



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Franciane da Silva França

**EFEITO DE DIFERENTES LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE  
BIFIDOBACTÉRIAS, pH FECAL E LESÕES PRÉ-  
NEOPLÁSICAS EM RATOS TRATADOS COM  
DIMETILHIDRAZINA**

**Florianópolis  
2012**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Franciane da Silva França

**EFEITO DE DIFERENTES LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE  
BIFIDOBACTÉRIAS, pH FECAL E LESÕES PRÉ-  
NEOPLÁSICAS EM RATOS TRATADOS COM  
DIMETILHIDRAZINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia na Área de concentração Análises Clínicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Flávia Martinello.

**Florianópolis  
2012**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

F814e França, Franciane da Silva

Efeito de diferentes lipídios dietéticos sobre bifidobactérias, pH fecal e lesões pré-neoplásicas em ratos tratados com dimetilhidrazina [dissertação] / Franciane da Silva França ; orientadora, Flavia Martinello. - Florianópolis, SC, 2012.

97 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Dimetilhidrazina. 3. Lipídios dietéticos. 4. Bifidobactéria. 5. Câncer colorretal. I. Martinello, Flávia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

Franciane da Silva França

**EFEITO DE DIFERENTES LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE  
BIFIDOBACTÉRIAS, pH FECAL E LESÕES PRÉ-  
NEOPLÁSICAS EM RATOS TRATADOS COM  
DIMETILHIDRAZINA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de **Mestre em Farmácia**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Florianópolis, 29 de fevereiro de 2012.

---

Prof. Eloir Paulo Schenkel, Dr.

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Flavia Martinello, Dra.

Orientadora (UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup> Thaís Cristine Marques Sincero, Dra.

Membro (UFSC)

---

Prof. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade, Dr.

Membro (UFSC)

---

Prof. Sérgio Britto Garcia, Dr.

Membro Externo (USP)



*Dedico esta obra a Deus, por mostrar e iluminar o meu caminho, as minhas irmãs Francielle e Flávia, pelo carinho, incentivo e cumplicidade, a minha avó materna, Ailla Santana (in memoriam) e em especial aos meus pais, Antonito Luiz França de Carvalho e Domitila da Silva Carvalho pela dedicação, apoio, perseverança e por serem meus melhores exemplos de honestidade e bondade.*





## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Dra. Flávia Martinello por compartilhar do seu conhecimento, guiando meus estudos com dedicação e competência ao longo destes dois anos.

A Capes-Prof pela bolsa de mestrado, a qual auxiliou a minha vivência enquanto desenvolvia este trabalho.

Aos meus pais, Antonito e Domitila, pelos apoios afetivos e financeiros investidos na minha vida e na minha educação, pelos valores morais passados e por sempre incentivarem o meu aprimoramento, tanto pessoal quanto profissional. As minhas irmãs que são verdadeiras companheiras e amigas. Obrigada por me permitir amar e ser amada por vocês.

Ao Tiago, por todo apoio, cumplicidade, paciência e companheirismo. Você é muito especial.

Aos meus amigos pela amizade, pelo ombro acolhedor e pelas palavras e empurrões de incentivo.

Aos estagiários de iniciação científica do Laboratório de Gestão de Qualidade em Análises Clínicas/UFSC pela cooperação e amizade.

Ao Biotério Central/UFSC pelo apoio técnico durante toda a realização deste trabalho.

Aos animais que tiveram as suas vidas usurpadas em prol da ciência.

Às professoras do laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas/UFSC, Helena Cristina Franz, Lucy Parucker e Thais Cristine M. Sincero, pela permissão do uso de alguns equipamentos.

Aos professores Edson Luiz da Silva e Elisabeth Wazlawik pela autorização no uso dos biotérios setoriais.

Ao Francisco Carlos Deschamps, da Epagri/Estação Experimental de Itajaí, pela disponibilidade para determinação dos perfis de ácidos graxos dos óleos comerciais.

À farmacêutica Aline Costa, do Serviço de Anatomia Patológica/HU-UFSC, pela contribuição e auxílio nas técnicas de imunohistoquímica.

Aos farmacêuticos Nicolle Machado e Itamar Durli Junior, do PetLabor - Exames Veterinários, pela permissão do uso de alguns equipamentos.

Aos professores Filipe Modolo Siqueira e Elena Riet Correa Rivero do Laboratório de Patologia Bucal/UFSC pela colaboração e ensino sobre o preparo das amostras para fins de análise patológica.

Aos demais professores do Departamento de Análises Clínicas/UFSC pelos ensinamentos transmitidos durante a minha formação acadêmica e profissional.

Aos meus colegas do curso de Pós-Graduação pelo convívio agradável e pelos momentos de partilha, desde angústias a realizações.

Aos que me subestimaram ou que de alguma maneira, me serviram de mau exemplo, por me incentivarem a buscar em mim o meu melhor ou o meu aprimoramento.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para o desenvolvimento e concretização deste trabalho. Muito Obrigada!

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”*

(Martin Luther King)



## RESUMO

Ambos os fatores genéticos e ambientais estão envolvidos na etiologia do câncer colorretal (CCR). A composição da dieta assume destaque entre os fatores de risco ambientais para o desenvolvimento do CCR. Enquanto dietas ricas em ômega-6 têm sido associadas à indução da tumorigênese intestinal, dietas ricas em ômega-3 e 9 têm demonstrado efeito protetor neste processo. Neste contexto, a hipótese do presente estudo é que a dieta enriquecida em lipídios pode influenciar na carcinogênese colorretal que por sua vez pode alterar o equilíbrio da microbiota intestinal. Assim o objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito da adição de diferentes lipídios na dieta (óleo de canola, óleo de oliva, óleo de milho e colesterol) sobre a quantidade de bifidobactérias, pH fecal e o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas induzidas pela dimetilhidrazina em ratos. Para tal, 80 ratos machos Wistar foram aleatoriamente divididos em grupos (n=8) de acordo com a dieta e tratamento com a dimetilhidrazina (DMH) (150 mg/kg de peso corporal i.p.): CN (controle), CAN (óleo de canola 10%), OLI (óleo de oliva 10%), MIL (óleo de milho 10%), COL (colesterol 1%), CNDMH (controle e DMH), CANDMH (óleo de canola 10% e DMH), OLIDMH (óleo de oliva 10% e DMH), MILDMH (óleo de milho 10% e DMH) e COLDMH (colesterol 1% e DMH). A composição de ácidos graxos na dieta foi analisada por cromatografia gasosa. O tratamento durou oito semanas. Após este período, amostras de fezes foram coletadas para identificação e quantificação das bifidobactérias, determinação de colesterol e medida do pH fecal. Amostras de sangue foram coletadas para determinação dos parâmetros bioquímicos séricos colesterol total, triglicérides e HDL-colesterol. O fígado foi coletado para determinação do colesterol hepático. O cólon distal foi coletado para análise dos focos de cripta aberrantes (FCA) e da proliferação celular (antígeno nuclear de célula em proliferação – PCNA). Os grupos tratados com os óleos apresentaram maior ganho de peso em relação aos grupos tratados com dieta controle e colesterol. As diferentes dietas e a DMH não modificaram a quantidade de bifidobactérias nas fezes e a concentração sérica de colesterol total. Todos os grupos tratados com DMH apresentaram menor concentração sérica de triglicérides quando comparados aos respectivos controles sem DMH. O grupo MILDMH apresentou menor concentração de HDL-colesterol que o grupo MIL. O grupo COLDMH apresentou maior pH do que o grupo COL. Os grupos OLI e MIL apresentaram maior concentração de colesterol hepático que CN, o que também observado nos grupos tratados com DMH. A

concentração de colesterol nas fezes foi maior nos grupos tratados com colesterol. Os grupos não tratados com DMH não apresentaram FCA. O número de FCA/campo e índice de marcação com PCNA foram menores nos grupos CANDMH e OLIDMH. O grupo COLDMH desenvolveu maior quantidade de FCA/campo que os grupos tratados com óleos e DMH e maior índice de marcação pelo PCNA que o grupo CNDMH. Concluindo, observamos que entre os animais tratados com DMH, os óleos de canola e oliva se mostraram protetores em relação ao desenvolvimento dos FCAs quando comparados ao grupo controle, apesar de acumularem maior quantidade de colesterol hepático. O óleo de milho também apresentou quantidade significativamente menor de FCAs que o grupo tratado com colesterol. Além disso, os óleos de canola e oliva também apresentaram menor proliferação celular colônica, enquanto o colesterol, maior. Assim, podemos sugerir que o efeito dos lipídios dietéticos sobre as lesões pré-neoplásicas depende do tipo e da composição de ácidos graxos. E que o mecanismo pelo qual os lipídios atuam no processo de carcinogênese colorretal não está relacionado com a modulação da microbiota intestinal, visto que a quantidade de bifidobactérias não foi alterada pelo tratamento com os diferentes lipídios e dimetilhidrazina.

**Palavras-chaves:** Lipídios dietéticos, bifidobactérias, pH fecal, focos de criptas aberrantes, dimetilhidrazina.

## ABSTRACT

Both genetic and environmental factors are involved in etiology of colorectal cancer (CRC). Diet composition stands out among the environmental risk factor for the development of CRC. While diets rich in omega-6 have been associated with induction of intestinal tumorigenesis, diets rich in omega-3 and 9 have demonstrated a protective effect in this process. In this context, the hypothesis of this study is that diet rich in lipids may influence colorectal carcinogenesis which in turn can alter the balance of intestinal microbiota. The aim of this study was to evaluate the effect of adding different lipids in the diet (canola oil, olive oil, corn oil and cholesterol) on quantification of bifidobacteria, fecal pH and on development of precancerous lesions induced by dimethylhydrazine in rats. For this purpose, 80 male Wistar rats were randomly divided into groups (n=8) according to the treatment with diet and dimethylhydrazine (DMH) (150 mg/kg body weight i.p.): CN (control), CAN (canola oil 10%), OLI (olive oil 10%), MIL (corn oil 10%), COL (cholesterol 1%), CNDMH (control and DMH), CANDMH (canola oil 10% and DMH), OLIDMH (olive oil 10% and DMH), MILDMH (corn oil 10% and DMH) and COLDMH (cholesterol 1% and DMH). Fatty acids composition in the diet was analyzed by gas chromatography. The treatment lasted eight weeks. After this period, feces samples were collected for identification and quantification of bifidobacterias, cholesterol and measurement of fecal pH. Blood sample were collected for determination of biochemical parameters (total cholesterol, triglycerides and HDL-cholesterol). Liver were collected for determination of hepatic cholesterol. Distal colon was collected for analysis of aberrant crypt foci (ACF) and cell proliferation (proliferating cell nuclear antigen- PCNA). Groups treated with oils exhibited higher weight gain than groups treated with control and cholesterol diets. Different diets and DMH did not alter the amount of bifidobacteria in feces and serum total cholesterol. All groups treated with DMH had lower serum triglycerides when compared to respective controls without DMH. MILDMH group had lower HDL-c than MIL. COLDMH group had higher pH than COL. OLI and MIL groups had higher liver cholesterol than CN, and it was also observed in groups treated with DMH. Cholesterol levels in feces were higher in groups treated with cholesterol. Groups that weren't treated with DMH did not show FCA. The number of FCA/field and PCNA-labeling index were lower in CANDMH and OLIDMH groups. COLDMH group had larger amount FCA/field than groups treated with oils and DMH, and higher PCNA-

labeling index than CNDMH. In conclusion, we found that between animals treated with DMH, canola and olive oils were protective against the development of FCAs when compared to control group, although accumulate greater amounts of hepatic cholesterol. In addition, corn oil group also showed significantly less FCAs than cholesterol. Canola and olive oils also showed lower colonic cell proliferation, while cholesterol higher. Therefore, we suggest that the effect of dietary lipids on preneoplastic lesions the colorectal carcinogenesis depends on the type and fatty acids composition. Furthermore, the mechanism by which the lipids act in the process of colorectal carcinogenesis is not related to the modulation of the intestinal microbiota, once the amount of bifidobacteria was not altered by treatment with different lipids and dimethylhydrazine.

**Keywords:** dietary lipids, Bifidobacterium, pH fecal, aberrant crypt foci, dimethylhydrazine.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases da Carcinogênese .....	29
Figura 2. Estrutura molecular dos AGPIs e AGMI. ....	34
Figura 3. Esquema da via de biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados.....	36
Figura 4. Microbiota do trato gastrointestinal. ....	38
Figura 5. Bifidobactérias .....	40
Figura 6. Macroscopia das bifidobactérias .....	53
Figura 7. Microscopia das bifidobactérias .....	54
Figura 8. UFC de bifidobactérias por grama de fezes. ....	55
Figura 9. pH fecal.....	56
Figura 10. Concentração sérica de triglicérideo, .....	57
Figura 11. Concentração sérica de colesterol total.....	58
Figura 12. Concentração sérica de HDL-colesterol. ....	59
Figura 13. Concentração de colesterol hepático,.....	60
Figura 14. Concentração de colesterol fecal.....	61
Figura 15. Microscopia de segmento do cólon distal de rato Wistar.....	62
Figura 16. Focos de criptas aberrantes por campo. ....	63
Figura 17. Multiplicidade de criptas aberrantes por foco. ....	64
Figura 18. Microscopia de segmento do cólon distal de rato Wistar marcado imunohistoquimicamente pelo PCNA.. ....	65
Figura 19. Índice de marcação pelo PCNA .....	66



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características de tratamento dos grupos.....	43
Tabela 2. Composição da ração.....	44
Tabela 3 - Composição de lipídios, em g/100 ml de óleo. ....	51
Tabela 4 - Composição dos ácidos graxos (%) nos óleos de canola, oliva e milho.....	51
Tabela 5 – Peso médio, em gramas, dos ratos tratados com diferentes lipídios na dieta e presença ou não de DMH.....	52



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGMI - ácidos graxos monoinsaturados  
AGPI - ácidos graxos poli-insaturados  
CAs - criptas aberrantes  
CCR - câncer colorretal  
CN- controle  
CNDMH – controle + DMH  
CAN - dieta padrão + óleo de canola 10%  
CAN - dieta padrão + óleo de canola 10% + DMH  
COL - dieta padrão + colesterol 1%  
COLDMH - dieta padrão + colesterol 1% + DMH  
COX-2- Ciclo-oxigenase-2  
DP - Dieta padrão  
DII - doença intestinal inflamatória  
DMH - cloreto de 1,2- dimetilhidrazina  
DNA - ácido desoxirribonucleico  
EP – erro padrão da média  
F6PPK - frutose-6-fosfato-fosfocetolase  
FCAs - focos de criptas aberrantes  
i.p. - intraperitoneal  
MIL - dieta padrão + óleo de milho 10%  
MILDMH - dieta padrão + óleo de milho 10% + DMH  
OLI – dieta padrão + óleo de oliva 10%  
OLIDMH - dieta padrão + óleo de oliva 10% + DMH  
PCNA – do inglês *proliferating cell nuclear antigen*: antígeno nuclear de célula em proliferação  
ω – ômega



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>25</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>29</b>
3.1 CÂNCER COLORRETAL .....	29
3.2 CARCINOGENESE COLÔNICA EXPERIMENTAL.....	32
<b>3.2.1 Modelo e marcadores de lesão pré-neoplásica .....</b>	<b>32</b>
3.3 LIPÍDIOS DIETÉTICOS .....	33
3.4 MICROBIOTA INTESTINAL .....	37
<b>3.4.1 Bifidobactérias.....</b>	<b>39</b>
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>43</b>
4.1 ANIMAIS.....	43
4.2 DIETA.....	43
<b>4.2.1 Determinação do perfil de ácidos graxos nos óleos comerciais por cromatografia gasosa. ....</b>	<b>44</b>
4.3 PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DO CARCINOGENO DMH ..	45
4.4 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	45
4.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE BIFIDOBACTÉRIAS E pH FECAL .....	46
<b>4.5.1 Preparo do meio de cultura .....</b>	<b>46</b>
<b>4.5.2 Preparo do tampão.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5.3 Processamento das amostras de fezes.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5.4 Identificação do gênero <i>Bifidobacterium</i> por meio da reação da F6PPK .....</b>	<b>47</b>
4.6 DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS SÉRICOS.....	48
4.7 DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL HEPÁTICO E FECAL ..	48
4.8 PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO DAS AMOSTRAS. 48	
<b>4.8.1 Coloração Hematoxilina-Eosina .....</b>	<b>49</b>
<b>4.8.2 Imunohistoquímica.....</b>	<b>49</b>
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NOS ÓLEOS COMERCIAIS .....	51
5.2 EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE O GANHO DE PESO DOS RATOS TRATADOS OU NÃO COM DMH. ....	52

5.3 EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE AS BIFIDOBACTÉRIAS NAS FEZES DOS RATOS TRATADOS OU NÃO COM DMH. ....	53
5.4 EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE O PH FECAL DOS RATOS TRATADOS OU NÃO COM DMH .....	55
5.5 EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS DOS RATOS TRATADOS OU NÃO COM DMH. ....	56
<b>5.5.1 Triglicerídeos.....</b>	<b>56</b>
<b>5.5.2 Colesterol total .....</b>	<b>57</b>
<b>5.5.3 HDL-colesterol .....</b>	<b>58</b>
5.6 EFEITOS DOS DIFERENTES TIPOS DE LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE O COLESTEROL HEPÁTICO E FECAL.....	59
<b>5.6.1 Colesterol hepático.....</b>	<b>59</b>
<b>5.6.2 Colesterol fecal .....</b>	<b>60</b>
5.7 EFEITOS DOS DIFERENTES TIPOS DE LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE O NÚMERO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES/CAMPO E MULTIPLICIDADE DE CRIPTAS POR FOCO.....	62
<b>5.7.1 FCA/Campo.....</b>	<b>62</b>
<b>5.7.2 Multiplicidade de criptas por foco.....</b>	<b>63</b>
5.8 EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE O ÍNDICE DE MARCAÇÃO PELO PCNA DAS CRIPTAS DOS RATOS TRATADOS COM DIETA E DMH.....	64
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>97</b>



## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O intestino humano é um órgão complexo, formado principalmente por três componentes que estão em contato permanente e relacionados entre si: as células intestinais, os nutrientes e a microbiota. Além das funções conhecidas como digestão e absorção dos nutrientes, o intestino desempenha também um papel importante de defesa contra as agressões do ambiente externo. Essa ação acontece por meio da microbiota, da barreira da mucosa e do sistema imune local (BOURLIOUX *et al.*, 2003).

O trato gastrointestinal humano é colonizado por uma ampla variedade de micro-organismos, que estão distribuídos heterogeneamente de acordo com as características de cada porção. A escassez de bactérias no trato gastrointestinal superior reflete a composição ácida do lúmen e a intensa atividade motora da região. O oposto ocorre no intestino grosso, que contém um complexo e dinâmico ecossistema microbiano, com concentração que varia de  $10^{11}$  a  $10^{14}$  bactérias por grama de conteúdo luminal (GUARNER, MALAGELADA, 2003; GILL *et al.*, 2006).

A composição da microbiota intestinal é única para cada indivíduo e pode mudar em resposta a diversos fatores como idade, doenças, uso de medicamento e dieta (KINROSS *et al.*, 2008). Uma vez que é reconhecido o papel da microbiota intestinal sobre a saúde humana, a capacidade de modulação da dieta sobre a população de bactérias benéficas do intestino tem despertado interesse. Entre as bactérias intestinais benéficas à saúde destacam-se os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (GUARNER, 2002; PERIS *et al.*, 2002, PICARD *et al.*, 2005, VENTURA *et al.*, 2009).

As bifidobactérias são bacilos gram-positivos, anaeróbios, heterofermentativos conhecidas por promover efeitos benéficos à saúde do hospedeiro ao participarem da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no intestino, reduzir o pH e desempenhando ação bactericida, diminuir a produção de amônia pela fermentação de proteínas, produzir vitaminas (GUARNER, 2002; PERIS *et al.*, 2002, PICARD *et al.*, 2005, VENTURA *et al.*, 2009) e modular a resposta imune, podendo influenciar em doenças gastrointestinais, como o câncer colorretal (GALLAHER *et al.*, 1999, FEMIA *et al.*, 2002).

A etiologia do câncer colorretal (CCR) é complexa e ambos os fatores genéticos e ambientais estão envolvidos neste processo. O modelo experimental mais utilizado para estudos de CCR é baseado nos Focos de Criptas Aberrantes (FCAs), que são consideradas lesões pré-

neoplásicas do cólon e reto, induzidas por agentes químicos, como a dimetilhidrazina (DMH) (BIRD, 1987; BIRD 1995).

Entre os fatores de risco ambientais para o CCR destaca-se a dieta e desta, a ingestão de gordura. Os ácidos graxos e colesterol podem influenciar na carcinogênese por meio de diversos mecanismos, como por exemplo, na peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), no dano ao DNA e na modulação da resposta imune (KUSHI, GIOVANNUCCI, 2002; BUSSTRA *et al.*, 2003). O alto consumo de gordura pode modular o CCR (RAO *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2004). A suposição de que AGPI  $\omega$ -6 promovam a carcinogênese colônica, enquanto AGPI  $\omega$ -3 e monoinsaturados  $\omega$ -9 reduzam esse processo é sustentada por diferentes estudos *in vivo* e *in vitro* (OWEN *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2004; GUTT *et al.*, 2007; HALL *et al.*, 2008). Estes estudos sugerem que tanto a quantidade quanto a composição da gordura ingerida são fatores cruciais para a carcinogênese colorretal.

Neste sentido, considerando a necessidade de equilíbrio da microbiota para a saúde do cólon e a relação entre a ingestão dos lipídios dietéticos e o risco de desenvolvimento de CCR, a hipótese do presente estudo é que os lipídios dietéticos afetam o processo de carcinogênese do cólon, modulando desta forma a microbiota intestinal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da adição de diferentes lipídios na dieta sobre a concentração de bifidobactérias, o pH fecal e suas relações com o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas induzidas pela DMH em ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Tratar ratos com diferentes fontes de lipídios dietéticos: colesterol, óleo de milho (AGPI  $\omega$ -6), óleo de canola (AGPI  $\omega$ -3) e óleo de oliva (AGMI  $\omega$ -9) e induzir as lesões pré-neoplásicas no cólon com o carcinógeno dimetilhidrazina;
- b) Avaliar o efeito da dieta sobre a quantidade de bifidobactérias e pH fecal dos ratos;
- c) Avaliar o efeito da dieta sobre o perfil lipídico sérico dos ratos;
- d) Avaliar o efeito da dieta sobre as lesões pré-neoplásicas no cólon no que diz respeito ao número de focos de criptas aberrantes, número de criptas por foco e proliferação celular;
- e) Relacionar a quantidade de bifidobactérias com as lesões pré-neoplásicas no cólon.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 CÂNCER COLORRETAL

Câncer é o termo genérico utilizado para representar o conjunto de mais de 100 doenças e é caracterizado pelo crescimento desordenado do número de células, que invadem tecidos e órgãos e podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2011).

A carcinogênese é um processo complexo, multifásico, que envolve alterações celulares, moleculares e morfológicas sustentadas por modificações na expressão de genes que coordenam atividades essenciais celulares, como proliferação, diferenciação e apoptose. O processo de carcinogênese é dividido em quatro etapas: iniciação, promoção, progressão e manifestação (**Figura 1**) (INCA, 2009).

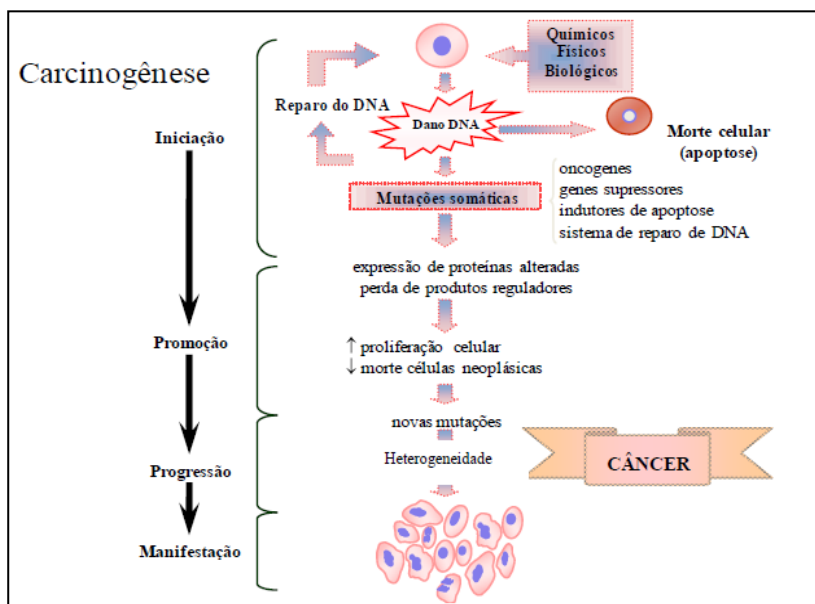


Figura 1. Fases da Carcinogênese. Esquemática dos quatro principais estágios do processo de carcinogênese: iniciação, promoção, progressão e manifestação. Fonte: CROCE, 2008.

A etapa de iniciação caracteriza-se por alteração permanente e irreversível do DNA celular. Na etapa de promoção há a expansão clonal de células iniciadas. Esta etapa é reversível, desde que retirado o

agente promotor. Na progressão tumoral, as células pré-neoplásicas se tornam invasivas (metástase) e mais expansivas, devido à elevada taxa de proliferação celular causada pela progressiva instabilidade genômica. Essas alterações estruturais observadas fornecem substrato biológico para a última etapa da carcinogênese, que é a manifestação clínica do câncer (PITOT, 1993; DOUGLAS, 2000; INCA, 2009).

O intestino grosso é subdividido em ceco, cólon, sigmoide, reto e ânus. O cólon apresenta uma superfície plana com numerosas criptas, tendo como principais funções a reabsorção de eletrólitos e água presente em seu lúmen (AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH FUND, 2007). Devido ao intenso fluxo entérico, a mucosa colônica necessita de renovação constante, e essa capacidade regenerativa é fundamental para manutenção da homeostase intestinal. Alterações nessa via podem levar a formação de pólipos, que são protruções salientes na superfície da parede intestinal, que podem progredir para câncer (GAROFALO *et al.*, 2004, SANCHO *et al.*, 2004). O cólon e reto são frequentemente acometidos por neoplasias primárias, que podem ser benignas (adenomas) ou malignas (carcinomas (adenocarcinomas)). Os adenocarcinomas são a maioria das neoplasias malignas do intestino grosso, que geralmente são iniciados como pólipos adenomatosos (BRUCKNER *et al.*, 2000; INCA, 2009).

O desenvolvimento do câncer colorretal resulta da instabilidade genética, possibilitando a proliferação descontrolada das células. O acúmulo de mutações que leva a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor pode aumentar a proliferação celular, levando a formação de lesões neoplásicas benignas ou malignas. Os principais oncogenes que apresentam anormalidades genéticas envolvidos no câncer colorretal são o *K-ras* e  $\beta$ -catenina, e entre os genes supressores de tumor, estão o *APC* (Adenomatous Polyposis Coli), *p53* e alguns membros da família de reparo de mal-pareamento (MMR), como o *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* (HOULSTON, TOMLINSON, 2001).

No Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas são a segunda causa de morte da população, representando aproximadamente 17% dos óbitos de causa conhecida notificados no Sistema de Informações sobre Mortalidade (INCA, 2009).

O CCR é uma doença que afeta grande parte da população mundial (SANTOS JÚNIOR, 2007). É a terceira causa mais comum de câncer no mundo em ambos os sexos, equivalendo a 9,4% de todos os casos novos de cânceres. O número de casos novos de CCR estimado para o Brasil para 2012 é de 14.180 casos em homens e de 15.960 em

mulheres, o que representa um risco de 15 casos novos/100mil homens e 16 casos novos/100mil mulheres (INCA, 2012).

Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o CCR em homens é o segundo câncer mais frequente na região Sudeste (22/100.000) e o terceiro nas regiões Sul (18/100.000) e Centro-Oeste (14/100.000). Na região Norte (4/100.000) ocupa a quarta posição e, na região Nordeste (5/100.000), a quinta. Nas mulheres, após o câncer de mama, é o segundo mais frequente nas regiões Sul (20/100.000) e Sudeste (23/100.000), o terceiro nas regiões Centro-Oeste (15/100.000) e Nordeste (7/100.000) e o sexto na região Norte (5/100.000) (INCA, 2012).

O prognóstico desse tipo de câncer é considerado bom quando detectado precocemente. A sobrevida média global em cinco anos se encontra em torno de 55% nos países desenvolvidos e 40% para países em desenvolvimento. Esse bom prognóstico faz com que o CCR seja o segundo tipo de câncer mais prevalente em todo o mundo, com aproximadamente 2,4 milhões de pessoas vivas diagnosticadas com essa neoplasia, ficando atrás somente do câncer de mama em mulheres (INCA, 2012).

Os principais fatores de risco do CCR são a idade acima de 50 anos, história familiar de CCR e a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas intestinais. Assim como para os outros tipos de cânceres, o tabagismo, alcoolismo, sedentarismo, histórico pessoal de câncer e a dieta também devem ser considerados (INCA, 2011; NCI, 2011). Entre os fatores dietéticos, a alimentação pobre em frutas, vegetais e fibras e rica em gordura animal e em carnes processadas e vermelha são sugeridos como de risco para o CCR. Porém, talvez nenhum fator dietético tenha atraído tanta atenção quanto à ingestão de gordura (KUSHI, GIOVANNUCCI, 2002; INCA, 2011).

Para o estudo da carcinogênese, modelos experimentais têm sido desenvolvidos em animais, utilizando-se carcinógenos químicos indutores da formação e desenvolvimento de tumores (SHETYE *et al.*, 1990). Entre os compostos químicos mais utilizados para indução da carcinogênese colorretal estão a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e o azoximetano (KEIGHLEY, WILLIAMS, 1998; ZILLOTTO, 2008; ROSENBERG, GIARDINA, TANAKA, 2009).

## 3.2 CARCINOGENESE COLÔNICA EXPERIMENTAL

### 3.2.1 Modelo e marcadores de lesão pré-neoplásica

O CCR induzido pela DMH e seus derivados é modelo muito utilizados na oncologia experimental para o estudo de vários aspectos da morfologia, patogênese, prevenção e tratamento deste câncer. Através desta prática, em condições experimentais controladas, é possível estudar em roedores a indução do CCR e a influência de fatores promotores ou inibidores no processo de oncogênese (ZILLOTTO, 2008).

Os carcinógenos químicos diretos e indiretos agem sobre o DNA e causam mutações, estimulam a proliferação celular e induzem tumores em vários órgãos, dependendo da dose, via e frequência de administração e sexo do indivíduo. O principal mecanismo de ação dos carcinógenos químicos é a formação de compostos covalentes com o DNA, aumentando a probabilidade de ocorrer erros durante a replicação e podendo inibir a atividade das enzimas reparadoras (ROSENBERG, GIARDINA, TANAKA, 2009).

A DMH é um carcinógeno químico indireto. A ativação metabólica da DMH envolve sua oxidação no fígado, originando o azometano, que sofre segunda oxidação, gerando o azoximetano. Este último, após sofrer hidroxilação por enzimas microssomais hepáticas, resulta em metilazoximetanol, um composto quimicamente instável em temperatura corporal, que após decomposição, libera formaldeído, água, nitrogênio e um agente alquilante, o metildiazônio, que é capaz de provocar metilação do DNA, RNA e outras proteínas. Seu modo de ação envolve interação com as bases púricas dos ácidos nucleicos, levando a modificação do genoma das células alvo. A preferência da DMH pelo cólon é explicada pela proliferação celular mais intensa no local, sendo que este carcinógeno induz a proliferação de tumores no cólon em grande número, principalmente no sigmoide e reto. Uma das alterações induzidas pela DMH no cólon são os focos de criptas aberrantes (FCAs) (OGATA *et al.*, 2010).

Segundo BIRD (1987), os FCAs são lesões caracterizadas morfologicamente por criptas anormais na superfície da mucosa do cólon, sendo descritas primariamente em ratos e apresentadas como evidência para o desenvolvimento futuro do CCR. Os FCAs podem ser utilizados como biomarcadores indicadores de provável progressão para câncer. As alterações nas células epiteliais das criptas colônicas tornam as criptas de tamanho aumentado, com aspecto mais corado, aberturas



menos circulares, tendência a se apresentarem alongadas, elípticas ou tortuosas, sendo chamadas de criptas aberrantes. Essas criptas aberrantes encontram-se isoladas ou agrupadas em FCAs.

As criptas aberrantes podem ser encontradas, por toda extensão do cólon, duas semanas após aplicação do carcinógeno químico. Primeiramente, surgem como criptas isoladas e, com o tempo, FCA com mais de uma cripta são encontrados. As novas criptas derivam de criptas aberrantes formadas anteriormente (BIRD, GOOD, 2000). O número de criptas por FCA é denominado de multiplicidade de criptas e é um parâmetro importante utilizado para avaliar a progressão dos FCAs (CHENG, LAI, 2003). No nível molecular são observados nos FCA mutações no gene *APC* e no *K-ras* (BIRD, GOOD, 2000).

O epitélio gastrointestinal tem a proliferação celular como mecanismo primordial de crescimento. A alta atividade proliferativa na região basal das criptas da mucosa intestinal é estritamente controlada por diversas proteínas reguladoras, incluindo o antígeno nuclear de célula em proliferação (PCNA). Por ser uma proteína de alta expressão na proliferação celular, é bastante utilizada, através da imunohistoquímica, como marcador de células em atividade proliferativa na extensão das lesões em estudos de CCR (HALL, LEVISON, 1990). Além do PCNA, outros marcadores são utilizados para observar alterações bioquímicas e imunohistoquímica nos focos de criptas aberrantes como o antígeno carcinoembrionário, proteínas *p53*, ciclooxygenase-2 e  $\beta$ -catenina (FERNANDES, MATOS, 2002; CHENG, LAI, 2003).

Estes modelos experimentais têm sido utilizados para o melhor entendimento da carcinogênese e dos efeitos de fatores genéticos e ambientais no seu desenvolvimento. Em relação aos fatores ambientais, a dieta se destaca por apresentar forte influência sobre carcinogênese colorretal (KUSHI, GIAVANNUCCI, 2002; INCA, 2011).

### 3.3 LIPÍDIOS DIETÉTICOS

A dieta é um dos mais importantes fatores de risco para o CCR, uma vez que a incidência deste câncer apresenta padrões bastante diferenciados entre regiões mundiais distintas, o que sugere uma forte influência de fatores locais (KUSHI, GIAVANNUCCI, 2002).

O processo dinâmico de renovação celular epitelial intestinal (proliferação, migração, diferenciação e apoptose) é afetado pelo estado nutricional e adequabilidade de nutrientes específicos da dieta (ZIEGLER *et al.*, 2003). O alto consumo de carnes e gorduras com o

baixo consumo de frutas, vegetais, vitaminas e fibras parecem aumentar o risco de CCR (RIBOLI, NORAT, 2003; SPENCER *et al.*, 2010).

O consumo de gordura tem sido considerado a principal influência nutricional sobre o desenvolvimento do CCR (RAO *et al.*, 2001). Porém, a quantidade e a composição da gordura dietética devem ser consideradas como fatores cruciais para carcinogênese colônica (FUJISE *et al.*, 2007).

O termo “gordura dietética” inclui os lipídios de plantas e tecidos animais que são ingeridos na alimentação. De uma forma geral, gorduras são sólidos e os óleos são líquidos a temperatura ambiente, e ambos constituem uma mistura de triglicerídeos com uma quantidade menor de outros constituintes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1995). A gordura dietética é composta de uma matriz complexa de ácidos graxos, com propriedades químicas e biofísicas únicas que fundamentam seu impacto sobre a saúde e doença (MACLENNAN, MA, 2010).

Existem três famílias importantes de ácidos graxos comumente consumidos na dieta: o ácido graxo monoinsaturado (AGMI)  $\omega$ -9 e os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs)  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 (**Figura 2**), sendo os óleos vegetais e óleo de peixe suas principais fontes (CUPPARI, 2002).

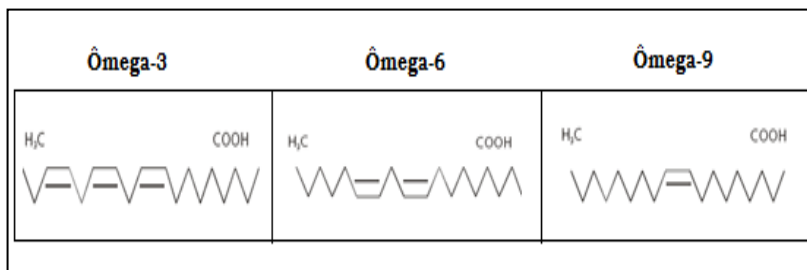


Figura 2. Estrutura molecular dos AGPIs e AGMI. Fonte: MACLENNAN, MA, 2010.

As duas maiores classes de AGPIs,  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, são moléculas ramificadas, com 16-24 carbonos, com 2 a 6 ligações insaturadas, sendo nomeada de acordo com a posição da primeira dupla ligação a partir do terminal metil da cadeia de hidrocarbonetos da molécula (ROYNETTE *et al.*, 2004).

Os  $\omega$ -3 marinhos ou de cadeia longa incluem os ácidos eicosapentaenoico, docosaexaenoico e docosapentaenoico. O ácido alfa-linolênico é o AGPI  $\omega$ -3 predominante na dieta e o único de cadeia

curta. Os AGPI  $\omega$ -6 incluem o ácido linoleico e ácido araquidônico. Os ácidos alfa-linolênico e linoleico são essenciais, uma vez que não podem ser sintetizados endogenamente e devem ser adquiridos através da dieta (WILLIAMS, BURDGE, 2006).

Diversos são os mecanismos propostos pelos quais os ácidos graxos e o colesterol podem influenciar a carcinogênese colorretal, incluindo o estresse oxidativo (peroxidação dos ácidos graxos e subsequente dano ao DNA), o metabolismo lipídico, glicêmico e dos ácidos biliares e as propriedades de membrana e sinalização celular. Porém, talvez o mecanismo mais evidenciado seja a resposta inflamatória e imune (KUSHI, GIOVANNUCCI, 2002; NKONDJOCK *et al.*, 2003; ROYNETTE *et al.*, 2004; KIMURA, 2006; CHAPKIN *et al.*, 2007).

Os AGPI são responsáveis pela formação de mediadores e reguladores da intensidade e duração da resposta inflamatória, como por exemplo, os eicosanoides: prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (LARSSON *et al.*, 2004; GAROFOLO, PETRILLI, 2006). Os ácidos graxos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 competem entre si pela incorporação em fosfolipídios de membrana, local em que modulam a fluidez, a sinalização e interações celulares (ROYNETTE *et al.*, 2004). Após a clivagem pelas fosfolipases A2 e C, a proporção relativa destes ácidos graxos determina a sua disponibilidade como substrato para a cicloxigenases (COX) e a lipoxigenases (LOX) e, com isso, determina o equilíbrio entre eicosanoides (LARSSON *et al.*, 2004; GAROFOLO, PETRILLI, 2006). Os AGPI  $\omega$ -6 são metabolizados em série 2 de prostaglandinas (PGE2) e tromboxanos, e série 4 de leucotrienos (LTB4). A metabolização dos AGPI  $\omega$ -3 gera eicosanoides derivados da COX que recebem o sufixo “3” e os da LOX, o sufixo “5” (**Figura 3**) (DUPERTUIS, MEGUID, PICHARD, 2007). As séries pares geradas tendem a ser pró-inflamatórias e proliferativas em muitos tecidos. As séries ímpares são preferencialmente utilizadas pelas enzimas COX e LOX e tendem a promover menor inflamação e proliferação, sendo menos favoráveis ao desenvolvimento e crescimento de células cancerígenas (SIMOPOULOS, 2002; HARDMAN, 2004).

Estudos experimentais e epidemiológicos têm mostrado que dietas ricas em AGPI  $\omega$ -6 promovem a carcinogênese, principalmente nas fases de pós-iniciação e/ou promoção (WU *et al.*, 2004; FUJISE *et al.*, 2007; FUNAHASHI *et al.*, 2008), e, dietas ricas em AGPI  $\omega$ -3 ou AGMI  $\omega$ -9 reduzem a tumorigênese, tanto na fase de iniciação quanto na pós-iniciação (REDDY, 2004; THEODORATOU *et al.*, 2007; FUNAHASHI *et al.*, 2008; KENAR *et al.*, 2008; MEGAN *et al.*, 2008;

HENRIQUES *et al.*, 2009; SÁNCHEZ-FIDALGO *et al.*, 2010; SOLANAS *et al.*, 2010).

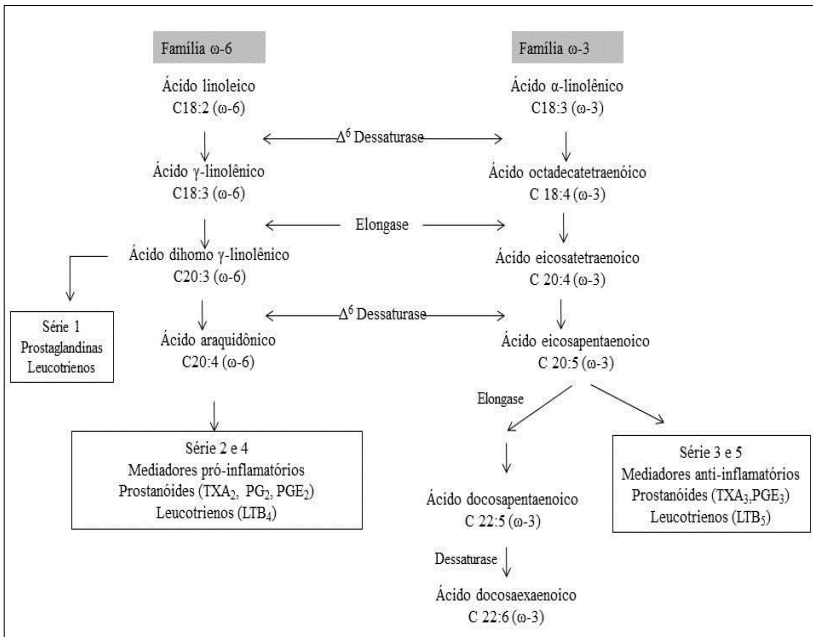


Figura 3. Esquematização da via de biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados. Fonte: GAROFOLO, PETRILLI, 2006.

Fujise e colabores (2007) investigaram a modulação dos óleos dietéticos sobre a via de sinalização responsável pela regulação da fosforilação da beta-catenina na carcinogênese colônica em ratos tratados com azoximetano, durante 44 semanas, e observaram que nos animais tratados com óleo de milho (ω-6) ou gordura bovina houve aumento no número de FCAs e maior incidência e multiplicidade tumoral, enquanto os tratados com óleo de oliva (ω-9) ou óleo de peixe (ω-3) apresentaram diminuição desses parâmetros. Também neste sentido, Wu e colaboradores (2004) observaram que a dieta suplementada com óleo de milho aumentou o número de FCAs, inibiu a apoptose, promoveu a proliferação celular e inibiu o gene supressor de tumor *p53* em ratos tratados com azoximetano, quando comparado ao grupo controle.

A hipótese de que o colesterol da dieta é um fator determinante na etiologia do CCR é controversa (ROSS, KASUM, 2002). Estudos

têm relatado o risco aumentado de CCR em dietas com alto consumo de colesterol (KENDALL *et al.*, 1992a, 1992b; KHAN *et al.*, 1996; DE STEFANI *et al.*, 1997; JARVINEN *et al.*, 2001; LLAVERIAS *et al.*, 2011; LA VECCHIA *et al.*, 2012). Porém, o efeito do colesterol pode ser dependente da fase de desenvolvimento do câncer. Quando o colesterol é administrado durante a fase de promoção, pode até diminuir o aparecimento de tumores induzidos (COHEN *et al.*, 1982, EL-SOHEMY *et al.*, 1996).

Considerada a influência da dieta na etiologia do CCR, é importante avaliar esta atuação por meio da ação sobre o metabolismo das bactérias intestinais, observando a geração ou não de derivados, a partir de alimentos, com potencial genotóxico, carcinogênico e indutor de tumor (BOSSCHER *et al.*, 2009).

### 3.4 MICROBIOTA INTESTINAL

Desde a infância, grandes mudanças ocorrem na composição da microbiota intestinal. Logo após o nascimento, o trato gastrointestinal previamente estéril começa a ser colonizado. Neste momento, vários são os fatores que influenciam na composição desta microbiota, como o tipo e o ambiente de parto, prematuridade, condições sanitárias e o tipo de amamentação. A implantação das diferentes espécies bacterianas ocorre de forma regulada pelo meio intestinal. Devido ao potencial redox positivo (concentração elevada de O<sub>2</sub>) da região, o crescimento de aeróbios ou anaeróbios facultativos é promovido. Gradualmente, o consumo do oxigênio por estas bactérias altera o ambiente intestinal tornando-o mais reduzido, proporcionando o crescimento de anaeróbios estritos (BEZIRTOGLOU, 1997; MACKIE *et al.*, 1999). A segunda grande alteração na composição da microbiota ocorre no desmame e introdução de alimentos sólidos (FAVIER *et al.*, 2002).

O trato gastrointestinal humano abriga uma microbiota constituída de uma ampla variedade de micro-organismos, que estão distribuídos heterogeneamente de acordo com as características de cada porção. A escassez de bactérias no trato gastrointestinal superior reflete a composição ácida do lúmen e a intensa atividade motora (peristaltismo) da região. O oposto ocorre no intestino grosso, devido ao peristaltismo lento e ao abundante suprimento nutricional, que desta forma apresenta um complexo e dinâmico ecossistema microbiano, com concentração variando entre 10<sup>11</sup> a 10<sup>14</sup> bactérias por grama de conteúdo luminal (GUARNER, MALAGELADA, 2003; GILL *et al.*, 2006).

A microbiota colônica adulta é constituída principalmente por anaeróbios estrictos como *Bacteriodes spp.*, *Clostridium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Atopodium spp* e em menor proporção por anaeróbios facultativos como lactobacilos, enterococos, estreptococos e enterobactérias (**Figura 4**) (DAVIS, MILNER, 2009).

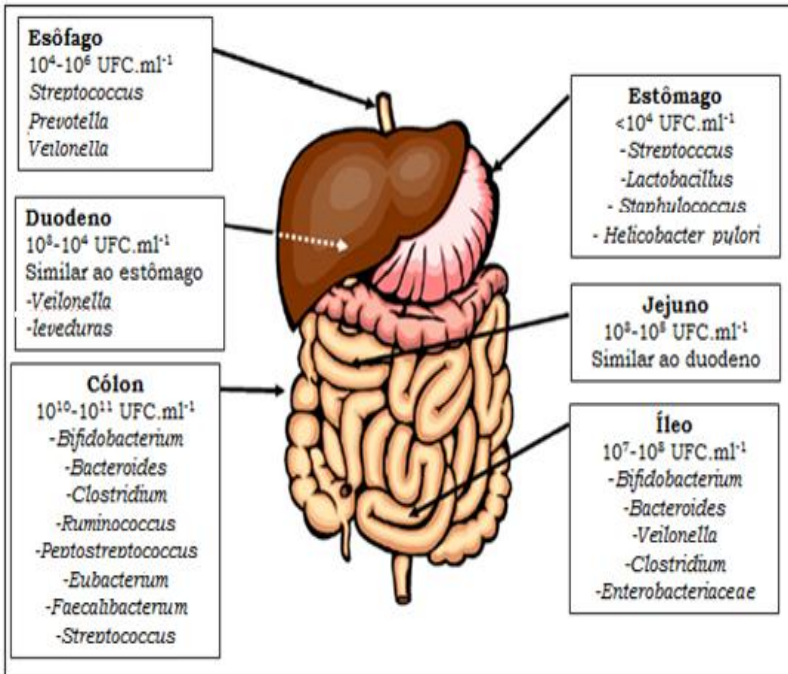


Figura 4. Microbiota das diferentes partes do trato gastrointestinal. Fonte: TIIHONEN, OUWEHAND, RAUTONEN, 2010.

A resistência à colonização (capacidade de impedir ou reduzir a multiplicação de micro-organismos exógenos), a modulação do sistema imune da mucosa intestinal e a contribuição nutricional ou metabólica exercidas pela microbiota, torna-a essencial para o desenvolvimento intestinal, homeostase e proteção contra patógenos (BRANDT *et al.*, 2006; MARCHESI, SHANAHAN, 2007).

O equilíbrio entre as espécies bacterianas residentes promove a estabilidade da população microbiana em condições normais. O desequilíbrio na composição da microbiota intestinal humana,

desencadeado em resposta a diversos fatores como idade, doença, medicamentos ou dieta, está relacionado com danos imediatos ou tardios a saúde do hospedeiro (MITCHELL *et al.*, 1996; GRONLUND *et al.*, 2007; KINROSS *et al.*, 2008). A dieta pode influenciar a composição da microbiota intestinal ao fornecer substratos específicos (prebióticos) para determinadas bactérias que contribuem para saúde do hospedeiro.

Os prebióticos são definidos como ingredientes alimentares não digeríveis que beneficiam o hospedeiro por estimulação seletiva da microbiota intestinal, promovendo o crescimento e atividade de um número limitado de bactérias no cólon, proporcionando melhora na saúde. Já os probióticos são organismos vivos, que em quantidades adequadas, afetam benéficamente o hospedeiro, promovendo o balanço da sua microbiota intestinal ao reforçar os mecanismos naturais de defesa (TUOHY *et al.*, 2003; SAAD, 2006). Uma biota intestinal favorável consistiria de uma quantidade maior de bactérias benéficas à saúde e menor de bactérias prejudiciais. Dentre as bactérias que compõem a microbiota intestinal, as bifidobactérias desempenham atividades biológicas positivas na saúde humana e são alvos comuns das intervenções dietéticas (CUMMINGS, MACFARLANE, 2002).

### 3.4.1 Bifidobactérias

A família Bifidobacteriaceae é constituída pelos gêneros *Bifidobacterium* e *Gardnerella*. O gênero *Bifidobacterium* é composto por mais de 30 espécies identificadas e isoladas de humanos e animais, sendo elas: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. boum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. infantis*, *B. inopinatum*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* e subsp. *globosum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. subtile*, *B. suis*, *B. thermacidophilum* e *B. thermophilum* (BIOVATI, MATTARELLI, 2006).

As bifidobactérias foram isoladas e descritas primeiramente por Tissier, entre 1899-1900, sendo denominadas de *Bacillus bifidus communis* ou simplesmente *Bacillus bifidus*. O gênero *Bifidobacterium* sp. foi originalmente proposto por Orla-Jensen, em 1924, porém, somente em 1986 foi aceito e reconhecido como gênero independente, na oitava edição do Manual Bergey's de Microbiologia (POUPARD, HUSAIN, NORRIS, 1973).

As bifidobactérias são classificadas como bactérias Gram-positivas, anaeróbias, imóveis, catalase negativas, não esporuladas e não produtoras de gás. No que diz respeito a sua morfologia, podem apresentar várias formas que incluem bacilos curtos e curvados a bacilos com extremidade em forma de V ou Y (**Figura 5**) (BIOVATI, MATTARELLI, 2006).

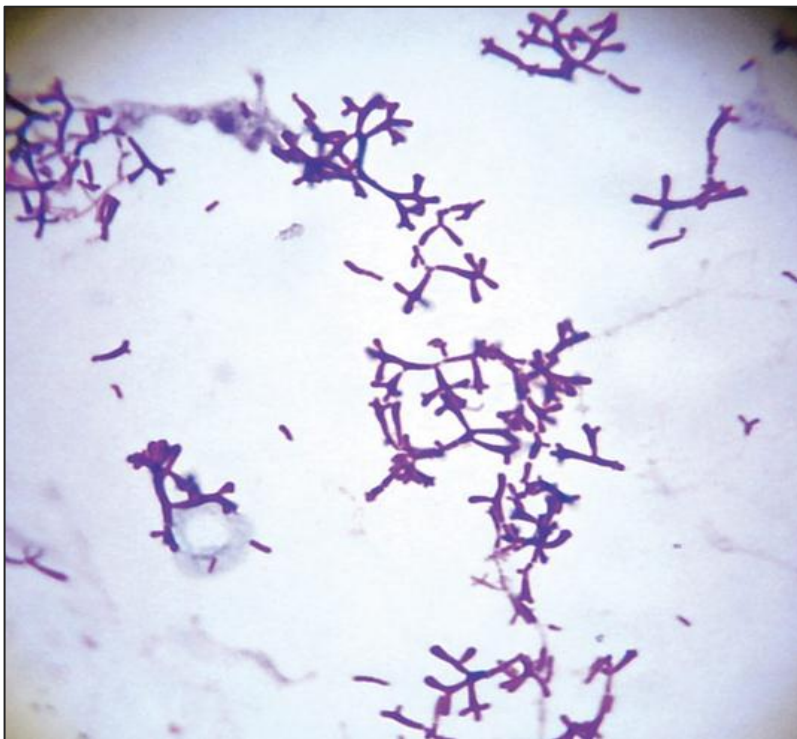


Figura 5. Bifidobactérias. Bacilos, com extremidade bifurcada, corados positivamente na técnica de GRAM. Fonte: OHNO, 2011.

O crescimento ótimo ocorre em temperaturas entre 37°C- 41°C e pH entre 6.5-7.0 (LEAHY *et al.*, 2005). São heterofermentativas, produzindo ácidos acético e lático na proporção molar de 3:2, a partir de dois moles de hexose, sem produção de CO<sub>2</sub>, exceto durante a degradação do gluconato. As bifidobactérias não possuem a enzima aldolase e apresentam atividade reduzida da fosfofrutoquinase, metabolizando a glicose por um processo diferenciado. A enzima-chave desta via fermentativa é a frutose-6-fosfatofosfocetolase (F6PPK), que



está envolvida na quebra da frutose-6-fosfato para eritrose-4-fosfato e acetil-fosfato, na presença de fosfato inorgânico e tem sido utilizada como marcador taxonômico na identificação do gênero, mas que não permite a diferenciação entre as espécies (BIOVATI, MATTARELLI, 2006).

Essas bactérias são consideradas potencialmente benéficas a saúde humana por reduzirem o pH através da produção de ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético e ácido láctico), inibindo assim o crescimento de bactérias patogênicas. Um efeito aditivo da produção de ácidos é a protonação de amônia (potencialmente tóxica), produzindo  $\text{NH}_4^+$ . Além disso, as bifidobactérias restauram a biota intestinal após terapia antimicrobiana, reduzem o colesterol sérico através da degradação e absorção dos ácidos biliares, ação que também contribui para redução da secreção de mucina e fluidos que contribuem para o desenvolvimento de diarreia ou síndrome do intestino irritável. Também possuem atividade imunomoduladora, melhorando a resistência aos patógenos e a atividade antitumoral (GIBSON, ROBERFROID, 1995; BIOVATTI, MATTARELLI, 2006; CAMILLERI, 2006; SHIN *et al.*, 2010).

Em relação à atividade antitumoral, Kulkarni e Reddy (1994) estudaram as propriedades de culturas liofilizadas de *B. longum* em FCA induzidos em ratos por azoximetano, durante cinco semanas. Os resultados indicaram que as suplementações dietéticas nas concentrações 1,5% e 3,0% inibiram significativamente a formação de FCA e a multiplicidade das criptas, o que sugere uma propriedade inibitória da *B. longum* no tumor de cólon.

Também neste sentido, Challa e colaboradores (1997) concluíram que o tratamento com dieta contendo associação de 0,5% de *B. longum* e 2,5% de lactulose exerce ação antitumorígenica no cólon de ratos, 13 semanas depois de receberem duas doses subcutâneas de azoximetano ( $16\text{mg. kg}^{-1}$  de peso).

Gueimonde e colaboradores (2007) caracterizaram a microbiota bífida da mucosa colônica em pacientes com CCR, diverticulite ou doença intestinal inflamatória (DII). As 34 amostras do cólon foram obtidas durante processo cirúrgico (por isso, a não obtenção de amostras de indivíduos saudáveis) e avaliadas por PCR. As bifidobactérias foram encontradas em todas as amostras dos pacientes com diverticulite ou DII, e em apenas 76% das amostras de CCR. Quantitativamente, os pacientes com CCR e DII apresentaram menor concentração de bifidobactérias do que os pacientes com diverticulite. Com isso, concluíram que alterações da mucosa associadas a microbiota estão

presentes em diferentes doenças intestinais, indicando uma correlação da microbiota com a patogênese dessas doenças.

Kim e colaboradores (2008) avaliaram a ação anticarcinogênica e a inibição de enzimas bacterianas pela *Bifidobacterium adolescentes* SPM0212 em linhagens celulares de CCR (Caco-2, HT-29 e SW 480). A espécie de bifidobactéria analisada inibiu as enzimas urease, triptofanase,  $\beta$ -glicosidade e  $\beta$ -glicuronidase, diminuiu a produção de TNF- $\alpha$  e reduziu a proliferação celular dose-dependentemente, exercendo um efeito anticarcinogênico.

O mecanismo pelo qual as bifidobactérias exercem sua atividade antitumoral não está claro, mas pode ser devido à melhoria da resposta imune do hospedeiro, degradação dos agentes potencialmente cancerígenos, alteração da microbiota intestinal que produz supostos carcinógenos, alteração das propriedades físico-químicas do cólon e/ou produção de substâncias antitumorais (HIRAYAMA, RAFTER, 1999; RHEE *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2008; YIN *et al.*, 2011).

Considerando a influência da dieta no equilíbrio da microbiota intestinal, buscamos uma relação entre a ingestão de diferentes lipídios dietéticos e as bifidobactérias da microbiota intestinal e, a ação destes no processo de carcinogênese colorretal.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ANIMAIS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC sob protocolo PP00321 (**Anexo**).

Oitenta ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, Rodentia), com idade entre 30-45 dias, foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 10 grupos de oito animais cada. Os animais (quatro por gaiola) foram mantidos em gaiolas de polietileno forradas com maravalha em temperatura de  $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclo de luz de 12 horas. Após o período de uma semana de aclimatização, o tratamento foi iniciado com a administração do carcinógeno DMH e da dieta por um período de oito semanas conforme a Tabela 1.

Tabela 1- Características de tratamento dos grupos.

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento</b>
1 CN	Dieta padrão (DP)
2 CAN	DP + óleo de canola
3 OLI	DP + óleo de oliva
4 MIL	DP + óleo de milho
5 COL	DP+ colesterol
6 CNDMH	DP + DMH
7 CANDMH	DP + óleo de canola + DMH
8 OLIDMH	DP + óleo de oliva + DMH
9 MILDMH	DP + óleo de milho + DMH
10 COLDMH	DP + colesterol + DMH

### 4.2 DIETA

Óleo de canola (Salada- Bunge®), de milho (Salada-Bunge®) ou de oliva (d'Aguire®) em concentração final de 10% (p/p) ou colesterol (Sigma-Aldrich) em concentração final de 1% (p/p) foram adicionados aos *pellets* da ração fornecida pelo Biotério Central da UFSC (Nutrilabor®) utilizando pulverizador. A composição desta ração está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Composição da ração.

Componente	Quantidade	Componente	Quantidade
Umidade (máx)	12,5 %	Antioxidante	100 mg
Proteína bruta (mín)	22 %	Matéria mineral (máx)	10 %
Extrato etéreo (máx)	4,5 %	Matéria fibrosa (máx)	8 %
Fósforo (mín)	0,8 %	Cálcio (máx)	1,4 %
Vit. A	12.000 UI	Ferro	50 mg
Vit. D3	1.800 UI	Zinco	60 mg
Vit. E	30,0 mg	Cobre	10 mg
Vit. K3	3,0 mg	Iodo	2,0 mg
Vit. B1	5,0 mg	Manganês	60 mg
Vit. B2	6,0 mg	Selênio	0,05 mg
Vit. B6	7,0 mg	Cobalto	1,5 mg
Vit. B12	20,0 mcg	Lisina	100 mg
Niacina	60,0 mg	Metionina	300 mg
Ácido pantonênico	20,0 mg	Biotina	0,05 mg
Ácido fólico	1,0 mg	Colina	600,0 mg

Fonte: Nuvital nutrientes.

A mesma quantidade de ração e água foi fornecida diariamente para os grupos. A análise do ganho de peso foi realizada por meio da pesagem dos animais no primeiro e no último dia de tratamento.

#### 4.2.1 Determinação do perfil de ácidos graxos nos óleos comerciais por cromatografia gasosa.

A determinação do perfil de ácidos graxos foi realizada na EPAGRI, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina- Estação Experimental de Itajaí.

Os lipídios foram transformados em ésteres metílicos seguindo a metodologia proposta por Hartman & Lago (1973), com pequenas modificações.

A derivatização foi realizada a partir da adição de 500 µl da solução de saponificação (KOH 0,5 N em metanol) a 50 mg de amostra de óleo, em bloco de digestão a 80°C por uma hora. Após esta etapa, 2 ml de solução metanólica ácida (6 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em 120 ml de metanol) foram adicionados e mantidos a 80°C por 1 hora.

Após a esterificação, os tubos foram resfriados. Para extração dos ésteres metílicos de ácidos graxos, foram adicionados 2 ml de n-hexano, e agitados em vórtex. Um mililitro da fase n-hexano foi transferido para um tubo adequado ao injetor automático do cromatógrafo gasoso.

Para a determinação do perfil de ácidos graxos foi utilizado cromatógrafo a gás Shimadzu 17A, equipado com o detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar Supelco SP2340 (60 m x 0,25 mm x 0,2  $\mu$ m). As temperaturas do detector e injetor foram de 260 °C e 240 °C, respectivamente. A temperatura da coluna iniciou com 120 °C por 5 minutos e aumentou gradualmente 4 °C/min até a temperatura final de 240 °C, permanecendo assim por 10 min (tempo total da corrida: 45 minutos). O gás de arraste ( $H_2$ ) possui velocidade linear de 17  $cm.s^{-1}$  o que corresponde ao fluxo na coluna de 0,67  $ml.min^{-1}$ . Foi utilizado o volume de injeção de 1  $\mu$ l com razão de split de 1:50. A identificação dos picos foi efetuada pela comparação dos tempos de retenção dos picos característicos com o padrão de ésteres metílicos (Supelco 37 components FAMES Mix, ref. 47885-U). A quantificação foi realizada pela razão da área do pico do éster metílico de interesse, em relação à área total dos picos identificados, expressa em percentagem.

#### 4.3 PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DO CARCINÓGENO DMH

Os animais dos grupos seis ao dez receberam uma dose única intraperitoneal de DMH (150 mg/kg de peso corporal). O cloreto de 1,2-dimetilhidrazina (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em solução salina estéril e o pH ajustado em 7,0 pela adição de hidróxido de sódio. Equipamentos de segurança individual e coletiva foram utilizados.

#### 4.4 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Após oito semanas de tratamento com as respectivas dietas, amostras de fezes de cada animal foram colhidas, individualmente, em sacos plásticos com fecho hermético.

Os animais em jejum de 12-14 horas foram anestesiados com ketamina e xilazina (90 mg/kg de peso e 10 mg/kg de peso, respectivamente) para coleta de sangue e eutanasiados por exsanguinação através de punção cardíaca. O soro foi separado por centrifugação a 2.500 rotações por minuto por 15 minutos em temperatura ambiente.

Os ratos foram submetidos à incisão mediana abdominal e os cólons foram removidos para análise histológica. As peças foram abertas longitudinalmente pela borda mesentérica e, em seguida, lavados com solução salina tamponada e armazenados em formalina tamponada 10%

(v/v) (tampão fosfato de sódio, pH 7,0) a temperatura ambiente até o processamento.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE BIFIDOBACTÉRIAS E PH FECAL

Para o isolamento e a quantificação de bifidobactérias e pH fecal, as amostras de fezes coletadas dos animais foram mantidas em ambiente anaeróbio por, no máximo, 3 horas até a análise.

##### 4.5.1 Preparo do meio de cultura

De acordo com a padronização do ITAL (Instituto de Tecnologia em Alimentos- Campinas/SP) e segundo Munõa & Pares (1988) a adição de determinados antibióticos ao RCA (*Reinforced Clostridial Agar*®) forma o meio BIM-25, que é seletivo para o isolamento de bifidobactérias.

Para o preparo de um litro de meio, 45 gramas de RCA (Himedia ®) foram pesados, dissolvidos em 1 litro de água destilada e deionizada e autoclavado a 121°C por 18 minutos. Após resfriar e atingir a temperatura de aproximadamente 50°C, os antibióticos (0,02 g/l de ácido nalidíxico, 0,0085 g/l de sulfato de polimixina B, 0,05g/l de sulfato de kanamicina, 0,025g/l de ácido iodoacético, 0,025g/l de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio e 0,005 g/l de anfotericina B) foram adicionados ao meio. O meio foi distribuído em placas de petri estéreis.

##### 4.5.2 Preparo do tampão

O tampão fosfato 0,25 M estéril estoque continha 34 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em um litro de água destilada e o pH ajustado em 7,2 com NaOH 1N. O tampão de uso 0,31 mM foi feito no momento do uso pela diluição do 1,25 ml de tampão estoque em quantidade suficiente para um litro de água estéril.

##### 4.5.3 Processamento das amostras de fezes

De cada animal, um grama de fezes foi pesado e diluído em nove mililitros de água destilada e deionizada estéril para verificação do pH em pHmetro PHTEK®.

De cada animal também foi pesado um grama de fezes e diluído em nove mililitros de tampão fosfato 0,31 mM. A partir desta diluição

( $10^{-1}$ ) foram realizadas diluições decimais seriadas até  $10^{-7}$  por meio da transferência de 100  $\mu$ l da diluição anterior para microtubos estéreis contendo 900  $\mu$ l de tampão fosfato 0,31 mM cada.

O inóculo (100  $\mu$ l) de cada diluição  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  foi semeado uniformemente em toda a superfície do ágar utilizando alça de Drigalski devidamente estéril. As placas, identificadas com as respectivas diluições, foram incubadas a 37 °C durante 72 horas em jarra de anaerobiose com sistema comercial de geração de atmosfera anaeróbia (Anaerobac da Probac®). Após 72 horas de incubação, foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias de bifidobactérias e determinado o número de colônias por grama de fezes. Para todos os tipos de colônias isoladas foram realizadas coloração de Gram, prova da catalase e a reação da F6PPK para confirmação do gênero.

#### **4.5.4 Identificação do gênero *Bifidobacterium* por meio da reação da F6PPK**

O método de detecção da F6PPK, primeiramente descrito por SCARDOVI (1986), com modificações de Orban e Patterson (2000) foi utilizado para a identificação do gênero *Bifidobacterium*.

Todas as colônias Gram positivas, em forma bacilar a cocoide e catalase negativas, observadas na semeadura das fezes foram cultivadas em 10 ml de caldo clostridial reforçado (Himedia) em jarras de anaerobiose, a 37°C por 42 horas. Após esse período os caldos foram centrifugados a 10.000 g, a 4°C, por 15 minutos. Os *pellets* foram lavados duas vezes com solução 1 (tampão fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05 M contendo cisteína-HCl 500  $\text{mg.l}^{-1}$  e pH 6,5) e ressuspensos em 1 ml da mesma solução. As células bacterianas foram rompidas pela adição de 0,4 ml de brometo de cetrímide (45  $\text{mg.ml}^{-1}$ ) por um período de 5 minutos. Em seguida, 0,25 ml da solução 2 (NaF 3  $\text{mg.ml}^{-1}$  e iodoacetato de sódio 5  $\text{mg.ml}^{-1}$ ) e 0,25 ml da solução 3 (frutose-6-fosfato 80  $\text{mg.ml}^{-1}$ ) foram adicionados, misturados e incubados a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, para interromper a reação, 1,5 ml de solução 4 (hidroxilamina-HCl 13  $\text{g.dl}^{-1}$  em água, pH 6.5) foi adicionado, misturado e deixado a temperatura ambiente por 10 minutos. Um mililitro de ácido tricloroacético a 15% (p/v) e um mililitro de HCl 4N foram adicionados para acidificar o meio. Um mililitro do indicador de cor cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  5% em HCl 0,1 M) foi adicionado e a solução agitada. O desenvolvimento de cor violeta indica a presença da enzima F6PPK e a coloração amarela indica resultado negativo (ORBAN, PATTERSON, 2000).

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS SÉRICOS

As determinações dos parâmetros bioquímicos triglicérides, colesterol total e colesterol-HDL foram realizados utilizando-se kits comerciais, conforme as instruções do fabricante Labtest Diagnóstico (Montes Claros, MG). As análises foram realizadas em duplicata utilizando o analisador semi-automatizado Bioplus modelo 200F.

Para a garantia da qualidade das determinações foi utilizado o soro controle veterinário Control Lab<sup>®</sup>, lotes VCB 25 e VCB 26.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL HEPÁTICO E FECAL

A determinação do colesterol hepático e fecal foi realizada de acordo com MELO e colaboradores (2008). O fígado dos animais foi removido, lavado em solução fisiológica, seco em papel filtro e refrigerado a -20°C, até a determinação da concentração hepática de colesterol. Amostras de fezes também foram coletadas e refrigeradas até a análise.

As amostras de fígado e fezes foram secas em estufa a 60°C, por 24 horas. Após este período, 5 ml de isopropanol foram adicionados a 0,5 g de amostra seca para solubilização do colesterol. A amostra foi macerada com auxílio de um pistilo e mantida, em geladeira, por 24 horas. O sobrenadante foi coletado após centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos.

Kits comerciais foram utilizados para determinação do colesterol hepático e fecal, conforme as instruções do fabricante Labtest Diagnóstico (Montes Claros, MG) e analisadas no analisador semi-automatizado Bioplus modelo 200F.

#### 4.8 PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO DAS AMOSTRAS

Os cortes foram retirados da formalina, recortados e processados. As peças foram desidratadas por imersão em banho de álcool em concentrações crescentes (Álcool 70% 1h; Álcool 95% 1h; Álcool Absoluto I 1h e Álcool Absoluto II 1h), diafanizadas em banho de xilol (Xilol I 1h; Xilol II 1h) e impregnadas em parafina fluida (parafina I 1h; parafina II 1h) antes de serem incluídas. Os cortes foram incluídos em duas posições para obtenção de cortes longitudinais e transversais das criptas intestinais. Após inclusão em parafina, os blocos foram



cortados em micrótomo para obtenção de cortes com 3µm de espessura e montados em lâminas.

#### 4.8.1 Coloração Hematoxilina-Eosina

Os cortes transversais das criptas intestinais foram corados com Hematoxilina de Harris por 5 min e contra corados com solução de Eosina Floxina alcoólica por 3min. As lâminas foram desidratadas submergindo-as em concentrações crescentes de álcool (95 a 100%) e em seguida diafanizadas em xilol que é o meio miscível do Entellan® (Merck) utilizado para selar as lâminas.

O conjunto de duas ou mais características (tamanho aumentado, camada epitelial mais espessa e corada quando comprada com as criptas adjacentes normais, lúmen maior e com forma alterada) foi utilizado para definir a cripta como aberrante (YAMADA *et al.*, 2000; GUPTA, PRETLOW, SCHOEN, 2007).

Para quantificação dos FCAs por campo microscópico (em aumento total de 400x), 20 campos microscópicos por corte de cada animal foram analisados. Para multiplicidade, o número de criptas aberrantes por FCA foi avaliado.

#### 4.8.2 Imunohistoquímica

A reação de imunohistoquímica foi realizada no Serviço de Anatomia Patológica/HU-UFSC.

A expressão da proteína PCNA no cólon dos ratos foi avaliada através da técnica de imunohistoquímica pelo método estreptavidina-biotina-peroxidase (*labelled streptavidin biotin* – LSAB).

As lâminas silanizadas contendo os cortes longitudinais das criptas intestinais foram mantidas em estufa a 50°C por 1 hora, para fixação. Em seguida, os cortes foram desparafinados em xilol, diafanizados e hidratados por passagens sucessivas em álcool de concentrações decrescentes. Após a hidratação dos cortes, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena, para evitar reações inespecíficas falso-positivas, por meio da incubação das lâminas em solução contendo peróxido de hidrogênio a 3% em metanol absoluto, por 20 minutos. Após essa etapa, os cortes foram lavados com tampão salina fosfato pH 7,2 (PBS) (Laborclin, Paraná, Brasil) e com água destilada. Para a reativação antigênica, as lâminas foram colocadas em tampão Citrato 0,1 M (pH 6,0), pré-aquecidas em banho-maria e mantidas durante 40 minutos em temperatura constante (95°C-98°C). Em seguida, as lâminas

foram mantidas a temperatura ambiente durante 30 minutos e lavadas com tampão PBS. O anticorpo monoclonal anti-PCNA (Thermo Scientific, EUA), diluído 1:500, foi adicionado aos cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a temperatura ambiente por 12 horas.

As lâminas foram lavadas com tampão PBS e incubadas com anticorpo secundário biotinizado (Daki, CA, EUA) por 30 minutos. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas com estreptavidina conjugada a peroxidase (Dako, CA, EUA) durante 40 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e submetidas à revelação colorimétrica com solução cromógena (3,3'-diaminobenzidina-DAB), conforme recomendação do fabricante (Biocare Medical, CA, EUA). Após a revelação, foi realizada a contra-coloração com solução Hematoxilina de Harris durante 6 min, a desidratação através da passagem em concentrações crescentes de álcool, a diafanização em xilol e montagem, utilizando meio de montagem sintético Entellan<sup>®</sup> (Merck). Como controle positivo foi utilizado o intestino de rato da linhagem Wistar. O controle negativo foi realizado pela abolição do anticorpo primário nas reações.

O índice de marcação foi determinado pela relação entre o número total de células e o número de células fortemente coradas pelo PCNA ao longo de cada cripta. Foram contadas 10 criptas por corte, sendo um corte para cada animal, em aumento total de 400x.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados e registrados no programa Excel<sup>®</sup> 2000.

A análise estatística dos dados foi realizada no programa estatístico SPSS<sup>®</sup> e SISVAR.

As variáveis quantitativas (peso, pH fecal, bifidobactérias, analitos séricos, colesterol fecal e hepático, PCNA, FCA e CA/FCA) foram apresentadas como média  $\pm$  erro padrão da média.

Para avaliação da distribuição dos dados, foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-smirnov. A análise de variância (ANOVA) com teste complementar de Tukey foi utilizada para comparar os grupos.

Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NOS ÓLEOS COMERCIAIS

Os rótulos dos óleos comerciais utilizados para produção da ração informavam a composição de lipídios, em gramas, por 100 ml de óleo, conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3 - Composição de lipídios, em g/100 ml de óleo.

Lipídios	Óleo de Canola	Óleo de Oliva	Óleo de Milho
Saturados	8,3	16,7	15
Monoinsaturado	65	66,7	36,7
Poli-insaturado	26,7	16,6	48,3

Fonte: Rótulos dos óleos de canola e milho (Bunge<sup>®</sup>) e oliva (D'aguire).

Além disso, para especificação dos AGPI, o óleo de canola possuía 6,7% de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3.

Considerando as poucas informações acerca dos óleos utilizados, os mesmos foram analisados por cromatografia gasosa para determinação da composição de ácidos graxos. A tabela 4 apresenta a percentagem de cada ácido graxo em relação ao total dos ácidos graxos identificados nos óleos. No cálculo deste perfil foram desconsiderados os ácidos graxos que representaram menos de 1% da composição.

Tabela 4 - Composição dos ácidos graxos (%) nos óleos de canola, oliva e milho.

Lipídios	Óleo de Canola	Óleo de Oliva	Óleo de Milho
Saturado (Palmítico (C16: 0) e Esteárico (C18:0))	8,0	18,1	14,0
Monoinsaturado (Oleico (C18: 1n9c))	64,4	67,1	36,7
Poli-insaturado (Linoleico C18: 2n6c)	27,6	14,8	49,2

Uma vez que estes óleos foram adicionados na concentração de 10% na dieta, as rações com óleo de canola, de oliva e milho continham 0,8%, 1,8% e 1,4% de gorduras saturadas, 6,4%, 6,7% e 3,7% de ácidos graxos monoinsaturados e 2,8%, 1,5% e 4,9% de ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -6, respectivamente.

## 5.2 EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE O GANHO DE PESO DOS RATOS TRATADOS OU NÃO COM DMH.

No primeiro e último dia do tratamento, os animais foram pesados para avaliação do ganho de peso durante o tratamento. O peso médio inicial e final, em gramas, de cada rato dos grupos está representado na tabela 5 como média  $\pm$  erro padrão da média. O ganho de peso dos animais foi obtido pela diferença entre o peso final e o peso inicial.

Tabela 5 – Peso médio, em gramas, dos ratos tratados com diferentes lipídios na dieta e presença ou não de DMH.

Grupo	Peso Inicial	Peso Final	Ganho de peso
CN	180 $\pm$ 6	314 $\pm$ 9	134 $\pm$ 7
CAN	169 $\pm$ 5	371 $\pm$ 14	212 $\pm$ 15*
OLI	149 $\pm$ 5	358 $\pm$ 9	210 $\pm$ 6*
MIL	155 $\pm$ 6	362 $\pm$ 7	215 $\pm$ 10*
COL	147 $\pm$ 7	291 $\pm$ 16	146 $\pm$ 8
CNDMH	166 $\pm$ 7	297 $\pm$ 16	149 $\pm$ 7
CANDMH	165 $\pm$ 7	345 $\pm$ 8	185 $\pm$ 8**
OLIDMH	143 $\pm$ 3	340 $\pm$ 8	203 $\pm$ 9**
MILDMH	161 $\pm$ 6	345 $\pm$ 9	191 $\pm$ 6**
COLDMH	152 $\pm$ 3	296 $\pm$ 7	144 $\pm$ 7

Resultados expressos como média  $\pm$  EP. \*quando comparado aos grupos CN e COL. \*\* quando comparado aos grupos CNDMH e COLDMH. CN (dieta padrão (DP)); CAN (DP + óleo de canola); OLI (DP + óleo de oliva); MIL (DP + óleo de milho); COL (DP + colesterol); CNDMH (DP + DMH); CANDMH (DP + óleo de canola + DMH); OLIDMH (DP + óleo de oliva + DMH); MILDMH (DP + óleo de milho + DMH) e COLDMH (DP + colesterol + DMH).

O ganho de peso dos grupos tratados somente com CN, CAN, OLI, MIL e COL foi de 134  $\pm$  7 g, 212  $\pm$  15 g, 210  $\pm$  6 g, 215  $\pm$  10 g e

146 ± 8 g, respectivamente. Os grupos tratados com óleo apresentaram um ganho de peso significativamente maior do que os grupos controle e colesterol. O grupo COL não apresentou diferença estatística em relação ao ganho de peso, quando comparado ao grupo controle.

Os mesmos achados foram observados nos grupos tratados com DMH.

O tratamento com DMH não alterou o ganho de peso dos animais quando comparado às respectivas dietas sem DMH.

### 5.3 EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE AS BIFIDOBACTÉRIAS NAS FEZES DOS RATOS TRATADOS OU NÃO COM DMH.

Após oito semanas de tratamento com as diferentes dietas, um grama de fezes de cada rato foi coletado para a quantificação das bifidobactérias.

As colônias de bifidobactérias observadas apresentaram coloração marfim, bordô e rosa clara, com consistência cremosa e superfície lisa (**Figura 6**). As morfologias microscópicas das respectivas colônias de bifidobactérias observadas foram de bacilos com extremidade bifurcada, bacilos curtos e bacilos cocoides (**Figura 7**).

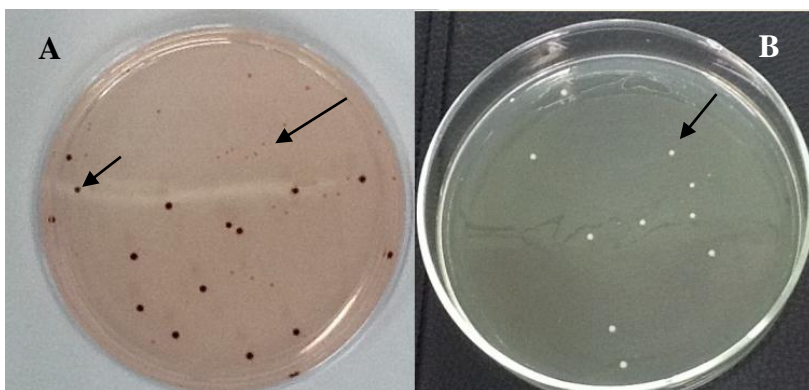


Figura 6. Características macroscópicas das colônias de bifidobactérias. A: colônias rosadas e colônias bordô. B colônias marfim.

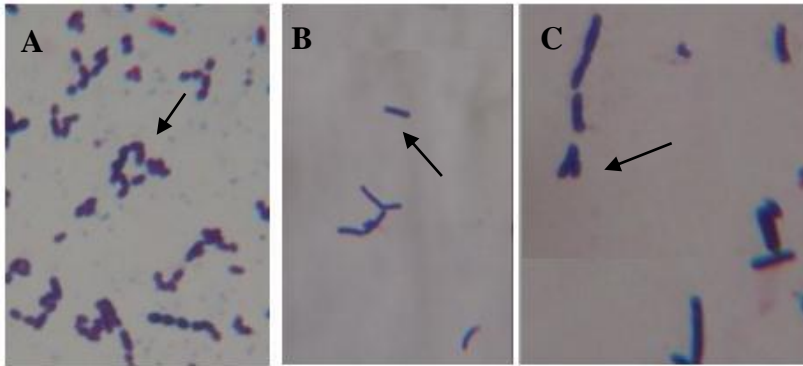


Figura 7. Características microscópicas das bifidobactérias. Coloração de Gram em aumento de 1000X. A: Bacilos cocoides Gram positivos, B: Bacilos Gram positivos. C: bacilos Gram Positivos com extremidade bifurcada.

A quantidade de bifidobactérias nas fezes dos diferentes grupos é apresentada como média  $\pm$  erro padrão média. O grupo controle (CN) apresentou  $4,35 \times 10^{10} \pm 3,39 \times 10^{10}$  UFC de bifidobactérias por grama de fezes. Os grupos tratados com óleo de canola, de oliva, de milho e com colesterol apresentaram quantidade de bifidobactérias de  $7,12 \times 10^{10} \pm 3,92 \times 10^{10}$ ,  $4,52 \times 10^{10} \pm 1,79 \times 10^{10}$ ,  $7,46 \times 10^{10} \pm 3,50 \times 10^{10}$  e  $9,39 \times 10^{10} \pm 3,64 \times 10^{10}$  UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Não foi observada influência da adição de diferentes lipídios na dieta sobre a quantificação de bifidobactérias. O mesmo foi observado entre os grupos tratados com DMH. A quantidade de bifidobactérias nos grupos CNDMH, CANDMH, OLIDMH, MILDMH e COLDMH foram, sequencialmente,  $8,37 \times 10^{10} \pm 3,10 \times 10^{10}$ ,  $2,15 \times 10^{10} \pm 1,06 \times 10^{10}$ ,  $7,66 \times 10^{10} \pm 2,36 \times 10^{10}$ ,  $4,96 \times 10^{10} \pm 2,83 \times 10^{10}$  e  $4,48 \times 10^{10} \pm 2,81 \times 10^{10}$  UFC por grama de fezes (**Figura 8**).

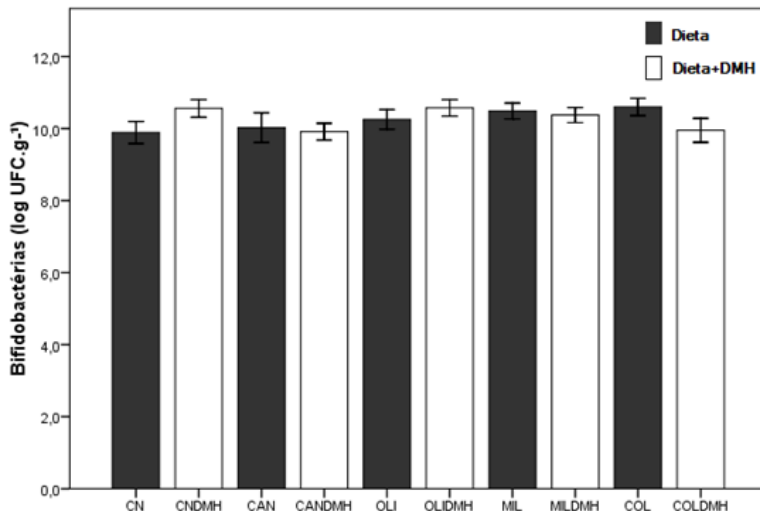


Figura 8. Unidades formadoras de colônias de bifidobactérias por grama de fezes, nos grupos tratados com diferentes tipos de lipídios na dieta e tratados ou não com DMH. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. CN (dieta padrão (DP)); CAN (DP + óleo de canola); OLI (DP + óleo de oliva); MIL (DP + óleo de milho); COL (DP + colesterol); CNDMH (DP + DMH); CANDMH (DP + óleo de canola + DMH); OLIDMH (DP + óleo de oliva + DMH); MILDMH (DP + óleo de milho + DMH) e COLDMH (DP + colesterol + DMH).

#### 5.4 EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE O PH FECAL DOS RATOS TRATADOS OU NÃO COM DMH

O pH das fezes é apresentado como média  $\pm$  erro padrão da média. Os resultados demonstram que o grupo CN apresentou pH fecal igual a  $7,0 \pm 0,3$ , enquanto nos grupos tratados com as demais dietas acrescidas de óleo de canola, oliva, milho e colesterol apresentaram  $6,5 \pm 0,2$ ,  $7,1 \pm 0,1$ ,  $6,7 \pm 0,5$  e  $6,5 \pm 0,1$ , respectivamente.

O pH fecal médio dos grupos tratados com DMH foi  $7,2 \pm 0,3$ ,  $7,0 \pm 0,2$ ,  $6,6 \pm 0,2$ ,  $6,4 \pm 0,1$  e  $7,1 \pm 0,3$  nos grupos CNDMH, CANDMH, OLIDMH, MILDMH e COLDMH, respectivamente. Apenas o grupo tratado com dieta com colesterol e DMH, quando comparado ao grupo tratado com a mesma dieta sem DMH, apresentou pH significativamente maior (**Figura 9**).

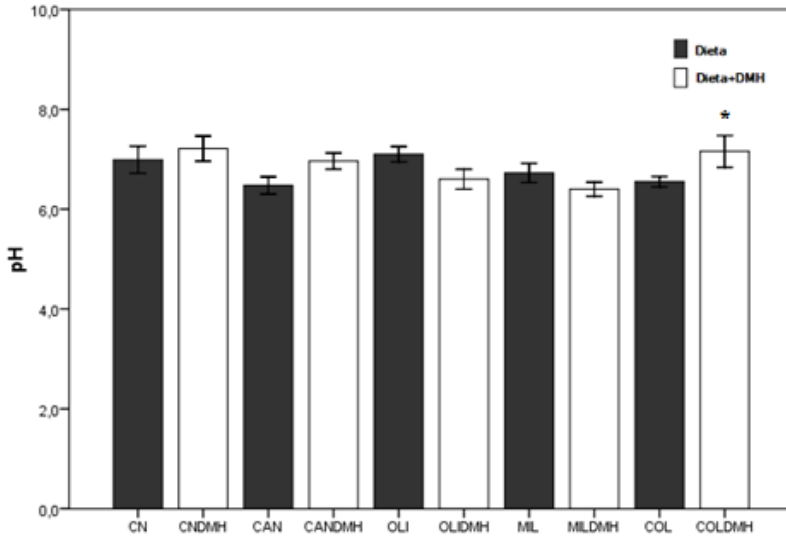


Figura 9. pH fecal nos grupos tratados com diferentes tipos de lipídios na dieta e tratados ou não com DMH. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão.

\*  $p < 0,05$  quando comparando ao grupo COL. CN (dieta padrão (DP)); CAN (DP + óleo de canola); OLI (DP + óleo de oliva); MIL (DP + óleo de milho); COL (DP + colesterol); CNDMH (DP + DMH); CANDMH (DP + óleo de canola + DMH); OLIDMH (DP + óleo de oliva + DMH); MILDMH (DP + óleo de milho + DMH) e COLDMH (DP + colesterol + DMH).

## 5.5 EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS DOS RATOS TRATADOS OU NÃO COM DMH.

### 5.5.1 Triglicerídeos

A concentração sérica de triglicerídeos, apresentada em média  $\pm$  erro padrão da média, nos grupos tratados apenas com as dietas foi de  $82 \pm 4$ ,  $74 \pm 3$ ,  $88 \pm 5$ ,  $80 \pm 4$ ,  $85 \pm 7$   $\text{mg} \cdot \text{dl}^{-1}$  nos grupos CN, CAN, OLI, MIL e COL, respectivamente, não sendo observada diferença estatística significativa entre eles.

Considerando os grupos tratados com DMH, os grupos CNDMH, CANDMH, OLIDMH, MILDMH e COLDMH apresentaram concentração sérica de triglicerídeos de  $59 \pm 4$ ,  $42 \pm 2$ ,  $62 \pm 3$ ,  $55 \pm 3$  e  $58 \pm 5$   $\text{mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ , respectivamente. O grupo CANDMH apresentou



concentração significativamente menor de triglicerídeos do que o grupo OLIDMH.

A concentração sérica de triglicerídeos dos grupos tratados com DMH foi significativamente menor quando comparado aos respectivos grupos tratados com as mesmas dietas e sem DMH (**Figura 10**).

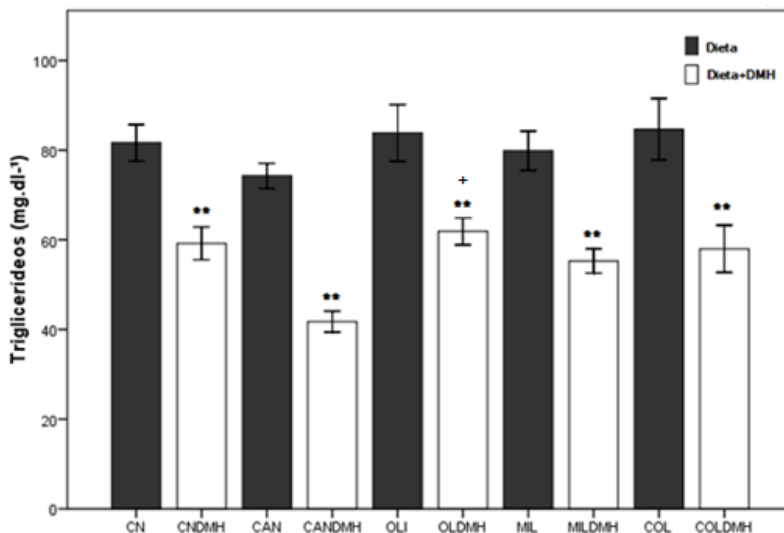


Figura 10. Concentração sérica de triglicerídeos, em  $\text{mg.dl}^{-1}$ , nos grupos tratados com diferentes tipos de lipídios na dieta e tratados ou não com DMH. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo com respectiva dieta e não tratados com DMH. +  $p < 0,01$ , comparando ao grupo CANDMH. CN (dieta padrão (DP)); CAN (DP + óleo de canola); OLI (DP + óleo de oliva); MIL (DP + óleo de milho); COL (DP + colesterol); CNDMH (DP + DMH); CANDMH (DP + óleo de canola + DMH); OLIDMH (DP + óleo de oliva + DMH); MILDMH (DP + óleo de milho + DMH) e COLDMH (DP + colesterol + DMH).

### 5.5.2 Colesterol total

A concentração sérica de colesterol total, representada como média  $\pm$  erro padrão da média, foi de  $128 \pm 8$ ,  $115 \pm 5$ ,  $120 \pm 9$ ,  $121 \pm 4$  e  $111 \pm 5$   $\text{mg.dl}^{-1}$  nos grupos tratados apenas com as dietas CN, CAN, OLI, MIL e COL, respectivamente. Nos grupos CNDMH, CANDMH, OLIDMH, MILDMH e COLDMH, a concentração sérica de colesterol foi de  $123 \pm 8$ ,  $111 \pm 7$ ,  $104 \pm 6$ ,  $115 \pm 4$  e  $105 \pm 7$ , respectivamente.

A concentração sérica de colesterol total não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados (**Figura 11**).

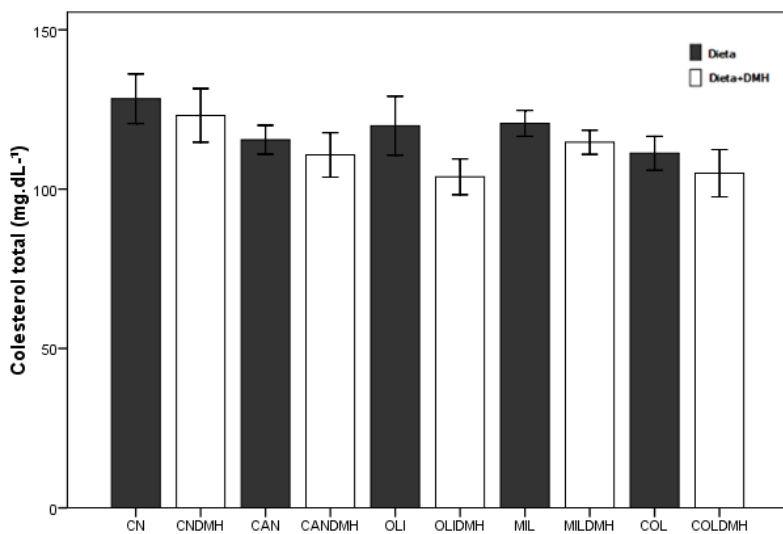


Figura 11. Concentração sérica de colesterol total, em  $\text{mg.dL}^{-1}$ , nos grupos tratados com diferentes tipos de lipídios na dieta e tratados ou não com DMH. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. CN (dieta padrão (DP)); CAN (DP + óleo de canola); OLI (DP + óleo de oliva); MIL (DP + óleo de milho); COL (DP + colesterol); CNDMH (DP + DMH); CANDMH (DP + óleo de canola + DMH); OLIDMH (DP + óleo de oliva + DMH); MILDMH (DP + óleo de milho + DMH) e COLDMH (DP + colesterol + DMH).

### 5.5.3 HDL-colesterol

A concentração sérica de HDL-colesterol, em média  $\pm$  erro padrão, foi de  $36 \pm 3$ ,  $40 \pm 2$ ,  $38 \pm 2$ ,  $41 \pm 2$  e  $36 \pm 2$   $\text{mg.dL}^{-1}$  nos grupos CN, CAN, OLI, MIL e COL, respectivamente. Os grupos tratados com DMH, CNDMH, CANDMH, OLIDMH, MILDMH e COLDMH apresentaram concentração de HDL-colesterol de  $37 \pm 2$ ,  $38 \pm 2$ ,  $35 \pm 2$ ,  $30 \pm 2$  e  $34 \pm 1$   $\text{mg.dL}^{-1}$ , respectivamente.

Apenas o grupo MILDMH, quando comparado ao grupo MIL, apresentou menor concentração de HDL (**Figura 12**).

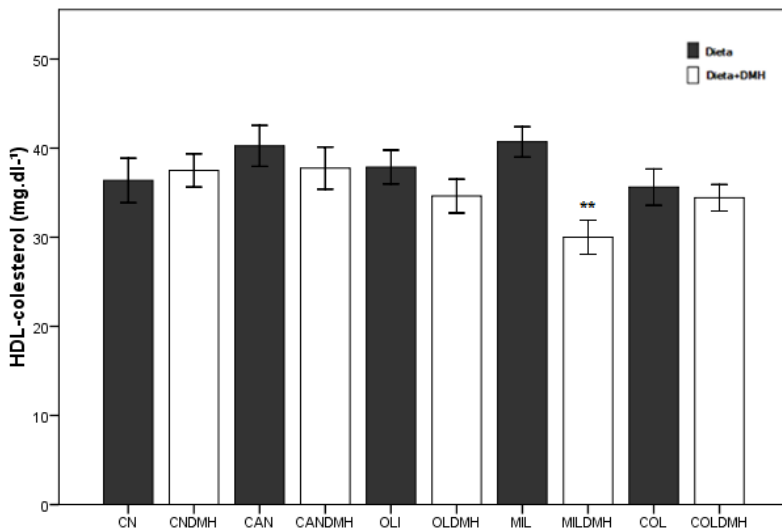


Figura 12. Concentração sérica de HDL-colesterol, em  $\text{mg.dl}^{-1}$ , nos grupos tratados com diferentes tipos de lipídios na dieta e tratados ou não com DMH. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão.  $**p < 0,01$ , comparado ao grupo MIL. CN (dieta padrão (DP)); CAN (DP + óleo de canola); OLI (DP + óleo de oliva); MIL (DP + óleo de milho); COL (DP + colesterol); CNDMH (DP + DMH); CANDMH (DP + óleo de canola + DMH); OLIDMH (DP + óleo de oliva + DMH); MILDMH (DP + óleo de milho + DMH) e COLDMH (DP + colesterol + DMH).

## 5.6 EFEITOS DOS DIFERENTES TIPOS DE LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE O COLESTEROL HEPÁTICO E FECAL.

### 5.6.1 Colesterol hepático

A concentração de colesterol hepático, expressa como média  $\pm$  erro padrão, foi de  $31 \pm 2$ ,  $31 \pm 3$ ,  $48 \pm 2$ ,  $62 \pm 3$  e  $35 \pm 3$   $\text{mg.dl}^{-1}$  nos grupos CN, CAN, OLI, MIL e COL, respectivamente. Os grupos tratados com DMH, CNDMH, CANDMH, OLIDMH, MILDMH e COLDMH apresentaram concentração de  $37 \pm 3$ ,  $43 \pm 2$ ,  $55 \pm 2$ ,  $58 \pm 3$  e  $33 \pm 2$   $\text{mg.dl}^{-1}$ , respectivamente.

O grupo MIL apresentou concentração de colesterol hepático significativamente maior que os demais grupos tratados sem DMH. Além disso, o grupo OLI teve concentração significativamente maior que os grupos CN, CAN e COL. Considerando os grupos tratados com DMH, os grupos OLIDMH e MILDMH apresentaram concentração de

colesterol hepático significativamente maior do que os grupos CNDMH, CANDMH e COLDMH.

A concentração do grupo CANDMH foi significativamente maior quando comparado ao respectivo grupo tratado com a mesma dieta e sem DMH (**Figura 13**).

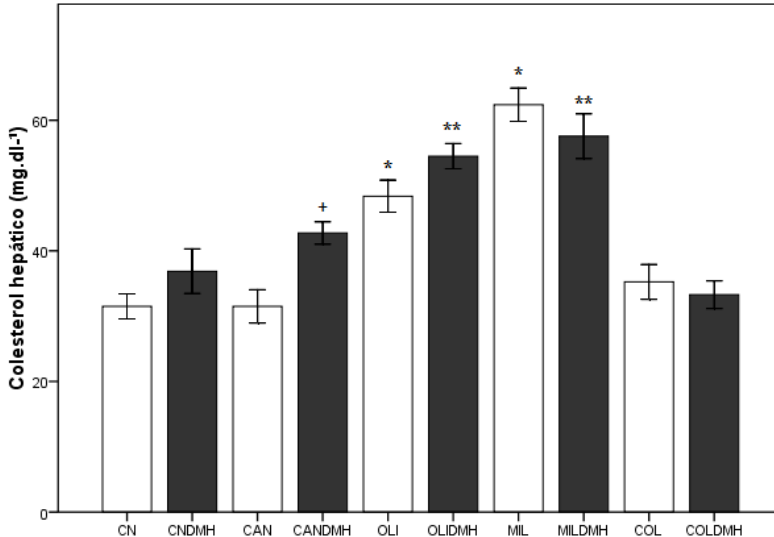


Figura 13. Concentração colesterol hepático, em mg.dl<sup>-1</sup>, nos grupos tratados com diferentes tipos de lipídios na dieta e tratados ou não com DMH. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,01$  comparando os grupos não tratados DMH. \*\*  $p < 0,01$  comparando aos grupos CNDMH, CANDMH e COLDMH. +  $p < 0,01$  comparando ao grupo CAN. CN (dieta padrão (DP)); CAN (DP + óleo de canola); OLI (DP + óleo de oliva); MIL (DP + óleo de milho); COL (DP + colesterol); CNDMH (DP + DMH); CANDMH (DP + óleo de canola + DMH); OLIDMH (DP + óleo de oliva + DMH); MILDMH (DP + óleo de milho + DMH) e COLDMH (DP + colesterol + DMH).

### 5.6.2 Colesterol fecal

A concentração de colesterol fecal, expressa como média  $\pm$  erro padrão, nos grupos CN, CAN, OLI, MIL e COL foi de  $34 \pm 5$ ,  $35 \pm 3$ ,  $26 \pm 3$ ,  $27 \pm 3$  e  $66 \pm 3$  mg.dl<sup>-1</sup>, respectivamente. Os grupos tratados CNDMH, CANDMH, OLIDMH, MILDMH e COLDMH apresentaram

concentração de  $24 \pm 3$ ,  $28 \pm 3$ ,  $38 \pm 5$ ,  $27 \pm 2$  e  $69 \pm 5$  mg.dl<sup>-1</sup>, respectivamente.

Todos os grupos sem DMH apresentaram concentração de colesterol fecal significativamente menor que o grupo COL. Este achado também foi observado nos grupos tratados com DMH.

A concentração de colesterol fecal dos grupos tratados com DMH não apresentou diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo tratado com a mesma dieta e sem DMH (**Figura 14**).

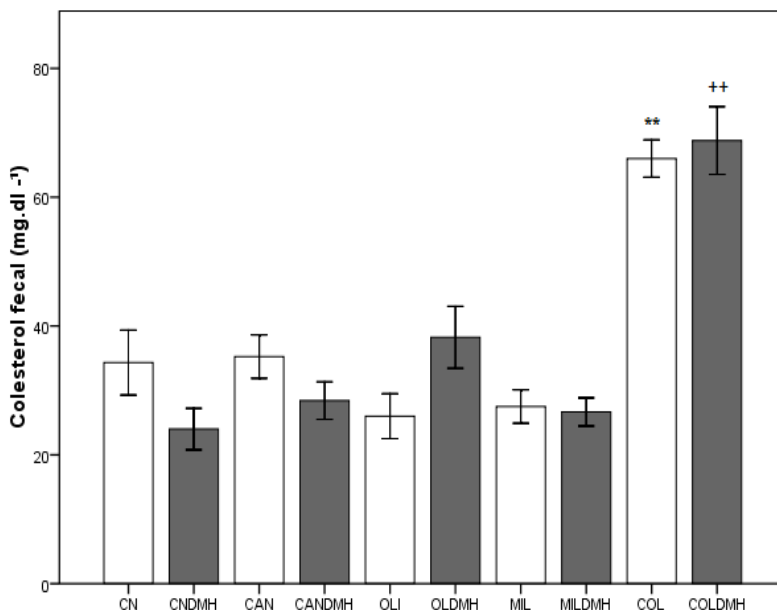


Figura 14. Concentração colesterol fecal, em mg.dl<sup>-1</sup>, nos grupos tratados com diferentes tipos de lipídios na dieta e tratados ou não com DMH. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*\*  $p < 0,01$  comparado aos demais grupos não tratados com DMH. ++  $p < 0,01$  comparado aos demais grupos tratados com DMH. CN (dieta padrão (DP)); CAN (DP + óleo de canola); OLI (DP + óleo de oliva); MIL (DP + óleo de milho); COL (DP + colesterol); CNDMH (DP + DMH); CANDMH (DP + óleo de canola + DMH); OLDMH (DP + óleo de oliva + DMH); MILDMH (DP + óleo de milho + DMH) e COLDMH (DP + colesterol + DMH).

## 5.7 EFEITOS DOS DIFERENTES TIPOS DE LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE O NÚMERO DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES POR CAMPO E MULTIPLICIDADE DE CRIPTAS POR FOCO.

### 5.7.1 FCA/Campo

As análises dos cortes histológicos demonstraram que os grupos não tratados com DMH não tiveram alteração no tecido colônico e não desenvolveram espontaneamente FCAs. A figura 15 ilustra um FCA com três criptas aberrantes (indicadas pelas setas pretas) representativa dos FCAs encontrados no cólon dos ratos tratados com DMH. Morfologicamente, os FCAs foram similares em todos os grupos tratados com DMH.

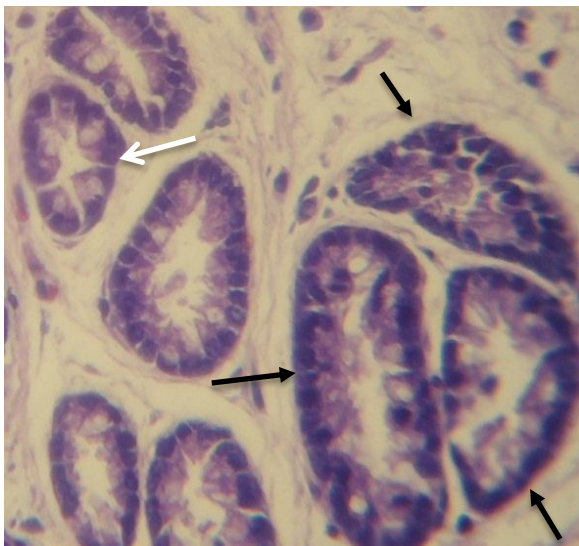


Figura 15. Fotomicroscopia do segmento do cólon distal de rato Wistar. Coloração com Hematoxilina e Eosina em aumento de 400X. As setas pretas indicam as criptas aberrantes. A seta branca indica cripta normal. A foto é representativa dos diferentes grupos.

Os grupos CANDMH ( $0,60 \pm 0,07$ ) e OLIDMH ( $0,74 \pm 0,03$ ) apresentaram quantidade significativamente menor de FCA/campo microscópico em comparação ao grupo CNDMH ( $0,97 \pm 0,06$ ). Os

grupos MILDMH ( $0,78 \pm 0,02$ ) e COLDMH ( $1,03 \pm 0,05$ ) não apresentaram diferença significativa quando comparados com o grupo CNDMH. Também foi observado que os grupos CANDMH, OLIDMH e MILDMH apresentaram quantidade significativamente menor de FCA/campo quando comparados ao grupo COLDMH ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente) (**Figura 16**).

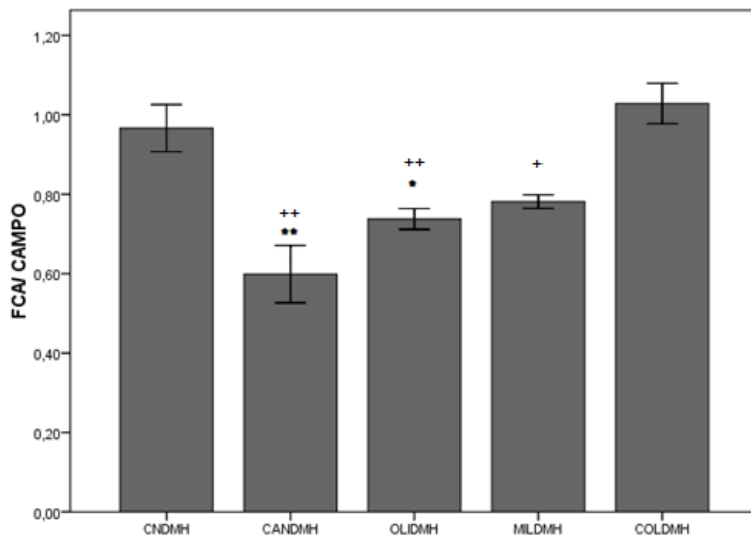


Figura 16. Focos de criptas aberrantes por campo, em média  $\pm$  EP, nos grupos tratados com diferentes tipos de lipídios na dieta e com DMH. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  quando comparando ao grupo CNDMH. +  $p < 0,05$  e ++  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo COLDMH. CNDMH (dieta padrão (DP) + DMH); CANDMH (DP + óleo de canola + DMH); OLIDMH (DP + óleo de oliva + DMH); MILDMH (DP + óleo de milho + DMH) e COLDMH (DP + colesterol + DMH).

### 5.7.2 Multiplicidade de criptas por foco

O número de criptas aberrantes por foco nos grupos tratados com diferentes lipídios na dieta e DMH, apresentados como média  $\pm$  erro padrão, foi de  $1,77 \pm 0,18$ ,  $1,57 \pm 0,11$ ,  $1,51 \pm 0,07$ ,  $1,49 \pm 0,07$  e  $1,92 \pm 0,05$  nos grupos CNDMH, CANDMH, OLIDMH, MILDMH e COLDMH, respectivamente. A análise estatística não demonstrou

diferença significativa entre os grupos tratados com as diferentes dietas e DMH (**Figura 17**).

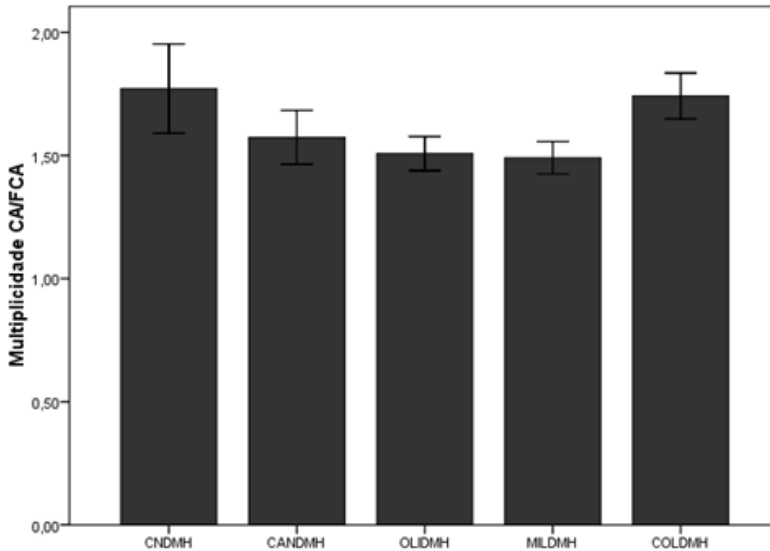


Figura 17. Multiplicidade de criptas aberrantes por foco nos grupos tratados com diferentes tipos de lipídios na dieta e com DMH. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. CNDMH (dieta padrão (DP) + DMH); CANDMH (DP + óleo de canola + DMH); OLDMH (DP + óleo de oliva + DMH); MILDMH (DP + óleo de milho + DMH) e COLDMH (DP + colesterol + DMH).

### 5.8 EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE LIPÍDIOS DIETÉTICOS SOBRE O ÍNDICE DE MARCAÇÃO PELO PCNA DAS CRIPTAS DOS RATOS TRATADOS COM DIETA E DMH.

A atividade proliferativa do epitélio colônico foi avaliada por um marcador de proliferação celular utilizando o índice de marcação pelo PCNA, o qual foi determinado pelo percentual de células em proliferação (fortemente coradas) em relação ao número total de células ao longo de cada cripta. As setas na figura 18 indicam núcleos marcados com imunohistoquímica pelo PCNA. A figura é representativa, uma vez que não houve diferença visual entre os grupos, apenas a contagem de núcleos positivos é que apresentou diferença.



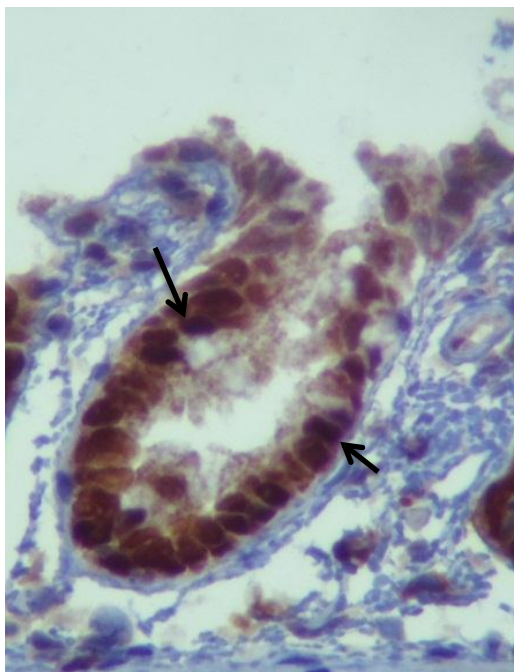


Figura 18. Fotomicroscopia de segmento do cólon distal de rato Wistar marcado imunohistoquimicamente pelo PCNA e contra corados com Hematoxilina e Eosina, em aumento de 400X. As setas indicam núcleos marcados. A foto é representativa dos diferentes grupos.

A porcentagem do índice de marcação pelo PCNA nos grupos CNDMH, CANDMH, OLIDMH, MILDMH e COLDMH foi, respectivamente,  $16,2\% \pm 1,7\%$ ,  $11,7 \pm 0,7\%$ ,  $9,3\% \pm 0,5$ ,  $20,1\% \pm 0,7\%$  e  $20,5\% \pm 0,4\%$ .

Quando comparados ao grupo CNDMH, os grupos CANDMH e OLIDMH apresentaram imunomarcação pelo PCNA significativamente menor, o grupo COLDMH apresentou imunomarcação pelo PCNA significativa maior e o grupo MILDMH teve uma tendência a apresentar maior imunomarcação ( $p=0,053$ ). Além disso, os grupos CANDMH e OLIDMH também apresentaram imunomarcação significativamente menor de PCNA comparados aos grupos COLDMH e MILDMH ( $p<0,01$ ) (**Figura 19**).

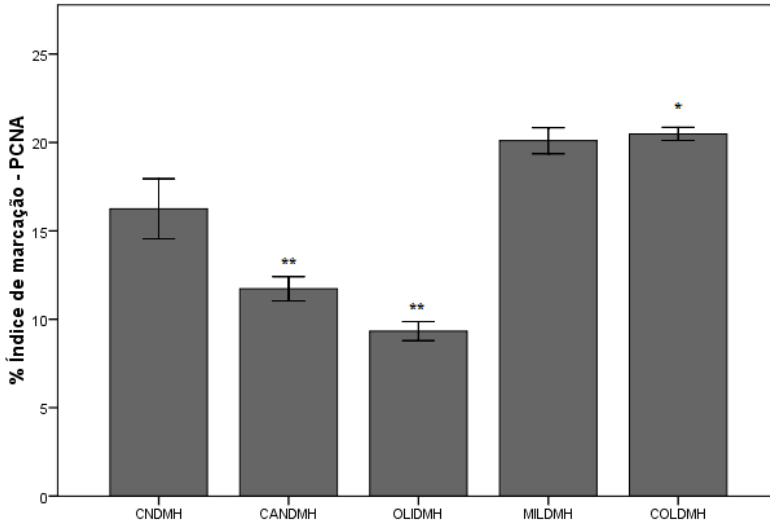


Figura 19. Índice de marcação pelo PCNA, em percentagem, nas criptas dos animais dos grupos tratados com diferentes tipos de lipídios na dieta e com DMH. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo CNDMH, \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo CNDMH, MILDMH e COLDMH. CNDMH (dieta padrão (DP) + DMH); CANDMH (DP + óleo de canola + DMH); OLIDMH (DP + óleo de oliva + DMH); MILDMH (DP + óleo de milho + DMH) e COLDMH (DP + colesterol + DMH).

## 6 DISCUSSÃO

As expressivas diferenças nas taxas de incidência e de mortalidade entre países, e o aumento da incidência em populações que migram de áreas de baixo risco para áreas de alto risco sugerem que os fatores ambientais desempenham um significativo papel na etiologia do CCR. A dieta tem sido considerada, há bastante tempo, como o fator de risco ambiental mais importante para o câncer colorretal (LIPKIN *et al.*, 1999).

A ingestão de alguns tipos de lipídios está entre os fatores de risco dietéticos para o CCR. O estilo de vida atual tem levado ao aumento da ingestão de gordura e substituição de alguns ácidos graxos alimentares, como o maior consumo de  $\omega$ -6 em relação ao  $\omega$ -3 e  $\omega$ -9 (BARTSCH *et al.*, 1999; LLOR *et al.*, 2003), o qual tem sido associado a indução da tumorigênese intestinal (WHELAN, McENTEE, 2004). Estudos experimentais em animais têm demonstrado o efeito protetor dos AGPI  $\omega$ -3 e do AGMI  $\omega$ -9 (REDDY, 2004; THEODORATOU *et al.*, 2007; ; FUNAHASHI *et al.*, 2008; KENAR *et al.*, 2008; MEGAN *et al.*, 2008; HENRIQUES *et al.*, 2009; SÁNCHEZ-FIDALGO *et al.*, 2010; SOLANAS *et al.*, 2010) sobre o desenvolvimento do CCR induzido quimicamente.

Neste sentido, torna-se importante conhecer os tipos de lipídios ingeridos na dieta ao invés de considerar apenas a quantidade de lipídios totais, visto que a promoção de tumores no cólon depende tanto do total quanto da composição da gordura (REDDY *et al.*, 1996; NKONDJCOCK *et al.*, 2003).

Neste contexto foi realizada a análise da composição dos ácidos graxos dos óleos comerciais utilizados na produção da ração dos animais. A quantidade de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados encontrados na análise cromatográfica foi muito semelhante àquela informada no rótulo dos produtos comerciais adicionados a ração, confirmando as informações divulgadas pelo fabricante. Era informado pelo fabricante que seu óleo de canola possuía 6,7% de AGPI  $\omega$ -3, porém este analito não foi detectado na análise cromatográfica.

A legislação brasileira não especifica as metodologias analíticas para determinação dos lipídios totais, saturados e *trans* que fazem parte da informação nutricional constantes nos rótulos dos alimentos. Quanto aos ácidos graxos monoinsaturados ou poli-insaturados e o teor de colesterol, a declaração na rotulagem dos alimentos tem caráter opcional. Entretanto, quando na embalagem, estes compostos são

apresentados como diferenciais do produto, relativos à presença ou não destes nutrientes, a especificação no rótulo é obrigatória. O teor de AGMI e AGPI deve ser pelo menos igual a 80% do valor declarado no rótulo. Com isso, de acordo com metodologia analítica utilizada, a determinação dos lipídios totais e, conseqüentemente, dos ácidos graxos podem estar sujeitas a variações (AUED-PIMENTEL, ZENEBON, 2009).

A adição de 10% de óleo a ração foi utilizada com base em estudos realizados por outros autores (FUJISE *et al.*, 2007; ION *et al.*, 2010). Além disso, segundo o Guia Dietético para Americanos de 2010, o limite aceitável de ingestão total de gordura para adultos de 20-35% está associado com um risco reduzido de doenças crônicas. Em relação aos  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3, as concentrações aceitáveis estabelecidas pela Acceptable Macronutrient Distribution Range (AMDR) são de 5-10% e 0,6-1,2%, respectivamente. Por sua vez, é recomendado que o consumo de colesterol, encontrado apenas em alimentos de fonte animal, seja menor que 300 miligramas por dia para manter a concentração normal no sangue, e menos de 200 miligramas por dia para pessoas com alto risco de doença cardiovascular (INSTITUTE OF MEDICINE, 2002). Assim, a ingestão de gordura total e colesterol pelos animais estavam dentro dos limites aceitáveis e recomendados para humanos.

A mesma quantidade de ração foi oferecida para todos os grupos estudados. A ingestão média diária de ração, por animal, dos grupos foi de 22,5 gramas, o que corresponde a ingestão de 0,18%, 1,8% e 1,4% de gordura saturada, 1,4%, 1,5% e 0,9% de ácidos graxos monoinsaturados, 0,6%, 0,3% e 1,1% de ácidos poli-insaturados nos grupos tratados com óleo de canola, de oliva e de milho, respectivamente, e 225 mg de colesterol no grupo tratado com o mesmo.

Apesar da mesma quantidade de ração ter sido consumida, os grupos tratados com óleo de canola, de oliva e de milho apresentaram maior ganho de peso que os grupos controle e colesterol, tanto nos grupos tratados como naqueles não tratados com dimetilhidrazina.

O peso corporal total é determinado pela soma dos ossos, músculos, órgãos, fluidos corpóreos e tecidos adiposos. A principal alteração no peso corpóreo é ocasionada pela variação do tamanho do depósito de gordura, normalmente gerada pela ingestão alimentar. Os animais, assim como os seres humanos, possuem o paladar acentuado por gorduras, pois a mesma pode aumentar a palatabilidade e a sensação de saciedade após a ingestão (MAHAN, ESCOTT-STUMP, 2002).

Maior ganho de peso é possível mesmo quando a quantidade de alimento ingerido é semelhante, devido à composição de nutrientes, que

pode alterar a eficiência de utilização do alimento. A maior densidade calórica dos grupos tratados com os óleos de canola, de oliva ou milho pode ter promovido o maior ganho de peso dos animais (PEREIRA *et al.*, 2003; ZENI, 2008). Por outro lado, a DMH não influenciou no ganho de peso dos animais, uma vez que não foi observada diferença significativa quando comparado ao grupo tratado com a mesma dieta sem DMH. Diferença no ganho de peso também não foi observada nos grupos tratados com colesterol, provavelmente por apresentar menor quantidade calórica que as dietas adicionadas de óleos.

Neste contexto, Zeni em 2008, ao adicionar 12,5% dos óleos de canola, de oliva e de soja durante 50 dias para avaliar seus efeitos sobre o peso corporal total de ratas Wistar observou menor consumo de ração nos grupos tratados com os óleos em relação ao grupo controle, que foi justificado possivelmente devido ao aumento da saciedade das rações preparadas com os óleos vegetais. No entanto, o óleo adicionado era aquecido a 90°C, o que pode ter oxidado os lipídios e os tornados menos palatáveis. Apesar disso, não observou diferença entre o ganho de peso dos animais tratados com óleo quando comparado ao grupo controle, o que foi explicado pela relação entre a quantidade de ração consumida e o percentual calórico de cada dieta (ZENI, 2008).

Maior ganho de peso corpóreo também foi observado por Jen e colaboradores (2003) ao avaliar o efeito de dietas enriquecidas com 40% de diferentes lipídios (óleo de peixe, de palma e soja) sobre ratos e ratas Wistar, durante seis semanas, submetidos ou não a exercícios de nado. Eles observaram menor ganho de peso nos ratos tratados com óleo de peixe e associaram isto ao aumento da lipólise e redução da captura de glicose pelas células adiposas. Outro mecanismo possivelmente responsável pelos efeitos diferentes dos ácidos graxos no ganho de peso pode ser devido à taxa de oxidação. Ácidos graxos saturados apresentam menor taxa de oxidação em relação aos AGPI, levando mais tempo para entrarem na beta-oxidação, favorecendo a sua deposição no tecido adiposo.

Nosso estudo também avaliou os efeitos dos diferentes lipídios dietéticos sobre o metabolismo lipídico. A concentração sérica de triglicerídeos foi semelhante entre os grupos não tratados com DMH. Entretanto, a concentração sérica de triglicerídeos foi menor nos grupos tratados com DMH quando comparado ao grupo que recebeu a mesma dieta e não tratados com DMH (figura 10). Esse achado também foi encontrado por Nauss e colaboradores (1983) ao avaliar os efeitos da quantidade de lipídios dietéticos, durante quatro semanas, na tumorigênese colônica induzida pela DMH em ratos. Estes

pesquisadores observaram que a concentração sérica de triglicerídeos dos animais tratados com dietas ricas em lipídios diminuiu nas primeiras semanas após o tratamento com DMH, mas aumentou nas fases avançadas da tumorigênese (10 meses depois do tratamento). Porém o mecanismo pelo qual a DMH reduz a concentração de triglicerídeos não é conhecido. Barton e colaboradores (1987) também observaram que a concentração sérica de triglicerídeos aumentou nas fases tardias da tumorigênese colônica induzida por DMH.

Segundo Baba e colaboradores (1999), a presença de  $\omega$ -3 no óleo de canola pode contribuir para a redução da concentração sérica de triglicerídeos e de colesterol total, porém este ômega não foi detectado na análise cromatográfica do perfil de ácidos graxos.

A quantidade de óleo e até mesmo de colesterol adicionada à dieta não foi suficiente para modificar, significativamente, a concentração sérica de colesterol total e HDL-colesterol no período de tempo avaliado (figuras 11 e 12). Da mesma forma, a associação da DMH também não modificou a concentração séria de colesterol nos diferentes grupos.

Dauqan e colaboradores (2011) observaram que ratos tratados com 15% de óleo de milho e de coco, durante quatro e oito semanas, não apresentaram diferença na concentração sérica de colesterol total quando comparados à dieta normal. Machado e colaboradores (2003) também verificaram a dificuldade em desenvolver hipercolesterolemia em ratos tratados com 1% de colesterol sintético por um mês. Para desenvolver hipercolesterolemia em ratos é comum a associação de colesterol e ácido cólico na dieta, pois este último aumenta a absorção intestinal do colesterol. A adição de 0,1% de ácido cólico elevou em 50% a concentração de colesterol sérico em ratos sem, contudo, promover significativo acúmulo de colesterol no fígado (MACHADO *et al.*, 2003).

Um importante aspecto para analisar a influência dos lipídios dietéticos sobre o metabolismo lipídico é a relação de ácidos graxos poli-insaturados/saturados. Como os ácidos graxos monoinsaturados também possuem efeito sobre as concentrações de lipídios séricos, a razão de [(AGMI+AGPI)/saturados] tem sido considerada um melhor indicador do efeito dos lipídios dietéticos sobre o perfil lipídico sérico, sendo que razões elevadas estão relacionadas com benefícios à saúde (AGUILLA *et al.*, 2002).

De acordo esta hipótese, o óleo de canola possui uma razão [(AGMI+AGPI)/saturados] de 11,5/1, o óleo de oliva 4,5/1 e o óleo de milho, 6,1/1. No entanto, as maiores concentrações de colesterol

hepático foram observadas nos grupos tratados com óleo de milho e de oliva. Apesar do óleo de oliva apresentar uma razão menor em relação ao óleo de milho, as suas concentrações de  $\omega$ -9 e  $\omega$ -6 são duas vezes maior e três vezes menor, respectivamente, que as concentrações no óleo de milho.

Almeida (2011) observou que a razão [(AGMI+AGPI)/saturados] não justificou a deposição de lipídios no fígado durante 28 dias de tratamento. Mesmo com razões distintas, os animais alimentados com manteiga e margarina apresentaram a mesma quantidade de lipídios no fígado, e o grupo alimentado com óleo de soja (maior relação [(AGMI+AGPI)/saturados] do estudo) apresentou quantidade de lipídios no fígado superiores aos alimentados com manteiga e margarina. Com isso, foi sugerido que a quantidade de lipídios no fígado não pode ser simplesmente explicada pela relação [(AGMI+AGPI)/saturados] uma vez que os grupos com diferentes razões apresentaram quantidade de lipídios hepáticos estatisticamente iguais.

O colesterol é sintetizado ou excretado, como colesterol livre na bile ou pela conversão em sais biliares, pelo fígado (CHOI *et al.*, 2001). A maior concentração de colesterol fecal foi observada nos grupos tratados com dieta acrescida de colesterol quando comparado aos demais grupos. O não desenvolvimento da hipercolesterolemia nos grupos tratados com colesterol na dieta pode ter ocorrido devido a maior conversão em ácidos biliares no fígado e excreção nas fezes (MACHADO *et al.*, 2003).

Considerando as dietas ricas em lipídios e a maior concentração de colesterol observada nas fezes dos grupos tratados com colesterol, torna-se importante avaliar seus efeitos sobre a microbiota intestinal e sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no cólon e reto. Neste sentido, quantificar as bifidobactérias é uma das formas de avaliar a microbiota intestinal, devido aos efeitos benéficos que estas bactérias exercem sobre o intestino e a saúde (BIOVATI, B.; MATTARELLI, 2006).

Estudos que investigaram os efeitos da ingestão de lipídios sobre a microbiota intestinal demonstraram que o alto teor de alguns tipos de lipídios diminui a proteção oferecida pela microbiota. Por exemplo, Cani e colaboradores (2007) observaram menor indução da resposta inflamatória associado com a diminuição de *Bifidobacterium spp.* em ratos tratados com dieta enriquecida com 49,5% de óleo de milho. Contudo, consideramos que a dieta utilizada neste estudo foi baseada praticamente em lipídios e que não é comum na população em geral. Por isso, utilizamos uma concentração de lipídios na dieta mais próxima da

realidade. Os mesmos pesquisadores, ao adicionar 10% de prebiótico àquela dieta, observaram a restauração da quantidade de bifidobactérias e normalização da resposta inflamatória.

Da mesma forma, Hekmatdoost e colaboradores (2008), em estudo realizado em fêmea de camundongos BALB/C para analisar o efeito de dietas com 20% de óleo de peixe, de canola ou açafrão sobre a microbiota cecal, indicadores inflamatórios e parâmetros bioquímicos em colite experimental, durante quatro semanas de intervenção dietética, observaram que os grupos tratados com óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -3 (óleo de peixe e óleo de canola) apresentaram maior quantidade de bifidobactérias quando comparado ao grupo tratado com dieta padrão. Além disso, nos grupos tratados com óleo de canola e de peixe houve redução da inflamação, porém, os pesquisadores sugeriram que esta relação ocorreu devido à propriedade anti-inflamatória do  $\omega$ -3 e não ao seu efeito direto sobre a microbiota intestinal.

No entanto, nossos resultados demonstraram que dietas acrescidas de diferentes lipídios não modificaram a concentração de bifidobactérias nas fezes dos ratos (Figura 8). Nesta acepção, os relatos demonstram que o efeito da dieta na microbiota intestinal é eficaz quando são utilizados substratos específicos a certas bactérias, como fruto-oligossacarídeos. Estes substratos promovem o crescimento específico das bifidobactérias com diminuição das bactérias patogênicas (BOURLIOUX *et al.*, 2003).

Além disso, estudos também sustentam a hipótese de que a suplementação com bifidobactérias exercem efeitos benéficos sobre a tumorigênese colônica por estarem associados à redução de focos de criptas aberrantes (ONOUÉ *et al.*, 1997; ROWLAND *et al.*, 1998; HIRAYAMA, RAFTER, 1999; LIEBERMAN *et al.*, 2003). Por exemplo, Challa e colaboradores (1997) ao avaliar a suplementação com 0,5% *Bifidobacterium longum* e/ou 2,5% de lactulose, durante 13 dias, em ratos Fisher com carcinogênese induzida por azoximetano, observaram que a suplementação com a bifidobactéria isolada ou em associação com a lactulose reduziu o número de FCA, possivelmente pela redução do pH cecal.

Contudo, nossos resultados demonstraram que além dos diferentes lipídios, a DMH também não influenciou na quantidade de bifidobactérias nas fezes, o que supostamente reflete o conteúdo intestinal. Considerando os nossos resultados e os estudos descritos na literatura, podemos aludir que a suplementação com pré e probióticos pode diminuir o processo inflamatório e o desenvolvimento tumoral



intestinal, porém as lesões pré-neoplásicas não estão relacionadas à diminuição da quantidade de bifidobactérias e provavelmente não causam um desequilíbrio na microbiota intestinal.

Os mecanismos sugeridos pelos quais as bifidobactérias podem inibir o câncer colorretal ainda não estão bem elucidados, mas acredita-se que possam estar relacionados ao aumento da resposta imune do hospedeiro, a degradação de agentes cancerígenos, a alteração da microbiota intestinal que produz agentes com potencial carcinogênico, a produção de metabólitos antitumorais e a alteração da atividade metabólica da microbiota intestinal (LIONG, 2008).

Outro mecanismo pelo qual as bifidobactérias podem beneficiar a saúde humana é por reduzirem o pH através da produção de ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético e ácido láctico), inibindo assim o crescimento de bactérias patogênicas (BIOVATI, MATTARELLI, 2006). Este é um dos mecanismos próprios do sistema digestório para controle populacional e seletividade da colonização bacteriana (CEBRA, 1999). Alguns pesquisadores têm sugerido que um elevado pH intestinal pode estar relacionado ao aumento do risco de câncer de cólon. O pH baixo aumenta a velocidade do trânsito fecal e, assim, diminui o tempo de contato entre carcinógenos do conteúdo fecal e a mucosa colônica como também o tempo viável para a microbiota intestinal agir no conteúdo fecal e gerar possíveis carcinógenos adicionais (SAMELSON, NELSON, NYHUS, 1985).

Entretanto, em nosso estudo tanto a dieta quanto a DMH não influenciaram na concentração de bifidobactérias e conseqüentemente no pH fecal. Exceto o grupo tratado com DMH e dieta acrescida de colesterol que apresentou pH significativamente maior que o grupo COL (figura 9).

Por outro lado, Bouhnik e colaboradores (2004) consideraram que o pH fecal pode não ser um bom indicador da acidificação intestinal, uma vez que não observou alteração no pH fecal de 200 voluntários saudáveis que ingeriram carboidratos não digeríveis, mesmo com o aumento no número de bifidobactérias fecais. Búrigo e colaboradores (2007) também não observaram alteração no pH fecal, mesmo com o aumento de bifidobactérias, após a suplementação com fruto-oligossacarídeos em pacientes com neoplasias hematológicas submetidos a quimioterapia.

Para que o metabolismo e o conteúdo intestinal possam refletir nas fezes, devem ser levadas em consideração as variáveis como a mobilidade intestinal, a ingestão total de fibras, as secreções intestinais, como a produção de ácidos graxos de cadeia curta, e a duração da

intervenção dietética. Neste sentido, o pH fecal pode não refletir com exatidão o pH do cólon (GARRO, AGUIRRE, GIORI, 2005).

No entanto, Samelson e colaboradores (1985) observaram que as fezes de ratos tratados com lactose e/ou sulfato de sódio e DMH eram mais ácidas e tinham tumores de cólon em número significativamente menor do que os ratos tratados apenas com DMH.

Neste contexto, o presente estudo avaliou o efeito de diferentes lipídios na dieta e do pH sobre a incidência de focos de criptas aberrantes, induzidos por DMH, no cólon e reto de ratos. A quantificação dos FCA em modelos experimentais é considerada excelente parâmetro para avaliar o potencial de proteção ou de risco para o câncer de cólon e reto (BIRD, 1987; BIRD, 1995).

Nossos resultados demonstraram que os grupos não tratados com o carcinógeno químico não apresentaram criptas aberrantes, o que indica que os lipídios nas concentrações adicionadas a dieta, isoladamente, não exerceram ação iniciadora da carcinogênese do cólon. Corroborando com estes resultados, não foram encontrados estudos que indiquem a relação direta de lipídios sobre a carcinogênese no cólon e reto.

Os grupos tratados com óleo de canola e de oliva apresentaram menor quantidade de FCA, mas sem diferença no número de criptas por foco, entre os ratos tratados com DMH. Um maior número de criptas por foco, quatro ou mais criptas, indica maior chance de transformação em tumores (SHIVAPURKAR *et al.*, 1994).

Neste sentido, Bhatia e colaboradores (2011) observaram que o óleo de canola reduziu o número de FCA e a multiplicidade, induzidas por azoximetano, quando comparado ao óleo de milho em ratos, possivelmente pelo aumento de ácidos graxos  $\omega$ -3 e menor expressão da COX-2.

Apesar do  $\omega$ -3 não ter sido detectado na análise cromatográfica do óleo de canola, a maior relação entre [AGMI+AGPI/saturados] pode estar relacionado aos efeitos benéficos sobre o CCR. Além disso, o óleo de canola e de oliva apresentam maior quantidade de  $\omega$ -9 do que o óleo de milho, e este tem sido associado à redução da tumorigênese do cólon (SÁNCHEZ-FIDALGO *et al.*, 2010).

O óleo de oliva tem atraída atenção devido à presença na dieta do Mediterrâneo e associado ao efeito protetor sobre doenças cardiovasculares e câncer. Este óleo, além de ser rico em ácidos graxos monoinsaturados, contém compostos minoritários (esqualeno, tocoferóis e compostos fenólicos) que podem ter efeitos quimiopreventivos sobre o câncer (ESCRICH *et al.*, 2007).

Da mesma forma, Fujise e colabores (2007) investigaram a modulação dos óleos dietéticos sobre a regulação da fosforilação da beta-catenina, na carcinogênese colônica induzida pelo azoximetano em ratos durante 44 semanas, e observaram que o grupo tratado com óleo de oliva ( $\omega$ -9) apresentou diminuição no número de FCA.

Os lipídios podem induzir mudanças na composição da membrana celular lipídica e na proliferação celular colônica, o que pode estar relacionado com o desenvolvimento de tumores (THORNTON; MACDONALD, 1997). A maior proliferação celular é condição importante na oncogênese humana e experimental (CHENG; LAI, 2003).

Os resultados do presente estudo demonstraram que, entre os grupos tratados com DMH, aqueles que consumiram a dieta com óleo de canola e oliva apresentaram menor proliferação celular avaliada pelo método do PCNA. Corroborando estes resultados, Cho e colaboradores (2010) observaram que o óleo de canola inibiu a proliferação de células cancerígenas *in vitro* e *in vivo*.

Por outro lado, o grupo COLDMH apresentou maior índice de marcação pelo PCNA que o grupo CNDMH, corroborando com estudos que relatam risco aumentado de CCR em dietas com alto consumo de colesterol (KENDALL *et al.*, 1992a, 1992b; DE STEFANI *et al.*, 1997; JARVINEN *et al.*, 2001). Porém, não apresentou diferença em relação aos FCAs e multiplicidade quando comparado com o grupo CNDMH.

Evidências científicas têm demonstrado que o maior contato de agentes nocivos, como os sais biliares e carcinógenos, com a mucosa colônica podem determinar alterações epiteliais importantes, podendo culminar com o desenvolvimento do câncer colorretal (FORTES *et al.*, 2007). Com estas evidências, a maior excreção fecal de colesterol observada em nosso estudo pode estar associada a maior quantidade de sais biliares no cólon e, com isso, ter estimulado a proliferação celular. No entanto, o colesterol dietético não influenciou no desenvolvimento dos FCA talvez devido ao pequeno período de tratamento (60 dias).

Em suma, a dieta acrescida de 1% de colesterol não foi suficiente para aumentar significativamente a colesterolemia e a concentração de colesterol hepático. Este fato pode ser explicado pela maior excreção fecal do mesmo (MELO *et al.*, 2008). Por outro lado, a presença de maior quantidade de colesterol nas fezes e/ou o maior pH fecal não influenciaram na quantidade de FCAs e no número de criptas por foco, mas aumentou a proliferação celular.

Nosso estudo indica que o efeito dos lipídios dietéticos sobre a carcinogênese colorretal depende do tipo, da composição e da

quantidade de ácidos graxos. Entre os animais que receberam DMH, os óleos de canola e oliva se mostraram protetores em relação ao desenvolvimento dos FCAs quando comparados à dieta controle, apesar de acumularem maior quantidade de colesterol hepático. Além destes, o óleo de milho também apresentou quantidade significativamente menor de FCAs que o grupo tratado com colesterol. Apesar de não haver diferença entre os grupos em relação ao número de criptas por foco, a proliferação celular também foi menor nos grupos tratados com os óleos de canola e oliva, e maior no grupo tratado com colesterol.

A hipótese inicial de que dietas com adição de diferentes lipídios e DMH poderiam diminuir a concentração de bifidobactérias e modular a formação de lesões pré-neoplásicas não foi sustentada pelos resultados obtidos, visto que não foi encontrada diferença na quantidade dessas bactérias entre os grupos. Assim, podemos sugerir que a influência dos lipídios sobre a carcinogênese colorretal não está relacionada com a modificação da microbiota intestinal. Ainda que outros estudos, com diferentes concentrações de lipídios e carcinógeno e de períodos de intervenção dietética, tenham demonstrado que a suplementação com probióticos reduzem as lesões pré-neoplásicas, a DMH não reduziu a quantidade de bifidobactérias no cólon dos ratos tratados com DMH.

## 7 CONCLUSÕES

- Os ratos tratados com diferentes lipídios dietéticos não desenvolveram hipertrigliceridemia ou hipercolesterolemia;

- Os lipídios isoladamente, nas concentrações adicionadas a dieta, não exerceram ação iniciadora da carcinogênese no cólon descendente, ou seja, o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas ocorreu somente nos grupos tratados com carcinógeno dimetilhidrazina;

- Os grupos tratados com dimetilhidrazina apresentaram menor concentração de triglicérides que os grupos tratados com as respectivas dietas;

- Os grupos tratados com colesterol apresentaram maior concentração fecal de colesterol e o grupo tratado com esta dieta e DMH também apresentou maior proliferação celular colônica;

- O efeito dos lipídios dietéticos sobre a carcinogênese colorretal depende do tipo de lipídio e da composição de ácidos graxos, sendo observados efeitos benéficos nos grupos tratados com óleo de canola e de oliva sobre as lesões pré-neoplásicas;

- Não foi observada relação entre a quantidade de bifidobactérias, o pH fecal e as lesões pré-neoplásicas no cólon;

- A quantidade de bifidobactérias não foi alterada pelo tratamento com os diferentes lipídios dietéticos e dimetilhidrazina, o que sugere que o mecanismo pelo qual os lipídios atuam no processo de carcinogênese colorretal não está relacionado à modulação da microbiota intestinal.



## REFERÊNCIAS

AGUILA, M.B.; LOUREIRO, C.C.; PINHEIRO, A.R.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Lipid metabolism in rats fed diets containing different types of lipids. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 78, n. 1, p. 32-38, 2002.

ALMEIDA, M.E.F.; QUEIROZ, J.H.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P. Lipídeos séricos e morfologia hepática de ratos alimentados com diferentes fontes lipídicas (óleo de soja, gordura de peixe e porco, margarina e manteiga). **Revista de Nutrição**. v.24, n.1, p.143-152, 2011.

AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH FUND. **Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective**. Washington, EUA, 2007.

AUED-PIMENTEL, S.; ZENEBON, O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 68, n. 2, p. 167-181, 2009.

BABA, N.H.; ANTONIADES, K.; HABBAL, Z. Effects of dietary canola, olive, and linolenic acid enriched olive oils on plasma lipids, lipid peroxidation and lipoprotein lipase activity in rats. **Nutrition Research**. v. 19, p. 601-612, 1999.

BARTOLI, R.; FERNANDEZ-BAÑARES, F.; NAVARRO, E.; *et al.* Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E2 synthesis. **Gut**. v. 46, p. 191-199, 2000.

BARTON, T.P.; CRUSE, J.P.; LEWIN, M.R. Changes in serum lipids related to the presence of experimental colon cancer. **British Journal of Cancer**. v. 56, n. 4, p. 451-454, 1987.

BARTSCH, H; NAIR, J; OWEN, RW. Dietary Polyunsaturated Fatty Acids and Cancers of the Breast and Colorectum: Emerging Evidence for their Role as Risk Modifiers. **Carcinogenesis**. v. 20, n. 12, p. 2209-2218, 1999.

BEZIRTOGLOU, E. The intestinal microflora during the first weeks of life. **Anaerobe**. v. 3, p. 173–177, 1997.

BHATIA, E.; DODDIVENAKA, C.; ZHANG, X.; *et al.*  
Chemopreventive effects of dietary canola oil on colon cancer development (**Abstract**). **Nutrition and Cancer**. v. 63, n. 2, 2011.

BIOVATI, B.; MATTARELLI, P. The Family Bifidobacteriaceae. **Prokaryotes**. v. 3, p. 322-382, 2006.

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

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

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

BOSSCHER, D.; BREYNAERT, A.; PIETERS, L.; HERMANS, N.  
Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 60, p. 5-11, 2009.

BOUHNİK, Y.; RASKINE, L.; SIMONEAU, G.; VICAUT, E.; NEUT, C.; FLOURIE, B.; BROUNS, F.; BORNET, F. R. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 80, n. 6, p. 1658-1664, 2004.

BOURLIOUX, P.; KOLETZKO, C.; GUARNER, F.; BRAESCO, V.  
The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium “The Intelligent Intestine,” held in Paris, June 14, 2002. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 78, p. 675-684, 2003.



BRANDT, K.G.; SAPIAO, M.M.S.C.; MIUKI, C. J. Importância da microbiota intestinal. **Pediatria**. v. 28, n. 2, p. 117-127, 2006.

BRUCKNER, H. W.; PITRELI, J.; MERRICK, M. Capítulo 103. Adenoma of the Colon and Rectum. Em Holland-Frei Cancer Medicine. 5ªEd. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20777/>. Acesso: 22 nov 2011.

BURIGO, T.; FAGUNDES, R. L. M.; TRINDADE, E. B. S. M.; VASCONCELOS, H. C. F. F.. Efeito bifidogênico do fruto-oligosacarídeo na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 29, p. 2, p. 130-135, 2007.

BUSSTR, M.C.; SIEZEN, C.L.E.; GRUBBEN, M.J.A.L.; *et al.* Tissue levels of fish fatty acids and risk of colorectal adenomas a case-control study (Netherlands). **Cancer Causes and Control**. v.14, p. 269-276, 2003.

CAMILLERI, M. Probiotics and irritable Bowel syndrome: rationale, putative mechanisms and evidence of clinical efficacy. **Journal of Clinical Gastroenterology**. v. 40, n. 3, p. 264-269, 2006.

CANI, P.D. *et al.* Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. **Diabetologia**. v. 50, p. 2374-2383, 2007.

CEBRA, J.J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. **American Journal of Clinical Nutrition**. p. 1046S-1051S, 1999.

CHALLA, A.; RAO, D.R.; CHAWAN, C.B.; SHACKELFORD, L. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis**. v. 18, n. 3, p. 517-521, 1997.

CHAPKIN, R. S.; DAVIDSON, L. A.; LY, L.; WEEKS, B. R.; LUPTON, J. R.; MURRAY, D. N. Immunomodulatory Effects of (n-3) Fatty Acids: Putative Link to Inflammation and Colon Cancer. **Journal of Nutrition**. v. 137, p. 200S-204S, 2007.

CHENG, L.; LAI, M. D. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**. v. 9, n. 12, p. 2642-2649, 2003.

CHO, K.; MABASA, L.; FOWLER, A.W.; WALSH, D.M.; PARK, C.S. Canola oil inhibits breast cancer cell growth in cultures and in vivo and acts synergistically with chemotherapeutic drugs. **Lipids**. v. 45, p. 777-784, 2010.

CHOI H.S.; DO K.M.; PARK Y.B.; JEON S.M.; JEONG T.; LEE Y.K.; LEE M.K.; BOK S.H. Effect of naringenin supplementation on cholesterol metabolism and antioxidant status on rats fed high cholesterol with different levels of vitamin E. **Annals of Nutrition and Metabolism**. v. 45, p. 193–201, 2001.

COHEN, B. I.; RAICHT, R. F.; FAZZINI, R. Reduction of *N-Methyl-N*-nitrosourea-induced colon tumors in the rat by cholesterol. **Cancer Research**. v. 42, p. 5050-5052, 1982.

CROCE, C.M. Oncogenes and cancer. **The New England Journal of Medicine**. v.358, p.503-511, 2008.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **British Journal Nutrition**. v. 87, s. 2, p. 145-151, 2002.

CUPPARI, L. **Guia de Nutrição: Nutrição clínica no adulto**. 1 ed. São Paulo: Manole Ltda. 2002.

DAUQAN, E.; SANI, H.A.; ABDULLAH, A.; KASIM, Z.M. Effect of different vegetable oils (red palm olein, palm olein, corn oil and coconut oil) on lipid profile in rat. **Food and nutrition sciences**. v. 2, p. 253-258, 2011.

DAVIS, C. S.; MILNER, J. A. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 743-752, 2009.

DE STEFANI, E.; MENDILAHARSU, M.; DENEOPELLEGRINI, H.; RONCO, A. Influence of dietary levels of fat, cholesterol, and calcium on colorectal cancer. **Nutrition Cancer**, v. 29, p. 83-89, 1997.

DOUGLAS, C. R. **Patofisiologia geral: Mecanismo da doença**. São Paulo: Robe Editorial, 2000.

DUPERTUIS, Y.M.; MEGUID, M.; PICHARD, C. Colon cancer therapy: new perspectives of nutritional manipulations using polyunsaturated fatty acids. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, p. 427–432, 2007.

EL-SOHEMY, A.; KENDALL, C. W.; RAO, A. V.; ARCHER, M. C.; BRUCE, W. R. Dietary cholesterol inhibits the development of aberrant crypt foci in the colon. **Nutrition and Cancer**. v. 25, p. 111-117, 1996.

ESCRICH, E.; MORAI, R.; GRAU, L.; COSTA, I.; SOLANAS, M. Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 51, p. 1279-1292, 2007.

FAVIER, C. R.; VAUGHAN, E.E.; DE VOS, W. M.; AKKERMANS, A. D. L. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, p. 219-226, 2002.

FEMIA, A. P.; LUCERI, C.; DOLARA, P.; GIANNINI, A.; BIGGERI, A.; SALVADORI, M.; CLUNE, Y.; COLLINS, K. J.; PAGLIERANI, M.; CADERNI, G. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 11, p. 1953-1960, 2002.

FERNANDES, L. C.; MATOS, D. Marcadores tumorais no câncer colorretal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v. 29, n. 2, 2002.

FORTES, R.C.; RECOVA, V. L.; MELO, A. L.; NOVAES, M. R. C. G. Hábitos dietéticos de pacientes com câncer colorretal em passe pós-operatória. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.53, n.3, p. 277-289, 2007.

FUJISE, T.; IWAKIRI, R.; KAKIMOTO, T.; SHIRAIISHI, R.; SAKATA, Y.; WU, B.; TSUNADA, S.; OOTANI, A.; FUJIMOTO, K.

Long-term feeding of various fat diets modulates azoxymethane-induced colon carcinogenesis through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in rats. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 292, p. 1150-1156, 2007.

FUNAHASHI, H.; MAKOTO, S.; SASCHA, H.; *et al.* Opposing effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on pancreatic cancer growth. **Pancreas**. v.36, n.4, p.353-362, 2008.

GALLAHER, D. D.; KHILL, J. The effect of synbiotics on colon carcinogenesis in rats. **The Journal of Nutrition**. v. 129, s. 7, p. 1483s-1490s, 1999.

GAROFOLO, A. *et al.* Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista de Nutrição**. v.17, n. 4, 2004.

GAROFOLO, A.; PETRILLI, A. S. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Revista de Nutrição**. v. 19, n. 5, p. 611-621, 2006.

GARRO, M. S.; AGUIRRE, L.; GIORI, G. S. Biological activity of *Bifidobacterium longum* in response to environmental pH. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 70, p. 612–617, 2005.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**. v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GILL, S. R.; POP, M.; DEBOY, R.T.; *et al.* Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**. v. 229, p. 1355-1359, 2006.

GRONLUND, M. M.; GUEIMONDE, M.; LAITINEN, K.; KOCIUBINSKI, G.; GRONROOS, T.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Maternal breast-milk and intestinal bifidobactérias guide the compositional development of *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk. **Clinical and Experimental Allergy**. v. 37, n. 12, p. 1764-1772, 2007.

GUARNER, F. El colon como órgano: hábitat de flora bacteriana. **Nutrición Hospitalaria**. v. 2, p. 2-7. 2002.

GUARNER, F; MALAGELADA, J-R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**. v. 360, p. 512-519, 2003.

GUEIMONDE, M.; OUWEHAND, A.; HUHTINEN, H.; SALMINEN, E.; SALMINEN, S. Qualitative and quantitative analyses of the bifidobacterial microbiota in the colonic mucosa of patients with colorectal cancer, diverticulitis and inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**. v. 13, n. 29, p. 3985-3989, 2007.

GUPTA, A. K.; PRETLOW, T. P.; SCHOEN R. E. Aberrant Crypt Foci: What We Know and What We Need to Know. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, p. 526-533, 2007.

GUTT, C. N.; *et al.* Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of metastases of colon carcinoma in rat liver. **European Journal of Nutrition**. v. 46, p. 279-285, 2007.

HALL, M. N.; CHAVARRO, J. E.; LEE, I-M.; WILLET, W. C.; MA, J. A 22-year prospective study of fish, n-3 fatty acid intake, and colorectal cancer risk in men. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**. v. 17, n. 5, p. 1136-1143, 2008.

HALL, P. A.; LEVISON, D. A. Review: Assessment of cell proliferation in histological material. **Journal of Clinical Pathology**. v. 43, p. 184-192, 1990.

HARDMAN, W.E. International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer - (n-3) fatty acids and cancer therapy. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 3427-3430, 2004.

HARTMAN, L.; LAGO, B. C. A Rapid Preparation of Fatty Acids Methyl Esters From Lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 457-477, 1973.

HEKMATDOOST, A.; *et al.* The effect of dietary oils on cecal microflora in experimental colitis in mice. **Indian Journal of Gastroenterology**. v. 27, p. 186-189, 2008.

HENRIQUES, V. T.; DIAS, C. M. G.; FRANCESCHINI, S. C. C.; *et al.* **Revista de Nutrição**. Ácidos graxos ômega-3 reduzem

desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas. v. 22, n. 2, p. 237-244, 2009.

HIRAYAMA, K.; RAFTER, J. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention - mechanistic considerations. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 76, p. 391-394, 1999.

HOULSTON, R.S.; TOMLINSON, I. P. M. Polymorphisms and colorectal tumor risk. **Gastroenterology**. v. 121, p. 282-301, 2001.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Ministério da Saúde. **Estimativas 2010: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro (RJ): INCA, 2009.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Ministério da Saúde. **Estimativas 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro (RJ): INCA, 2012.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Ministério da Saúde. Homepage. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322). Acesso: 22 out 2011.

INSTITUTE OF MEDICINE. FOOD AND NUTRITION BOARD. **Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids**. Washington (DC): National Academy Press; 2002.

ION, G.; AKINSETE, A.; HARDMAN, W. R. Maternal consumption of canola oil suppressed mammary gland tumorigenesis in C3(1) Tag mice offspring. **BMC Cancer**. v. 10, p. 81-92, 2010.

JARVINEN, R.; KNEKT, P.; HAKULINEN, T.; RISSANEN, H.; HELIUVAAARA, M. Dietary fat, cholesterol and colorectal cancer in a prospective study. **British Journal of Cancer**, v. 85, p. 357-361, 2001.

JEN, K-L. C.; BUISSON, A.; PELLIZON, M.; ORDIZ, F.; SANTA ANA, L.; BROWN, J. Differential effects of fatty acids and exercise on body weight regulation and metabolism in female Wistar rats. **Experimental Biology and Medicine**. v. 228, p. 843-849, 2003.

KENAR, L.; KARAYILANOGLU, T. AYDIN, A.; SERDAR, M.; KOSE, S.; ERBIL, M. K. Protective effects of diets supplemented with omega-3 polyunsaturated fatty acids and calcium against color tumor formation. **Digestive Disease Science**. v. 53, p. 2177-2182, 2008.

KENDALL, C. W.; KOO, M.; SOKOLOFF, E.; RAO, A. V. Effect of dietary oxidized cholesterol on azoxymethane-induced colonic pre-neoplasia in mice. **Cancer Letters**, v. 66, p. 241-248, 1992a.

KENDALL, C. W.; JANEZIC, S. A.; FRIDAY, D.; RAO, A. V. Dietary cholesterol enhances pre neoplastic aberrant crypt formation and alters cell proliferation in the murine colon treated with azoxymethane. **Nutrition and Cancer**, v. 17, p. 107-114, 1992b.

KEIGHLEY, M. R. B.; WILLIAMS, N. S. Cirurgia do ânus, reto e colo. 1ª ed. São Paulo: Editora Manole, 1998, p. 2448.

KHAN, B. A.; ABRAHAM, A.; LEELAMMA, S. *Murraya koenigii* and *Brassica juncea* – alterations on lipid profile in 1-2 dimethyl hydrazine induced colon carcinogenesis. **Investigational New Drugs**, v. 14, p. 365-369, 1996.

KIM, Y.; LEE, D.; KIM, D.; *et al.* Inhibition of proliferation in colon cancer cell lines and harm enzyme activity of colon bacteria by *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212. **Archives of Pharmacal Research**. v. 31, n. 4, p. 468-473, 2008.

KIMURA, Y. Fish, n-3 polyunsaturated fatty acid and colorectal cancer prevention: a review of experimental and epidemiological studies. **Nippon Koshu Eisei Zasshi**. v. 53, p. 735-48, 2006.

KINROSS, J. M.; ROOM, A. C.; HOLMES, E.; DARZI, A.; NICHOLSON, J. K. The human gut microbiome: implications for future health care. **Current Gastroenterology Reports**. v. 10, p. 396-403, 2008.

KULKARNI, N.; REDDY, B. S. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial b-glucuronidase. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**. v. 207, p. 278-283, 1994.

KUSHI, L.; GIOVANNUCCI, E. Dietary fat and cancer. **American Journal of Medicine.** v. 113, n. 19, p. 63S-70S, 2002.

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

LA VECCHIA, C. *et al.* Dietary cholesterol intake and cancer. **Annals of oncology.** v.23, p.491-500, 2012.

LEAHY, S. C.; HIGGINS, D. G.; FITZGERALD, G. F.; SINDEREN, D. A review: Getting better with bifidobacterium. **Journal of Applied Microbiology,** v. 98, p. 1303-1315, 2005.

LEE, D.K.; JANG, S.; KIM, M.J.; *et al.* Anti-proliferative effects of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 extract on human colon cancer cell lines. **BMC Cancer.** v.8, p.310-318, 2008.

LIEBERMAN, D. A.; PRINDIVILLE, S.; WEISS D. G.; WILLETT W. Risk Factors for Advanced Colonic Neoplasia and Hyperplastic Polyps in Asymptomatic Individuals. **Journal of the American Medical Association.** v. 290, n. 22, p. 2959-2967, 2003.

LIN, J.; ZHANG, S. M.; COOK, N. R.; LEE, I-M.; BURING, J.E. Dietary fat and fatty acids and risk of colorectal cancer in women. **American Journal of Epidemiology.** v. 160, n. 10, p. 1011-1022, 2004.

LIONG, M-T. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and in-vivo evidence. **International Journal of molecular sciences.** v. 9, p. 854-863, 2008.

LIPKIN, M.; REDDY, B.; NEWMAR, H.; LAMPRECHT, S.A. Dietary factors in human colorectal cancer. **Annual review of nutrition.** v. 19, p. 545-586, 1999.

LLAVERIAS, G.; DANILO, C.; MERCIER, I.; *et al.* Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. **The American journal of pathology.** v.178, n.1, p.402-412, 2011.



LLOR, X.; PONS, R.; ROCA, A.; ALVAREZ, M.; MANÉ, J.; FERNANDEZ-BANARES, F.; GASSULL, M. A. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. **Clinical nutrition**. v. 22, n. 1, p. 71-79, 2003.

MACHADO, D. F.; FERREIRA, C. L. L.F.; COSTA, N. M. B. Evaluation of the probiotic effect in the modulation of the levels of seric cholesterol and in the weight of the liver of mices fed with rich diet in cholesterol and colic acid. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, n. 2, p. 270-275, 2003.

MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 69, p. 1035S-1045S, 1999.

MACLENNAN, M.; MA, D. W. L. Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer. **Cancer Research**. v. 12, p. 211. 2010.

MAHAN, K; ESCOTT-STUMP, S. **Krause alimentos, nutrição & dietoterapia**. 10ª ed. São Paulo: Rocca, 2002.

MARCHESI, J.; SHANAHAN, F. The normal intestinal microbiota. **Current Opinion in the infectious diseases**. v. 20, p. 508-513, 2007.

MEGAN, N. H.; CHAVARRO, J. E.; *et al.* A 22-year prospective study of fish, n-3 fatty acid intake and colorectal cancer risk in men. **Cancer epidemiology, biomarkers e prevention**. v. 17, n. 5, p. 1136-1143, 2008.

MELO, S.S.; SILVEIRA, B. M.; STEFANES, F.B.; TOMIO, T. A.; TISCHER, C. A. Efeito da goma arábica nas concentrações de colesterol hepático , sérico e fecal de ratos alimentados com semente de linhaça, óleo de linhaça e colesterol sintético. **Alimentos e nutrição**. v. 19, n. 2, p. 133-144, 2008.

MITCHELL, D. K.; VAN, R.; MASON, E. H.; NORRIS, D. M.; PICKERING, L. K. Prospective study of toxigenic *Clostridium difficile* in children given amoxicillin/ clavulanate for otitis media. **Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 15, n. 6, p. 514-519, 1996.

MUÑO A, F. J.; PARES, R. Selective medium for isolation and enumeration of bifidobacterium spp. **Applied and environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1715-1718, 1988.

NACIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer of the colon and rectum. Disponível em: [http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/colon-and-rectal/WYNTK\\_Colon.pdf](http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/colon-and-rectal/WYNTK_Colon.pdf). Acesso em: 29 out 2011.

NAUSS, K.,M.; LOCNISKAR, M.; NEWBERNE, P. M. Effect of alterations in the quality and quantity of dietary fat on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumorigenesis in rats. **Cancer Research**. v. 43, p. 4083-4090, 1983.

NKONDJOCK, A.; SHATENSTEIN, B.; MAISONNEUVE, P.; GHADIRIAN, P. Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. **Cancer Detection and Prevention**. v. 27, p. 55-66, 2003.

OHNO, H. Bacterial guests double as bodyguards. **Riken Research**. Disponível em: <http://www.rikenresearch.riken.jp/eng/hom/6585>. Acesso: 22 nov 2011.

ONOUE, M.; KADO, S.; SAKAITANI, Y.; UCHIDA, K.; MOROTOMI, M. Specific species of intestinal bacteria influence the induction of aberrant crypt foci by 1,2-dimethylhydrazine in rats. **Cancer Letters**. v. 113, p. 179-186, 1997.

ORBAN, J. I.; PATTERSON, J. A. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobactérias. **Journal of Microbiological Methods**. v. 40, p. 221-224, 2000.

OGATA, C.O.; GRECA, F.H.; LUZ, M.A.; *et al.* Foco de criptas aberrantes e câncer da junção colorretal: análise da presença de lesões precoces microscópicas na periferia do câncer colorretal e correlação com a expressão da  $\beta$ -catenina e Ki-67. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v.37, n.2, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Fats and oils in human nutrition**. 1995. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/v4700e/v4700e00.htm>. Acesso: 15 nov 2011.

- OWEN, R. W.; HAUBNER, R.; WURTELE, G.; HULL, E.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Olives and olive oil in cancer prevention. **European Journal of Cancer Prevention**. v. 13, p. 319-326, 2004.
- PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P.; LANCHI, A.H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência a insulina. **Arquivo brasileiro de endocrinologia e metabologia**. v. 47, p. 111-127, 2003.
- PERIS, G. P.; LESMES, B.; CUERDA COMPES, C. M.; ÁLVAREZ, C. Metabolismo colonico de la fibra. **Nutrición Hospitalaria**. v. 17 p. 11-16, 2002.
- PICARD, C.; FIORAMONTI, J.; FRANCOIS, A.; ROBINSON, T.; NEANT, F.; MATUCHANSKY, C. Review article: Bifidobacteria as probiotic gents- physiological effects and clinical benefits. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**. v. 22, p. 495-512, 2005.
- PITOT, H. C. The molecular biology carcinogenesis. **Cancer**. v. 72, n. 3, p. 962-970, 1993.
- POUPARD, J. A.; HUSAIN, I.; NORRIS, R. F. Biology of the bifidobacteria. **Bacteriological Reviews**. v. 37, n. 2, p. 136-165, 1973.
- RAO, C. V.; HIROSE, Y.; INDRANIE, C.; REDDY, B. S. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. **Cancer Research**. v. 61, p. 1927-1933, 2001.
- REDDY, B.S.; SIMI, B.; PATEL, N.; ALIAGA, C.; RAO, C.V. Effect of amount and types of dietary fat on intestinal bacterial 7 $\alpha$ -dehydroxylase and phosphatidylinositol specific phospholipase C and colonic mucosal diacylglycerol kinase and PKC activities during different stages of colon tumor promotion. **Cancer Research**. v. 56, p. 2314-2320, 1996.
- REDDY, B. S. Omega-3 fatty acids in colorectal cancer prevention. **International Journal Cancer**. v. 112, p. 1-7, 2004.
- RHEE, Y-K., BAE, E-A.; KIM, S-Y.; *et al.* Antitumor activity of *Bifidobacterium spp.* Isolated from a healthy Korean. **Archives of Pharmacal Research**. v.23, n.5, p.482-487, 2000.

RIBOLI, E.; NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 78, p. 559S–569S, 2003.

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

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

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Annual Review of nutrition*. v. 22, p. 19-34, 2002.

ROWLAND, I. R.; RUMNEY, C. J.; COUTTS, J. T.; LIEVENSE, L. C. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis**. v. 19, p. 281-285, 1998.

SAAD, S. M. T. Probióticos e prébióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 1, 2006.

SAMELSON, S.L.; NELSON, R.L.; NYHUS, L.M. Protective role of faecal pH in experimental colon carcinogenesis. **Journal of the Royal Society of Medicine**. v. 78, n. 3, p. 230–233, 1985.

SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; VILLEGAS, I.; CÁRDENO, A.; TALERO, W.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; MOTILVA, V.; LASTRA, C. A. Extra-virgin olive oil-enriched diet modulates DSS-colitis-associated colon carcinogenesis in mice. **Clinical Nutrition**. v. 29, p. 663-673, 2010.

SANCHO, E.; BATLE, E.; CLEVERS, H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v. 20, p. 695-723, 2004.

SANTOS JÚNIOR, J. C. M. Câncer ano-reto-cólico: aspectos atuais II- Câncer colorretal- fatores de riscos e prevenção. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. v. 27, n. 4, p. 459-473, 2007.

SCARDOVI, V. **Genus Bifidobacterium**. In: BERGEY'S manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. p. 1418-1434.

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**. v. 50, p. 6358-6363, 1990.

SHIN, H. S.; PARK, S. Y.; LEE, D. Y.; *et al.* Hypcholesterolemic effect of sonication-killed *Bifidobacterium longum* isolated from healthy adult Koreans in high cholesterol fed rats. **Archives of pharmacal research**. v. 33, n. 9, p. 1425-1431, 2010.

SHIVAPURKAR, N.; TANG, Z.; FERREIRA, A.; NASIN, S.; GARETT, C.; ALABASTER, O. Sequential analysis of K-ras mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors induced by azoxymethane in Fischer-344 rats on high-risk diet. **Carcinogenesis**. v. 15, n. 4, p. 775-778, 1994.

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

SOLANAS, M.; GRAU, L.; MORAL, R.; VELA, E.; ESCRICH, R.; ESCRICH, E. Dietary olive oil and corn oil differentially affect experimental breast cancer through distinct modulation of the p21Ras signaling and the proliferation-apoptosis balance. **Carcinogenesis**. v.31, n. 5, p.871-879, 2010.

SPENCER, E.A. *et al.* Meat, poultry and fish and risk of colorectal cancer: pooled analysis of data from the UK dietary cohort consortium. **Cancer Causes Control**. v.21, p.1417-1425, 2010.

THEODORATOU, E.; McNEIL, G.; CETNARSKVY, R.; FARRINGTON, S. M.; *et al.* Dietary Fatty acids and colorectal cancer:

A case-control Study. **American Journal of Epidemiology**. v. 166, n. 2, p. 181-195, 2007.

TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A. C.; RAUTONEN, N. Human intestinal microbiota and healthy ageing. **Ageing research reviews**. v. 9, p. 107-106, 2010.

TUOHY, K. M.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C. W.; GIBSON, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**. v. 3 p. 692-700, 2003.

THORNTON, W.H.; MACDONALD, R.S. dietary fat quantity and composition induce changes in proliferation and membrane lipids in rat colon cells. **Annals of nutrition and metabolism**. v. 41, n. 4, p. 260-268, 1997.

VENTURA, M.; O'FLAHERTY, S.; CLAESSON, M. J.; TURRONI, F.; KLAENHAMMER, T. R.; SINDEREN, D. W.; O'TOOLE, P. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. **Nature Review Microbiology**. v. 7, p. 61-71, 2009.

WHELAN, J.; McENTEE, M.F. Dietary ( $\omega$ -6) PUFA and intestinal tumorigenesis. **Journal of nutrition**. v. 134, s. 12, p. 3421-3426, 2004.

WILLIAMS, C. M.; BURDGE, G. Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 65, p. 42-50, 2006.

WU, B.; IWAKIRI, R.; OOTANI, A.; TSUNADA, S.; FUJISE, T.; SAKATA, Y.; SAKATA, H.; TODA, S.; FUJIMOTO, K. Dietary corn oil promotes colon cancer by inhibiting mitochondria-dependent apoptosis in azoxymethane-treated rats. **Experimental Biology Medicine**. v. 229, p. 1017-1025, 2004.

YAMADA, Y.; YOSHIMI, N.; HIROSE, Y.; KAWABATA, K.; MATSUNAGA, K.; SHIMIZU, M.; HARA, A.; MORI, H. Frequent  $\beta$ -catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 60, p. 3323-3327, 2000.

YIN, Y.; WANG, Q-X.; CHEN, X. *et al.* Antitumor efficacy of *Bifidobacterium longum* carrying endostatin gene enriched with selenium and the distribution of selenium. **African Journal of Microbiology Research**. v.5, n.31, p.5615-5621, 2011.

ZIEGLER, T. R.; EVANS, M. E.; FERNÁNDEZ-ESTÍVARIS, C.; JONES, D. P. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. **Annual Review of Nutrition**, v. 23, p. 229-261, 2003.

ZENI, M.M. **Efeitos fisiológicos da ingestão de óleos vegetais por ratos Wistar fêmeas**. 2008. 14 f. TCC (Graduação em Nutrição) – Faculdade Assis Gurguez, Cascavel, 2008.

ZILIOOTTO, L. **Modulação da carcinogênese do cólon pelo cogumelo *Agaricus blazei* no rato**. 2008. 108f. Tese (Mestrado em Patologia)- Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu 2008.





## ANEXO

**Resultado de Solicitação de Protocolo****Protocolo**

PP00321

**Título**

Efeito de lipídios dietéticos sobre as bifidobactérias e o pH intestinal e suas relações com o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas induzidas pela DMH em ratos

**Data de Entrada**

21/05/2009

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

15/09/2011

**Considerações**

Ofício nº 108/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Flávia Martinello, Departamento de Análises Clínicas - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO ad referendum, por mais 01 ano, para a utilização de 80 (oitenta) ratos (*Rattus norvegicus*, em suplementação.

- Adita-se o ofício nº 100/CEUA/PRPE/2009 abaixo:

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Flávia Martinello, Departamento de Análises Clínicas - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO ad referendum, por 02 (dois) anos, para a utilização de 80 (oitenta) ratos (*Rattus norvegicus*.

- Processo cadastrado sob o número: 23080.018822/2009-46

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**

**Data 09/10/2012**

Data 15/09/2011

**Parecer(es):**

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE