patologia que afeta grande parte da população mundial, configurando-se como um problema de saúde pública. Fatores genéticos e ambientais são apontados como as principais causas do CCR. Dentre os ambientais podemos destacar os dietéticos que incluem como causa do CCR uma alimentação com alta ingestão de gorduras saturadas como fonte energética, o uso de alimentos altamente calóricos (os carboidratos de um modo geral), o baixo consumo de frutas e vegetais, principalmente os ricos em fibras e a ingestão de carne vermelha submetida a altas temperaturas. Mediante estas evidências, é importante a conscientização da população em geral de que, uma dieta saudável é de vital importância na prevenção desta doença, sendo a utilização de fibras apontada em vários estudos como uma das medidas alternativas na prevenção do CCR. A presente revisão discorre sobre a epidemiologia, fatores de risco, marcadores inflamatórios e a prevenção do CCR. O uso de prebióticos como uma das alternativas na prevenção do CCR vem ganhando cada vez mais o apoio da comunidade científica. Prebióticos são fibras solúveis que reduzem o risco de desenvolvimento de CCR pela produção de metabólitos protetores, como por exemplo, os ácidos graxos de cadeia curta como o acetato, propionato e o butirato. Os prebióticos influenciam também no crescimento de bactérias ácido-láticas e bifidobactérias proporcionando efeito inibitório em muitas bactérias que produzem enzimas carcinogênicas.

CAPÍTULO I

Câncer colorretal (CCR): epidemiologia, fatores de risco, marcadores inflamatórios e a prevenção com o uso dos prebióticos

1. Introdução

O câncer colorretal é uma doença que afeta grande parte da população mundial (Santos Júnior, 2007). A sua incidência vem aumentando em diversos países ao longo dos últimos anos, devido as mais diversificadas etiologias (Ahmed, 2003; Habr-Gama, 2005; INCA, 2009). Presume-se que uma dieta inadequada seja um dos fatores de predisposição para esta neoplasia (Brouns et al., 2002; Rubio, 2002; Sanjoaquin et al., 2004; Rose et al., 2007).

Uma das alternativas na prevenção do câncer colorretal tem sido o uso dos prebióticos (Bolognani et al., 2001; Manning & Gibson, 2004; Rose et al., 2007). Os prebióticos são suplementos alimentares não digeríveis que beneficiam o hospedeiro por estimulação seletiva da microbiota intestinal, promovendo o crescimento e a atividade de um número limitado de bactérias no cólon, proporcionando melhora na saúde do hospedeiro (Tuohy et al., 2003).

Os prebióticos quando fermentados por bactérias da microbiota geram ácidos graxos de cadeia curta como o acético, propiônico e butírico (Davie, 2003; Manning & Gibson, 2004; Gupta et al., 2006; Rose et al., 2007). Estudos recentes indicam que esses componentes são eficazes na prevenção do câncer de cólon devido aos mais diversificados efeitos no câncer, incluindo a inibição da progressão do ciclo celular ou desencadeando a morte celular programada (Tan et al., 2008). Estes ácidos graxos de cadeia curta possuem a capacidade de ativar genes que codificam as proteínas responsáveis por controlar a proliferação celular ou proteger o genoma (Hughes & Rowland, 2001; Munjal et al., 2009).

Dentre esses prebióticos destacam-se os frutooligossacarídeos e a inulina. Dados da literatura sugerem que tais componentes são eficazes na prevenção do câncer colorretal (Reddy et al., 1997; Bolognani et al., 2001; Rafter et al., 2007).

2. Epidemiologia e fatores de risco

Em termos de incidência, 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. Cerca de 9,4%, equivalendo a um milhão de casos novos, de todos os cânceres são de cólon e reto. Nos últimos anos a incidência de CCR parece ter atingido um platô em relação à distribuição na população nas áreas de alto risco, e parece aumentar nas áreas antes consideradas de baixo risco. Os padrões geográficos são bem similares entre homens e mulheres; porém o câncer de reto é cerca de 20 a 50% maior em homens na maioria das populações (Ahmed, 2003, INCA 2009).

A cada ano, no mundo, é diagnosticado cerca de um milhão de casos novos de CCR e conseqüentemente, neste mesmo período em que há meio milhão de mortes, conseqüentes (Santos Júnior, 2007).

O CCR apresenta incidência variável nos diferentes continentes e países, predominando principalmente nos economicamente mais ricos e industrializados como a América do Norte, a Europa, a Nova Zelândia e a Austrália (Habr-Gama, 2005).

No Brasil o câncer em geral configura-se como problema de saúde pública de dimensões nacionais. Com o aumento da expectativa de vida do povo brasileiro e com a progressiva industrialização e globalização, as neoplasias ganharam importância crescente no perfil de mortalidade do país, ocupando o segundo lugar como causa de óbito (Hermsdorff & Ribeiro, 2005).

Em 2010, são esperados 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil). O número de casos novos de CCR estimados, no ano de 2010 no Brasil, será de 13.310 casos em homens e de 14.800 em mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto em homens é o terceiro mais frequente nas regiões Sul (21/100.000) e Sudeste (19/100.000). Na Região Centro-Oeste (11/100.000) ocupa a quarta posição. Nas regiões Nordeste (5/100.000) e Norte (4/100.000) ocupam a quinta posição. Para as mulheres, é o segundo mais frequente nas regiões Sul (22/100.000) e Sudeste (21/100.000); o terceiro nas regiões Centro-Oeste (11/100.000) e Nordeste (6/100.000), e o quinto na região Norte (4/100.000) (Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2009).

Ocorreu uma tendência crescente da mortalidade nas capitais das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste e na população acima de 60 anos e principalmente entre indivíduos do sexo masculino. Esse fato deve-se provavelmente, à maior exposição aos fatores de risco ambientais e à maior prevalência de cânceres letais entre os homens. As capitais das regiões Sul e Sudeste seguem tendência crescente. A mortalidade por neoplasia aumentou ao longo dos últimos anos, podendo se tornar a principal causa de morte no Brasil (Hermsdorff & Ribeiro, 2005).

Mais de 50% dos casos de CCR manifestam-se em indivíduos com mais de 60 anos (média de 67 anos), sendo o risco deste câncer tanto maior quanto maior a faixa etária (Habr-Gama, 2005; Neves et al., 2006).

O CCR aparece distribuído em diferentes níveis nas populações pelo mundo e vem se alterando com o passar do tempo. Populações que vivem em uma mesma comunidade com estilo de vida diferente entre seus indivíduos apresentam heterogênea distribuição de CCR. Imigrantes perdem rapidamente suas características e costumes do local de origem adquirindo os novos padrões e estilo de vida da comunidade para qual migraram, fator este que contribui para o aumento na taxa de CCR em determinada região (Boyle & Langman, 2000).

Nos Estados Unidos um estudo relacionando as condições socioeconômicas, raça e sexo, demonstrou que entre brancos houve uma diminuição significativa da incidência de CCR entre os anos de 1994 a 2004 de 3,3% em homens e de 2,8% entre as mulheres a cada ano. No entanto estes resultados somente foram observados em homens e mulheres que viviam em regiões de melhor poder socioeconômico. Entre homens negros a taxa de incidência de CCR foi estável entre os anos de 1992 a 2004 e diminuiu entre as mulheres negras em 2,5% ao ano entre os anos de 2000 a 2004 (Siegel et al., 2008).

Dos doentes com câncer do intestino grosso 63% vivem em países desenvolvidos, com igual distribuição, entre sexos, já para o câncer de reto ocorre predominância no sexo masculino (Santos Júnior, 2007).

Dentre outros fatores de risco para o CCR destacam-se dietas com base em gorduras animais, baixa ingestão de frutas, vegetais, cereais e cálcio, e ainda o consumo excessivo de álcool e o tabagismo. A prática de atividade física regular está associada a um baixo risco de desenvolvimento de CCR (INCA, 2009).

Na Alemanha um estudo realizado entre os anos de 1970 a 2000 sobre a mortalidade associada ao CCR demonstrou similaridades na taxa de mortalidade encontrada na população mundial com maior incidência entre mulheres do que homens.

O resultado deste estudo sugeriu que apesar da mortalidade ser menor entre homens, esta aumentou nos últimos anos indicando que isto possa estar relacionada ao tipo de atividade profissional que devido à modernização industrial demandou menor esforço físico por parte dos homens influenciando no aumento da incidência da mortalidade por CCR (Stang et al., 2007).

No Japão, pacientes portadores de CCR que não faziam atividade física, ingeriam bebidas alcoólicas, fumavam, ingeriam dieta hipercalórica e apresentavam índice de massa corporal acima dos padrões normais não apresentaram estatisticamente diferenças significativas na incidência de CCR quando comparados ao grupo com CCR que não tinham tais hábitos e índice de massa corporal dentro dos padrões normais (Wakai et al., 2006). Em outro estudo realizado na Suécia os autores não encontraram nenhuma relação entre dietas hipercalóricas, glicemia elevada e CCR (Larsson et al., 2006).

3. Marcadores inflamatórios associados ao CCR

Várias pesquisas são realizadas na busca de marcadores inflamatórios que tenham elevada sensibilidade e especificidade e que demonstrem um benefício clínico. Alguns possíveis marcadores vêm sendo explorados com maior frequência, como no CCR em que são utilizados o antígeno carcinoembrinário (CEA), as proteínas p53, timidilato sintase (TS), ciclinas, ciclooxigenase-2 (COX-2) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), entre outros (Srivastava et al., 2001).

O CEA é uma glicoproteína da família das imunoglobulinas expressa pelos tecidos normais durante os primeiros seis meses de vida fetal e que decai com o nascimento. Sua função é promover a adesão intercelular. A principal diferença entre o conteúdo de CEA nas células normais e neoplásicas aparenta ser muito mais quantitativa do que qualitativa. No entanto, estudos ultra-estruturais demonstraram que existem diferenças no padrão de distribuição celular do CEA quando se compara o tecido normal com o neoplásico. No câncer o CEA pode ser quantificado no plasma ou em tecidos e está associada a metástases. O CEA é o único marcador tumoral cuja sensibilidade e valor prognóstico foi definido para a aplicabilidade na prática clínica (Samara et al., 2007; Li et al., 2008). No entanto, os níveis sanguíneos de CEA são de pouco valor diagnóstico, pois atingem níveis significativos apenas depois que o tumor já atingiu tamanho considerável e muito provavelmente já apresenta disseminação. Além disso, níveis “positivos” de CEA podem ser produzidos por carcinomas de pulmão,

mama, ovário, bexiga urinária e próstata, assim como por desordens não-neoplásicas, como a cirrose alcoólica, pancreatite e colite ulcerativa (American Society of Clinical Oncology –ASCO, 1996; ASCO, 1998).

A progressão ordenada das células pelas várias fases do ciclo celular é dirigida pelas quinases dependentes de ciclinas (CdKs), que são ativadas pela ligação às ciclinas, assim chamadas devido à natureza cíclica de sua produção e degradação. Os complexos de ciclina-CdKs fosforilam as proteínas alvo que conduzem a célula através do ciclo celular. Enquanto as ciclinas despertam as CdKs, seus inibidores, que são muitos, silenciam as CdKs e exercem controle negativo sobre o ciclo celular (Carnero et al., 2002). Durante a carcinogênese do cólon ocorre um aumento na expressão das ciclinas na mucosa intestinal associado a anormalidades na progressão e regulação do ciclo celular (Hur et al., 2000).

As ciclinas D e E se ligam a G₁-CdK e G₁/S-CdK respectivamente para que estas proteínas possam se tornar ativas, e alterações na sua concentração ajudam a direcionar a montagem cíclica e a ativação dos complexos ciclina-CdK (Carnero, 2002). Problemas que afetam a expressão da ciclina D ou da CdK4 parecem ser um evento comum na transformação neoplásica (Han et al., 1999).

A progressão da fase G₁ do ciclo celular é mediada pela combinação da atividade da ciclina D1, que se liga a proteínquinases dependentes de ciclina CdK-4/6, e a ciclina E com CdK2 formando complexos que conduzem a fase S do ciclo celular (Coradini et al., 2002, Bardon et al., 2002).

A timidilato sintase (TS), é uma enzima de grande importância para a síntese de DNA, etapa fundamental na divisão celular, sendo um fator determinante para a sensibilidade a tratamentos quimioterápicos e a proteína p53 está relacionada à preservação da integridade do código genético celular através da ativação de proteínas de reparo do DNA (Popat et al., 2006). Em um estudo de correlação do valor prognóstico desses dois marcadores os autores não encontraram correlações clínicas entre a expectativa de vida e os altos ou baixos níveis de TS e p53, apesar de ambas as proteínas terem sido detectadas em todos os pacientes analisados (Li et al., 2008). Um estudo semelhante correlacionou a p53 com a ciclooxigenase-2 (COX-2) uma proteína expressa no trato gastrointestinal em baixos níveis, porém com elevada expressão no CCR e que está relacionada à angiogênese e à progressão da doença. Neste estudo verificou-se a expressão dessas proteínas em adenocarcinoma intestinal e mucosa adjacente sendo possível observar que proporcionalmente à progressão do estadiamento do tumor houve aumento da expressão destes marcadores, apesar destes dados não

demonstrarem diferença significativa, sugerindo que estes achados não podem suportar a hipótese de associação entre os marcadores p53 e COX-2 com o estadiamento do tumor de intestino (Felin et al., 2008).

Mutações no gene *TP53* são encontradas em cerca de metade de todos os cânceres humanos. O gene *TP53* age inibindo a transformação neoplásica por diferentes mecanismos: ativação da interrupção temporária do ciclo celular, indução da interrupção do ciclo celular de forma permanente, disparando a morte celular programada (apoptose) ou inibindo a angiogênese provavelmente por diminuir a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Sua detecção serve com um indicador do perfil genômico no CCR relacionado ao potencial de crescimento tumoral. Danos no gene *TP53* estão presentes em 75% dos casos de CCR sendo envolvido na conversão de adenoma para adenocarcinoma por impedir a ligação da proteína p53 mutada em sequências específicas do DNA, o que impossibilita ativação de genes adjacentes (Kinzler & Vogelstein, 1998; Hanahan & Weinberg, 2000; Vogelstein et al., 2000). O DNA danificado causa um aumento tanto na concentração como na atividade da p53, uma proteína reguladora de genes, que ativa a transcrição de um gene que codifica um inibidor de Cdk (CdkI) a proteína p21. A p21 se liga à G₁/S-Cdk, prevenindo que elas conduzam a célula para a fase S por inibir a fosforilação da retinoblastoma (Rb). O aprisionamento do ciclo celular em G₁ permite que a célula tenha tempo para reparar o DNA danificado antes de replicá-lo (Vogelstein et al., 2000).

Hábitos alimentares ruins e desordens metabólicas tais como diabetes e obesidade, são considerados responsáveis pela maioria dos casos esporádicos de CCR (Brouns et al., 2002). Acredita-se que o consumo excessivo de energia total eleva o nível de insulina circulante (levando à resistência à insulina) o que eleva a concentração de proteínas ligantes de insulina. Estudos in vitro e em animais sugerem que os membros do sistema do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFs), incluindo IGF-I, IGF-II, receptores de IGF-I e IGF-II (IGF-IR e IGF-IIR), e as proteínas ligantes de IGF (IGFBPs) podem ter um importante envolvimento no desenvolvimento e na progressão de neoplasias. Mais especificamente, as IGFs promovem a progressão do ciclo celular e inibem a apoptose tanto por ação direta em conjunto com outros fatores de crescimento como por ação indireta interagindo com outros sistemas moleculares intracelulares envolvidos na promoção e/ou progressão do câncer. Além disso, estudos epidemiológicos têm sugerido que concentrações elevadas das IGFs, independente das alterações nas IGFBPs, podem estar associadas a um aumento no risco de desenvolver determinadas neoplasias dentre elas o CCR (Spinola & Guerra-Júnior, 2005).

4. Uso de prebióticos na prevenção do CCR

Estudos epidemiológicos mostraram que indivíduos que consomem dietas ricas em gorduras e carnes são potenciais candidatos a desenvolver CCR (Boyle & Langman, 2000; Chão et al., 2005).

O CCR em indivíduos com dieta rica em gordura se desenvolve principalmente na região do cólon sigmóide (Benson, 2007). Em um estudo realizado em dez capitais brasileiras foi encontrada uma relação direta entre a mortalidade por CCR e a ingestão de alimentos como ovos, leite e carne bovina associados a um baixo consumo de fibras (Neves et al., 2006).

Pessoas que consomem dietas ricas em frutas e vegetais parecem ter uma baixa incidência de muitos cânceres, incluindo o CCR (Brous et al., 2002). Em um estudo realizado na Inglaterra entre os anos de 1982 a 1999 envolvendo 10.998 participantes revelou que 95 destes apresentaram diagnóstico de CCR, onde 39 eram vegetarianos e 56 não-vegetarianos, sugerindo que o consumo de vegetais e frutas diminuem o risco de CCR (Sanjoaquin et al., 2004).

A ingestão adequada de fibras insolúveis e solúveis criam condições em regiões específicas do intestino gerando um efeito protetor contra o CCR. Uma das alternativas dessa proteção é o uso dos prebióticos (Zheng et al., 2006).

Os prebióticos são definidos como um ingrediente alimentar não digerível que beneficia o hospedeiro por estimulação seletiva, crescimento e atividade de um número limitado de bactérias no cólon e assim melhora a saúde do hospedeiro. Estudos em animais e humanos revelaram que os prebióticos são seletivamente utilizados pelas bifidobactérias melhorando a microbiota intestinal e direcionando-a para uma composição de microrganismos benéficos (Zheng et al., 2006, Underwood et al., 2009; Gibson & Barret, 2010; Glade, 2010; Rodrigues-Cabezas et al., 2010). As bactérias alvo dos prebióticos são as bifidobactérias e lactobacilos. Os prebióticos de eficácia comprovada e comercialmente disponíveis são a inulina e os frutooligossacarídeos (FOS), ambos são considerados como alimentos normais, ingredientes alimentares ou fibras em diferentes países (Tuohy et al., 2003).

Recentemente os prebióticos têm recebido muita atenção por causa do seu efeito sobre a microbiota intestinal, destacando-se a inulina, que contém cadeias de duas a 70 unidades de frutose sendo encontrada em diversos alimentos, dentre os quais o alho, a banana, o tomate, a alcachofra de Jerusalém e a raiz de chicória. A inulina é geralmente utilizada em países desenvolvidos, como substituto do açúcar e/ou gordura devido as

suas características que a enquadram como alimento funcional e dietético (Roberfroid & Delzenne, 1998; Oliveira et al., 2006; Kolida et al., 2007).

O FOS contém de duas a nove unidades de frutose que são, às vezes, ligadas a uma unidade de glicose terminal originadas da hidrólise enzimática da inulina sendo encontrado na cebola, aspargo, alcachofra de Jerusalém e alho (Molis et al., 1996; Roberfroid & Delzenne, 1998, Patel & Goyal, 2010).

A fermentação de FOS e inulina necessita de enzimas específicas. Bifidobactérias fermentam FOS através da enzima β -fructosidase e sintetizam as inulinas para a degradação da inulina (Roberfroid & Delzenne, 1998)

Embora não haja um consenso entre diferentes estudos sobre a recomendação da dose diária dos prebióticos FOS e inulina, alguns deles sugerem que uma quantidade até 12 g dia⁻¹ é suficiente para aumentar a quantidade de bifidobactérias, bacterias ácido-láticas e diminuir o pH fecal com ação bactericida contra bactérias patogênicas (Kolida et al., 2007; Búrigo et al., 2007). Em um estudo recente, Ripoll et. al (2010), observaram que uma dose de 5 g dia⁻¹ de inulina extraída de chicória foi bem tolerada por pacientes saudáveis.

Os prebióticos reduzem o risco de desenvolvimento de câncer do cólon por mecanismos diretos e indiretos. Os indiretos incluem a produção de metabólitos protetores, como por exemplo, butirato. Os mecanismos diretos influem na modificação da composição da microbiota intestinal e no crescimento de bactérias ácido-láticas e bifidobactérias proporcionando efeito inibitório em muitas bactérias que produzem enzimas carcinogênicas (Rose et al., 2007; O'Keefe et al., 2009).

Os prebióticos possuem também a capacidade de ativar o sistema imunológico, Janardhana (2009), Patel & Goyal, (2010), Souza et al. (2010), de aumentar a secreção dos peptídeos, neurotensina e somatostatina auxiliando no processo de digestão, Russo et al. (2010), de aumentar a absorção de minerais, Lobo (2009), Wang (2010), de diminuir o colesterol e a peroxidação lipídica, Yen et al. (2010). Em crianças com menos de um ano os prebióticos diminuem a incidência de infecções intestinais, Bruzzese et al. (2009), bem como melhoram a qualidade de vida de pacientes com colite ulcerativa (Fujimori et al., 2009).

Em ratos induzidos ao CCR com azoximetano (AOM) e alimentados com oligofrutose e inulina foi observada a diminuição de focos de criptas aberrantes (FCA) ou lesões pré-neoplásicas, sendo o efeito mais pronunciado no grupo que recebeu dieta acrescida de inulina devido a esse prebiótico atingir a parte mais distal do cólon onde foi injetado o carcinógeno exercendo maiores efeitos neste local (Reddy et al., 1997).

Em outro estudo com ratos alimentados com oligofrutose e inulina observou-se aumento significativo de células apoptóticas por focos de criptas no cólon distal quando comparadas ao grupo controle, sugerindo o efeito protetor destes prebióticos nos estágios iniciais do câncer (Hughes & Rowland, 2001).

Cultura de células de carcinoma intestinal humano (HCT-116) e células pré-neoplásicas indutoras de adenomas (LT97) foram expostas concomitantemente e separadamente a três tratamentos. O primeiro com microbiota intestinal humana acrescida de inulina enriquecida com FOS incubado em anaerobiose, o segundo contendo um mix sintético com ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácido desoxicólico e o terceiro somente com microbiota intestinal humana, para avaliar a indução da apoptose. O ácido desoxicólico é um ácido biliar secundário que pode interferir nos efeitos biológicos proporcionado pelos AGCC bem como na atividade do crescimento celular, na atividade metabólica e na indução da apoptose. Estes autores observaram que o tratamento contendo microbiota intestinal humana mais inulina enriquecida com FOS aumentou significativamente a produção de AGCC diminuindo a concentração de ácido desoxicólico em ambas as linhagens de células. As células LT97 apresentaram maior sensibilidade ao crescimento e inibição da atividade celular. Além disso, houve um aumento significativo na taxa de apoptose dessas células. Esses dados sugerem que os efeitos benéficos do prebiótico inulina na prevenção do câncer de cólon é a sua capacidade de inibir o crescimento celular e induzir a apoptose em células pré-neoplásicas (Munjal et al., 2009).

O butirato produzido pela fermentação bacteriana dos prebióticos estimula a proliferação celular da mucosa, induz a diferenciação celular de colonócitos, aumenta o fluxo sanguíneo para a mucosa, a motilidade ileal, a secreção de muco pelo colón, a apoptose de células neoplásicas (Scheppach, 1994; Rose et al., 2007, Roy et. al., 2009) e de neutrófilos resistentes a apoptose que causam inflamação persistente (Aoyama et al., 2010) e proporcionam também a diminuição do estresse oxidativo celular (Hamer et al., 2009).

Um estudo utilizando células (HCT-116), demonstrou que células tratadas com butirato apresentaram bloqueio do ciclo celular por redução de proteínas regulatórias e efeito anti-metástase por aumento de proteínas associadas ao citoesqueleto fortalecendo esta estrutura. Foi observada também uma redução na expressão de proteínas responsáveis pela biossíntese de nucleotídeos bem como o aumento da expressão dos genes supressores de tumor e proteínas associadas com poros mitocondriais de transição

do citocromo C e modulação da expressão de chaperonas e proteossomos resultando na ativação das cascatas de apoptose (Tan et al., 2008).

O mais importante é lembrar que em termos de dieta, excluindo as condições mórbidas que determinam a restrição absoluta ou relativa de determinados grupos de alimentos, o “veneno” está muito mais na quantidade do que na qualidade daquilo que é ingerido e as medidas preventivas incluem as dietas “balanceadas” com uso limitado, não mais que 10% de gorduras saturadas como fonte energética, o uso regrado de alimentos altamente calóricos (os carboidratos de um modo geral); o aumento do consumo de frutas e vegetais, principalmente os ricos em fibras – evitando, se possível, o consumo exagerado de cereais – a diminuição da ingestão de carne vermelha submetida a altas temperaturas. Outras medidas profiláticas incluem a diminuição ou abolição do consumo de bebidas alcoólicas; com o abandono do hábito de fumar, inclusive na forma passiva; com o aumento das atividades físicas, de forma regular e com o controle do peso corporal (Santos Júnior, 2007; INCA, 2009).

5. Conclusão

Na presente revisão foi possível evidenciar que a fibra alimentar constitui um grupo de componentes funcionais importantes dos alimentos. Uma ingestão adequada de fibra está relacionada com a menor incidência de várias doenças incluindo o câncer colorretal.

Considerando que o câncer colorretal no Brasil tem apresentado tendência crescente em algumas regiões e a prevenção e o diagnóstico precoce, como na maioria das neoplasias, é o melhor investimento quando se trata de saúde deve-se estimular a inclusão na dieta de alimentos que se constituem em boas fontes dos prebióticos (FOS) e inulina sendo possível usufruir dos efeitos desses componentes como alimentos funcionais na prevenção do CCR.

Referências

- Ahmed, FE. Colon cancer: prevalence, screening, gene expression and mutation, and risk factors and assessment. **Journal of Environmental Science Health**, 2003;21:65-131.
- American Society of Clinical Oncology (ASCO). Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 1996;14(10):2843-877.
- American Society of Clinical Oncology (ASCO). Update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**. 1998;16:793-95.
- Aoyama, M.; Kotani, J.; Usami, M. Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways. **Nutrition**, 2010;26:653-61.
- Bardon, S.; Foussard, V.; Fournel, A. Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. **Cancer Letters**, 2002 ;181:187-94.
- Benson, AB. Epidemiology, disease Progression, and Economic Burden of Colorectal Cancer. **Supplement to Journal of Managed Care Pharmacy**, 2007;13(Suppl Sc):5-18.
- Bolognani, F.; Rumney, CJ.; Pool-Zobel, BL.; Rowland, I.R.. Effect of lactobacilli, bifidobacteria and inulin on the formation of aberrant crypt foci in rats. **European Journal of Nutrition**, 2001;40:293-300.
- Boyle P, Langman JS. ABC of Colorectal Epidemiology. **Clinical Review**, 2000;321:805-8.
- Brouns, F.; Kettlitz B.; Arrigoni E. Resistant starch and “the butyrate revolution”. **Trends in Food & Technology**, 2002;23:251-61.
- Bruzzese, E.; Volpicelli, M.; Squeglia, V.; Bruzzese, D.; Salvini, F.; Bisceglia, M.; Lionetti, P.; Cinquetti, M.; Iacono, G.; Amarri, S.; Guarino, A. A formula containing galacto- and fructo-oligosaccharides prevents intestinal and extra-intestinal infections: An observational study. **Clinical Nutrition**, 2009;28:156-61.
- Búrigo, T.; Martins, RL.; Fagundes, EBSM.; Vasconcelos, HCFF. Efeito bifidogênico do frutooligossacarídeo na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica. **Revista de Nutrição**, 2007;20:491-97.

- Carnero, A. Targeting the cell cycle for cancer therapy. **British Journal of Cancer**, 2002;87:129-33.
- Chao, A.; Michael, JT.; Cari, JC.; McCullough ML.; Jacobs EJ.; Flanders WD; Rodriguez, C.; Sinha, R.; Calle, E.E. Meat Consumption and Risk of Colorectal Cancer. **Journal of the American Medical Association**, 2005;293:172-182.
- Coradini, D.; Pellizzaro, C.; Abolafio, G.; Daidone, M.G. Sodium butyrate modulates cell cycle-related protein in HT29 human colonic adenocarcinoma cells. **Cell Proliferation**, 2002;33:139-46.
- Davie, J. R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **Journal of Nutrition**, 2003;133:2485-93.
- Felin, RC.; Rocha, AB.; Felin, IP; Regner, A; Grivicich, I. Expressão das Proteínas p53 e Cox-2 em Adenocarcinoma Intestinal e Mucosa Adjacente. **Revista Brasileira de Proctologia**, 2008;28:19-25.
- Fujimori, S.; Gudis, K.; Mitsui, K.; Seo, T.; Yonezawa, M.; Tanaka, S.; Tatsuguchi, A.; Sakamoto, C. A randomized controlled trial on the efficacy of synbiotic versus probiotic or prebiotic treatment to improve the quality of life in patients with ulcerative colitis. **Nutrition**, 2009;25:520-25.
- Gibson, PR.; Barrett, JS. The concept of small intestinal bacterial overgrowth in relation to functional gastrointestinal disorders. **Nutrition**, 2010;26:1038-43.
- Glade, MJ. Probiotics in Pediatric Medicine. **Nutrition**, 2010;26:1029-30.
- Gupta, N.; Martin, P. M.; Prasad, P. D.; Ganapathy, V. SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. **Life Sciences**, 2006;78:2419-25.
- Habr-Gama, A. CÂNCER COLORRETAL – A importância de sua prevenção. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2005;42:1-3.
- Hamer, HM.; Jonkers, DMAE.; Bast, A.; Vanhoutvin, SALW.; Fischer, MAJG.; Kodde, A.; Troost, FJ.; Venema, K.; Brummer, Robert-Jan M. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. **Clinical Nutrition**, 2009;28:88-93.
- Han, EKH.; Arber, SCNN.; Begemann, M.; Weinstein, B. Roles of cyclin D1 and related genes in growth inhibition, senescence and apoptosis. **Apoptosis**, 1999; 4: 213–219.
- Hanahan, D.; Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, 2000;100:57-70.

- Hermsdorff, HHM.; Ribeiro, RCL. Tendência da mortalidade por doenças neoplásicas em 10 capitais brasileiras, de 1980 a 2000. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 2005;8:407-18.
- Hughes, R.; Rowland, IR. Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans the rat colon. **Carcinogenesis**, 2001;22:43-47.
- Hur, K.; Kim, JR.; Yoon, BI.; Lee, JK; Choi, JH; Oh, GT; Kim, DY. Overexpression of cyclin D1 and cyclin E in 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced rat colon carcinogenesis. **Journal of Veterinary Science**, 2000;1(2):121-26.
- Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): **Instituto Nacional de Câncer (INCA)**; 2009. [citado em 2010 ago 16]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>.
- Janardhana, V.; Broadway, MM.; Bruce, MP.; Lowenthal, JW.; Geier, MS.; Hughes, RJ.; Bean, AGD. Prebiotics Modulate Immune Responses in the Gut-Associated Lymphoid Tissue of Chickens. **The Journal of Nutrition**, 2009;139: 1404-09.
- Kinzler, KW.; Vogelstein, B. Landscaping the cancer terrain. **Science**, 1998; 280:1036-37.
- Kolida, S.; Meyer, D.; Gibson, G. A double-blind placebo-controlled study to establish the bifidogenic dose of inulin in healthy humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, 2007;61:1189-95.
- Larsson, SC.; Giovannucci, E.; Wolk, A. Dietary Carbohydrate, Glycemic Index, and Glycemic Load in Relation to Risk of Colorectal Cancer in Women. **American Journal of Epidemiology**, 2006;165:256-61.
- Li, M.; LI, Ji-You.; Zhao, Ai-Lian., He, Jing-Sheng; Zhou, Li-Xin; Li, Ying-Ai.; Gu, Jin. Comparison of Carcinoembryonic Antigen (CEA) Prognostic value in serum and Tumor Tissue of Patients with colorectal Cancer. **Colorectal Disease**, "Postprint"; doi: 2008;10.1111/j.1463.1318.2008.01591.x.
- Lobo, AR.; Mancini Filho, J.; Alvares, EP.; Cocato, ML.; Colli, C. Effects of dietary lipid composition and inulin-type fructans on mineral bioavailability in growing rats. **Nutrition**, 2009;25:216-25.
- Manning, TS.; Gibson, GR. Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. **Best Practice Research Clinical Gastroenterology**, 2004;18(2):287-98.
- Molis, C.; Flourié, B.; Ouarne, F.; Gailing, MF.; Lartigue, S.; Guibert, A.; Bornet, F.; Galmiche, JP. Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. **American Journal Clinical**, 1996;64:324-8.

- Munjal, U.; Gleib, M.; Pool-Zobel, B. L.; Scharlau, D. Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis. **British Journal of Nutrition**, 2009;1-9.
- Neves, FJ.; Koifman, RJ.; Mattos, IE. Mortalidade por câncer de cólon e reto e consumo alimentar em capitais brasileiras selecionadas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 2006;9:112-20.
- O'Keefe, SJD.; Ou, J.; Aufreiter, S.; O'Connor, D.; Sharma, S.; Sepulveda, J.; Fukuwatari, T.; Shibata, K.; Mawhinney, T. Products of the Colonic Microbiota Mediate the Effects of Diet on Colon Cancer Risk. **The Journal of Nutrition**, 2009;139:2044-48.
- Oliveira, RA.; Oliveira, WP.; Park, KJ. Determinação da Difusividade Efetiva de Raiz de Chicória. **Engenharia Agrícola**, 2006;26(1):181-89.
- Patel, S.; Goyal, A. Functional oligosaccharides: production, properties and applications. **World Journal Microbiol Biotechnol**, 2010;DOI 10.1007/s11274-010-0558-5.
- Popat, S.; Chen, Z.; Zhao, D.; Pan, H.; Hearle, N.; Chandler, I.; Shao, Y.; Ahrne, W.; Houlston, RS. A prospective, blinded analysis of thymidylate synthase and p53 expression as prognostic markers in the adjuvant treatment of colorectal cancer. **Annals of Oncology**, 2006;17:1810-17.
- Rafter, J.; Bennett, M.; Caderni, G.; Clune, Y.; Hughes, R.; Karlsson, PC.; Klinder, A.; O'Riordan, M.; O'Sullivan, GC.; Pool-Zobel, B.; Recnkemmer, G.; Roller, M.; Rowland, I.; Salvadori, M.; Thijs, H.; Loo, JV.; Watzl, B.; Collins, JK. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2007;85:488-96.
- Reddy, BS.; Hamid, R.; Rao, CV. Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. **Carcinogenesis**, 1997; 18:1371-74.
- Ripoll, C.; Flourie, B.; Megnien, S.; Hermand, O.; Janssens, M. Gastrointestinal tolerance to an inulin-rich soluble roasted chicory extract after consumption in healthy subjects. **Nutrition**, 2010;26:799-803.
- Roberfroid, MB & Delzenne, M. Dietary fructans. **Annual Review of Nutrition**, 1998;18:117-43.
- Rodríguez-Cabezas, ME.; Camuesco, D.; Arribas, B.; G-M, N.; Comalada, M.; Bailón, E.; C-S, M.; Utrilla, P.; G-H, E.; P-R, C.; Gálvez, J.; Zarzuelo, A. The combination of fructooligosaccharides and resistantstarch shows prebiotic additive effects in rats. **Clinical Nutrition**, 2010;1-8.

- Rose, DJ.; DeMeo, MT.; Keshavarzian, A.; Hamaker, BR. Influence of Dietary Fiber on Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer: Importance of Fermentation Pattern. **Nutrition Reviews**, 2007;65(2):51-62.
- Roy M-J.; Dionne, S.; Marx, G.; Qureshi, I.; Sarma, D.; Levy, E; Seidman, EG. In vitro studies on the inhibition of colon cancer by butyrate and carnitine. **Nutrition**, 2009;25:1193-1201.
- Rubio, MA. Implicaciones de la fibra en distintas patologías. **Nutrición Hospitalaria**, 2002;2:17-29.
- Russo, F.; Clemente, C.; Linsalata, M.; Chiloiro, M.; Orlando, A.; Marconi, E.; Chimienti, G.; Riezzo, G. Effects of a diet with inulin-enriched pasta on gut peptides and gastric emptying rates in healthy young volunteers. **European Journal of Nutrition**, 2010;DOI 10.1007/s00394-010-0135-6.
- Samara, RN.; Laguinge, LM.; Jessup, JM. Carcinoembryonic Antigen in Colorectal Carcinoma Cells by Interfering with Trail-R2 (DR5) Signaling. **Cancer Research**, 2007;67(10):4774-82.
- Sanjoaquin, MA.; Appleby, PN.; Trorogood, M.; Mann, JI.; Key, TJ. Nutrition, lifestyle and colorectal cancer incidence: a prospective investigation of 10998 vegetarians and non-vegetarians in the United Kingdom. **British Journal of Câncer**, 2004;90:118-21.
- Santos Júnior, J. C. M. Câncer Ano-Reto-Cólico: Aspectos Atuais II - Câncer Colorretal - Fatores de Riscos e Prevenção. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, 2007;27:459-73.
- Scheppach W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. **Gut**, 1994;1:35-38.
- Siegel, RL.; Jemal, A.; Thun, MJ.; Hao, Y.; Ward, EM. Trends in the Incidence of Colorectal Cancer in Relation to County-Level Poverty among Blacks and Whites. **Journal of the National Medical Association**, 2008;100:1441-44.
- Souza, FS.; Cocco, RR.; Sarni, ROS.; Mallozi, MC.; Sole, D. Prebióticos, probióticos e simbióticos na prevenção e tratamento das doenças alérgicas. **Revista Paulista de Pediatria**, 2010;28(1):86-97.
- Spinola, AM.; Guerra-Júnior, GC. GH/IGF e Neoplasia: O Que Há de Novo Nesta Associação. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, 2005;49(5):833-42.
- Srivastava, S.; Verma, M.; Henson, DE. Biomarkers for Early Detection of Colon Câncer. **Clinical Cancer Research**, 2001;(7):1118-126.

- Stang, A.; Stabenow, R.; Christa, S.; Eisinger, B.; Edeutraud, BH.; Jöckel, KH. Unexplained inversion of the incidence ratio of colon and rectal cancer among men in East Germany. A time trend analysis including 147,790 cases. **European Journal of Epidemiology**, 2007;22:245-55.
- Tan, HT.; Tan, S.; Lin Q.; Lim, TK.; Hew, CL; Chung, MCM. Quantitative and Temporal Proteome Analysis of Butyrate-treated Colorectal Cancer Cells. **Molecular & Cellular Proteomics**, 2008;(7):1174-85.
- Tuohy, KM.; Probert, HM.; Smejkal, CW.; Gibson, GR. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, 2003;8(15):692-700.
- Underwood, MA.; Salzman, NH.; Bennett, SH.; Barman, M.; Mills, DA.; Marcobal, Z.; Tancredi, DJ.; Bevins, CL.; Sherman, MP. A Randomized Placebo-controlled Comparison of 2 Prebiotic/Probiotic Combinations in Preterm Infants: Impact on Weight Gain, Intestinal Microbiota, and Fecal Short-chain Fatty Acids. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, 2009;48:216-25.
- Vogelstein, B.; Lane, D. Levine', AJ. The p53 tumour-suppressor gene integrates numerous signals that control cell life and death. As when a highly connected node in the Internet breaks down, the disruption of p53 has severe consequences. **Nature**, 2000;408:307-10.
- Wakai, K.; Hirose, K.; Matsuo, K.; Ito, H.; Kuriki, K.; Suzuki, T.; Kato, T.; Hirai, T.; Kanemitsu, Y.; Tajima, K. Dietary risk factors for colon and rectal cancers: A comparative case-control study. **Journal of Epidemiology**, 2006;16:125-35.
- Wang, Y.; Zeng, T.; Wang, S.; Wang, W.; Wang, Q.; Yu, Hong-Xia. Fructo-oligosaccharides enhance the mineral absorption and counteract the adverse effects of phytic acid in mice. **Nutrition**, 2010; 26:305-311.
- Yen, C-H.; Kuo, Y-W.; Tseng, Y-H.; Lee, M-C.; Chen, H-L. Beneficial effects of fructo-oligosaccharides supplementation on fecal bifidobacteria and index of peroxidation status in constipated nursing-home residents: a placebo-controlled, diet-controlled trial. **Nutrition**, 2010;1-6.
- Zheng, S.; Steenhout, P.; Kuiran, D.; Qihong, W.; Weiping, W.; Hager, C.; Haschke, F.; Clemens, RA. Nutritional support of pediatric patients with cancer consuming and enteral formula with fructooligosaccharides. **Nutrition Research**, 2006;26:154.

RESUMO (CAPÍTULO II)

GOMIDES, Antônio Frederico de Freitas, D.S. Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2010. **A linhaça e seus efeitos na prevenção do câncer colorretal (CCR).** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientadores: Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Leandro Licursi de Oliveira.

Atualmente a população mundial vem sendo exposta agressões das mais variadas, como estresse, a falta de tempo para o preparo de uma alimentação adequada, aumentando o consumo de alimentos industrializados, além do aumento do sedentarismo, exposição a agentes poluentes e tóxicos. Diante disso, é importante que a população se conscientize que uma alimentação saudável pode trazer benefícios à saúde e evitar diversas doenças. Dentre as várias doenças ocasionadas por uma alimentação inadequada podemos citar o câncer colorretal (CCR), que é uma das doenças neoplásicas malignas mais comuns, sendo o terceiro tipo de câncer mais prevalente no mundo. Nos últimos anos a incidência de CCR parece ter atingido um alto platô em relação à distribuição na população nas áreas de alto risco, e parece aumentar nas áreas antes consideradas de baixo risco, afetando homens e mulheres quase na mesma proporção. Uma das alternativas na prevenção do CCR é a utilização de alimentos benéficos como a linhaça que constitui-se em um componente alimentar rico em ácidos graxos essenciais que podem funcionar como antiinflamatório, propocionar diminuição da proliferação celular e induzir a apoptose em células cancerosas. Outro componente são as fibras e compostos associados que podem ser convertidos em fitoquímicos biologicamente ativos, por bactérias aeróbias facultativas presentes no cólon de mamíferos podendo diminuir a atividade de enzimas pró-carcinogênicas e aumentar a atividade de enzimas que atuam no processo de detoxificação celular e proteção contra o câncer. A linhaça está disponível no mercado na forma de grãos integrais, farelo e similares.

CAPÍTULO II

A linhaça e seus efeitos na prevenção do câncer colorretal (CCR)

1. Introdução

A linhaça (*Linum usitatissimum L.*) é uma semente extraída do linho que possui algumas variedades de cores constituindo-se em uma boa fonte de nutrientes incluindo as fibras e o ácido graxos essenciais (Cunnane et al., 1993; Brooks et al., 2004, Bayrak et al., 2010).

A fração de fibra mais importante consiste de amidos resistentes, a celulose, e complexos polímeros como a lignana, é também uma fonte de fibra solúvel como a mucilagem. Estudos indicam que alguns componentes ativos presentes na linhaça possuem a capacidade de prevenção de algumas doenças como a constipação, hipercolesterolemia, diabetes e câncer (Cunnane et al., 1993; Brooks et al., 2004, Rigby & Powell, 2008; Chen et al., 2009; Pan et al., 2009).

O primeiro desses componentes é ácido graxo α -linolênico que pode reduzir o processo inflamatório por diminuir a expressão da COX-2, uma enzima cuja expressão está aumentada em 90% dos casos de câncer colorretal (CCR) e em 40% a 90% nos adenomas. Esta enzima está envolvida na síntese de PGE₂ (prostaglandina E₂), que parece favorecer a proliferação celular epitelial, inibir a apoptose e acentuar a angiogênese pelo aumento da produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), (Coleman et al., 2002).

O segundo componente são os compostos associados às fibras, as lignanas onde um desses compostos conhecido como secoisolariciresinol diglicosídeo (SDG), que pode ser convertido por bactérias aeróbias facultativas presentes no cólon de mamíferos em fitoquímicos biologicamente ativos como enterodiol (ED) e enterolactona (EL) com suposto potencial anticarcinogênico e aparente efeito antioxidante por varrer os íons hidróxidos, um potente oxidante celular (Borriello et al., 1985; Harris & Haggerty, 1993; Prasad, 1997, Danbara et al., 2005; Mukker et al., 2010; Wang et al., 2010). O metabolismo do SDG em mamíferos e os seus produtos pela fermentação bacteriana são representados na **figura 1**.

Uma significativa redução urinária de ED e EL tem sido observada em humanos e um aumento na relação ED/EL tem sido observado em indivíduos tratados com antibióticos. Estes dados destacam a importância da microbiota do cólon para o metabolismo e disponibilidade de lignanas em mamíferos. A absorção de ED e EL no

intestino grosso é afetada por uma série de fatores, como a variação na composição da microbiota, o tempo de trânsito intestinal, a estrutura das lignanas e a composição da dieta (Saarinen et al., 2002). O metabolismo de ED e EL envolve a absorção através da circulação entero-hepática onde são formados conjugados com ácido glicurônico e sulfato por enzimas entero-hepáticas tais como as glicuronosiltransferases, β -glicuronidase e sulfatases (Adlercreutz et al., 1995). Os conjugados de lignana são transportados do plasma para diferentes tecidos como o útero e rim sendo excretados na urina **figura 1** (Rickard & Thompson 1998). Presume-se que EL e ED possam também ser reabsorvidos de modo semelhante ao estrógeno, onde cerca de aproximadamente 50-60% dos conjugados do estrógeno entram na circulação entero-hepática sendo enviado para o duodeno junto com a bile seguido pela desconjugação através da β -glicuronidase ou sulfatase bacteriana e reabsorvida pela circulação entero-hepática (Oikarinen et al., 2005).

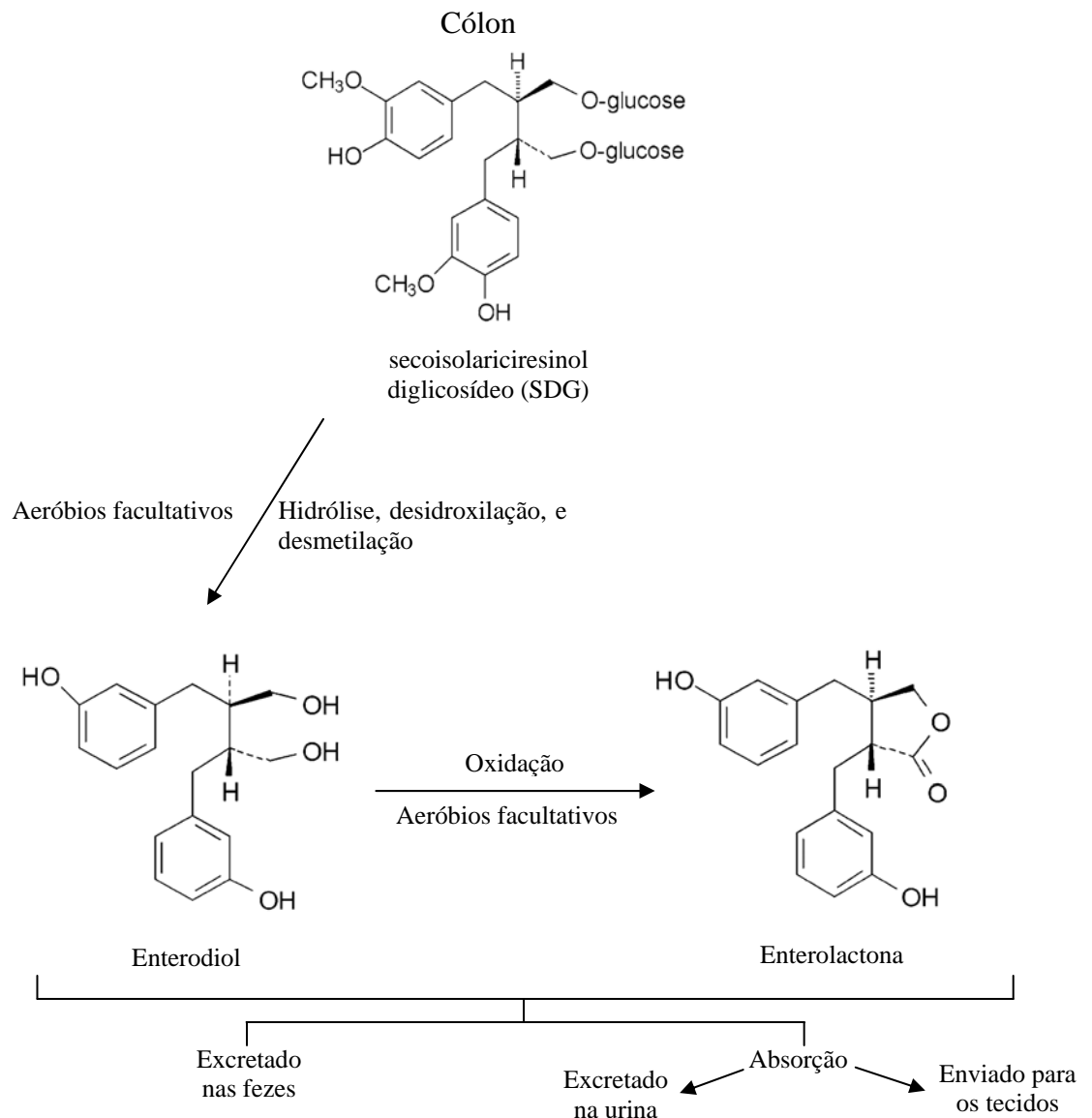


Figura 1: Estrutura do SDG, seus produtos do metabolismo por bactérias e destinos no organismo.

O terceiro componente da linhaça é a fibra que representa um total de 28% do peso das sementes de linhaça tendo como maior fração a celulose e a mucilagem (Cunnane et al., 1993; Murphy & Hendrich, 2002).

2. A linhaça e o CCR

Jenab & Thompson (2001) em um estudo realizado para investigar o efeito protetor da linhaça no câncer de colón correlacionando se os elevados teores de lignana exercem efeitos na atividade de β -glicuronidase uma enzima envolvida na circulação entero-hepática, ativação de procarcinogênicos, carcinogênicos, mutagênicos e toxinas. Seis grupos de ratos foram induzidos ao câncer de cólon com AOM (azoximetano) e alimentados após a primeira dose da droga com dieta controle com alto teor de gordura, ou dietas contendo 2,5% ou 5% de linhaça, dieta contendo 2,5% ou 5% linhaça desengordurada ou dieta com alto teor de gordura com a adição de 1,5 mg de SDG administrado diariamente por gavagem. A excreção urinária de lignanas por dose dependente foi significativamente aumentada nos grupos que receberam dieta com linhaça e linhaça desengordurada, mas não no grupo que recebeu SDG por gavagem. A atividade de β -glicuronidase foi aumentada em todos os grupos tratados. Em comparação com o grupo controle o número de FCA (focos de criptas aberrantes) foi significativamente reduzido no cólon distal dos ratos de todos os tratamentos. Quatro microadenomas e dois pólipos foram encontrados no grupo controle, mas não nos grupos tratados. Os autores sugeriram que a linhaça tem efeito protetor na carcinogênese do cólon atribuído em parte à presença do SDG e seus produtos metabólicos EL e ED que são substratos que aumentam a atividade da β -glicuronidase uma enzima necessária para desconjugar as liganas do ácido glicurônico ou sulfato e, portanto, desviar a ação dessa enzima do metabolismo do carcinogênico administrado diminuindo seus efeitos deletérios no cólon.

Bommareddy et al. (2006) avaliaram o efeito do farelo de linhaça e de milho em ratos que foram induzidos ao câncer com AOM recebendo injeção com 15 mg/kg. Os animais tiveram o sangue e as fezes coletados. O número, a localização e o tamanho dos tumores foram registrados. Foi realizado também análise de ácidos graxos e de lignanas no soro e nas fezes dos animais. A expressão de COX-1 e COX-2 foram também medidas. O número, a localização e o tamanho dos tumores encontrados foram significativamente menores no tratamento com farelo de linhaça, bem como a expressão de COX-1 e COX-2 sugerindo que a presença de ácido graxo ômega-3 e lignanas na

linhaça exerceram efeito protetor no desenvolvimento do câncer de cólon quando comparado ao farelo de milho.

Em um estudo utilizando óleo de linhaça e farelo de linhaça foi avaliado o efeito protetor desses componentes na prevenção de formação de FCA em ratos após a administração de AOM. Foram utilizados 344 ratos machos divididos em seis grupos que receberam dieta de crescimento (AIN93G) com 7% e 14% de óleo de soja, dieta AIN93G com 7% e 14% de óleo de linhaça e dieta AIN93G com 10% e 20% de farelo de linhaça. Todos os ratos receberam injeções de 16 mg/Kg de peso de AOM. As dietas contendo óleo de linhaça e farelo de linhaça reduziram a formação de FCA no cólon distal e cólon proximal com um percentual de redução de 87,5% e 84% respectivamente. Foi verificada também a atividade da glutathione-S-transferase, uma enzima que oferece proteção contra efeitos tóxicos de uma variedade de substâncias químicas ambientais, sendo observado aumento na sua atividade. Esse estudo mostrou que tanto o óleo de linhaça quanto o farelo de linhaça reduzem a incidência de FCA no intestino de ratos após a indução com AOM funcionando assim como agentes preventivos do CCR (Williams et al., 2007). Em outros estudos os autores observaram que a atividade da glutathione-S-transferase foi significativamente aumentada nos grupos alimentados com óleo de linhaça e farelo de linhaça comparado ao grupo que recebeu óleo de soja (Hayes & Pulford, 1995; Board et al., 1997; Board et al., 2000).

Bommareddy et al. (2010) investigaram o efeito do ED e da EL produzidos por bactérias presentes no cólon de mamíferos pelo metabolismo da lignana SDG e do ácido graxo ômega-3 em cultura de células Caco-2. Foram realizados tratamentos com diferentes concentrações tanto isoladamente como em combinação nos períodos de 24, 48 e 72 horas. O tratamento com EL diminuiu significativamente a proliferação celular em todos os tempos estudados e o ED nos tempos de 48 e 72 horas. O ácido graxo ômega-3 diminuiu significativamente a proliferação celular quando administrado nas concentrações de 400-1000 μ M. A combinação de ácido graxo ômega-3 com EL ou ED promoveu diminuição na proliferação celular. Diferentes concentrações de EL e ED aumentaram a porcentagem de apoptose quando comparado com as células não tratadas. Os autores sugeriram que a EL, o ED e o ácido graxo ômega-3 presentes na linhaça agem juntos para promover a quimioprevenção do câncer de cólon por diminuir a proliferação celular e induzir a apoptose.

Bommareddy et al. (2009) avaliaram o efeito protetor dos óleos de milho e linhaça e farelo de milho e linhaça no desenvolvimento de tumores em camundongos APC *Min* durante 12 semanas de tratamento. O número, a localização e o tamanho dos

tumores foram registrados. A incidência de tumor foi observada em 100% em todos os grupos. No entanto, a multiplicidade e a dimensão dos tumores no intestino delgado e cólon de ratos foram significativamente menores nos grupos que receberam o farelo e o óleo de linhaça, em comparação com os grupos que receberam o farelo de milho e o óleo de milho. A expressão de COX-1 e COX-2 foram medidas, sendo menor nos grupos que receberam o farelo e o óleo de linhaça. Os autores atribuíram tais efeitos a presença do ácido graxo ômega-3 e lignana presente na linhaça sugerindo um efeito preventivo no desenvolvimento do tumor intestinal.

Oikarinen et al. (2005a) investigaram se a linhaça tinha algum efeito na prevenção da formação de adenomas em camundongos *Min*. Os camundongos do grupo controle receberam dieta com elevado teor de gordura e desprovida de fibras, outro grupo recebeu uma combinação de linhaça desengordurada, fibra de trigo e óleo de linhaça e um terceiro grupo recebeu linhaça desengordurada, fibra de trigo, óleo de linhaça e óleo de colza. Nos animais do grupo controle a média do número de adenomas foi maior no intestino delgado quando comparado aos grupos que receberam linhaça e o grupo que recebeu a combinação dos óleos. A incidência, o número e o tamanho dos tumores no cólon foram reduzidos entre os grupos controle e tratamento. Foi avaliada a expressão de β -catenina e da proteína quinase C (PKC- ξ , uma isoenzima envolvida na regulação da proliferação celular, diferenciação, apoptose e com a malignização celular), foram observados níveis ligeiramente elevados de β -catenina e PKC- ξ na membrana de células da mucosa dos animais que receberam linhaça quando comparado ao grupo controle. Foi medido o tamanho dos adenomas, sendo observado que os animais que receberam a dieta contendo linhaça ou a combinação dos óleos apresentaram menor tamanho dos adenomas quando comparado ao grupo controle. Foi dosado também lignanas sendo encontrado aumento dos níveis no ceco e plasma somente para o grupo que recebeu linhaça, quando os três grupos foram associados não foi encontrado relação entre os níveis de lignana intestinal ou plasmático com a formação de tumor. Esses autores sugerem que o efeito preventivo da linhaça sobre a carcinogênese do cólon pode ser atribuída à presença do óleo de linhaça com aumento dos níveis da β -catenina e PKC- ξ ligadas à membrana com menor disponibilidade no citoplasma o que estaria diminuindo o desenvolvimento do tumor intestinal.

Em outro estudo Oikarinen et al. (2005b) avaliaram o efeito protetor da linhaça em machos e fêmeas de camundongos *Min* e tipo selvagem alimentados com farelo de linhaça. O grupo controle recebeu dieta desprovida de fibras. O tamanho e o número total de adenomas no intestino delgado não foram diferentes entre o grupo controle e o

tratamento. Nos tratamentos ocorreu uma diminuição do número de adenomas no cólon em ambos os sexos de camundongos *Min*. Foram também mensurados os níveis de EL e ED no intestino delgado e no ceco, sendo observada uma diferença significativa entre os sexos tanto no intestino delgado quanto no ceco onde os níveis foram maiores nas fêmeas. A presença de adenomas influenciou os níveis de EL e ED, sendo maior no conteúdo intestinal do tipo selvagem. Os níveis plasmáticos de EL aumentaram sete vezes quando comparado ao grupo controle, mas não diferiram entre os camundongos *Min* e selvagem; no entanto, as concentrações plasmáticas de EL não tiveram correlação com o número de adenomas no intestino delgado e cólon. Os autores concluíram que a quantidade de adenomas intestinais em camundongos *Min* não está diretamente relacionada, à produção de EL ou ligados aos níveis de lignanas presente na linhaça sugerindo que o metabolismo da lignana é complexo e difere entre sexos.

Trentin et al. (2004) avaliaram a influência da dieta contendo linhaça e outros grãos, frutas e vegetais na proteção de danos cromossomais espontâneos em eritrócitos e reticulócitos de camundongos por ensaios de micronúcleos. No grupo de animais que receberam dieta contendo linhaça os danos cromossomais foram menores do que nos outros grupos tanto em reticulócitos quanto em eritrócitos reduzindo tais danos em 30% e 11% nessas células, respectivamente. Os mecanismos pelos quais a linhaça protege os cromossomos de danos ainda não são reconhecidos, no entanto é sugerido que as lignanas possam estar contribuindo para tais efeitos protegendo os cromossomos de danos oxidativos. Os resultados mostraram que experimentos com animais podem ser utilizados para identificar anticarcinógenos dietéticos que possam prevenir o câncer em humanos. No entanto em outro estudo semelhante os autores não encontraram nenhum efeito protetor de lignanas e isoflavonóides contra danos oxidativos nos cromossomos de células de cólon humano submetidas ao tratamento com peróxido de hidrogênio, apesar de estes autores relatarem que lignanas podem proteger as bases nitrogenadas do DNA de danos oxidativos sugerindo que esses compostos podem ter algum efeito potencial em proteger as células do cólon humano (Pool-Zobel et al., 2000).

3. Conclusão

Na presente revisão foi possível observar que a linhaça constitui-se como um alimento importante na prevenção do CCR uma vez que os estudos demonstraram que os níveis de enzimas pró-carcinogênicas, proteínas promotoras dos processos inflamatórios, os danos oxidativos e cromossômicos em animais e culturas de células foram diminuídos quando ocorreu a utilização da linhaça na dieta.

É importante lembrar que a linhaça além da prevenção do câncer tem importante papel em outras patologias como em pacientes com níveis elevados de colesterol e diabéticos.

Os efeitos benéficos observados da linhaça podem ser atribuídos tanto as fibras insolúveis e solúveis presentes nesse alimento proporcionando um efeito mecânico, retardando o processo absorptivo de componentes alimentares ou compostos nocivos ao organismo bem como um efeito benéfico por proporcionar o crescimento de uma microbiota saudável a partir das fibras solúveis.

Os compostos similares as fibras como as lignanas e o ácido graxo ômega-3 presentes na linhaça também desempenham papéis importantes na prevenção do câncer e doenças do coração.

Diante de tais evidências o consumo da linhaça como componente alimentar dever ser estimulada uma vez que são grandes os benefícios desse alimento frente à prevenção de variadas patologias além de proporcionar aos indivíduos uma melhor qualidade de vida.

Referências

- Adlercreutz, H.; Wildt, JVD.; KINZEL, J. Lignan and Isoflavonoid Conjugates in Human Urine. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 1995;52(1):97-103.
- Bayrak1, A.; Kiralan1, M.; Ipek, A.; Arslan, N.; Cosge, B.; Khawar, KM. Fatty acid compositions of linseed (*Linum Usitatissimum L.*) genotypes of different origin cultivated in turkey. **Biotechnol. & Biotechnol**, 2010; Doi: 10.2478/v10133-010-0034-2.
- Board, PG; Baker, RT.; Chelvanayagam, G.; Jermin, LS. A novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. **Journal of Biochemistry**, 1997;328:929-35.
- Board, PG.; Coggan, M.; Chelvanayagam, G.; Easteal, S.; Jermiin, LS.; Schulte, GK.; Danely, DE.; Hoth, LR.; Griffor, MC.; Kamath, AV.; Rosner, MH.; Chrunyl, BA.; Perregaux, DE.; Gabel, CA.; Geoghegan, KF.; Pandit, J. Identification, characterization, and crystal structure of the omega class of glutathione transferases. **Journal of Biological Chemistry**, 2000;275:24798-806.
- Bommareddy, A.; Arasada, BL.; Mathees, DP.; Dwivedi, C. Chemopreventive effects of dietary flaxseed on colon tumor development. **Nutrition and Cancer**, 2006;54(2):216-22.
- Bommareddy, A.; Zhang, X.; Kaushik, RS.; Dwivedi, C. Effects of components present in flaxseed on human colon adenocarcinoma Caco-2 cells: Possible mechanisms of flaxseed on colon cancer development in animals. **Drug Discoveries & Therapeutics**. 2010;4(3):184-189.
- Bommareddy, A.; Zhang, X.; Schrader, D.; Kaushik, RS.; Zeman, D.; Matthees, DP.; Dwivedi, C. Effects of dietary flaxseed on intestinal tumorigenesis in Apc^{Min} mouse. **Nutrition and Cancer**, 2009;61(2):276-83.
- Borriello, KSP.; Setchell, DR.; Axelso, M. Production and metabolism of lignans by the human faecal flora. **Journal of Applied Bacteriology**, 1985;58:37-43.
- Brooks, JD.; Ward, WE.; Lewis, JE; Hilditch, J.; Nickell, L.; Wong, E.; Thompson, LU. Supplementation with flaxseed alters estrogen metabolism in postmenopausal women to a greater extent than does supplementation with an equal amount of soy. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2004;79:318-25.

- Chen, J.; Saggar, JK.; Corey, P.; Thompson, LU. Flaxseed and Pure Secoisolariciresinol Diglucoside, but Not Flaxseed Hull, Reduce Human Breast Tumor Growth (MCF-7) in Athymic Mice. **The Journal of Nutrition**, 2009; 139:2061-66.
- Coleman, L.; Landstrom, EK.; Royle, PJ.; Bird, AR.; McIntosh, GH. A diet containing α -cellulose and fish oil reduces aberrant crypt foci formation and modulates other possible markers for colon cancer risk in azoxymethane-treated rats. **Journal of Nutrition**, 2002;132:2312-18.
- Cunnane, SC.; Ganguli, S.; Menard, C.; Wolever, TMS.; Jenkins, DJA. High α -linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. **British Journal of Nutrition**, 1993;69:443-53.
- Danbara, N.; Yuri, T.; T-K, M.; Tsukamoto, R.; Uehara, N.; Tsubura, A. Enterolactone Induces Apoptosis and Inhibits Growth of Colo 201 Human Colon Cancer Cells both *In vitro* and *In Vivo*. **Anticancer Research**, 2005;25(38)2269-76.
- Harris, R.; Haggerty, W. Assays for potentially anticarcinogenic phytochemicals in flaxseed. **Cereal Foods World**, 1993;38:147-51.
- Hayes, JD.; Pulford, DJ. The Glutathione-S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 1995;30:445-600.
- Jenab, M & Thompson, LU. The influence of flaxseed and lignans on colon carcinogenesis and β -glucuronidase activity. **Carcinogenesis**, 2001;17(6):1343-48.
- Mukker, JK.; Kotlyarova, V.; Singh, RSP.; Alcorn, J. HPLC method with fluorescence detection for the quantitative determination of flaxseed lignans. **Journal of Chromatography**, 2010;Doi:10.1016/j.jchromb.2010.09.012 .
- Murphy, P.; Hendrich, S. Phytoestrogens in foods. **Advances in Food & Nutrition Research**, 2002;44:195-246.
- Oikarinen, SI.; Pajari, A.M; Salminen, I.; Heinonen, SM.; Adlercreutz, H.; Mutanen, M. Effects of a flaxseed mixture and plant oils rich in α -linolenic acid on the adenoma formation in multiple intestinal neoplasia (Min) mice. **British Journal of Nutrition**, 2005a;94:510-18.
- Oikarinen, S.; Heinonen, SM.; Nurmi, T.; Adlercreutz, H.; Mutanen, M. No effect on adenoma formation in Min mice after moderate amount of flaxseed. **European Journal of Nutrition**, 2005b;44:273-80.

- Pan, A.; Yu, D.; Demark-Wahnefried, W.; Franco, OH.; Lin, X. Meta-analysis of the effects of flaxseed interventions on blood lipids. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2009;90:288-97.
- Pool-Zobel, BL.; Adlercreutz, H.; Gleib, M.; Ziegibel, UT.; Sttlington, J.; Rowland, I.; Wähälä, K.; Rechkemmer, G. Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. **Carcinogenesis**, 2000;21(6):1257-52.
- Prasad, K. Hydroxyl radical-scavenging property of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flax-seed. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 1997;168:117-23.
- Rickard & Thompson, LU. Chronic Exposure to Secoisolariciresinol Diglycoside Alters Lignan Disposition in Rats. **Journal of Nutrition**, 1998;128:615-23.
- Rigby, D. The causes and treatment of constipation. **Continence Essentials**, 2008;1:117-20.
- Saarinen, NM.; Smeds, A.; Mäkela, SI. Structural determinants of plant lignans for the formation of enterolactone in vivo. **Journal of Chromatography B**, 2002;777:311-19.
- Trentin, GA.; Moody, J.; Torous, DK.; Thompsonc, LU.; Heddle, JA. The influence of dietary flaxseed and other grains, fruits and vegetables on the frequency of spontaneous chromosomal damage in mice. **Mutation Research**, 2004;551:213-22.
- Wang, C-Z.; Ma, X-Q.; Yang, D-H.; Guo Z-R.; Liu G-R.; Zhao G-X.; Tang, J.; Zhang Y-N.; Ma, M.; Cai, S-Q.; Ku, B-S.; Liu, S-L. Production of enterodiol from defatted flaxseeds through biotransformation by human intestinal bacteria. **BMC Microbiology**, 2010;10:115.
- Williams, D.; Verghese, M.; Walker, LT.; Boateng, J.; Shackelford, L.; Chawan, CB. 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**, 2007;45:153-59.

RESUMO (CAPÍTULO III)

GOMIDES, Antônio Frederico de Freitas, D.S. Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2010. **Prebióticos previnem o aparecimento de focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon de camundongos Balb/C.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientadores: Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Leandro Licursi de Oliveira.

Pesquisas sobre o efeito protetor das fibras tem se mostrado efetiva na investigação do aparecimento de focos de criptas aberrantes (FCA) ou lesões pré-neoplásicas no cólon distal de camundongos. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos das fibras solúveis frutooligosacarídeo e inulina no cólon de camundongos Balb/C induzidos ao aparecimento de FCA com 1,2-dimetilhidrazina (DMH). Os resultados desse estudo permitiram concluir que a inulina possui maior potencial na prevenção do aparecimento de FCA com número menor ou igual a três criptas e FCA com número maior que três criptas no cólon proximal, médio e distal quando comparado ao controle. No cólon médio e distal o frutooligosacarídeo também mostrou-se eficaz na prevenção da incidência de FCA com número menor ou igual a três criptas e FCA com número maior que três criptas. Diante de tais evidências mais estudos são necessários para tentar elucidar os mecanismos de prevenção desencadeados pela inulina. Já para o frutooligosacarídeo essa eficácia no cólon distal pode ser atribuída à expressão aumentada do gene da proteína p16 conhecida como supressora de tumor.

CAPÍTULO III

Prebióticos previnem o aparecimento de focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon de camundongos Balb/C

1. Introdução

Os prebióticos são definidos como um ingrediente alimentar não digerível que beneficia o hospedeiro por estimulação seletiva, crescimento e atividade de um número limitado de bactérias no cólon e assim melhora a saúde do hospedeiro. Estudos em animais e humanos revelaram que os prebióticos são seletivamente utilizados pelas bifidobactérias melhorando a microbiota intestinal e direcionando-a para uma composição de microrganismos benéficos (Zheng et al., 2006).

Dentre os tipos de fibras solúveis destacam-se os carboidratos fermentáveis como os prebióticos, que são definidos como um componente alimentar não digerível que beneficia o hospedeiro por estimulação seletiva, crescimento e atividade de um número limitado de bactérias no cólon e assim melhora a saúde do hospedeiro. Estudos em animais e humanos revelaram que os prebióticos são seletivamente utilizados pelas bifidobactérias melhorando a microbiota intestinal e diminuindo o estresse oxidativo por aumentar a atividade da catalase no intestino, após a produção de butirato, um ácido graxo de cadeia curta (Zheng et al., 2006; Sauer et al., 2007).

Os prebióticos reduzem o risco de desenvolvimento de câncer do cólon por mecanismos diretos e indiretos. Os diretos incluem a produção de metabólitos protetores, como por exemplo, butirato. Os mecanismos indiretos influem no crescimento de bactérias ácido-láticas e bifidobactérias proporcionando efeito inibitório em muitas bactérias que produzem enzimas carcinogênicas (Rose et al., 2007).

Os prebióticos de eficácia comprovada e comercialmente disponíveis são a inulina e os frutooligossacarídeos (FOS), ambos são considerados como alimentos normais, ingredientes alimentares ou fibras em diferentes países (Tuohy et al., 2003).

Diante dos comprovados efeitos benéficos da utilização dos prebióticos como componente da dieta, o presente estudo teve como objetivo, investigar os efeitos protetores das fibras solúveis em camundongos induzidos ao aparecimento de FCA e alimentados com dietas contendo os prebióticos FOS ou inulina.

2. Métodos

2.1. Animais e dietas

Foram utilizados 40 camundongos Balb/C machos com 12 semanas de idade e com peso de aproximadamente 25 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde e permaneceram em caixas coletivas no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, mantidos à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em fotoperíodo de 12 horas. Os animais foram divididos em cinco tratamentos ($n = 8$) conforme **tabela 1**. Os animais receberam água *ad libitum* e dieta AIN93M modificada (Reeves et al., 1993), acrescida de 10% dos prebióticos FOS ou inulina em substituição a celulose e dieta sem fibras durante 15 semanas. O experimento foi conduzido, de acordo com os princípios éticos para manejo de animais de laboratório e estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Tabela 1. Diferentes tipos de tratamentos aos quais os animais foram submetidos.

Tratamento	Características
C-	Dieta AIN93M sem fibras + DMH
INL	Dieta AIN93M com inulina
INLCA	Dieta AIN93M com inulina + DMH
FOS	Dieta AIN93M com FOS
FOSCA	Dieta AIN93M com FOS + DMH

2.2. Indução do aparecimento de FCA com a administração de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e coleta de material

Os animais que foram submetidos ao aparecimento de FCA receberam injeção intraperitoneal uma vez por semana de 20mg/Kg de peso corpóreo de DMH durante um período de oito semanas. A DMH foi dissolvida em solução salina 0,9% contendo 1 mM de EDTA e 10 mM de citrato de sódio, pH 8, os animais dos grupos controle receberam somente o veículo sem a droga (Newell & Heddle, 2004). Sete semanas após a última aplicação de DMH os animais foram sacrificados, por asfixia com CO_2 . Foi retirado o intestino grosso dos animais do ceco até o ânus, para a contagem de FCA. No cólon distal e fígado dos animais foi mensurada a atividade da catalase para avaliação do estresse oxidativo ocasionado pela administração da DMH e no cólon distal também

foi quantificado o RNAm para avaliar a expressão dos genes das proteínas ciclina-D1, ciclina-E, p16, p21 e p53. Foi coletado o baço para quantificação dos linfócitos CD4 e CD8, as fezes do cólon e da gaiola foram coletadas para a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta: acético, propiônico e butírico e ainda foram pesados o fígado, baço, rim e coração para avaliação da homeostasia do animal.

2.3. Preparação do tecido para contagem de FCA

Após a remoção, o intestino grosso foi lavado em solução tampão salina fosfato (PBS), aberto longitudinalmente pela margem contra mesentérica, colocado em placas de parafina, com a mucosa voltada para a parte superior da placa e fixadas em formalina de Carson por 24 horas. Depois de fixado, o intestino grosso foi medido e dividido em três fragmentos iguais, denominados proximal, médio e distal, em relação ao ceco. Em seguida os fragmentos foram corados em solução de azul de metileno a 0,1% por 2 minutos, e lavados em tampão fosfato para a retirada do excesso de corante para posterior análise. A contagem das lesões foi realizada por microscopia óptica com aumento de 40x e 100x. 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 do FCA foi com base no número de criptas aberrantes por foco, ou seja, focos com número menor ou igual a três criptas e focos com número maior que três criptas (Bird, 1987).

2.4. Processamento do baço para quantificação de linfócitos CD4 e CD8

Após a morte dos camundongos os baços foram coletados, macerados em PBS e centrifugados durante 10 minutos a 1600 g a 4°C, em seguida o sobrenadante foi descartado e os pellets contendo os esplenócitos e hemácias foram diluídos em tampão de lise gelado (NH₄Cl 0,16M; Tris HCl 0,7M pH 7,5; EDTA 2mM) e incubado a temperatura ambiente por 4 minutos no escuro para lise das hemácias. Após esta etapa foi adicionado 8 ml de meio RPMI-16 incompleto com 2 mM de EDTA e a suspensão celular submetida à centrifugação durante 10 min a 1600 g a 4°C. Após a centrifugação os pellets de esplenócitos foram ressuspensos em 3 ml de RPMI-1640 completo e as células contadas em câmara de Neubauer. Para quantificar os linfócitos CD4 e CD8 foi realizada citometria de fluxo. Os anticorpos utilizados foram adquiridos junto à BD Pharmingen, NJ USA (anti-CD44-PE Cy5.5) e Caltag Laboratories, Thailand (anti-CD4-FITC e anti-CD8-FITC). Células extraídas do baço dos animais de todos os tratamentos foram incubadas com uma mistura de anticorpos contendo anti-CD4⁺ ou

anti-CD8⁺, para avaliar a expressão de linfócitos CD4 ou CD8, respectivamente. Após 2 horas de incubação, as amostras foram centrifugadas a 1500 g por 10 minutos e ressuspensas em PBS – Formol 1%. As amostras foram lidas em citômetro de fluxo GUAVA (Guava EasyCyte Mini System, Millipore) e os dados analisados no software Guava CytoSoft 4.2.1 (Field et al., 1999).

2.5. Atividade da catalase no fígado e intestino

Para a atividade da catalase o fígado e cólon distal dos camundongos foram macerados em tampão fosfato, obtido um homogenato que foi acondicionado em eppendorf, centrifugado a 6000 g a 4 °C durante 10 minutos e coletado o sobrenadante. Posteriormente a centrifugação o homogenato do fígado e o cólon distal foram utilizados para medir a atividade da catalase (Aebi, 1984). Para o branco foi utilizado 2 mL de tampão fosfato e 20 µL do homegenato do fígado e cólon distal medido espectrofotometricamente a 240 nm. Para cada amostra foi realizado um novo branco com o respectivo homogenato. Para medir a atividade da catalase foi preparada no momento da análise uma solução contendo 50 mL de tampão fosfato e 80 µL de peróxido de hidrogênio a 30%. Em uma cubeta de quartzo foi adicionado 20 µL do homogenato e 2 mL de tampão fosfato com peróxido de hidrogênio, a atividade da catalase foi medida durante 1 minuto e mesurada três vezes a cada 30 segundos, ou seja, no tempo 0, 30 e 60 segundos espectrofotometricamente a 240 nm. Para o cálculo da atividade da catalase foi realizada a quantificação de proteína total utilizando o kit BIOCLIN[®] e a atividade da catalase foi expressa em (U da catalase/mg de proteína).

2.6. RT-PCR

2.6.1. Extração do RNAm e análise quantitativa da expressão dos genes das proteínas ciclinas-D1, ciclina-E, p16, p21 e p53.

O RNA foi extraído após maceração do cólon distal em eppendorf utilizando TRIzol[®] (Invitrogen, CA, USA), que contém isotiocianato de guanidina e sarcosil, que são usados para a extração de RNA. Brevemente, foram homogeneizados 500 µL da amostra com 750 µL de TRIzol[®] e a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir foram adicionados 300 µL de clorofórmio agitando-se os tubos por 15 minutos manualmente e incubando-os a temperatura ambiente por mais 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a uma temperatura de 4°C, após a qual a fase aquosa transparente foi separada e transferida para um outro tubo. Em

seguida foi realizada a adição de 350 μL de isopropanol, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos a fim de promover a precipitação do RNA e posteriormente submetidas à centrifugação por 10 minutos a uma temperatura de 4°C. Os “pellets” foram lavados com 750 μL de etanol 75%, centrifugados por 10 minutos a 7.500 g e secos a temperatura ambiente por 30 minutos. Após a secagem, os “pellets” foram ressuspensos em 20 μL de água DEPC. Aproximadamente 10 μg de cada RNA total, obtidos conforme este protocolo, foram usados para sintetizar as primeiras fitas de cDNA, usando “primers” para ciclinas-D1, ciclina-E, p16, p21 e p53.

2.6.2. Síntese do cDNA

Após extração do RNA total das amostras foi realizada a síntese da primeira fita de cDNA para ciclina-D1, ciclina-E, p16, p21 e p53, usando-se o kit Superscript™ (Invitrogen®, New York, USA). Para tanto, 1 μL de “primer” randômico (pd(N)₆) (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, England) foi adicionado a aproximadamente 2 μg de RNA do cólon, sendo submetido a aquecimento por 10 minutos à 70°C .

Após isto, foi preparada uma mistura contendo o tampão da transcriptase reversa, DTT, transcriptase reversa e dNTPs. Em seguida foi realizado o aquecimento desta mistura e, posteriormente, esta foi adicionada à amostra. Em seguida, essa solução foi incubada por 1 hora a 42°C, e por 1 minuto a 70°C, para desnaturar a transcriptase reversa.

2.6.3. Quantificação do RNAm para a expressão dos genes das proteínas ciclina-D1, ciclina-E, p16, p21 e p53 por PCR em tempo real

A expressão dos genes de ciclina D1, ciclina-E, p16, p21 e p53 foram avaliadas do cólon distal. Após 24 h o cólon foi clareado por centrifugação a 10.000 g por 2 minutos e submetidos à extração do RNA e a síntese do DNA complementar, conforme descrito anteriormente. A avaliação da expressão dos genes foi realizada através da técnica de PCR em tempo real onde a quantificação destes RNAs mensageiros foi comparada à expressão dos RNAs mensageiros de um gene constitutivo que foi o da β -actina. Para tanto, aproximadamente 2 μg do cDNA total oriundos do cólon foram usadas para a PCR em tempo real, numa reação de 50 μL que conteve 0,45 nmol dos “primers” sense e antisense específicos para cada gene, **tabela 2**, 20 U/ μL do inibidor de RNase e 12,5 μL do “Master Mix” SYBR Green PCR. As condições de ciclagem foram 95°C por 10 minutos seguidos por 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. A quantificação da expressão transcricional dos genes foi realizada

através do software Gene Amp[®] 5700 Sequence Detection System Version 1.3 (Applied Biosystems), (Hailfinger, et al., 2007; Rajkumar et al. 2007; Muddhasani, et al. 2008; Nakade et al., 2009).

Tabela 2. Primers sense e antisense específicos para os genes.

Genes	Primers
Ciclina D1 (Rajkumar et al.; 2007)	Sense: 5'-CATCAAGTGTGACCCGGACTG-3' Antisense: 5'-CCTCCTCCTCAGTGGCCTTG-3'
Ciclina-E (Nakade, et al.; 2009)	Sense: 5'-AGACCCACACCAACAGCTTG-3' Antisense: 5'-TCATTCTGTCTCCTGCTCGC-3'
p16 (Muddhasani, et al.; 2008)	Sense: 5'- ATCTGGAGCAGCATGGAGTC-3' Antisense: 5'- TCGAATCTGCACCGTAGTTG-3'
p21 (Muddhasani, et al.; 2008)	Sense: 5'-GTCAGGCTGGTCTGCCTCCG-3' Antisense: 5'-CGGTCCCGTGGACAGTGAGCAG-3'
p53 (Hailfinger, et al.; 2007)	Sense: 5'- GGAGACATTTTCAGGCTTATGG -3' Antisense: 5'- AGAAGGGACAAAAGATGACAGG -3'

2.7. Quantificação de *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp* e anaeróbios totais

Bifidobacterium spp. foram determinadas em agar MRS + NPML (Hartemink et al., 1996) e anaeróbios totais em agar Wilkins-Chalgren. As amostras plaqueadas contendo anaeróbios totais e *Bifidobacterium spp.* foram incubadas a 37 °C em câmara de anaerobiose (Gás Pak System – BBL, Sparks, USA), por 48 horas e 72 horas respectivamente. Para a contagem de *Clostridium spp.*, foi utilizado agar RCM (Reinforced Clostridial Medium). As amostras plaqueadas foram incubadas a 37°C em câmara de anaerobiose (Gás Pak System – BBL, Sparks, USA), por 48 horas (Santos et al., 2003). As análises foram feitas em duplicata e os resultados para contagem de colônias de *Bifidobacterium spp.*, anaeróbios totais e *Clostridium spp.* foram expressos em Log₁₀ UFC/g.

2.8. Extração e dosagem de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acético, propiônico e butírico nas fezes do cólon e da gaiola por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

A análise das fezes foi feita em duplicata. Foram pesadas aproximadamente 400 mg de fezes em Eppendorf e adicionado 500 µL de ácido m-fosfórico a 25%, agitado e mantido em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Após os Eppendorfs foram centrifugados a 13.200 rpm por 30 minutos, coletado o sobrenadante e centrifugado a 13.200 rpm por 20 minutos e congelados a -20 °C.

Para a dosagem, as amostras das fezes foram centrifugadas por 10 minutos a 13.200 rpm e aplicadas no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC), marca

SHIMADZU, modelo SPD-10A VP acoplado ao Detector Ultra Violêta (UV) utilizando-se um comprimento de onda de 210 nm.

Para a separação cromatográfica, 20 uL de amostra foi injetada em uma coluna móvel SCR – 101H marca SHIMADZU com 30 cm x 7,9 mm de diâmetro com fluxo de 0,8 ml/minuto e pressão de 24 Kgf utilizando-se como fase móvel água em 1% de ácido m-fosfórico (Smirick-Tjardes et al., 2003 modificado).

2.9. Peso dos órgãos

Foram pesados fígado, baço, coração e rim após sete semanas da última aplicação da DMH.

2.10. Análise estatística

Foi utilizado o software Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1, para análise estatística (SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, 2007). As comparações entre três ou mais grupos independentes foram realizadas por análise de variância (ANOVA) para dados com a distribuição normal. Como ocorreram diferenças estatísticas, foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey e teste não-paramétrico de Lilliefors para detectar os grupos que diferiram. O valor (p) foi fixado até 5% com o intuito de obter uma confiabilidade de 95% nas comparações para o teste de Tukey.

3. Resultados

3.1. Contagem de focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon proximal, médio e distal

Nos tratamentos (INL e FOS) que não receberam a inoculação de DMH não foram observados FCA em nenhum dos seguimentos do intestino diferindo significativamente em relação ao controle (C-), dados não mostrados nas figuras. No cólon proximal somente no tratamento INLCA não foram observados FCA com número menor ou igual a três criptas diferindo significativamente em relação ao controle (C-), ($p < 0,05$). No cólon distal os tratamentos INLCA e FOSCA diferiram entre si ($p < 0,05$) com menor incidência de FCA no tratamento INLCA. Ambos os tratamentos diferiram também em relação ao controle (C-) apresentando menor incidência de FCA no cólon médio e distal ($p < 0,05$), **figura 1**. Não foram observados FCA com mais de três criptas no cólon proximal. No cólon médio e distal foram observados FCA com mais de três criptas em todos os tratamentos que receberam a administração da DMH onde os tratamentos INLCA e FOSCA apresentaram menor incidência desses focos diferindo significativamente em relação ao controle (C-), ($p < 0,05$), **figura 2**.

3.2. Atividade da catalase no fígado e no cólon distal

A atividade da catalase no fígado não diferiu em nenhum dos tratamentos analisados em relação ao controle (C-), ($p > 0,05$), **figura 3**, no entanto essa atividade no cólon distal nos tratamentos INL, INLCA e FOSCA foi menor diferindo significativamente em relação ao controle (C-), ($p < 0,05$), **figura 4**.

3.3. Citometria de fluxo das células do baço

A contagem de células CD4 não foi diferente em nenhum dos tratamentos em relação ao controle (C-), teste não-paramétrico de Lilliefors ($p = 0,01$). Para células CD8 a contagem também não diferiu em nenhum dos tratamentos em relação ao controle ($p > 0,05$), teste de Tukey, e a razão CD4/CD8 não foi diferente em nenhum dos tratamentos em relação ao controle (C-), teste não-paramétrico de Lilliefors ($p = 0,01$), **figura 5**.

3.4. Peso dos órgãos

No fígado foi observado maior peso nos tratamentos FOS e FOSCA diferindo do tratamento C- ($p < 0,05$) e no rim foi observado maior peso nos tratamentos INL, INLCA, FOS e FOSCA diferindo do tratamento C- ($p < 0,05$). No coração e baço não foram observadas diferenças em nenhum dos tratamentos ($p > 0,05$), **figura 6**.

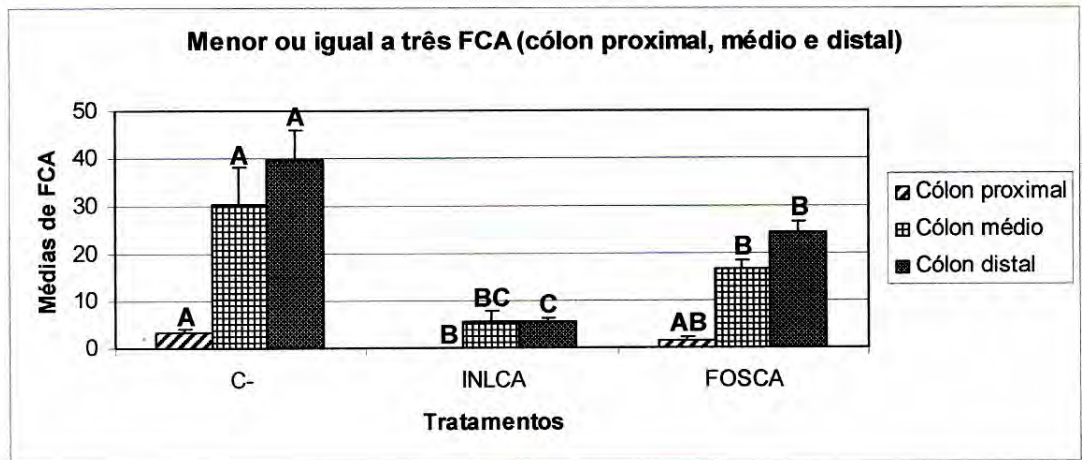


Figura 1. Contagem de FCA com número menor ou igual a três criptas no cólon proximal, médio e distal de camundongos Balb/C que receberam a administração da DMH. No cólon proximal o tratamento INLCA apresentou diferença em relação ao tratamento C-. No cólon médio os tratamentos INLCA e FOSCA apresentaram diferença do tratamento C-. No cólon distal os tratamentos INLCA e FOSCA apresentaram diferença do tratamento C- e os tratamentos INLCA e FOSCA também diferiram entre si. Anova ou teste T. ^{A,B,C}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

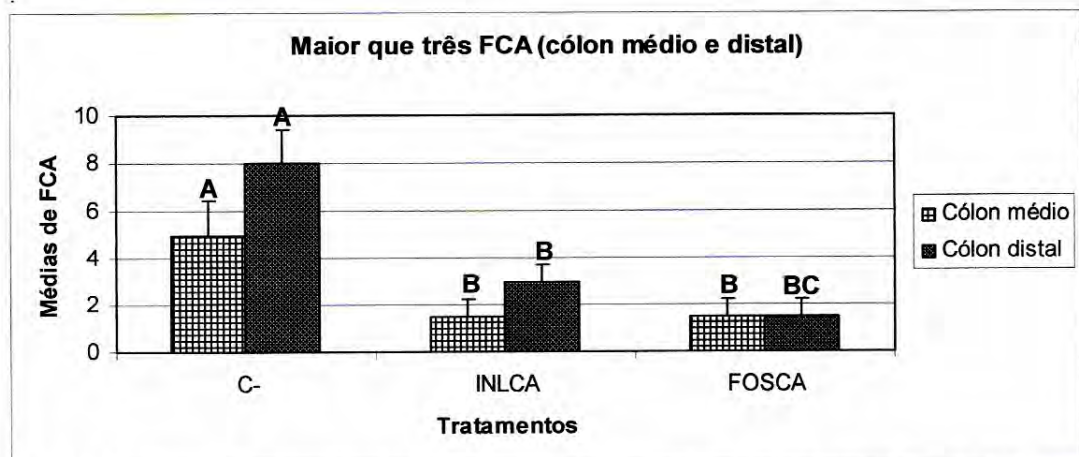


Figura 2. Contagem de FCA com mais de três criptas no cólon médio e distal de camundongos Balb/C que receberam a administração da DMH. No cólon médio e distal os tratamentos INLCA e FOSCA diferiram do tratamento C-. Anova ou teste T. ^{A,B,C}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Nos três segmentos (proximal, médio e distal) não foram observados FCA com número menor ou igual a três criptas ou FCA com número maior que três criptas nos tratamentos INL e FOS. dados não mostrados nas figuras.

C- = Dieta AIN93M sem fibras + DMH

INL = Dieta AIN93M com inulina

INLCA = Dieta AIN93M com inulina + DMH

FOS = Dieta AIN93M com frutooligossacarídeo

FOSCA = Dieta AIN93M com frutooligossacarídeo + DMH

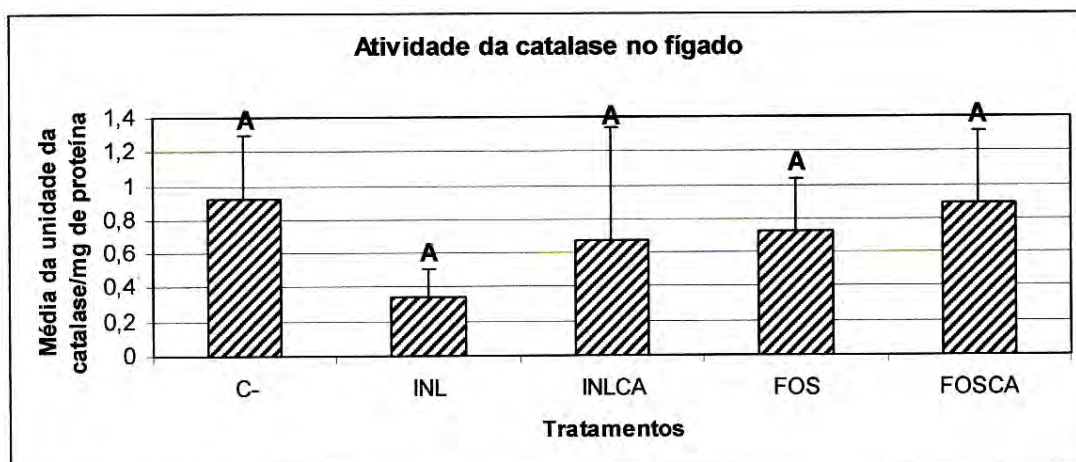


Figura 3. Atividade da catalase no fígado de camundongos Balb/C. Não foi observada diferença na atividade da catalase no fígado em nenhum dos tratamentos. Anova ou teste T. ^AMédias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

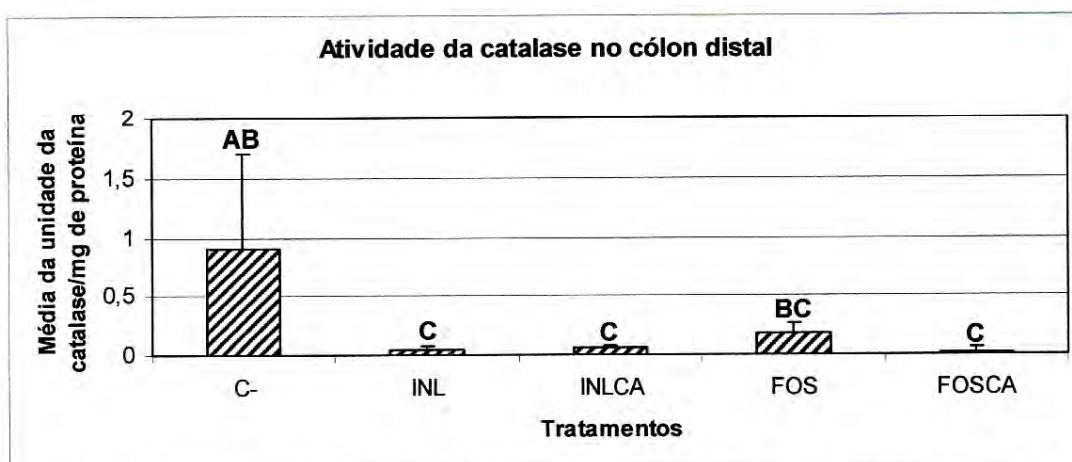


Figura 4. Atividade da catalase no cólon distal de camundongos Balb/C. Na atividade da catalase no cólon distal os tratamentos INL, INLCA e FOSCA apresentaram diferença em relação ao tratamento C-. Anova ou teste T. ^{A,B,C}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

C- = Dieta AIN93M sem fibras + DMH

INL = Dieta AIN93M com inulina

INLCA = Dieta AIN93M com inulina + DMH

FOS = Dieta AIN93M com frutooligossacarídeo

FOSCA = Dieta AIN93M com frutooligossacarídeo + DMH

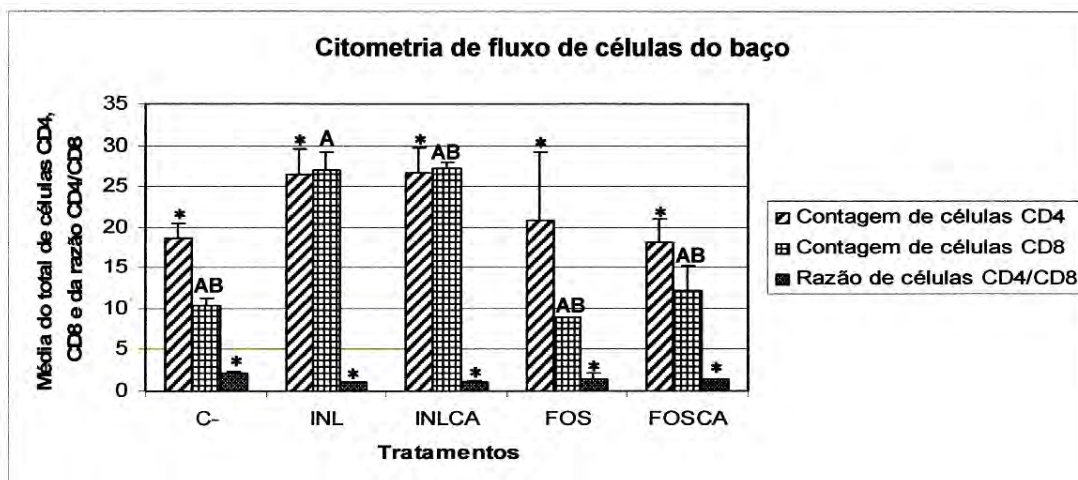


Figura 5. Citometria de fluxo de células do baço de camundongos Balb/C. A contagem de células CD4 e CD8 e a razão CD4/CD8 não diferiu em nenhum dos tratamentos. Anova ou teste T. ^{A,B}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. *Não significativo pelo teste não-paramétrico de Lilliefors (p=0,01).

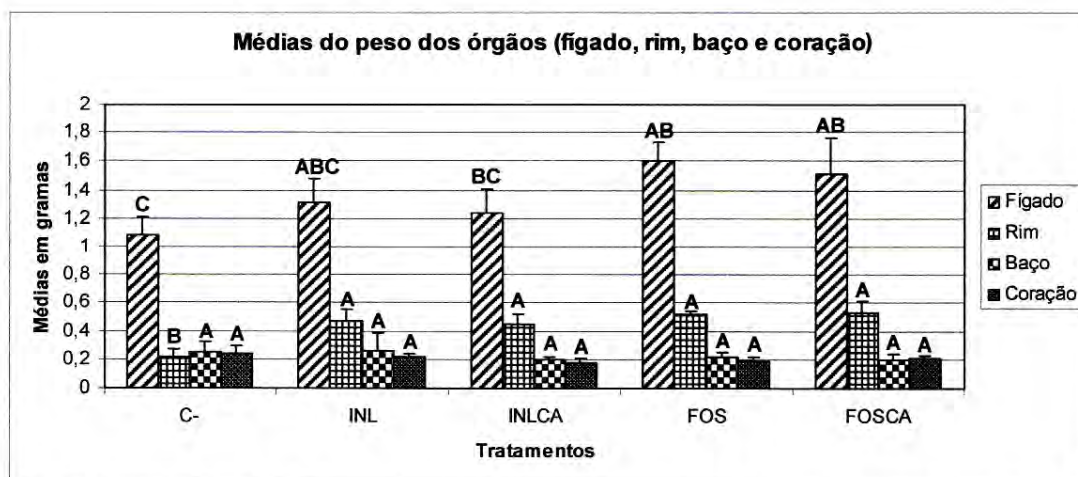


Figura 6. Peso dos órgãos dos camundongos Balb/C. No fígado não foi observada diferença significativa no peso nos tratamentos FOS e FOSCA em relação ao tratamento C- e no rim todos os tratamentos diferiram significativamente do tratamento C-. No coração e no baço não foram observadas diferenças no peso em nenhum dos tratamentos. Anova ou teste T. ^{A,B,C}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

C- = Dieta AIN93M sem fibras + DMH

INL = Dieta AIN93M com inulina

INLCA = Dieta AIN93M com inulina + DMH

FOS = Dieta AIN93M com frutooligossacarídeo

FOSCA = Dieta AIN93M com frutooligossacarídeo + DMH

3.5. RT-PCR

Não ocorreu diferença significativa em relação ao controle (C-) em nenhum dos tratamentos para a expressão do gene da proteína p53 ($p>0,05$), **figura 7a**. Não ocorreu diferença significativa em relação ao controle (C-) em nenhum dos tratamentos para a expressão do gene da proteína p21 ($p>0,05$), **figura 7b**. Não ocorreu diferença significativa em relação ao controle (C-) em nenhum dos tratamentos para a expressão do gene da proteína ciclina-E ($p>0,05$), **figura 7c**. O tratamento FOSCA, apresentou diferença significativa em relação ao controle (C-), com maior expressão do gene da proteína p16 ($p<0,05$), **figura 7d**. O tratamento INL apresentou diferença significativa em relação ao controle (C-) com maior expressão do gene da proteína ciclina-D1 ($p<0,05$), **figura 7e**.

3.6. Quantificação de *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium ssp.*, anaeróbios totais e aferição do pH fecal

A contagem de *Clostridium spp.*, *Bifidobacterium spp.* e anaeróbios totais não diferiu em relação ao controle (C-) em nenhum dos tratamentos avaliados ($p>0,05$), **tabela 3**. O pH das fezes do cólon também não diferiu em nenhum dos tratamentos, **tabela 4**.

Tabela 3. Médias da contagem de bactérias Log₁₀ UFC/g.

Tratamentos	Médias da contagem de bactérias		
	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Clostridium spp.</i>	Anaeróbios totais
C-	7,990 ± 0,632*	8,813 ± 0,061 ^{AB}	8,738 ± 0,795*
INL	7,933 ± 0,605*	8,913 ± 0,181 ^{AB}	8,853 ± 0,077*
INLCA	8,276 ± 0,065*	8,816 ± 0,130 ^{AB}	8,868 ± 0,186*
FOS	8,873 ± 0,873*	9,361 ± 0,398 ^A	9,567 ± 0,148*
FOSCA	8,161 ± 0,021*	9,127 ± 0,068 ^{AB}	9,552 ± 0,219*

^{A,B}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferiu entre si pelo teste de TuKey ao nível de 5% de probabilidade. *Não significativo pelo teste de Tukey.

Tabela 4. pH das fezes do cólon.

pH	Tratamentos				
	C-	INL	INLCA	FOS	FOSCA
	6,93±0,51*	6,94±0,66*	7,33±0,05*	6,62±0,63*	7,28±0,12*

*Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.7. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acético, propiônico e butírico

A quantificação de ácidos graxos nas fezes do cólon e da gaiola não apresentou diferença significativa em relação ao controle (C-) em nenhum dos tratamentos avaliados. Teste não-paramétrico de Lilliefors ($P=0,01$).

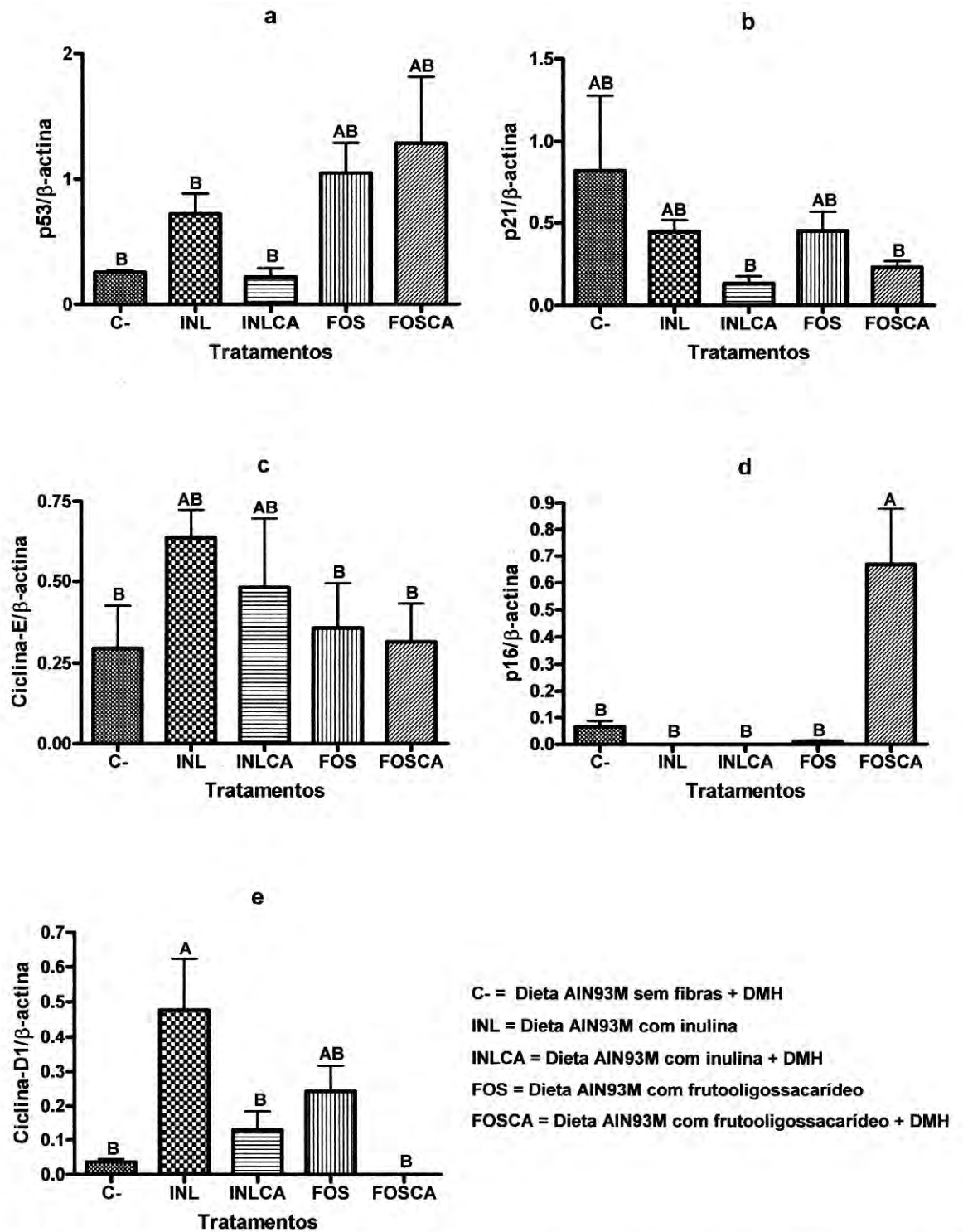


Figura 7. RT-PCR para a expressão do RNAm dos genes das proteínas reguladoras do ciclo celular. a) Expressão do RNAm do gene da proteína p53 no cólon distal de camundongos Balb/C. Não ocorreu diferença em nenhum dos tratamentos. b) Expressão do RNAm do gene da proteína p21 no cólon distal de camundongos Balb/C. Não ocorreu diferença em nenhum dos tratamentos. c) Expressão do RNAm do gene da proteína ciclina-E no cólon distal de camundongos Balb/C. Não ocorreu diferença em nenhum dos tratamentos. d) Expressão do RNAm do gene da proteína p16 no cólon distal de camundongos Balb/C. O tratamento FOSCA apresentou diferença em relação ao tratamento C-. e) Expressão do RNAm do gene da proteína ciclina-D1 no cólon distal de camundongos Balb/C. O tratamento INL apresentou diferença em relação ao tratamento C-. Anova ou teste T. ^{A,B}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4. Discussão

4.1. Focos de criptas aberrantes (FCA)

O presente estudo avaliou os efeitos preventivos dos prebióticos inulina e frutooligossacarídeo na incidência de FCA no cólon proximal, médio e distal de camundongos induzida por DMH. Segundo BIRD (1987), focos de criptas aberrantes (FCA) são lesões caracterizadas morfológicamente por criptas anormais na superfície da mucosa do cólon, sendo descritas primariamente em ratos e tidas como evidências para o desenvolvimento futuro do CCR. A DMH e o azoximetano (AOM) são as drogas mais utilizadas na indução de FCA, pois induzem a proliferação desses focos no cólon em grande número, principalmente na porção sigmóide (Laranjeira et al., 1998).

No presente estudo quando comparamos o tratamento controle sem fibras (C-) com o tratamento com inulina (tratamento INLCA) esse prebiótico levou a redução significativa de FCA com número menor ou igual a três criptas no cólon proximal, médio e distal ($p < 0,05$), **figura 1**. O mesmo efeito foi observado para FCA com número maior que três criptas no cólon médio e distal, com redução significativa de FCA no tratamento com inulina ($p < 0,05$), **figura 2**. Efeitos semelhantes foram observados em um estudo realizado com ratos induzidos ao aparecimento de FCA com AOM e alimentados com dieta acrescida de inulina, esse prebiótico mostrou-se eficaz na diminuição do aparecimento de FCA quando comparado ao grupo controle que não recebeu prebiótico (Bolognani et al., 2001).

O prebiótico frutooligossacarídeo (tratamento FOSCA) foi eficaz na redução de FCA com número menor ou igual a três criptas e FCA com número maior que três criptas somente para o cólon médio e distal levando a uma redução significativa de FCA ($p < 0,05$), **figura 1**, em relação ao controle (C-). Reddy et al. (1997) observaram efeitos benéficos em ratos induzidos ao aparecimento de FCA com AOM e alimentados com FOS e inulina, com a diminuição de FCA, sendo o efeito mais pronunciado no grupo que recebeu dieta acrescida de inulina, devido a este prebiótico chegar de forma intacta ao cólon distal, onde foi injetado o carcinógeno, exercendo efeitos protetores mais pronunciados neste local.

No cólon proximal não foram encontrados FCA com número maior que três criptas (indicativo categóricos de lesões pré-neoplásicas) em nenhum dos tratamentos avaliados. Esses resultados sugerem que a inulina e o frutooligossacarídeo são componentes dietéticos importantes na prevenção de FCA no cólon distal.

4.2. Atividade da Catalase

No presente estudo avaliamos se a atividade da catalase possui efeitos preventivos no fígado e no cólon distal contra o estresse oxidativo gerado pela administração da DMH.

No fígado a atividade da catalase não diferiu em nenhum dos tratamentos avaliados, **figura 3**, sugerindo que essa enzima pode não ter efeito na prevenção do estresse oxidativo nesse órgão quando foi administrada a DMH. Observamos também que os tratamentos FOS e FOSCA apresentaram maior peso do fígado quando comparado ao tratamento C-, sugerindo que esse prebiótico pode ter influenciado na manutenção da homeostasia do órgão.

A catalase é um dos principais sistemas de defesa contra o estresse oxidativo, uma vez que muito rapidamente desintoxica a célula convertendo o H_2O_2 em H_2O e O_2 . Foi demonstrado que no câncer de pulmão uma diminuição da atividade da catalase levou ao acúmulo de H_2O_2 , causando danos no DNA bem como criou um ambiente antiapoptótico intracelular que é especialmente suscetível a aumento da frequência de mutações, uma situação que foi capaz de conduzir à transformação celular e ocasionar o câncer (Ho et al., 2001).

No presente estudo no cólon distal a atividade da catalase foi menor ($p < 0,05$) nos tratamentos INL, INLCA e FOSCA sugerindo que os prebióticos, diminuem a atividade da catalase na ausência da DMH no tratamento com inulina e na presença da DMH nos tratamentos com inulina e frutooligosacarídeos, **figura 4**. Segundo Skrzydlewska et al. (2005), Sauer et al. (2007) um alto nível de expressão da catalase poderia estar associado com menor dano genético diminuindo o risco de câncer. Estas evidências foram observadas por esses autores em estudos envolvendo o câncer colorretal em humanos onde, uma diminuição da atividade da catalase foi observada nos indivíduos com câncer.

No presente estudo nossos resultados demonstraram que o único tratamento que foi administrado DMH e que aumentou a atividade da catalase foi o tratamento sem fibras (C-), no entanto foi o tratamento que aumentou significativamente a incidência de FCA quando comparado aos tratamentos INLCA e FOSCA. Assim não é possível sugerir que o aumento da atividade da catalase, esteja relacionado com a menor incidência de FCA em camundongos.

Nossos resultados sugerem também que no cólon distal a diminuição da atividade da catalase na presença dos prebióticos pode ser importante na prevenção do

aparecimento de FCA quando camundongos são submetidos ao tratamento com DMH, uma vez que observamos menor incidência de FCA nos tratamentos que receberam os prebióticos inulina e frutooligossacarídeo em relação ao tratamento sem fibras.

4.3. Citometria de fluxo

No presente estudo observamos que os tratamentos com fibras não são eficazes na ativação do sistema imunológico uma vez que no tratamento C- (sem fibras) a contagem de células CD4 e CD8 não diferiu dos demais tratamentos que receberam as fibras ($p>0,05$), **figura 5**.

Um dos mecanismos sugeridos para os efeitos dos prebióticos no sistema imunológico incluem os efeitos diretos após a sua fermentação por bactérias com a produção de AGCC que ativam linfócitos (Bouhnik et al., 1999). Estudos em ratos utilizando separadamente (Rowland et al., 1998; Marotta et al., 2003) ou em combinação (Femia et al., 2002; Roller et al., 2004) os prebióticos inulina e frutooligossacarídeos têm demonstrado efeitos inibitórios na formação de FCA (Rowland et al., 1998; Marotta et al., 2003), adenomas (Roller et al., 2004) e tumores (Marotta et al., 2003) no cólon desses animais.

Em um estudo com ratos os autores demonstraram a diminuição na razão de células CD4/CD8 no baço e linfonodos mesentéricos desses animais quando alimentados com inulina, sendo atribuído a esse prebiótico um efeito positivo na proteção contra o aparecimento de adenomas no cólon devido ao aumento na contagem de células CD8, sugerindo que tais efeitos estão associados com a supressão da carcinogênese no cólon (Roller et al., 2004). Nossos resultados não demonstraram a diminuição na razão de células CD4/CD8 no baço, apesar dos tratamentos com prebióticos terem sido eficazes na prevenção do aparecimento de FCA no cólon dos camundongos. O motivo de não ter ocorrido ativação do sistema imunológico e alterações na quantificação de células CD4 e CD8 do baço em nenhum dos tratamentos do presente estudo, pode está relacionado a não ter sido observado diferença na quantificação de AGCC e bifidobactéria em nenhum dos tratamentos avaliados.

4.5. Peso dos órgãos

No presente estudo foi observado diminuição do peso do fígado nos tratamentos C-, INL e INLCA e no rim no tratamento C- ($p<0,05$), sugerindo a possibilidade de

alteração na homeostasia nesses órgãos causada pela DMH. No coração e no baço não foi observado alterações do peso em nenhum dos tratamentos ($p>0,05$), **figura 6**. Esses resultados sugerem que a inulina pode ter protegido o rim e o frutooligossacarídeo pode ter protegido o fígado e rim de alterações na homeostasia.

Em um estudo realizado por Ferreira et al. (2008) com ratos em que observaram os efeitos dos prebióticos FOS e inulina, probióticos e simbióticos no cólon e ceco não foram observadas diferenças no peso do fígado, rim, baço e coração dos animais.

4.6. RT-PCR

No presente estudo avaliamos se a expressão aumentada dos genes das proteínas supressores de tumor p53, p21 e p16 e a diminuição da expressão dos genes de proteínas de controle do ciclo celular, ciclina-E e ciclina-D1, tinham algum efeito preventivo na diminuição da incidência de FCA.

Sabe-se que mutações no gene *TP53* que codifica a proteína p53 são encontradas em cerca de metade de todos os cânceres humanos. O gene *TP53* age inibindo a transformação neoplásica por diferentes mecanismos: ativação da interrupção temporária do ciclo celular, indução da interrupção do ciclo celular de forma permanente, disparando a morte celular programada (apoptose) ou inibindo a angiogênese provavelmente por diminuir a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Sua detecção serve com um indicador do perfil genômico no CCR relacionado ao potencial de crescimento tumoral (kinzler & Vogelstein, 1996; Hanahan & Weinberg, 2000; Vogelstein et al., 2000).

No presente estudo dos tratamentos que receberam a administração da DMH o aumento da expressão do gene da proteína p53 não foi significativo em nenhum dos tratamentos ($p>0,05$), sugerindo que os prebióticos frutooligossacarídeo e inulina não protegem o cólon distal dos camundongos por aumentar a expressão do gene dessa proteína, **figura 7a**.

Danos no gene *TP53* estão presentes em 75% dos casos de CCR sendo envolvido na conversão de adenoma para adenocarcinoma por impedir a ligação da proteína p53 mutada em sequências específicas do DNA, o que impossibilita ativação de genes adjacentes (kinzler & Vogelstein, 1996; Hanahan & Weinberg, 2000; Vogelstein et al., 2000).

O DNA danificado causa um aumento tanto na concentração como na atividade da p53 que ativa a transcrição de um gene que codifica um inibidor de Ckd (CdkI) a

proteína p21. A p21 se liga à G₁/S-CdK, prevenindo que elas conduzam a célula para a fase S por inibir a fosforilação da retinoblastoma (Rb). O aprisionamento do ciclo celular em G₁ permite que a célula tenha tempo para reparar o DNA danificado antes de replicá-lo (Vogelstein et al., 2000). As inibições mediadas pela p21 podem ocorrer especificamente na sua ligação com a ciclina D-CdK4 ou CdK6 na fase G₁, ou ciclina E-CdK2 na fase de transição de G₁ para a fase S ou em G₂ inibindo a ciclina B1-CdK1. A p21 pode também inibir o ciclo celular independente de sua ligação a CdKs por inibição do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) o qual é requerido para a progressão do ciclo celular para a fase S por mediar a ligação da polimerase- δ a fita molde do DNA. A p21 pode também ligar-se a várias outras proteínas envolvidas na síntese e reparo do DNA inibindo a progressão do ciclo celular (Abbas & Dutta, 2009).

No presente estudo não observamos aumento na expressão do gene da p21 em nenhum dos tratamentos, **figura 7b**, sugerindo que os tratamentos com prebióticos não protegeram o cólon distal dos camundongos por mecanismos desencadeados pela p21. Um dos motivos de não ter ocorrido alterações na expressão do gene da proteína p21 em nenhum dos tratamentos pode ter sido desencadeado pela baixa expressão do gene da proteína p53.

Observamos também que a p21 não influenciou na diminuição da expressão do gene da ciclina-E, **figura 7c**. O aumento da ciclina-E é sugestivo de progressão do ciclo celular (Coradini et al., 2002; Bardon et al., 2002; Abbas & Dutta, 2009), no entanto, não observamos aumento expressivo do gene dessa ciclina em nenhum dos tratamentos avaliados .

A mutação das CdKIs também pode conduzir o ciclo celular por meio da ativação desregulada das ciclinas e CdKs. Por exemplo, o gene CDKN2A que codifica a proteína p16 é alvo extremamente comum de deleção ou inativação mutacional nos tumores humanos. A p16 quando ativa inibe a fosforilação da Rb por se ligar a CdK-4 e bloquear a formação do complexo ciclina-D/CdK4 e conseqüentemente a expressão da ciclina-E. A iniciação da replicação do DNA requer a atividade do complexo ciclina E-CdK2, e a expressão da ciclina E depende da família de fatores de transcrição E2F. Inicialmente em G₁ a Rb está na sua forma hipofosforilada ativa impedindo o E2F de se ligar ao DNA e ativar a transcrição da ciclina-E inibindo a progressão do ciclo celular (Burkhart & Sage, 2008).

No presente estudo observamos maior expressão da p16 no tratamento FOSCA, **figura 7d**, no entanto essa maior expressão não foi suficiente para reduzir a expressão da ciclina-D1 uma vez que com exceção do tratamento INL ($p < 0,05$) a expressão dessa

ciclina não diferiu nos demais tratamentos quando comparado ao tratamento C-. Porém, a p16 poderia estar inibindo a Cdk-4 e impedindo a formação do complexo ciclina-D1/Cdk-4 e conseqüentemente a fosforilação da retinoblastoma, o que poderia estar atuando na prevenção do aparecimento de FCA no cólon distal dos camundongos no tratamento FOSCA.

A progressão da fase G1 do ciclo celular é mediada pela combinação da atividade da ciclina-D1, que se liga a proteínquinases dependentes de ciclina (Coradini et al., 2002; Bardou et al., 2002). Em um estudo com camundongos com mutação no gene *APC*, que desenvolvem câncer de cólon espontaneamente, e que foram alimentados com inulina, foi observado que esse prebiótico aumentou a expressão de ciclina-D1 e o tamanho dos adenomas nestes animais, sugerindo um acelerado processo canceroso (Misikangas et al., 2008). Os resultados encontrados no presente estudo, não são condizentes com a literatura citada, pois a expressão da ciclina-D1 foi maior no tratamento INL ($p < 0,05$), **figura 7e**, que não recebeu a administração da DMH e não foi diferente nos demais tratamentos ($p > 0,05$), sugerindo que essa proteína não seja um fator determinante no aumento da incidência de FCA no cólon distal dos camundongos. No entanto, esse aumento na expressão do gene da ciclina-D1 poderia estar induzindo a proliferação celular em células saudáveis no tratamento INL para a renovação normal do epitélio da mucosa do cólon distal.

Diante desses resultados torna-se necessário, mais estudos, que possam elucidar os efeitos preventivos dos prebióticos na incidência de FCA.

4.7. Quantificação de *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium ssp.*, anaeróbios totais e aferição do pH fecal

Têm-se demonstrado que o aumento de bifidobactérias na microbiota intestinal tem melhorado a saúde de pacientes com doenças gastrointestinais crônicas e de idosos que possuem pequenas quantidades de bifidobactérias no intestino (Tuohy et al., 2003). As bifidobactérias proporcionam efeito inibitório em muitas bactérias que produzem enzimas carcinogênicas (Manning & Gibson, 2004; Rose et al., 2007). Estudos em animais sugerem que prebióticos podem exercer efeito protetor contra o desenvolvimento tumoral no cólon, mas dados em humanos ainda são inconsistentes (Rafter et al., 2007).

No presente estudo não foi observada diferenças na quantificação de *Bifidobacterium spp.*, **tabela 4**, em nenhum dos tratamentos avaliados. Assim não

podemos sugerir que essas bactérias possam estar exercendo efeitos protetores no cólon dos camundongos submetidos à administração da DMH uma vez que a quantificação dessas bactérias não diferiu em nenhum dos tratamentos avaliados ($p>0,05$).

Alguns autores observaram aumento no número de bifidobactérias e redução no número de bactérias patogênicas *Bacteroides/Prevotella*, *Clostridium histolyticum* e *C. lituseburens* nas fezes de humanos que receberam na dieta inulina extraída de chicória (Kleessen et al., 2007). Nossos resultados não são condizentes com a literatura uma vez que não observamos aumento na quantificação de *Bifidobacterium spp.* e *Clostridium spp.* em nenhum dos tratamentos avaliados ($p>0,05$). Em outro estudo os autores utilizaram três tratamentos com dieta contendo FOS, inulina e a mistura de FOS mais inulina em ratos, encontrando aumento na contagem de *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale* nos tratamentos com inulina e inulina mais FOS enquanto a dieta contendo somente FOS não afetou a quantidade desse microrganismo (Kleessen et al., 2001). Não observamos aumento na contagem *Clostridium spp.* em nenhum dos tratamentos avaliados, **tabela 4**, não sendo possível sugerir que o prebiótico inulina aumente a contagem de *Clostridium spp.* Também em nenhum dos tratamentos avaliados não foi observada diferenças na quantificação de anaeróbios totais, **tabela 4**.

Estudos recentes têm relatado que a suplementação com prebióticos é capaz diminuir o pH fecal exercendo ação bactericida (Búrigo et al. 2007; Hatayama et al., 2007). No presente estudo os valores do pH não apresentaram diferenças em nenhum dos tratamentos avaliados, **tabela 5**, não sendo possível sugerir ação bactericida através da aferição do pH fecal.

4.8. Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), acetato, propionato e butirato nas fezes do cólon e da gaiola

Fibras solúveis ao chegar ao cólon são fermentadas pela microbiota intestinal em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Os AGCC incluem ácido acético, propiônico e butírico, que são combustíveis para as células da mucosa colônica. A produção de AGCC tem sido relacionada com efeitos benéficos ao organismo incluindo a diminuição do colesterol sérico e o risco de câncer (Slavin, 2004). Alguns autores observaram que a inulina aumentou a produção de AGCC como o butirato no intestino de ratos (Roland et al., 1995). Outros autores também observaram o aumento de bifidobactérias, AGCC como acetato e butirato nas fezes de humanos (Kleessen et al., 1997). No entanto em

outro estudo os autores observaram aumento no número de bifidobactérias no intestino de humanos sem aumento de ácido butírico (Kruse et al., 1999).

Em estudo com ratos utilizando os prebióticos FOS e inulina foi observado que esses aumentaram significativamente a concentração de ácido butírico no ceco e cólon, e somente o tratamento com inulina resultou em aumento fecal expressivo desse ácido quando comparado ao controle. Segundo esses autores dietas contendo FOS ou inulina tem aumentado a proporção molar de ácido butírico nas fezes sugerindo um efeito preventivo do câncer de cólon (Kleessen et al., 2001).

No presente estudo não foi possível afirmar que os ácidos graxos acético, propiônico e butírico estejam desempenhando efeitos protetores no cólon dos camundongos, uma vez que em nenhum dos tratamentos avaliados foi observado diferença na quantificação desses AGCC nas fezes do cólon e da gaiola. Estes resultados podem estar relacionados à contagem de bifidobactérias, que não apresentaram diferenças significativas em sua contagem em nenhum dos tratamentos avaliados.

5. Conclusão

Os resultados desse estudo permitiram concluir que a inulina possui eficácia na prevenção do aparecimento de FCA com número menor ou igual a três criptas e FCA com número maior que três criptas no cólon proximal, médio e distal, no entanto observou-se uma baixa expressão dos genes das proteínas supressoras de tumor p53, p21 e p16. Esses dados sugerem que mais estudos com esse prebiótico devem ser realizados para tentar elucidar os mecanismos desencadeados na prevenção do aparecimento de FCA no cólon dos camundongos.

Para o aparecimento de FCA com número menor ou igual a três criptas e FCA com número maior que três criptas no cólon médio e distal o frutooligossacarídeo mostrou-se eficaz. Essa eficácia no cólon distal pode ser atribuída à expressão aumentada do gene da proteína p16.

Diante de tais evidências é importante que a população tenha consciência de que uma dieta saudável contendo alimentos ricos em prebióticos é de vital importância na prevenção do CCR.

6. Referências

- Abbas, T.; Dutta, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews**, 2009;9:400-14.
- Aebi, H. Catalase in vivo. **Methods Enzymol**, 1984;105:121-26.
- Bardon, S.; Foussard, V.; Fournel, A. Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. **Cancer Letters**, 2002;181:187-94.
- Bird, RP. Observations and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Letters**, 1987;37(2):147-51.
- Bolognani, F.; Rumney, CJ.; Pool-Zobel, BL.; Rowland, I.R.. Effect of lactobacilli, bifidobacteria and inulin on the formation of aberrant crypt foci in rats. **European Journal of Nutrition**, 2001;40:293-300.
- Bouhnik, Y.; Vahedi, K.; Achour, L.; Attar, A.; Salfati, J.; Pochart, p; Marteau, P.; Flourie, B.; Bornet, F.; Rambaud, JC. Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. **Journal of Nutrition**, 1999;129:113-16.
- Búrigo, T.; Fagundes, RLM.; Trindade, EBSM.; Vasconcelos, HCFF. Efeito bifidogênico do frutooligossacarídeo na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica. **Revista de Nutrição**, 2007;20(5):491-97.
- Burkhardt, DL.; Sage, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nature Reviews**, 2008;8:671-82.
- Coradini, D.; Pellizzaro, C.; Abolafio, G.; Daidone, M.G. Sodium butyrate modulates cell cycle-related protein in HT29 human colonic adenocarcinoma cells. **Cell Proliferation**, 2002;33:139-46.
- Femia, AP.; Luceri, C.; Dolara, P.; Giannini, A.; Biggeri, A.; Salvadori, M.; Clune, Y.; Collins, KJ.; Paglierani, M.; Caderni, G. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. **Carcinogenesis** 2002;23(11):1953-60.
- Ferreira, CLLF.; Teshima, E.; Costa, NMB. Effect of probiotic, prebiotic and synbiotic on colon and cecum microbiota of rats. **International Journal of probiotics and prebiotics**, 2008;03:71-76.

- Field, C.J.; Mcburney, M.I.; Massimino, S. The fermentable fiber content of the diet alters the function and composition of canine gut associated lymphoid tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 1999;72:325-41.
- Hailfinger, S.; Jaworski, M.; Marx-Stoelting, P.; Wanke, I.; Schwarz, M. Regulation of P53 stability in p53 mutated human and mouse hepatoma cells. **International Journal of Cancer**, 2007;120:1459-64.
- Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, 2000;100:57-70.
- Hartemink, R.; Kok, B.J.; Weenk, G.H.; Rombouts, F.M. Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, 1996;27:33-43.
- Hatayama, H.; Iwashita, J.; Kuwajima, A.; Abe, T. The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2007;356:599-603.
- Ho, J.C.; Zheng, S.; Comhair, S.A.A.; Farver, C.; Erzurum, S.C. Differential Expression of Manganese Superoxide Dismutase and Catalase in Lung Cancer. **Cancer Research**, 2001;61, 8578–585.
- Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. Landscaping the cancer terrain. **Science**, 1996;280:1036-37.
- Kleessen, B.; Sykura, B.; Zunft, H.J.; Blaut, M. Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. **American Journal of Clinical Nutrition**, 1997;65:1397-402.
- Kleessen, B.; Hartmann, L.; Blaut, M. Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. **British Journal of Nutrition**, 2001;86:291-300.
- Kleessen, B.; Schwarz, S.; Boehm, A.; Fuhrmann, H.; Richter, A.; Henle, T.; Krueger, M. Jerusalem artichoke and chicory inulin in bakery products affect faecal microbiota of healthy volunteers. **British Journal of Nutrition**, 2007;98:540-49.
- Kruse, H.; Kleessen, B.; Blaut, M. Effects of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects. **British Journal of Nutrition**, 1999;82:375-82.
- Laranjeira, L.L.S.; Taha, M.O.; Ferme, A. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 13(3). 1998. doi:10.1590/S0102-86501998000300008.
- Manning, T.S.; Gibson, G.R. Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. **Best Practice Research Clinical Gastroenterology**, 2004;18(2):287-98.

- Marotta, F.; Naito, Y.; Minelli, E.; Tajiri, H.; Bertuccelli, J.; Wu, CC.; Min, CH.; Hotten, P.; Fesce, E. Chemopreventive effect of a probiotic preparation on the development of preneoplastic and neoplastic colonic lesions: an experimental study. **Hepatogastroenterology**, 2003;50(54):1914-18.
- Misikangas, M.; Tanayama, H.; Rajakangas, J.; Lindé, J.; Pajaril, A-M.; Mutanenl, M. Inulin results in increased levels of β -catenin and cyclin D1 as the adenomas increase in size from small to large in the Min/+ mouse. **British Journal of Nutrition**, 2008;99:963-70.
- Mudhasani, R.; Zhu, Z.; Hutvagner, G.; Eischen, CM.; Lyle, S.; Hall, LL.; Lawrence, JB.; Imbalzano, AN.; Jones, SN. Loss of miRNA biogenesis induces p19^{Arf}-p53 signaling and senescence in primary cells. **Journal of Cell Biology**, 2008;181(7):1055-63.
- Nakade, K.; Pan, J.; Yamasaki, T.; Murata, T.; Wasylyk, B.; Yokoyama, KK. JDP2 (Jun Dimerization Protein 2)-deficient Mouse Embryonic Fibroblasts Are Resistant to Replicative Senescence. **Journal of Biological Chemistry**, 2009;284(16):10808-17.
- Newell, L.; Heddle, JA. The potent colon carcinogen, 1,2 dimethylhydrazine induced mutations primarily in the colon. **Mutation Research**. 2004;564:1-7.
- Rafter, J.; Bennett, M.; Caderni, G.; Clune, Y.; Hughes, R.; Karlsson, PC.; Klinder, A.; O'Riordan, M.; O'Sullivan, GC.; Pool-Zobel, B.; Recnkemmer, G.; Roller, M.; Rowland, I.; Salvadori, M.; Thijs, H.; Loo, JV.; Watzl, B.; Collins, JK. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2007;85:488-96.
- Rajkumar, L.; Kittrell, FS.; Guzman, RC.; Brown, PH.; Nandi, S.; Medina, D. Hormone-induced protection of mammary tumorigenesis in genetically engineered mouse models. **Breast Cancer Research**, 2007;9:R12 (doi:10.1186/bcr1645).
- Reddy, BS.; Hamid, R.; Rao, CV. Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. **Carcinogenesis**, 1997;18:1371-74.
- Reeves, PG.; Nielsen, FH.; Junior, GCF. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc 73 Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, 1993;123:1939-51.
- Roland, N.; Nugon-Baudon, L.; Andrieux, C.; Szykut, O. Comparative study of the fermentative characteristics of inulin and different types of fibre in rats inoculated with a human whole faecal flora. **British Journal of Nutrition**, 1995.;14: 239-49.

- Roller, M.; Femia, AP.; Caderni, G.; Rechkemmer, G.; Watzl, B. Intestinal immunity of rats with colon cancer is modulated by oligofructose-enriched inulin combined with *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*. **British Journal of Nutrition**, 2004;92:931-38.
- Rose, DJ.; Demeo, MT.; Keshavarzian, A.; Hamaker, BR. Influence of Dietary Fiber on Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer: Importance of Fermentation Pattern. **Nutrition Reviews**, 2007;65(2):51-62.
- Rowland, IR.; Rumney, CJ.; Coutts, JT.; Lievense, LC. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis**, 1998;19(2):281-85.
- SAEG - **Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.
- Santos, MS.; Ferreira, CLLF.; Gomes, PC. Influência do fornecimento de probiótico à base de *Lactobacillus sp.* sobre a microbiota intestinal de leitões. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. 2003;27(6):1395-1400.
- Sauer, J.; Richter, KK.; Pool-Zobe, BL. Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2007;18:736-45.
- Skrzydłowska, E.; Sulkowski, S.; Koda, M.; Zalewski, B.; Kanczuga-Koda, L.; Sulkowska, M. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, 2005;11(3):403-06.
- Slavin, JL. Whole grain and human health. **Nutrition Research Reviews**, 2004;17:99-110.
- Smirick-Tjardes, MR.; Grieshop, CM.; Flickinger, EA.; Bauer, LL.; Fahey Jr., GC. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentive characteristics of growing pigs. **American Society of Animal Science**, 2003;81:2535-45.
- Tuohy, KM.; Probert, HM.; Smejkal, CW.; Gibson, GR. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, 2003;8(15):692-700.
- Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, AJ. The p53 tumour-suppressor gene integrates numerous signals that control cell life and death. As when a highly connected node in the Internet breaks down, the disruption of p53 has severe consequences. **Nature**, 2000;408:307-10.
- Zheng, S.; Steenhout, P.; Kuiran, D.; Qihonga, W.; Weipinga, W.; Hagerc, C.; Haschkeb, F.; Clemensd, RA. Nutritional support of pediatric patients with cancer

consuming and enteral formula with fructooligosaccharides. **Nutrition Research**, 2006;26:154-62.

RESUMO (CAPÍTULO IV)

GOMIDES, Antônio Frederico de Freitas, D.S. Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2010. **Farelo de linhaça desengordurado previne o aparecimento de focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon de camundongos Balb/C.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientadores: Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Leandro Licursi de Oliveira.

Estudos recentes investigando o efeito protetor das fibras tem se mostrado efetivo na investigação do aparecimento de focos de criptas aberrantes (FCA) ou lesões pré-neoplásicas no cólon distal de camundongos. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos do farelo de linhaça desengordurado no cólon de camundongos Balb/C induzidos ao aparecimento de FCA com 1,2-dimetilhidrazina (DMH). Os resultados desse estudo permitiram concluir o farelo de linhaça desengordurado mostrou-se eficaz na prevenção do aparecimento de FCA com número menor ou igual a três criptas. Para a incidência de FCA com número maior que três criptas, que são indicativos categóricos de lesões pré-neoplásicas no cólon distal, o farelo de linhaça desengordurado também possui efeitos preventivos. Essa eficácia pode ser atribuída à expressão aumentada do gene da proteína p53.

CAPÍTULO IV

Farelo de linhaça desengordurado previne o aparecimento de focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon de camundongos Balb/C

1. Introdução

O câncer colorretal (CCR) acomete grande parte da população mundial, sendo o terceiro tipo de câncer mais prevalente no mundo (INCA, 2009). Um dos primeiros indicativos do desenvolvimento desse tipo de câncer é a presença de focos de criptas aberrantes (FCA) ou lesões pré-neoplásicas (Stevens et al., 2007). Focos de criptas aberrantes (FCA) são lesões caracterizadas morfológicamente por criptas anormais na superfície da mucosa do cólon, sendo descritas primariamente em ratos e tidas como evidências para o desenvolvimento futuro do CCR (Bird, 1987).

Vários tipos de alimentos estão sendo investigados como substâncias preventivas contra o CCR dentre eles as fibras, diariamente correlacionadas na prevenção das diversas enfermidades do sistema digestório incluindo o CCR (Rubio, 2002).

A relação entre o consumo de fibra na dieta e o risco de câncer de cólon tem sido estudado a mais de 30 anos. No entanto, os dados não são conclusivos. Há muitas razões para esses resultados inconclusivos, como as fontes e tipos diversificados de fibras além dos diversos sítios de localização do câncer de cólon (diferentes segmentos) principalmente em humanos. O estilo de vida, o uso de fumo, álcool e consumo de alimentos de diferentes modos são também fatores que aumentam potencialmente as variáveis para chegar aos mecanismos de atuação das substâncias com efeito carcinogênico (Hill, 2003, Papas et al., 2004).

Alimentos ricos em fibras têm-se revelado importante na prevenção de diversas doenças. Dentre eles o farelo de linhaça desengordurado que se constitui em uma boa fonte de nutrientes incluindo as fibras e os ácidos graxos essenciais. A fração de fibra mais importante consiste de amidos resistentes, a celulose, e complexos polímeros como a lignana (Brooks et al., 2004; Bayrak et al., 2010); é também uma fonte de fibra solúvel como a mucilagem. Estudos indicam que alguns componentes ativos presentes na linhaça possuem a capacidade de prevenção de algumas doenças como a hipercolesterolemia, diabetes e câncer (Cunnane et al., 1993).

Outros mecanismos pelos quais as fibras podem funcionar como constituintes anti-carcinogênicos incluem o aumento do volume fecal estimulando dessa forma o

peristaltismo e diminuindo o tempo de exposição do epitélio intestinal a carcinógenos intraluminais; a diminuição dos níveis séricos de insulina com efeito anti-carcinogênico; a ligação das fibras dietéticas ao ácido biliar primário o que leva a uma diminuição da produção de ácidos biliares, os quais são pró-carcinogênicos (Hawk et al., 2001; Rose et al., 2007).

Diante de tais evidências o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos protetores das fibras em camundongos induzidos ao aparecimento de FCA e alimentados com dietas contendo farelo de linhaça desengordurado.

2. Métodos

2.1. Animais e dietas

Foram utilizados 24 camundongos Balb/C machos com 12 semanas de idade e com peso de aproximadamente 25 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde e permaneceram em caixas coletivas no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, mantidos à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em fotoperíodo de 12 horas. Os animais foram divididos em três tratamentos ($n = 8$) conforme **tabela 1**. Os animais receberam água *ad libitum* e dieta AIN93M modificada (Reeves et al., 1993), acrescida de 10% de farelo de linhaça desengordurado em substituição a celulose e dieta sem fibras durante 15 semanas. O experimento foi conduzido, de acordo com os princípios éticos para manejo de animais de laboratório e estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Tabela 1. Diferentes tipos de tratamentos aos quais os animais foram submetidos.

Tratamento	Características
C-	Dieta AIN93M sem fibras + DMH
LIN	Dieta AIN93M com farelo de linhaça desengordurado
LINCA	Dieta AIN93M com farelo de linhaça desengordurado + DMH

2.2. Indução do aparecimento de FCA com a administração de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e coleta de material

Os animais que foram submetidos ao aparecimento de FCA receberam injeção intraperitoneal uma vez por semana de 20mg/Kg de peso corpóreo de DMH durante um período de oito semanas. A DMH foi dissolvida em solução salina 0,9% contendo 1 mM de EDTA e 10 mM de citrato de sódio, pH 8, os animais dos grupos controle receberam somente o veículo sem a droga (Newell & Heddle, 2004). Sete semanas após a última aplicação de DMH os animais foram sacrificados, por asfixia com CO_2 . Foi retirado o intestino grosso dos animais do ceco até o ânus, para a contagem de FCA. No cólon distal e fígado dos animais foi mensurada a atividade da catalase para avaliação do estresse oxidativo ocasionado pela administração da DMH e no cólon distal também foi quantificado o RNAm para avaliar a expressão dos genes das proteínas ciclina-D1,

ciclina-E, p16, p21 e p53. Foi coletado o baço para quantificação dos linfócitos CD4 e CD8, as fezes do cólon e da gaiola foram coletadas para a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta: acético, propiônico e butírico e ainda foram pesados o fígado, baço, rim e coração para avaliação da homeostasia do animal.

2.3. Preparação do tecido para contagem de FCA

Após a remoção, o intestino grosso foi lavado em solução tampão salina fosfato (PBS), aberto longitudinalmente pela margem contra mesentérica, colocado em placas de parafina, com a mucosa voltada para a parte superior da placa e fixadas em formalina de Carson por 24 horas. Depois de fixado, o intestino grosso foi medido e dividido em três fragmentos iguais, denominados proximal, médio e distal, em relação ao ceco. Em seguida os fragmentos foram corados em solução de azul de metileno a 0,1% por 2 minutos, e lavados em tampão fosfato para a retirada do excesso de corante para posterior análise. A contagem das lesões foi realizada por microscopia óptica com aumento de 40x e 100x. 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 do FCA foi com base no número de criptas aberrantes por foco, ou seja, focos com número menor ou igual a três criptas e focos com número maior que três criptas (Bird, 1987).

2.4. Processamento do baço para quantificação de linfócitos CD4 e CD8

Após a morte dos camundongos os baços foram coletados, macerados em PBS e centrifugados durante 10 minutos a 1600 g a 4°C, em seguida o sobrenadante foi descartado e os pellets contendo os esplenócitos e hemácias foram diluídos em tampão de lise gelado (NH₄Cl 0,16M; Tris HCl 0,7M pH 7,5; EDTA 2mM) e incubado a temperatura ambiente por 4 minutos no escuro para lise das hemácias. Após esta etapa foi adicionado 8 ml de meio RPMI-16 incompleto com 2 mM de EDTA e a suspensão celular submetida à centrifugação durante 10 min a 1600 g a 4°C. Após a centrifugação os pellets de esplenócitos foram ressuspensos em 3 ml de RPMI-1640 completo e as células contadas em câmara de Neubauer. Para quantificar os linfócitos CD4 e CD8 foi realizada citometria de fluxo. Os anticorpos utilizados foram adquiridos junto à BD Pharmingen, NJ USA (anti-CD44-PE Cy5.5) e Caltag Laboratories, Thailand (anti-CD4-FITC e anti-CD8-FITC). Células extraídas do baço dos animais de todos os tratamentos foram incubadas com uma mistura de anticorpos contendo anti-CD4⁺ ou

anti-CD8⁺, para avaliar a expressão de linfócitos CD4 ou CD8, respectivamente. Após 2 horas de incubação, as amostras foram centrifugadas a 1500 g por 10 minutos e ressuspendidas em PBS – Formol 1%. As amostras foram lidas em citômetro de fluxo GUAVA (Guava EasyCyte Mini System, Millipore) e os dados analisados no software Guava CytoSoft 4.2.1 (Field et al., 1999).

2.5. Atividade da catalase no fígado e intestino

Para a atividade da catalase o fígado e cólon distal dos camundongos foram macerados em tampão fosfato e obtido um homogenato que foi acondicionado em eppendorf, centrifugado a 6000 g a 4 °C durante 10 minutos e coletado o sobrenadante. Posteriormente a centrifugação o homogenato do fígado e o cólon distal foram utilizados para medir a atividade da catalase (Aebi, 1984). Para o branco foi utilizado 2 mL de tampão fosfato e 20 µL do homegenato do fígado e cólon distal medido espectrofotometricamente a 240 nm. Para cada amostra foi realizado um novo branco com o respectivo homogenato. Para medir a atividade da catalase foi preparada no momento da análise uma solução contendo 50 mL de tampão fosfato e 80 µL de peróxido de hidrogênio a 30%. Em uma cubeta de quartzo foi adicionado 20 µL do homogenato e 2 mL de tampão fosfato com peróxido de hidrogênio, a atividade da catalase foi medida durante 1 minuto e mesurada três vezes a cada 30 segundos, ou seja, no tempo 0, 30 e 60 segundos espectrofotometricamente a 240 nm. Para o cálculo da atividade da catalase foi realizada a quantificação de proteína total utilizando o kit BIOCLIN[®] e a atividade da catalase foi expressa em (U da catalase/mg de proteína).

2.6. RT-PCR

2.6.1. Extração do RNAm e análise quantitativa da expressão dos genes das proteínas ciclinas-D1, ciclina-E, p16, p21 e p53.

O RNA foi extraído após maceração do cólon distal em eppendorf utilizando TRIzol[®] (Invitrogen, CA, USA), que contém isotiocianato de guanidina e sarcosil, que são usados para a extração de RNA. Brevemente, foram homogeneizados 500 µL da amostra com 750 µL de TRIzol[®] e a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir foram adicionados 300 µL de clorofórmio agitando-se os tubos por 15 minutos manualmente e incubando-os a temperatura ambiente por mais 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a uma temperatura de 4°C,

após a qual a fase aquosa transparente foi separada e transferida para um outro tubo. Em seguida foi realizada a adição de 350 µL de isopropanol, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos a fim de promover a precipitação do RNA e posteriormente submetidas à centrifugação por 10 minutos a uma temperatura de 4°C. Os “pellets” foram lavados com 750 µL de etanol 75%, centrifugados por 10 minutos a 7.500 g e secos a temperatura ambiente por 30 minutos. Após a secagem, os “pellets” foram ressuspensos em 20 µL de água DEPC. Aproximadamente 10 µg de cada RNA total, obtidos conforme este protocolo, foram usados para sintetizar as primeiras fitas de cDNA, usando “primers” para ciclinas-D1, ciclina-E, p16, p21 e p53.

2.6.2. Síntese do cDNA

Após extração do RNA total das amostras foi realizada a síntese da primeira fita de cDNA para ciclina-D1, ciclina-E, p16, p21 e p53, usando-se o kit Superscript™ (Invitrogen®, New York, USA). Para tanto, 1µl de “primer” randômico (pd(N)₆) (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, England) foi adicionado a aproximadamente 2µg de RNA do cólon, sendo submetido a aquecimento por 10 minutos à 70°C .

Após isto, foi preparada uma mistura contendo o tampão da transcriptase reversa, DTT, transcriptase reversa e dNTPs. Em seguida foi realizado o aquecimento desta mistura e, posteriormente, esta foi adicionada à amostra. Em seguida, essa solução foi incubada por 1 hora a 42°C, e por 1 minuto a 70°C, para desnaturar a transcriptase reversa.

2.6.3. Quantificação do RNAm de ciclina-D1, ciclina-E, p16, p21 e p53 por PCR em tempo real

A expressão dos genes de ciclina D1, ciclina-E, p16, p21 e p53 foram avaliadas do cólon distal. Após 24 h o cólon foi clareado por centrifugação a 10.000 g por 2 minutos e submetidos à extração do RNA e a síntese do DNA complementar, conforme descrito anteriormente. A avaliação da expressão dos genes foi realizada através da técnica de PCR em tempo real onde a quantificação destes RNAs mensageiros foi comparada à expressão dos RNAs mensageiros de um gene constitutivo que foi o da β-actina. Para tanto, aproximadamente 2 µg do cDNA total oriundos do cólon foram usadas para a PCR em tempo real, numa reação de 50 µl que conteve 0,45 nmol dos “primers” sense e antisense específicos para cada gene, **tabela 2**, 20 U/µl do inibidor de RNase e 12,5 µl do “Master Mix” SYBR Green PCR. As condições de ciclagem foram

95°C por 10 minutos seguidos por 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. A quantificação da expressão transcricional dos genes foi realizada através do software Gene Amp[®] 5700 Sequence Detection System Version 1.3 (Applied Biosystems), (Hailfinger, et al., 2007; Rajkumar et al. 2007; Muddhasani, et al. 2008; Nakade et al., 2009).

Tabela 2. Primers sense e antisense específicos para os genes.

Genes	Primers
Ciclina D1 (Rajkumar et al.; 2007)	Sense: 5'-CATCAAGTGTGACCCGGACTG-3' Antisense: 5'-CCTCCTCCTCAGTGGCCTTG-3'
Ciclina-E (Nakade, et al.; 2009)	Sense: 5'-AGACCCACACCAACAGCTTG-3' Antisense: 5'-TCATTCTGTCTCCTGCTCGC-3'
p16 (Muddhasani, et al.; 2008)	Sense: 5'- ATCTGGAGCAGCATGGAGTC-3' Antisense: 5'- TCGAATCTGCACCGTAGTTG-3'
p21 (Muddhasani, et al.; 2008)	Sense: 5'-GTCAGGCTGGTCTGCCTCCG-3' Antisense: 5'-CGGTCCCCTGGACAGTGAGCAG-3'
p53 (Hailfinger, et al.; 2007)	Sense: 5'- GGAGACATTTTCAGGCTTATGG -3' Antisense: 5'- AGAAGGGACAAAAGATGACAGG -3'

2.7. Quantificação de *Bifidobacterium spp.*, e *Clostridium spp* e anaeróbios totais.

Bifidobacterium spp. foram determinadas em agar MRS + NPML (Hartemink et al., 1996) e anaeróbios totais em agar Wilkins-Chalgren. As amostras plaqueadas contendo anaeróbios totais e *Bifidobacterium spp.* foram incubadas a 37 °C em câmara de anaerobiose (Gás Pak System – BBL, Sparks, USA), por 48 horas e 72 horas respectivamente. Para a contagem de *Clostridium spp.*, foi utilizado agar RCM (Reinforced Clostridial Medium). As amostras plaqueadas foram incubadas a 37°C em câmara de anaerobiose (Gás Pak System – BBL, Sparks, USA), por 48 horas (Santos et al., 2003). As análises foram feitas em duplicata e os resultados para contagem de colônias de *Bifidobacterium spp.*, anaeróbios totais e *Clostridium spp.* foram expressos em Log₁₀ UFC/g.

2.8. Extração e dosagem de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acético, propiônico e butírico nas fezes do cólon e da gaiola por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

A análise das fezes foi feita em duplicata. Foram pesadas aproximadamente 400 mg de fezes em Eppendorf e adicionado 500 µL de ácido m-fosfórico a 25%, agitado e mantido em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Após os Eppendorfs foram

centrifugados a 13.200 rpm por 30 minutos, coletado o sobrenadante e centrifugado a 13.200 rpm por 20 minutos e congelados a -20 °C.

Para a dosagem, as amostras das fezes foram centrifugadas por 10 minutos a 13.200 rpm e aplicadas no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC), marca SHIMADZU, modelo SPD-10A VP acoplado ao Detector Ultra Violeta (UV) utilizando-se um comprimento de onda de 210 nm.

Para a separação cromatográfica, 20 uL de amostra foi injetada em uma coluna móvel SCR – 101H marca SHIMADZU com 30 cm x 7,9 mm de diâmetro com fluxo de 0,8 ml/minuto e pressão de 24 Kgf utilizando-se como fase móvel água em 1% de ácido m-fosfórico (Smirick-Tjardes et al., 2003 modificado).

2.9. Peso dos órgãos

Foram pesados fígado, baço, coração e rim após sete semanas da última aplicação da DMH.

2.10. Análise estatística

Foi utilizado o software Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1, para análise estatística (SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, 2007). As comparações entre três ou mais grupos independentes foram realizadas por análise de variância (ANOVA) para dados com a distribuição normal. Como ocorreram diferenças estatísticas, foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey e teste não-paramétrico de Lilliefors para detectar os grupos que diferiram. O valor (p) foi fixado até 5% com o intuito de obter uma confiabilidade de 95% nas comparações para o teste de Tukey.

3. Resultados

3.1. Contagem de focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon proximal, médio e distal

No tratamento (LIN) que não recebeu a inoculação de DMH não foi observado FCA em nenhum dos seguimentos do intestino diferindo em relação ao controle (C-) ($p < 0,05$). No cólon proximal o tratamento LINCA não diferiu em relação ao controle (C-), ($p > 0,05$). No cólon médio e distal o tratamento LINCA apresentou menor incidência de FCA com número menor que três criptas em relação ao controle (C-) ($p < 0,05$), **figura 1**. Não foram observados FCA com mais de três criptas no cólon proximal em nenhum dos tratamentos. No cólon médio e distal o tratamento LINCA não apresentou FCA com número maior que três criptas diferindo em relação ao controle (C-), ($p < 0,05$), **figura 2**.

3.2. Atividade da catalase no fígado e no cólon distal

A atividade da catalase no fígado e no cólon distal não diferiu em nenhum dos tratamentos avaliados ($p > 0,05$), **figuras 3 e 4**.

3.3. Citometria de fluxo das células do baço

A contagem de células CD4 não foi diferente em nenhum dos tratamentos, teste não-paramétrico de Lilliefors ($p = 0,01$). Para células CD8 a contagem também não diferiu em nenhum dos tratamentos ($p > 0,05$), teste de Tukey, e a razão CD4/CD8 não foi diferente em nenhum dos tratamentos, teste não-paramétrico de Lilliefors ($p = 0,01$), **figura 5**.

3.4. Peso dos órgãos

No fígado e no rim foi observado menor peso no tratamento C- ($p < 0,05$). No coração e baço não foram observadas diferenças no peso em nenhum dos tratamentos ($p > 0,05$), **figura 6**.

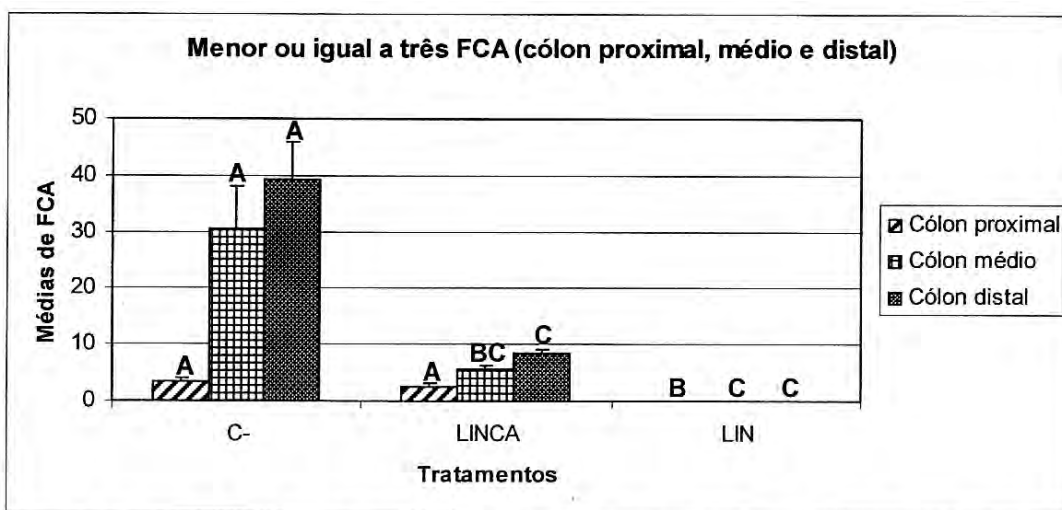


Figura 1. Contagem de FCA com número menor ou igual a três criptas no cólon proximal, médio e distal de camundongos Balb/C que receberam a administração da DMH. No cólon proximal somente o tratamento LIN diferiu do tratamento C-. No cólon médio e distal os tratamentos LINCA e LIN diferiram do tratamento C-. A,B,C Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

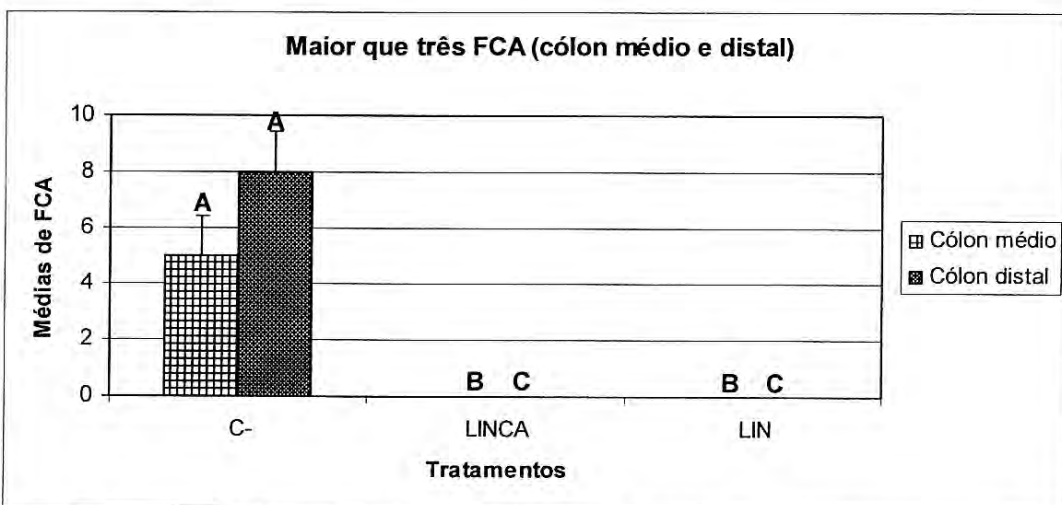


Figura 2. Contagem de FCA com mais de três criptas no cólon médio e distal de camundongos Balb/C que receberam a administração da DMH. No cólon médio e distal os tratamentos LINCA e LIN não apresentaram FCA, diferindo do tratamento C-. A,B,C Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

C- = Dieta AIN93M sem fibras + DMH

LINCA = Dieta AIN93M com farelo de linhaça desengordurado + DMH

LIN = Dieta AIN93M com farelo de linhaça desengordurado

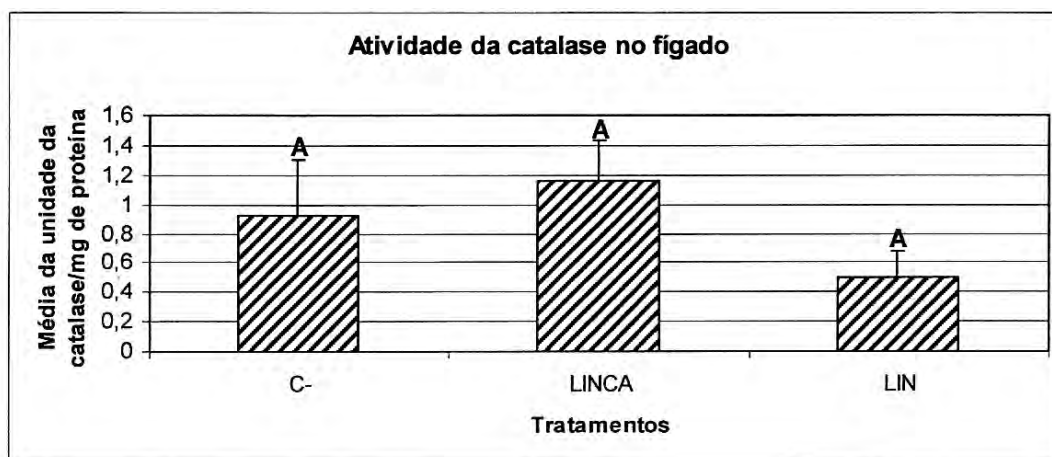


Figura 3. Atividade da catalase no fígado de camundongos Balb/C. Não foi observada diferença na atividade da catalase no fígado em nenhum dos tratamentos. ^AMédias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

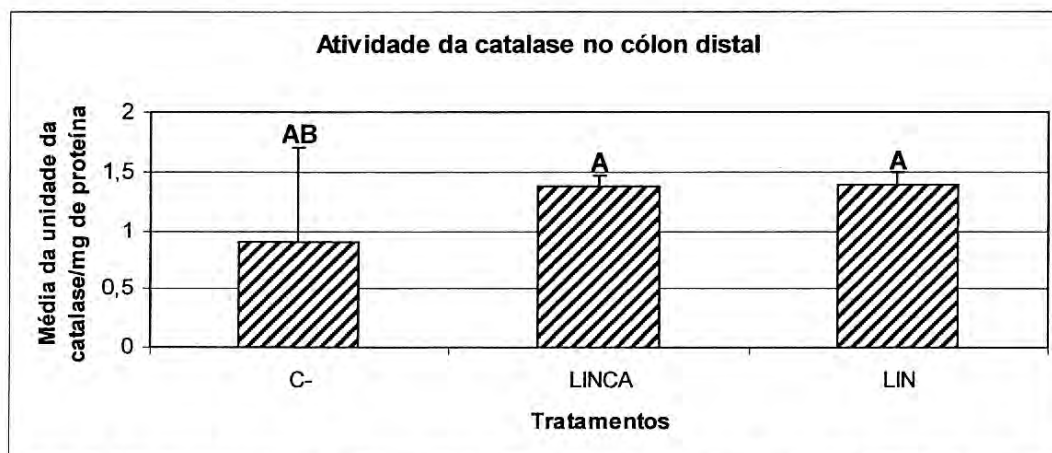


Figura 4. Atividade da catalase no cólon distal de camundongos Balb/C. Não foi observada diferença na atividade da catalase no cólon distal em nenhum dos tratamentos. ^{A,B}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

C- = Dieta AIN93M sem fibras + DMH

LINCA = Dieta AIN93M com farelo linhaça desengordurado + DMH

LIN = Dieta AIN93M com farelo de linhaça desengordurado

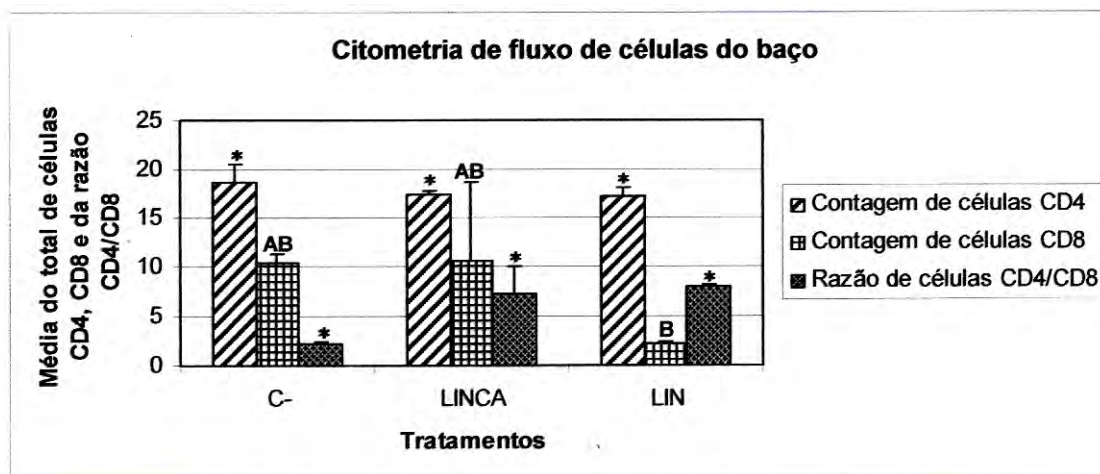


Figura 5. Citometria de fluxo do baço de camundongos Balb/C. A contagem de células CD4 e CD8 e a razão CD4/CD8 não diferiu em nenhum dos tratamentos. ^{A,B}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. *Não significativo pelo teste não-paramétrico de Lilliefors ($p=0,01$).

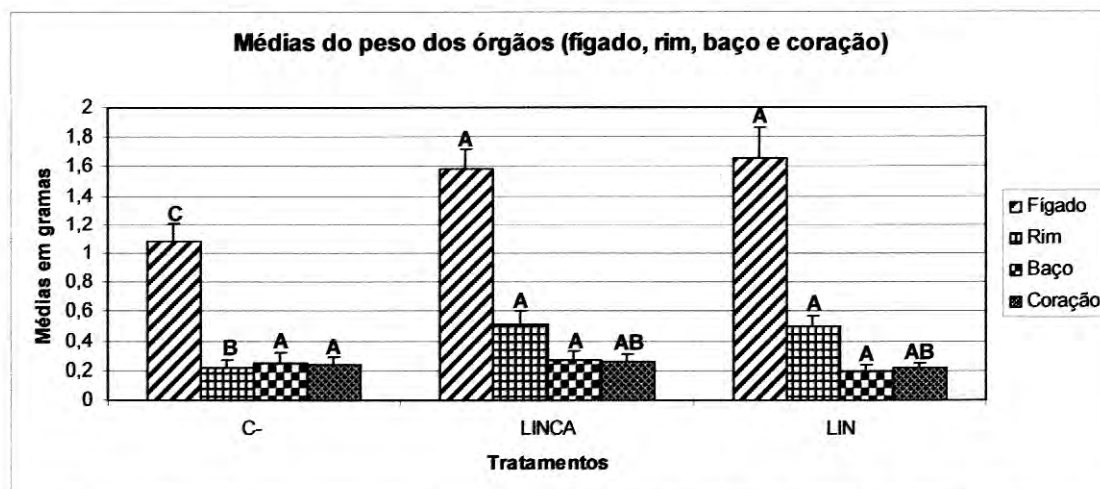


Figura 6. Peso dos órgãos dos camundongos Balb/C. No fígado e rim foi observado diferença no peso nos tratamentos LINCA e LIN em relação ao tratamento C-. ^{A,B,C}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

C- = Dieta AIN93M sem fibras + DMH

LINCA = Dieta AIN93M com farelo de linhaça desengordurado + DMH

LIN = Dieta AIN93M com farelo de linhaça desengordurado

3.5. RT-PCR

O tratamento LINCA apresentou diferença em relação ao tratamento C- com maior expressão do RNAm para o gene da proteína p53 ($p < 0,05$), **figura 7a**. Os tratamentos LIN e LINCA não apresentaram diferenças para a expressão do RNAm para o gene da proteína p21 em relação ao controle (C-), ($p > 0,05$), **figura 7b**. O tratamento LINCA apresentou diferença em relação aos tratamentos C- com maior expressão do RNAm para o gene da proteína ciclina-E ($p < 0,05$), **figura 7c**. Não foram observadas diferenças para a expressão do RNAm para o gene da proteína p16 e ciclina-D1 em nenhum dos tratamentos ($p > 0,05$), **figuras 7d e 7e**.

3.6. Quantificação de *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, anaeróbios totais e aferição do pH fecal

A contagem de *Clostridium spp.*, *Bifidobacterium spp.* e anaeróbios totais não diferiu em nenhum dos tratamentos avaliados ($p > 0,05$), **tabela 3**. O pH fecal também não diferiu em nenhum dos tratamentos ($p > 0,05$), **tabela 4**. Teste de Tukey.

Tabela 3. Médias da contagem de bactérias Log₁₀ UFC/g.

Médias da contagem de bactérias			
Tratamentos	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Clostridium spp.</i>	Anaeróbios totais
C-	7,990 ± 0,632*	8,813 ± 0,061 ^{AB}	8,738 ± 0,795*
LIN	7,671 ± 0,465*	7,984 ± 0,415 ^B	8,976 ± 0,727*
LINCA	8,46 ± 0,063*	8,813 ± 0,061 ^{AB}	8,806 ± 0,072*

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferiu entre si pelo teste de TuKey ao nível de 5% de probabilidade. *Não significativo pelo teste de Tukey.

Tabela 4. pH das fezes do cólon.

Tratamentos			
	C-	LIN	LINCA
pH	6,93±0,51*	7,49±0,67*	7,35±0,48*

*Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.7. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acético, propiônico e butírico

A quantificação de ácidos graxos nas fezes do cólon e da gaiola na não apresentou diferenças em nenhum dos tratamentos avaliados. Teste não-paramétrico de Lilliefors ($P = 0,01$).

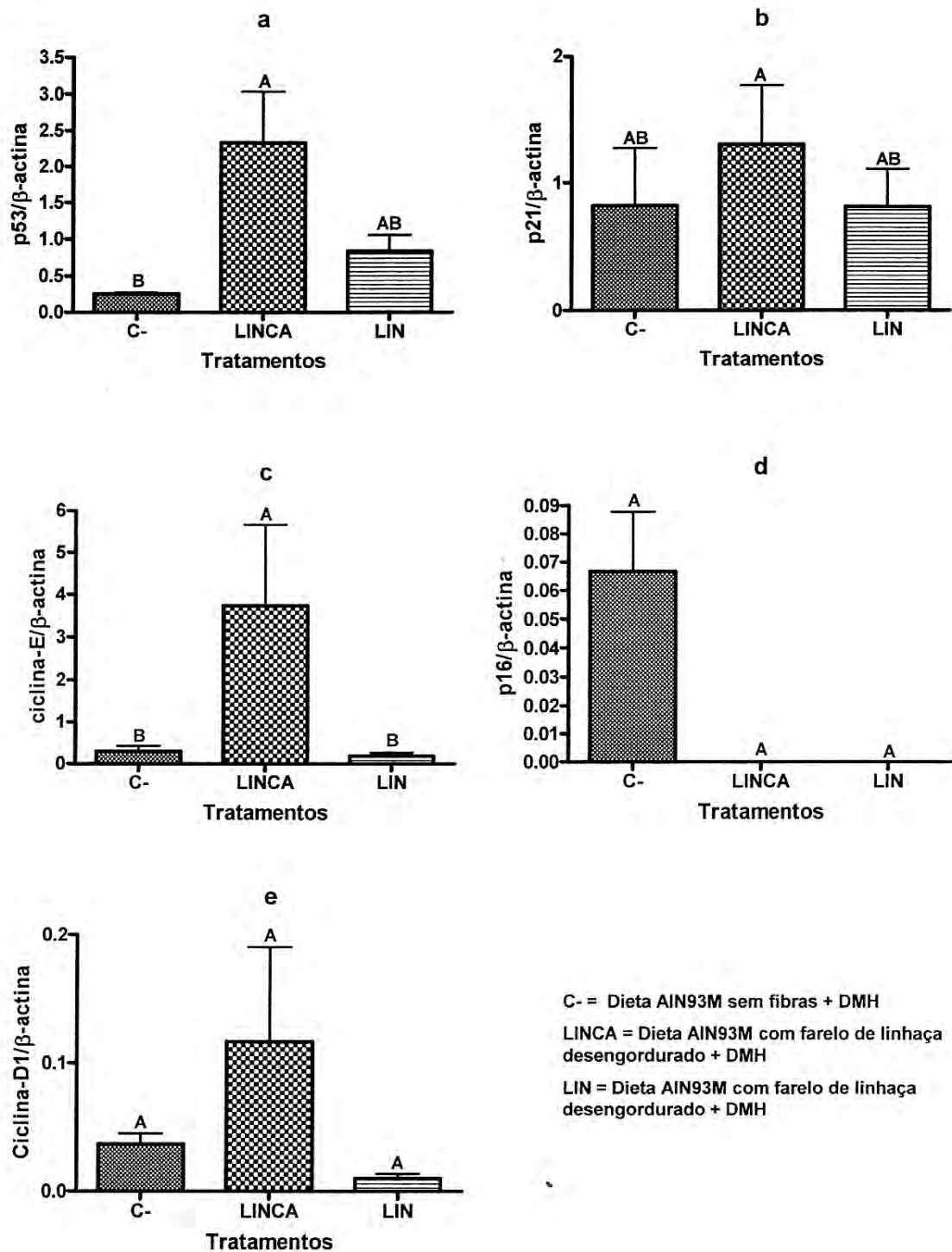


Figura 7. RT-PCR para a expressão do RNAm dos genes das proteínas reguladoras do ciclo celular. a) Expressão do RNAm do gene da proteína p53 no cólon distal de camundongos Balb/C. O tratamento LINCA apresentou diferença do tratamento C-. b) Expressão do RNAm do gene da proteína p21 no cólon distal de camundongos Balb/C. Não foi observado diferença em nenhum dos tratamentos. c) Expressão do RNAm do gene da proteína ciclina-E no cólon distal de camundongos Balb/C. O tratamento LINCA apresentou diferença do tratamento C-. d) Expressão do RNAm do gene da proteína p16 no cólon distal de camundongos Balb/C. Não foi observado diferença em nenhum dos tratamentos. e) Expressão do RNAm do gene da proteína ciclina-D1 no cólon distal de camundongos Balb/C. Não foi observado diferença em nenhum dos tratamentos. Anova ou teste T. ^{A,B}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4. Discussão

4.1. Focos de criptas aberrantes (FCA)

O presente estudo avaliou os efeitos preventivos do farelo de linhaça desengordurado na incidência de FCA no cólon proximal, médio e distal de camundongos induzida por DMH. A DMH é uma das drogas mais utilizadas em experimentos para indução de FCA, ela induz a proliferação de tumores no cólon em grande número, principalmente no distal (Rosenberg et al., 2009).

No presente estudo não foi possível sugerir que o farelo de linhaça desengordurado protegeu o cólon proximal, uma vez que, nos tratamentos C- e LINCA foram observados FCA, mas, no entanto não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$). No entanto para o cólon médio e distal nossos resultados são condizentes com a literatura, uma vez que o tratamento C- apresentou maior incidência de FCA com número menor ou igual a três criptas em relação ao tratamento LINCA, **figura 1**. Esses achados permitem sugerir que o farelo de linhaça ao chegar ao cólon médio e distal, exerceu efeitos protetores mais pronunciados neste local.

No cólon proximal não foram encontrados FCA com número maior que três criptas em nenhum dos tratamentos avaliados. Para o cólon médio e distal o tratamento C- diferiu do tratamento LINCA apresentando maior incidência de FCA com número maior que três criptas ($p < 0,05$). O tratamento LINCA não apresentou FCA com número maior que três criptas (indicativo categóricos de lesões pré-neoplásicas) no cólon médio e distal, **figura 2**. Nossos resultados indicam que o farelo de linhaça desengordurado é eficaz na proteção do cólon de camundongos na presença da DMH para FCA com número menor ou igual a três e para FCA com número maior que três criptas. Alguns estudos relataram que o farelo de linhaça desengordurado têm demonstrado efeitos benéficos na diminuição do aparecimento de FCA (Jenab & Thompson 1996; Williams et al., 2007), microadenomas e tumores em ratos (Bommareddy et al., 2006).

4.2. Atividade da Catalase

No presente estudo avaliamos se a atividade da catalase possui efeitos preventivos no fígado e no cólon distal contra o estresse oxidativo gerado pela administração da DMH. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido a uma taxa relativamente alta como um produto do metabolismo aeróbio. O H_2O_2 é relativamente

estável em comparação com outras moléculas de espécies reativas do oxigênio (ROS), a meia-vida de H_2O_2 é de 1 ms enquanto que a do O_2 é de 1 μs (Reth, 2002). Além disso, o H_2O_2 pode difundir livremente através da membrana celular e se ligar a resíduos de cisteína em diversas proteínas. Na verdade, o H_2O_2 oxida e modifica diversas proteínas, incluindo p53. A enzima catalase constitui-se em um sistema de defesa contra as ações deletérias do H_2O_2 (Schreck et al., 1991; Sathyanarayanan, et al., 2000; Sauer et al., 2001).

No presente estudo a atividade da catalase no fígado não diferiu em nenhum dos tratamentos avaliados **figura 3**, sugerindo que essa enzima pode não ter efeito protetor contra o estresse oxidativo ocasionado nesse órgão quando administrada a DMH, apesar de ter sido observado menor peso do fígado no tratamento C- e neste caso, como não havia nenhuma substância teste das utilizadas no estudo, sugerindo que o órgão pode ter sido sobrecarregado. No cólon distal a atividade da catalase não diferiu em nenhum dos tratamentos em relação ao controle (C-), **figura 4**. Estes dados sugerem que a catalase não foi eficaz na proteção do cólon distal do estresse oxidativo quando camundongos são submetidos ao tratamento com farelo de linhaça desengordurado e submetidos à inoculação da DMH. Estudos recentes envolvendo o câncer colorretal em humanos demonstraram uma diminuição da atividade da catalase em indivíduos com câncer (Skrzydowska et al., 2005; Sauer et al., 2007).

4.3. Citometria de fluxo

No presente estudo não foi possível sugerir que o tratamento com farelo de linhaça desengordurado seja eficaz na ativação do sistema imunológico, uma vez que, no tratamento C- (sem fibras) a contagem de células CD4 e CD8 não diferiu dos demais tratamentos que receberam a fibra, **figura 5**. Alguns estudos têm demonstrado os efeitos benéficos das fibras solúveis na prevenção do aparecimento de FCA e na ativação do sistema imunológico contra o desenvolvimento do câncer (Rowland et al., 1998; Bouhnik et al., 1999; Femia et al., 2002; Marotta et al., 2003; Roller et al., 2004). O farelo de linhaça desengordurado contém a mucilagem, que é um tipo de fibra solúvel. Assim no presente estudo esperávamos que o farelo de linhaça desengordurado aumentasse a contagem de bifidobactérias e consequentemente de AGCC, desempenhando efeitos na ativação do sistema imunológico, fato que não ocorreu no presente estudo. Apesar disso, o farelo de linhaça desengordurado mostrou-se eficaz na prevenção do aparecimento de FCA.

4.5. Peso dos órgãos

No presente estudo foi observado diminuição no peso do fígado e rim no tratamento C- ($p < 0,05$), sugerindo possível alteração na homeostasia causada pela DMH nesses órgãos na ausência de fibras na dieta. Esses resultados sugerem o farelo de linhaça desengordurado pode ter protegido o fígado e o rim dos efeitos deletérios da DMH por um mecanismo ainda desconhecido, uma vez que a atividade da catalase não foi alterada na presença da droga.

A DMH e seu metabólito o azoximetano (AOM) que são pró-carcinogênicos requerem ativação metabólica para formar produtos reativos que interagem com o DNA. O metabolismo desses compostos envolve múltiplas enzimas de metabolização no fígado. Estes metabólitos formados pela ação da CYP2E1 são transportados para o cólon via corrente sanguínea. A possibilidade de DMH e AOM terem como alvo a mucosa colônica é provavelmente consequência da relativa estabilidade dos metabólitos hidroxilados desses compostos (Rosenberg et al., 2009). Assim, um dos possíveis caminhos a serem investigados no efeito protetor do farelo de linhaça desengordurado no fígado, pode ser a interferência desse alimento em alguma das etapas dos processos metabólicos exercidos por enzimas de metabolização da droga, tornando-a menos ativa e também menos tóxicas ao rim.

4.6. RT-PCR

No presente estudo avaliamos se a expressão aumentada dos genes das proteínas supressores de tumor p53, p21 e p16 e a diminuição da expressão dos genes de proteínas de controle do ciclo celular, ciclina-E e ciclina-D1, apresentam algum efeito preventivo na diminuição da incidência de FCA.

A expressão do gene da proteína p53 foi maior no tratamento LINCA (que não apresentou FCA com número maior que três criptas) quando comparado ao tratamento C- ($p < 0,05$), **figura 2**, sugerindo que o farelo de linhaça desengordurado protegeu o cólon distal dos camundongos do desenvolvimento desses tipos de FCA por aumentar a expressão do RNAm para o gene dessa proteína, **figura 7a**.

Vários estudos realizados para evidenciar a presença nuclear p53 indicam que a presença dessa proteína esta associada com estágios mais avançados do CCR, no entanto a presença deste supressor de tumor nos FCA não tem sido extensivamente avaliada (Nambiar, et al., 2002, Renehan, et al., Fujimori, et al., 2001).

Mutações que causam a perda das funções da p53 podem gerar perda das funções da p21, causando descontrolada progressão do ciclo celular, podendo ser um mecanismo fundamental na progressão do CCR (Walczak, et al., 2001). Lam et al. (2008) em um estudo com 188 pacientes com adenocarcinoma observaram a perda da expressão da p21 relacionada com a menor positividade da expressão da proteína p53.

No presente estudo a expressão do gene da p21 não diferiu em nenhum dos tratamentos, **figura 7b**, sugerindo que o farelo de linhaça desengordurado não foi eficaz na indução da expressão do RNAm para o gene dessa proteína por aumentar a expressão do gene da proteína p53, e não protegeu o cólon distal dos camundongos por mecanismos desencadeados pela p21. Observamos também que a p21 não influenciou na diminuição da expressão do gene da ciclina-E no tratamento LINCA, **figura 7c**. Devido ao alto índice de proliferação celular no CCR, maiores concentrações da ciclina-E foram encontradas no tecido canceroso quando comparados com os não-neoplásicos na mucosa. (Wang et al., 1996; Sutter et al., 1997). O aumento da ciclina-E é sugestivo de progressão do ciclo celular (Coradini et al., 2002; Bardon et al., 2002; Abbas & Dutta, 2009), no entanto o aumento da ciclina-E no tratamento LINCA pode estar relacionado a renovação do epitélio da mucosa do cólon distal e não diretamente com o aumento de FCA, uma vez que a p53 poderia estar desencadeando a diminuição das células com esses focos, pois no tratamento LINCA não foi observado FCA com número maior que três criptas no cólon distal.

No câncer de cólon vários estudos têm avaliado a relação entre a expressão da p16 e sua associação com a inibição do ciclo celular com a melhor evolução do prognóstico dos pacientes (Omura et al., 2000; Esteller et al., 2001; McKay et al., 2002).

Zhao et al. (2003) observaram que em 74 casos de CCR em humanos, na maioria dos carcinomas a imunomarcagem para p16 e Cdk4 foi maior do que no citoplasma de adenomas ou na mucosa normal. Forte imunomarcagem citoplasmática de p16 foi preditor de melhor prognóstico, ao passo que forte imunomarcagem da Cdk4 foi um preditor de mau prognóstico dos tumores. Estes resultados indicam que a correlação da expressão da p16 e Cdk4 pode desempenhar um papel importante no mecanismo da inibição da retinoblastoma pela p16. Assim a expressão da p16 e Cdk4, pode desempenhar um papel chave no desenvolvimento do CCR, tornando-se novos marcadores do prognóstico nesse tipo de câncer.

No presente estudo não observamos diferenças na expressão do RNAm para o gene da proteína p16, **figura 7d**, não sendo possível sugerir que essa proteína possa

estar inibindo a Cdk-4 e impedindo a formação do complexo ciclina-D1/Cdk-4 e conseqüentemente a fosforilação da retinoblastoma o que eventualmente poderia diminuir a expressão do RNAm para o gene da ciclina-E, **figura 7c**.

Assim dos RNAs mensageiros avaliados no presente estudo, nos tratamentos que receberam a administração da DMH, a expressão aumentada do RNAm para o gene da proteína p53 no tratamento LINCA pode ter sido o responsável pela menor incidência de FCA no cólon distal dos camundongos quando comparado com o tratamento sem fibras na dieta (C-).

4.7. Quantificação de *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, anaeróbios totais, aferição do pH fecal

Vários estudos têm demonstrado que através da utilização de fibras solúveis ocorre a estimulação e o desenvolvimento de muitas bactérias incluindo as *Bifidobacterium spp.* que desempenham papel fundamental na manutenção da integridade da microbiota intestinal, proporcionando uma composição de microorganismos que produzem uma relação harmoniosa com o hospedeiro promovendo a manutenção da saúde ou a melhora de pacientes com doenças gastrointestinais (Kleessen et al., 2001; Tuohy et al., 2003; Manning & Gibson, 2004; Búrigo et al. 2007; Hatayama et al., 2007; Kleessen et al., 2007; Rose et al., 2007;). No presente estudo não foi observada diferenças na quantificação de *Bifidobacterium spp.*, **tabela 4**, em nenhum dos tratamentos avaliados. Assim, não podemos sugerir que essas bactérias possam estar exercendo efeitos protetores no cólon dos camundongos submetidos à administração da DMH.

As fibras solúveis quando fermentadas por *Bifidobacterium spp.* atuam inibindo o crescimento de bactérias patogênicas incluindo *Clostridium*. As fibras solúveis podem também diminuir o pH fecal proporcionando efeitos bactericidas. (Kleessen et al., 2001; Tuohy et al., 2003; Manning & Gibson, 2004; Búrigo et al. 2007; Hatayama et al., 2007; Kleessen et al., 2007; Rose et al., 2007;). Não observamos alterações na contagem de *Clostridium spp* em nenhum dos tratamentos avaliados, sugerindo que o farelo de linhaça não inibe o crescimento de *Clostridium spp.* na ausência ou presença da DMH, **tabela 4**. Os valores do pH nas fezes do cólon distal também não apresentaram diferenças em nenhum dos tratamentos avaliados, **tabela 5**, não sendo possível sugerir ação bactericida através da diminuição pH.

4.8. Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), acetato, propionato e butirato nas fezes do cólon e da gaiola

As fibras solúveis ao chegar ao cólon são fermentadas pela microbiota intestinal em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como acetato, propionato e butirato (Slavin, 2004). Os AGCC possuem concentração no lúmen intestinal da ordem de 30-70 mM e são absorvidos por colonócitos via transportadores presentes em sua membrana plasmática que podem está silenciado em 60% dos casos de câncer de cólon. Os AGCC são capazes de influenciar a expressão gênica em colonócitos e induzir a apoptose de células com mutação no DNA, funcionando com um protetor contra o CCR (Davie, 2003; Gupta et al., 2006).

No presente estudo não foi possível sugerir que os ácidos graxos acético, propiônico e butírico estejam desempenhando efeitos preventivos no aparecimento de FCA no cólon dos camundongos, uma vez que em nenhum dos tratamentos avaliados foram observadas diferenças na quantificação desses AGCC nas fezes do cólon e da gaiola. Como o farelo de linhaça desengordurado não aumentou a contagem de *Bifidobacterium ssp.* no cólon dos camundongos, esse pode ter sido o motivo de não termos observado aumento na quantificação dos AGCC nas fezes. No entanto, diferenças significativas, com menor número de FCA foram observadas no tratamento com o farelo de linhaça desengordurado quando comparado com o tratamento sem fibras na dieta.

5. Conclusão

Os resultados desse estudo permitiram concluir que o farelo de linhaça desengordurado foi eficaz na prevenção do aparecimento de FCA com número menor ou igual a três criptas e FCA com número maior que três criptas no cólon distal por aumentar a expressão do RNAm para o gene da proteína p53. No entanto, mais estudos são necessários para entender outros possíveis mecanismos protetores do cólon distal, uma vez que o farelo de linhaça desengordurado além das fibras constitui-se em boas fontes de outros componentes comprovadamente benéficos na prevenção do câncer.

Diante de tais evidências é importante que a população tenha consciência da importância de uma dieta contendo o farelo de linhaça desengordurado e outros tipos de fibras na dieta.

6. Referências

- Abbas, T.; Dutta, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews**, 2009;9:400-14.
- Aebi, H. Catalase in vivo. **Methods Enzymol**, 1984;105:121-26.
- Bardon, S.; Foussard, V.; Fournel, A. Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. **Cancer Letters**, 2002;181:187-94.
- Bird, RP. Observations and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Letters**, 1987;37(2):147-51.
- Bommareddy, A.; Arasada, BL.; Mathees, DP.; Dwivedi, C. Chemopreventive effects of dietary flaxseed on colon tumor development. **Nutrition and Cancer**, 2006;54(2):216-22.
- Bouhnik, Y.; Vahedi, K.; Achour, L.; Attar, A.; Salfati, J.; Pochart, p; Marteau, P.; Flourie, B.; Bornet, F.; Rambaud, JC. Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. **Journal of Nutrition**, 1999;129:113-16.
- Búrigo, T.; Fagundes, RLM.; Trindade, EBSM.; Vasconcelos, HCFF. Efeito bifidogênico do frutooligossacarídeo na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica. **Revista de Nutrição**, 2007;20(5):491-97.
- Coradini, D.; Pellizzaro, C.; Abolafio, G.; Daidone, MG. Sodium butyrate modulates cell cycle-related protein in HT29 human colonic adenocarcinoma cells. **Cell Proliferation**, 2002;33:139-46.
- Cunnane, SC.; Ganguli, S.; Menard, C.; Wolever, TMS.; Jenkins, DJA. High α -linolenic acid flaxseed (*Linurn usiiaiiissimurn*): some nutritional properties in humans. **British Journal of Nutrition**, 1993;69:443-53.
- Davie, JR. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **Journal of Nutrition**, 2003;133:2485-93.
- Esteller, M.; González, S.; Risques, RA.; Marcuello, E.; Manges, R.; Germà, JR.; Herman, JG; Capellà, G.; Peinado, MA. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 2001; 19: 299–304.
- Femia, AP.; Luceri, C.; Dolaro, P.; Giannini, A.; Biggeri, A.; Salvadori, M.; Clune, Y.; Collins, KJ.; Paglierani, M.; Caderni, G. Antitumorogenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus*

- rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. **Carcinogenesis** 2002;23(11):1953-60.
- Field, C.J.; Mcburney, M.I.; Massimino, S. The fermentable fiber content of the diet alters the function and composition of canine gut associated lymphoid tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 1999;72:325-41.
- Fujimori, T.; Kawamata, H.; Kashida H. Precancerous lesions of the colorectum. **Journal Gastroenterol**, 2001;36:587-94.
- Gupta, N.; Martin, P.M.; Prasad, P.D.; Ganapathy, V. SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. **Life Sciences**, 2006;78:2419-25.
- Hailfinger, S.; Jaworski, M.; Marx-Stoelting, P.; Wanke, I.; Schwarz, M. Regulation of P53 stability in p53 mutated human and mouse hepatoma cells. **International Journal of Cancer**, 2007;120:1459-64.
- Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, 2000;100:57-70.
- Hartemink, R.; Kok, B.J.; Weenk, G.H.; Rombouts, F.M. Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, 1996;27:33-43.
- Hatayama, H.; Iwashita, J.; Kuwajima, A.; Abe, T. The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2007;356:599-603.
- Hawk, E.T.; Limburg, P.J.; Viner, J.L. Epidemiology and prevention of colorectal cancer. **Surgical Clinics of North America**, 2002;82(5):900-41.
- Hill, M. Dietary fiber and colon cancer: where do we go from here? **Proceedings of the Nutrition Society**, 2003;62:63-65.
- Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): **Instituto Nacional de Câncer (INCA)**; 2009. [citado em 2010 ago 16]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>.
- Jenab, M.; Thompson, L.U. The influence of flaxseed and lignans on colon carcinogenesis and β -glucuronidase activity. **Carcinogenesis**, 1996;17(6):1343-48.
- Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. Landscaping the cancer terrain. **Science**, 1996;280:1036-37.
- Kleessen, B.; Hartmann, L.; Blaut, M. Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. **British Journal of Nutrition**, 2001;86:291-300.

- Kleessen, B.; Schwarz, S.; Boehm, A.; Fuhmann, H.; Richter, A.; Henle, T.; Krueger, M. Jerusalem artichoke and chicory inulin in bakery products affect faecal microbiota of healthy volunteers. **British Journal of Nutrition**, 2007;98:540-49.
- Lam, AK-Y.; Ong, K. Giv, MJ.; Ho, Y-H. p16 expression in colorectal adenocarcinoma: marker of aggressiveness and morphological types. **Pathology**, 2008;40(6):580–585.
- Manning, TS.; Gibson, GR. Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. **Best Practice Research Clinical Gastroenterology**, 2004;18(2):287-98.
- Marotta, F.; Naito, Y.; Minelli, E.; Tajiri, H.; Bertuccelli, J.; Wu, CC.; Min, CH.; Hotten, P.; Fesce, E. Chemopreventive effect of a probiotic preparation on the development of preneoplastic and neoplastic colonic lesions: an experimental study. **Hepatogastroenterology**, 2003;50(54):1914-18.
- McKay, JA.; Douglas, JJ.; Ross, VG.; Curran, S.; Loane, JF.; Ahmed, FY.; Cassidy, J.; McLeod, HL.; Murray, G. Analysis of key cell-cycle checkpoint proteins in colorectal tumours. **Journal of Pathology** , 2002; 196: 386–93.
- Mudhasani, R.; Zhu, Z.; Hutvagner, G.; Eischen, CM.; Lyle, S.; Hall, LL.; Lawrence, JB.; Imbalzano, AN.; Jones, SN. Loss of miRNA biogenesis induces p19^{Arf}-p53 signaling and senescence in primary cells. **Journal of Cell Biology**, 2008;181(7):1055-63.
- Nakade, K.; Pan, J.; Yamasaki, T.; Murata, T.; Wasylyk, B.; Yokoyama, KK. JDP2 (Jun Dimerization Protein 2)-deficient Mouse Embryonic Fibroblasts Are Resistant to Replicative Senescence. **Journal of Biological Chemistry**, 2009;284(16):10808-17.
- Nambiar, PR.; Giardina, C.; Guda, K.; Aizu, W.; Raja, R.; Rosenberg, DW. Role of the alternating reading frame (P19)-p53 pathway in an in vivo murine colon tumor model. **Cancer Research**, 2002;62:3667–74.
- Newell, L.; Heddle, JA. The potent colon carcinogen, 1,2 dimethylhydrazine induced mutations primarily in the colon. **Mutation Research**. 2004;564:1–7.
- Omura, K.; Uno, Y.; Kawakami, K.; Kanehira, E.; Tawaraya, K.; Tsukayama, M.; Hiranuma, C.; Watanabe, Y. Expression of thymidylate synthase in human gastric and colorectal adenocarcinomas is upregulated by p16/INK4. **Hepatogastroenterology**, 2000;47: 742–5.
- Papas, M.A.; Giovannucci, E.; Platz, EA. Fiber from Fruit and Colorectal Neoplasia. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**, 2004;13(8):1267-70.

- Rajkumar, L.; Kittrell, FS.; Guzman, RC.; Brown, PH. Hormone-induced protection of mammary tumorigenesis in genetically engineered mouse models. **Breast Cancer Research**, 2007;9:R12 (doi:10.1186/bcr1645).
- Reeves, PG.; Nielsen, FH.; Junior, GCF. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc 73 Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, 1993;123:1939-51.
- Renehan, AG.; O'Dwyer, ST.; Haboubi, NJ.; Potten. CS. Early cellular events in colorectal carcinogenesis. **Colorectal Disease**, 2002;4:76–89.
- Reth, M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. **Nature Immunology**, 2002;3:1129-1134.
- Roller, M.; Femia, AP.; Caderni, G.; Rechkemmer, G.; Watzl, B. Intestinal immunity of rats with colon cancer is modulated by oligofructose-enriched inulin combined with *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*. **British Journal of Nutrition**, 2004;92:931-38.
- Rose, DJ.; Demeo, MT.; Keshavarzian, A.; Hamaker, BR. Influence of Dietary Fiber on Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer: Importance of Fermentation Pattern. **Nutrition Reviews**, 2007;65(2):51-62.
- Rosenberg, D. W.; Giardina, C.; Tanaka, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 30:183-96. 2009.
- Rowland, IR.; Rumney, CJ.; Coutts, JT.; Lievens, LC. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis**, 1998;19(2):281-85.
- Rubio, M. A. Implicaciones de la fibra en distintas patologías. **Nutrición Hospitalaria**, 2002; 2:17-29.
- SAEG - **Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.
- Santos, MS.; Ferreira, CLLF.; Gomes, PC. Influência do fornecimento de probiótico à base de *Lactobacillus sp.* sobre a microbiota intestinal de leitões. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. 2003;27(6):1395-1400.
- Sathyanarayanan, PV.; Cremo, CR.; Poovaiah, BW. Plant chimeric Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. Role of the neural visinin-like domain in regulating autophosphorylation and calmodulin affinity. **The Journal of Biological Chemistry**, 2000;275:30417–422.

- Sauer, H.; Wartenberg, M.; Hescheler, J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. **Cell Physiol Biochemistry**, 2001;11:173–186
- Sauer, J.; Richter, KK.; Pool-Zobel, BL. Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2007;18:736-45.
- Schreck, R.; Rieber, P.; Baeuerle, PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. **EMBO Journal**, 1991;10:2247–258.
- Skrzydłowska, E.; Sulkowski, S.; Koda, M.; Zalewski, B.; Kanczuga-Koda, L.; Sulkowska, M. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, 2005;11(3):403-06.
- Slavin, JL. Whole grain and human health. **Nutrition Research Reviews**, 2004;17:99-110.
- Smirick-Tjardes, MR.; Grieshop, CM.; Flickinger, EA.; Bauer, LL.; Fahey Jr., GC. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentive characteristics of growing pigs. **American Society of Animal Science**, 2003;81:2535-45.
- Stevens, R. G.; Swede, H.; Rosenberg, DW. Epidemiology of colonic aberrant crypt foci: Review and analysis of existing studies. **Cancer Letters**, 2007;252:171-83.
- Sutter, T.; Doi, S.; Carnevale, KA.; Arber, N.; Weinstein, IB. Expression of cyclins D1 and E in human colon adenocarcinomas. **Journal Medical**, 1997;28:285–309.
- Tuohy, KM.; Probert, HM.; Smejkal, CW.; Gibson, GR. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, 2003;8(15):692-700.
- Walczak, GP.; Kordek, R.; Faflik, M. p21 (waf1) expression in colorectal cancer: correlation with p53 and cyclin d1 expression, clinicopathological parameters and prognosis. **Pathology Research and Practice**, 2001;197:683–89
- Williams, D.; Verghese, M.; Walker, LT.; Boateng, J.; Shackelford, L.; Chawan, CB. 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**, 2007;45:153-59.
- Zhao, P.; Hu, Y-C.; Talbot, JC. Expressing patterns of p16 and CDK4 correlated to prognosis in colorectal carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, 2003;9(10):2202-206.

RESUMO (CAPÍTULO V)

GOMIDES, Antônio Frederico de Freitas, D.S. Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2010. **Uso do farelo de linhaça desengordurado na avaliação dos focos de criptas aberrantes (FCA) e modificações bioquímicas camundongos C57BL6 induzidos a alterações no cólon com 1,2-dimetilhidrazina.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientadores: Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Leandro Licursi de Oliveira.

A linhaça é um tipo de alimento funcional que constitui-se em uma boa fonte de nutrientes incluindo as fibras e os ácidos graxos essenciais. A fração de fibra mais importante consiste de amidos resistentes, a celulose, e complexos polímeros como a lignana; é também uma fonte de fibra solúvel como a mucilagem. Estudos indicam que alguns componentes ativos presentes na linhaça possuem a capacidade de prevenção do câncer colorretal (CCR). O objetivo deste estudo foi investigar em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, alimentados com farelo de linhaça desengordurado, se existem possíveis mecanismos de prevenção contra o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas ou focos de criptas aberrantes (FCA). No presente estudo o farelo de linhaça desengordurado foi eficaz na proteção do cólon proximal, médio e distal de camundongos C57BL/6 macho para FCA com número menor ou igual a três criptas. Nas fêmeas o farelo de linhaça protegeu somente o cólon proximal e médio para esses mesmos tipos de focos. Para FCA com mais de três criptas o farelo de linhaça não foi eficaz em nenhum dos segmentos do cólon em ambos os sexos. Esses resultados sugerem que mais estudos devem ser realizados para esclarecer essa diferença encontrada.

CAPÍTULO V

Uso do farelo de linhaça desengordurado na avaliação dos focos de criptas aberrantes (FCA) e modificações bioquímicas em camundongos C57BL6 induzidos a alterações no cólon com 1,2-dimetilhidrazina (DMH)

1. Introdução

O câncer colorretal (CCR) é caracterizado por crescimento descontrolado de células neoplásicas decorrente de uma série de erros genéticos que se acumulam nestas durante os anos. Os primeiros indicativos do desenvolvimento do CCR são a presença de focos de criptas aberrantes (FCA) ou lesões pré-neoplásicas (Kinzler & Vogelstein, 1996; Stevens et al., 2007).

Durante o processo de transformação maligna do CCR ocorrem mudanças que alteram as proteínas relacionadas ao ciclo celular. Ciclinas são proteínas regulatórias dos processos de proliferação celular que atuam na fase G1, S e G2. Assim, a superexpressão de ciclinas nessas fases pode ser a chave para a carcinogênese colorretal. Ciclinas e suas subunidades catalíticas, as quinases dependentes de ciclina (Cdks), desempenham um papel fundamental na regulação de eventos do ciclo celular. A progressão das células através do ciclo celular é controlada pela degradação seqüencial de uma série de ciclinas que formam complexos que ativam várias Cdks (Cam et al., 2001).

Estes complexos de ciclina e Cdk desempenham um papel crítico na proliferação e diferenciação celular (Hunter & Pines, 1994). São vários os genes de ciclinas presentes no genoma humano, que são incluídos em três categorias, a saber: fase G1 (ciclinas D1, D2, D3 e E), fase S (ciclina A) e G2/M (ciclinas A, B1 e B2), (Sherr, 1996). Talvez um dos membros mais importantes da família das ciclinas que agem em G1, cuja disfunção pode estar envolvida na tumorigênese, seja a ciclina D1, sendo uma das primeiras famílias de ciclinas a ser expressa no ciclo celular. Tem sido demonstrado que a ciclina D1 se acumula e pode alcançar um nível máximo na fase G1 do ciclo celular (Callender et al., 1994). Estudos têm relatado que a ciclina D1 desempenha um importante papel oncogênico em uma ampla variedade de cânceres (Naitoh et al., 1994; Michalides et al., 1995). A super-expressão do gene CCND1 que codifica a ciclina D1, ocorre entre 30% a 50% no câncer de mama e CCR, estando associado com o aumento

da proliferação celular e um pior prognóstico para esses tipos de câncer. (Arber et al., 1996; McKay et al., 2000; Holley, et al., 2001).

A ciclina-E se associa com Cdk2 e ativa a serina-treonina quinase pouco antes da entrada em fase S (Dulic et al., 1992). A super-expressão da ciclina-E diminui o tamanho das células, diminui a exigência de fatores de crescimento e acelera a fase G1 do ciclo celular (Resnitzky et al., 1999), sugerindo que a ciclina E é um elemento essencial para controlar a progressão da fase G1 em células de mamíferos (Ohtsubo et al., 1995).

Os principais mecanismos de regulação das CdKs envolvem uma família de diversas proteínas, denominadas CdKIs (inibidores de CdKs), que se ligam e inativam complexos ciclina-Cdk. Duas classes de CdKIs a p16 e p21 atuam no processo de inativação do ciclo celular como proteínas supressoras de tumor. (Serrano et al., 1993; Hannon & Beach, 1994).

As inibições mediadas pela p21 podem ocorrer especificamente na sua ligação com a ciclina D-CdK4/6 na fase G₁, ou ciclina E-CdK2 na fase de transição de G₁ para a fase S ou em G₂ inibindo a ciclina B1-CdK1. A p21 pode também inibir o ciclo celular independente de sua ligação a CdKs por inibição do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) o qual é requerido para a progressão do ciclo celular para a fase S por mediar a ligação da polimerase- δ a fita molde do DNA. A p21 pode também ligar-se a várias outras proteínas envolvidas na síntese e reparo do DNA inibindo a progressão do ciclo celular (Abbas & Dutta, 2009).

A p16 compete com a ciclina-D1 pela ligação com CdK4 ou CdK6, isso inibe a capacidade do complexo ciclina D-CdK-4/6 de fosforilar a retinoblastoma (Rb) causando a parada do ciclo celular em G1. A iniciação da replicação do DNA requer a atividade do complexo ciclina E-CdK2, e a expressão da ciclina-E depende da família de fatores de transcrição E2F. Inicialmente em G₁, a Rb está na sua forma hipofosforilada ativa e liga-se ao E2F impedindo a transcrição da ciclina-E inibindo a progressão do ciclo celular. Outra maneira que a Rb inibe este processo é recrutando as enzimas remodeladoras da cromatina, como as histonas desacetilases e as histonas metiltransferases, que se unem aos promotores dos genes que respondem ao E2F, inibindo a produção da ciclina-E. Essas enzimas também modificam a cromatina na região promotora para alterar a estrutura do DNA tornando-o insensível aos fatores de crescimento (Burkhart & Sage, 2008).

A maioria dos cânceres humanos adquirem mutações que envolvem o supressor de tumor p53. Essa proteína pode ser ativada em resposta a danos ao DNA, a ativação

de oncogenes e hipoxia, podendo desencadear uma variedade de eventos celulares antiproliferativos tais como apoptose, a parada do ciclo celular, a senescência ou a modulação da autofagia. (Yee & Vousden, 2005; Riley et al., 2008; Green & Kroemer, 2009). Com relação às funções supressoras da p53 deve, ser levado em consideração, inúmeros fatores como o tipo celular, o microambiente, e os eventos oncogênicos adquiridos durante o curso e evolução do tumor. No caso do CCR o evento crítico no desenvolvimento de carcinomas malignos a partir de adenomas colorretais benignos é a mutação do supressor p53 (Fearon & Vogelstein, 1990).

Mecanismos de defesa, contra danos ao DNA, incluem os efeitos dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que são substâncias originadas do metabolismo de fibras solúveis por bactérias da microbiota intestinal, podendo controlar a expressão gênica em colonócitos e induzir a apoptose de células com mutação no DNA, portanto funcionando com um protetor contra o CCR (Davie, 2003; Gupta et al. 2006) . Outro mecanismo importante é a proteção do estress oxidativo mediado pela catalase, que converte o peróxido de hidrogênio em H₂O mais O₂, protegendo a célula da ação dos radicais livres e danos ao DNA (Ho et al., 2001; Skrzydlewska et al., 2005, Sauer et al., 2007).

Diante de tais evidências, o presente estudo investigou os efeitos preventivos do farelo de linhaça desengordurado em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas com objetivo de avaliar se existem mecanismos de prevenção desse alimento contra o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas ou focos de criptas aberrantes (FCA), que pode ser um indicativo de início do desenvolvimento do CCR. Para tais fins investigamos se o farelo de linhaça desengordurado influencia na atividade da enzima catalase no fígado e cólon distal, na expressão dos genes da proteína supressora de tumor p53, p16 e p21 e na expressão das ciclinas-D1 e ciclina-E. Avaliamos também o perfil de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acetato, propionato e butirato nas fezes dos animais na presença e ausência de administração da DMH.

2. Métodos

2.1. Animais e dietas

Foram utilizados 48 camundongos C57BL/6, 24 machos e 24 fêmeas com 12 semanas de idade e com peso de aproximadamente 25 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde e permaneceram em caixas coletivas no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, mantidos à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em fotoperíodo de 12 horas. Os animais foram divididos em seis tratamentos ($n = 8$) para comparação entre sexos de C57BL/6, conforme **tabela 1**. Os animais receberam água *ad libitum* e dieta AIN93M modificada (Reeves et al., 1993), acrescida de 10% de farelo de linhaça desengordurado em substituição a celulose durante 15 semanas. O experimento foi conduzido, de acordo com os princípios éticos para manejo de animais de laboratório e estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e aprovado pelo comitê de ética do departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Tabela 1 – Diferentes tipos de tratamentos aos quais os animais C57BL/6 machos (BLm) e fêmeas (BLf) foram submetidos. (Des. = desengordurado).

Tratamento	Características
C- BLm	Dieta AIN93M sem fibras C57BL/6 macho + DMH
LBLm	Dieta AIN93M com farelo de linhaça des. C57BL/6 macho
LCABLm	Dieta AIN93M com farelo de linhaça des. C57BL/6 macho + DMH
C- BLf	Dieta AIN93M sem fibras C57BL/6 fêmea + DMH
LBLf	Dieta AIN93M com farelo de linhaça des. C57BL/6 fêmea
LCABLf	Dieta AIN93M com farelo de linhaça des. C57BL/6 fêmea + DMH

2.2. Indução do aparecimento de FCA com a administração de DMH e coleta de material

Os animais que foram submetidos ao aparecimento de FCA receberam injeção intraperitoneal uma vez por semana de 20mg/Kg de peso corpóreo de DMH durante um período de oito semanas. A DMH foi dissolvida em solução salina 0,9% contendo 1 mM de EDTA e 10 mM de citrato de sódio, pH 8, os animais dos grupos controle receberam somente o veículo sem a droga (Newell & Heddle, 2004). Sete semanas após

a última aplicação de DMH os animais foram eutanasiados, por asfixia com CO₂. Foi retirado o intestino grosso dos animais do ceco até o ânus, para a contagem de FCA. No cólon distal e fígado dos animais foi mensurada a atividade da catalase para avaliação do estresse oxidativo ocasionado pela administração da DMH e no cólon distal também foi quantificado o RNAm para avaliar a expressão dos genes das proteínas ciclina-D1, ciclina-E, p16, p21 e p53. Foram coletadas as fezes do cólon e da gaiola para a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta: acético, propiônico e butírico e ainda foi pesado o fígado para avaliação da homeostasia do animal.

2.3. Preparação do tecido para contagem de FCA

Após a remoção, o intestino grosso foi lavado em solução tampão salina fosfato (PBS), aberto longitudinalmente pela margem contra mesentérica, colocado em placas de parafina, com a mucosa voltada para a parte superior da placa e fixadas em formalina de Carson por 24 horas. Depois de fixado, o intestino grosso foi medido e dividido em três fragmentos iguais, denominados proximal, médio e distal, em relação ao ceco. Em seguida os fragmentos foram corados em solução de azul de metileno a 0,1% por 2 minutos, e lavados em tampão fosfato para a retirada do excesso de corante para posterior análise. A contagem das lesões foi realizada por microscopia óptica com aumento de 40x e 100x. 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 do FCA foi com base no número de criptas aberrantes por foco, ou seja, focos com número menor ou igual a três criptas e focos com número maior que três criptas (Bird, 1987).

2.4. Atividade da catalase no fígado e intestino

Para a atividade da catalase o fígado e cólon distal dos camundongos foram macerados em tampão fosfato e obtido um homogenato que foi acondicionado em ependorf, centrifugado a 6000 g a 4 °C durante 10 minutos e coletado o sobrenadante. Posteriormente a centrifugação o homogenato do fígado foi utilizado para medir a atividade da catalase (Aebi, 1984). Para o branco foi utilizado 2 mL de tampão fosfato e 20 µL do homogenato do fígado e cólon distal medido espectrofotometricamente a 240 nm. Para cada amostra foi realizado um novo branco com o respectivo homogenato. Para medir a atividade da catalase foi preparada no momento da análise uma solução

contendo 50 mL de tampão fosfato e 80 µL de peróxido de hidrogênio a 30%. Em uma cubeta de quartzo foi adicionado 20 µL do homogenato e 2 mL de tampão fosfato com peróxido de hidrogênio, a atividade da catalase foi medida durante 1 minuto e mesurada três vezes a cada 30 segundos, ou seja, no tempo 0, 30 e 60 segundos espectrofotometricamente a 240 nm. Para o cálculo da atividade da catalase foi realizada a quantificação de proteína total utilizando o kit BIOCLIN[®] e a atividade da catalase foi expressa em (U da catalase/mg de proteína).

2.5. RT-PCR

2.5.1. Extração do RNAm e análise quantitativa da expressão dos genes das proteínas ciclinas D1, ciclina E1, p16, p21 e p53.

O RNA foi extraído após maceração do cólon distal em eppendorf utilizando TRIzol[®] (Invitrogen, CA, USA), que contém isotiocianato de guanidina e sarcosil, que são usados para a extração de RNA. Brevemente, foram homogeneizados 500 µL da amostra com 750 µL de TRIzol[®] e a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir foram adicionados 300 µL de clorofórmio agitando-se os tubos por 15 minutos manualmente e incubando-os a temperatura ambiente por mais 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a uma temperatura de 4°C, após a qual a fase aquosa transparente foi separada e transferida para um outro tubo. Em seguida foi realizada a adição de 350 µL de isopropanol, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos a fim de promover a precipitação do RNA e posteriormente submetidas à centrifugação por 10 minutos a uma temperatura de 4°C. Os “pellets” foram lavados com 750 µL de etanol 75%, centrifugados por 10 minutos a 7.500 g e secos a temperatura ambiente por 30 minutos. Após a secagem, os “pellets” foram ressuspensos em 20 µL de água DEPC. Aproximadamente 10 µg de cada RNA total, obtidos conforme este protocolo, foram usados para sintetizar as primeiras fitas de cDNA, usando “primers” para ciclinas-D1, ciclina-E, p16, p21 e p53.

2.5.2. Síntese do cDNA

Após extração do RNA total das amostras foi realizada a síntese da primeira fita de cDNA para ciclina-D1, ciclina-E, p16, p21 e p53, usando-se o kit Superscript[™] (Invitrogen[®], New York, USA). Para tanto, 1µl de “primer” randômico (pd(N)₆)

(Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, England) foi adicionado a aproximadamente 2µg de RNA do cólon, sendo submetido a aquecimento por 10 minutos à 70°C .

Após isto, foi preparada uma mistura contendo o tampão da transcriptase reversa, DTT, transcriptase reversa e dNTPs. Em seguida foi realizado o aquecimento desta mistura e, posteriormente, esta foi adicionada à amostra. Em seguida, essa solução foi incubada por 1 hora a 42°C, e por 1 minuto a 70°C, para desnaturar a transcriptase reversa.

2.5.3. Quantificação do RNAm de ciclina-D1, ciclina E, p16, p21 e p53 por PCR em tempo real

A expressão dos genes de ciclina D1, ciclina-E, p16, p21 e p53 foram avaliadas do cólon distal. Após 24 h o cólon foi clareado por centrifugação a 10.000 g por 2 minutos e submetidos à extração do RNA e a síntese do DNA complementar, conforme descrito anteriormente. A avaliação da expressão dos genes foi realizada através da técnica de PCR em tempo real onde a quantificação destes RNAs mensageiros foi comparada à expressão dos RNAs mensageiros de um gene constitutivo que foi o da β-actina. Para tanto, aproximadamente 2 µg do cDNA total oriundos do cólon foram usadas para a PCR em tempo real, numa reação de 50 µl que conteve 0,45 nmol dos “primers” sense e antisense específicos para cada gene, **tabela 2**, 20 U/µl do inibidor de RNase e 12,5 µl do “Master Mix” SYBR Green PCR. As condições de ciclagem foram 95°C por 10 minutos seguidos por 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. A quantificação da expressão transcricional de cada gene foi realizada através do software Gene Amp[®] 5700 Sequence Detection System Version 1.3 (Applied Biosystems), (Hailfinger, et al., 2007; Rajkumar et al. 2007; Muddhasani, et al. 2008; Nakade et al., 2009).

Tabela 2. Primers sense e antisense específicos para os genes.

Genes	Primers
Ciclina-D1 (Rajkumar et al.; 2007)	Sense: 5'-CATCAAGTGTGACCCGGACTG-3' Antisense: 5'-CCTCCTCCTCAGTGGCCTTG-3'
Ciclina-E (Nakade, et al.; 2009)	Sense: 5'-AGACCCACACCAACAGCTTG-3' Antisense: 5'-TCATTCTGTCTCCTGCTCGC-3'
p16 (Muddhasani, et al.; 2008)	Sense: 5'- ATCTGGAGCAGCATGGAGTC-3' Antisense: 5'- TCGAATCTGCACCGTAGTTG-3'
p21 (Muddhasani, et al.; 2008)	Sense: 5'-GTCAGGCTGGTCTGCCTCCG-3' Antisense: 5'-CGGTCCCCTGGACAGTGAGCAG-3'
p53 (Hailfinger, et al.; 2007)	Sense: 5'- GGAGACATTTTCAGGCTTATGG -3' Antisense: 5'- AGAAGGGACAAAAGATGACAGG -3'

2.6. Extração e dosagem de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acético, propiônico e butírico nas fezes do cólon e da gaiola por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

A análise das fezes foi feita em duplicata. Foram pesadas aproximadamente 400 mg de fezes em Eppendorf e adicionado 500 µL de ácido m-fosfórico a 25%, agitado e mantido em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Após os Eppendorfs foram centrifugados a 13.200 rpm por 30 minutos, coletado o sobrenadante e centrifugado a 13.200 rpm por 20 minutos e congelados a -20 °C. Para a dosagem, as amostras das fezes foram centrifugadas por 10 minutos a 13.200 rpm e aplicadas no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC), marca SHIMADZU, modelo SPD-10A VP acoplado ao Detector Ultra Violêta (UV) utilizando-se um comprimento de onda de 210 nm. Para a separação cromatográfica, 20 uL de amostra foi injetada em uma coluna móvel SCR – 101H marca SHIMADZU com 30 cm x 7,9 mm de diâmetro com fluxo de 0,8 ml/minuto e pressão de 24 Kgf utilizando-se como fase móvel água em 1% de ácido m-fosfórico (Smirick-Tjardes et al., 2003 modificado).

2.7. Peso dos órgãos

Foi pesado o fígado dos animais de todos os tratamentos

2.9. Análise estatística

Foi utilizado o software Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1, para análise estatística (SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, 2007). As comparações entre três ou mais grupos independentes foram realizadas por análise de variância (ANOVA) para dados com a distribuição normal. Como ocorreram diferenças estatísticas, foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey e teste não-paramétrico de Lilliefors para detectar os grupos que diferiram. O valor (p) foi fixado até 5% com o intuito de obter uma confiabilidade de 95% nas comparações para o teste de Tukey.

3. Resultados

3.1. Contagem de Focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon proximal, médio e distal

Nos tratamentos (LBLm e LBLf) que não receberam a inoculação de DMH não foram observados FCA em nenhum dos seguimentos do intestino, dados não mostrados nas figuras, diferindo significativamente dos controles C- BLm e C- BLf respectivamente. Para a contagem de FCA com número menor ou igual a três criptas no cólon proximal e médio o tratamento LCABLm apresentou menor incidência de FCA do que o tratamento C- BLm, o tratamento LCABLf apresentou maior incidência de FCA do que o tratamento C- BLf, o tratamento LCABLm apresentou menor incidência de FCA do que o tratamento LCABLf e o tratamento C- BLf apresentou menor incidência de FCA do que o tratamento C- BLm ($p < 0,05$). No cólon distal o tratamento LCABLm apresentou menor incidência de FCA do que o tratamento C- BLm, o tratamento LCABLf não diferiu do tratamento C- BLf e o tratamento C- BLf não diferiu do tratamento C- BLm ($p < 0,05$), **figura 1**. Para a contagem de FCA com mais de três criptas no cólon proximal não foi observado diferença significativa em nenhum dos tratamentos. No cólon médio o tratamento LCABLf apresentou maior incidência de FCA do que o tratamento LCABLm ($p < 0,05$). No cólon distal o tratamento C- BLm e C- BLf apresentaram diferença ($p < 0,05$) somente em relação aos tratamentos LBLm e LBLf que não receberam a inoculação da DMH, dados não mostrado na **figura 2**.

3.2. Atividade da catalase no fígado e cólon distal

Para a atividade da catalase no fígado dos camundongos o tratamento C- BLf, apresentou menor atividade quando comparado com os tratamentos C- BLm, LBLf e LCABLm ($p < 0,05$), **figura 3**. Para a atividade da catalase no cólon distal dos camundongos não foi observada diferença em nenhum dos tratamentos ($p = 0,01$), **figura 4**.

3.3. Peso do fígado

Foi observado maior peso do fígado nos tratamentos LBLm e LCABLm, diferindo dos tratamentos C- BLf e LCABLf, **tabela 4**.

Tabela 4.

Tratamentos	Médias do peso do fígado - C57BL/6 machos e fêmeas					
	C- BLm	LBLm	LCABLm	C- BLf	LBLf	LCABLf
Peso	1,09±0,11 ^{AB}	1,18±0,04 ^A	1,19±0,13 ^A	1,00±0,10 ^B	1,07±0,07 ^{AB}	0,93±0,07 ^B

^{A,B}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferiu entre si pelo teste de TuKey ao nível de 5% de probabilidade.

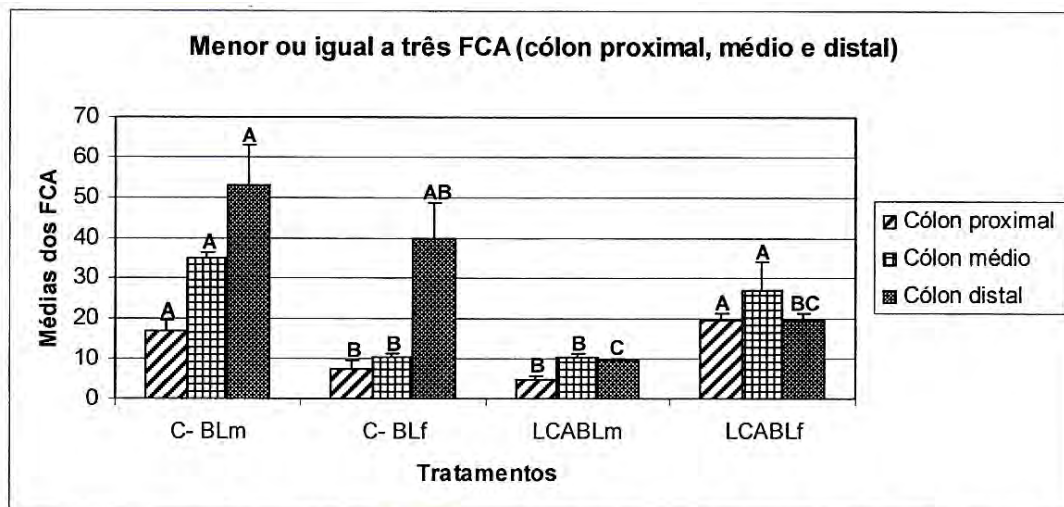


Figura 1. Contagem de FCA com número menor ou igual a três criptas no cólon proximal, médio e distal de camundongos C57BL/6 machos e fêmeas que receberam a administração da DMH. No cólon proximal e médio o tratamento LCABLm diferiu do tratamento C- BLm, o tratamento LCABLf diferiu do tratamento C- BLf e o tratamento LCABLm diferiu do tratamento LCABLf. No cólon distal o tratamento LCABLm apresentou diferença do tratamento C- BLm. ^{A,B,C}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

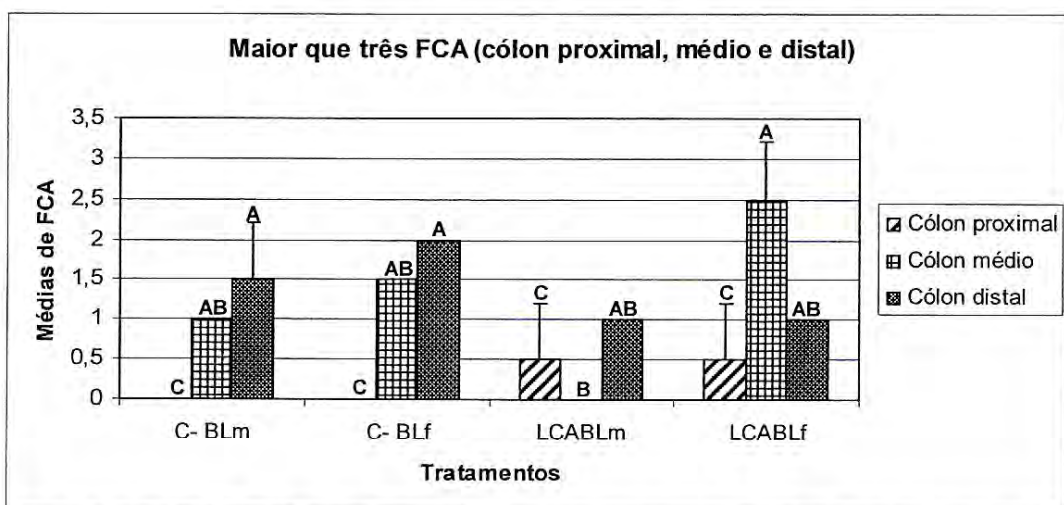


Figura 2. Contagem de FCA com mais de três criptas no cólon proximal, médio e distal de camundongos C57BL/6 machos e fêmeas que receberam a administração da DMH. No cólon proximal não foi observado FCA. No cólon médio o tratamento LCABLf apresentou diferença do tratamento LCABLm. No cólon distal os tratamentos C- BLm, C- BLf apresentaram diferença somente dos tratamentos que receberam linhaça sem a aplicação de DMH (que não apresentaram FCA, dados não mostrados na figura) em ambos os sexos. ^{A,B,C}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Nos três segmentos (proximal, médio e distal) não foram observados FCA com número igual a três ou maior que três criptas nos tratamentos LBLm e LBLf, dados não mostrados nas figuras.

C- BLm = Dieta AIN93M sem fibras C57BL/6 macho + DMH

C- BLf = Dieta AIN93M sem fibras C57BL/6 fêmea + DMH

LBLm = Dieta AIN93M com linhaça C57BL/6 macho

LBLf = Dieta AIN93M com linhaça C57BL/6 fêmea

LCABLm = dieta com linhaça C57BL/6 macho + DMH

LCABLf = dieta com linhaça C57BL/6 fêmea + DMH

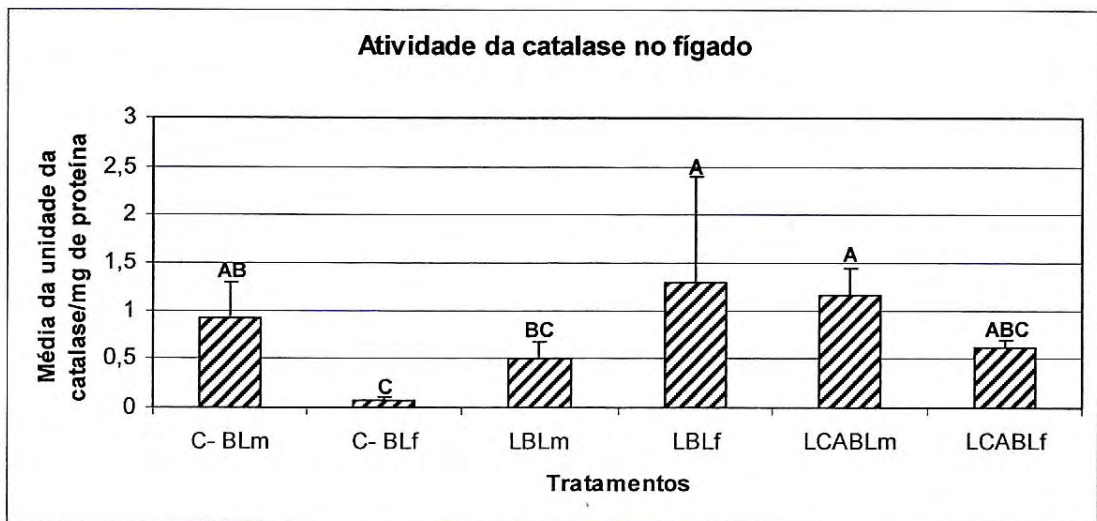


Figura 3. Atividade da catalase no fígado dos camundongos C57BL/6 machos e fêmeas. Os tratamentos LBLf e LCABLm diferiram do tratamento C-BLf e LBLm. ^{A,B,C}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

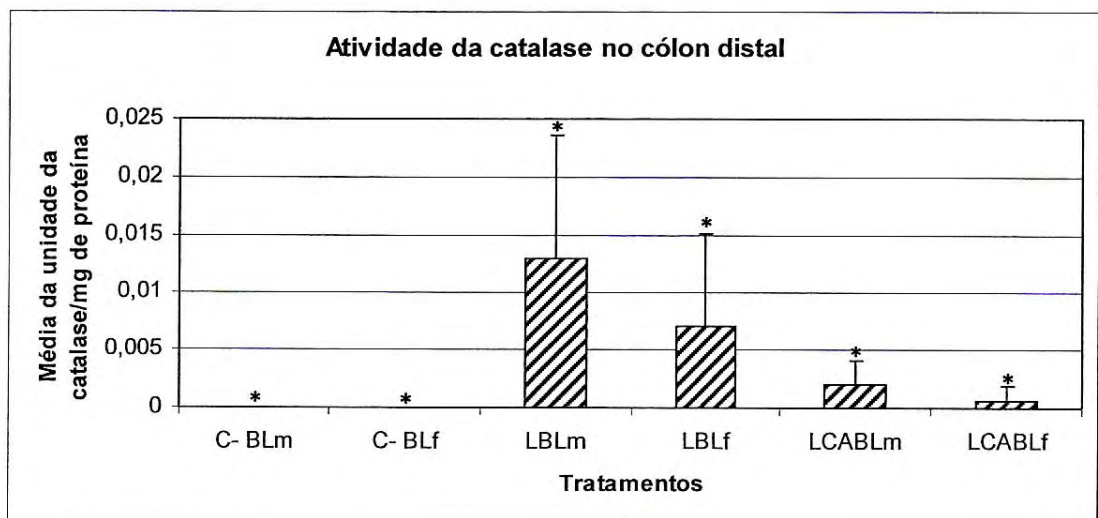


Figura 4. Atividade da catalase no cólon distal dos camundongos C57BL/6 machos e fêmeas. Não foi observada diferenças em nenhum dos tratamentos. Análise de variância não-paramétrica. *Não significativo pelo teste não-paramétrico de Lilliefors ($p=0,01$).

C- BLm = Dieta AIN93M sem fibras C57BL/6 macho + DMH

C- BLf = Dieta AIN93M sem fibras C57BL/6 fêmea + DMH

LBLm = Dieta AIN93M com linhaça C57BL/6 macho

LBLf = Dieta AIN93M com linhaça C57BL/6 fêmea

LCABLm = dieta com linhaça C57BL/6 macho + DMH

LCABLf = dieta com linhaça C57BL/6 fêmea + DMH

3.4. RT-PCR no cólon distal

A expressão do gene da proteína p53 foi maior no tratamento LCABLM apresentando diferença significativa dos demais tratamentos ($p < 0,05$), **figura 5a**. Para a expressão do gene da proteína p21 o tratamento LBLM apresentou maior expressão em relação aos tratamentos LBLf e LCABLf ($p < 0,05$), **figura 5b**. Para a expressão do gene da proteína ciclina-E somente o tratamento LCABLM apresentou maior expressão em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$), **figura 5c**. Para a expressão do gene da proteína p16 o tratamento LBLf apresentou maior expressão em relação aos tratamentos C- BLm, LBLM, LCABLM e C- BLf ($p < 0,05$), **figura 5d**. Para a expressão do gene da proteína ciclina-D1 somente o tratamento LBLM apresentou maior expressão em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$), **figura 5e**.

3.5. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), acético, propiônico e butírico nas fezes do cólon e da gaiola

Não foi observada diferença na quantificação de ácido acético, propiônico e butírico nas fezes do cólon e da gaiola em nenhum dos tratamentos avaliados. Teste não-paramétrico de Lilliefors ($P = 0,01$).

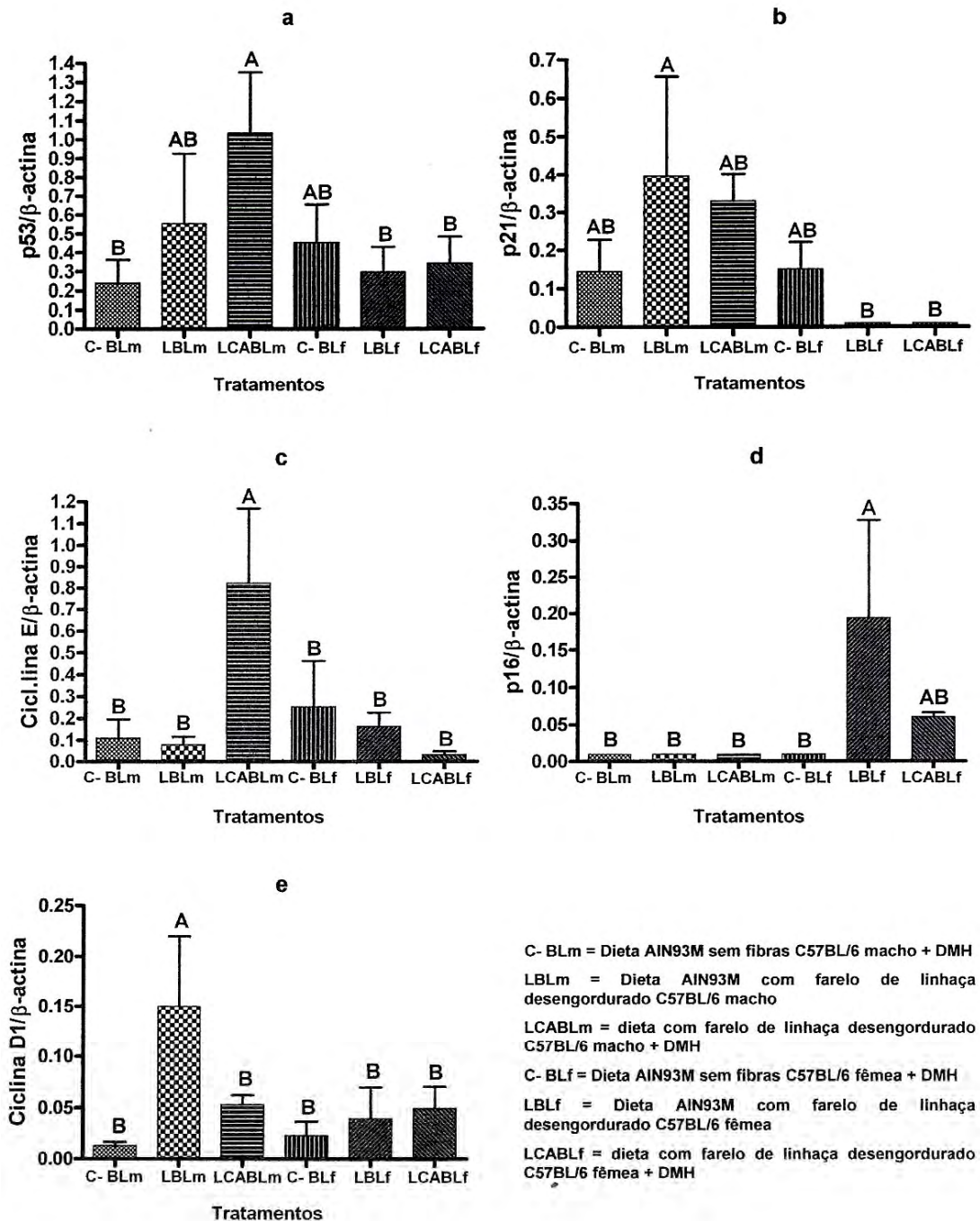


Figura 5. RT-PCR para a expressão do RNAm das proteínas reguladoras do ciclo celular. a) Expressão do RNAm do gene da proteína p53 no cólon distal de camundongos C57BL/6 machos e fêmeas. O tratamento LCABLm apresentou diferença em relação aos tratamentos C-BLm, LBLf e LCABLf. b) Expressão do RNAm do gene da proteína p21 no cólon distal de camundongos C57BL/6 machos e fêmeas. Os tratamento LBLm apresentou diferença em relação ao tratamento LBLf e LCABLf. c) Expressão do RNAm do gene da proteína ciclina-E no cólon distal de camundongos C57BL/6 machos e fêmeas. Somente o tratamento LCABLm apresentou diferença em relação aos demais tratamentos. d) Expressão do RNAm do gene da proteína p16 no cólon distal de camundongos C57BL/6 machos e fêmeas. O tratamento LBLf apresentou diferença em relação aos demais tratamentos. e) Expressão do RNAm do gene da proteína ciclina-D1 no cólon distal de camundongos C57BL/6 machos e fêmeas. Somente o tratamento LBLm apresentou diferença em relação aos demais tratamentos. Anova ou teste T. ^{A,B}Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4. Discussão

4.1. Focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon proximal, médio e distal

O presente estudo avaliou os efeitos preventivos do farelo de linhaça desengordurado na incidência de FCA no cólon proximal, médio e distal de camundongos C57BL/6 induzida por DMH. Há décadas se iniciou experimentos para indução de neoplasias de cólon, em roedores, com uma variedade de drogas carcinogênicas, dentre elas os sintéticos análogos, 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e Azoximetano (AOM). Uma desvantagem destes modelos é a falta de fenótipo invasivo e metastático, no entanto, modelos de roedores são bastante utilizados para elucidar a seqüência adenoma-carcinoma, semelhante ao que ocorre no CCR humano (Rosenberg et al., 2009).

Os resultados do presente estudo, quando comparamos os diferentes sexos de camundongos C57BL/6, o farelo de linhaça desengordurado mostrou-se mais eficaz na proteção dos machos apresentando diferença significativa entre os tratamentos LCABLM e LCABLf para FCA com número menor ou igual a três criptas no cólon proximal e médio ($p < 0,05$). Observamos também que o tratamento LCABLM e LCABLf diferiram dos seus respectivos grupos controle C- BLM e C- BLf no cólon proximal e médio. No entanto, não esperavamos que o tratamento LCABLf aumentasse significativamente os FCA com número menor ou igual a três criptas quando comparado com o seu respectivo grupo controle C- BLf. Portanto, o farelo de linhaça desengordurado não possui efeito preventivo no cólon proximal e médio das fêmeas, **figura 1**. Para o cólon distal somente o tratamento LCABLM apresentou diferença significativa do seu respectivo grupo controle C- BLM. Para as fêmeas não observamos diferenças, sugerindo que o farelo de linhaça não protege os cólon distal das fêmeas da incidência de FCA com número menor ou igual a três criptas.

Para FCA com número maior que três criptas no cólon distal não foi observado diferença em nenhum tratamento ($p > 0,05$), sugerindo que o farelo de linhaça desengordurado não protege o cólon distal do aparecimento de FCA com número maior que três criptas nos camundongos machos e fêmeas na mesma linhagem, **figura 2**.

Jenab & Thompson (2001) em um estudo com ratos induzidos ao câncer de cólon com AOM (azoximetano) e alimentados após a primeira dose da droga com dieta controle com alto teor de gordura, ou dietas contendo 2,5% ou 5% de linhaça, dieta contendo 2,5% ou 5% linhaça desengordurada ou dieta com alto teor de gordura com a

adição de 1,5 mg de SDG (secoisolariciresinol diglicosídeo, uma lignana presente na linhaça) administrado diariamente por gavagem, os autores observaram que com exceção do grupo controle (dieta com alto teor de gordura) o número de FCA foi significativamente reduzido no cólon distal dos ratos de todos os tratamentos. Quatro microadenomas e dois pólipos foram encontrados somente no grupo controle.

Em outro estudo os autores avaliaram o efeito do farelo de linhaça e de milho em ratos que foram induzidos ao câncer de cólon com AOM. O número, a localização e o tamanho dos tumores encontrados foram significativamente menores no tratamento com farelo de linhaça, bem como a expressão das proteínas COX-1 e COX-2 envolvidas no processo de inflamação (Bommareddy et al.; 2006).

Williams et al. (2007) em um estudo utilizando óleo de linhaça e farelo de linhaça avaliaram o efeito protetor desses componentes na prevenção da formação de FCA no cólon de ratos após a administração de AOM. Esse estudo mostrou que tanto o óleo de linhaça quanto o farelo de linhaça reduzem a incidência de FCA no intestino de ratos após a indução com AOM funcionando assim como agentes preventivos do CCR.

Em outro estudo os autores avaliaram o efeito protetor dos óleos de milho e linhaça e farelo de milho e de linhaça no desenvolvimento de tumores em camundongos APC *Min* durante 12 semanas de tratamento. O número, a localização e o tamanho dos tumores foram registrados. A incidência de tumor foi observada em 100% em todos os grupos. No entanto, a multiplicidade e a dimensão dos tumores no intestino delgado e cólon dos ratos foram significativamente menores nos grupos que receberam o farelo e o óleo de linhaça, em comparação com os grupos que receberam o farelo de milho e o óleo de milho (Bommareddy et al., 2009).

Oikarinen et al. (2005) avaliaram o efeito protetor da linhaça em machos e fêmeas de camundongos *Min* alimentados com farelo de linhaça (tratamento). O grupo controle recebeu dieta desprovida de fibras. O tamanho e o número total de adenomas no intestino delgado não foram diferentes entre o grupo controle e o tratamento nos camundongos. No entanto quando compararam o cólon no tratamento ocorreu uma diminuição do número de adenomas em ambos os sexos de camundongos.

Os resultados encontrados nesse estudo sugerem que nos tratamentos com farelo de linhaça desengordurado os machos da linhagem C57BL/6 são mais resistentes as ações da DMH no cólon proximal e médio quando comparados com as fêmeas. Esses resultados diferem dos observados por Oikarinen et al. (2005) em camundongos *Min*, onde ocorreu uma diminuição de adenomas em ambos os sexos. Embora tenha sido observados adenomas e não FCA. Diante desses resultados sugerimos que mais estudos

devem ser realizados para tentar elucidar os mecanismos de prevenção do aparecimento de FCA desencadeados pelo farelo de linhaça desengordurado que permitam esclarecer a diferença encontrada entre sexos na mesma linhagem de camundongos.

4.2. Atividade da catalase no fígado e cólon distal

No presente estudo avaliamos se a atividade da catalase possui efeitos preventivos no fígado e no cólon distal contra o estresse oxidativo gerado pela administração da DMH. Substâncias como os radicais livres podem ocasionar danos ao DNA (Ames, 1983). Vários mecanismos de defesas enzimáticas celulares agem contra os efeitos deletérios desses radicais. Dentro deste aparato de defesa, destacam-se as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e a glutathione reductase (Davies, 2000). A catalase é um dos principais sistemas de defesa contra o estresse oxidativo após a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado pelos radicais livres (Ho et al., 2001). A catalase rapidamente desintoxica a célula, convertendo o H_2O_2 em H_2O e O_2 . Estudos recentes indicam que um alto nível de expressão de catalase poderia estar associado com menor dano genético diminuindo o risco do CCR (Skrzydłowska et al., 2005; Sauer et al., 2007).

No presente estudo não foi observado diferença na atividade da catalase e nem no peso do fígado nos tratamentos C- BLM, LBLM e LCABLM ($p>0,05$), assim não foi possível sugerir que o farelo de linhaça desengordurado tenha exercido efeitos preventivos no fígado dos camundongos machos, **figura 7** e **tabela 4**. Nas fêmeas, observamos uma baixa expressão da catalase no tratamento C- BLf ($p<0,05$), no entanto não foi observado diferença no peso do fígado em nenhum dos tratamentos avaliados. Portanto não foi possível sugerir efeitos protetores do farelo de linhaça no fígado das fêmeas, **tabela 4**. Também não foi possível sugerir que nos tratamentos com farelo de linhaça ocorreu a proteção do cólon distal desses animais, pois não observamos diferença na atividade da catalase em nenhum dos tratamentos avaliados ($p>0,05$), **figura 8**.

4.3. RT-PCR

No presente estudo avaliamos se a expressão aumentada dos genes das proteínas supressores de tumor p53, p21 e p16 e a diminuição da expressão dos genes de proteínas

de controle do ciclo celular, ciclina-E e ciclina-D1, desenvolveram algum efeito preventivo na diminuição da incidência de FCA.

No presente estudo a expressão do gene da proteína p53 foi maior nos tratamentos LCABLM diferindo significativamente dos tratamentos C- BLM, LBLf e LCABLf ($p < 0,05$), **figura 5a**. No tratamento LCABLM a incidência de FCA com número menor ou igual a três criptas diferiu no cólon proximal e médio quando comparado com o tratamento LCABLf, sugerindo que o farelo de linhaça possui efeitos preventivos somente no cólon dos machos. No cólon distal os mesmos efeitos não foram observados entre os tratamentos LCABLM e LCABLf. O tratamento C- BLM diferiu significativamente do tratamento LCABLM, sugerindo efeitos preventivos no cólon distal dos camundongos machos devido ao aumento da expressão do gene da proteína p53.

Segundo Nambiar, et al. (2004), a marcação por imunohistoquímica para p53 nuclear é consistentemente observada em FCA. A análise da p53 é importante para a discriminação de alto e baixo risco de formação de FCA (Nambiar, et al.; 2002).

Em um estudo de 122 casos de CCR em humanos, foi observado nas análises de imunohistoquímica 48 marcações positivas para a p21 (39%), 96 para a p53 (70%), e 100% para a ciclina-D1. Nesse estudo foi confirmada uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão das proteínas p21 e p53 no CCR, que apóia à teoria de que nestes tumores, a indução de p21 ocorre principalmente em um caminho p53-dependente (Pasz-Walczak, et al.; 2002).

No presente estudo nos camundongos a expressão do gene da proteína p21 foi menor nos tratamentos LBLf e LCABLf ($p < 0,05$), **figura 5b**, esses resultados indicam que o farelo de linhaça desengordurado não foi eficaz na expressão do gene da p21 e na proteção do cólon distal, pois os tratamentos C- BLM e C- BLf que não receberam a fibra apresentaram maior expressão do gene dessa proteína.

Em um estudo com dois tipos de células de CCR (HCT 116) uma com expressão positiva da p21 (tipo selvagem) e outra deficiente na expressão da p21, os autores observaram acentuada proliferação celular no tipo deficiente, concluindo que essa proteína é uma importante inibidora do ciclo celular nas fases G1/S (Ukomadu & Dutta.; 2003). Em muitos tumores humanos quando o gene da ciclina-E é super-expresso a atividade de sua quinase é muitas vezes alterada (Keyomarsi et al., 1995; Dutta, 1995; Keyomarsi & Herliczek, 1997; Porter, 1997.; Nielsen, 1998) o papel regulatório da ciclina-E é fundamental para vários processos celulares que influenciam

no processo de replicação dos cromossomos, incluindo o reconhecimento das origens de replicação do DNA e duplicação dos centrossomos (Spruck, et al., 1999).

No presente estudo nos camundongos observamos que a p21 não influenciou na diminuição da expressão da ciclina-E no tratamento LCABLm, **figura 5c**, fato que pode estar diretamente relacionado à renovação do epitélio da mucosa do cólon, uma vez que a expressão da p53 foi maior nesse tratamento, sugerindo que essa proteína pode também estar desencadeando a diminuição das células com FCA no cólon distal nessa linhagem e fazendo com que o epitélio da mucosa esteja sendo renovado. Observamos também que nos tratamentos que menos expressaram a ciclina-E e que receberam a administração da DMH, independente da presença do farelo de linhaça desengordurado, o número de FCA com número maior que três criptas foram mais incidêntes no cólon distal. Os resultados encontrados sugerem que o farelo de linhaça desengordurado não protege o cólon dos camundongos por um caminho dependente da diminuição da expressão do gene da ciclina-E nos camundongos.

Alterações da expressão da p16 uma inibidora de CdK tem sido freqüentemente relatado em vários tipos de cânceres. (Omura et al., 2000; Sui et al., 2000; Esteller et al., 2001; Sturm et al., 2001; Yi et al., 2001; Marsh et al., 2001, McKay et al., 2002; Namazie, et al., 2002). Em particular, a inativação da gene CDKN2/MTS1 levando à perda expressão da p16 está associada com a agressividade biológica das células cancerosas e um mau prognóstico de pacientes com câncer (Sui et al., 2000; Esteller et al., 2001; Sturm et al., 2001; Yi et al., 2001; Namazie, et al., 2002).

Lam et al. (2008), investigaram o papel clínico da expressão de p16 em um grupo de pacientes com adenocarcinoma colorretal. A expressão da proteína p16 foi investigada em 194 pacientes (102 homens, 92 mulheres) por imunohistoquímica e os resultados foram correlacionados com as suas características clinicopatológicas. A proteína p16 foi detectada em 80% (155 de 194) dos pacientes com carcinoma colorretal, sendo mais freqüentemente detectada em pacientes do sexo masculino (86% versus 73%). A expressão desta proteína foi vista frequentemente em carcinomas de reto, sigmóide e cólon descendente comparado com o cólon proximal (90% versus 61%). A proteína p16 foi frequentemente detectada no adenocarcinoma colorretal mais diferenciado e em menor quantidade no pouco diferenciado (84% versus 63%). Assim a expressão correlacionada com sexo do paciente, localização distal, diferenciação e estadiamento do tumor sugerem que a p16 desempenha um papel importante na patogênese do câncer e tem implicações prognósticas na gestão clínica.

Aumento na expressão da ciclina-D1 tem sido frequentemente relacionado com mal prognóstico no CCR e baixa sobrevida em humanos, indicando que a sua superexpressão pode ser útil como avaliador da recorrência da doença (Maeda, et al., 1998; Asaad, et al., 2000; Bahnassy, et al., 2004; Khor et al., 2006).

No presente estudo, nos camundongos a expressão do gene da proteína p16 foi maior nos tratamentos LBLf ($p < 0,05$), **figura 5d**, mas no entanto a expressão da ciclina-D1 foi diferente somente no tratamento LBLm, **figura 5e**, sugerindo que a p16 não protegeu o cólon distal na mesma linhagem e sexos diferentes em nenhum dos tratamentos que receberam a DMH. Observamos também que a ciclina-D1 não foi à responsável por aumentar a incidência de FCA no cólon distal dos animais uma vez que, a expressão aumentada da ciclina-D1 foi observada somente no tratamento que não recebeu a inoculação da DMH. .

4.4. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acético, propiônico e butírico

Os AGCC possuem concentração no lúmen intestinal da ordem de 30-70 mM e são absorvidos por colonócitos via transportadores presentes em sua membrana plasmática que são codificados pelo gene *SLC5A8* reconhecido como um supressor tumoral que está silenciado em 60% dos casos de câncer de cólon. Os transportadores SMCT1 e MCT1 transportam os AGCC juntamente com os cátions sódio e hidrogênio respectivamente. Foi observado também que o SMCT1 é um transportador mais ativo de AGCC, inclusive influenciando na mudança do gradiente osmótico e elétrico com absorção mais efetiva de água/ Na^+ /AGCC pelos colonócitos. O propionato e o butirato são reconhecidos como supressores da histona desacetilase e os seus transportes são mediados pelo SMCT1 para o interior dos colonócitos sendo capaz de influenciar na acetilação de histonas controlando a expressão gênica em colonócitos e induzindo a apoptose de células com mutação no DNA, portanto funcionando com um protetor contra o CCR (Davie, 2003; Gupta et al., 2006).

Outras funções atribuídas aos AGCC após a sua transferência para a corrente sanguínea, por um mecanismo ainda desconhecido, é a interação com dois receptores de AGCC acoplados a proteína G, o GPR43 que se liga ao acetato e ao propionato e o GPR41 que se liga ao butirato e ao isobutirato (Brown et al., 2003; Le-Poul, et al., 2003). O GPR41 pode ser encontrado em vários tecidos incluído os adipócitos, onde ao entrarem em contato com os AGCC induzem a liberação de leptina, um hormônio relacionado à regulação do apetite, do gasto energético e da angiogênese (Xiong et al.,

2004). O GPR43 é expresso principalmente por células do sistema imunológico, conseqüentemente, a suplementação com fibras solúveis pode aumentar a produção de AGCC no intestino e ativar as células do sistema imunológico através dos receptores de AGCC (Brown et al., 2003; Le-Poul et al., 2003).

No presente estudo esperávamos que o farelo de linhaça desengordurado aumentasse a produção de AGCC devido à presença de fibras solúveis nesse alimento, no entanto, os resultados não são consistentes com a literatura uma vez que não foi possível afirmar que os AGCC possam estar protegendo o cólon do aumento da incidência de FCA, pois em nenhum dos tratamentos na presença ou ausência do farelo de linhaça desengordurado foram observadas diferenças na concentração de ácido acético, propiônico e butírico nas fezes do cólon e da gaiola dos animais.

5. Conclusão

Os resultados desse estudo permitiram concluir que o farelo de linhaça desengordurado protegeu o cólon distal dos camundongos machos da incidência de FCA com número menor ou igual a três criptas por aumentar a expressão do gene da p53. Nas fêmeas o farelo de linhaça protegeu somente o cólon proximal e médio desses mesmos tipos de focos, no entanto não foram observadas alterações significativas em nenhuma das técnicas avaliadas que pudessem explicar essa eficácia. Para FCA com número maior que três criptas em ambos os sexos o farelo de linhaça desengordurado não foi eficaz.

Diante de tais evidências sugerimos que mais estudos sejam realizados para tentar elucidar a diferença encontrada entre sexos da mesma linhagem de camundongos.

6. Referências

- Abbas, T.; Dutta, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews**, 2009;9:400-14.
- Aebi, H. Catalase in vivo. **Methods Enzymol**, 1984;105:121-26.
- Ames, BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. **Science**, 1983;221:1256-64.
- analysis of azoxymethane induced colon tumors in inbred mice commonly used as transgenic/knockout progenitors. **International Journal Oncology**, 2003;22:145–50.
- Arber, N.; Hibshoosh, H.; Moss, SF.; Sutter, T.; Zhang, Y.; Begg, M.; Wang, S.; Weinstein, IB.; Holt, PR. Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. **Gastroenterology**, 1996;110:669-674.
- Asaad, M.D.; Mona A.; Kandil, M.D.; Nadia, M.M. Prognostic Value of Cyclin D1 and P53 Protein in Colorectal Carcinoma. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**. 2000;12(4):283-292.
- Bahnassy, AA.; Zekri, A-RN.; El-Houssini1, S. Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. **BMC Gastroenterology**, 2004;4(22):1-12.
- Bird, RP. Observations and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Letters**, 1987;37(2):147-51.
- Bommareddy, A.; Arasada, BL.; Mathees, DP.; Dwivedi, C. Chemopreventive effects of dietary flaxseed on colon tumor development. **Nutrition and Cancer**, 2006;54(2):216-22.
- Bommareddy, A.; Zhang, X.; Schrader, D.; Kaushik, RS.; Zeman, D.; Mathees, DP.; Dwivedi, C. Effects of dietary flaxseed on intestinal tumorigenesis in Apc^{Min} mouse. **Nutrition and Cancer**, 2009;61(2):276-83.
- Brown, AJ.; Goldsworthy, SM.; Barnes, AA.; Eilert, MM.; Tcheang, L.; Daniels, D.; Muir, AI.; Wigglesworth, MJ.; Kinghorn, I.; Fraser, NJ.; Pike, NB.; Strum, JC.; Steplewski, KM.; Murdock, PR.; Holder, JC.; Marshall, FH.; Szekeres, PG.; Wilson, S.; Ignar, DM.; Foord, SM.; Wise, A.; Dowell. SJ. The Orphan G Protein-coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids. **The Journal of Biological Chemistry**, 2003;278(13):11312-19.
- Burkhart, DL.; Sage, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nature Reviews**, 2008;8:671-82.

- Callender, T.; El-Naggar, AK.; Lee, MS.; Frankenthaler, R.; Luna, MA.; Batsakis, JG. PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer**, 1994;74:152–158.
- Cam, WR.; Masaki, T.; Shiratori, Y.; Kato, N.; Okamoto, M.; Yamaji, Y.; Igarashi, K.; Sano, T.; Omata, M. Activation of Cyclin E-Dependent Kinase Activity in Colorectal Cancer. **Digestive Diseases and Sciences**, 2001;46(10):2187-198
- Davie, JR. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **Journal of Nutrition**, 2003;133:2485-93.
- Davies, KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. **IUBMB Life**, 2000;50:279-89.
- Dulic, V.; Lees, E.; Reed, SI. Association of human cyclin E with a periodic G1-S protein kinase. **Science**, 1992;257:1958 –961.
- Dutta, A.; Chandra, R.; Leiter, LM.; Lester, S. Cyclins as markers of tumor proliferation: immunocytochemical studies in breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, 1995;92:5386–90.
- Esteller, M.; González, S.; Risques, RA.; Marcuello, E.; Manges, R.; Germà, JR.; Herman, JG; Capellà, G.; Peinado, MA. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 2001; 19: 299–304.
- Fearon, E. R.; Vogelstein, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, 61: 759–767.
- Green, DR.; Kroemer, G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. **Nature**, 2009;458: 1127–1130.
- Gupta, N.; Martin, PM.; Prasad, PD.; Ganapathy, V. SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. **Life Sciences**, 2006;78:2419-25.
- Hailfinger, S.; Jaworski, M.; Marx-Stoelting, P.; Wanke, I.; Schwarz, M. Regulation of P53 stability in p53 mutated human and mouse hepatoma cells. **International Journal of Cancer**, 2007;120:1459-64.
- Hannon, GJ.; Beach, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. **Nature**, 1994;371:257–61.
- Ho, JC.; Zheng, S.; Comhair, SAA.; Farver, C.; Erzurum, SC. Differential Expression of Manganese Superoxide Dismutase and Catalase in Lung Cancer. **Cancer Research**, 2001;61, 8578–585.

- Holley SL.; Parkes, G.; Matthias C.; Bockmühl, U.; Jahnke, V.; Leder, K.; Strange, RC.; Fryer, AA.; Hoban, PR. Cyclin D1 polymorphism and expression in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **American Journal of Pathology**, 2001;159:1917-1924.
- Hunter, T.; Pines, J. Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. **Cell**, 1994;79:573–582.
- Jenab, M.; Thompson, LU. The influence of flaxseed and lignans on colon carcinogenesis and β -glucuronidase activity. **Carcinogenesis**, 1996;17(6):1343-48.
- Keyomarsi, K.; Conte, D.; Toyofuku, W.; Fox, MP. Deregulation of cyclin E in breast cancer. **Oncogene**, 1995;11:941–50.
- Keyomarsi, K.; Herliczek, TW. The role of cyclin E in cell proliferation, development and cancer. **Progression Cell Cycle Research**, 1997;3:171–91.
- Khor, T.; Yunus, A.; Ithnin, GH.; Seow, HF.. A comparative study of the expression of Wnt-1, WISP-1, survivin and cyclin-D1 in colorectal carcinoma. **International Journal of Colorectal Disease**, 2006;21: 291–300
- Kinzler, KW.; Vogelstein, B. Landscaping the cancer terrain. **Science**, 1996;280:1036-37.
- Le-Poul, E.; Loison, C.; Struyf, S.; Springael, JY.; Lannoy, V.; Decobecq, ME.; Brezillon, S.; Dupriez, V.; Vassart, G.; Damme, JV.; Parmentier, M.; Detheux, M. Functional Characterization of Human Receptors for Short Chain Fatty Acids and Their Role in Polymorphonuclear Cell Activation. **The Journal of Biological Chemistry**, 2003;278(28):25481-89.
- Maeda, K.; Chung, Y-s.; Kang, S-M.; Ogawa, M.; Onoda, N.; Nishiguchi, Y.; Ikehara, T.; Nakata, B.; Okuno, M.; Sowa, M. Cyclin D1 Overexpression and Prognosis in Colorectal Adenocarcinoma. **Oncology**, 1998;55:145–151.
- Marsh, S.; McKay, JA.; Curran, S.; Murray, GI.; Cassidy J.; McLeod, HL. Primary colorectal tumour is not an accurate predictor of thymidylate synthase in lymph node metastasis. **Oncology Reports**, 2001; 9: 231–4.
- McKay, JA.; Douglas, JJ.; Ross, VG.; Curran, S.; Loane, JF.; Ahmed, FY.; Cassidy, J.; McLeod, HL.; Murray, GI. Analysis of key cell-cycle checkpoint proteins in colorectal tumours. **Journal of Pathology** , 2002; 196: 386–93.
- Michalides, R.; Hageman, P.; Van, Tinteren H.; Houben, L.; Wientjens, E.; Klompmaker, R.; Peterse, J. A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. **Britney Journal Cancer**, 1996;73:728–734.

- Mudhasani, R.; Zhu, Z.; Hutvagner, G.; Eischen, CM.; Lyle, S.; Hall, LL.; Lawrence, JB.; Imbalzano, AN.; Jones, SN. Loss of miRNA biogenesis induces p19^{Arf}-p53 signaling and senescence in primary cells. **Journal of Cell Biology**, 2008;181(7):1055-63.
- Naitoh, H.; Shibata, J.; Awaguchi, A.; Kodama, M.; Hattori, T. Overexpression and localization of cyclin D1 mRNA and antigen in esophageal cancer. **American Journal of Pathology**, 1995;146:1161–1169.
- Nakade, K.; Pan, J.; Yamasaki, T.; Murata, T.; Wasylyk, B.; Yokoyama, KK. JDP2 (Jun Dimerization Protein 2)-deficient Mouse Embryonic Fibroblasts Are Resistant to Replicative Senescence. **Journal of Biological Chemistry**, 2009;284(16):10808-17.
- Namazie, A.; Alavi, S.; Olopade, OI.; Pauletti, G.; Aghamohammadi, N.; Aghamohammadi, M.; Gornbein, JA.; Calcaterra, TC.; Slamon, DJ.; Wang, MB.; Srivatsan, ES. Cyclin D1 amplification and p16 (MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. **Laryngoscope**, 2002; 112: 472–81.
- Nambiar, PR.; Giardina, C.; Guda, K.; Aizu, W.; Raja, R.; Rosenberg, DW. Role of the alternating reading frame (P19)-p53 pathway in an in vivo murine colon tumor model. **Cancer Research**, 2002;62:3667–74.
- Nambiar, PR.; Nakanishi, M.; Gupta, R.; Cheung, E.; Firouzi, A. Genetic signatures of High- and Low-Risk Aberrant Crypt Foci in a Mouse Model of Sporadic Colon Cancer. **Cancer Research**, 2004; 64, 6394–6401.
- Newell, L.; Heddle, JA. The potent colon carcinogen, 1,2 dimethylhydrazine induced mutations primarily in the colon. **Mutation Research**. 2004;564:1–7.
- Nielsen, NH.; Arnerlöv, C.; Cajander, S.; Landberg, G. Cyclin E expression and proliferation in breast cancer. **Anal Cell Pathology**, 1998;17:177–88.
- Ohtsubo, M.; Theodoras, AM.; Schumacher, J.; Roberts, JM.; Pagano, M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. **Molecular and Cell Biology**, 1995;15:2612–624.
- Oikarinen, SI.; Pajari, A.M.; Salminen, I.; Heinonen, SM.; Adlercreutz, H.; Mutanen, M. Effects of a flaxseed mixture and plant oils rich in α -linolenic acid on the adenoma formation in multiple intestinal neoplasia (Min) mice. **British Journal of Nutrition**, 2005;94:510-18.
- Omura, K.; Uno, Y.; Kawakami, K.; Kanehira, E.; Tawaraya, K.; Tsukayama, M.; Hiranuma, C.; Watanabe, Y. Expression of thymidylate synthase in human gastric and colorectal adenocarcinomas is upregulated by p16/INK4. **Hepato-gastroenterology**, 2000;47: 742–5.

- Pasz-Walczak, G.; Kordek, R.; Fafilik. P21 (WAF1) Expression in Colorectal Cancer: Correlation with P53 and Cyclin D1 Expression, Clinicopathological Parameters and Prognosis. **Pathology Research and Practice**, 2001,197:683-89.
- Porter, PL.; Malone, KE.; Heagerty PJ.; Alexander, GM.; Gatti, LA.; Firpo,EJ.; Daling, JR.; Roberts, JM. Expression of cell cycle regulators p27kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. **Nature Medicine**, 1997;3:222–5.
- Rajkumar, L.; Kittrell, FS.; Guzman, RC.; Brown, PH. Hormone-induced protection of mammary tumorigenesis in genetically engineered mouse models. **Breast Cancer Research**, 2007;9:R12 (doi:10.1186/bcr1645).
- Reeves, PG.; Nielsen, FH.; Junior, GCF. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc 73 Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, 1993;123:1939-51.
- Resnitzky, D.; Gossen, M.; Bujarde, H. Reed, SI. Acceleration of G1-phase transition by expression of cyclin D1 and E with an inducible system. **Molecular and Cell Biology**, 1994;14:1669 –679.
- Reth, M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. **Nature Immunology**, 2002;3:1129–134.
- Riley, T.; Sontag, E.; Chen, P.; Levine, A. Transcriptional control of human p53 regulated genes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2008;9: 402–412.
- Rosenberg, D. W.; Giardina, C.; Tanaka, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 30:183-96. 2009.
- SAEG - **Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.
- Serrano, M.; Hannon, GJ.; Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, 1993;366:704 –707.
- Sherr, CJ. G1 phase progression: Cycling on cue. **Cell**, 1994;79:551–555.
- Skrzydłowska, E.; Sulkowski, S.; Koda, M.; Zalewski, B.; Kanczuga-Koda, L.; Sulkowska, M. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, 2005;11(3):403-06.
- Smirick-Tjardes, MR.; Grieshop, CM.; Flickinger, EA.; Bauer, LL.; Fahey Jr., GC. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentive characteristics of growing pigs. **American Society of Animal Science**, 2003;81:2535-45.

- Spruck, CH.; Won, K-A.; Reed, S. Deregulated cyclin E induces chromosome instability. **Nature**, 1999;401:297–300.
- Sturm, I.; Petrowsky, H.; Volz, R.; Lorenz, M.; Radetzki, S.; Hillebrand, T.; Wolff, G.; Hauptmann, S.; Dörken, B.; Daniel, PT. Analysis of p53/BAX/ p16ink4a/CDKN2 in esophageal squamous cell carcinoma: High BAX and p16ink4a/CDKN2 identifies patients with good prognosis. **Journal of Clinical Oncology**, 2001;19: 2272–81.
- Sui, L.; Dong, Y.; Ohno, M.; Goto, M.; Inohara, T.; Sugimoto, K.; Tai, Y.; Hando, T.; Tokuda, M. Inverse expression of Cdk4 and p16 in epithelial ovarian tumors. **Gynecologic Oncology**, 2000;79: 230–37.
- Ukomaduc C.; Dutta, A. p21-dependent Inhibition of Colon Cancer Cell Growth by Mevastatin Is Independent of Inhibition of G1Cyclin-dependent Kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, 2003;2789(44):43586–594.
- Williams, D.; Verghese, M.; Walker, LT.; Boateng, J.; Shackelford, L.; Chawan, CB. 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**, 2007;45:153-59.
- Xiong, Y.; Miyamoto, N.; Shibata, K.; Valasek, MA.; Motoike, T.; Kedzierski, RM.; Yanagisawa, M. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2004;101:1045-50.
- Yee, KS.; Vousden, KH. Complicating the complexity of p53. **Carcinogenesis**, 2005;26: 1317–1322.
- Yi, J.; Wang, ZW.; Cang, H.; Chen, Y-Y.; Zhao, R.; Yu, B-M.; Tang, X-M. p16 gene methylation in colorectal cancers associated with Duke's staging. **World Journal of Gastroenterology**, 2001;7: 722–5.

2. CONCLUSÕES GERAIS

Diante de tais evidências encontradas no presente estudo concluímos que os prebióticos frutooligossacarídeo ou inulina e o farelo de linhaça desengordurado são fibras dietéticas efetivas na prevenção do desenvolvimento do CCR, no entanto mais estudos, devem ser realizados para elucidar outros mecanismos que possam estar envolvidos nesse processo de prevenção, tanto na linhagem de camundongos Balb/C que receberam prebióticos e farelo de linhaça desengordurado na dieta, bem como nos camundongos C57BL/6 que foram alimentados somente com o farelo de linhaça desengordurado.