

VIVIANA TEIXEIRA HENRIQUES

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE DIETA COM ÔMEGA-3 NA  
CARCINOGENESE COLORRETAL INDUZIDA POR  
DIMETILHIDRAZINA EM RATOS WISTAR**

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**  
**2004**

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

T

H519e  
2004

Henriques, Viviana Teixeira, 1974-

Efeitos da suplementação de dieta com ômega-3 na carcinogênese colorretal induzida por dimetilhidrazina em ratos wistar / Viviana Teixeira Henriques. – Viçosa : UFV, 2004.

xv, 99f. : il. ; 29cm.

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

Referências bibliográficas: f. 86-99

1. Ácidos graxos ômega-3. 2. Suplementos dietéticos.  
3. Carcinogênese - Desenvolvimento - Efeito de ômega-3.  
4. Carcinogênese - Prevenção. 5. Carcinogênese - Tratamento. 6. Fígado - Teor de lipídios. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 641.14

VIVIANA TEIXEIRA HENRIQUES

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE DIETA COM ÔMEGA-3 NA  
CARCINOGENESE COLORRETAL INDUZIDA POR  
DIMETILHIDRAZINA EM RATOS WISTAR**

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 26 de março de 2004

---

Profa. Cristina Maria Ganns Chaves Dias  
(Conselheira)

---

Profa. Sylvia do Carmo Castro Franceschini  
(Conselheira)

---

Profa. Neuza Maria Brunoro Costa

---

Profa. Jacqueline Isaura Alvarez Leite

---

Profa. Maria do Carmo Gouveia Peluzio  
(Orientadora)

## **Agradecimentos**

“O mais amplo do mundo, o conhecimento, o reconhecimento, a alegria deixada por um presente, como um suavíssimo cometa, tudo isso e muito mais cabem na extensão de uma palavra. Quando se diz obrigado, se dizem muitas coisas mais, que vem de muito longe e de muito perto, de tão longe como a origem do indivíduo humano, de tão perto como secreto pulsar do coração”.

*Pablo Neruda*

Agradeço a Deus que em tudo pode e me fortalece.

À minha família, em especial a minha mãe pelo amor sempre presente e a confiança ilimitada que sempre me fez acreditar que para conquistar algo era só dar o primeiro passo.

À Cida pelas orações e pelo carinho.

À professora Maria do Carmo pelo apoio em minha vida de pesquisadora, pelas experiências adquiridas e amizade.

À professora Cristina pelos ensinamentos e auxílios prestados com dedicação e carinho.

À professora Sylvia “por tudo”.

À professora Céphora, pelas contribuições muito importantes neste trabalho.

Às professoras Neuza e Jacqueline por fazerem parte da banca.

Aos colegas do mestrado, em especial a Maria Célia pela força e amizade compartilhadas ao longo dessa trajetória. A Sandra e a Ivi, as quais agradeço as hospedagens, momentos de descontração e a conquista da amizade que sempre levarei comigo.

Aos alunos da graduação que auxiliaram. A Carina, pela convivência nos finais de semana e feriados no laboratório e pela carinhosa amizade.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde. A Solange. Ao Sr. Adão pelo carinho.

## CONTEÚDO

<b>Lista de Figuras</b>	vii
<b>Lista de Tabelas</b>	ix
<b>Lista de siglas</b>	xi
<b>RESUMO</b>	xii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b>1 Introdução</b>	<b>01</b>
<b>2 Revisão Bibliográfica</b>	<b>04</b>
2.1 Câncer colorretal	04
2.1.1 Cólon e Reto	04
2.1.2 Fases da carcinogênese	05
2.1.3 Genes envolvidos na carcinogênese	05
2.1.4 Incidência e mortalidade	08
2.1.5 Fatores de risco	11
2.1.6 Focos de criptas aberrantes (FCA)	12
2.2 Ácidos graxos ômega-3	16
2.2.1 Definição	16
2.2.2 Nomenclatura	17
2.2.3 Síntese dos ácidos graxos	18
2.2.4 Principais fontes dietéticas	19
2.2.5 Consumo dietético	20
2.2.6 Relação ômega-3:ômega-6 no consumo dietético humano	21
2.2.7 Principais localizações no organismo humano	23
2.3 Metabolismo dos ácidos graxos PUFAs e suas relações com a carcinogênese colorretal	23

2.4 Estudos em animais relacionando câncer coloretal e PUFA	28
<b>3 Objetivos</b>	<b>30</b>
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos	30
<b>4 Materiais e Métodos</b>	<b>31</b>
4.1 Animais	31
4.2 Dietas	31
4.3 Modo de preparo e aplicação da 1,2-dimetilhidrazina	33
4.4 Procedimento experimental	34
4.5 Realização dos sacrifícios	34
4.6 Consumo dietético e peso dos animais	35
4.7 Remoção do intestino grosso	35
4.8 Análises microscópicas	36
4.9 Extração dos lipídios	38
4.10 Saponificação e esterificação dos lipídios	39
4.11 Análise dos ácidos graxos	40
4.12 Análise estatística	40
<b>5 Resultados</b>	<b>42</b>
5.1 Peso dos animais	42
5.2 Ganho de peso	43
5.3 Consumo de dietas	44
5.4 Coeficiente de eficácia alimentar	45
5.5 Focos de criptas aberrantes (FCA)	46
5.5.1 Número de focos de criptas aberrantes	46
5.5.2 Porcentagem de redução dos focos de criptas aberrantes	49
5.5.3 Categorização das criptas aberrantes	50
5.5.4 Porcentagem de redução dos focos com mais de 3 criptas aberrantes	52
5.5.5 Distribuição do número de FCA	53
5.6 Perfil dos ácidos graxos	55
5.6.1 Perfil dos ácidos graxos dos tecidos hepáticos do grupo controle e ômega-3 na 6 <sup>a</sup> , 13 <sup>a</sup> e 30 <sup>a</sup> semanas	55

5.6.2 Perfil dos ácidos graxos das gorduras viscerais do grupo controle e ômega-3 na 6 <sup>a</sup> , 13 <sup>a</sup> e 30 <sup>a</sup> semanas	60
5.6.3 Perfil dos ácidos graxos dos tecidos hepáticos e das gorduras viscerais do grupo controle na 6 <sup>a</sup> , 13 <sup>a</sup> e 30 <sup>a</sup> semanas	64
5.6.4 Perfil dos ácidos graxos dos tecidos hepáticos e das gorduras viscerais do grupo ômega-3 na 6 <sup>a</sup> , 13 <sup>a</sup> e 30 <sup>a</sup> semanas	64
<b>6 Discussão</b>	<b>67</b>
<b>7 Conclusões</b>	<b>84</b>
<b>8 Referências Bibliográficas</b>	<b>86</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Representação da progressão da carcinogênese de cólon, apontando mutações e alterações genéticas em diferentes etapas	<b>07</b>
<b>Figura 2</b> - Representação do esqueleto carbônico do ácido linolênico	<b>17</b>
<b>Figura 3</b> - Esquema da síntese dos ácidos graxos a partir do palmitato	<b>19</b>
<b>Figura 4</b> – Esquema do metabolismo dos ácidos graxos PUFAs e caminhos pelos quais sugere-se possível ação sobre a carcinogênese	<b>27</b>
<b>Figura 5</b> - Intestino grosso, após remoção, abertos pela margem contra mesentérica, fixados em solução tamponada de formol a 10%	<b>36</b>
<b>Figura 6</b> - Evolução do peso dos animais	<b>42</b>
<b>Figura 7</b> – Ganho de peso dos animais	<b>43</b>
<b>Figura 8</b> - Evolução do consumo alimentar	<b>44</b>
<b>Figura 9</b> – Coeficiente de eficiência alimentar	<b>45</b>
<b>Figura 10</b> - FCA no intestino grosso de ratos Wistar, submetidos ao tratamento com DMH. a) Área de mucosa colônica normal (+) e presença de seis FCA: um com duas criptas, dois com três criptas, um com quatro criptas, um com cinco e um com nove criptas aberrantes localizados no centro da figura (40 X); b) FCA com 4 criptas aberrantes (100 X); c) FCA um com 4 criptas e um com 2 criptas (100 X); d) FCA com 4 criptas (100X); e) FCA um com 3 criptas e um com 8 criptas (100X); f) FCA com 10 criptas ao centro e um com duas criptas à direita do campo (100X). Azul de metileno.	<b>46</b>
<b>Figura 11:</b> Porcentagem de redução dos FCA, do grupo ômega-3 em relação ao controle com 6,13 e 30 semanas de intervenção dietética.	<b>49</b>

**Figura 12:** Porcentagem de redução dos FCA > 3 do grupo ômega-3 em relação ao controle com 6,13 e 30 semanas de intervenção dietética. **52**

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1</b> - Composição da dieta experimental (g/100g)	<b>32</b>
<b>Tabela 2</b> - Perfil dos ácidos graxos (%) da cápsula de óleo de peixe	<b>33</b>
<b>Tabela 3</b> - Contagem dos FCA pelos observadores	<b>38</b>
<b>Tabela 4</b> - Número de focos de criptas aberrantes (FCA)	<b>48</b>
<b>Tabela 5</b> - Número de focos de criptas aberrantes $\leq 3$	<b>50</b>
<b>Tabela 6</b> - Número de focos de criptas aberrantes $> 3$	<b>51</b>
<b>Tabela 7</b> - Número de FCA/região – grupo controle	<b>53</b>
<b>Tabela 8</b> - Número de FCA/região – grupo ômega-3	<b>54</b>
<b>Tabela 9</b> - Mediana do número de FCA/região – grupos controle e ômega-3	<b>54</b>
<b>Tabela 10</b> - Perfil dos ácidos graxos da dieta controle e da dieta suplementada com ômega-3	<b>56</b>
<b>Tabela 11</b> - Comparação entre o perfil dos ácidos graxos dos tecidos hepáticos do grupo controle na 6 <sup>a</sup> , 13 <sup>a</sup> e 30 <sup>a</sup> semanas	<b>57</b>
<b>Tabela 12</b> - Comparação entre o perfil dos ácidos graxos dos tecidos hepáticos do grupo ômega-3 na 6 <sup>a</sup> , 13 <sup>a</sup> e 30 <sup>a</sup> semanas	<b>58</b>
<b>Tabela 13</b> - Comparações do perfil lipídico dos ácidos graxos do tecido hepático entre os grupos controles (CT) e ômega-3 ( $\omega$ -3) na 6 <sup>a</sup> , 13 <sup>a</sup> e 30 <sup>a</sup> semanas	<b>59</b>

**Tabela 14** - Comparação entre o perfil dos ácidos graxos das gorduras viscerais do grupo controle na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas **61**

**Tabela 15** - Comparação entre o perfil dos ácidos graxos das gorduras viscerais do grupo ômega-3 na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas **62**

**Tabela 16** - Comparações do perfil lipídico dos ácidos graxos da gordura visceral entre os grupos controles (CT) e ômega-3 ( $\omega$ -3) na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas **63**

**Tabela 17** - Comparações do perfil lipídico dos ácidos graxos do tecido hepático (FIG) e da gordura visceral (GV) do grupo controle na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas **65**

**Tabela 18** - Comparações do perfil lipídico dos ácidos graxos do tecido hepático (FIG) e da gordura visceral (GV) do grupo ômega-3 na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas **66**

## **Lista de Siglas**

AOM – Azometilhidrazina

CEA – Coeficiente de eficácia alimentar

COX – Cicloxigenases

CT – Grupo controle

DHA – Ácido docosahexaenóico

DMH – Dimetilhidrazina

DP – Desvio padrão

EPA – Ácido eicosapentaenóico

FAP – Síndrome genética adenomatosa polipóide familiar

FAP – Fatores de ativação plaquetária

FCA – Focos de criptas aberrantes

FIG – Tecido hepático

GV – Gordura visceral

HNPPC – Câncer coloretal não polipóide hereditário

MHC – Molécula do complexo de histocompatibilidade principal

PBS – Solução tampão fosfato

PGE - Prostaglandinas

PUFAs – Ácidos graxos polinsaturados

$\omega$ -3 – Grupo ômega-3

## RESUMO

HENRIQUES, Viviana Teixeira, M. S. Universidade Federal de Viçosa, Março de 2004. **Efeitos da suplementação de dieta com ômega-3 na carcinogênese colorretal induzida por dimetilhidrazina em ratos Wistar.** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Conselheiras: Cristina Maria Ganns Chaves Dias e Sylvia do Carmo Castro Franceschini.

O estudo de nutrientes dietéticos tem sido cada vez mais necessário para o entendimento do seu papel nas doenças crônicas degenerativas não transmissíveis. Entre estas se encontra o câncer, sendo o câncer colorretal, um dos tipos mais comuns em todo o mundo, contribuindo significativamente para morbidade e mortalidade. O estudo do papel dos lipídios na etiologia e prevenção da carcinogênese colorretal tem sido um grande desafio nos últimos anos. Evidências experimentais sugerem a possibilidade dos ácidos graxos polinsaturados ômega-3 terem um papel preventivo na carcinogênese colorretal. Os efeitos dos ácidos graxos ômega-3 podem ser pesquisados através dos focos de criptas aberrantes (FCA), lesões pré-neoplásicas, que podem sofrer remodelação, inibição do crescimento, regressão ou eliminação quando tratadas por agentes específicos. O desenvolvimento da carcinogênese colorretal, através dos FCA, induzidos pela administração de quatro injeções subcutâneas da DMH, na dose de 40mg/Kg de peso, foi avaliado em ratos Wistar, machos, adultos, que receberam dieta AIN-93M suplementada com ácido graxo ômega-3 (10g/100g de dieta), sendo comparados a animais controle que tiveram o mesmo tratamento e consumiram dieta AIN-93M. O peso e o consumo dietético dos animais foram monitorados semanalmente. Os ratos foram sacrificados em diferentes períodos de intervenção dietética, sendo estes 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas. O intestino grosso dos animais foi retirado para quantificação, caracterização da distribuição e categorização dos FCA em  $\leq$  ou  $>$  que 3 criptas aberrantes. O fígado e a gordura visceral foram retirados para análise do perfil dos ácidos graxos. O peso dos animais do grupo ômega-3 apresentou-se menor ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle em diversas semanas experimentais, sendo verificado maior consumo de dieta pelo grupo

controle. Foram encontrados FCA nos dois grupos, sendo observada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) somente na 30ª semana, na qual foi visualizada uma porcentagem de redução de FCA de 55,34% e de FCA > 3 de 57,14% no grupo ômega-3, em relação ao grupo controle. O maior número de FCA foi notado na região medial, seguido da região distal. Em relação ao perfil lipídico dos ácidos graxos, foram observadas baixas concentrações de EPA e DHA na gordura visceral dos animais ômega-3, com 30 semanas experimentais e uma alta conversão do ácido EPA a DHA no tecido hepático desses animais. Estes resultados nos sugerem que o ômega-3 poderá atuar na diminuição da evolução na fase de promoção da carcinogênese colorretal, prevenindo o seu desenvolvimento.

## ABSTRACT

HENRIQUES, Viviana Teixeira, M. S. Universidade Federal de Viçosa, Março de 2004. **Effects of diet supplementation with omega-3 on dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in wistar rats.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Committee members: Cristina Maria Ganns Chaves Dias and Sylvia do Carmo Castro Franceschini.

It has been increasingly necessary to study diet nutrients so as to understand their role in non-transmissible degenerative chronic diseases such as malignancies. Among the latter, colorectal cancer is one of the most common types worldwide, with significant morbidity and mortality. The role of lipids in the etiology and prevention of colorectal cancer has been a great challenge in recent years. Experimental evidence suggests that omega-3 polyunsaturated fatty acids might have a preventive role in colorectal carcinogenesis. The effects of omega-3 fatty acids may be studied through the analysis of aberrant crypt foci (ACF), premalignant lesions amenable to remodelling, growth inhibition, regression, or elimination when treated with specific agents. The development of colorectal carcinogenesis, through dimethylhydrazine-induced ACF (40mg/Kg weight, 4 subcutaneous doses), was studied in male adult Wistar rats receiving omega-3 fatty acid (10g/100g diet) supplemented AIN-93M diet, with similarly treated animals receiving AIN-93M diet as controls. Weight and diet intake were monitored every week. The rats were sacrificed after 6, 13, and 30 weeks. The large bowel was removed for ACF quantification, distribution description, and classification according to the number of aberrant crypts (3 or fewer, and more than 3). The liver and visceral fat were removed for analysis of fatty acid profile. The animals in the omega-3 group weighed less ( $p < 0.05$ ) than controls at several weeks, the latter having had greater diet intake. ACF were found in both groups, statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) being noticed only after 30 weeks, with a 55.34% reduction of ACF and a 57.14% reduction of ACF > 3 in the omega-3 group compared with controls. The greatest number of ACF was in the medial region, followed by the distal one. As for the fatty acid lipid profile, low EPA and DHA concentrations were noticed in the visceral fat of omega-3 animals after 30 weeks, with a high

EPA to DHA conversion rate in the liver tissue of these animals. These results suggest that omega-3 may prevent colorectal carcinogenesis by reducing evolution of the promotion phase.

## 1 Introdução

Acompanhando a transição epidemiológica, a frequência de doenças infecciosas diminuiu ao longo dos anos, dando lugar às doenças crônicas degenerativas não transmissíveis. Entre essas, encontra-se o câncer, que figura como a segunda causa de morte no mundo ocidental.

O câncer colorretal é um dos tipos mais frequentes de câncer, e vem contribuindo significativamente para a morbidade e a mortalidade (HUR *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2002).

A transição nutricional vem ocorrendo ao longo dos séculos, com mudanças nos padrões alimentares das populações, relacionadas a fatores econômicos como a industrialização, fatores sociais, demográficos e de saúde. Atualmente há uma tendência em quase todo o mundo, ao consumo de uma dieta rica em gorduras, particularmente as de origem animal e em carboidratos simples, denominada “dieta ocidental”. Os hábitos alimentares têm grande correlação com as doenças crônicas degenerativas não transmissíveis.

Entre os hábitos dietéticos atuais, a quantidade elevada de gordura na dieta tem sido associada a grande incidência de câncer colorretal.

Nos países industrializados, onde as transições epidemiológicas e nutricionais já se encontram estabelecidas, há estimativa de que a maioria dos casos de câncer de cólon esteja associados à dieta ocidental (ROYNETTE *et al.*, 2004).

No entanto, o papel das gorduras na carcinogênese colorretal, depende não somente da quantidade da mesma, mas também do tipo de gordura consumida. A composição dos ácidos graxos dos lipídios da dieta parece ser um dos fatores determinantes na promoção do câncer colorretal (DOMMELS *et al.*, 2002).

Os efeitos causados pelos lipídeos da dieta, nas doenças crônicas e entre essas na carcinogênese colorretal têm sido alvo de grande interesse, durante os últimos anos.

Em 1950, estudos demonstraram o efeito do óleo de peixe, rico em ácidos graxos polinsaturados da família ômega-3, na redução do colesterol sérico (AHRENS *et al.*, 1954).

Houve um grande avanço das pesquisas na década de 80, relacionando os ácidos graxos polinsaturados, particularmente o ômega-3, no papel de prevenção e tratamento de doenças, como cardiopatias, artrites, hipertensão, câncer e estados inflamatórios (TEITELBAUM e WALKER, 2000).

Durante a última década, vários estudos, tanto epidemiológicos quanto experimentais, foram conduzidos com o objetivo de avaliar a relação existente entre os ácidos ômega-3 e a carcinogênese colorretal, concluindo-se que a alta ingestão dos mesmos exerce efeitos protetores contra a doença (REDDY, 1994; GOOD *et al.*, 1998; ROSE e CONNOLLY, 1999; PETRIK *et al.*, 2000; DOMMELS *et al.*, 2002).

Os agentes preventivos ou de tratamento da carcinogênese irão atuar na regressão, inibição ou eliminação de lesões pré-neoplásicas, quando estas já estiverem formadas, resultando na diminuição da incidência de câncer (BIRD e GOOD, 2000).

Componentes da dieta agem como agentes preventivos podendo atuar distintamente nas várias fases de evolução da carcinogênese colorretal.

Com o objetivo de que sejam estabelecidos métodos de prevenção e tratamento para o câncer colorretal em humanos, faz-se necessária a realização de trabalhos experimentais, buscando entender o mecanismo da carcinogênese, uma vez que o desenvolvimento do câncer colorretal envolve vários processos de alterações patológicas, evoluindo, desde lesões

microscópicas discretas da mucosa, denominadas focos de criptas aberrantes (FCA), a tumores malignos (RODRIGUES *et al.*, 2002).

## **2 Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Câncer Colorretal**

#### **2.1.1 Cólon e Reto**

O cólon e o reto são constituintes do intestino grosso. O cólon é responsável pela absorção de água e eletrólitos (aproximadamente 1400 mL por dia) e pela compactação e eliminação das fezes (100 mL por dia). Constitui a maior parte do intestino grosso e é dividido em partes denominadas: cólon ascendente, transverso, descendente e sigmóide. A superfície mucosa do trato gastrointestinal é revestida por células absorptivas e dá origem as criptas de Lieberkühn por invaginação. À microscopia óptica, observa-se a presença das criptas de Lieberkühn em toda a mucosa do intestino grosso. Essas glândulas são largas e caracterizadas pela grande presença de células caliciformes e pequena quantidade de células enteroendócrinas. A renovação celular das criptas ocorre pela divisão das células localizadas na parte basal. As células migram e dão origem aos vários tipos celulares presentes nas glândulas por um processo de diferenciação progressiva (ROSS, 1993; GARTNER e HIATT, 1997).

O reto possui histologia bem semelhante a do cólon, sendo que suas criptas de Lieberkühn são menos numerosas, em unidade de área, e são mais profundas (GARTNER e HIATT, 1997).

Devido à semelhança anatômica e fisiológica existente entre o cólon e o reto é difícil distinguir em que região a carcinogênese surge. Com isto o câncer presente nestes segmentos é freqüentemente chamado “câncer colorretal” (SCHARTKIN, 2003).

### **2.1.2 Fases da carcinogênese**

O processo de carcinogênese envolve vários eventos que ocorrem nos níveis molecular, celular e morfológico e pode ser dividido em três estágios principais:

**Iniciação:** envolve transformação do DNA celular, resultando em mutações de genes relacionados à multiplicação e à sobrevivência da célula; é caracterizada por mudanças genotípicas, acompanhadas ou não de alterações morfológicas.

**Promoção:** envolve expansão clonal das células iniciadas, sendo caracterizada por alterações morfológicas e/ou mudanças fenotípicas;

**Progressão:** envolve mudanças genotípicas e fenotípicas, associadas com as características de malignidade e o desenvolvimento de metástases (BIRD, 1995).

### **2.1.3 Genes envolvidos na carcinogênese**

A manutenção do corpo humano envolve a divisão celular contínua, com o objetivo de renovar as células envelhecidas, o tecido danificado e desenvolver respostas imunes contra patógenos invasores (PARHAM, 2001).

Um processo continuado de proliferação celular regulado é balanceado pela morte celular e mantém a homeostase do tecido normal.

Uma célula cancerosa desenvolve-se a partir de alterações nos processos de regulação da proliferação celular ou da morte celular (PARHAM, 2001).

Várias mutações, alterações do DNA celular, devem ocorrer nos genes relacionados ao controle da multiplicação e da sobrevivência celulares durante o processo de carcinogênese (GOLDSBY *et al*, 2000).

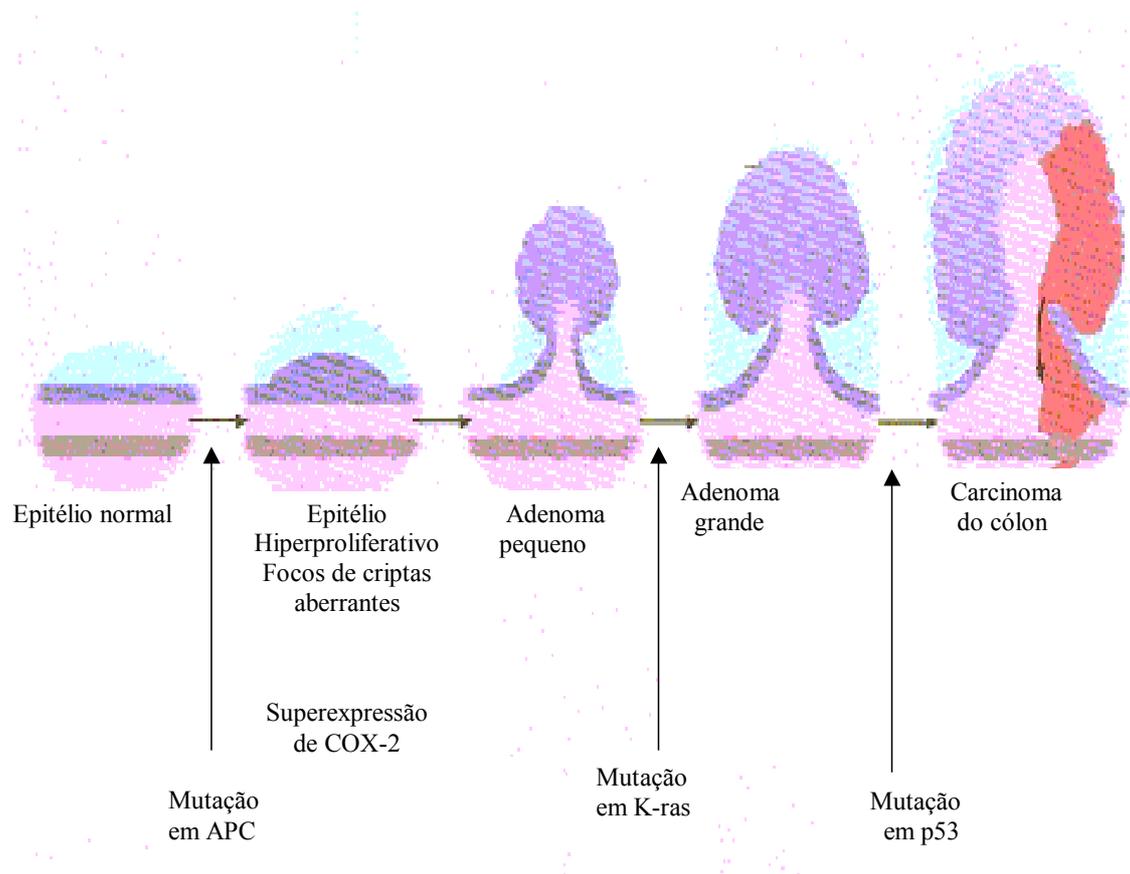
Os genes mutados com alterações na sua expressão que podem estar envolvidos na transformação maligna da célula são:

- Os oncogenes, que correspondem às formas mutadas dos pró-oncogenes, envolvidos na regulação de divisão celular, na codificação de fatores de crescimento, de receptores de fatores de crescimento, de proteínas envolvidas na transdução de sinais e na regulação da transcrição gênica (KUMAR *et al.*, 1992; GOLDSBY *et al.*, 2000; PARHAM, 2001).

- Os genes supressores de tumores, os quais codificam proteínas que inibem a proliferação celular. A mutação genética mais comum nesse tipo de gene é a do p53, que é responsável por codificar uma proteína nuclear. Há relatos de que mais de 50% dos casos de câncer de cólon estão associados a mutações do gene p53. O gen bcl-2 é também supressor da apoptose celular, estes se encontram envolvidos na regulação da morte celular programada (KUMAR *et al.*, 1992; GOLDSBY *et al.*, 2000; PARHAM, 2001).

Para que uma célula se torne cancerosa é estimado que ela acumule pelo menos cinco ou seis mutações independentes (PARHAM, 2001).

Na figura 1 encontra-se um esquema da progressão da carcinogênese do câncer de cólon, demonstrando diferentes etapas e mutações.



**Figura 1** – Representa o da progressão da carcinogênese de cólon, apontando mutações e alterações genéticas em diferentes etapas

APC- gene supressor de tumor

K-ras – oncogene

p53- gene supressor de tumor

COX-2- cicloxigenase de classe 2

**Fonte:** WAITZBERG, 2003

#### **2.1.4 Incidência e mortalidade**

O câncer colorretal é responsável por aproximadamente 150.000 mortes a cada ano e vem mostrando um aumento anual de 3 a 7% em sua incidência mundial (ROYNETTE *et al.*, 2004).

Em 1996, foram estimados 875.000 novos casos de câncer colorretal diagnosticados mundialmente, representando 8,5% dos cânceres incidentes (WALLACE e CASLAKE, 2001).

Aproximadamente 20.000 novos casos foram diagnosticados no Brasil e há uma estimativa de que 6.000 brasileiros morreram devido ao câncer colorretal no ano de 1998 (ALMEIDA *et al.*, 2000).

FILHO e MONCAU (2002) analisaram a mortalidade causada por câncer no período de 1980-1995. Durante toda a década de 80 as taxas mantiveram-se estáveis, mas entre 1989 e 1995, ocorreu um aumento de 14,5% na mortalidade entre os homens e 10,2% entre as mulheres.

Para o ano de 2001, foram estimados 16.000 novos casos, com 9.600 óbitos e para 2002, 18.970 novos casos com 7.630 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE – SIM, 2003). Ao dividirem estas taxas de acordo com o sexo, não são observadas grandes diferenças, sendo 9.170 novos casos e 3.535 óbitos estimados entre os homens e 9.800 novos casos e 4.095 óbitos entre as mulheres.

O Brasil é dividido em cinco regiões com características físicas, econômicas e sociais distintas, havendo discrepâncias que são observadas com relação à expectativa de vida, exposição a fatores de risco e acesso a serviços de saúde. Com isso, os principais tipos de cânceres encontram-se distribuídos de forma desigual entre as regiões brasileiras (KLIGERMAN, 2000; FILHO e MONCAU, 2002).

Segundo dados obtidos pelo Sistema de Informação sobre Mortalidade, do Ministério da Saúde de 2003, houve grande diferença entre as regiões

brasileiras com relação às estimativas de incidência e mortalidade por câncer colorretal para o ano de 2002, sendo a maior incidência na região Sudeste com 12.830 novos casos e 4.710 óbitos. A região Sul aparece em segundo lugar com 3.140 novos casos e 1.710 óbitos, vindo após o Nordeste com 1.460 casos incidentes e 680 óbitos, Centro Oeste com 1.310 casos incidentes e 360 óbitos e por último a região Norte com 230 novos casos e 170 óbitos.

Nos Estados Unidos e na Europa, são diagnosticados entre 130.000 a 180.000 novos casos, respectivamente, todos os anos (WALLACE e CASLAKE, 2001).

Ao verificar as prevalências de câncer colorretal em 3 períodos distintos e progressivos nos Estados Unidos, nota-se um aumento percentual da doença ao longo do tempo. De 1974 a 1976 foi encontrado que 50% dos casos de câncer nos Estados Unidos corresponderam ao colorretal, de 1983 a 1985 este valor foi de 57%, aumentando ainda para 62% entre 1992 a 1999 (SOCIEDADE AMERICANA DO CÂNCER; 2004).

A probabilidade de desenvolver câncer, prevista entre 1998 a 2000 nos Estados Unidos foi de 1 para cada 17 homens e 1 para cada 18 mulheres (SOCIEDADE AMERICANA DO CÂNCER, 2004).

Correspondente ao ano de 2003, a mesma Sociedade estimou 147.300 novos casos e 571.00 óbitos, sendo que para 2004 a estimativa da incidência é de 150.482 casos, com 56.370 óbitos. Na última estimativa, 76.951 novos casos são previstos para o sexo masculino e 73.531 para o feminino.

Ainda ocorrem diferenças entre as raças na população americana, sendo esta de 10% entre os americanos brancos (63%) e americanos africanos (53%) (SOCIEDADE AMERICANA DO CÂNCER, 2004).

Na França a incidência fica em torno de 33.400 novos casos a cada ano (ANDRIEU *et al.*, 2003).

Em Portugal, que durante os últimos 25 anos vem passando por reestruturação econômica e mudanças sociais, com maior urbanização, a qual tem interferência na qualidade de vida; como aumento no consumo de bebidas e alimentos que podem ser fatores de risco que atuam elevando a incidência de câncer, o câncer colorretal aumentou em 3,3% no período de 1988 a 1998, sendo que no ano de 2000 foi o tipo mais comum entre os homens, com uma incidência de 3.173 casos e o segundo entre as mulheres, com 2.541 casos novos (PINHEIRO, 2003).

No Japão, desde a Segunda Guerra Mundial, a incidência de câncer colorretal vem aumentando progressivamente (KOYAMA e KOTAKE, 1997).

Dados registrados pela Sociedade Japonesa de Câncer Colorretal demonstram que um total de 77.520 pacientes, 40.528 possuíam câncer de cólon e 36.992 câncer de reto, sendo estes registrados num período de 20 anos (1973-1993). A relação entre o câncer de cólon e câncer de reto foi alta em todos os períodos estudados, para ambos os sexos, sendo que os dois apresentaram-se mais prevalentes nos homens do que nas mulheres (MUTO *et al.*, 2001).

Em 1999, o câncer de cólon foi responsável por 23.245 mortes no Japão e o câncer de reto por 11.836 óbitos (KITAGAWA *et al.*, 1999).

Neste mesmo país, estimativas do número de pacientes com câncer existem até o ano de 2015, sendo que os cânceres de cólon e reto aumentam ao longo dos anos, estimando-se 77.850 casos de câncer de cólon e 38.147 de reto entre os homens, e 58.544 de cólon e 19.151 de reto entre as mulheres (KITAGAWA *et al.*, 1999).

Na Índia, é observada a menor proporção de incidência de câncer colorretal, sendo de 1 a 3 casos a cada 100.000 pessoas (POTTER, 1995).

### 2.1.5 Fatores de risco

O câncer colorretal possui etiologia complexa, que envolve fatores genéticos e ambientais (ROYNETTE, 2004).

Poucos casos de câncer de cólon (menos que 5%) são devido à síndrome genética polipóide adenomatosa familiar (FAP) e a câncer colorretal não polipóide hereditário (HNPCC) (ANDRIEU *et al.*, 2003).

A alteração associada a FAP localiza-se no gen APC, mapeado do cromossomo 5q. Constitui uma síndrome genética rara que se desenvolve precocemente em crianças, e é caracterizada por múltiplos adenomas e de poucos a vários pólipos. Desenvolve câncer colorretal em 100% dos casos (POTTER, 1995).

WALLACE e CASLAKE (2001) relataram que aproximadamente 25% dos casos estão relacionados a fatores hereditários e 75% relacionados a outros fatores de risco, como fumo, obesidade, sedentarismo, envelhecimento e hábitos dietéticos. Já ROYNETTE *et al.* (2004) relataram que em 50 a 80% dos casos de desenvolvimento de câncer colorretal estão envolvidos fatores ambientais e entre esses a dieta é o principal fator envolvido.

Entre os hábitos dietéticos vários estudos têm sido realizados com diversos componentes da dieta. Estes estudos têm observado que a baixa ingestão de alimentos ricos em fibras e a alta ingestão em alimentos ricos em gorduras podem aumentar o risco de câncer colorretal.

A fibra como agente preventivo do câncer colorretal foi primeiramente estudada por BURKITT (1969), que observou que os africanos, por consumirem dieta rica em fibras, possuíam baixa incidência de câncer colorretal.

No Japão, o aumento no consumo de gordura de aproximadamente 10% para 25% do valor energético total (VET) da dieta entre 1955 e 1985,

provavelmente contribui para um aumento de 130% nas mortes por câncer de cólon (WILLET 1989; CHENG *et al.*, 2002).

Os valores no consumo de lipídios no Japão sofreram um aumento progressivo ao longo das décadas, sendo que em 1980 correspondia a 23,6% do VET, em 1990 a 25,3% do VET e a 26,5% VET, em 1999 (NATIONAL NUTRITION SURVEY – MINISTRY OF HEALTH, LABOUR e WELFARE, 2004).

Entre os americanos acima de 60 anos de idade, a incidência de câncer de cólon é quatro vezes maior em comparação aos que possuem idade entre 40 e 60 anos (MAGNUSON *et al.*, 2000).

Um estudo desenvolvido pelo Harvard Center for Cancer Prevention (1999), demonstrou, que o consumo de carne vermelha e a obesidade determinaram um risco relativo de 1,5 vezes na incidência do câncer colorretal (PINHO *et al.*, 2003).

Vários estudos empregando modelos animais tem verificado forte correlação entre o consumo de gordura da dieta e o câncer colorretal. Esses estudos têm demonstrado valor inestimável para testar e comprovar hipóteses de correlação entre a dieta e o desenvolvimento de câncer colorretal (GOOD *et al.*, 1998; BIRD e GOOD, 2000).

#### **2.1.6 Focos de criptas aberrantes (FCA)**

Os FCA foram primeiramente observados por BIRD (1987) em cólon de roedores tratados com carcinógenos. As criptas modificadas, denominadas criptas aberrantes, somente foram demonstradas em roedores tratados com agentes químicos que promoviam a carcinogênese.

Os FCA são lesões da mucosa colônica que exibem alterações morfológicas como displasia, proliferação anormal e mutações de oncogenes

envolvidos na indução do câncer de cólon, distinguindo as mesmas das criptas normais (JEN *et al.*, 1994; PASSANI *et al.*, 1998; BIRD e GOOD, 2000).

Cada FCA evolui de uma cripta alterada e podem ser observados, quantificados microscopicamente, após serem corados com azul de metileno. O resultado da contagem dos FCA é tido como indicador da carcinogênese de cólon. Os FCA encontram-se presentes em indivíduos que possuem alta predisposição a desenvolver câncer de cólon (BIRD *et al.*, 1989; BIRD *et al.*, 1995; GHIA, 1996; BIRD, 1998; BIRD e GOOD, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2002).

Os agentes carcinogênicos mais empregados em modelos experimentais de carcinogênese de cólon em roedores são as drogas azometilhidrazina (AOM) e dimetilhidrazina (DMH) (GENNARO *et al.*, 1973; CELIK *et al.*, 1980; TILSON, 1980; SHETYE *et al.*, 1990; LARANJEIRA *et al.*, 1998; MAGNUSON *et al.*, 2000).

A indução de câncer de cólon, com o uso da DMH, constitui uma boa ferramenta para explorar a relação entre FCA e câncer de cólon (RODRIGUES *et al.*, 2002).

ONOSE *et al.* (2003) relatam que a DMH tem sido utilizada em modelos experimentais para detecção da carcinogênese de cólon num curto período de tempo.

As criptas aberrantes se desenvolvem a partir de duas semanas após aplicações de carcinógenos, como a DMH (BIRD e GOOD, 2000).

A DMH induz a formação de tumores no cólon, especialmente no sigmóide e reto, podendo também ocorrer ao redor da junção duodeno-jejunal; provavelmente interferindo no processo de metilação do DNA via citocromo P450 (CELIK *et al.*, 1981; McGARRITY *et al.*, 1988; LARANJEIRA *et al.*, 1998).

A maior parte dos estudos, para avaliar o impacto dos nutrientes da dieta como agentes preventivos, utilizam as contagens dos FCA para medir o desenvolvimento do câncer colorretal (WARGOVICH *et al.*, 1996; GOOD *et al.*, 1998; MAGNUSON, *et al.*, 2000).

O número e o aspecto morfológico das criptas evoluem com o tempo, mostrando o aparecimento de sinais progressivos de multiplicação como a multiplicidade de criptas nos FCA (BIRD *et al.*, 1989; BIRD *et al.*, 1995; BIRD e GOOD, 2000; RODRIGUES, *et al.*, 2002).

As características dos FCA, como o número de criptas nos focos, podem ser usadas para identificar alterações celulares e moleculares que conduzem ao desenvolvimento do tumor e para quantificar a evolução das alterações que ocorrem ao longo do tempo no desenvolvimento do câncer de cólon (BIRD, 1995).

FCA avançadas, ou seja, apresentando múltiplas criptas aberrantes, parecem exibir maior resistência à morte celular por apoptose quando comparada com FCA menos avançadas (MAGNUSON, 1994; BIRD, 1995; GOOD, 1998).

O número dos FCA varia com o tempo, podendo aumentar, ao sofrer remodelações, ou podendo diminuir, sofrendo regressões. No entanto, os processos biológicos que causam remodelações ou regressões não estão bem definidos (BIRD e GOOD, 2000).

BIRD (1995); TAKAYAMA *et al.*, (1998); BIRD e GOOD (2000); RODRIGUES *et al.*, (2002), afirmaram que existem poucos estudos sobre os estágios preneoplásicos.

Os agentes químicos ou nutrientes utilizados como preventivos do câncer de cólon podem exercer efeitos diferentes, dependendo do estágio de desenvolvimento do câncer (GOOD *et al.*, 1998).

Além disso, vários aspectos influenciam o número de FCA em um modelo experimental. Entre estes estão o sexo e a idade dos animais (BIRD e GOOD, 2000).

MAGNASUM *et al.* (2000) desenvolveram um estudo no qual analisaram o número de FCA em ratas fêmeas, em dois grupos: jovens, com 4 semanas de vida e adultas, considerando 50 semanas de vida. Os animais foram sacrificados após 6 e 14 semanas do início da aplicação do carcinógeno (AOM). O grupo jovem apresentou média e desvio padrão de  $87 \pm 7$  FCA e  $91 \pm 8$  FCA, respectivamente, em contrapartida o grupo adulto apresentou  $211 \pm 18$  FCA e  $206 \pm 19$  FCA, sendo observada uma grande diferença estatística no número de FCA entre os dois grupos, demonstrando que os animais mais velhos são mais suscetíveis a desenvolver FCA de acordo com o modelo carcinogênico empregado.

Por outro lado, ratos machos parecem mais suscetíveis a desenvolver FCA que as fêmeas (MOON e FRICKS, 1977; HAMILTON, 1989).

A região do cólon examinada e o tempo de progressão da lesão afetam o número de FCA, assim como, o modelo experimental empregado (BIRD e GOOD, 2000).

Entre os fatores correspondentes do modelo experimental, a frequência da exposição ao carcinogênico pode afetar o número de FCA (BIRD e GOOD, 2000).

RODRIGUES *et al.* (2002) demonstraram que ratos submetidos à indução de carcinogênese por DMH apresentaram maior número de FCA após 30 semanas de experimentação em comparação com 4 semanas, sendo esta diferença estatisticamente significativa. A multiplicidade também aumentou de 8,5% FCA com 3 ou mais criptas na 4ª semana, para 46,9% na 30ª semana. Houve diferença ainda com relação aos fragmentos examinados do cólon, sendo que as regiões denominadas médias e distais obtiveram maior número de FCA tanto na 4ª como na 30ª semana, em comparação à região proximal.

Ratos submetidos à aplicação de AOM, com variação do número de aplicações de uma a quatro vezes por semana exibiram diferenças no número de FCA e na sua multiplicidade (BIRD, 1995; BIRD e GOOD, 2000).

Análises histológicas dos FCA revelaram que as criptas aberrantes sofrem displasia ao longo do tempo. No entanto, vários FCA podem não apresentar displasia, sugerindo assim que, este pode ser um evento atrasado na carcinogênese do cólon e que a expansão clonal e displasia podem ser controlados por processos biológicos distintos (BIRD, 1995).

## **2.2 Ácidos graxos ômega-3**

### **2.2.1 Definição**

Os ácidos graxos ômega-3 são ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), ou seja, possuem mais de uma dupla ligação. As classes dos ácidos graxos polinsaturados ômega-3 e ômega-6 são distinguidos devido à localização da primeira dupla ligação a partir do grupamento metil, sendo que a primeira dupla ligação dos ácidos ômega-3 se localiza entre o carbonos 3 e 4 a contar da extremidade metílica (TEITELBAUM e WALKER, 2001).

São ditos essenciais, assim como os PUFAs pertencentes a família ômega-6, pois devem ser obtidos através da ingestão dietética, devido a incapacidade dos mamíferos em sintetizá-los, sendo esta capacidade pertencente aos vegetais. Além disso, possuem papel fundamental em manter a estrutura, fluidez e funções das membranas celulares (SPRECHER, 1989; CALDER, 1998; TEITELBAUM e WALKER, 2001; DOMMELS *et al.*, 2002).

Existe grande interesse em pesquisas relacionadas aos ácidos graxos PUFAs, particularmente sobre o ácido graxo ômega-3. O conhecimento atual sobre este ácido graxo define o seu possível papel na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão, artrite, doenças auto-imunes,

câncer e doenças inflamatórias (WAITZBERG, 2000; TEITELBAUM e WALKER, 2001; TAPIERO *et al.*, 2002).

### 2.2.2 Nomenclatura

A nomenclatura dos ácidos graxos caracteriza o comprimento da cadeia carboxílica e o número de duplas ligações, que aparece separado por dois pontos. A posição das duplas ligações se dá a partir da contagem do carbono da carboxila e são representadas sobrescrita pela letra grega  $\Delta$  (delta) (LEHINGER, 1997; ROSE e CONNOLLY, 1999).

O ácido graxo linolênico que possui a estrutura do esqueleto carbônico:  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ , recebe a denominação de 18:3( $\Delta^{9,12,15}$ ) (LEHINGER *et al.*, 1997). Este ácido também é representado estruturalmente, como demonstra a Figura 2.

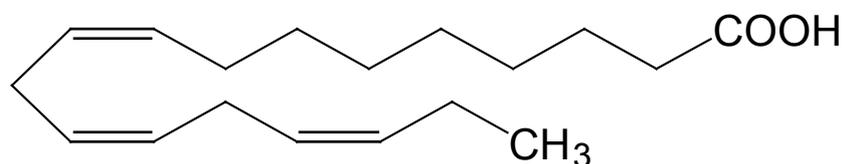


Figura 2- Representação do esqueleto carbônico do ácido  $\alpha$ -linolênico

As letras  $\omega$  (ômega) e n são também utilizadas para descrever a estrutura química das moléculas de ácidos graxos, sendo seguidas pelo número correspondente do carbono que possui a primeira dupla ligação a partir do grupo metil terminal do ácido graxo (ROSE e CONNOLLY, 1999; TEITELBAUM e WALKER, 2001; DOMMELS *et al.*, 2002).

Os principais ácidos da famílias ômega-3 são assim representados: ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3 $\omega$ -3 ou 18:3n-3), ácido eicosapentaenóico –EPA (20:5 $\omega$ -3 ou 20:5n-3) e ácido docosahexaenóico – DHA (22:6 $\omega$ -3 ou 22:6n-3).

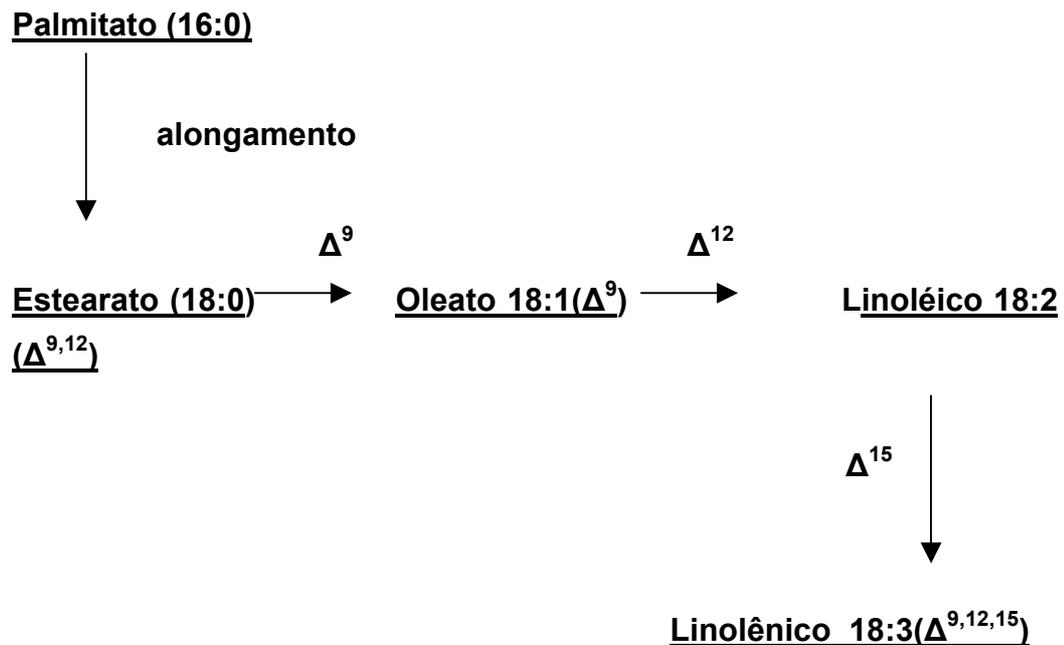
### 2.2.3 Síntese dos ácidos graxos

A síntese dos ácidos graxos ocorre no citosol das células. Estes são sintetizados a partir da acetil-CoA, sendo o produto final das reações o palmitato, que contém 16 átomos de carbono em sua cadeia carboxílica (16:0). O palmitato pode sofrer alongamento e originar o estearato com 18 átomos de carbono (18:0), que por sua vez é dessaturado, sendo catalizado pela enzima  $\Delta^9$  – dessaturase, que encontra-se presente em plantas e animais. Esta enzima introduz uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 da cadeia carboxílica, originando um ácido graxo insaturado, o oleato (18:1n-9) (LEHINGER *et al.*, 1997; CALDER, 1998).

Os ácidos graxos saturados normalmente são supridos por adequadas quantidades presentes na dieta (CALDER, 1998; TEITELBAUM e WALKER, 2001).

Os ácidos que contêm mais de uma dupla ligação são denominados polinsaturados (PUFAs). Os PUFAs são sintetizados a partir do ácido oleato. No entanto, somente as plantas possuem as enzimas  $\Delta^{12}$ -dessaturase e  $\Delta^{15}$  – dessaturase, necessárias para que sejam realizadas as dessaturações que originam o ácido linoléico (18:2n-3) e  $\alpha$ -linolênico (18:3n-3), respectivamente (CALDER, 1998; ROYNETTE *et al.*, 2004).

Na Figura 3 estão demonstradas as sínteses dos ácidos graxos a partir do palmitato.



Os respectivos símbolos correspondem as enzimas de dessaturação:

$\Delta^9 = \Delta^9$  - dessaturase

$\Delta^{12} = \Delta^{12}$  - dessaturase

$\Delta^{15} = \Delta^{15}$  - dessaturase

**Figura 3** -Esquema da síntese dos ácidos graxos a partir do palmitato

#### 2.2.4 Principais fontes dietéticas

Os ácidos graxos ômega-3 são encontrados em óleos de peixe, peixes e frutos do mar (DOMMELS, 2002).

As algas marinhas unicelulares fazem alongamento e dessaturação dos ácidos linolênicos, formando EPA e DHA. As algas marinhas transferem estes ácidos através da cadeia alimentar aos peixes (CALDER, P. C. 1998; TEITELBAUM e WALKER, 2001).

Os óleos de peixe possuem elevadas concentrações dos ácidos EPA e DHA (ACKMAN e MAG, 1998; CONNOR, 2000).

O ácido  $\alpha$ -linolênico é encontrado em sementes de linhaça, algumas amêndoas como as nozes inglesas, vegetais folhosos verdes escuros, óleo de oliva, de soja, canola e “perilla” (*perilla frutescens*) (SIMOPOULOS, 1996; ROSE e CONNOLLY, 1999; BARTSCH *et al.*, 1999; DOMMELS, 2002).

Diferenças nas concentrações dos ácidos graxos ômega-3 em peixes são visualizadas em várias espécies, devido às influências de áreas geográficas, estação do ano, sendo que as melhores fontes são os peixes de água salgada, fria e profunda e os peixes de água doce e fria (ZAMULA, 1986; ROSE e CONNOLLY 1999; CASTRO, 2003).

### **2.2.5 Consumo dietético**

Pesquisas têm demonstrado baixa incidência de câncer de cólon na Finlândia e outras áreas do mediterrâneo, entretanto, estas populações têm alto consumo de gorduras, sendo que a principal fonte se origina de peixes e óleos de peixes ricos em ácidos graxos polinsaturados, pertencentes à família ômega-3 (ESTEVE *et al.*, 1993; LLOR *et al.*, 2003).

Em populações de esquimós na Groelândia, o consumo dos PUFAs ômega-3 de cadeia longa (EPA, DHA e docasapentaenóico), é maior que 10 g/dia. Ao contrário da “dieta ocidental” onde o consumo destes ácidos é de 1-2 g/dia (ROYNETTE *et al.*, 2004).

Observou-se que os imigrantes japoneses nos Estados Unidos, que se adaptam aos hábitos alimentares da dieta ocidental, apresentam aumento na incidência de câncer de cólon em comparação aos seus contemporâneos japoneses (BINGHAM, 1998). No Japão, o consumo dos ácidos graxos ômega-3 é alto, devido ao grande consumo de peixes naquele país (BARTSCH *et al.*, 1999).

Não está estabelecida uma quantidade ideal de ingestão de ômega-3, no entanto, a American Heart Association, recomenda que indivíduos adultos

consumam peixe pelo menos 2 vezes por semana; e que a ingestão dos ácidos graxos ômega-3 de 0,5 a 1,8g/dia dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), e 1,5 a 3g/dia do ácido  $\alpha$ -linolênico parece ser benéfica, embora mais estudos sejam necessários (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2003).

Segundo ROYNETTE *et al.* (2004), até o momento, seria precoce fazer qualquer recomendação de dosagem de ômega-3 com relação a terapia do câncer de cólon.

### **2.2.6 Relação ômega-6:ômega-3 no consumo dietético humano**

SIMOPOULOS (1991) relatou que durante o período de evolução do *Homo sapiens*, em que a constituição genética humana foi programada em resposta a influências dietéticas, a proporção do consumo entre ácidos ômega-6 e ômega-3 foi de aproximadamente um.

O *Homo sapiens* surgiu há 40.000 anos atrás e a constituição genética humana permanece quase a mesma, no entanto ocorreram mudanças dietéticas a partir da revolução industrial, particularmente nos últimos 150 anos, marcado pelo desenvolvimento tecnológico; favorecendo as modernas técnicas da agricultura e a indústria de óleo vegetal, no entanto, isto vem contribuindo para o aumento da ingestão de gordura e substituição dos ácidos graxos dietéticos com maior consumo dos ácidos ômega-6 em relação aos ômega-3 (TEITELBAUM e WALKER, 2001; SABARENSE, 2003; MOREIRA, 2003).

Desde o início do século XX, ocorreu a diminuição do consumo dos ácidos linolênico, EPA e DHA e um aumento da ingestão do ácido linoléico e araquidônico, sendo que atualmente a ingestão do ácido linoléico e do ácido araquidônico é muito maior do que a quantidade necessária ao organismo humano (LEAF e WEBER, 1987; MOREIRA, 2003).

Com o uso da hidrogenação do óleo de soja, passou-se a reduzir a quantidade de ácido linolênico, levando a uma alta concentração do ácido linoléico neste produto (TEITELBAUM e WALKER, 2001).

Anteriormente a 1940, as crianças ingeriam óleo de fígado de bacalhau, como fonte de vitamina A e D. No entanto estas vitaminas começaram a ser sintetizadas farmacologicamente, provocando queda no consumo do mesmo (MOREIRA, 2003).

A proporção de ômega-6:ômega-3 na dieta é importante, embora ainda não se tenha determinado uma proporção ideal. Atualmente, na Europa, esta proporção é estimada em 10-14:1, em Israel chega a aproximadamente 22-26:1 (BARTSCH, *et al.*, 1999).

O ácido linoléico encontra-se presente em altas concentrações nos óleos de soja, milho, girassol, açafraão, sendo altamente consumidos através da “dieta ocidental”. Isto ajuda a proporcionar este desbalanço na relação ômega-6:ômega-3 (DOMMELS, 2002; ROYNETTE *et al.*, 2004). Tem-se associado este desbalanço na proporção ômega-6:ômega-3, com o aumento do risco para doenças cardiovasculares e alguns tipos de cânceres, entre estes o câncer de cólon (ROSE e CONNOLLY, 1999).

VIOLA (1997) propôs que as proporções encontradas no azeite de oliva de 6:1 – 10:1 são ideais para o consumo humano.

Segundo PEPPING (1999) e KRIS-ETHERTON, (2003) para que os lipídios propiciem efeitos benéficos na dieta, a relação entre ômega-3 e ômega-6 deve ser de 2:1 a 4:1.

### **2.2.7 Principais localizações no organismo humano**

O DHA é encontrado em grande quantidade no córtex cerebral, na retina, nos testículos, no esperma (O'BRIEN e SAMPSON, 1965; ANDERSON, 1970; POULOS *et al.*, 1975; VIOLA, 1997).

Os ácidos ômega-3, bem como os ômega-6 são constituintes dos fosfolipídios das membranas celulares. O DHA é o ácido graxo PUFA de maior concentração nas membranas, sendo o EPA, o PUFA que possui menor proporção na mesma (CARRIÉ *et al.*, 2000).

As proporções dos PUFAS nas membranas celulares podem ser modificadas, refletindo as quantidades ingeridas pela alimentação (ROSE e CONNOLLY, 1999).

Quando suplementado através da dieta, os ácidos ômega-3 concentram-se também no músculo cardíaco, no pulmão e no fígado (INNIS *et al.*, 1995).

### **2.3 Metabolismo dos ácidos graxos PUFAs e suas relações com a carcinogênese colorretal**

Utilizando uma cascata de reações de dessaturação e alongamento, o ácido linolênico pode ser convertido em EPA (20:5n-3), este então é novamente alongado e dessaturado a 24:6n-3, que passa por uma  $\beta$ -oxidação dando origem ao DHA (22:6 n-3). Por uma série de reações similares, o ácido  $\alpha$ -linoléico é convertido ao ácido araquidônico (20:4 n-6), como ilustrado na Figura 4. Estas reações metabólicas ocorrem entre o grupo carboxílico e a dupla ligação mais próxima. Os ácidos derivados de uma classe de PUFA, ômega-3 ou ômega-6 possuem um fragmento terminal livre de insaturação idênticos (WAINWRIGHT, 1997; CALDER, 1998; ROYNETTE *et al.*, 2004; SABARENSE, 2003).

O metabolismo dos ácidos graxos polinsaturados é seguido por uma série de competitivas reações de alongamento e dessaturação, que é limitada pela enzima  $\Delta^6$ -dessaturase. Esta é uma proteína de membrana, que é expressa em uma variedade de tecidos, incluindo o cérebro, fígado, pulmão e coração e que tem como função inserir uma dupla ligação no carbono seis dos PUFAs.

A  $\Delta^6$ - dessaturase possui forte afinidade pela família ômega-3, mesmo quando a dieta possui altas quantidades do mesmo, este é preferencialmente metabolizado. Conseqüentemente, um aumento na ingestão dietética de ômega-3 (ácido linolênico, EPA e DHA) diminui a reação de dessaturação do ácido linoléico e com isto, a produção do ácido araquidônico. O ácido araquidônico e seus metabólitos parecem estar envolvidos num aumento da produção de sais biliares secundários, que provavelmente aumentam a proliferação celular (DOMMELS, 2002; HANSEN- PETRIK *et al.*, 2002; ROYNETTE *et al.*, 2004).

Os sais biliares possivelmente encontram-se envolvidos na formação de criptas aberrantes e regulação da apoptose. No entanto, os mecanismos pelos quais os sais biliares agem no processo carcinogênico não são bem compreendidos. Os sais biliares secundários, derivados dos sais biliares primários, que são desconjugados e deidroxilados pela flora colônica intestinal, parecem interagir com componentes celulares, conduzindo a alterações de genes envolvidos na regulação de crescimento, na expressão de fatores de transcrição como NFkB e modificação de genes promotores. Alterações do DNA celular e de moléculas de superfície nos colonócitos, como, as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), podem causar uma desregulação do sistema imune com relação as células tumorais (ALLGAYER *et al.*, 2002; ROYNETTE *et al.*, 2004).

REDDY e WYNDER (1973) observaram uma maior excreção de sais biliares em pacientes com câncer colorretal quando comparados com indivíduos saudáveis.

Foi observado que a enzima 7- $\alpha$ -deidroxilase, responsável pela formação de ácidos biliares secundários, teve sua atividade diminuída ao ser consumida uma dieta suplementada com ômega-3 por ratos machos F344 (RAO *et al.*, 1996).

Uma outra competição entre os ácidos graxos polinsaturados ocorre na presença das enzimas cicloxigenases (COX-1 e COX-2) e lipoxigenases (ROYNETTE *et al.*, 2004).

As COX são encontradas na superfície do retículo endoplasmático e no envoltório nuclear de células humanas. Estas enzimas estão envolvidas nas reações de produção de eicosanóides (SINGHER-RANGER e MOKBEL, 2002).

Prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos são eicosanóides, que se derivam dos ácidos dihomogama-linoléico (20:3n-6), araquidônico e eicosapentaenóico (Figura 4). O ácido araquidônico produz prostaglandinas de série 2 (PGE<sub>2</sub>), enquanto EPA é precursor das prostaglandinas de série 3 (PGE<sub>3</sub>). As prostaglandinas possuem importante papel na modulação, na intensidade e duração da resposta imune. A PGE<sub>2</sub> tem efeitos pró-inflamatórios, como febre, eritema, aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e edemas causados por histaminas. Tem-se observado em doenças inflamatórias crônicas, um aumento de linfócitos T supressores e aumento na produção de PGE<sub>2</sub>. Os eicosanóides produzidos a partir do EPA possuem efeitos menos potentes no processo pró-inflamatório, quando comparados aos eicosanóides derivados do ácido araquidônico.(TEITELBAUM e WALKER, 2001; TAPIERO *et al.*, 2002; DOMMELS, 2002; SINGH-RANGER e MOKBEL, 2002; ROYNETTE *et al.*, 2004).

A PGE<sub>2</sub> estimula o aumento na concentração e atividade da COX-2. Em lesões neoplásicas pré-invasivas, de modelo animal, e neoplasias de câncer de cólon em humanos, foi demonstrado um aumento da indução de síntese de óxido nítrico, este também estimula a produção de COX-2; sendo esta observada em 90% dos tumores de cólon, bem como na presença de FCA e

adenomas colorretal (TAKASASHI *et al.*, 1997a; LAGARES-GARCIA *et al.*, 2001; DOMMELS *et al.*, 2003).

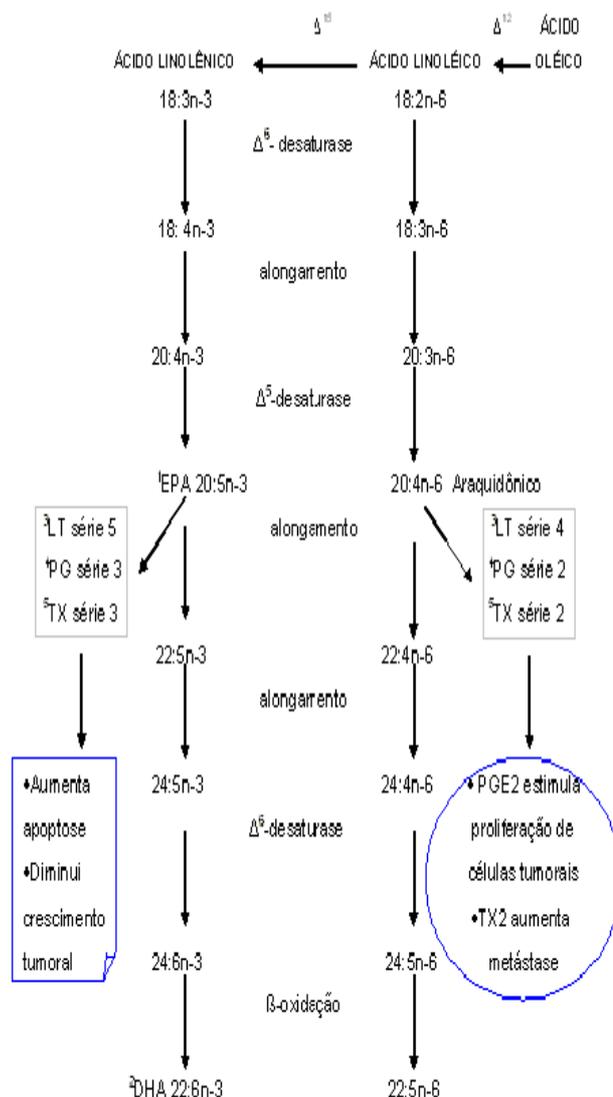
O aumento na atividade da COX-2 tem sido observado na carcinogênese colorretal (OSTERSTROM, A. *et al.* 2002). Estudos *in vitro*, com células intestinais demonstraram que uma maior concentração de COX-2, resultava numa indução da síntese da proteína Bcl-2, diminuindo a apoptose (TSUJII e DUBOIS, 1995; LLOR *et al.*, 2003).

O DHA parece regular a produção de COX-2, diminuindo a expressão da proteína Bcl-2, e como consequência induzindo a apoptose (CHEN e ISTFAN, 2000; TAPIERO *et al.*, 2002).

A apoptose é fundamental para regulação do número de células epiteliais, e essencial para a prevenção da divisão celular de células mutadas (LLOR *et al.*, 2003).

CHENG *et al.* (2003) demonstraram um aumento na produção da proteína Bax na mucosa normal de pacientes colectomizados em consequência de adenomas ou tumor colorretal. Essa proteína pode estar envolvida na indução da apoptose pelo ômega-3. No entanto, ainda não está definida a relação entre ômega-3 e as proteínas Bcl-2 e Bax.

Uma maior ingestão dos ácidos graxos ômega-3, EPA e DHA, por humanos, parcialmente substitui os ácidos ômega-6 presentes nas membranas celulares (TEITELBAUM e WALKER, 2001).



<sup>1</sup>EPA: ácido eicosapentaenóico, <sup>2</sup>DHA: ácido docosaexaenóico

<sup>3</sup>LT: leucotrieno, <sup>4</sup>PG: prostaglandinas e <sup>5</sup>TX: tromboxanos

**Figura 4 – Esquema do metabolismo dos ácidos graxos PUFAs e caminhos pelos quais sugere-se possível ação sobre a carcinogênese.**

Fonte: ROYNETTE *et al.*, 2004

## 2.4 Estudos em animais relacionando câncer colorretal e PUFAs

GOOD *et al.* (1998) induziram câncer colorretal em ratos que após receberem dieta padrão por 12 semanas, tiveram a mesma suplementada com óleo de milho e óleo de peixe. Nas análises feitas na 6ª e 12ª semanas de intervenção dietética, observaram que os intestinos dos animais que consumiram dieta suplementada com óleo de peixe apresentaram maior número de FCA em relação aos animais que consumiram as outras dietas ( $p < 0,05$ ). Entretanto, na análise após 12 semanas, nos ratos com dieta suplementada com óleo de milho foi encontrado um aumento no número de tumores colorretais, enquanto o número de tumores encontrado nos animais que receberam dieta suplementada com óleo de peixe não foi afetado ( $p < 0,05$ ). Esses resultados demonstram que diferentes lipídeos exercem efeitos variados nos estágios da carcinogênese colorretal.

Ratos machos F344 foram alimentados com diferentes quantidades de óleo de oliva, óleo de girrasol e “perilla”, uma semana após receberem aplicação da AOM. Nos grupos estudados, os animais que consumiram óleo “perilla”, que possui alta concentração do ácido linolênico, demonstraram um menor número de FCA, quando comparado aos demais (ONOGI *et al.*, 1996).

Em modelo de carcinogênese com AOM, animais foram tratados com ácido graxo ômega-3 (EPA) correspondendo a 16,0% do valor calórico da ração. Nos resultados foram observada a diminuição do número de criptas aberrantes e do número de focos com mais de 3 criptas (DESCHNER *et al.*, 1990). Estes autores obtiveram resultados similares quando trataram animais com EPA correspondente a 10,2% do valor calórico da ração, não sendo visto o mesmo efeito em ratos tratados com rações contendo EPA nas quantidades correspondentes a 4,4% do valor calórico.

TAKAHASHI *et al.* (1993) demonstraram uma diminuição no número de FCA em animais submetidos a um carcinógeno e tratados com 0,7 mL de éster metil DHA, dado na forma de gavagem, 5 vezes por semana.

Estudos em ratos demonstraram que EPA e DHA diminuem o tamanho e número de tumores malignos, enquanto o ácido linoléico aumenta ambos (GALLI e BUTRUM, 1991; CAVE, 1991).

REDDY (1994) analisaram o efeito da dieta suplementada com óleo de peixe, logo após as injeções do carcinógeno, observando a diminuição do número de tumores no colón, enquanto, a intervenção com dieta suplementada com óleo de milho apresentou aumento do número de tumores.

Em estudo realizado por PETRIK *et al.*, 2000, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, recebendo dietas diferenciadas suplementadas com EPA, ácido araquidônico, ou EPA mais ácido araquidônico e um grupo de animais utilizado como grupo controle, teve a ração suplementada com azeite de oliva. Ao compararem os grupos, verificou-se que apenas o grupo que recebeu a dieta suplementada com EPA teve uma média de diminuição no número de tumores de 68,7% em relação ao grupo controle.

Mais estudos relacionando ômega-3 e evolução do câncer colorretal são necessários para predizer se essa família de PUFAs possui efeitos anticarcinogênicos, contribuindo para a terapia dessa doença, que apresenta grande impacto nos índices de mortalidade em todo o mundo.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o potencial anticarcinogênico da suplementação da dieta com ácido graxo ômega-3 em diferentes estágios do desenvolvimento do câncer colorretal em ratos Wistar.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a eficácia do modelo carcinogênico aplicado, observando os efeitos causados pela 1,2-dimetilhidrazina no intestino grosso (cólon e reto) e na formação de pré-lesões neoplásicas.
- Avaliar o consumo dietético e o ganho de peso dos animais que receberam dieta suplementada com ômega-3 durante o experimento.
- Avaliar os efeitos da suplementação de dieta com ácido graxo ômega-3 (10g/100g), na evolução da carcinogênese colorretal, após 6,13 e 30 semanas de intervenção dietética.
- Analisar os FCA com relação à presença de lesões pré-neoplásicas (FCA); quantificação do número total de FCA; quantificação dos FCA nos diferentes fragmentos intestinais, denominados proximal, médio e distal; categorização dos focos em  $\leq$  e  $>$  3 criptas aberrantes; porcentagem de redução dos FCA totais; porcentagem de redução dos focos com mais de 3 criptas aberrantes.
- Verificar o perfil lipídico de ácidos graxos na dieta controle e na dieta suplementada com ômega-3, no tecido hepático e na gordura visceral dos animais controle e tratados com ômega-3.

## 4 Materiais e Métodos

### 4.1 Animais

Cinquenta e três ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, Rodentia), machos com 11 semanas de idade, foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa.

Os animais foram mantidos à temperatura de  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  em fotoperíodo de 12 horas.

Foram divididos em 2 grupos experimentais, os quais foram divididos de acordo com a dieta que recebiam em: grupo controle (n=25), recebendo dieta AIN-93M; grupo tratado, denominado ômega-3 (n=28), recebendo dieta AIN-93M suplementada com ácido graxo ômega-3 (10g/100g de dieta).

Os animais permaneceram no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, em gaiolas coletivas de polietileno, cobertas com grade de metal, contendo de 4 a 6 animais, em cada gaiola. Estes receberam dieta e *água ad libitum*, por um período de 30 semanas.

### 4.2 Dietas

As dietas foram preparadas manualmente nos Laboratórios de Análise Bioquímica dos Alimentos, Nutrição Experimental e Higiene de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde, da Universidade Federal de Viçosa.

Os ingredientes foram adicionados em quantidades determinadas, de acordo com as recomendações do American Institute of Nutrition for Rodents (REEVES, *et al.* 1993), seguindo o protocolo AIN-93M, recomendada para a manutenção de animais adultos.

O ômega-3 foi obtido através de cápsulas de óleo de peixe, adquiridas pelo laboratório Galenas, Campinas, SP, Brasil.

O perfil dos ácidos graxos da cápsula de óleo de peixe foi verificado através de cromatografia gasosa e está demonstrado na Tabela 2.

O ômega-3 foi adicionado a dieta AIN93M (10g/100g de dieta), sendo feita a preparação em sala com ausência de luz ultravioleta.

Após a confecção das rações na forma de pellets, estas foram mantidas em geladeiras com temperatura entre 0 e 4°C, e protegidas da luz até o momento de sua utilização.

Na Tabela 1 está demonstrada a composição da dieta experimental (g/100g).

**Tabela 1- Composição da dieta experimental (g/100g)**

<b>Componentes</b>	<b>Controle</b>
<sup>1</sup> Amido de milho (q.s.p.)	48,56
<sup>3</sup> Amido dextrinizado	15,50
<sup>1</sup> Sacarose	10,00
<sup>6</sup> Caseína	12,00
<sup>5</sup> Celulose	5,00
<sup>1</sup> Óleo de soja	4,00
<sup>2</sup> Mistura vitamínica	1,00
<sup>2</sup> Mistura mineral	3,50
<sup>3</sup> L-cistina	0,18
<sup>4</sup> Bitartrato de colina	0,25

<sup>1</sup> Obtidos no comércio de Viçosa, MG

<sup>2</sup> Elaboradas segundo Reeves *et al.* (1993) no laboratório do departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa

<sup>3</sup> Obtida da Rhoster Indústria e Comércio LTDA - Vargem Grande Paulista -SP

<sup>4</sup> Obtida da Natural Pharma - Produtos Farmacêuticos- SP

<sup>5</sup> Obtido da Comprecel - Mingtai Chemical CO, LTD - SP

<sup>6</sup> Obtida da M.CASSAB Comércio e Indústria LTDA -SP.

Os animais do grupo ômega-3 receberam dieta AIN-93M suplementada por óleo de peixe (22g/100g de dieta), contendo 10g de óleo de peixe.

**Tabela 2 – Perfil dos ácidos graxos (%) da cápsula de óleo de peixe**

<b>Ácidos graxos (%)</b>		
Mirístico	C14:0	6,07
Pentadecanóico	C15:0	0,41
Palmítico	C16:0	13,53
Heptadecanóico	C17:0	0,5
Esteárico	C18:0	3,57
Araquídico	C20:0	0,63
<b>Σ Saturados</b>		<b>24,71</b>
Palmitoléico	C16:1	7,97
Oléico	C18:1	10,69
Eicosenóico	C20:1	1,28
<b>Σ Monoinsaturados</b>		<b>19,94</b>
Linoléico	C18:2	3,12
<b>*Linolênico</b>	<b>C18:3</b>	<b>0,72</b>
Eicosadienóico	C20:2	3,68
Eicosatrienóico	C20:3	1,23
Araquidônico	C20:4	1,03
Docosadienóico	C22:2	1
<b>*EPA</b>	<b>C20:5</b>	<b>25,28</b>
<b>*DHA</b>	<b>C20:6</b>	<b>19,3</b>
<b>Σ Polinsaturados</b>		<b>55,36</b>

\* pertencentes à família ômega-3

#### 4.3 Modo de preparo e aplicação da 1,2-dimetilhidrazina

Os animais dos grupos controle e ômega-3 receberam 4 injeções subcutâneas da droga 1,2-dimetilhidrazina (DMH), em doses de 40mg/Kg de peso. Esta droga foi obtida do laboratório SIGMA® (USA).

A DMH era preparada imediatamente antes do uso, dissolvida em NaCl 0,9% contendo 15% de EDTA como veículo, e o pH final ajustado para 6,5.

A cada aplicação foram pesadas 100mg de DHM para cada 100 mL de solução salina conforme método utilizado por RODRIGUES *et al.* (2002).

As aplicações foram realizadas 2 vezes/semana, com intervalos entre os dias de aplicação, durante 2 semanas.

#### **4.4 Procedimento experimental**

Durante as duas primeiras semanas de experimentação, foram administradas 4 injeções subcutâneas da droga 1,2-dimetilhidrazina (DMH) nos animais dos grupos controle e ômega-3.

A intervenção dietética transcorreu todo o período experimental. Os animais começaram a consumir as dietas experimentais no primeiro dia de experimento, coincidindo com a primeira aplicação da DMH.

Dos cinquenta e três animais iniciados no experimento, houve morte de um animal do grupo controle e dois animais do grupo ômega-3. Estas mortes ocorreram nas primeiras três semanas de estudo.

Com 6 semanas de experimentação foi realizado o sacrifício, de 3 animais do grupo controle e 3 animais do grupo ômega-3.

Procedeu-se o segundo sacrifício, com 13 semanas de experimentação, em 11 animais do grupo controle e 11 animais do grupo ômega-3.

O terceiro sacrifício foi feito com 30 semanas de experimentação, 10 animais pertencentes ao grupo controle e 12 animais do grupo ômega-3.

#### **4.5 Realização dos sacrifícios**

Os animais foram sacrificados em três períodos diferentes. Os ratos permaneciam em jejum por 12 horas. Os sacrifícios eram realizados por asfixia com CO<sub>2</sub>. O 1º sacrifício foi realizado com 6 semanas experimentais, o 2º com 13 semanas e o 3º com 30 semanas, sendo que estes tempos correspondiam

ao tempo de intervenção dietética e respectivamente a 4<sup>a</sup>, 11<sup>a</sup> e 28<sup>a</sup> semanas após a última aplicação da DMH.

O 1º sacrifício foi realizado com o propósito de se verificar a ação da DMH. Tendo sido denominado como “tempo zero”.

Foram removidos dos animais o intestino grosso, o fígado e a gordura visceral. O fígado e a gordura visceral foram congelados logo após a sua retirada e mantidos em freezer a -20°C, até a análise.

#### **4.6 Consumo dietético e peso dos animais**

A ingestão das dietas e o peso dos animais foram monitorados semanalmente, durante todo o experimento. Estes eram realizados em balança mecânica da marca Filizola.

Foram analisadas a evolução do consumo dietético e a evolução do peso dos grupos experimentais semanalmente.

O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi obtido através do ganho de peso dos animais (g) (peso final – peso inicial) dividido pela média do consumo de dieta (g) em cada grupo experimental:

$$\text{CEA} = \frac{\text{ganho de peso dos animais (g)}}{\text{consumo da dieta (g)}}$$

#### **4.7 Remoção do intestino grosso**

O intestino grosso foi removido após o sacrifício dos animais, sendo retirado desde o ceco até o ânus. Após a remoção foi lavado em solução salina fisiológica, aberto longitudinalmente pela banda contra mesentérica, colocado em placas de madeira revestidas por 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, para posterior análise (Figura 5).



**Figura 5** – Intestino grosso após remoção, abertos pela margem contra mesentérica, fixados em solução tamponada de formol a 10%.

#### **4.8 Análise microscópica**

Depois de fixados em formol por 24 horas, os intestinos grossos foram medidos e divididos em três fragmentos iguais denominados de fragmento proximal, médio e distal, em relação ao ceco. Em seguida foram corados em solução de azul de metileno a 1%, por 2 minutos e lavados em tampão fosfato (PBS).

A superfície mucosa intestinal foi observada com o auxílio de microscópio óptico de luz, com aumento de 100x, para identificação dos focos de criptas aberrantes (FCA) e das criptas aberrantes, de acordo com a técnica de BIRD (1987).

Os FCA foram contados por 2 observadores, independentes e treinados. A contagem foi feita em toda a superfície mucosa do intestino grosso, do cólon ao reto. Esta contagem foi realizada de forma cega. Foi realizada análise das contagens entre os observadores (Tabela 3) e não foi verificada diferença

estatística, sendo então, considerada a média entre as contagens dos observadores, para posterior análise.

A categorização dos FCA foi realizada de maneira que eram contados os focos contendo 3 ou menos criptas aberrantes focos com mais de 3 criptas aberrantes.

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa.

A porcentagem de redução dos FCA totais e dos focos com mais de 3 criptas aberrantes nas diferentes semanas estudadas foi obtida da seguinte forma:

- Primeiro foi calculado a porcentagem de FCA apresentada pelo grupo ômega-3 através de uma regra de três, onde se considera os FCA do grupo controle como 100%.

- Depois de obtido este resultado, o mesmo é subtraído de 100%, resultando na porcentagem de redução do grupo ômega-3 em relação ao grupo controle.

As imagens dos FCA foram digitalizadas com o uso do microscópio de luz Olympus AX 70, com aumento de 100X, acoplado a câmara digital analógica e conectado a um computador. A captura de imagem também foi realizada através do software Image Pro-plus. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

**Tabela 3 - Contagem dos FCA pelos observadores**

<b>Controle</b>					
	<b>Observador 1</b>		<b>Observador 2</b>		
<b>Semanas</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>Mediana</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>Mediana</b>	<b>p*</b>
<b>6 (n=3)</b>	94,66 + 26,27	104	103,33 + 27,06	112	<b>0,7</b>
<b>13 (n=11)</b>	180,18 + 102,46	203	225,18 + 84,03	203	<b>0,51</b>
<b>30 (n=10)</b>	189,10 + 90,29	199	243,80 + 94,26	250	<b>0,27</b>

<b>Ômega-3</b>					
	<b>Observador 1</b>		<b>Observador 2</b>		
<b>Semanas</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>Mediana</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>Mediana</b>	<b>p*</b>
<b>6 (n=3)</b>	105,33 + 25,93	94	113,00 + 23,64	103	<b>0,4</b>
<b>13 (n=11)</b>	143,36 + 81,35	186	185,09 + 69,48	186	<b>0,37</b>
<b>30 (n=12)</b>	95,25 + 36,54	104	94,58 + 42,46	104	<b>0,9</b>

\*Teste de Mann-Whitney

#### **4.9 Extração dos lipídios**

O fígado e a gordura visceral foram utilizados para extração dos lipídios totais.

Os lipídios hepáticos, da gordura visceral, e das dietas, foram extraídos utilizando-se o método de FOLCH *et al.* (1957).

Foram pesados cem miligramas das amostras: dos fígados, das gorduras viscerais e das dietas. Estas foram colocadas em tubos de ensaio, ao quais posteriormente foi adicionada 1,9mL de solução clorofórmio: metanol (2:1) e as amostras foram triturados com o auxílio de bastão de vidro, sendo a seguir homogeneizadas em vórtex, por 3 minutos. Posteriormente, 400µL de metanol foram adicionados às misturas e centrifugadas por 10 minutos, a 3000 rpm. Os sobrenadantes das misturas foram retirados por micropipetas transferidos para tubos de ensaio. Estes foram levados a estufa por 20 minutos

e após ao dessecador. Depois 800 µL de clorofórmio e em seguida 640 µL de NaCl a 0,73% foram adicionados às misturas para serem centrifugadas por 10 minutos, tendo após a fase superior desprezada. Foi utilizada a solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,29%) para lavar internamente as paredes dos tubos de ensaio. Os extratos lipídicos foram secos em estufa.

#### **4.10 Saponificação e esterificação dos lipídios**

Após a extração, 50mg dos extratos foram saponificados e esterificados, para preparar os ésteres metílicos dos ácidos graxos, utilizando-se a técnica de HARTMAN e LAGO (1986).

Em 50mg dos extratos foram adicionados 4 mL do reagente saponificante (hidróxido de sódio 0,5 N em metanol). As misturas foram aquecidas em banho-maria a 80°C por 15 minutos; após foi adicionado as misturas, 10 mL de reagente de esterificação (2g de cloreto de amônia, 3 mL de ácido sulfúrico e 6 mL de metanol), sendo a seguir aquecidas em banho-maria a 80°C durante 10 minutos, e resfriadas a temperatura ambiente até 40°C. Após o resfriamento foram adicionadas as misturas 0,5 mL de hexano (grau HPLC) e 5 mL de solução de cloreto de sódio a 20% e homogeneizadas em vórtex. Os sobrenadantes, ácidos metílicos, foram retirados através do auxílio de micropipetas e transferidos para frascos âmbar. Os ésteres metílicos foram novamente extraídos, repetindo a adição de 0,5 mL de hexano à mistura e homogeneizadas em vórtex, sendo retirado o sobrenadante e posteriormente reservados nos frascos âmbar. A seguir os ésteres metílicos foram evaporados com N<sub>2</sub> congelados e ressuspensos em 1mL de hexano para análise cromatográfica.

#### **4.11 Análise dos ácidos graxos**

A análise dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa, pela comparação dos tempos de retenção dos ésteres das amostras com padrões de metil ésteres (SIGMA®), 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, injetor split.

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

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

#### **4.12 Análise estatística**

Foi utilizado o software SigmaStat, na versão 2.03, para análise estatística, sendo empregados testes não-paramétricos.

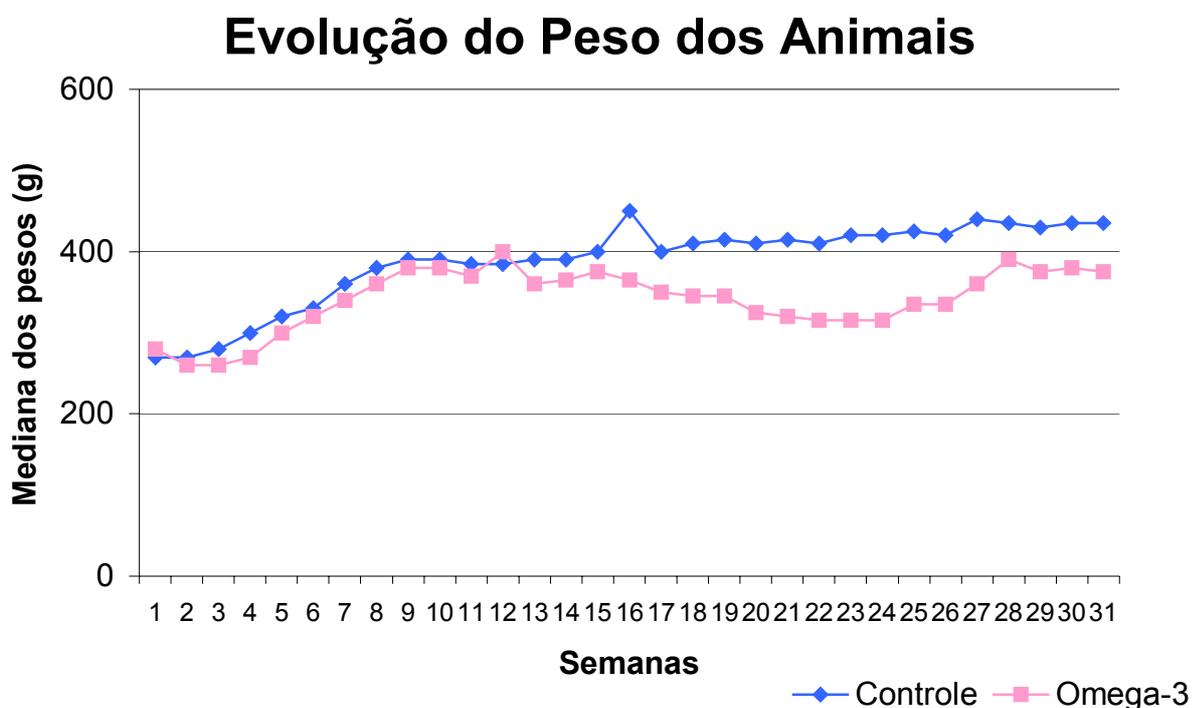
Para comparação de dois grupos independentes, foi utilizado o teste de Mann-Whitney e para comparação de três grupos independentes o teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo procedimento de comparações múltiplas de Dunn's.

O valor de  $p$  foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ), com o intuito de obter uma confiabilidade de 95% as comparações.

## 5 Resultados

### 5.1 Peso dos animais

No início do experimento o peso dos animais apresentou-se semelhante entre os dois grupos, sendo que a diferença entre eles não ultrapassava 10g. Ao longo do experimento o grupo controle apresentou maior peso em relação ao grupo ômega-3, com exceção na 11ª semana experimental. Diferenças estatísticas foram observadas entre os grupos da 2ª a 6ª semana, na 12ª e 15ª semana e da 28ª semana até o final do experimento na 30ª semana. A Figura 6 demonstra a evolução do peso dos animais de ambos os grupos.



Teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ) -semanas: 2, 3, 4, 5, 6, 12, 15, 28, 29, 30.

**Figura 6-** Evolução do peso dos animais

## 5.2. Ganho de peso

Na Figura 7 está demonstrado o ganho de peso dos animais a cada semana experimental.

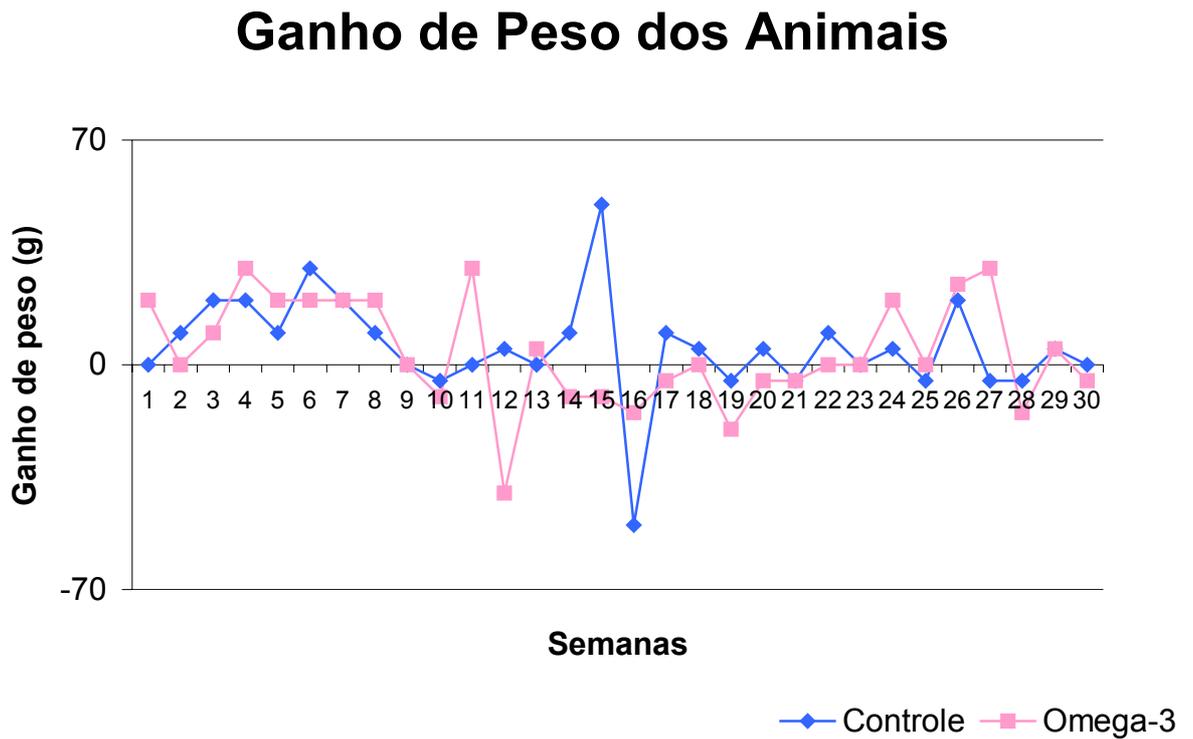
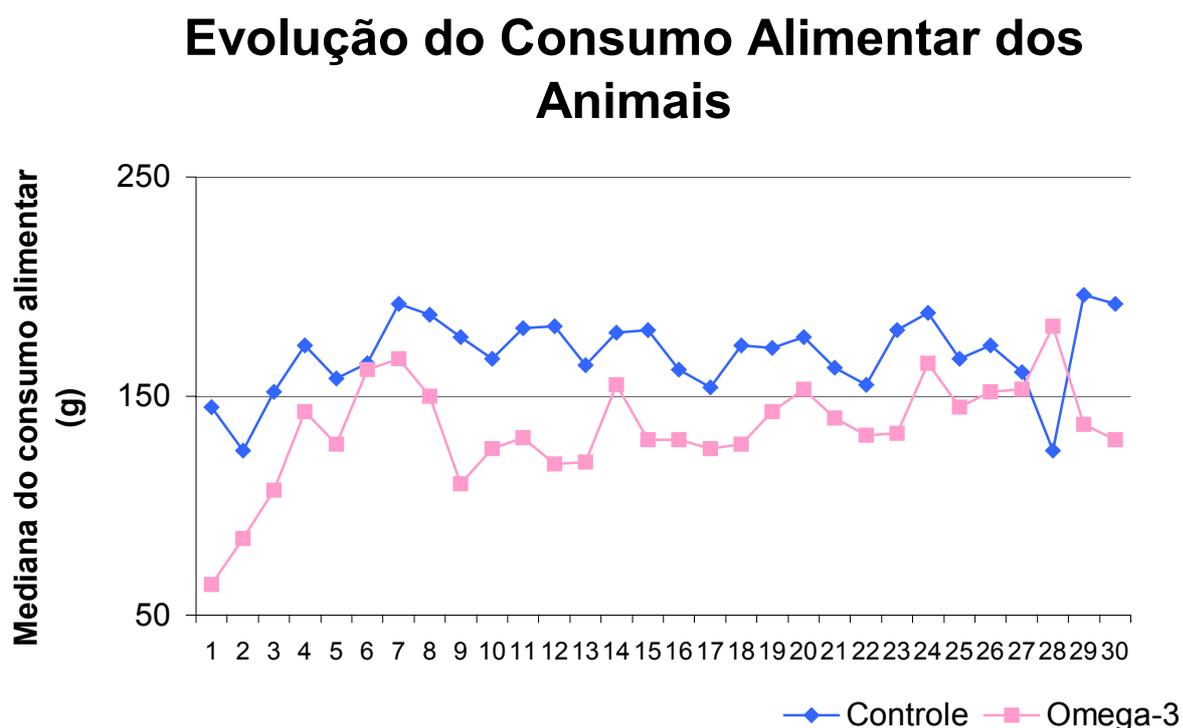


Figura 7 – Ganho de peso dos animais

### 5.3 Consumo de dietas

Conforme observado na Figura 8 houve um maior consumo de dieta pelos animais do grupo controle em relação aqueles do grupo ômega-3, com diferença estatística significativa da 1ª a 3ª semana, na 5ª semana, da 9ª a 13ª semana, na 23ª e na 29ª e 30ª semanas.

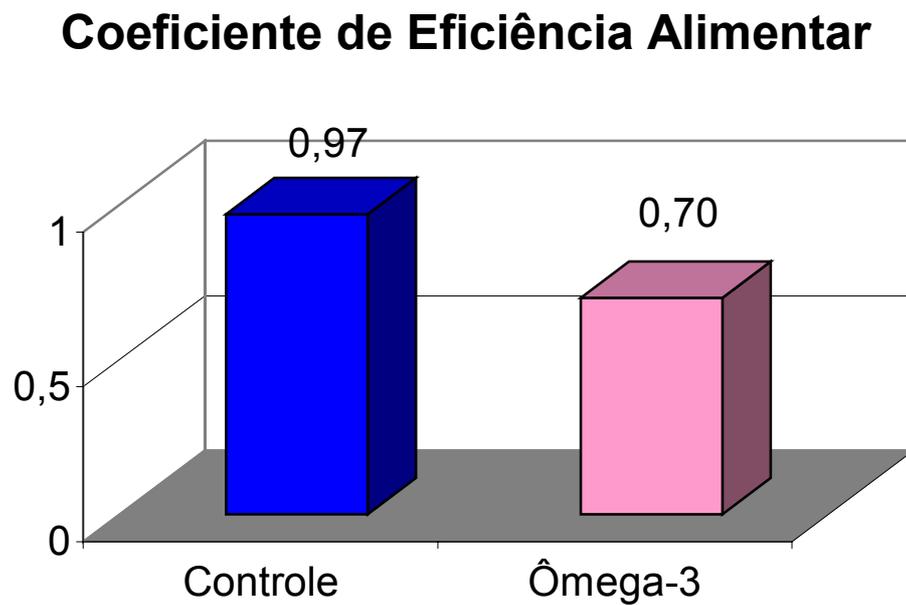


Teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ) semanas: 1, 2, 3, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 23, 29, 30.

**Figura 8-** Evolução do consumo alimentar

#### 5.4 Coeficiente de eficiência alimentar

Através do ganho de peso e consumo alimentar de ambos os grupos, foi calculado o coeficiente de eficiência alimentar. O grupo controle obteve maior coeficiente de eficiência alimentar em relação ao grupo ômega-3 (Figura 9).

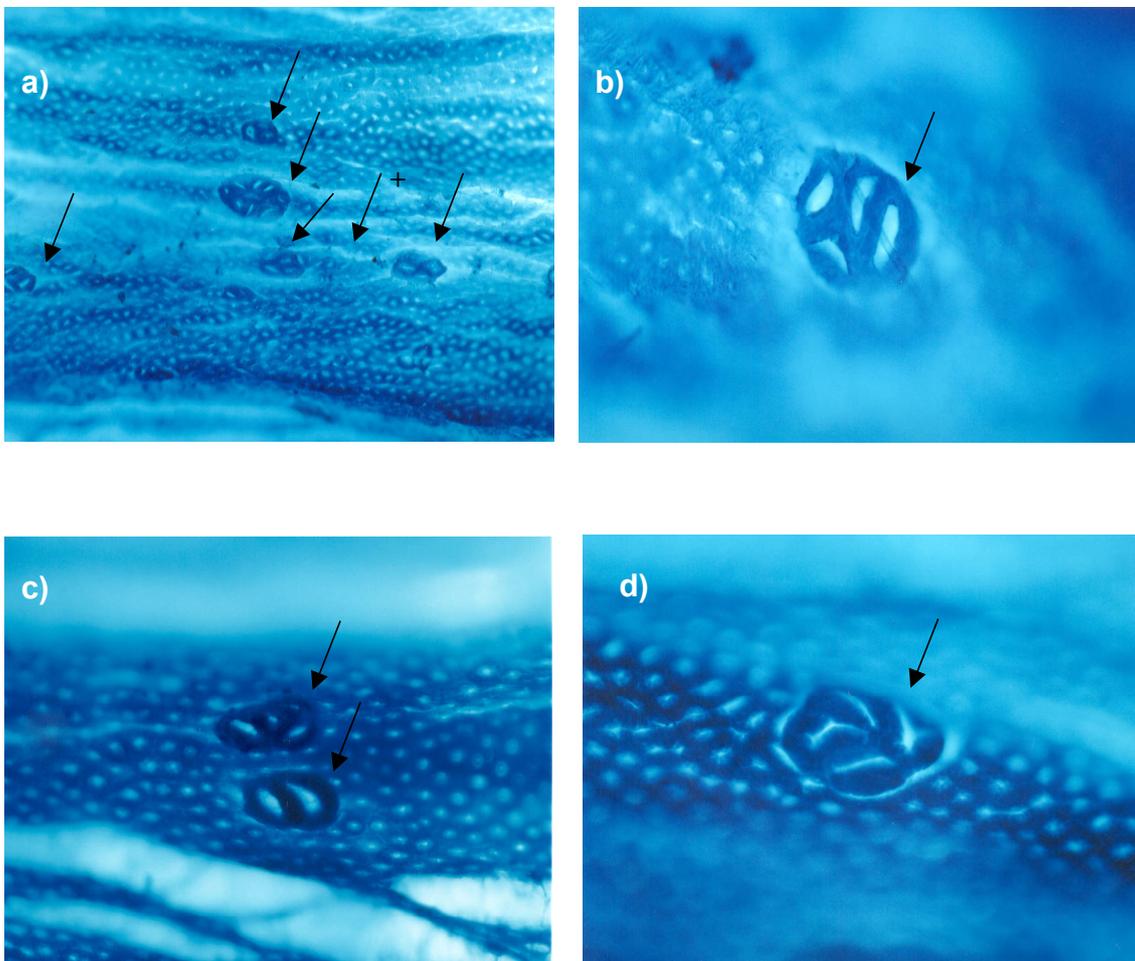


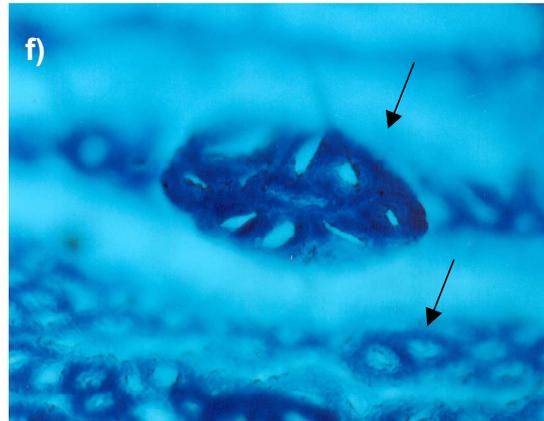
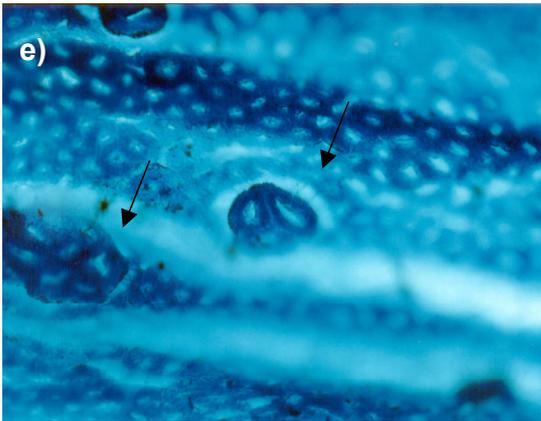
**Figura 9** – Coeficiente de eficiência alimentar

## 5.5 Focos de Criptas Aberrantes (FCA)

### 5.5.1 Número de FCA

No exame da mucosa colônica dos animais foram observados FCA nos grupos controle e ômega-3 (Figura 10).





**Figura 10** - FCA no intestino grosso de ratos Wistar, submetidos ao tratamento com DMH. a) Área de mucosa colônica normal (+) e presença de seis FCA: um com duas criptas, dois com três criptas, um com quatro criptas, um com cinco e um com nove criptas aberrantes localizados no centro da figura (40 X); b) FCA com 4 criptas aberrantes (100 X); c) FCA um com 4 criptas e um com 2 criptas (100 X); d) FCA com 4 criptas (100X); e) FCA um com 3 criptas e um com 8 criptas (100X); f) FCA com 10 criptas ao centro e um com duas criptas à direita do campo (100X). Azul de metileno.

Os resultados de FCA obtidos após 6 semanas de intervenção dietética foram utilizados como “tempo zero”, confirmando a eficácia da droga (DMH).

Após 13 e 30 semanas de intervenção dietética, os intestinos dos animais foram examinados (cólon e reto), e então se procedeu a contagem dos FCA, comparado-os em relação aos resultados obtidos no “tempo zero” e entre os grupos controle e ômega-3. Pela Tabela 6 observa-se que ocorreu diferença estatística após 30 semanas de intervenção dietética.

**Tabela 4 – Número de focos de criptas aberrantes (FCA)**

Semanas	Controle			Ômega-3			p <sup>a</sup>
	n	Média ± DP	Mediana <sup>b</sup>	n	Média ± DP	Mediana <sup>c</sup>	
<b>6</b>	6	99,00 ± 24,32	<b>108,00</b>	6	109,16 ± 22,58	<b>99,50</b>	0,818
<b>13</b>	22	161,77 ± 92,22	<b>137,50</b>	22	205,13 ± 77,98	<b>192,50</b>	0,069
<b>30</b>	20	216,45 ± 94,11	<b>234,00</b>	24	94,91 ± 38,73	<b>104,50</b>	<b>0,001</b>

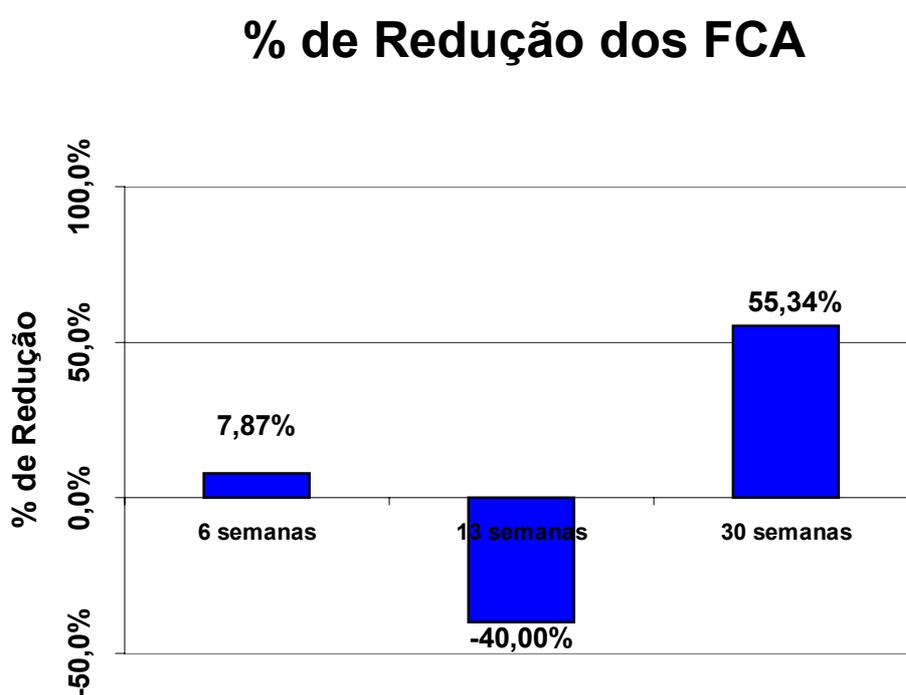
<sup>a</sup> Teste de Mann-Whitney

<sup>b</sup> Teste de Kruskal-Wallis (p=0,015). Teste de comparações múltiplas de Dunn's: 6 < 30

<sup>c</sup> Teste de Kruskal-Wallis (p=0,001). Teste de comparações múltiplas de Dunn's: 6<13; 13>30

### 5.5.2 Porcentagem de redução dos focos de criptas aberrantes

O cálculo da porcentagem de redução dos FCA foi realizado com base nos resultados apresentados na Tabela 6, utilizando-se a mediana. Verifica-se que houve uma redução de 55,34% nos FCA com 30 semanas de experimento, enquanto não ocorreu redução com 13 semanas e apenas 7,87% de redução no tempo zero (Figura 11).



**Figura 11:** Porcentagem de redução dos FCA, do grupo ômega-3 em relação ao controle com 6,13 e 30 semanas de intervenção dietética.

### 5.5.3 Categorização das criptas aberrantes

Os resultados das criptas aberrantes são apresentado nas Tabelas 5 e 6.

Pela Tabela 5, verifica-se que ocorreu diferença estatisticamente significativa entre o número de FCA com três ou menos criptas aberrantes, com 30 semana, havendo uma diminuição no grupo ômega-3.

Houve um aumento no número de focos com mais de 3 criptas aberrantes no grupo controle ao longo do tempo de experimentação. No grupo ômega-3 este aumento foi observado após 13 semanas e apesar de não ter sido obtida diferença estatisticamente significativa entre a análise feita com 13 e 30 semanas, houve uma redução após 30 semanas, como demonstrado na Tabela 6.

**Tabela 5 - Número de Focos de Criptas Aberrantes  $\leq 3$**

Semanas	Controle			Ômega-3			p <sup>a</sup>
	n	Média $\pm$ DP	Mediana <sup>b</sup>	n	Média $\pm$ DP	Mediana <sup>c</sup>	
6	6	93,33 $\pm$ 21,68	<b>105,00</b>	6	104 $\pm$ 14,36	<b>110,00</b>	0,4
13	22	134 $\pm$ 74,7	<b>109,00</b>	22	156,36 $\pm$ 51,41	<b>150,00</b>	0,29
30	20	147 $\pm$ 51,38	<b>157,50</b>	24	74,45 $\pm$ 26,07	<b>76,00</b>	<b>0,004</b>

<sup>a</sup> Teste de Mann-Whitney

<sup>b</sup> Teste de Kruskal-Wallis p = 0,254

<sup>c</sup> Teste de Kruskal-Wallis p = 0,001. Teste de comparações múltiplas de Dunn's: 13>30

**Tabela 6 - Número de Focos de Criptas Aberrantes > 3**

Semanas	Controle			Ômega-3			p <sup>a</sup>
	n	Média ± DP	Mediana <sup>b</sup>	n	Média ± DP	Mediana <sup>c</sup>	
6	6	6,33 ± 6,11	<b>5,00</b>	6	4,33 ± 2,08	<b>5,00</b>	1
13	22	27,54 ± 15,9	<b>21,00</b>	22	48,72 ± 42,67	<b>32,00</b>	0,178
30	20	68,6 ± 49,90	<b>52,50</b>	24	20,66 ± 11,04	<b>22,50</b>	<b>0,013</b>

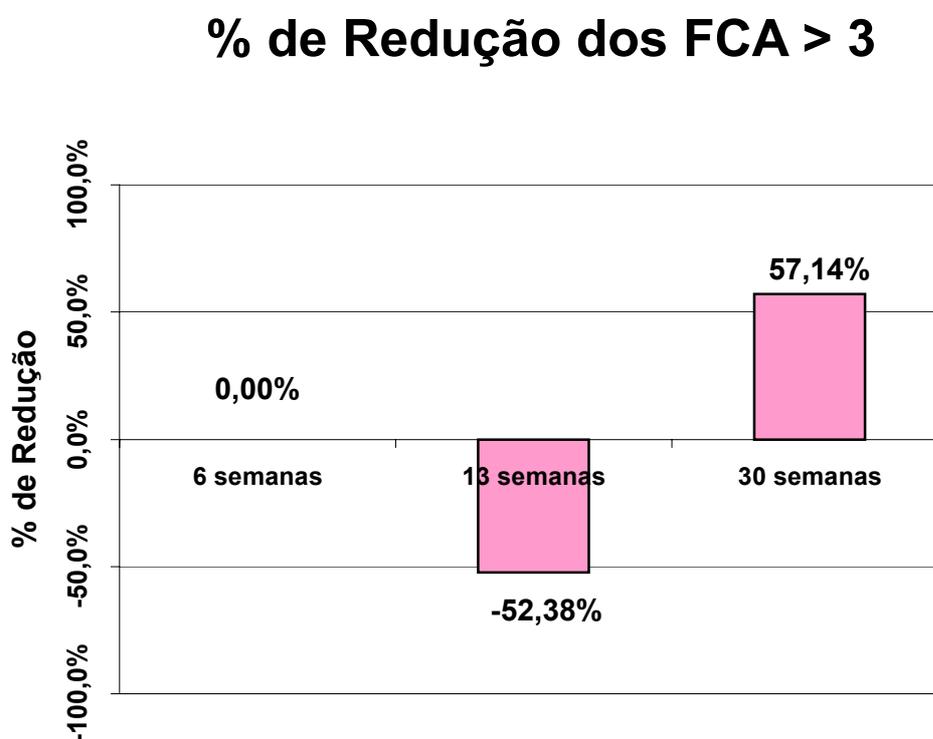
<sup>a</sup> Teste de Mann-Whitney

<sup>b</sup> Teste de Kruskal-Wallis p = 0,006. Teste de comparações múltiplas de Dunn's: 6 < 30

<sup>c</sup> Teste de Kruskal-Wallis p = 0,008. Teste de comparações múltiplas de Dunn's: 6 < 13

#### 5.5.4 Porcentagem de redução dos focos com mais de 3 criptas aberrantes

O cálculo de porcentagem de redução foi feito também para os focos com mais de 3 criptas aberrantes, após cada sacrifício, utilizando a mediana do grupo ômega-3 em relação ao controle. Somente após 30 semanas, ocorreu uma redução de 57,14%, como verificado na Figura 12.



**Figura 12:** Porcentagem de redução dos FCA > 3 do grupo ômega-3 em relação ao controle com 6,13 e 30 semanas de intervenção dietética.

### 5.5.5 Distribuição do número de FCA

As Tabelas 7 e 8 apresentam os números de FCA de acordo com as regiões analisadas na mucosa intestinal do cólon ao reto denominadas: proximal, médio e distal, separadamente para os grupos controle e ômega-3.

A maioria dos FCA foi encontrada nos fragmentos médios e distais em ambos os grupos.

Na Tabela 7, é demonstrado que a mediana do número de FCA/região entre os grupos mostrou-se significativamente diferente em todas as regiões em relação às análises feitas após 30 semanas de intervenção dietética. Porém, foi observada apenas uma diferença estatística na 13ª semana, na região média entre os grupos controle e ômega-3.

**Tabela 7 - Número de FCA/ região - grupo controle**

Semanas	6 (n=6)		13 (n=22)		30 (n=20)	
	X ± DP	Mediana <sup>a</sup>	X ± DP	Mediana <sup>b</sup>	X ± DP	Mediana <sup>c</sup>
<b>Proximal</b>	12 ± 3,74	<b>11,50</b>	18,95 ± 14,5	<b>15,50</b>	28,45 ± 22,32	<b>23,50</b>
<b>Médio</b>	51,33 ± 16,14	<b>57,50</b>	79,77 ± 52,84	<b>60,00</b>	108,85 ± 43,39	<b>110,00</b>
<b>Distal</b>	35,66 ± 7,11	<b>37,50</b>	63,04 ± 42,22	<b>62,50</b>	79,15 ± 46,16	<b>88,50</b>

<sup>a</sup>Teste de Kruskal-Wallis  $p = 0,002$ . Teste de comparações múltiplas de Dunn's: proximal < médio

<sup>b</sup>Teste de Kruskal-Wallis  $p = 0,001$ . Teste de comparações múltiplas de Dunn's: proximal < médio; distal

<sup>c</sup>Teste de Kruskal-Wallis  $p = 0,001$ . Teste de comparações múltiplas de Dunn's: proximal < médio; distal

**Tabela 8 - Número de FCA/ região - grupo ômega-3**

Semanas	6 (n=6)		13 (n=22)		30 (n=24)	
	X ± DP	Mediana <sup>a</sup>	X ± DP	Mediana <sup>b</sup>	X ± DP	Mediana <sup>c</sup>
<b>Proximal</b>	7,5 ± 6,59	<b>6,50</b>	18,18 ± 15,20	<b>11,50</b>	9,87 ± 7,13	<b>8,00</b>
<b>Médio</b>	60,83 ± 15,88	<b>55,00</b>	110,81 ± 50,53	<b>95,50</b>	56,08 ± 28,34	<b>63,00</b>
<b>Distal</b>	40,83 ± 8,01	<b>42,50</b>	76,13 ± 45,07	<b>72,50</b>	28,95 ± 18,76	<b>27,00</b>

<sup>a</sup>Teste de Kruskal-Wallis p = 0,001. Teste de comparações múltiplas de Dunn's: proximal < médio

<sup>b</sup>Teste de Kruskal-Wallis p = 0,001. Teste de comparações múltiplas de Dunn's: proximal < médio; distal

<sup>c</sup>Teste de Kruskal-Wallis p = 0,001. Teste de comparações múltiplas de Dunn's: proximal < médio; distal

**Tabela 9 - Mediana do número de FCA/região - grupos controle e ômega-3**

Semanas	Proximal			Médio			Distal		
	Controle	Ômega-3	p*	Controle	Ômega-3	p*	Controle	Ômega-3	p*
<b>6</b>	11,5	6,5	0,18	57,5	55	0,81	37,5	42,5	0,24
<b>13</b>	15,5	11,5	0,511	60	95,5	<b>0,024</b>	62,5	72,5	0,36
<b>30</b>	23,5	8	<b>0,001</b>	110	63	<b>0,001</b>	88,5	27	<b>0,001</b>

\* Teste de Mann-Whitney

## **5.6 Perfil dos ácidos graxos**

### **5.6.1 Perfil dos ácidos graxos dos tecidos hepáticos do grupo controle e ômega-3 na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas**

Na Tabela 10 são descritos o perfil dos ácidos graxos das dietas controle e ômega-3.

Na Tabela 11 encontra-se o perfil dos ácidos graxos dos tecidos hepáticos dos animais do grupo controle, na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas do experimento, sendo observada a relação entre os tecidos nas diferentes semanas estudadas. Entre os ácidos graxos saturados totais, não é detectada diferença estatística, existindo esta com relação aos ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados da 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semana do experimento.

O mesmo em relação ao perfil dos ácidos graxos do tecido hepático do grupo ômega-3 é observado na Tabela 12. É notável que não houve diferença estatística no somatório entre os ácidos graxos.

A mediana dos ácidos graxos do tecido hepático dos animais controle e ômega-3 encontram-se na Tabela 13, sendo visualizada a sua relação entre os grupos controle e ômega-3 em cada semana estudada. Diferença estatística é observada entre os ácidos saturados e polinsaturados totais na 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas de estudo. Porém observou-se esta diferença com relação aos ácidos monoinsaturados totais apenas na 13<sup>a</sup> semana do experimento. Não foram verificadas diferenças estatísticas quanto aos ácidos graxos analisados na 6<sup>a</sup> semana de estudo.

Tabela 10 - Perfil dos ácidos graxos da dieta controle e da dieta suplementada com ômega-3

Ácidos graxos (%)	Dieta Controle		Dieta Ômega-3	
	Média + DP	Mediana	Média + DP	Mediana
C14 Mirístico	3,5 ± 1,93	3,5	5,6 ± 0,83	5,34
C16 Palmítico	17,74 ± 1,63	17,23	13,13 ± 0,64	13,13
C17 Heptadecanóico			0,56 ± 0,03	0,56
C18 Esteárico	2,9 ± 0,32	2,98	4,19 ± 0,56	4,1
C20 Araquídico	0,32 ± 0,09	0,32	0,52 ± 0,05	0,52
<b>Saturados</b>	<b>23,13 ± 1,21</b>	<b>22,74</b>	<b>23,66 ± 24,42</b>	<b>24,42</b>
C16:1 Palmitoléico			9,14 ± 1,83	10,15
C18:1Oléico	35,41 ± 0,56	35,18	11,91±1,31	12,21
C20:1Eicosaenóico			1,38 ± 0,27	1,24
<b>Monoinsaturados</b>	<b>35,41 ± 0,56</b>	<b>35,18</b>	<b>22,44 ± 1,99</b>	<b>22,43</b>
C18:2 Linoléico	40,43 ± 0,98	40,69	12,08 ± 0,79	12,17
C20:2 Eicosadienóico			2,92 ± 0,09	2,92
C22:2 Docosadienóico			0,59 ± 0,09	0,59
C18:3 Linolênico	0,49 ± 0,04	0,49	1,7 ± 0,26	1,81
C20:3 Eicotrienóico			1,14 ± 0,33	1,2
C20:4 Araquidônico			0,71 ± 0,29	0,63
C20:5 EPA			20,66 ± 1,95	21,44
C20:6 DHA			15,27 ± 2,08	15,27
<b>Polinsaturados</b>	<b>40,76 ± 1,27</b>	<b>41,15</b>	<b>53,92 ± 4,21</b>	<b>53,23</b>

Tabela 11 - Comparações entre o perfil dos ácidos graxos dos tecidos hepáticos do grupo controle na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas

Ácidos graxos (%)	6 semanas (n=3)		13 semanas (n=10)		30 semanas (n=9)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
C16 Palmítico	19,26 ± 4,09	19,47 <sup>ab</sup>	27,14 ± 5,36	29,24 <sup>a</sup>	18,33 ± 3,33	17,16 <sup>b</sup>
C18 Esteárico	9,69 ± 4,1	10,46 <sup>ab</sup>	8,33 ± 5,8	5,2 <sup>a</sup>	15,74 ± 2,79	15,2 <sup>b</sup>
Saturados	28,96 ± 8,18	29,93 <sup>a</sup>	35,47 ± 4,56	33,51 <sup>a</sup>	34,07 ± 5,39	32,72 <sup>a</sup>
C16:1 Palmitoléico			7,67 ± 1,63	7,42 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,3	0,57 <sup>b</sup>
C18:1 Oléico	13,4 ± 5,59	15,82 <sup>ab</sup>	25,02 ± 6,86	27,26 <sup>a</sup>	9,22 ± 2,85	8,58 <sup>b</sup>
Monoinsaturados	13,4 ± 5,59	15,82 <sup>ab</sup>	29,81 ± 10,83	33,77 <sup>a</sup>	9,64 ± 3,06	8,9 <sup>b</sup>
C18:2 Linoléico	23,71 ± 8,19	25,47 <sup>a</sup>	23,05 ± 6,32	21,58 <sup>a</sup>	19,85 ± 2,56	20,46 <sup>a</sup>
C20:4 Araquidônico	14,65 ± 4,91	16,68 <sup>ab</sup>	10,9 ± 5,84	11,37 <sup>a</sup>	26,99 ± 5,95	29,98 <sup>b</sup>
C20:6 DHA			3,87 ± 1,56	4,58 <sup>a</sup>	9,35 ± 2,73	8,33 <sup>b</sup>
Polinsaturados	38,36 ± 12,73	43,69 <sup>ab</sup>	36,10 ± 12,74	37,53 <sup>a</sup>	56,52 ± 9,46	58,79 <sup>b</sup>
NI	19,27 ± 9,12	22,39 <sup>a</sup>	3,26 ± 3,22	2,09 <sup>a</sup>	1,09 ± 0,59	1,12 <sup>a</sup>

Teste de Kruskal-Wallis p < 0,005. Teste de comparações múltiplas de Dunn's:

<sup>a</sup> -sem diferença entre os grupos

<sup>a, b, c</sup> - diferença entre os 3 grupos

NI - não identificados

Tabela 12- Comparações entre o perfil dos ácidos graxos dos tecidos hepáticos do grupo ômega-3 na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas

Ácidos graxos (%)	6 semanas (n=3)		13 semanas (n=10)		30 semanas (n=10)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
C14 Mirístico						
C16 Palmítico	18,41 ± 3,25	19,12 <sup>a</sup>	18,93 ± 2,48	19,12 <sup>a</sup>	18,95 ± 2,28	17,68 <sup>a</sup>
C18 Esteárico	9,81 ± 0,19	9,73 <sup>a</sup>	8,42 ± 1,97	7,92 <sup>a</sup>	8,37 ± 1,35	8,09 <sup>a</sup>
Saturados	28,22 ± 3,44	29,16 <sup>a</sup>	27,53 ± 4,75	27,33 <sup>a</sup>	27,53 ± 1,94	27,2 <sup>a</sup>
C16:1 Palmitoléico						
C18:1Oléico	7,82 ± 1,15	7,4 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,34	1,77	2,23 ± 0,55	2,21
Monoinsaturados	7,82 ± 1,15	8,83 <sup>a</sup>	8,12 ± 2,26	8,10 <sup>a</sup>	8,65 ± 1,72	8,44 <sup>a</sup>
C18:2 Linoléico	14,27 ± 3,4	13,83 <sup>a</sup>	9,22 ± 2,93	9,72 <sup>a</sup>	10,47 ± 2,61	10,3 <sup>a</sup>
Diinsaturados	14,27 ± 3,4	13,83 <sup>a</sup>	12,06 ± 1,29	11,72 <sup>a</sup>	11,60 ± 1,89	10,89 <sup>a</sup>
C20:4 Araquidônico	8,22 ± 0,61	8,27 <sup>a</sup>	12,06 ± 1,29	11,72 <sup>a</sup>	11,60 ± 1,89	10,89 <sup>a</sup>
C20:5 EPA	11,03 ± 0,54	7,69 <sup>a</sup>	6,99 ± 1,95	7,04 <sup>a</sup>	7,36 ± 2,24	7,07 <sup>a</sup>
C20:6 DHA	29,07 ± 1,8	28,37 <sup>a</sup>	8,47 ± 2,98	7,69 <sup>a</sup>	8,64 ± 2,88	9,75 <sup>a</sup>
Polinsaturados	48,28 ± 2,58	48,22 <sup>a</sup>	34,41 ± 4,37	32,78 <sup>a</sup>	34,04 ± 5,29	33,49 <sup>a</sup>
NI	2,08 ± 0,91	2,08 <sup>a</sup>	49,96 ± 5,02	51,05 <sup>a</sup>	49,32 ± 3,66	50,69 <sup>a</sup>
			1,51 ± 0,02	1,52 <sup>a</sup>	2,0 ± 1,77	2,29 <sup>a</sup>

Teste de Kruskal-Wallis p < 0,005. Teste de comparações múltiplas de Dunn's:

<sup>a</sup> -sem diferença entre os grupos

<sup>a, b, c</sup> - diferença entre os 3 grupos

NI - não identificados

Tabela 13 - Comparações do perfil dos ácidos graxos do tecido hepático entre os grupos controle (CT) e ômega-3 ( $\omega$ -3) na 6ª, 13ª e 30ª semanas

Ácidos graxos (%)	6 semanas			13 semanas			30 semanas		
	Mediana CT	Mediana $\omega$ -3	p*	Mediana CT	Mediana $\omega$ -3	p*	Mediana CT	Mediana $\omega$ -3	Mediana CT p*
C16 Palmítico	19,47	19,12	0,7	29,24	19,12	<b>0,004</b>	17,16	17,68	0,27
C18 Esteárico	10,46	9,73	0,7	5,2	7,92	0,488	15,2	8,09	<b>0,001</b>
Saturados	29,93	29,16	1	33,51	27,33	<b>0,001</b>	32,72	27,2	<b>0,001</b>
C16:1 Palmitoléico				7,42	1,77	<b>0,004</b>	0,57	2,21	<b>0,002</b>
C18:1 Oléico	15,82	7,4	0,4	27,26	8,1	<b>0,001</b>	8,58	8,44	0,838
Monoinsaturados	15,82	8,83	0,4	33,77	9,72	<b>0,001</b>	8,9	10,3	0,488
C18:2 Linoléico	25,47	13,83	0,2	21,58	11,72	<b>0,001</b>	20,46	10,89	<b>0,001</b>
C20:4 Araquidônico	16,68	8,27	0,1	11,37	7,04	0,206	29,98	7,07	<b>0,001</b>
C20:5 EPA		7,69			7,69			9,75	
C20:6 DHA		28,37		4,58	32,78	<b>0,003</b>	8,33	33,49	<b>0,001</b>
Polinsaturados	43,69	62,05	0,1	37,53	61,91	<b>0,001</b>	58,79	61,58	0,131
NI	22,39	2,08	0,2	2,09	1,52	0,786	1,12	2,29	0,393

\* Teste de Mann-Whitney

### **5.6.2 Perfil dos ácidos graxos das gorduras viscerais do grupo controle e ômega-3 na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas**

Entre as comparações do perfil dos ácidos graxos das gorduras viscerais do grupo controle nas diferentes semanas avaliadas, é demonstrado diferença estatística dos ácidos graxos saturados e polinsaturados na 30<sup>a</sup> semana experimental em relação às demais semanas (Tabela 14).

Na Tabela 15 é apresentado o perfil dos ácidos graxos das gorduras viscerais do grupo ômega-3. Nesta é observada diferença estatística no somatório dos ácidos graxos saturados na 30<sup>a</sup> semana em relação a demais semanas e dos ácidos graxos polinsaturados entre a 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas de intervenção dietética.

As comparações do perfil dos ácidos graxos da gordura visceral entre os grupos controle e ômega-3 nas diferentes semanas estudadas, são observadas na Tabela 16, sendo verificada diferença estatística entre os ácidos graxos saturados e polinsaturados totais, tanto na 13<sup>a</sup> quanto na 30<sup>a</sup> semana de estudo. Não sendo observada diferença estatística na 6<sup>a</sup> semana de intervenção dietética.

Tabela 14- Comparações entre o perfil dos ácidos graxos das gorduras viscerais do grupo controle na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas

Ácidos graxos (%)	6 semanas (n=3)		13 semanas (n=10)		30 semanas (n=10)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
C14 Mirístico	1,79 ± 0,27	1,78 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,1	1,49 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,17	0,8 <sup>b</sup>
C16 Palmítico	31,84 ± 4,16	30,56 <sup>a</sup>	25,36 ± 1,5	24,04 <sup>ab</sup>	20,25 ± 3,84	18,9 <sup>b</sup>
C18 Esteárico	4,33 ± 0,58	4,38 <sup>a</sup>	3,32 ± 0,48	2,9 <sup>ab</sup>	2,83 ± 0,27	2,95 <sup>b</sup>
Saturados	37,96 ± 4,97	36,72 <sup>a</sup>	29,38 ± 2,44	30,79 <sup>a</sup>	23,56 ± 3,3	21,31 <sup>b</sup>
C16:1 Palmitoléico	7,4 ± 1,29	7,31 <sup>a</sup>	6,91 ± 0,91	6,97 <sup>a</sup>	2,89 ± 0,79	2,72 <sup>b</sup>
C18:1Oléico	36,76 ± 1,78	36,55 <sup>a</sup>	34,55 ± 2,32	34,27 <sup>a</sup>	34,78 ± 4,84	32,94 <sup>a</sup>
Monoinsaturados	44,16 ± 2,78	42,71 <sup>a</sup>	41,47 ± 2,7	41,68 <sup>a</sup>		35,44 <sup>a</sup>
C18:2 Linoléico	17,37 ± 7,16	20,55 <sup>a</sup>	27,06 ± 2,26	27,37 <sup>a</sup>	37,62 ± 6,96	39,79 <sup>b</sup>
C18:3 Linolénico			1,46 ± 0,23	1,53 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,07	1,33 <sup>a</sup>
C20:4 Araquidônico					0,73 ± 0,13	0,72
Polinsaturados	17,37 ± 7,16	20,55 <sup>a</sup>	27,65 ± 1,99	27,67 <sup>a</sup>	38,98 ± 6,77	39,79 <sup>b</sup>
NI	0,51 ± 0,0	0,51 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,0	0,93 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,0	0,4 <sup>a</sup>

Teste de Kruskal-Wallis p < 0,005. Teste de comparações múltiplas de Dunn's:

<sup>a</sup> -sem diferença entre os grupos

<sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup> - diferença entre os 3 grupos

NI - não identificados

Tabela 15 - Comparações entre o perfil dos ácidos graxos das gorduras viscerais do grupo ômega-3 na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas

Ácidos graxos (%)	6 semanas (n=3)		13 semanas (n=11)		30 semanas (n=12)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
C14 Mirístico	4,33 ± 0,25	4,27 <sup>a</sup>	4,87 ± 0,6	4,81 <sup>a</sup>	4,495 ± 0,568	4,46 <sup>a</sup>
C16 Palmítico	34 ± 0,37	34,02 <sup>a</sup>	35,06 ± 6,03	36,23 <sup>a</sup>	27,33 ± 3,99	26,9 <sup>b</sup>
C18 Esteárico	5,46 ± 0,71	5,36 <sup>a</sup>	5,23 ± 0,77	5,55 <sup>a</sup>	4,06 ± 0,546	3,9 <sup>b</sup>
Saturados	43,79 ± 0,156	43,77 <sup>a</sup>	45,16 ± 6,71	46,65 <sup>a</sup>	35,88 ± 4,5	34,97 <sup>b</sup>
C16:1 Palmitoléico	7,92 ± 1,82	7,66 <sup>a</sup>	8,49 ± 1,55	8,56 <sup>a</sup>	8 ± 2,33	8,8 <sup>a</sup>
C18:1Oléico	31,97 ± 1,8	31,95 <sup>a</sup>	30,09 ± 3,81	31,16 <sup>a</sup>	27,6 ± 3,789	27,67 <sup>a</sup>
Monoinsaturados	40,06 ± 0,47	40,03 <sup>a</sup>	38,59 ± 4,139	38,46 <sup>a</sup>	36,15 ± 2,65	36,41 <sup>a</sup>
C18:2 Linoléico	15,51 ± 1,06	14,96 <sup>a</sup>	11,87 ± 8,47	13,85 <sup>a</sup>	17,31 ± 4,98	14,28 <sup>a</sup>
C18:3 Linolénico					1,28 ± 0,14	1,27
C20:5 EPA					2,61 ± 1,47	1,61
C20:6 DHA					6,98 ± 1,52	6,55
Polinsaturados	15,51 ± 1,06	14,96 <sup>ab</sup>	13,35 ± 6,30	13,85 <sup>a</sup>	26,16 ± 5,28	25,48 <sup>b</sup>
NI	0,55 ± 0,0	0,55 <sup>a</sup>	5,17 ± 6,12	1,09 <sup>a</sup>	2,36 ± 2,7	1,29 <sup>a</sup>

Teste de Kruskal-Wallis p < 0,005. Teste de comparações múltiplas de Dunn's:

<sup>a</sup> -sem diferença entre os grupos

<sup>a b c</sup> - diferença entre os 3 grupos

NI - não identificados

Tabela 16 - Comparações do perfil dos ácidos graxos da gordura visceral entre os grupos controle (CT) e ômega-3 ( $\omega$ -3) na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas

Ácidos graxos (%)	6 semanas			13 semanas			30 semanas		
	Mediana CT	Mediana $\omega$ -3	p*	Mediana CT	Mediana $\omega$ -3	p*	Mediana CT	Mediana $\omega$ -3	p*
C14 Mirístico	1,78	4,27	0,1	1,49	4,81	0,001	0,8	4,46	0,01
C16 Palmítico	30,56	34,02	0,7	24,04	36,23	0,001	18,9	26,9	0,002
C18 Esteárico	4,38	5,36	0,2	2,9	5,55	0,001	2,95	3,9	0,001
Saturados	36,72	43,77	0,1	30,79	46,65	0,001	21,31	34,97	0,001
C16:1 Palmitoléico	7,31	7,66	0,7	6,97	8,56	0,022	2,72	8,8	0,001
C18:1 Oléico	36,55	31,95	0,1	34,27	31,16	0,003	32,94	27,67	0,002
Monoinsaturados	42,71	40,03	0,1	41,68	38,46	0,053	35,44	36,41	0,817
C18:2 Linoléico	20,55	14,96	0,7	27,37	13,85	0,001	39,79	14,28	0,001
C18:3 Linolénico				1,53			1,33	1,27	0,534
C20:4 Araquidônico							0,72		
C20:5 EPA								1,61	
C20:6 DHA								6,55	
Polinsaturados	20,55	14,96	0,7	27,65	13,85	0,001	39,79	25,48	0,001
NI	0,51	0,55	1	0,93	1,09a	1	0,4	1,29	0,333

\* Teste de Mann-Whitney

### **5.6.3 Perfil dos ácidos graxos dos tecidos hepáticos e das gorduras viscerais do grupo controle na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas**

Na Tabela 17, encontram-se as comparações do perfil dos ácidos graxos analisados no fígado e na gordura visceral dos animais do grupo controle na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas estudadas. Observou-se diferença estatística com relação ao somatório dos ácidos saturados, monoinsaturados e polinsaturados na 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas. Não sendo verificada diferença entre os ácidos graxos na 6<sup>a</sup> semana experimental.

### **5.6.4 Perfil dos ácidos graxos dos tecidos hepáticos e das gorduras viscerais do grupo ômega-3 na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas**

As comparações do perfil de ácidos graxos dos tecidos do fígado e da gordura visceral nas diferentes semanas de estudo do grupo experimental ômega-3, são visualizadas na Tabela 18. Na 6<sup>a</sup> semana de estudo, não é visto diferença estatística entre os ácidos graxos, sendo esta encontrada entre os ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados totais na 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas de estudo.

Tabela 17 - Comparação do perfil dos ácidos graxos dos tecidos hepáticos (FIG) e da gordura visceral (GV) do grupo controle na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas

Ácidos graxos (%)	6 semanas			13 semanas			30 semanas		
	Mediana FIG	Mediana GV	p*	Mediana FIG	Mediana GV	p*	Mediana FIG	Mediana GV	p*
C14 Mirístico		1,78			1,49			0,8	
C16 Palmítico	19,47	30,56	0,1	29,24	24,04	0,348	17,16	18,9	0,153
C18 Esteárico	10,46	4,38	0,1	5,2	2,9	0,01	15,2	2,95	<b>0,001</b>
Saturados	29,93	36,72	0,2	33,51	30,79	<b>0,002</b>	32,72	21,31	<b>0,001</b>
C16:1 Palmitoléico		7,31		7,42	6,97	0,358	0,57	2,72	<b>0,003</b>
C18:1 Oléico	15,82	36,55	0,1	27,26	34,27	<b>0,001</b>	8,58	32,94	<b>0,001</b>
Monoinsaturados	15,82	42,71	0,1	33,77	41,68	0,009	8,9	35,44	<b>0,001</b>
C18:2 Linoléico	25,47	20,55		21,58	27,37	0,206	20,46	39,79	<b>0,001</b>
C20:4 Araquidônico	16,68			11,37			29,98	0,72	<b>0,002</b>
C20:5 EPA									
C20:6 DHA				4,58			8,33		
Polinsaturados	43,69	20,55	0,1	56,49	27,67	<b>0,002</b>	38,33	39,79	0,391
NI	22,39	0,51	0,5	2,09	0,93	0,857	1,12	0,4	0,5

\* Teste de Mann-Whitney

Tabela 18 - Comparação do perfil dos ácidos graxos dos tecidos hepáticos (FIG) e da gordura visceral (GV) do grupo ômega-3 na 6ª, 13ª e 30ª semanas

Ácidos graxos (%)	6 semanas			13 semanas			30 semanas		
	Mediana FIG	Mediana GV	p*	Mediana FIG	Mediana GV	p*	Mediana FIG	Mediana GV	p*
C14 Mirístico		4,27			4,81			4,46	
C16 Palmítico	19,12	34,02	0,1	19,12	36,23	0,001	17,68	26,9	0,001
C18 Esteárico	9,73	5,36	0,1	7,92	5,55	0,001	8,09	3,9	0,001
Saturados	29,16	43,77	0,1	27,33	46,65	0,001	27,2	34,97	0,001
C16:1 Palmitoléico		7,66		1,77	8,56	0,001	2,21	8,8	0,001
C18:1 Oléico	7,4	31,95	0,1	8,1	31,16	0,001	8,44	27,67	0,001
Monoinsaturados	8,83	40,03	0,1	9,72	38,46	0,001	10,3	36,41	0,001
C18:2 Linoléico	13,83	14,96	0,7	11,72	13,85	0,549	10,89	14,28	0,002
C20:4 Araquidônico	8,27			7,04			7,07		
C20:5 EPA	7,69			7,69			9,75	1,61	0,001
C20:6 DHA	28,37			32,78			33,49	6,55	0,001
Polinsaturados	62,05	14,96	0,1	61,91	13,85	0,001	61,58	25,18	0,001
NI	2,08	0,55	0,667	1,52	1,09	0,786	2,29	1,29	0,841

\* Teste de Mann-Whitney

## 6 Discussão

Os FCA presentes nos grupos tratados com DMH comprovaram a eficácia do modelo de carcinogênese descrito por BIRD (1987).

Ao início do experimento o peso dos animais apresentava-se semelhante, sem diferença estatisticamente significativa. No entanto ao visualizarmos a evolução do peso dos animais é notado que o grupo controle apresenta maior ganho de peso ao longo do experimento em relação ao grupo ômega-3.

O grupo ômega-3 apresenta diminuição do peso em algumas semanas experimentais, principalmente a partir da 15<sup>a</sup> semana, sendo observado que nas semanas experimentais finais este comportamento se modifica e o grupo ômega-3 começa a recuperar o peso.

Entretanto, devemos considerar que o grupo ômega-3 estava sendo tratado contra a carcinogênese e não acompanhou a evolução ponderal do grupo controle. Talvez possa ter havido um maior acúmulo de gordura no grupo controle, e apresentando uma adiposidade mais elevada, possa ter aumentado o risco de câncer de cólon. Segundo MARTINEZ *et al.* (1996), a adiposidade mais elevada aumenta o risco de câncer de cólon.

Percebe-se que a dieta suplementada com óleo de peixe, denominada dieta ômega-3, apresenta alta porcentagem de PUFA, como era de se esperar, devido ao elevado conteúdo de EPA (C20:5) e DHA (C20:6), presentes no óleo de peixe, utilizado na elaboração da dieta. A proporção ômega-6: ômega-3 presente nesta ração foi de 0,37:1.

Já na dieta controle, esta relação apresenta-se na proporção de 82,5:1, demonstrando uma alta concentração do ácido linoléico, uma vez que nesta foi utilizado somente óleo de soja, rico neste PUFA ômega-6, como verificado pelas

análises realizadas por SABARENSE (2003), detectando que 54,7% da concentração correspondia ao ácido linoléico e somente 5,03 ao ácido linolênico.

Quando se observa o consumo de dieta, nota-se um maior consumo pelo grupo controle em comparação ao ômega-3, entretanto, a dieta suplementada com ômega-3 apresenta maior densidade calórica em relação à dieta controle. Então o maior consumo de dieta pelo grupo controle não justifica o maior ganho de peso desses animais, visto que em termos calóricos o consumo foi semelhante entre os grupos.

As pré-lesões cancerosas (FCA) apresentam-se diferentemente nos diversos estágios ou fases da carcinogênese.

Após quatro semanas da última aplicação da DMH, ou seis semanas de intervenção dietética, denominado “tempo zero” foi verificada a presença de FCA no intestino (cólon e reto) dos animais sacrificados. No nosso estudo foi utilizada a DMH, que segundo ANISIMOV *et al.* (2002), é um dos carcinógenos mais freqüentemente utilizado em modelo experimental. As transformações malignas, nos diversos estágios da carcinogênese e os carcinomas de cólon induzidos por essa droga, são similares aos que ocorrem naturalmente em humanos. No modelo empregado, foi verificada a eficácia da DMH, no tempo zero, em induzir FCA. No entanto, com relação à intervenção dietética com ômega-3, não foi observada diferença em relação ao número de FCA do grupo controle. Já, ONOGI *et al.* (1996) notaram menor número de FCA nos animais tratados com óleo de perilla, rico em ácido linolênico, ( $p < 0,001$ ) em comparação aos que consumiam dieta com óleo de girassol e óleo de oliva, sendo que estes resultados foram obtidos após duas semanas da aplicação da AOM. Há de se considerar que, apesar do autor ter trabalhado com um óleo rico em ômega-3, o modelo não serve para compararmos os resultados por terem utilizado tempos diferentes. Apenas pode-se confirmar a importância do uso do ômega-3.

Com treze semanas de intervenção dietética foi demonstrado um aumento no número de FCA, em ambos os grupos, não havendo diferença estatística entre eles. Verificando a porcentagem de redução dos FCA, do grupo ômega-3 em relação ao controle, é notado que até então o ômega-3 não causou diminuição no número de FCA dos intestinos. GOOD et al. (1998) detectaram em seu estudo que, após dezenove semanas da indução da carcinogênese, que foi realizada por três injeções de AOM (15mg/kg de peso), ocorreu um maior número de FCA no grupo tratado com óleo de peixe (18g/100g de dieta), sendo este de  $586,9 \pm 140,5$ , em relação aos demais grupos, que correspondiam ao grupo tratados com baixa concentração de óleo de milho (5g/100g de dieta), onde o número de FCA encontrado foi de  $486,0 \pm 89,5$ , e ao grupo tratado com alta concentração de óleo de milho (23g/100g de dieta), onde FCA foi igual a  $507,6 \pm 120,9$ . No entanto, neste estudo, a intervenção dietética se deu a partir de 12ª semana após a aplicação do carcinógeno, sendo que neste estágio o número médio de FCA dos animais era de  $350,1 \pm 61,0$ .

É possível que o agente utilizado com o objetivo de alterar o desenvolvimento da carcinogênese, tenha gerado diversos resultados, ao ser empregado em tempos diferentes em relação ao carcinógeno, como antes, durante ou após a aplicação do mesmo.

Um vez que foi encontrado maior número de FCA na 13ª semana experimental no grupo ômega-3, apesar de não ter sido verificada diferença estatística em relação ao grupo controle é notado que neste período, coincidentemente começa a ocorrer diminuição do peso dos animais no grupo ômega-3. Pode ser que tenha ocorrido maior gasto energético pelos animais do grupo ômega-3.

O ganho de peso dos animais apresentou-se bem variado, entre as semanas experimentais em ambos os grupos. Foi visualizado menor consumo de dieta no grupo ômega-3 nas primeiras semanas experimentais, o que pode ter

contribuído para diminuição do peso nas duas primeiras semanas, sendo que esses animais podem ter demorado a se adaptar a palatabilidade da dieta.

Através do coeficiente de eficiência alimentar (CEA) se observa o aproveitamento da dieta pelo organismo. Foi avaliado o CEA dos animais de ambos os grupos. Observou-se um comportamento diferente entre os grupos. Sendo que o grupo controle apresentou maior CEA em relação ao grupo controle.

Observa-se pelos dados obtidos, que o ganho de peso através do consumo dietético é uma variável importante a ser considerada na evolução da carcinogênese.

O menor peso dos animais do grupo ômega-3, talvez possa ter contribuído para a redução do número de FCA. Entretanto, em relação ao consumo calórico, não é possível supor o mesmo, pois apesar do menor consumo dietético do grupo ômega-3, o valor calórico da dieta consumida pelo grupo ômega-3 correspondia ao valor calórico consumido pelo grupo controle.

Com 30 semanas de intervenção dietética no nosso experimento foi verificado que no grupo tratado com ômega-3 ocorreu uma diminuição no número de FCA em comparação ao grupo controle.

No estudo de Good *et al.* (1998), foi encontrado após 24 semanas da última aplicação do carcinógeno, no grupo tratado com óleo de peixe, aumento do número de FCA, em relação aos grupos tratados com baixa concentração de óleo de milho e aquele que recebeu alta concentração de óleo de milho. No entanto, o número de tumores em cada grupo apresentou-se na seguinte ordem decrescente: grupo com dieta com alta concentração de óleo de milho, grupo com baixa concentração de óleo de milho e grupo tratado com óleo de peixe. É possível supor que a displasia pode não ocorrer em vários FCA, como relatam BIRD (1995) e MCLELEN *et al.* (1991), podendo justificar o menor aparecimento

de tumores no grupo tratado por óleo de peixe no estudo de GOOD, C.K. et al. 1998.

No presente estudo, detectou-se um aumento significativo no número de FCA encontrado no grupo controle entre a 6ª e a 30ª semana de experimento. O grupo ômega-3 apresentou um aumento no número de FCA da 6ª para a 13ª semana, contudo da 13ª a 30ª ocorreu uma diminuição no número de FCA. Estes resultados mostraram-se estatisticamente significantes.

Na categorização do número de FCA, é notada diferença estatística, entre o número de FCA com número de criptas aberrantes  $\leq 3$ , na 30ª semana de experimentação, entre os grupos controle e ômega-3. A mediana do grupo ômega-3 apresentou-se maior, com treze semanas, do que a mediana com trinta semanas, ou seja, um menor número de focos  $\leq 3$  criptas aberrantes foram visualizados ao final de experimento, devido a uma diminuição do mesmo neste grupo. No entanto, apesar de não ter sido estatisticamente significativa, percebe-se um aumento na mediana do grupo controle ao longo do experimento.

Com relação aos FCA com número de criptas aberrantes  $>3$ , também foi verificada diferença estatística na 30ª semana de estudo, entre os grupos controle e ômega-3. Já nesta categorização, o grupo controle apresentou-se com menor número na 6ª semana em relação à 30ª semana, mostrando que o número de criptas nos focos aumenta ao longo do tempo. No entanto, ocorreu o contrário no grupo ômega-3, que obteve o número diminuído na 30ª semana em comparação a 6ª semana. Sendo estes resultados estatisticamente significantes.

RODRIGUES et al. (2002) observaram em seu estudo sobre avaliação de FCA, em curto e médio tempo, que o número de criptas aberrantes  $>3$  nos focos aumenta de quatro semanas ( $28,4 \pm 8,5$ ) para trinta semanas ( $280,4 \pm 83,4$ ) após quatro aplicações da DMH (40mg/kg de peso).

Foi observada uma porcentagem de redução (57,14%), dos FCA com número de criptas aberrantes > 3 com trinta semanas de experimento, no grupo ômega-3, em relação ao controle. Esses resultados podem indicar um papel do ômega-3 na prevenção do câncer de cólon, uma vez que, é sugerido que quanto maior o número de criptas nos focos mais resistentes à morte celular (apoptose) estes se encontram e conseqüentemente, podem ser conduzidos ao desenvolvimento de tumor (BIRD, 1995; MAGNUSON, 1994; BIRD, 1995; GOOD, 1998). A apoptose é essencial na regulação do número de células e é um dos mecanismos responsáveis pela destruição de células mutadas (LLOR et al., 2003).

Quando se obteve os resultados nos grupos dividindo o número de FCA, de acordo com a categorização, observou-se que um número maior de FCA com número de criptas aberrantes  $\leq 3$  ocorrem durante todo o experimento e em ambos os grupos.

O cólon intestinal possui intensa proliferação celular, devido a isto, a DMH induz neoplasias quase que especificamente neste segmento do intestino (LARANJEIRA et al., 1998).

Em relação às regiões intestinais (cólon e reto) analisados, que foram denominadas: proximal, média e distal, foi observado maior número de FCA na região média, vindo a distal em segundo plano, tanto na 6<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas em ambos os grupos. Resultados semelhantes também foram encontrados por RODRIGUES et al. (2002) e suportam a idéia de que os FCA representam alterações morfológicas induzidas pela DMH na mucosa colônica e provavelmente sejam os passos iniciais da carcinogênese.

Ao se analisar o número de FCA de acordo com as regiões e entre os grupos, verificou-se diferença estatisticamente significativa na 13<sup>a</sup> semana, com um maior número de FCA no grupo ômega-3. Entretanto com relação à 30<sup>a</sup>

semana, este grupo apresentou-se com menor número de FCA ( $p < 0,05$ ), em todas as regiões, em relação ao controle, o que vem a comprovar mais uma vez a diminuição do número de FCA pelo ômega-3 nesta fase da carcinogênese.

Com relação à fase da carcinogênese, podemos considerar que o ômega-3 teve sua atuação benéfica, diminuindo o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas durante a promoção da doença.

## **Perfil dos ácidos graxos**

### **Tecido hepático - grupo controle**

A deposição dos ácidos graxos nos tecidos é influenciada pela composição dos lipídios da dieta (SABARENSE e MANCINI FILHO, 2003).

No tecido hepático dos animais do grupo controles, não foram observadas diferença estatística em relação aos ácidos saturados. Entretanto foi detectada diminuição ( $p < 0,05$ ) do ácido palmítico da 13<sup>a</sup> semana para a 30<sup>a</sup> semana. Ocorrendo o contrário com relação ao ácido esteárico que aumentou significativamente da 13<sup>a</sup> para a 30<sup>a</sup> semana, extrapolando estes resultados possivelmente em função da conversão metabólica do ácido palmítico ao ácido esteárico.

Percebe-se uma redução dos monoinsaturados da 13<sup>a</sup> semana para a 30<sup>a</sup> semana, supondo que estes possam ter sido utilizados para produção de energia, visto que a dieta recebida por estes animais ofereceu boa quantidade do ácido oléico. Foi observado ainda, um aumento no número de FCA nos intestinos dos animais do grupo controle, ou seja, ocorreu um maior desenvolvimento da carcinogênese colorretal, sugerindo maior gasto energético devido ao estresse metabólico que a doença pode ocasionar. Tem sido argumentado que células danificadas induzem resposta inflamatória, conduzida pelos radicais livres e

espécies reativas de oxigênio, levando a uma ativação das células fagocitárias e estimulando o aumento do “brust” respiratório nas mesmas (ROBERFROID e CALDERON, 1995).

Dos ácidos graxos PUFAs totais, verificou-se um aumento na concentração hepática da 13<sup>a</sup> para 30<sup>a</sup> semana. No entanto, o ácido linoléico apresentou-se reduzido e um aumento concomitante na concentração do ácido araquidônico, permitindo deduzir desta forma, que ocorreu maior eficiência na conversão do ácido linoléico a ácido araquidônico. Constatado pela razão linoléico (C18:2)/araquidônico (C20:4) de 1,89 e 0,68 respectivamente na 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas de intervenção dietética. Resultados semelhantes são verificados em estudos com ratos que tiveram alta ingestão de ácido linoléico através da dieta, sendo registrado uma elevada produção de ácido araquidônico no fígado dos animais (LANDS *et al.*, 1990; MARANGONI *et al.*, 1992).

Na 30<sup>a</sup> semana em nosso estudo verificou-se um aumento no número de FCA no grupo controle. Há hipótese de que o aumento de ácidos graxos ômega-6, particularmente o ácido araquidônico acelera o desenvolvimento da carcinogênese colorretal por aumentar a produção de eicosanóides derivados do ácido araquidônico, que possuem efeitos pró-inflamatórios. As enzimas COX -1 e COX-2 introduzem dois átomos de oxigênio no ácido araquidônico para formar a hidroperoxi-endoperoxidase (PGG<sub>2</sub>) que é então reduzida a hidroxí-endoperoxidase (PGH<sub>2</sub>). A PGH<sub>2</sub> é substrato para várias enzimas, incluindo a PGE sintetase que forma a PGE<sub>2</sub> (FISCHER, 1997).

A COX-2 é normalmente ausente na maioria das células, mas é altamente induzida em resposta a estímulos inflamatórios, sendo expressa na maioria dos carcinomas do cólon. Nos adenocarcinomas de cólons humanos foi verificado um aumento no nível de COX-2 de duas a cinquenta vezes mais alto do que o nível em células adjacentes da mucosa intestinal normal.

A oxidação do ácido araquidônico pelas COXs gera outras espécies oxidativas, elevando o estado oxidativo da célula, podendo conseqüentemente, afetar o funcionamento celular (KARGMAN *et al.*, 1995; ROSE e CONNOLLY, 1999; TAPIERO *et al.*, 2002). NICHOLSON *et al.* (1991) relataram que a quantidade de ácido araquidônico presente na membrana celular de ratos encontra-se aumentada em células de tumores colorretal.

A PGE<sub>2</sub> formada a partir do ácido araquidônico através das enzimas COX-1 e COX-2 estimula a proliferação celular no cólon (TAPIERO *et al.*, 2002; DOMMELS, *et al.* 2003). Estudos *in vitro* com células Caco-2, demonstraram que o ácido araquidônico aumenta a produção de PGE<sub>2</sub> ao serem tratadas por fonte exógena do mesmo (DOMMELS, *et al.* 2003). A indução da produção de PGE<sub>2</sub> leva ao aumento progressivo da expressão de COX-2 (YAMAMOTO *et al.*, 1995). Estudo *in vitro*, com células intestinais, demonstrou uma indução de síntese da proteína Bcl-2 devido a maior concentração de COX-2 (TSUJII e DUBOIS, 1995). A proteína Bcl-2 inibe desta forma a indução da apoptose celular, facilitando o desenvolvimento da carcinogênese colorretal por estimular a progressão e a sobrevivência das células mutadas (LLOR *et al.*, 2003).

### **Tecido hepático - grupo ômega-3**

No tecido hepático do grupo ômega-3, nota-se uma elevada incorporação de PUFAs no tecido hepático, o que pode ser explicado devido a sua alta concentração na dieta.

Segundo INNIS *et al.* (1995), quando estes ácidos são suplementados na dieta podem apresentar alta concentração no fígado dos animais. Além disso, são considerados como importantes biomarcadores (ARUB, 2003). Ao observarmos o ácido graxo EPA, este se encontra em maior quantidade na dieta do que o ácido graxo DHA, entretanto o DHA aparece em maior porcentagem no tecido hepático

do grupo ômega-3, supondo que o EPA foi o substrato preferencial da ação da enzima  $\Delta^6$  – dessaturase, na conversão a DHA, confirmando a maior afinidade pelos PUFAs da família ômega-3, principalmente quando estes estão em maior concentração que os PUFAs ômega-6 (ROYNETTE *et al.*, 2004).

Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre as concentrações de DHA na 13ª e 30ª semanas em relação a 6ª semana do experimento, os resultados absolutos são importantes, principalmente quando verificamos a razão EPA (C20:5)/DHA(C20:6), que resultou em 0,27; 0,23 e 0,29 na 6ª, 13ª e 30ª semanas, respectivamente. Já para a razão de C18:2/C20:4, detecta-se 1,67; 1,66 e 1,54 na 6ª, 13ª e 30ª semanas respectivamente. Nota-se que houve maior conversão de EPA a DHA do que o ácido linoléico (C18:2) à ácido araquidônico (C20:4).

Na 30ª semana experimental foi verificada uma diminuição do número de FCA no grupo ômega-3. Vários estudos experimentais têm apresentado inibição da carcinogênese colorretal através do aumento no consumo de óleo de peixe e óleo “perilla” (DESCHNER *et al.*, 1990; REDDY *et al.*, 1991; ONOGI *et al.*, 1996; TAKAHASHI *et al.*, 1997b).

DOMMELS *et al.* (2002) relatam que a competição enzimática existente entre os ácidos ômega-3 e ômega-6 e que está é aumentada quando feita suplementação com EPA, o que poderá inibir o metabolismo do ácido araquidônico, bem como, a produção de seus metabólitos como a PGE<sub>2</sub>.

Os derivados eicosanóides do EPA, PGE<sub>3</sub> e LTs<sub>5</sub> apresentam efeitos antiinflamatórios, que podem estar envolvidos na diminuição da produção de substâncias antiinflamatórias como leucotrienos B<sub>4</sub> e fatores de ativação plaquetária (FAP) que são liberados pela ativação da síntese da PGE<sub>2</sub> e tromboxanos B<sub>2</sub>, derivados a partir do ácido araquidônico (ROSE e CONNOLLY 1999; TAPIERO *et al.*, 2002).

Quanto ao DHA, também utilizado em grande concentração na dieta, sabe-se que ele reduz a expressão da COX-2 e induz a apoptose (CHEN e ISTFAN, 2000).

Recente estudo em animais demonstrou que os ácidos graxos ômega-3 inibem a proliferação e promovem apoptose em células normais da mucosa colônica (GALVIELLO *et al.*, 1999). Cheng *et al.* (2003) observaram um aumento da expressão da proteína Bax na mucosa de células normais de pacientes colectomizados devido a adenomas ou tumor colorretal, após consumirem 8 cápsulas de óleo de peixe (equivalentes a 100mg/dia de EPA e 400mg/dia de DHA) durante dois anos. Além disso, após os dois anos de intervenção dietética, a proporção das proteínas Bax-Bcl-2 foi significativamente diminuída. Os resultados indicaram que a elevada produção da proteína Bax é um dos caminhos pelos quais há promoção da apoptose, e que esta proteína pode inibir a expressão da Bcl-2. Os autores sugerem desta forma, ser o ômega-3 um componente dietético candidato à intervenção e ou quimioprevenção do câncer de cólon humano.

O ômega-3 sendo um componente dietético que diminui os níveis do ácido araquidônico nos fosfolipídios das membranas dos colonócitos e assim a diminuição da liberação dos mesmos das membranas, diminuindo a expressão de enzimas envolvidas na síntese de PGE<sub>2</sub> é provavelmente eficaz na prevenção e tratamento da carcinogênese colorretal (ROYNETTE *et al.*, 2004).

### **Comparação entre os tecidos hepáticos dos grupos controle e ômega-3**

Vale notar que ocorreu maior concentração do ácido palmítico no tecido hepático do grupo controle na 13<sup>a</sup> semana, sendo a diferença em relação ao grupo ômega-3 foi estatisticamente significativa. Já na 30<sup>a</sup> semana não é visualizada esta diferença. Em contrapartida houve um aumento na concentração do ácido

esteárico no grupo controle ( $p < 0,05$ ), o que demonstra que o ácido palmítico serviu como substrato para o metabolismo do ácido esteárico.

Os monoinsaturados apresentam-se diferentes estatisticamente na 13ª semana de intervenção dietética, sendo observada maior concentração no tecido hepático do grupo controle. Com 30 semanas não foi obtida diferença estatística, entre os ácidos graxos monoinsaturados entre o grupo controle e ômega-3, no entanto, houve diferença com relação ao ácido palmitoléico, que apresentou-se responsável pela concentração dos ácidos graxos monoinsaturados diminuída no tecido hepático do grupo controle.

O ácido linoléico apresenta-se em menor porcentagem no tecido hepático do grupo ômega-3 na 13ª e 30ª semana, sendo que este fato pode ser explicado em função da menor concentração na dieta em relação ao grupo que recebeu dieta controle.

Foi observado que o ácido araquidônico apresenta-se em menores concentrações no grupo ômega-3, sendo esta diferença em relação ao grupo controle estatisticamente significativa na 30ª semana. Estes dados também são observados por TASHIRO et al (1998) em ratos que receberam infusão de uma emulsão contendo os ácidos EPA e DHA, corroborando a prioridade da  $\Delta^6$  – dessaturase para os PUFAs da família ômega-3 (ROYNETTE et al., 2004).

Sendo que foi visualizada na 30ª semana aumento do número de FCA pelo grupo controle e redução das mesmas pelo grupo ômega-3, é possível supor que os ácidos ômega-6 aumentem o desenvolvimento da carcinogênese colorretal, enquanto os ácidos ômega-3 diminuem o mesmo.

### **Gordura Visceral –grupo controle**

Os ácidos graxos saturados da gordura visceral dos animais do grupo controle tiveram suas concentrações diminuídas na 30<sup>a</sup> semana do experimento ( $p < 0,005$ ) em relação às demais. O ácido palmítico apresentou porcentagem diferente estatisticamente da 6<sup>a</sup> para a 30<sup>a</sup> semana, provavelmente este foi mobilizado para ser utilizado como fonte energética.

As concentrações dos ácidos monoinsaturados sofreram diminuição ao longo do experimento, apesar de não ter sido verificada diferença estatística.

O ácido linoléico apresentou um aumento nas concentrações dos grupos avaliados, sendo maior na 30<sup>a</sup> semana em relação às demais. Sugerindo a possibilidade de modulação da deposição em função da duração do consumo da dieta.

Com relação aos PUFA's ômega-3, o estoque na gordura visceral do ácido linolênico é mínimo, sendo visualizado apenas na 30<sup>a</sup> semana do experimento.

### **Gordura Visceral –grupo ômega-3**

Houve diminuição na concentração dos lipídios saturados na gordura visceral do grupo ômega-3 na 30<sup>a</sup> semana em relação às demais ( $p < 0,005$ ).

Ao longo do experimento ocorreu diminuição dos ácidos graxos monoinsaturados, apesar de não ter sido estatisticamente significativa.

Diferentemente do ocorrido com os tecidos dos animais do grupo controle, o ácido graxo linoléico apresentou-se com valores similares durante toda intervenção dietética, não indicando deposição em função do prolongamento no consumo da dieta.

Não foram encontrados PUFAs ômega-3 estocados na 6ª e 13ª semanas do experimento, como era de se esperar, uma vez que estes ácidos possuem papéis fundamentais no organismo como constituintes das membranas celulares e são freqüentemente utilizados para as funções próprias da membrana (ROYNETTE, *et al.* 2003). Contudo, estes ácidos graxos, EPA e DHA aparecem na gordura visceral na 30ª semana. Provavelmente este estoque ocorreu em função da sua alta concentração na dieta, refletida em longo prazo pela mesma ingestão.

Ao se analisar estes dados em comparação aos resultados de FCA, apresentados na Tabela 6 foi possível supor que maior quantidade dos ácidos ômega-3 estiveram presentes em membranas dos colonócitos, quando o número de FCA encontrava-se maior no grupo ômega-3, particularmente na 13ª semana. Essa particularidade pode ter favorecido a diminuição desses FCA visualizados na 30ª semana de intervenção dietética. Até então, estes ácidos não haviam sido estocados na gordura visceral. Segundo TEITELBAUM e WALKER (2001), um elevado consumo dos ácidos EPA e DHA, por humanos, substitui parcialmente os ácidos ômega-6 presentes nas membranas celulares.

### **Comparação entre gordura visceral dos grupos controle e ômega-3**

Os dados obtidos nos tecidos de gordura visceral dos grupos controle e ômega-3 apresentam diferenças estatísticas em relação aos lipídios saturados a partir da 13ª semana do experimento. O grupo ômega-3 apresenta maior concentração desses ácidos em relação ao grupo controle. É possível que maior quantidade desses ácidos tenham sido utilizados como fonte de energia no grupo controle. Apesar de ter sido observada redução desses ácidos saturados no grupo ômega-3 na 30ª semana em comparação a 13ª semana do experimento, ainda assim suas concentrações permaneceram mais altas que no grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Em relação aos ácidos monoinsaturados não foi detectada diferença estatística entre os grupos.

O ácido linoléico apresenta-se em maior concentração, estocado na gordura visceral do grupo controle em relação ao ômega-3, sendo estatisticamente significante a partir da 13<sup>a</sup> semana do experimento.

Foi observado pequeno estoque do ácido linolênico na 13<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> semanas e do araquidônico na 30<sup>a</sup> semana, pelo grupo controle e já os ácidos graxos que aparecem estocados no grupo ômega-3, na 30<sup>a</sup> semana são os ácidos EPA e DHA.

### **Comparação da mediana do tecido hepático e da gordura visceral do grupo controle**

Os ácidos saturados não apresentaram diferença estatística com seis semanas de experimento, sendo nesta encontrada maior concentração na gordura visceral.

Na 13<sup>a</sup> semana foi identificada uma maior concentração do ácido palmítico no tecido hepático e menor do ácido esteárico, em relação a 6<sup>a</sup> semana, sendo que nesta fase do estudo, os ácidos saturados encontraram-se em maiores porcentagens no fígado em relação a gordura visceral ( $p < 0,005$ ).

Já com 30 semanas de experimento nota-se maior concentração do ácido esteárico no tecido hepático, e ocorreu uma diminuição do ácido palmítico da 13<sup>a</sup> a 30<sup>a</sup>, que provavelmente serviu como substrato no metabolismo lipídico neste tecido. É visualizada maior concentração dos ácidos saturados no tecido hepático, em comparação a gordura visceral ( $p < 0,005$ ).

Os ácidos monoinsaturados apresentaram-se sempre em maiores concentrações na gordura visceral, sendo a diferença em relação ao tecido hepático significativa a partir da 13ª semana.

O ácido linoléico se comportou com uma concentração menor no tecido hepático em relação à gordura visceral na 6ª semana. No entanto, a partir da 13ª semana este resultado se inverteu, sendo apresentada maior concentração na gordura visceral, e sendo esta diferença estatisticamente significativa na 30ª semana.

É verificada uma alta quantidade de ácido araquidônico no tecido hepático, o que não é visto com relação a gordura visceral. Provavelmente, porque o ácido linoléico foi utilizado como substrato para a síntese do ácido araquidônico no fígado.

### **Comparação da mediana do tecido hepático e da gordura visceral do grupo ômega-3**

Não houve diferença estatística entre os ácidos graxos, entre o tecido hepático e a gordura visceral do grupo ômega-3, com seis semanas de experimento.

Entretanto a partir da 13ª semana do experimento, estas diferenças se fazem notar. Houve maior estoque dos lipídeos saturados na gordura visceral em comparação ao tecido hepático ( $p < 0,05$ ), tanto na 13ª como na 30ª semana do experimento indicado pelo aumento na síntese de ácido esteárico no tecido hepático, e depositado na gordura visceral.

O contrário ocorreu com relação aos ácidos monoinsaturados, que tiveram sua maior concentração na gordura visceral. Possivelmente estes ácidos graxos

foram utilizados como fontes energéticas porque não foram identificados outros ácidos graxos monoinsaturados com cadeia carbônica maior na gordura visceral, por isso, nota-se menor concentração no tecido hepático, tanto na 13<sup>a</sup> quanto na 30<sup>a</sup> semana do experimento.

O ácido linoléico apresentou-se sempre em maior concentração na gordura visceral, no entanto apresentou diferença estatística significativa apenas na 30<sup>a</sup> semana em comparação ao tecido hepático. No entanto, o ácido araquidônico permanece com quantidades constantes no tecido hepático ao longo do experimento no tecido hepático.

Os ácidos graxos EPA e DHA são visualizados no tecido hepático em concentrações semelhantes ao longo do experimento. Na gordura visceral são encontrados apenas na 30<sup>a</sup> semana, ao final do experimento, onde é percebido que sua concentração é menor que no tecido hepático ( $p < 0,005$ ). Sendo observado que nesta semana o número de FCA encontrados no grupo ômega-3 sofreu redução.

## 7 Conclusões

Os resultados obtidos nos permitem concluir que o grupo ômega-3 obteve menor peso em relação ao grupo controle.

O grupo ômega-3 também apresentou menor ingestão da dieta em relação ao grupo controle durante quase todo o experimento.

A suplementação da dieta de ratos Wistar com ômega-3 (10g/100g de dieta) pode ter contribuído para a redução no número total de FCA na 30ª semana de intervenção dietética, evidenciada uma porcentagem de redução de 55,34%.

A suplementação da dieta de ratos Wistar com ômega-3 (10g/100g de dieta) pode ter contribuído para a redução do número de focos contendo mais de três criptas na 30ª semana de intervenção dietética. A redução do número total de FCA na 30ª semana de intervenção dietética foi de 57,14%.

A intervenção dietética, por 6 e 13 semanas, não reduziu o número de FCA nos animais com dieta com ômega-3.

Foram observadas baixas concentrações de EPA e DHA na gordura visceral dos animais do grupo ômega-3, com 30 semanas experimentais.

Ocorreu maior conversão do ácido EPA a DHA no tecido hepático quando comparada à conversão de linoléico a araquidônico no grupo ômega-3.

Ocorreu maior eficácia da conversão do ácido linoléico a araquidônico no tecido hepático do grupo controle, pois não havia outro substrato (ômega-3) para ação da  $\Delta^6$  dessaturase, conseqüentemente conduzindo ao aumento do número de FCA no grupo controle.

O menor ganho de peso pelo grupo ômega-3 talvez possa ter interferido, contribuindo para o menor desenvolvimento no número de FCA neste grupo.

Mais trabalhos, com diferentes quantidades de ômega-3 na dieta, talvez sejam necessários para verificar sua atuação benéfica no desenvolvimento da carcinogênese colorretal.

No presente estudo, possivelmente, o ômega-3 teve atuação benéfica, diminuindo o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas durante a fase de promoção da doença.

## 8 Referências Bibliográficas

ACKMAN, R. G.; MAG, T. K. Trans fatty acids and the potencial for less in technical products. In: SÉBÉDIO, J. L.; CHRISTIE, W. W., eds. **Trans fatty acids in human nutrition**. The Oil Press: Glasgow, 1998. p.35-58. cap. 2.

ANISIMOV, V. N.; KHAVINSON, V. K.; POPOVICH, I. G.; ZABEZHINSKI, M. A. Inibitory effect of peptide Epitalon on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. **Cancer Letters**, Shannon, v.183, p. 1-8, feb. 2002.

AHRENS, E.H.; BLANKENHORN, D.H.; TSALTAS, T.T. Effect on human serum lipids of substituting plant for animal fat in the diet. **Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.86, p.872-888, 1954.

ALLGAYER, H.; KOLB, M.; STUBER, V.; KRUIS, W. Effects of bile acids on base hydroxylation in a model of human colonic mucosal DNA. **Cancer Detection and Prevention**, v. 26, p.85-89, nov. 2002.

ALMEIDA, F.F.N.; ARAUJO, S. E. A.; SANTOS, P. S.; FRANCO, C.J.C.S.; NAHAS, S. C.; HABR-GAMA, A. Colorectal Cancer Screening. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, São Paulo. v.55, n.1, p.35-42, 2000.

ANDERSON, R. E. Lipids of ocular tissue. IV. A comparison of the phospholipids from the retina of six mammalian species. **Exp Eye Res**, v.10, p.339-344, 1970.

ANDRIEU N.; LAUNOY, G.; GUILLOIS R.; ORY- PAOLETTI, C.; GIGNOUX, M. Familial relative risk of colorectal cancer: a population – based study. **European Journal of Cancer**, v.39, p.1904-1911, mar. 2003.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts and Figures 2003.[www.cancer.org/index-4up.html](http://www.cancer.org/index-4up.html) Pesquisado em março de 2004.

ARUB, L. Biomarkers of fat and fatty acid intake. **Journal Nutrition**, Bethesda, v.133, suppl., p. 925S-932S, 2003.

BARTSCH, H.; NAIR, J.; OWEN, R. W. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. **Carcinogenesis**, Oxford, v.20, p.2209-2218, 1999.

BINGHAM, S. A. Epidemiology of colorectal cancer. In: STRAIN, J.; SADLER, M.; CABALLERO, B., eds. **Encyclopedia of human nutrition**. New York: Academic Press, 1998. p. 230-5.

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

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

BIRD, R. P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Letter**, Shannon, v. 93, p. 55-71, apr. 1995.

BIRD, R. P. Further investigation of the effect of cholic acid on the induction, growth characteristics and stability of aberrant crypt foci in rat colon. **Cancer Letters**, Shannon, v. 88, p.201-209, 1995.

BURKITT, D. Relate disease/related cause? **Lancet**, New York, v.I2, p. 1229-1231, 1969.

CALDER, P. C. Dietary fatty acids and the immune system. **Nutrition Reviews**, Copenhagen, v. 56, n.1, p.S70-S83, jan. 1998.

CARRIÉ, I.; CLÉMENT, M.; JAVEL, D.; FRANCÉS, H.; BOURRE, J. M. Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.41, p. 473-780, 2000.

CASTRO, F. A. F. **Avaliação da composição de ácidos graxos de três espécies de peixes de água doce**. 2003. Tese (Mestrado em Ciência da Nutrição). Departamento de Nutrição e Saúde - Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais.

CAVE, J. W. T. W-3 Fatty acid diet effects on tumorigenesis in experimental animals. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v.66, p.462-76,1991.

CELIK, C.; MITTELMAN, A.; PAOLINI Jr., N.S.; LEWIS, D.; EVANS, J.T. - Effects of 1,2-symmetrical dimethylhydrazine on jejunocolic transposition in Sprague-Dawley rats. **Cancer Research**, Birmingham, v. 4, p.2908-2911, 1981.

CHEN, Z.; ISTFAN, N. Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 colon cancer cells. **Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids**, Sidcup, v.63, p. 301-308,dec. 2000.

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

CHIA, M.; MATTIOLI, F.; MERETO, E. A possible medium-term assay for detecting the effects of liver and colon carcinogens in rats. **Cancer Letters**, Shannon, v.105 p.71-75, apr.1996.

CONNOR, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.71, p.171S-175S, 2000.

DESCHENR, E. E.; LYTLE, J. S.; WONG, G.; RUPERTO, J. F.; NEWMARK, H. L. The effect of dietary omega-3 fatty acids (fish oil) on azoxymethanol-induced focal areas of dysplasia and colon tumor incidence. **Cancer**, v.66, p.2350-2356, 1990.

DOMMELS, Y. E. M.; ALINK, G. M.; BLADEREN, P. J. V.; OMMEN, B.V. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis: results from cultured colon cells, animal models and human studies. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v.11, p.297-308, jan. 2002.

DOMMELS, Y. E. M.; HARING, M. M. G.; KEESTRA, N. G. M.; ALINK, G. M.; BLADEREN, P. J. V.; OMMEN, B. V. The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE<sub>2</sub> synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines. **Carcinogenesis**, Oxford, v.24, n.3, p. 385-392, 2003.

ESTEVE J.; KRICKER A., PARKIN D. M. Facts and figures of colon cancer in the European community. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1993.

FILHO, V. W.; MONCAU, J. E. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: padrões regionais e tendências temporais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 48, n.3, p.260-7; 2002.

FISCHER, S. M. Prostaglandins and cancer. **Frontiers in Bioscience**, v.2, p. 482-500, 1997.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANELEY, S. P. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biology Chemistry**, Bethesda, v. 226, p. 409-509, 1957.

GALLI C. , BUTRUM R. Dietary  $\omega$ -3 fatty acids and cancer: an overview. **World Review of Nutrition Dietetics**, v.66, p.446–61, 1991.

GARTNER, L. P. E HIATT, J.M., Sistema digestivo II – Tubo Digestivo. In: GARTNER, L. P. E HIATT, J.M., eds. **Tratado de Histologia em Cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.p.294- 317.

GALVIELLO, G.; PALOZZA, P.; MAGGIANO, N.; PICCIONI, P.; FRANCESCHELLI, A.; NICUOLO, F. D.; BARTOLI, G. M. Cell proliferation, differentiation, and apoptosis are modified by  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids in normal colonic mucosa. **Lipids**, Champaign, v.34, p.599-604, 1999.

GENNARO, A.R.; VILLANUEVA, R.; SUKONTHAMA, Y.; VATHANOPHAS, V.; ROSEMOND, G.P. - Chemical carcinogenesis in transposed intestinal segments. **Cancer Research**, Birmingham, v. 33, p.536-541, 1973.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A.Cancer e o sistema imune. In: GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B.,eds. **Kubi Imunologia**. Revinter., 2002. p.539-561.

GOOD, C. K.; LASKO, C. M.; ADAM, J.; BIRD, P. R. Diverse effects of fish oil on the growth of aberrant crypt foci and tumor multiplicity in F344 rats. **Nutrition and Cancer**, v.31,n.3, p. 204-211, 1998.

HAMILTON, S.R. Experimental models of colorectal carcinogenesis. In: Sciez, H. K. Shimanowsiki, U. A. Wright, N. A eds. **Colorectal Cancer from Pathogenesis to Prevention**, New York : Springer Vcerlag, 1989.

HANSEN-PETRIK, M. B.; McENTEE, M. F.;JOHNSON, B. T.; OBUKOWICZ, M. G.; MASFERRER, J.; ZWEIFEL, B.; CHIU, C.; WHELAN, J. Selective inhibition of  $\Delta^6$ -desaturase impedes intestinal tumorigenesis. **Cancer Letters**, Shannon, v.175; p.157-163; aug. 2002.

HARTMAN, L. G. E LAGO, B. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Pratic**, London, v. 22, p. 475-477, 1973.

Harvard Report on Cancer Prevention Cancer Causes and Control, v.10, p.167-180, 1999.

HUR, K.; KIM J. R.; YOON, B.I.; LEE, J. K.; CHOI, J. C.; OH, G. T.; KIM, D.Y. Overexpression of cyclin D1 and cyclin E in 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced rat colon carcinogenesis. **Journal Veterinary Science**, v.1, n.2, p121-126, 2000.

INNIS, S. M.; RIOUX, F. M.; AUESTAD, N.; ACKMAN, R. G. Marine and freshwater fish oil varying in arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic aids differ in their effects on organ lipids and fatty acids in growing rats. **Journal Nutrition**, Bethesda, v.125; p. 2286-2293, 1995.

JEN, J.; POWEEL S. M.; PAPADOPOULUS, N.; SMITH, K. J; HAMILTON, S. R.; VOGELSTEIN, B. ; KINZLER,K. W. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. **Cancer Research**, Birmingham , v.54, p. 5523-5526, 1994.

KARGMAN, S. L., O'Neill, G. P.; VICKERS, P. J.; EVANS, J. F.; MANCINI, J. A.; JOTHY, S. Expression of prostaglandin G/H synthase – 1 and –2 protein in human colon cancer. **Cancer Research**, Birmingham , v. 55, p. 2556-2559; 1995.

KITAGAWA T, TSUKUMA H et al.: Prediction of cancer incidence in Japan. In TOMINAGA S. **Cancer Statistics-1999**. Tokyo: ShinoharaShuppan, 1999.

KLIGERMAN, J. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 46, n.1, jan/fev/mar. 2000.

KOYAMA, Y.; KOTAKE, K. Overview of colorectal cancer in Japan: report from the Registry of the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. **Dis-Colon-Rectum**, v.40(10 supl), p. S2-9; oct. 1997.

KRIS-ETHERTON, P.M.; LAWRENCE, W.S.H. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Arteriosclerosis Trombosis Vascular Biology**, v. 2, p.20-31, 2003.

KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. Neoplasia. IN: KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L., eds. **BASIC PATHOLOGY**. Philadelphia – Pennsylvania: W. B. Saunders Company – Harcourt Brace Jovanovich, Inc.,1992. p.171-215.

LAGARES-GARCIA, J.; MOORE, R.; COLLIER, B.; HEGGERE, M.; DIAZ, F.; QIAN, F. Nitric oxide synthase as a marker in colorectal carcinoma. **American Surgery**, v.67, p.709-713, 2001.

LANDS, W. E. MORRIS, A.; LIBELT, B. Quantitative effects of dietary polyunsaturated fats on the composition of fatty acids in rats tissues. **Lipids**, Champaign, v.25, p. 505-516, 1990.

LARANGEIRA, L. L. S.; TAHA, M. O.; FERME, A.; LEMOS, R.; PLAPLER, H. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.13, n.3, set. 1998.

LEAF, A.; WEBER, P. C. A new era for science in nutrition. **American Journal Clinical Nutrition**, Bethesda, v.45, p. 1048 – 1987.

LEHINGER, A. L.; NESLSON, D. L.; COX, M. M. Biossíntese de lipídeos. In: LEHINGER, A. L.; NESLSON, D. L.; COX, M. M. eds. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarver, 1997. p. 477-512.

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

MAGNASUM, B. A.; SOUTH, E. H.; EXON, J. H.; DASHWOOD, R. H.; XU, M.; HENDRIX, K. HUBELE, S. Increased susceptibility of adult rats to azoxymethane-induced aberrant crypt foci. **Cancer Letters**, Shannon, v.161, p.185-193, sept. 2000.

MARANGONI, F.; MASCONI, C.; GALELLA, G. GALLI, C. Increments of dietary linoleate raise liver arachidonate, but markedly reduce heart n-6 and n-3 fatty acids in the rat. **Lipids**, Champaign, v. 27, p. 624-628, 1992.

MARTINEZ, M. E. GIOVANUCCI, E.; SPIELGELMAN, D. **American Journal Epidemiology**, p. 143- 147, 1996.

McGARRITY, T. J.; PEIFFER, L. P.; COLONY, P. C. - Cellular proliferation in proximal and distal rat colon during 1,2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis. **Gastroenterology**, v.95, p.343-348, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE- SIM -SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE MORTALIDADE. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2003. <http://www.inca.gov.br/cancer/epidemiologia/estimativa2002/introducao.html> . Pesquisado em março de 2004.

MOON, R. C.; FRICKS, C. M. Influence of gonadal hormones and age on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenes. **Cancer**, v.40, p.2502-2508, 1977.

MOREIRA, A. V. B. **Efeito antioxidante dos compostos fenólicos de especiarias sobre os ácidos graxos das séries  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6. 2003.** Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

MUTO, T.; KOTAKE, K.; KOYAMA, Y. Colorectal cancer estatistics in Japan data from JSCCR registration, 1974-1993. **Interanational Journal Clinical Oncology**, v.6, p.171-176, 2001.

NICHOLSON, M. L.; NEOPTOLEMOS, J. P.; CLAYTON, H. A.; TALBOT, I. C.; BELL, P. R. Increased cell membrane archidonic acid in experimental colorectal tumours. **Gut**, v.32, p. 413-418, 1991.

O'BRIEN, J. S.; SAMPSON, E. L. Fatty acid and aldehyde composition of the major brain lipids in normal gray matter, white matter and myelin. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.6, p.545-55, 1965.

ONOGI, N.; OKUNO, M.; KOMAKI, C.; MORIWAKI, H.; KAWAMORI, T.; TANAKA, T.; MORI, H.; MUTO, Y. Suppressing effect of perilla oil on azoxymethane-induced foci of colonic aberrant crypts in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v.17, p.1291-1296, 1996.

ONOSE, J.; IMAI, T.; HASUMURA, M.; UEDA, M.; HIROSE, M. Rapid induction of colorectal tumors in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine followed by dextran sodium sulfate treatment. **Cancer Letters**, Shannon, v.198, p.145-152, apr. 2003.

OSTERSTRO, M. A.; DIMBERG, J. FRANSÉN, K. SODERKVIST, P. Expression of cytosolic and group X secretory phospholipase A<sub>2</sub> genes in human colorectal adenocarcinomas. **Cancer Letters**, Shannon, v. 182, p.175-182, feb. 2002.

PARHAM, P. O câncer e suas interações com o sistema imune. In: PARHAM, P., ed. **O sistema imune**. Porto Alegre: Arthmed, 2001. p. 358-372.

PASSANI, M. B.; LUCERI, C.; CADERNI, G.; DOLARA, P. Intercellular communication in normal and aberrant crypts of rat colon mucosa. **Cancer Letters**, Shannon, v.123, p.77-81, sep. 1998.

PEPPING, J. Omega-3 essential fatty acids. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v.56, p.719-724, 1999.

PETRIK, M. B.; McENTEE, M. F.; CHIU, C. H.; WHELAN, J. Antagonism of arachidonic acid is linked to the antitumorigenic effect of dietary eicosapentanoic acid in Apc<sup>Min/+</sup> mice. **Journal Nutrition**, Bethesda, v.130, n.5, p. 1153-1158.

PINHEIRO, P.S.; TYEZNSKI, J. E.; BRAY, F.; AMADO, J.; MATOS, E.; PARKIN, D. M. Cancer incidence and mortality in Portugal. **European Journal of Cancer**., v.39, p.2507-2520; mar. 2003.

PINHO, M. S. L.; FERREIRA, L. C.; BRIGO, M. J. K.; PEREIRA, A. F.; WENGERKIEVICZ, A.; PONATH, A.; SALMORIA, L. Incidência do câncer colorretal na regional de saúde de Joinville (SC). **Revista Brasileira de Coloproctology**, v.23, n.2, p.73-76, abr.2003.

POTTER, J. D. Risk factors for colon neoplasia – epidemiology and Biology. **European Journal of Cancer**, v.31, p.1033-1038, 1995.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G.; The phospholipid bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.46B, p.541-549, 1975.

RAO, C.; SIMI, B.; WYNN, T.; GARR, K.; REDDY, B. Modulating effect of amount and types of dietary fat on colonic mucosal phospholipase A2, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activities, and cyclooxygenase metabolite formation during different stages of colon tumor promotion in male F344 rats. **Cancer Research**, Birmingham, v.56, p.532-7, 1996.

REDDY, B.; WYNDER, E. Large bowel carcinogenesis: fecal constituents of populations with diverse incidence rates of colon cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.50, p.1437-1442, 1973.

REDDY, B. S.; BURILL, C.; RIGOTTY, J. Effects of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. **Cancer Research**, Birmingham, v.51, p.487-4917, 1991.

REDDY, B.S. Chemoprevention of colon cancer by dietary fatty acids. **Cancer Metastasis**, v.13, p.285-302, 1994.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for Laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad Hoc writing comiitee and the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal Nutrition.**, Bethesda, v.123, p.1939-1951, 1993.

RODRIGUES, M. A. M.; SILVA, L. A. G.; SALVADORI, D. M. F.; CAMARGO, I. L. V.; MONTENEGRO, M. R. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short – and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, São Paulo, v.35, n.3, p.351-355, 2002.

ROBERFROID, M.; CALDERON, P. B. Excessive activation of phagocytic cells: a key event in radicals and reactive oxygen species-mediated pathogenesis. In: ROBERFROID, M.; CALDERON, P. B. eds. Free radicals and oxidation phenomena in biological systems. New York: Dekker. 1995. p.158-192.

ROSE, D. P.; CONNOLLY, J. M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive. **Pharmacology & Therapeutics**, v.83, p. 217-244, 1999.

ROSS, M. H.; REITH, J. E.; ROWRELL, J. L. Sistema digestivo II: esôfago, estômago e intestino. In: ROSS, M. H.; REITH, J. E.; ROWRELL, J. L. eds. Histologia texto e atlas. São Paulo: Panamericana, 1993. p.421-444. cap.16.

ROYNETTE, C. E.; CALDER, P. L.; DUPERTUIS, Y. M.; PICHARD, C. n-3 Polynsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutrition**, Bethesda, v.23, p.139-151, jul. 2004.

SABARENSE, C.M. **Avaliação do efeito dos ácidos graxos trans sobre o perfil dos lípidios teciduais de ratos que consumiram diferentes teores de ácidos**

**graxos essenciais.** 2003. Tese (Doutorado em Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SABARENSE, C. M.; FILHO MANCINI, J. Efeito da gordura vegetal parcialmente hidrogenada sobre a incorporação de ácidos graxos trans em tecidos de ratos. **Revista de. Nutrição**, Campinas, v.16, n.4, p.399-407, out./dez. 2003.

SCHARTKIN, M. D. Colon and Rectum. Risk factors. <http://seer.cancer.gov/publications/raterisk/risks129.html>, Pesquisado em dezembro de 2003.

SHETYE, J. D.; RUBIO, C. A.; HARMENBERG, U.; WARE, J.; DUVANDER, A.; MELLSTEDT, H.T. - Tumor-associated antigens common to humans and chemically induced colonic tumors of the rat. **Cancer Research**, Birmingham, v.50, p.6358-6363, 1990.

SIMOPOULOS, A. P.  $\omega$  -3 fatty acids in health na disease and in growth and development. **American Journal Clinical Nutrition**, Bethesda, v.54, p. 438-63, 1991.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids. Part 1. Metabolic effects on omega-3 fatty acids and essentiality. In: SPILLER, G. A. ed. **Lipids in human nutrition**. Roca Raton: CRC Press, 1996.

SINGH-RANGER, G.; MOKBEL, K. The role of ciclooxygenase-2 (COX-2) in breast cancer, and implications of COX-2 inhibition. **European Journal Sugery Oncology**, London, v.28, p.729-737, 2002.

SPRECHER, H. (n-3) and (n-6) fatty acid metabolism. In: GALLI, C.; SIMOPOULOS, A., eds. **Dietary  $\omega$ 3 and  $\omega$ 6 fatty acids** – Biological effects and nutritional essentiality. New York and London : Plenum Press: 1989. p. 69-7.

TAKAHASHI, M.; FUKUDA, K. OHATA, T. SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Increased expression of inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthases in rat colon tumors induced by azoxymethane. **Cancer Research**, Birmingham, v.57, p. 1233-1237, 1997a.

TAKAHASHI, M.; FUKUTAKE, M.; ISOI, T.; FUKUDA, K. SATO, H.; YAZAWA, K.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Supression of azoxymethane-induced rat colon carcinoma development by a fish oil component, docosahexanoic acid (DHA). **Carcinogenes**, Oxford, v.18,p.1337-1342, 1997b.

TAKAYAMA, T.; KATSUKI, S.; TAKAHASHI, Y.; OHI, M.; NOJINI, S.; SAKAMAKI, S.; KATO, J.; KOGAWA, K.; MIYAKE, H.; NIITSU, Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.339, p.1277-1284, 1998.

TAPIERO, H.; BA, G. N.;COUVREUR, P.; TEW, K. D. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomed. Pharmacother.**, v. 56, p.215-222, apr. 2002.

TASHIRO, T.; YAMAMORI, H.; HAYASHI, N.; SUGIURA, T.; TAKAGI, K.; FURUKAWA, K.; NAKAJIMA, N.; ITOH, I.; WAKABAYASHI, T.; OHBA, S.; AKAHANE, N. Effects of a newly developed fat emulsion containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on fatty acid profiles in rats. **Nutrition**, v. 14, n.4, sept. 1998.

TEITELBAUM, J. A.; WALKER, W. A. Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.12, p.21-32, sept. 2001.

TSUJII, M.; DUBOIS, R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell**, v.83, p.493-501, 1995.

VIOLA, P. **Azeite de oliva e a saúde**. Madrid: Consejo Oleícola Internacional, v.1, p.7-11, 1997.

WAINWRIGHT, P. E. Essential fatty acids and behavior. Is there role for the eicosanóides? 1 In: YEHUDA, S.; MOSTOFISKY, D. I., eds. **Handbook of essencial fatty acid biology; biochemistry, physiology and behavioral neurobiology**. Totowa: Humana Press Inc. 1997,p. 299-34. Cap.14.

WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3ª edição. Editora Atheneu, São Paulo, S.P., 2000, 1858p.

WALLACE, H. M.; CASLAKE, R. Polyamines and colon cancer. **European Journal of gastroenterology and Hepatology**, v.13, p.1033-1039, 2001.

WILLETT, W. The search for the causes of breast and colon cancer. **Nature**, London, v. 338, p. 389-394, 1989.

WARGOVICH, M.; CHEN, C.D.; JIMENEZ, A.; STEELE, V.E.; VELASCO, M. Et al.: Aberrant crypts as a biomarker for colon cancer: evaluation of potencial chemopreventive agents in the rat. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.5, p.355-360, 1996.

ZAMULA, E. The Greenland diet: can fish oils prevent heart disease? **FDA Consum.**,v.20,n.8,p.06-08,1986.