

Isabela Campelo de Queiroz

Uso do Butirato em Câncer de Cólon

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

Viçosa

Minas Gerais – Brasil

2005

Isabela Campelo de Queiroz

Uso do Butirato em Câncer de Cólon

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

APROVADA EM: 18 de Abril de 2005

Profa. Cristina Maria Ganns Chaves Dias

(Conselheira)

Prof. Antônio José Natali

Profa. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite

Profa. Josefina Bressan Resende Monteiro

Profa. Maria do Carmo Gouveia Peluzio

(Orientadora)

Dedicatória

Dedico esta tese:

Aos meus pais,

Por todo apoio, amor, carinho, dedicação, compreensão e confiança depositadas em mim. Sobretudo, por suportarem pacientemente uma filha distante da vida familiar por mais dois anos. No entanto, vocês são mesmo a razão disto tudo, e é a vocês que ofereço a minha festa.

Aos meus irmãos e cunhada: Rodrigo, Ricardo e Cláudia;

Amigos eternos, presentes em todos os instantes de minha vida. Minha gratidão, pelo amor que sempre dedicaram, e por tudo o que representam.

Ao meu noivo: Esley;

Que acompanhou toda esta trajetória e que sempre ofereceu o seu colo, para que eu pudesse me refugiar nos momentos difíceis. Às palavras - e foram muitas - que me fizeram acreditar que eu seria capaz de vencer esta etapa.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria do Carmo Gouveia Peluzio pela confiança depositada no meu trabalho. Orgulho-me muito de ter sido merecedora de tão grande confiança, apoio e amizade. Pelo constante incentivo, sempre indicando a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade;

Às conselheiras, Profa. Dra. Cristina M. Ganns Chaves Dias, Profa. Dra. Céphora Maria Sabarense e Profa. Dra. Sylvia do Carmo Castro Fransischini pelas orientações e discussões no decorrer de todo este estudo, possibilitando a sua concretização;

À Profa. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite, pela participação na banca de defesa, valiosas contribuições e principalmente por abrir as portas de seu laboratório permitindo o enriquecimento de meu aprendizado;

À Profa. Josefina Bressan Resende Monteiro e ap Prof. Antônio José Natali, que gentilmente aceitou participar e colaborar com este trabalho fazendo parte da Banca.

Ao Sr. Adão, pelo exemplo de carinho e ética em seu trabalho com os animais;

Às colegas, Monise, Daniela, Aline e Carina, pela grande contribuição em todas as etapas da pesquisa. Este trabalho também é de você!

Às colegas do Laboratório de Bioquímica Nutricional (ICB-UFMG), Luciane Portugal, Luciana Fernandez, Ana Lúcia etc, pelos ensinamentos e paciência, durante minha passagem por lá;

Aos Professores, Funcionários e Colegas do Programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição, pela parcela de contribuição, amizade e estímulos diários;

À Universidade Federal de Viçosa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por financiar o projeto e conceder a bolsa de pesquisa;

A toda a minha família e ao Esley, pelo incentivo e solidariedade na minha "eterna busca de crescimento profissional";

Quando mencionamos nomes, incorremos no risco de esquecer alguém e, por isso, quero agradecer a todos que, embora não tenham sido mencionados, estiveram presentes comigo durante este percurso;

Finalmente, e principalmente, agradeço a Deus por toda força que me tem dado em todos os momentos da minha vida para cumprir minha tarefa neste mundo.

Biografia

Isabela Campelo de Queiroz filha de Sebastião Peluso de Queiroz e Ionê Antônia Campelo de Queiroz, nascida em 02 de fevereiro de 1979 em Belo Horizonte, Minas Gerais.

Em 1998, iniciou o curso de Graduação em Nutrição na Universidade Federal de Viçosa, colando grau em setembro de 2002.

Em agosto de 2003, ingressou no curso de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, com defesa da dissertação em abril de 2005.

Conteúdo

Resumo	viii
Abstract	ix
Capítulo I: Papel do Butirato no Câncer de Cólon	01
Resumo	01
1. Introdução	02
2. Fibras e Câncer de Cólon	03
3. Butirato – Produção, Absorção e Metabolismo	05
4. Butirato e Câncer de Cólon	07
5. Mecanismos Propostos para Atuação do Butirato na Prevenção do Câncer de Cólon	13
6. Conclusão	17
7. Referências Bibliográfica	18
Capítulo II: Uso do Butirato na Intervenção do Processo de Câncer de Cólon em Ratos Wistar	26
Resumo	27

1.Introdução	29
2.Materiais e Métodos	32
2.1- Animais e Dietas	32
2.2-Aplicação da 1,2-Dimetilhidrazina e Coleta de Material	33
2.3- Preparação do Tecido para Contagem dos Focos de Criptas Aberrantes	34
2.4- Extração de RNAm e Análise Quantitativa de RT-PCR de Ciclinas D1 e Ciclina E	34
2.5- Perfil Lipídico do Tecido Hepático e da Gordura Intrabdominal	36
2.6- Análise Estatística	36
3.Resultados	37
3.1- Peso dos animais e consumo de dieta	37
3.2- Número de Focos de Criptas Aberrantes	37
3.3- Análise quantitativa de RT-PCR de ciclina D1 e E	38
3.4- Perfil Lipídico	38
4.Discussão	39
5. Conclusão	43
6.Agradecimento	44
7. Referencia Bibliográfica	45
8. Gráficos e Tabelas	52

Resumo

QUEIROZ, Isabela Campelo de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2005. **Uso do Butirato em Câncer de Cólon**. Orientador: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Conselheiros: Cristina Maria Ganns Chaves Dias, Céphora Maria Sabarense e Sylvia do Carmo Castro Franceschini.

Evidências sugerem que o butirato está associado a processos de redução ou inibição da formação de câncer de cólon. O butirato é produzido pela degradação das fibras alimentares no cólon humano, tais como amido resistente, fruto-oligossacarídeo e fibras do trigo. A formação de maior porcentagem de butirato está associada, principalmente a ação das bactérias anaeróbicas dos gêneros *Clostridium*, *Eubacterium* e *Fusobacterium*. O butirato após ser captado pelos enterócitos é utilizado como fonte de energia local. Diversos estudos realizados com animais experimentais comprovam o efeito benéfico do butirato na redução das lesões cancerosas por meio da ingestão oral de butirato ou por uso crônico das fibras “butirogênicas”. A inibição da proliferação celular das células do cólon, induzida pelo butirato, é devida, principalmente, a sua capacidade de induzir apoptose e regular genes moduladores do ciclo celular. Os efeitos do butirato de sódio no câncer colorretal foram pesquisados através da quantificação dos focos de criptas aberrantes (FCA); quantificação da expressão de RNAm das ciclinas D1 e E; alteração no perfil de ácido graxos da gordura visceral e hepático de animais tratados com 1,2-dimetilhidrazina, na dose de 40mg/Kg de peso. Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, que receberam durante 30 dias (período de indução da doença) butirato de sódio *ad libitum*, em substituição à água. O peso e consumo dietético dos animais foram monitorados semanalmente, durante as 17 semanas do experimento. O intestino grosso dos animais foi

retirado para quantificação e categorização dos FCA, e obtenção do raspado de mucosa dos segmentos médio e distal para quantificação da expressão do RNAm das ciclinas D1 e E. O fígado e a gordura visceral foram retirados para análise do perfil dos ácidos graxos. O consumo de dieta e evolução de peso do grupo controle e butirato não apresentaram diferenças durante o experimento, exceto na 4^a e 5^a semanas, na qual os animais do grupo butirato apresentaram peso estatisticamente maior. Houve uma redução de 51,4% de FCA total no grupo que recebeu butirato, a redução ocorreu principalmente no segmento médio. Não encontramos diferenças entre a expressão do RNAm da ciclina D1 e E entre os grupos. Os animais do grupo butirato apresentaram menores porcentagens de ácido esteárico (3,5% grupo butirato e 4,4% grupo controle) e ácido oléico (34,2% grupo butirato e 44,6% grupo controle) na gordura intrabdominal e menores porcentagens de ácido docosahexanóico (8,2% no grupo butirato e 10,4% no grupo controle) no fígado e maiores porcentagens de ácido linoléico (29,7% grupo controle e 14,4% grupo butirato) na gordura intrabdominal. Em conclusão, o uso do butirato de sódio durante a fase de indução do câncer foi capaz de reduzir o número de lesões pré-neoplásicas em animais com câncer de cólon induzido pela DMH, entretanto, não foram detectadas alterações na expressão das ciclinas D1 e E na mucosa intestinal dos animais, imediatamente após o uso de butirato de sódio. O Butirato inibiu as alterações do perfil de ácidos graxos tecidual e hepáticos comumente encontradas em pacientes com câncer de cólon.

Abstract

QUEIROZ, Isabela Campelo de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2005. **Use of the Butyrate in Colon Cancer**. Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Committee members: Cristina Maria Ganns Chaves Dias, Céphora Maria Sabarense and Sylvia do Carmo Castro Franceschini.

There are evidences suggesting that butyrate is associated to the processes of reduction or inhibition of the colon cancer formation. Butyrate is produced by degradation of dietary fibres in human colon, such as resistant starch, fructo-oligosaccharides and wheat fibres. The formation of bigger percentage of butyrate is associated mainly to the action of the anaerobics bacteria of the *Clostridium*, *Eubacterium* and *Fusobacterium*. Butyrate after to be caught by the colonocytes is used as local energy source. Many studies done with experimental animals shows the butyrate benefith effect in the reduction of the injuries cancerous by means oral ingestion of butyrate or for chronic use of "butyrogenics" fibres. The inhibition of the cell proliferation of the colon cells, induced by the butyrate is due to the, mainly, capacity to induce apoptose and to regulate genes modulating of the cell cycle. The sodium butyrate effect in colorretal cancer was searched through the aberrant crypt foci (ACF) quantification; mRNA of the cyclin D1 and E expression quantification; alteration in the fatty acids profile of adipose tissue and liver in the animals treated with 1,2-dimethylhydrazine (40mg/Kg). Wistar, males, adults rats, who had received during 30 days sodium butyrate *ad libitum*, in replace the water. The weight and dietary consumption of the animals was monitored weekly, during the 17 experiment weeks. The animals large intestine was removed for ACF classification and quantification, and attainment of the scraped one of mucosa of the medium and distal segments for mRNA of cyclin D1 and E expression quantification. The liver and the visceral fat was removed to analyse the fatty

acid profile. The diet consumption and weight evolution of both group; control and butyrate; had not demonstrated differences during the experiment, except in 4^a and 5^a weeks, which the animals of the butyrate group was presented bigger statistically weight. There were a total reduction of 51.4% of ACF in the group that received butyrate, the reduction occurred mainly in the medium colon. We did'nt find differences between the mRNA of the cyclin D1 and E expression of the between the groups. The animals of the butyrate group was presented decreasead percentages of stearic acid (3.5% butyrate group and 4.4% control group), oleic acid (34.2% butyrate group and 44.6% control group) in adipose tissue and decreasead percentages docosahexaenoic acid (8.2% butyrate group and 10.4% control group) in liver and incresead percentagens of linoleic acid (29.7% butyrate group and 14.4% control group) in adipose tissue. In conclusion, the use of the sodium butyrate during the phase cancer-induction reduced the number of preneoplastic injuries in animals treated by DMH, however, it was'nt detectd alterations in the mRNA of the cyclin D1 e E expression in the intestinal mucosa of the animals, immediately after the use of sodium butyrate. Butyrate inhibited the fatty acid profile alterations of tecidual and liver usually found in colon cancer patient.

Capítulo I:

Papel do Butirato no Câncer de Cólon

Resumo

Evidências sugerem que o butirato está associado a processos de redução ou inibição da formação de câncer de cólon. O butirato é produzido pela degradação das fibras alimentares no cólon humano, tais como amido resistente, fruto-oligossacarídeo e fibras do trigo. A formação de maior porcentagem de butirato está associada, principalmente a ação das bactérias anaeróbicas dos gêneros *Clostridium*, *Eubacterium* e *Fusobacterium*. O butirato após ser captado pelos enterócitos é utilizado como fonte de energia local. Estudos realizados com animais experimentais comprovam o efeito benéfico do butirato na redução das lesões cancerosas por meio da ingestão oral de butirato ou por uso crônico das fibras “butirogênicas”. A inibição da proliferação celular das células do cólon, induzida pelo butirato, é devida, principalmente, à sua capacidade de induzir apoptose nessas células.

1. Introdução

O câncer compreende um conjunto de doenças caracterizadas por alterações genéticas que levam a mutações cumulativas no genoma celular. É a segunda causa de morte nos Estados Unidos, precedido apenas pelas doenças cardiovasculares. Mundialmente, o câncer colorretal é a quarta neoplasia mais incidente em ambos os sexos (INCA, 2005). Nos Estados Unidos é o terceiro tipo de câncer mais comum e a terceira causa de morte por câncer, entre homens e mulheres, aproximadamente 10% de morte por câncer (American Cancer Society, 2004). No Brasil dentre as causas de morte por câncer, o câncer colorretal figura entre as cinco primeiras, tendo-se observado um aumento consistente de suas taxas de mortalidade ao longo das últimas décadas. Em 2005, segundo a Unidade da Federação do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2005) as taxas de estimativas para o câncer colorretal nas regiões sul e sudeste são de 12,3 a 27,86 e 4,48 a 12,3 casos por 100.000 homens, respectivamente e 12,83 a 28,64 e 6,01 a 12,83 casos por 100.000 mulheres, respectivamente.

As chances de um indivíduo desenvolver câncer colorretal nos EUA são em torno de 6%, sendo que mais de 90% dos casos ocorreram após os 50 anos (Howe *et al.*, 2001). Apesar das causas não serem totalmente conhecidas, certos fatores parecem aumentar o risco de desenvolvimento desta doença. Dentre eles, pode-se citar: idade, histórico familiar, sedentarismo, obesidade, fumo, doença inflamatória do intestino e dieta.

Para todas as idades, fatores ambientais representam 62% de risco para o desenvolvimento da doença (Lichtenstein *et al.*, 2000). Para esse tipo de câncer, a composição da dieta tem sido amplamente relacionada ao risco e prevenção de desenvolvimento da doença. Algumas evidências indicam a existência de mecanismos

fisiológicos, tais como aumento da massa do bolo fecal, redução do tempo de trânsito intestinal, diluição dos constituintes colônicos; que podem exercer proteção contra o desenvolvimento do câncer de cólon (Harris & Ferguson, 1993).

Sabe-se que o alto consumo de carne vermelha, gordura total ou proteína animal possui uma associação positiva com risco aumentado de desenvolvimento de câncer de cólon (Potter, 1995). Entretanto, de acordo com Burkitt (1969), uma dieta rica em frutas e hortaliças pode proteger contra o desenvolvimento do câncer colorretal, bem como reduzir o risco, já que é sugerido que a ingestão de fibras alimentares contribuem com 25-30% de redução (Brouns *et al.*, 2002). Numerosas classes de constituintes da dieta, incluindo os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente o butirato, podem regular o processo de proliferação e morte celular (Johnson, 2002).

Este panorama evidencia a abrangência do câncer de cólon como um fator grave e progressivo sobre as causas de morte por câncer nas populações e muitos estudos buscam alternativas de tratamento e/ou prevenção. Pretende-se com esta revisão abordar os aspectos relevantes do papel do butirato na prevenção do câncer de cólon, bem como os mecanismos de ação do mesmo.

2. Fibras e Câncer de Cólon

Fibra alimentar é a parte comestível das plantas que resistem à hidrólise pelas enzimas do trato gastrointestinal (Charalampopoulos *et al.*, 2002). A redução de 25-30% do risco de desenvolvimento de câncer colorretal tem sido associada à ingestão de fibras alimentares (Brouns *et al.*, 2002). Existe indicação de que o consumo regular de certas

subclasses de fibras alimentares suscetíveis à fermentação resulta na modulação da resposta imune e da microflora intestinal (Brouns *et al.*, 2002).

Pesquisas experimentais em animais e humanos indicam que as fibras alimentares têm uma ampla ação no trato gastrointestinal (McIntyre *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 2002; Muir *et al.*, 2004). Os mecanismos de proteção das fibras alimentares no desenvolvimento de câncer de cólon podem ser divididos em dois grupos: aqueles em que as fibras exercem um efeito direto e aqueles que resultam da degradação das fibras pelas bactérias colônicas. Possivelmente, os mecanismos diretos incluem a ligação das fibras não degradadas com carcinógenos e/ou habilidade de se associar à água resultando em aumento do bolo fecal, com conseqüente diminuição do tempo do trânsito intestinal. Já o mecanismo indireto, mais aceito, refere-se ao abaixamento do pH colônico por meio da produção de AGCC, como resultado da fermentação bacteriana (Harris & Ferguson, 1993). As bactérias do cólon humano contribuem de maneira importante para esta fermentação de polissacarídeos não absorvidos, produzindo os AGCC (Campos *et al.*, 1999). Esses AGCC são os principais substratos energéticos dos colonócitos e agem regulando o crescimento e diferenciação do epitélio sadio (Brouns *et al.*, 2002).

Os AGCC predominantes no cólon são o acetato (50-60%), propionato (20-25%) e butirato (15-20%), juntos perfazem cerca de 85-95% dos AGCC totais em toda a região colônica (Teshima, 2003). Esta proporção pode ser variável, dependendo da composição das fibras alimentares (Harris & Ferguson, 1993). Essas substâncias têm uma ação importante sobre a manutenção do trofismo da parede do cólon (Kissmeyer-Nielsen *et al.*, 1993; Kissmeyer-Nielsen *et al.*, 1994; Greca *et al.*, 2000) e tais efeitos no trofismo são causados por um baixo valor de pH no cólon, que acompanha a produção dos AGCC (Ramos *et al.*, 1996).

Diversos efeitos benéficos são atribuídos à produção de AGCC, como por exemplo, contribuição para as necessidades energéticas, manutenção da integridade e fisiologia da mucosa colônica, bem como implicações no metabolismo nitrogenado, de lipídeos e glicídeos; além disso, diversas afecções colorretais têm sido relacionadas à deficiência de AGCC, como a colite por desuso, colite ulcerativa, bolsite pós-proctocolectomia com anastomose íleo-anal e câncer colorretal (Campos *et al.*, 1999).

Dos AGCC, o butirato vem sendo amplamente estudado devido seu possível efeito protetor contra o câncer colorretal, por ser utilizado como fonte de energia primária para os colonócitos e por seus múltiplos efeitos na diferenciação celular (Campos *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2002). Outras evidências sugerem que esse ácido graxo é um potente indutor da apoptose em colonócitos (Nkondjock *et al.*, 2003). Apesar de todos os AGCC terem a capacidade de reduzir o pH do cólon, o butirato parece ter particular importância na prevenção de estágios avançados do desenvolvimento do câncer (Harris & Ferguson, 1993), sugerindo efeitos adicionais, além da prevenção, no tratamento do câncer de cólon.

3. Butirato – Produção, Absorção e Metabolismo

O ácido butírico, constituído por quatro átomos de carbono (figura 1), é um dos principais AGCC e um dos mais importantes subprodutos da degradação das fibras alimentares, sendo a fonte de energia primária para os colonócitos (Campos *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2002). O ácido butírico, assim como os demais AGCC, é encontrado em maior concentração na região proximal do intestino grosso, devido principalmente a maior disponibilidade de carboidratos nesta região (Macfarlane & Macfarlane, 2003). A produção

diária de AGCC em humanos é aproximadamente 100 a 200mM (Cook & Sellin, 1998), estando a produção do butirato em torno de 15-40mM.

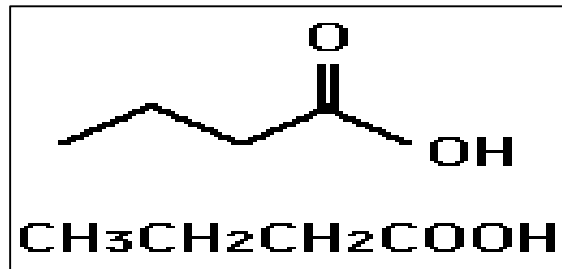


Figura 1: Fórmula estrutural do ácido butírico- C₄H₈O₂

A fermentação microbiana para a formação do butirato, bem como para os demais AGCC, é dependente de diversos fatores, tais como, dieta, idade, atividade do sistema enteroendócrino, estresse, secreções pancreáticas e de outras do trato gastrointestinal (Macfarlane & Macfarlane, 2003). Segundo revisão de Macfarlane & Macfarlane (2003), do ponto de vista microbiológico, a composição química, forma física e quantidade do substrato disponível afetam a reação de fermentação bacteriana, além do tipo e número de diferentes populações de bactérias no intestino. Pryde *et al.* (2002) apresentaram argumentos que justificam a produção de butirato pelas bactérias anaeróbicas dos gêneros *Clostridium*, *Eubacterium* e *Fusobacterium*.

Os principais polissacarídeos que estimulam a formação do butirato são o amido resistente (Pouteau *et al.*, 2003; Muir *et al.*, 2004) e os farelos de trigo e aveia (Knudsen *et al.*, 2003). Hu *et al.* (2002) e Adam *et al.* (2002) verificaram, em ratos, que o farelo e a farinha de trigo, principalmente integral, aumentaram respectivamente a concentração de

butirato nas fezes e no ceco dos animais. Entretanto, em estudo com humanos, Muir *et al.* (2004) verificaram que a combinação do farelo de trigo com o amido resistente proporcionam maiores benefícios que o farelo de trigo sozinho, incluindo maior concentração de butirato nas fezes.

Os oligossacarídeos, também vêm sendo testados quanto ao poder em produzir maiores concentrações de butirato. Delzenner (2003), em sua revisão associou o uso dos oligossacarídeos à maior produção de butirato, enquanto Rizkalla *et al.* (2000) verificaram que o consumo crônico de iogurte por homens saudáveis, com ou sem intolerância a lactose, provocou aumento na concentração plasmática de butirato.

O butirato, como todo AGCC é rapidamente absorvido no cólon, aproximadamente 95% do butirato produzido são transportados através do epitélio (Pryde, 2002). O ácido butírico (forma protonada) é lipossolúvel e se difunde através das membranas celulares. Já o butirato (forma iônica), por não ser lipossolúvel, requer diferentes mecanismos de absorção pelo epitélio (Cook & Sellin, 1998). Um dos mecanismos prováveis é a absorção por troca aniônica associada com a absorção de sódio e cloro e secreção de bicarbonato (Campos *et al.*, 1999). A proporção da forma ionizada e protonada é determinada pelo pH, e em pH normal aproximadamente 1% do butirato, está na forma protonada (Cook & Sellin, 1998). Após a entrada do butirato na célula este é convertido a butiril-CoA por ação da butiril-CoA sintase dentro da mitocôndria (Numa, 1984) e desta forma oxidado pela oxidação (Brody, 1994).

4. Butirato e Câncer de Cólon

Diversos estudos, em modelos experimentais e em humanos, foram realizados com o objetivo de verificar o efeito do butirato, em diversas formulações, na redução câncer de cólon ou doenças inflamatórias (Tabela 1). Porém, estes estudos não foram conclusivos, tanto no que diz respeito ao efeito, dosagem, concentração e formulação do butirato.

Tabela 1: Estudos avaliando o efeito do butirato na redução do câncer de cólon ou doenças inflamatórias do intestino

Referência	Tipo de estudo	Administração e concentração	Resultados
Carraro <i>et al.</i> , 1993	Ratos tratados c/ DMH	Adm. oral de butirato de sódio a 2%	S/ alteração
McIntyre <i>et al.</i> , 1993	Ratos tratados c/ DMH	Dieta rica em fibras (AR)	↓ lesões tumorais
Ramos <i>et al.</i> , 1996	Camundongos tratados c/ citarabina	Adm. oral de AGCC	Proteção contra lesões
Steinhart <i>et al.</i> , 1996	Homens c/ colite ulcerativa	60ml de enema de butirato de sódio a 80mM	S/ efeito
Medina <i>et al.</i> , 1998	Ratos tratados c/ DMH	Lavagem intracecal: 1,5ml/h de butirato de sódio a 40mmol/l	↓ tumores malignos
Ramos <i>et al.</i> , 1999	Camundongos tratados c/ arabinofuranosilcitosina	Adm. oral de AGCC	↓ necrose das células intestinais

Referência	Tipo de estudo	Administração e concentração	Resultados
Aguilar-Nascimento <i>et al.</i> , 1999	Ratos tratados c/ ácido acético 4%	Lavagem intestinal c/ 40ml de butirato de sódio e 60ml de propionato por 8 dias	↑re-epitelização mucosa intestinal
Douillard <i>et al.</i> , 2000	Homens c/ câncer colorretal metastático	Droga: Arginina Butirato – Máximo 3g/kg/dia	S/ efeito clínico
Perrin <i>et al.</i> , 2001	Ratos tratados c/ AOM	Dieta rica em fibras (AR e fruto-oligossacarideo)	↓ número de FCA
Coleman <i>et al.</i> , 2002	Ratos tratados c/ AOM	4 semanas de dieta rica em AR	↑ número de FCA
Luhrs <i>et al.</i> , 2002	Homens c/ colite ulcerativa	4 e 8 semanas de 60ml de enema de butirato de sódio a 100mM	Redução da inflamação da mucosa intestinal
Paitnaik <i>et al.</i> , 2002	Homens c/ tumores sólidos avançados	Droga: Pivoloiloximetil butirato – Máximo 3,3g/m ² /dia	S/ efeito clínico
Nakanishi <i>et al.</i> , 2003	Ratos tratados c/ AOM	Ingestão de probiótico: AR e <i>Clostridium Butyricum</i>	↓ número de FCA
Edelman <i>et al.</i> , 2003	Homens c/ tumores sólidos avançados	Droga tributitum: dosagem 150 a 200mg/kg dia	S/ efeito clínico

Siglas: FCA, focos de criptas aberrantes; AOM, azoximetano; DNH, 1,2-dimetilhidrazina; AR, amido resistente.

Em geral, a carcinogênese colônica é induzida experimentalmente por carcinógenos químicos que produzem tumores colônicos por modificar o genoma celular resultando em alterações fenotípicas. Os carcinógenos mais utilizados nos estudos são a 1,2-Dimetilhidrazina (DMH) e um subproduto de seu metabolismo – azoximetano (AOM); estas substâncias estão envolvidas na metilação do DNA das células epiteliais colônicas (LaMont & O’Gorman, 1978).

Carraro *et al.* (1993) avaliaram o efeito do butirato de sódio na carcinogênese colônica induzida por DMH em ratos e verificaram que a suplementação com butirato de sódio a 2% não alterou o número de tumores formados. McIntyre *et al.* (1993) avaliando o efeito de dietas ricas em fibras conhecidas como “butirogênicas”; ou seja, produtoras de grandes quantidades de butirato, apresentaram menores números de lesões tumorais que os animais tratados com as demais fibras. Portanto, a ingestão de fibras produtoras de grandes quantidades de butirato se mostrou mais eficiente na prevenção de tumores.

As formas de butirato utilizadas como suplementação nos estudos encontrados são o butirato de sódio, que pode estar, também, associado aos demais AGCC; butiratoarginina; pivaloioximetil butirato. Alguns estudos utilizam, entretanto, as fibras butirogênicas adicionadas à dieta como produtora de butirato endógeno.

As formas de administração do butirato de sódio podem ser por via oral, exercendo um efeito mais fisiológico, com absorção de forma lenta e constante (Ramos *et al.*, 1996) ou administração local (enema ou lavagens) que apresenta um resultado mais rápido e eficaz.

A administração intracecal de butirato de sódio foi testada em ratos por Medina *et al.*, (1998). Esses pesquisadores notaram que a infusão de 1,5ml/h de butirato de sódio na concentração de 40mmol/L, administrado na fase de indução do câncer de cólon, não reduziu o número de tumores totais (benigno e maligno) em relação ao grupo controle.

Entretanto, a análise microscópica dos tumores mostrou a presença de 97,29% de tumores malignos no grupo controle, enquanto que no grupo que recebeu o butirato apenas 75% dos tumores eram malignos, essa redução no número de tumores malignos se mostrou estatisticamente significativa. Ainda nesse estudo, análises de fatores tumorais em relação ao fenótipo dos tumores (aspecto, histologia, grau de diferenciação e metástase) foram menos agressivos nos ratos tratados com butirato. Além disso, estes animais tiveram seu peso significativamente aumentado ($p=0,008$) quando comparado com o do grupo controle.

Perrin *et al.* (2001) estudaram o efeito de diferentes tipos de fibras butirogênicas em ratos tratados com azoximetano (AOM) e demonstraram, da mesma forma que McIntyre *et al.* (1993) que nos ratos que receberam as fibras que apresentavam produção estável de butirato (amido resistente e fruto-oligossacarídeo) ocorreu uma diminuição do número de focos de criptas aberrantes (FCA) quando comparado às outras fibras. Nesses estudos, os animais receberam as diferentes dietas ricas em fibras, antes, durante e após a indução do câncer.

Já Coleman *et al.* (2002), avaliando o efeito da combinação na dieta de diferentes fibras (10g/100g de dieta) com óleo de peixe e óleo de semente de girassol (10g/100g de dieta) em ratos com câncer de cólon induzido por AOM, verificaram que após quatro semanas de consumo das dietas, o número de FCA foi maior nos animais que receberam amido resistente do que nos animais que receberam β -celulose, independente do tipo de óleo. Os autores justificaram o efeito não protetor do amido resistente ao fato deste ter produzido uma grande quantidade de AGCC, diluindo a concentração do butirato, portanto, reduzindo seu efeito.

Nakanishi *et al.* (2003) observaram o efeito benéfico do probiótico composto por amido resistente e *Clostridium butyricum* na redução dos FCA em ratos tratados com AOM. O

grupo de animais que recebeu o *Clostridium butyricum* apresentou concentrações aumentadas de butirato no ceco, mas não houve redução no número de FCA; enquanto no grupo que recebeu a dieta com amido resistente foi observada uma redução significativa no número de FCA. Porém apenas o grupo que recebeu amido resistente mais *Clostridium butyricum* reduziu significativamente o número das lesões pré-neoplásicas.

O butirato, juntamente com os outros AGCC, tem sido estudado quanto ao seu efeito nas inflamações, tanto do intestino delgado quanto do intestino grosso. No estudo de Ramos *et al.* (1996) foi observado que a ingestão de AGCC, no qual o butirato estava presente na concentração de 9 mM, protegeu o intestino delgado contra lesões causadas pela droga citarabina em camundongos isentos de germens, e a forma de administração oral em substituição à água obteve melhores perspectivas a respeito da integridade da mucosa, que aqueles que receberam mesmas proporções dos ácidos graxos por dose única via intragástrica, pois a absorção de forma lenta e constante pode causar melhora na manutenção do efeito benéfico desses AGCC. Esses mesmos autores em 1999 confirmaram o efeito benéfico dessa solução de AGCC em camundongos “germe-free” tratados com arabinofuranosilcitosina, droga capaz de causar necrose das células intestinais (Ramos *et al.*, 1999).

Lavagens intestinais com 40mM de butirato de sódio e 60mM de propionato de sódio, por oito dias, causaram menos inflamação intestinal em ratos com colite ulcerativa induzida por ácido acético a 4%, que lavagens com solução de glicose ou solução salina (Aguilar-Nascimento *et al.*, 1999). Estes autores concluíram que a solução de AGCC pode aumentar a re-epitelização da mucosa intestinal na colite experimental.

Steinhart *et al.* (1996) não observaram efeitos benéficos de enema de butirato de sódio em pacientes com colite ulcerativa. Dezenove pacientes com a doença receberam

enemas de 60ml de butirato de sódio a 80mM, uma vez ao dia. Para justificar os resultados, os autores consideraram a concentração do butirato utilizado no enema, a frequência da administração e a duração do tratamento, insuficientes para redução da inflamação. Enquanto Luhrs et al. (2002) verificaram a redução da inflamação da mucosa em pacientes com colite ulcerativa após 4 e 8 semanas de tratamento com enema de 60ml de butirato de sódio a 100mM.

Estudos clínicos foram realizados com o uso oral de argininabutirato e pivaloiloimetil butirato. Estas substâncias foram avaliadas em pacientes com câncer colorretal metastático e tumores sólidos avançados, respectivamente (Douillard *et al.*, 2000; Paitnaik *et al.*, 2002). Estes estudos não apresentaram nenhuma resposta clínica positiva, porém constataram que a dosagem máxima tolerada pelos pacientes foi de 3g/kg/dia para a argininabutirato e 3,3g/m²/dia para pivaloiloimetil butirato.

A tributirina, triglicerídeo contendo três butiratos, foi testada em pacientes com tumores sólidos avançados (Edelman *et al.*, 2003) com boa tolerância. Porém nenhuma resposta objetiva foi observada com a dosagem de 150 a 200mg/kg três vezes ao dia, sendo que a dose-limite para toxicidade foi estabelecida pelos autores em três doses diárias de 200mg/kg.

5. Mecanismos Propostos para Atuação do Butirato na Prevenção do Câncer de Cólon

Estudos *in vitro* tentam elucidar os mecanismos envolvidos no efeito protetor do butirato no desenvolvimento do câncer de cólon. Seus efeitos incluem indução da

diferenciação celular (Kovariková *et al.*, 2000; Gaschott *et al.*, 2001; Sasahara *et al.*, 2002), inibição da proliferação das células transformadas (Wachtershauser & Stein, 2001; Chen *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2002), indução de apoptose (Sasahara *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2002) e modulação das expressões de diferentes genes envolvidos no ciclo celular (Chen *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2002).

Dos mecanismos possíveis, associando o butirato à prevenção e/ou tratamento do câncer de cólon, o principal é a indução do processo apoptótico em células cancerosas do cólon, por meio do aumento da atividade da caspase-3 ou pela capacidade de induzir a atividade de enzimas reguladoras do ciclo celular (Iacomino *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2002).

A apoptose é um processo de morte celular regulado por vias celulares específicas e o funcionamento incorreto desse processo contribui para a patogênese de inúmeras doenças incluindo o câncer de cólon (Mandal *et al.*, 1999). Estudos *in vitro* demonstraram que o processo de apoptose induzido pelo butirato seria mediado pelo aumento da atividade de uma cisteína protease, a caspase-3 (Turner *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2002). No estudo de Mandal *et al.* (1999) realizado com células de carcinoma colorretal (DiFi, HT-29 e SW-480) incubadas com ácido butírico (3mM) por 24 horas, verificaram que este AGCC aumentou a atividade da caspase-3 e também a expressão da procaspase-3, que está envolvida na clivagem proteolítica seletiva do DNA-PKcs destas células. Baixa concentração de butirato parece não ser suficiente para estimular a via da caspase-3 no câncer de cólon; somente doses acima de 5mM são capazes de reduzir a proliferação celular por meio do aumento da atividade da caspase-3 (Turner *et al.*, 2002).

O outro modo pelo qual o butirato reduz a proliferação celular, induz a diferenciação e ainda leva a apoptose celular, seria a capacidade de modular a expressão de

alguns genes do ciclo celular. O ciclo celular é regulado pela interação de ciclinas com quinases-dependentes de ciclinas (cdks), que quando ativadas levam à progressão do ciclo celular. As proteínas supressoras p21 e p27 são conhecidas como reguladores negativos do ciclo celular (Gaschott *et al.*, 2001).

Vários genes reguladores do ciclo celular tiveram suas expressões aumentadas devido ao tratamento *in vitro* com butirato, dentre eles: p16^{INK4A}, p19^{INK4D} (Iacomino *et al.*, 2001), p21^{Cip/Waf1} (Iacomino *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2002), p57 e p14/15 (Gaschott *et al.*, 2001). Gaschott *et al.* (2001) verificaram que o butirato induz a diferenciação em células intestinais modificadas Caco-2, acompanhado por uma estimulação seletiva da expressão da p21, bloqueando o ciclo celular na fase G1.

A progressão da fase G1 do ciclo celular é mediada pela combinação da atividade da ciclina D1 que se liga à cdk4 e cdk6 e a ciclina E com cdk2 formando um complexo que leva à fase S do ciclo celular, conforme observado na figura 2. A expressão aumentada destas ciclinas causa anormalidade no controle do crescimento e na progressão do ciclo celular. Portanto essas se encontram aumentadas durante as fases da carcinogênese de cólon (Hur *et al.* 2000).

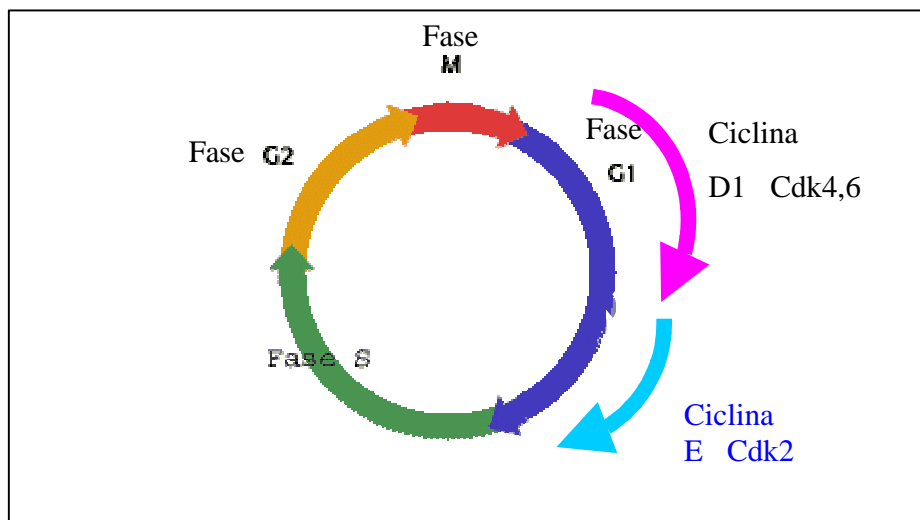


Figura 2: Fases do Ciclo Celular. Fase M; período de divisão celular, mitose. Fase G1; intervalo entre a fase de mitose e duplicação do DNA. Fase S; período em que o DNA é duplicado. Fase G2; intervalo entre o período de duplicação do DNA e divisão celular.

Estudos *in vitro* demonstraram a capacidade do butirato em reduzir a expressão das ciclinas D1 (Tabuchi *et al.*, 2002; Blottiere *et al.*, 2003).

Coradini *et al.* (2000) ao avaliarem o efeito do butirato de sódio, na concentração de 4mM, em células epiteliais colônicas humanas (HT29), verificaram que após 24 horas de tratamento houve redução na expressão da proteína ciclina D1. Entretanto, Siavoshian *et al.* (2000) verificaram somente a redução da expressão do RNAm para ciclina D1 e não da proteína ciclina D1 após a exposição de células HT29 ao butirato de sódio a 5mM por 24 horas. Porém, Tabuchi *et al.* (2002) demonstraram que o butirato de sódio a 2mM é capaz de reduzir a expressão da proteína e do RNAm da ciclina D1 em células epiteliais colônicas (MCE301) após um período de 48 horas, bloqueando, portanto, a passagem da célula da

fase G1 para a fase S do ciclo celular. Kovariková *et al.* (2000) demonstraram o efeito do butirato em bloquear o ciclo celular de células de adenocarcinoma de cólon na fase G0/G1 e, assim, inibir o crescimento, além de induzir a diferenciação dessas células.

6. Conclusão

Considerando as evidências dos estudos conduzidos com diferentes modelos experimentais, observou-se que tanto a ingestão oral de butirato, quanto o consumo crônico de fibras produtoras de concentrações elevadas de butirato podem exercer papel importante na redução ou prevenção de lesões malignas no cólon.

Estudos “*in vitro*”, que objetivaram identificar os mecanismos pelos quais o butirato pode reduzir a proliferação celular colônica, indicam que esta substância é capaz de induzir a apoptose celular por meio da ativação da caspase-3 ou pelo aumento da atividade de uma proteína supressora – p21. O butirato também reduz a atividade da ciclina D1, responsável pela ativação do ciclo celular da fase G1 à fase S. Porém, estes estudos em pacientes portadores de carcinoma no cólon são ainda pouco conclusivos.

7. Referências Bibliográficas

- ADAM, A.; LOPEZ, H. W.; TRESSOL, J. C.; LEUILLET, M.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. Impact of whole wheat flour and its milling fractions on the cecal fermentations and plasma and liver lipids in rats. **J Agric Food Chem** 50:6557-6562, 2002.
- AGUILAR-NASCIMENTO, J.E.; FRANÇA-DA-SILVA L. R.; OLIVEIRA A.F.; GOMES-DA-SILVA M.H. Enhanced mucosal re-epithelialization induced by short chain fatty acids in experimental colitis. **Braz J Med Biol Res** 32(8):961-966, 1999.
- AMERICAN CANCER SOCIETY INC. Cancer prevention & early detection Facts and Figures, 2004. www.cancer.org. Pesquisado em janeiro de 2005.
- BLOTTIERE, H. M.; BUECHER, B.; GALMICHE, J. P.; CHERBUT, C. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. **Proc Nutr Soc** 62:101-106, 2003.
- BRODY T **Nutrition Biochemistry**. Chapter III: *Nutrients that resist or escape digestion*. California:Academic Press Inc,1994, 658 pp.
- BROUNS, F.; KETTLITZ, B.; ARRIGONI, E.; Resistant starch and “the butyrate revolution”. **Trends in Food & Technology** 23:251-261, 2002.
- BURKITT, D. P. Related disease-related cause? **Lancet** 2:1229-1231, 1969.
- CAMPOS, F. G. C. M.; HABR-GAMA, A.; PLOPPER, C.; TERRA, R. M.; WAITZBERG, D. L. Ácidos graxos de cadeia curta e doenças colorretais / Short-chain fatty acids and colorectal diseases. **Rev braz colo-procto** 19(1):11-16,1999.
- CARRARO, S.; MONTIEL, M.; CELENER, D.; PONS, S.; NAVIGANTE, A; BUSTOS, D; BUSTOS F., L. Influencia de la ingesta de butirato de sodio en la carcinogénesis

- colónica murina / Influence of sodium butyrate intake on murine colonic carcinogenesis. **Medicina (B.Aires)** 53(2):133-136, 1993.
- CHEN, Z.; CLARK, S.; BIRKELAND, M.; SUNG, C. M.; LAGO, A.; LIU, R.; KIRKPATRICK, R.; JOHANSON, K.; WINKLER, J. D.; HU, E. Induction and superinduction of growth arrest and DNA damage gene 45 (GADD45) α and β messenger RNAs by histone deacetylase inhibitors trichostatin A (TSA) and butyrate in SW620 human colon carcinoma cells. **Cancer Lett** 188:127-140, 2002.
- CHARALAMPOPOULOS, D.; WANG, R.; PANDIELLA, S.S.; WEBB, C. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. **Int J Food Microbiol** 79:131–141, 2002.
- COLEMAN, L. J.; LANDSTROM, E. K.; ROYLE, P. J.; BIRD, A. R.; MCINTOSH, G. H. A diet containing α -cellulose and fish oil reduces aberrant crypt foci formation and modulates others possible markers for colon cancer risk in azoxymethane-treated rats. **J Nutr** 132:2312-2318, 2002.
- COOK, S. I.; SELLIN, J. H. Review article: short chain fatty acids in health and disease. **Aliment Pharmacol Ther** 12:499-507, 1998.
- CORADINI, D.; PELLIZZARO, C.; MARIMPIETRI, D.; ABOLAFIO, G.; DAIDONE, M. G. Sodium butyrate modulates cell cycle-related proteins in HT29 human colonic adenocarcinoma cells. **Cell Prolif** 33:139-146, 2000.
- DELZENNE, N. M. Oligosaccharides:state of the art. **Proc Nutr Soc** 62:177-182, 2003.
- DOUILLARD, J. Y.; BENNOUNA, J.; VAVASSEUR, F.; DEPORTE-FETY, R.; THOMARE, P.; GIACALONE, F.; MEFLAH, K. Phase I trial of interleukin-2 and

- high-dose arginine butyrate in metastatic colorectal cancer. **Cancer Immunol Immunother** 49:56-61, 2000.
- EDELMAN, M. J.; BAUER, K.; KHANWANI, S.; TAIT, N.; TREPEL, J.; KARP, J.; NEMIEBOKA, N.; CHUNG, E.; ECHO, D. V. Clinical and pharmacologic study of tributyrin: an oral butyrate prodrug. **Cancer Chemother Pharmacol** 51:439-444, 2003.
- GASCHOTT, T.; WACHTERSHAUSER, A.; STEINHILBER, D.; STEIN, J. 1,25-Dihydroxycholecalciferol enhances Butyrate-induced p21^{Waf1/Cip1} expression. **Biochem Biophys Res Commun** 283:80-85, 2001.
- GRECA, F. H.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; COLLAÇO, L. M.; TOLAZZI, A. R. D.; GASPARETTO, E. L.; SANTOS, E. A. A. A ação dos ácidos graxos de cadeia curta na cicatrização de anastomoses colônicas – estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras** 15(3):12-16, 2000.
- HARRIS, P. J.; FERGUSON, L. R. Dietary fibre: its composition and role in protection against colorectal cancer. **Mut Res** 290: 97-110,1993.
- HOWE, H.; WINGO, P.; THUN, M.; RIES, L.; ROSENBERG, H., FEIGAL, E.; EDWARDS, B. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recente increasing trends. **J Natl Cancer Inst** 93:824-842, 2001.
- HU, Y.; MARTIN, J.; LEU, R. L.; YOUNG, G. P. The colonic response to genotoxic carcinogens in the rat:regulation by dietary fibre. **Carcinogenesis** 20(7):1131-2237, 2002.
- HUR, K.; KIM, J.R.; YOON, B.I.; LEE, J.K.; CHOI, J.H.; OH, G.T.; KIM, D.Y. Overxpression of cyclin D1 and cyclin E in 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloridde-induced rat colon carcinogenesis. **J Vet Sci** 1(2):121-126, 2000.

- IACOMINO, G.; TECCE, M. F.; GRINMALDI, C.; TOSTO, M.; RUSSO, G. L.
Transcriptional response of a human colon adenocarcinoma cell line to sodium butyrate.
Bioch Biophys Res Comm 285:1280-1289, 2001.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA)- Estimativas de Incidência de câncer no
Brasil. (www.inca.gov.br). Pesquisado em janeiro de 2005.
- JOHNSON, I. T. Review: Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the
colorectal mucosa. **Food Chem Toxicol** 40:1171-1178, 2002.
- KISSMEYER-NIELSEN P.; CHRISTENSEN H.; LAURBERG S. Decrease in the
collagenous proteins and mechanical strength of distal colon after diverting colostomy
in rats. **Int J Colorectal Dis** 8:120-124,1993.
- KISSMEYER-NIELSEN P.; CHRISTENSEN, H.; LAURBERG, S. Diverting colostomy
induces mucosal and muscular atrophy in the rat distal colon. **Gut** 35:1275-1281, 1994.
- KNUDSEN, K. E. B.; SERENA, A.; CANIBE, N.; JUNTUNEN, K. S. New insight into
butyrate metabolism. **Proc Nutr Soc** 62:81-86, 2003.
- KOVARIKOVÁ, M.; PACHERNIK, J.; HOFMANOVÁ, J.; ZADÁK, Z.; KOZUBIK, A.
TNF- α modulate the differentiation induced by butyrate in the HT-29 human colon
adenocarcinoma cell line. **Eur J Cancer** 36:1844-1552, 2000.
- LaMONT, J. T.; O'GORMAN, T. A. Experimental colon cancer. *Gastroenterol* 75:1157-
1169, 1978.
- LICHTENSTEIN, P.; HOLM, N. V.; VERKASALO, P. K.; ILIADOU, A.; KAPRIO, J.;
KOSKENVUO, M.; PUKKALA, E.; SKITTHE, A.; HEMMINK, K. Enviromental and
heritable factors in the causation of cancer. **N Eng J Med**. 343:78-85, 2000.

- LUHRS, H.; GERKE, T.; MULLER, J. G.; MELCHER, R.; SCHAUBER, J.; BOXBERGER, F.; SCHEPPACH, W.; MENZEL, T. Butyrate inhibits NF- κ B activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. **Scand J Gastroenterol** 37:458-466, 2002.
- MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T. Session: Short-chain fatty acids- Regulation of short-chain fatty acid production. **Proc Nutr Soc** 62:67-72, 2003.
- MANDAL, M.; ADAM, L.; KUMAR, R. Redistribution of activated caspase-3 to the nucleus during butyrate acid-induced apoptosis. **Bioch Biophys Res Comm** 260:775-780, 1999.
- MEDINA, V.; AFONSO, J. J.; ALVAREZ-ARGUELLES, H.; HERNÁNDEZ, C.; GONZÁLEZ, F. Sodium Butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2-Dimethylhydrazine induced rat colon cancer. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, 1998.
- MCINTYRE, A.; GIBSON, P. R.; YONG, G. P. Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. **Gut** 34:386-391, 1993.
- MUIR, J. G.; YEOW, E. G. W.; KEOGH, J.; PIZZEY, C.; BIRD A. R.; SHARPE, K.; O'DEA, K.; MACRAE, F. A. Combining wheat bran with resistant starch has more beneficial effects on fecal indexes than does wheat bran alone. **Am J Clin Nutr** 79:1020-1028, 2004.
- NAKANISHI, S.; KATAOKA, K.; OHNISHI, Y. Effect of high amylose maize starch and clostridium butyricum on metabolism in colonic microbiota and formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. **Microbiol Immunol** 47(12):951-958, 2003.

- NKONDJOCK, A.; SHATENSTEIN, B.; MAISONNEUVE, P.; GHADIRIAN, P. Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. **Cancer Detect Prev** 27:55-66, 2003.
- NUMA, S. **Fatty acid metabolism and its regulation**. Amsterdam: Elsevier Publishers B.V. 209pp, 1984.
- PAITNAIK, A.; ROWINSKY, E. R.; VILLALONA, M. A.; HAMMOND, L. A.; BRITTEN, C. D.; SIU, L. L.; GOETZ, A.; FELTON, S. A.; BURTON, S.; VALONE, F. H.; ECKHARDT, S. G. A phase I study of Pivaloyloxymethyl Butyrate, a prodrug of the differentiating agent acid butyric, in patients with advanced solid malignancies. **Clin Cancer Res** 8:2142-2148, 2002.
- PERRIN, P.; PIERRE, F.; CHAMP, M.; BERREUR, M.; PRADAL, G.; BORNET, F.; MEFLAH, K.; MENANTEAU, J. Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. **Gut** 48:53-61, 2001.
- POTTER, J.D. Risk factors for colon neoplasia - Epidemiology and Biology. **Eur J Cancer** 31:1033-1038, 1995.
- PRYDE, S. E.; DUNCAN, S. H.; HOLD, G. L.; STEWART, C. S.; FLINT, H. J. The microbiology of butyrate formation in the human colon. **FEMS Microbiol Lett** 217, 133-139, 2002.
- POUTEAU, E.; NGUYEN, P.; BALLEVRE, O.; KREMPF, M. Production rates and metabolism of short-chain fatty acids in the colon and whole body using stable isotopes. **Proc Nutr Soc** 62:87-93, 2003.
- RAMOS, M.G.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; BAMBIRRA, E.A.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C. Short Chain Fatty Acids protect intestinal mucosa of germfree mice against cytarabine

- lesions. Germfree Life and its Ramifications. **Germfree Life and its Ramifications**, 1996.
- RAMOS, M.G.; BAMBIRRA, E.A.; NICOLI, J.R.; CARA, D.C.; VIEIRA, E.C. ALVAREZ-LEITE, J.I. Protection by short-chain acids against 1- β -D-Arabinofurasylycytosine-induced intestinal lesions in germfree mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 43(4):950-953.
- RAMOS, M.G.; RABELO, F.L.A.; DUARTE T.; GAZZINELLI, R.T.; ALVAREZ-LEITE, J.I. Butyrate induces apoptosis in murine macrophages via caspase-3, but independent of autocrine synthesis of tumor necrosis factor and nitric oxide. **Braz J Biol Res** 35:161-173, 2002.
- RIZKALLA, S. W.; LUO, J.; KABIR, M.; CHEVALIER, A.; PACHER, N.; SLAMA, G. Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath-hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. **Am J Clin Nutr** 72:1474-1479, 2004.
- SASAHARA, Y.; MUTOH, M.; TAKAHASHI, M.; FUKUDA, K.; TANAKA, N.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Suppression of promoter-dependent transcriptional activity of inducible nitric oxide synthase by sodium butyrate in colon cancer cells. **Cancer Lett** 177:155-161, 2002.
- SIAVOSHIAN, S.; SEGAN, J.P.; KORNPORST, M.; BONNET, C.; CHERBUT, C.; GALMICHE, J.P.; BLOTTIERE, H.M. Butyrate and trichostatin A on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induced of cyclin D3 and p21 expression. **Gut** 46:507-514, 2000.

- STEINHART, A. H.; HIRUKI, T.; BRZEZINSKIS, A.; BAKER, J. P. Treatment of left-sided ulcerative colitis with butyrate enema: a controlled trial. **Aliment Pharmacol Ther** 10:729-736, 1996.
- TABUCHI, Y.; ARAI, Y.; KONDO, T.; TAKEGUCHI, N.; ASANO, S. Identification of genes responsive to sodium butyrate in colonic epithelial cells. **Biochem Biophys Res Comm** 293:1287-1294, 2002.
- TESHIMA, E. **Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos**. In: FERREIRA C. L. L. F. *Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção*. Viçosa, MG, 2003, 206p.
- TURNER, N. D.; ZHANG, J.; DAVIDSON, L. A.; LUPTON, J. R.; CHAPKIN, R. S. Oncogenic ras alters sensitivity of mouse colonocytes to butyrate and fatty acid mediated growth arrest and apoptosis. **Cancer Lett** 186:29-35, 2002.
- WACHTERSHAUSER, A.; STEIN, J. Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells occurs independently from p27. **Bioch Biophys Res Comm** 281:295-299, 2001.

Capítulo II:

Uso do Butirato na Intervenção do Processo de Indução do Câncer de Cólon em Ratos

Wistar

Uso do Butirato no Câncer de Cólon

¹Queiroz, I. C.; ²Peluzio, M. C. G.; ³Chaves-Dias, C. M. G.; ⁴Sabarense, C. M.; ⁵Franceschini, S.C.C; ⁶Alvarez-Leite, J. I.

¹Isabela Campelo de Queiroz – Universidade Federal de Viçosa

²Maria do Carmo Gouveia Peluzio – Universidade Federal de Viçosa

³Cristina Maria Ganns Chaves Dias - Universidade Federal de Viçosa

⁴Cephora Maria Sabarense - Universidade Federal de Viçosa

⁵Sylvia do Carmo Castro Franceschini – Universidade Federal de Viçosa

⁶Jacqueline Isaura Alvarez Leite – Universidade Federal de Minas Gerais

Autor responsável pela correspondência: Maria do Carmo Gouveia Peluzio

Endereço para correspondência: Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Avenida PH Rolffs, s/número. Viçosa-MG. Cep: 36571-000.

E-mail: mpeluzio@ufv.br; icqueiroz@ig.com.br

Telefones: (31)3899-1275 ou (31)3427-4554

Resumo

Introdução: o câncer de cólon é, dentre os tipos de câncer, o mais afetado pela dieta. Sabe-se que dietas ricas em fibras podem proteger contra o desenvolvimento do câncer colorretal, principalmente por meio da produção do butirato. Objetivo: avaliar os efeitos do butirato no câncer colorretal experimental, por meio da quantificação dos focos de criptas aberrantes (FCA), alteração no perfil de ácido graxos da gordura intrabdominal e hepática e quantificação da expressão de RNAm das ciclinas D1 e E. Materiais e Métodos: foram utilizados ratos Wistar tratados com 1,2-Dimetilhidrazina (DMH) que receberam durante 30 dias butirato de sódio *ad libitum*, em substituição à água. O peso e consumo da dieta foram monitorados, durante as 17 semanas. O intestino grosso foi retirado para quantificação e categorização dos FCA, e obtenção do raspado de mucosa para quantificação da expressão do RNAm das ciclinas D1 e E. O fígado e a gordura intrabdominal foram retirados para análise do perfil dos ácidos graxos. Resultados: o consumo de dieta e evolução de peso dos animais não apresentou diferenças durante o experimento, exceto nas 4^a e 5^a semanas. Houve uma redução estatística nos FCA total no grupo que recebeu butirato, principalmente no segmento médio. Porém, não houve diferença na expressão do RNAm das ciclinas D1 e E dos grupos. Os animais do grupo butirato apresentaram menores porcentagens de ácido esteárico e oléico na gordura

intrabdominal e menores porcentagens de docosahexanóico no fígado e maiores porcentagens de linoleico na gordura intrabdominal, diferenças estatísticas. Conclusão: o uso do butirato foi capaz de reduzir as lesões pré-neoplásicas em animais, entretanto, não foram detectadas alterações na expressão das ciclinas D1 e E na mucosa intestinal dos animais, imediatamente após o uso de butirato. O Butirato inibiu as alterações no perfil de ácido graxos tecidual e hepáticos comumente encontradas em pacientes com câncer de cólon.

Palavras-Chave: Câncer de Cólon, Butirato, Focos de Criptas Aberrantes, Perfil Lipídico, Ciclinas.

1. Introdução

O câncer de cólon atinge milhões de pessoas em todo o mundo, causando a morte de mais de meio milhão de indivíduos anualmente. É o tipo de câncer mais afetado pela dieta e, por isso, sua prevenção pela dieta tem recebido grande atenção (Mourão *et al.*, 2004). Sabe-se que o alto consumo de carne vermelha, gordura total ou proteína animal possui uma associação positiva com risco aumentado de desenvolvimento de câncer de cólon (Potter, 1995). Entretanto, de acordo com Burkitt (1969), uma dieta rica em frutas e hortaliças pode proteger contra o desenvolvimento do câncer colorretal, bem como reduzir o risco.

Estudos experimentais e epidemiológicos sugerem o efeito protetor das fibras alimentares no câncer de cólon (Grasten *et al.* 2000; Hu *et al.* 2002), pois sua ingestão regular resulta na modulação da resposta imune no intestino e da microflora intestinal (Brouns *et al.* 2002).

O cólon humano contribui de maneira importante para a fermentação de polissacarídeos não absorvidos, produzindo os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente o ácido acético, ácido propiônico e o ácido butírico (Campos *et al.* 1999). Estes AGCC são predominantemente formados no cólon, sendo que os ácidos acético (50-60%), propiônico (20-25%) e butírico (15-20%) produzidos perfazem cerca de 85-95% dos AGCC totais em toda a região colônica (Teshima, 2003). Esta proporção pode variar dependendo da composição das fibras da dieta (Harris & Ferguson, 1993).

O butirato tem atraído grande atenção dos pesquisadores por ser considerado o principal candidato para explicar o efeito protetor das fibras alimentares contra o câncer de

cólon (Nkondjock *et al.* 2003). Na dieta, os produtos lácteos são as principais fontes de butirato exógeno (Carraro *et al.* 1993). O butirato é um ânion derivado do ácido orgânico, constituído por quatro átomos de carbono e apresenta-se como fonte de energia primária para os colonócitos, por ser prontamente absorvidos pela mucosa colônica (Cook & Sellin, 1998). Aproximadamente 95% do butirato produzido no cólon é absorvido pelo epitélio, porém pequena concentração é encontrada na circulação porta, indicando sua rápida oxidação pelos colonócitos (Pryde, 2002). O metabolismo do butirato inicia-se com a sua entrada nas células epiteliais, sendo este convertido a butiril-CoA dentro da mitocôndria, e desta forma oxidado pela β -oxidação dos ácidos graxos (Brody, 1994).

O câncer colorretal ocorre devido a um acúmulo seqüencial de mutações genéticas distintas, tais como mutação do gene APC, que exerce função reguladora na proliferação epitelial, alteração no gene K-ras que irá funcionar como oncogene, mutação da proteína DCC, importante na adesão celular, além da mutação da p53, que pode ser decisiva no processo de malignidade, sendo encontrada em 70% dos carcinomas colorretais (Fearon & Vogelstein, 1990).

Durante a carcinogêne do cólon ocorre um aumento na expressão das ciclinas na mucosa intestinal associado a anormalidades na progressão do ciclo celular e na regulação do crescimento celular (Hur *et al.* 2000). A progressão da fase G1 do ciclo celular é mediada pela combinação da atividade da ciclina D1, que se liga a quinase-dependente de ciclina (cdk) 4 e 6, e a ciclina E com cdk2 formando um complexo que leva à fase S do ciclo celular (Coradini *et al.* 2000; Bardon *et al.* 2002).

Alterações importantes ocorrem em nível celular e metabólico durante o processo carcinogênico do cólon. Há evidências da ocorrência de alterações no metabolismo dos

lipídios em pacientes oncológicos, variando as porcentagens de ácidos graxos presentes no plasma sanguíneo e no tecido adiposo destes pacientes (Neoptolemos *et al.*, 1991; Hendrickse *et al.* 1994, Banares *et al.* 1996). Alterações como redução da peroxidação lipídica, que é característico do crescimento celular, leva ao aumento da concentração do ácido graxo docosahexaenóico (DHA) no tecido tumoral (Neoptolemos *et al.*, 1991). Aumento nas porcentagens de ácidos esteárico e ácido oléico, além de reduções na porcentagem do ácido linoléico, são observadas em estudos de avaliação do perfil dos ácidos graxos no plasma e nas células sanguíneas de pacientes com câncer colorretal (Hendrickse *et al.*, 1994; Banares *et al.*, 1996; Baro *et al.*,1998). Porém, não se conhece os mecanismos que justificam tais modificações.

O butirato é bem conhecido por ter múltiplos efeitos na diferenciação de células malignas ou normais do cólon (Campos *et al.* 1999; Ramos *et al.* 2002). Estudos *in vitro* (Coradini *et al.*, 2000; Kovariková *et al.*, 2000; Tabuchi *et al.*, 2002) demonstraram a capacidade do butirato em reduzir a expressão do RNAm das ciclinas D1 e E, bloqueando a passagem da célula da fase G1 para a fase S do ciclo celular, causando apoptose celular. Coradini *et al.* (2000) ao avaliarem o efeito do butirato de sódio na concentração de 4mM em células epiteliais colônicas humanas (HT29), verificaram que após 24 horas de tratamento houve redução na expressão da proteína ciclina D1. Kovariková *et al.* (2000) demonstraram a eficiência do butirato em bloquear o ciclo celular de células de adenocarcinoma de cólon na fase G0/G1 e, assim, inibir o crescimento, além de induzir a diferenciação dessas células. Tabuchi *et al.* (2002) demonstraram que o butirato de sódio a 2mM é capaz de reduzir a expressão da proteína e do RNAm da ciclina D1 em células epiteliais colônicas (MCE301) após um período de 48 horas, bloqueando, portanto, a

passagem da célula da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Porém, pouco se sabe sobre a atuação do butirato de sódio em estudos *in vivo*.

Este estudo teve por objetivos avaliar o efeito da solução de butirato, administrado por via oral, na etapa inicial da carcinogênese do cólon induzida pela 1,2 dimetilhidrazina (DMH) em ratos Wistar e traçar o perfil de ácidos graxos do fígado e da gordura intrabdominal destes animais. Ainda, foi proposto avaliar a expressão das ciclinas D1 e E na mucosa intestinal de animais tratados com a DMH, logo após o tratamento com butirato de sódio.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais e Dietas

Foram utilizados no estudo vinte e cinco ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, Rodentia), machos, com 11 semanas de idade e com peso variando de 180 a 320 gramas. Os animais permaneceram em gaiolas coletivas de polietileno (4 a 5 animais por gaiola) no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa e foram mantidos à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em fotoperíodo de 12 horas.

Os animais foram divididos, de acordo com a média de peso de 250g, em 2 grupos: grupo controle (n=9), recebendo água *ad libitum* e grupo experimental, denominado butirato (n=16), recebendo solução de butirato de sódio (34%) *ad libitum*, nas duas semanas

de administração da droga carcinogênica e nas duas primeiras semanas do experimento; após este período todos os animais receberam água *ad libitum* até o final do experimento. Ambos grupos receberam dieta comercial (Nuvilab[®]) indicada para alimentação de roedores de laboratórios e hamsters, durante as 17 semanas do estudo. A solução de butirato de sódio foi preparada com 34mL de ácido butírico (SIGMA[®], USA) e água destilada suficiente para completar 100mL; pH foi ajustado para 7.2 a 7.4 com solução de NAOH 0.1N.

O consumo das dietas e o peso dos animais foram monitorados semanalmente.

2.2. Administração da 1,2-Dimetilhidrazina e Coleta de Material

Foram aplicadas quatro injeções subcutâneas da droga 1,2-dimetilhidrazina (SIGMA[®], USA) na doses de 40mg/Kg de peso, duas vezes por semana, durante duas semanas. A 1,2-dimetilhidrazina (DMH) foi preparada imediatamente antes do uso, dissolvida em solução de NaCl 0.9%, com 15% de EDTA e pH 6.5 (Rodrigues *et al.*, 2002).

Os animais foram sacrificados 17 semanas após a última aplicação da DMH, após jejum de 12 horas, por asfixia com CO₂. Foi retirado o intestino grosso dos animais, do ceco até o ânus, para análise dos focos de criptas aberrantes, o fígado e a gordura intrabdominal para verificação do perfil lipídico.

Para avaliar o efeito do butirato na expressão das ciclinas D1 e E na mucosa colônica, seis animais (sendo 3 do grupo controle e 3 do grupo butirato) foram sacrificados logo após a suplementação com butirato (30 dias) e retirado todo o intestino grosso para obtenção do raspado de mucosa dos animais.

2.3.Preparação do Tecido para Contagem dos Focos de Criptas Aberrantes

Após a remoção, foi lavado em solução salina fisiológica, aberto longitudinalmente pela margem contra mesentérica, colocado em placas de parafina, com a mucosa voltada para a parte superior da placa (tendo as extremidades fixadas por alfinetes) e então fixado em formol, a 10%, por 24 horas. Depois de fixado, o intestino grosso foi medido e dividido em três fragmentos iguais denominados de proximal, médio e distal, em relação ao ceco. Em seguida, os segmentos foram corados em solução de azul de metileno a 1%, por 2 minutos, e lavados em tampão fosfato (PBS) para posterior análise.

A superfície da mucosa intestinal foi observada com o auxílio de microscópio óptico de luz, binocular com aumento de 10x para identificação e categorização dos FCA de acordo com a técnica de Bird (1987). Os FCA foram contados em toda a superfície mucosa do intestino grosso, do ceco ao reto, por dois observadores independentes de maneira duplo-cega. A categorização dos FCA foi realizada com a contagem dos focos contendo três ou menos criptas aberrantes e focos com mais de três criptas aberrantes.

Para análise dos resultados, foi calculada primeiramente a potência de redução, dividindo a mediana do número de FCA dos animais do grupo controle pela mediana de FCA dos animais do grupo butirato; o percentual de redução dos FCA pela seguinte fórmula: $\text{Percentual de Redução} = 100 - 100/\text{Potência}$.

2.4. Extração de RNAm e Análise Quantitativa de RT-PCR de Ciclina D1 e E

Considerando a maior quantidade de FCA, foram extraídos os raspados da mucosa dos segmentos médio e distal do cólon. Esses foram identificados e imediatamente

congelados em nitrogênio líquido até a análise. A extração do RNAm foi conduzida conforme descrito por Portugal *et al.* (2004) e a análise de RT-PCR foi adaptada de Hur *et al.* (2000). Os tecidos congelados foram preparados utilizando-se TRIzol[®] (Invitrogen laboratories, USA), para extração do RNAm total da mucosa dos animal de cada grupo. O RNAm total foi quantificado por espectrofotometria a 260nm e a fita de cDNA foi preparada por transcrição reversa (RT). O cDNA foi amplificado por PCR usando “primer”de HPRT, Ciclina D1 e Ciclina E. A reação foi conduzida em termociclizador com 9µl de mix para reação de PCR, contendo DNTP 2.5mM, Taq. Buffer com MgCl₂ a 15mM, Taq DNA polimerase e mistura 1:1 de “primer sense e anti-sense”. As amostras foram primeiramente incubadas a 95°C por 3 minutos e desnaturadas a 94°C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto seguidos de extensão por 2 minutos a 72°C. Após o término do programa com o número de ciclos designados para cada “primer”, o programa executava uma extensão de 72°C, por 7 minutos. Sequências nucleotídicas, tamanhos dos produtos de PCR, temperatura de anelamento e número de ciclos para cada “primer”, estão relacionados abaixo: Ciclina D1, “sense” 5'-TGGAGCCCCTGAAGAAGAG-3' e “antisense” 5'-AAGTGCGTTGTGCGGTAGC-3', 60°C, 34 ciclos. Ciclina E, “sense” 5'-CTGGCTGAATGAATGTTTATGTCC-3', “antisense” 5'-TCTTTGCTTGGGCTTTGTCC-3', 60°C, 34 ciclos. HPRT “sense” 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3' e “antisense” 5'-GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC-3', 58°C, 35 ciclos. Após a amplificação os produtos de PCR foram separados por gel de poliacrilamida (6%) e corados com nitrado de prata. A intensidade de cada banda foi medida por densitometria realizada com o auxílio do programa Gel Expert-Nucleotch.

2.5. Perfil Lipídico do Tecido Hepático e da Gordura Intrabdominal

O fígado e a gordura intrabdominal foram congelados logo após a sua retirada e mantidos a -20°C , até a análise. Os lipídios hepáticos e da gordura intrabdominal foram extraídos utilizando-se o método de Folch *et al.* (1957) e esterificados segundo a técnica de Hartmann e Lago (1986).

A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa, pela comparação dos tempos de retenção dos ésteres das amostras com padrões de referência (SIGMA[®],USA), utilizando o cromatógrafo a gás GC 17 A Shimadzu/Class GC 10, equipado com coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 de 100m e 0.25mm de diâmetro interno e detector de ionização de chama.

2.6. Análise Estatística

Foi utilizado o software SigmaStat, na versão 2.03, para análise estatística, sendo empregados testes paramétricos para aqueles grupos que apresentavam distribuição normal e não-paramétricos para os grupos que não apresentavam distribuição normal. Para comparação de dois grupos independentes, foi utilizado o teste t de Student ou teste de Mann-Whitney e para comparação de três grupos independentes o teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo procedimento de comparações múltiplas de Dunn's.

O valor de p foi fixado até 5% ($p < 0.05$) com o intuito de obter uma confiabilidade de 95% nas comparações.

3. Resultados

3.1. Peso dos animais e consumo de dietas

O consumo de dieta e a evolução do peso dos animais estão apresentados na figura 1. Não houve diferença entre o consumo de dieta entre os animais do grupo butirato e grupo controle ($p=0.508$).

A Figura 1b demonstra a evolução do peso dos animais de ambos os grupos. O peso dos animais ao longo do experimento apresentou-se semelhante entre os dois grupos, com exceção na 4ª e 5ª semana experimental, onde os animais do grupo butirato apresentaram peso estatisticamente maior ($p=0.047$ e $p=0.013$, respectivamente) que os do grupo controle.

Ao analisar o ganho de peso dos animais, verificou-se que os animais do grupo butirato apresentaram maior ganho durante a 2ª, 3ª e 4ª semanas (dados não mostrados), confirmando a diferença observada na 4ª e 5ª semanas de experimentação.

3.2. Número de Focos de Criptas Aberrantes

O número total de focos de cripta aberrantes, a categorização dos FCA e a distribuição do FCA por segmento afetado são apresentados na Tabela 1. Observa-se que houve redução no número de FCA total, no número de FCA com menos e mais de três criptas entre os grupos controle e tratado. A redução do número de FCA total do grupo

butirato foi de 51.4%, do número de focos com três ou menos de três criptas de 53.3% e 32.8% de redução para focos com mais de três criptas.

Quanto ao segmento do intestino grosso dos animais do grupo do butirato, foi observada redução de 31.5% no número de FCA total no segmento proximal, 43.9% no segmento médio e de 54.41% no segmento distal, a análise estatística está mostrada na tabela 1.

3.3. Análise quantitativa de RT-PCR de ciclina D1 e E

As bandas reveladas pela análise quantitativa de RT-PCR das amostras de mucosa, utilizando “primers” específicos para ciclina D1, E e HPRT estão mostradas na Figura 2a.

Não houve diferença na extensão e intensidade das bandas da ciclina D1 e E das amostras dos animais do grupo butirato e controle ($p=0.400$ e $p=0.534$, respectivamente), conforme demonstrado na Figura 2b.

3.4. Perfil lipídico

A comparação entre os perfis dos ácidos graxos do tecido hepático e da gordura intrabdominal de ambos os grupos, bem como os testes estatísticos estão apresentados nas Tabelas 2 e 3. O grupo butirato apresentou menor porcentagem do ácido graxo esteárico e oléico e maior porcentagem de linoléico ($p<0.05$) na gordura intrabdominal, quando comparado com o grupo controle. No tecido hepático, o grupo butirato apresentou valores percentuais inferiores do ácido graxo DHA ($p<0.05$) quando comparado ao grupo controle.

4. Discussão

O butirato de sódio é considerado um possível agente redutor do câncer de cólon induzido quimicamente em animais de experimentos (Perrin *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2002). Nesse estudo, o efeito do butirato de sódio sob a formação de FCA, considerado um marcador para a carcinogênese do cólon, induzida pela DMH, foi testado. A DMH induz a proliferação de tumores do cólon, principalmente por interferir no processo de duplicação do DNA na fase S do ciclo celular (McGarrity *et al.*, 1988; Laranjeira *et al.*, 1998).

Após dezessete semanas de experimento, foi observada a presença de FCA nos dois grupos experimentais, indicando que a droga foi eficiente na indução de lesões pré-neoplásicas. Os FCA foram observados principalmente nos segmentos médio e distal, semelhante ao descrito por Laranjeiras *et al.* (1998).

A redução de 51.45% no FCA total causada pelo butirato, em nosso estudo, foi devida principalmente a diminuição dos focos com menos de três criptas, mais numerosos no momento do sacrifício. A multiplicidade das criptas, ou seja, o grau de malignidade das lesões é influenciada pelo tempo decorrido entre a aplicação da droga e o sacrifício dos animais (Bird & Good, 2000). Rodrigues *et al.* (2002) observaram que com quatro semanas, desde a aplicação da DMH, o número de focos com apenas uma cripta foi maior que aqueles com mais de três criptas, enquanto que com 30 semanas, o número de focos com mais de três criptas foi estatisticamente maior que os focos com apenas uma cripta, apesar do número total de FCA não ter diferido ao se comparar quatro e 30 semanas.

Carraro *et al.* (1993) não encontraram efeitos da suplementação com butirato, utilizando a concentração de 2%, no número de tumores formados, em experimentos com 12 semanas de intervenção. Freeman (1986), encontrou aumento da incidência de tumores

colônicos em ratos tratados por 12 semanas com DMH e recebendo butirato de sódio oral a 1 e 2%. No presente trabalho a dose do butirato utilizada foi superior (34%) e o tempo de experimento menor (quatro semanas de intervenção).

A concentração do butirato parece ser um ponto importante a ser considerado durante sua suplementação. Nos estudos a concentração é bastante variada e não se tem um consenso da concentração ideal. Estudos *in vitro* (Dang *et al.*, 1995; Siavoshian *et al.*, 2000; Coradini *et al.*, 2000) utilizam concentrações que variam de 1 a 25mM, enquanto em estudos com modelos experimentais e em pacientes com tumores avançados, a concentração pode chegar a 100mg/kg de peso ao dia (Douillard *et al.* 2000; Edelman *et al.* 2003), próximo ao utilizado em nosso estudo (68mg/kg de peso/dia).

Acredita-se ainda que o butirato, quando administrado na forma oral, em substituição à água, permite uma absorção intestinal em doses constantes, próxima ao fisiológico, podendo levar a uma melhor manutenção dos efeitos benéficos e menor produção de metabólitos hepáticos (Ramos *et al.* 1996). Porém, grandes quantidades de butirato são absorvidas no intestino delgado por difusão passiva (Freeman, 1986; Tuleu *et al.*, 2001) diminuindo a quantidade que atingirá o cólon.

No estudo de Freeman (1986) o aumento da concentração de butirato de 1% para 2% permitiu um aumento da concentração de ácido butírico no cólon distal dos animais de 0.67mg/g para 0.71mg/g de fezes. Como no presente estudo a concentração utilizada foi de 34%, possivelmente a concentração de ácido butírico no cólon estaria em torno de 1.36mg/g de fezes.

De acordo com o estudo de Fleming *et al.* (1985) que encontrou uma concentração de 1.64mg/g de butirato nas fezes de humanos ao adicionar 33g de fibras alimentares (proveniente do feijão) em uma dieta usual, é possível estimarmos que para a produção do

efeito redutor no câncer de cólon, encontrado no presente estudo, seria necessária a ingestão de cerca de 30g de fibra alimentar por dia. Essa quantidade está de acordo com as recomendações do *Institute of Medicine/Food and Nutrition Board* (2002) que são de 25 e 38g/dia para mulheres e homens adultos, respectivamente.

O butirato é capaz de alterar a expressão de reguladores do ciclo celular, inibindo a proliferação e induzindo a apoptose em cultura de células de câncer de cólon (Chen *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2002; Sasahara *et al.*, 2002). Porém seu efeito *in vivo* ainda é pouco conhecido. A metodologia utilizada para avaliação dos mecanismos moleculares envolvidos na redução do número de FCA pelo butirato, não evidenciou redução na expressão das ciclinas, como demonstrado em experimentos *in vitro* (Coradini *et al.*, 2000; Tabuchi *et al.*, 2002). Não foi observada, também, diferença no número de FCA entre os grupos, após duas semanas do tratamento com DMH (dados não apresentados), apesar de identificarmos FCA em ambos os grupos, principalmente naqueles com menos de três criptas. Acredita-se que com duas semanas após a indução com DMH já ocorram alterações genômicas característica do processo carcinogênico (LaMont & O’Gorman, 1978; Rodrigues *et al.*, 2002), o que justificou nossa pesquisa de alteração da expressão das ciclinas D1 e E nesse período.

Otori *et al.* (1999) identificaram a expressão da ciclina D1 em FCA de ratos tratados com DMH e verificaram a expressão aumentada de ciclina D1 em FCA, porém, diferente do nosso estudo, foram utilizados apenas os focos que continham mais de sete criptas. Em estudos *in vitro* (Coradini *et al.*, 2000 e Tabuchi *et al.*, 2002), o tratamento de células de câncer colônico e células transgênica com concentração de butirato de sódio entre 1mM e 5mM, reduziu os níveis de RNAm de ciclina D1. Kennedy *et al.* (2002) observaram a inibição da proliferação celular em glândulas mamárias normais de camundongos por meio

da redução da expressão da ciclina D1, contudo neste estudo foram utilizadas altas concentrações de butirato de sódio (250 – 500 mg/kg/dia).

Outros mecanismos podem estar envolvidos no efeito benéfico exercido pelo butirato de sódio em lesões pré-neoplásicas do cólon. Estudos *in vitro* demonstraram que o processo de apoptose induzido pelo butirato seria mediado pelo aumento da atividade de uma cisteína protease, a caspase-3 (Turner *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2002). Ou ainda aumentando a expressão de proteínas supressoras, tais como p21 e p27, que são conhecidas como reguladores negativos do ciclo celular (Gaschott *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). Vários outros genes reguladores do ciclo celular tiveram, também, suas expressões aumentadas devido ao tratamento *in vitro* com butirato, dentre eles: p16^{INK4A}, p19^{INK4D} (Iacomino *et al.*, 2001), p57 e p14/15 (Gaschott *et al.*, 2001).

Diversos estudos relatam as alterações no metabolismo dos ácidos graxos em pacientes com câncer de cólon (Neoptolemos *et al.*, 1988; Baro *et al.*, 1998; Nkondjock *et al.*, 2003). Em nosso estudo encontramos alterações no perfil dos ácidos graxos, como redução na porcentagem de ácido esteárico e ácido oléico, aumento de ácido linoléico na gordura intrabdominal e redução do ácido docosahexanóico (DHA) no tecido hepático dos animais do grupo butirato, diferentes das encontradas durante a carcinogênese colônica (Neoptolemos *et al.*, 1991; Hendrickse *et al.*, 1994; Baro *et al.*, 1998), evidenciando o efeito benéfico exercido pela suplementação com butirato de sódio nestes animais. Alterações como redução da peroxidação lipídica, que é característico do crescimento celular, como afirma Neoptolemos *et al.* (1991), leva ao aumento da concentração de DHA no tecido tumoral. Em nosso estudo a porcentagem deste ácido graxo estava diminuída no tecido hepático dos animais do grupo do butirato, sugerindo um perfil mais próximo de células não cancerosas.

Os ácidos graxos da gordura intrabdominal apresentam um turnover lento e sua constituição é reflexo da composição lipídica da dieta ingerida (Field *et al.*, 1985). Como a composição e a quantidade da dieta dos dois grupos experimentais em nosso estudo foram semelhantes, nossos dados sugerem que a diferença encontrada pode está associada ao consumo do butirato de sódio.

Em estudo que avaliou o perfil dos ácidos graxos no plasma e nas células sanguíneas de pacientes com câncer colorretal, Baro *et al.*(1998) verificaram que os ácidos esteárico e ácido oléico encontram-se aumentados nestes pacientes, enquanto o linoléico encontrava-se reduzido. Da mesma forma, Hendrickse *et al.* (1994) e Banares *et al.* (1996) encontraram aumento das concentrações de ácido oléico nas frações fosfolipídicas do plasma de pacientes com câncer colorretal. Estes autores acreditam que mudanças no metabolismo desses ácidos graxos sejam causadas pela doença. Os nossos resultados, no entanto, apresentaram-se alterados, porém na ordem inversa. O grupo butirato apresentou menores porcentagens de ácido esteárico e ácido oléico, além de porcentagem aumentada de ácido linoléico na gordura visceral quando comparado ao grupo controle. Pode ser que as alterações provocadas pela doença tenham um perfil específico para cada tecido ou o butirato tenha contribuído benéficamente para reverter as alterações provocadas pela doença.

5. Conclusão

O uso do butirato de sódio por um período de quatro semanas reduziu o número de lesões pré-neoplásicas em animais tratados com DMH, além de inibir as alterações do perfil

de ácido graxos tecidual e hepáticos causados pelo processo carcinogênico. Entretanto, não foram detectadas alterações na expressão das ciclinas D1 e E na mucosa intestinal dos animais, após quatro semanas de uso do butirato de sódio.

6. Agradecimentos

Á Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por financiar o projeto e as bolsas de pesquisa. Ao laboratório de Bioquímica Nutricional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais pela contribuição nas análises de RT-PCR.

7. Referência Bibliográficas:

1. Mourão DM, Monteiro JBR, Chaves-Dias CMG, Costa NMB. Fibra alimentar na redução da incidência do câncer de cólon: evidências conclusivas? Rev Bras Nut Clin 2004;19(4):196-202.
2. Potter JD. Risk factors for colon neoplasia - Epidemiology and Biology. Eur J Cancer 1995;31:1033-1038.
3. Burkitt DP. Related disease-related cause? Lancet 1969;2:1229-1231.
4. Grasten SM, Juntunen KS, Poutanen KS, Gylling HK, Miettinen TA, Mykkanen HM. Rye bread improves bowel function and decreases the concentration of some compounds that are putative colon cancer risk markers in middle-aged women and men. J Nutr 2001;30:2215-2221.
5. Hu Y, Martin J, Leu RL, Young GP. The colonic response to genotoxic carcinogens in the rat: regulation by dietary fibre. Carcinogenesis 2002; 20(7):1131-2237.
6. Brouns F, Kettlitz B, Arrigoni E. Resistant starch and “the butyrate revolution”. Trends in Food & Technology 2002;23:251-261.
7. Campos, FGCM, Habr-Gama A, Plopper C, Terra RM, Waitzberg DL. Ácidos graxos de cadeia curta e doenças colorretais / Short-chain fatty acids and colorectal diseases. Rev Bras Colo-Procto 1999;19:11-6.
8. Teshima E. In: Ferreira CLLF. Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção. Viçosa:2003.
9. Harris PJ, Ferguson LR. Dietary fiber: its composition and role in protection against colorectal cancer. Mutat Res 1993;290:97-110.

10. Nkondjock A, Shatenstein B, Maisonneuve P, Ghadirian P. Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. *Cancer Detect Prev* 2003;27:55-66.
11. Carraro S, Montiel M, Celener D, Pons S, Navigante A, Bustos D, Fernandez LB. Influencia de la de butirato de sodio en la carcinogenesis colonica murina. *Medicina* 1993;53:133-136.
12. Cook SI, Sellin JH. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12:499-507.
13. Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon . *FEMS Microbiol Lett* 2002;217:133-139.
14. Brody T. *Nutrition Biochemistry*. California:Academic Press Inc; 2004.
15. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-761.
16. 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. *J Vet Sci* 2000;1(2):121-126.
17. Coradini D, Pellizzaro C, Marimpietri D, Abolafio G, Daidone MG. Sodium butyrate modulates cell cycle-related protein in HT29 human colonic adenocarcinoma cells. *Cell Prolif* 2000;33:139-146.
18. Bardon S, Foussard V, Fournel S, Loubat A. Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. *Cancer Lett* 2002;181:187-194.
19. Neoptolemos JP, Husband D, Imray C, Rowley S, Lawson N. Arachidonic acid and docosahexaenoic acid are increased in human colorectal cancer. *Gut* 1991;32:278-281.

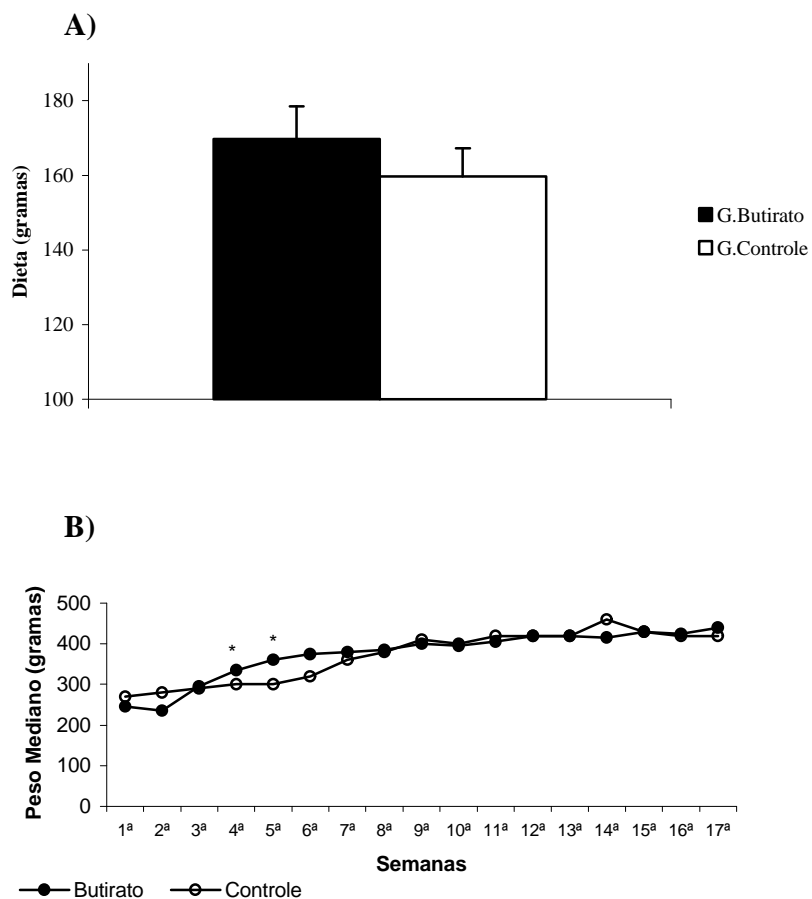
20. Hendrickse CW, Kelly RW, Radley S, Donovan IA, Keighley MRB, Neoptolemos JP. Lipid peroxidation and prostaglandins in colorectal cancer. *Br J Surg* 1994;81:1219-1223.
21. Banares-Fernandez F, Esteves M, Navarro E, Cabre E, Boix J, Abad-Lacruz A, Klaassen J, Planas R, Humbert P, Pastor C, Gassull MA. Changes of the mucosal n3 and n6 fatty acid status occur early in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Gut* 1996;38:254-259.
22. Baro L, Hermoso JC, Nunes MC, Jimenez-Rios JA, Gil A. Abnormalities in plasma and red blood cell fatty acid profiles of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998;77:1978-1983.
23. Ramos MG, Rabelo FLA, Duarte T, Gazzinelli RT, Alvarez-Leite JJ. Butyrate induces apoptosis in murine macrophages via caspase-3, but independent of autocrine synthesis of tumor necrosis factor and nitric oxide. *Braz J Biol Res* 2002;35:161-173.
24. Kovariková M, Pachernik J, Hofmanová J, Zadák Z, Kozubik A. Tnf- α modulate the differentiation induced by butyrate in the HT-29 human colon adenocarcinoma cell line. *Eur J Cancer* 2000;36:1844-1552.
25. Tabuchi Y, Arai Y, Kondo T, Takeguchi N, Asano S. Identification of genes responsive to sodium butyrate in colonic epithelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2002;293:1287-1294.
26. Rodrigues MAM, Silva LAG, Salvadori DMF, Camargo ILV, Montenegro MR. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short – and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:351-355.

27. Bird RP. Observations and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 1987;37:147-151.
28. Portugal LR, Fernandes LR, Cesar GC, Santiago HC, Oliveira DR, Silva NM, Silva AA, Lannes-Vieira J, Arantes RME, Gazzielli RT, Alvarez-Leite JI. Infection with *Toxoplasma gondii* increases atherosclerotic lesion in ApoE-deficient mice. *Infect Immun* 2004;72:3571-3576.
29. Folch J, Lees M, Staneley SP. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:409-509.
30. Hartman LGE, Lago BC. A Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract* 1973;22:475-477.
31. Perrin P, Pierre F, Patry Y, Champ M, Berreur M, Pradal G, Bornet F, Meflah K, Menanteau J. Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. *Gut* 2001;48:53-61.
32. McGarrity TJ, Peiffer LP, Colony PC. Cellular proliferation in proximal and distal raat colon during 1,2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis. *Gastroenterol* 1988;95:343-348.
33. Larangeira LLS, Taha MO, Ferme A, Lemos R, Plapler H. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no colon de ratos. *Acta Cir Bras* 1998;13(3):00-00.
34. Bird RP, Good CK. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol Lett* 2000;112(113):395-402.
35. Freeman HJ. Effect of differing concentrations of sodium butyrate on 1,2-Dimethylhydrazine-induced rat intestinal neoplasia. *Gastroenterol* 1986;91:596-602.

36. Dang J, Wang Y, Doe WF. Sodium butyrate inhibits expression of urokinase and its receptor mRNAs at both transcription and pos-transcription levels in colon cancer cells. FEBS Lett 1995;359:147-150.
37. Siavoshian S, Segan JP, Kornprobst M, Bonnet C, Cherbut C, Galmiche JP, Blottiere HM. Butyrate and trichostatin A on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells:induced of cyclin D3 and p21 expression. Gut 2000;46:507-514.
38. Douillard JY, Bennouna J, Vavasseur F, Deporte-Fety R, Thomare P, Giacalone F, Meflah K. Phase I trial of interleukin-2 and high-dose arginine butyrate in metastatic colorectal cancer. Cancer Immunol Immunother 2000;49:56-61.
39. Edelman MJ, Bauer K, Khanwani S, Tait N, Trepel J, Karp J, Nemieboka N, Chung E, Echo DV. Clinical and pharmacologic study of tributyrin: an oral butyrate prodrug. Cancer Chemother Pharmacol 2003;51:439-444.
40. Ramos MG, Alvarez-Leite JI, Bambirra EA, Nicoli JR, Vieira EC. Short chain fatty acids protect intestinal mucosa of germfree mice against cytarabine lesions. Germfree Life and its Ramifications 1996;429-433.
41. Tuleu C, Andrieux C, Cherbuy C, Darcy-vrillon B, Duée PH, Chaumeil JC. Colonic delivery of sodium butyrate via oral route: acrylic coating desing of pellets and in vivo evaluation in rats. Methods Find Exp Clin Pharmacol 2001;23(5):245-253.
42. Fleming SE, O'Donnell AU, Perman JA. Influence of frequent and long-term bean consumption on colonic function and fermentation. Am J Clin Nutr 1985; 41:909-918.
43. Institute of Medicine/ Food and Nutrition Board – Dietary Reference Intakes. Energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and aminoacids. Washington, National Academy Press, 2002.

44. Chen Z, Clark S, Birkeland M, Sung CM, Lago A, Liu R, Kirkpatrick R, Johanson K, Winkler JD, Hu E. Induction and superinduction of growth arrest and DNA damage gene 45 (GADD45) α and β messenger RNAs by histone deacetylase inhibitors trichostatin A (TSA) and butyrate in SW620 human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 2002;188:127-140.
45. Turner ND, Zhang J, Davidson LA, Lupton JR, Chapkin RS. Oncogenic ras alters sensitivity of mouse colonocytes to butyrate and fatty acid mediated growth arrest and apoptosis. *Cancer Lett* 2002;186:29-35.
46. Sasahara Y, Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Tanaka N, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppression of promoter-dependent transcriptional activity of inducible nitric oxide synthase by sodium butyrate in colon cancer cells. *Cancer Lett* 2002;177:155-161.
47. LaMonte JT, O’Gorman AT. Experimental colon cancer. *Am Gastroenterol Assoc* 1978;75:1157-1169.
48. Otori K, Sugiyama K, Fukushima S, Esumi H. Expression of the cyclin D1 gene in rat colorectal aberrant crypt foci and tumors induced by azoximethane. *Cancer Lett* 1999;140:99-104.
49. Kennedy C, Byth K, Clarke CL, deFazio A. Cell Proliferation in the normal mouse mammary gland and inhibition by phenylbutyrate. *Mol Cancer Ther* 2002;1:1025-1033.
50. Gaschott T, Wachtershauser A, Steinhilber D, Stein J. 1,25-Dihydroxycholecalciferol enhances Butyrate-induced p21^{Waf1/Cip1} expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:80-85.

51. Iacomino G, Tecce MF, Grinmaldi C, Tosto M, Russo GL. Transcriptional response of a human colon adenocarcinoma cell line to sodium butyrate. *Bioch Biophys Res Comm* 2001;285:1280-1289.
52. Neoptolemos JP, Clayton H, Heagerty AM, Nicholson MJ, Johnson B, Mason J, Manson K, James RFL, Bell PRF. Dietary fat in relation to fatty acid composition of red cells and adipose tissue in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1988;58:575-579.
53. Field CJ, Angel A, Clandinin MT. Relationship of diet to the fatty acid composition of human adipose tissue structural and stored lipids. *Am J Clin Nutr* 1985;42:1206-1220.



*Diferença estatística segundo teste t de student, $p < 0.05$

Figura 1- Consumo de dieta e evolução de peso. **A)** Consumo médio de dieta por animal por semana, durante todo período de experimento. **B)** Evolução do peso mediano dos animais do grupo controle e butirato, durante 17 semanas.

Tabela 1: Mediana do número de Focos de Criptas Aberrantes totais, com menos de três criptas, mais de três criptas e FCA totais por segmento do intestino grosso.

		1.1 Focos de Criptas Aberrantes			1.2 Total/Segmento		
Grupo	N	Total	3	>3	Proximal	Médio	Distal
Controle	9	207.0	166.0	32.0	27.0	90.0	74.0
Butirato	16	100.5	77.5	21.5	18.5	50.5	34.0
p^a		0.006	0.004	0.336	0.203	0.002	0.051

^aTeste de Mann-Whitney

Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os segmentos proximal x médio x distal.

Grupo Butirato e Controle: $p < 0.001$. Teste de Dunn's: proximal < médio, distal.

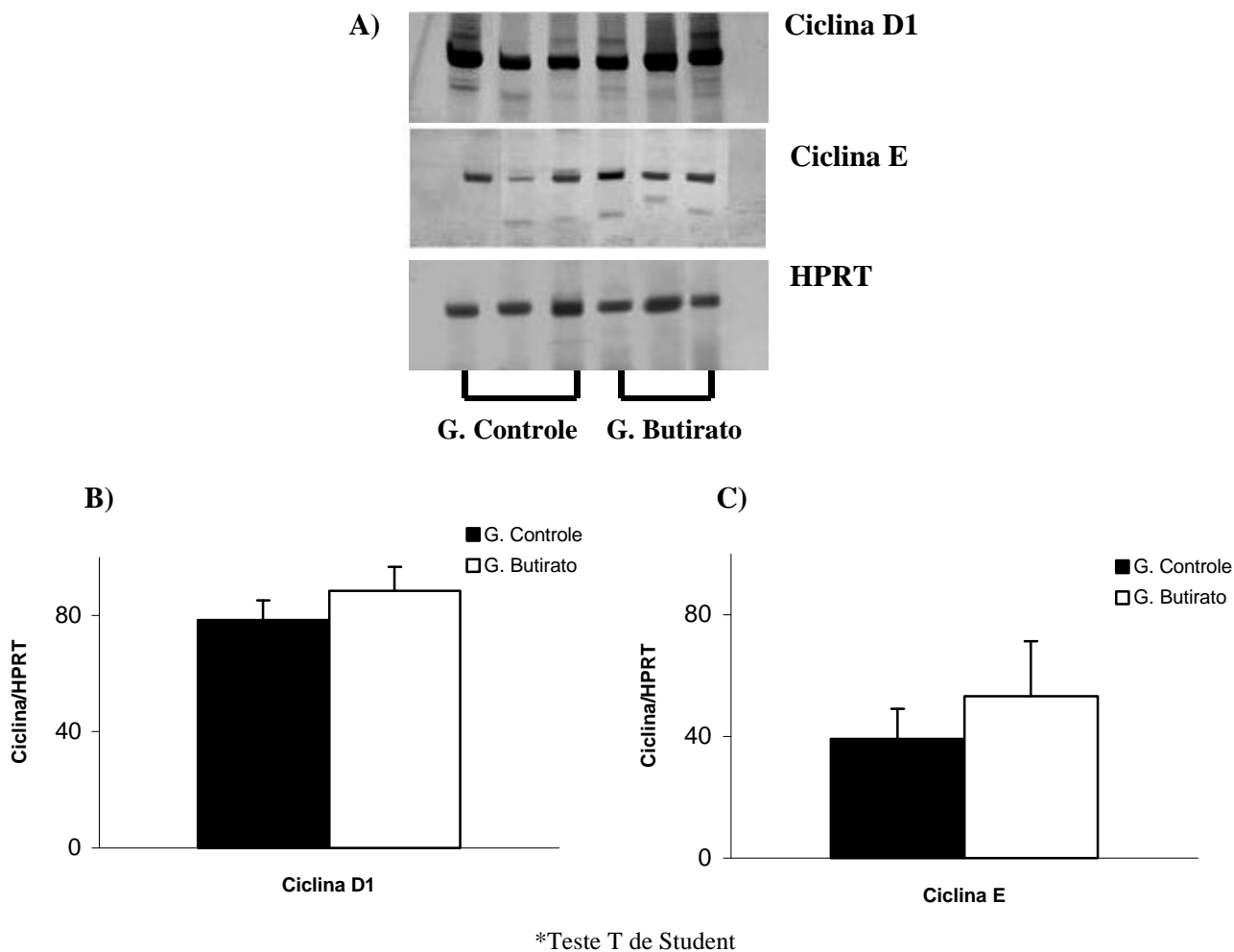


Figura 2- RT-PCR Análise e quantificação de mRNA de ciclina D1 e ciclina E, usando HPRT como controle interno em mucosa do cólon dos animais do grupo controle e butirato. **A)** Bandas de RNAm de ciclina D1, E e HPRT, reveladas em gel de poliacrilamida 6%. **B)** Quantificação da expressão de RNAm de ciclina D1. **C)** Quantificação da expressão de mRNA ciclina E.

Tabela 2: Perfil dos principais ácidos graxos da gordura intrabdominal dos animais do grupo controle e butirato.

Ácido Graxo	Grupo Controle	Grupo Butirato	Valor de p*
	(%)	(%)	
C16 Palmítico	30.27	23.59	0.064
C18 Esteárico	4.4	3.52	0.009
C18:1 Oléico	44.58	34.16	0.001
C18:2 Linoléico	14.44	29.71	0.013

Mediana dos valores

*Teste de Man Whitney

Tabela 3: Perfil dos principais ácidos graxos do tecido hepático dos animais do grupo controle e butirato.

Ácido Graxo	Grupo Controle (%)	Grupo Butirato (%)	Valor de p*
C16 Palmítico	16.98	19.3	0.171
C18 Esteárico	13.42	14.8	0.210
C18:1 Oléico	12.12	10.69	0.162
C18:2 Linoléico	20.68	20.93	0.560
C18:3 Linolênico	0.81	0.77	0.589
C20:4 Araquidônico	24.24	24.74	0.546
C20:6 DHA	10.36	8.17	0.039

Mediana dos valores

* Teste de Man Whitney