

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**EXPOSIÇÃO À DIETA OCIDENTAL DURANTE A GESTAÇÃO,
LACTAÇÃO, FASE JUVENIL E SUSCEPTIBILIDADE À
CARCINOGENESE QUÍMICA DO CÓLON EM RATOS
ADULTOS DA LINHAGEM SPRAGUE-DAWLEY.**

MESTRANDA: GISELE APARECIDA DIONÍSIO LOPES

**ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARCHESAN
RODRIGUES**

CO-ORIENTADOR: LUÍS FERNANDO BARBISAN

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da Faculdade
de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista – UNESP para obtenção do
título de Mestre em Patologia.

BOTUCATU - SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Lopes, Gisele Aparecida Dionísio.

Exposição à dieta ocidental durante a gestação, lactação, fase juvenil e susceptibilidade a carcinogênese química do cólon em ratos adultos da linhagem Sprague-Dawley / Gisele Aparecida Dionísio Lopes. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientadora: Maria Aparecida Marchesan Rodrigues

Assunto CAPES: 40105008

1. Cólon - Câncer 2. Gestação - Doenças

Palavras-chave: Dieta ocidental; Câncer do cólon; Fenótipo econômico; Focos de criptas aberrantes (FCA); Programação fetal

Dedicatoria

Ao meu amado Deus:

Pela concretização de um grande sonho que se consolidou desde o momento em que eu verdadeiramente O conheci e entreguei minha vida em Tuas mãos. Nunca me deixes esquecer que tudo o que tenho, tudo o que sou, e o que eu vier a ser, vem de Ti Senhor.

Porque desde a antiguidade não se ouviu, nem com ouvidos se percebeu, nem com os olhos se viu um Deus além de ti que trabalha para aquele que nele espera.” (Isaías 64.4).

À minha amada família:

*Aos meus pais, Idair e Marina, exemplos de luta, caráter,
bondade e dignidade. Pelo amor, carinho, amizade e incentivo
sempre incondicionáveis. Pela confiança, compreensão,
ensinamentos e sacrifício em todos os momentos da minha vida.
Sem vocês eu não chegaria até aqui. Deus me presenteou com pais
tão maravilhosos... Amo vocês!*

*Aos meus galinhos e galinhas de estimação, por me ensinarem
uma nova forma de amar.*

À Braz Títton Júnior:

*Pela dedicação e apoio em todas as etapas deste trabalho. Pela
compreensão e incentivo para que eu pudesse seguir com meus
sonhos.*

Agradecimento Especial

*À Profa. Dra. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues
(Tuca):*

Uma profissional carinhosa, dedicada, competente, que não somente me orientou, mas cuidou de mim com paciência nestes dois anos, me recebendo de braços abertos desde o dia em que eu timidamente adentrei em sua sala. Com ela aprendi a educar de forma positiva e ter amor ao trabalho mesmo nos momentos mais difíceis. Carregarei sempre comigo seus ensinamentos.

Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan:

Pelo apoio, paciência, competência. Não só pelos ensinamentos sobre carcinogênese experimental desde a Iniciação Científica, mas pela convivência com tão brilhante pesquisador. Pela oportunidade e liberdade de utilizar a infra-estrutura do Departamento de Morfologia, onde foram realizadas praticamente todas as fases do experimento.

Muito obrigada!

*Aos companheiros de trabalho que sempre levarei no
coração:*

*Marcos Correa Dias, por ter sido o anjo que Deus colocou em meu
caminho desde a Iniciação Científica. Pelos muitos momentos de
diversão, atrapalhadas e conhecimento. Ele sempre cedeu seu
tempo para me ajudar com um sorriso no rosto e contribuir com
minha formação, e ainda me presenteou com seu carinho e
verdadeira amizade.*

*Kelly da Silva Furtado e Paulo Wagner Pires, que me acolheram
com muito carinho e competência na Iniciação Científica. Sempre
serei grata pelo auxílio e ensinamentos na fase experimental e
intelectual. Obrigada pela amizade de vocês!*

Agradecimientos

Quem me conhece sabe da minha dificuldade em escrever os agradecimentos, pelo medo de esquecer alguém e de não expressar no papel os meus sentimentos. Agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha vida e foram importantes neste período, em especial:

*Aos queridos amigos do Departamento de Morfologia: **Flávia Regina, Nelci, Ariane, Justulín, Lúvia, Jaqueline, Robson, Lucas, Joyce, Marco Aurélio, Alexandre, Larissa, Carol, Elaine e Flávia Delella**. À agregada: Paula "Gansa". Pelo carisma, apoio e amizade nunca dispensados, por tornarem o meu dia mais alegre e mais leve.*

*À **Helôisa**, pela competência e dedicação com que assumiu o projeto de Iniciação Científica. Grande companheira e amiga!*

*Aos técnicos de Biotério **Paulo César Georgete (PC)** e **Juliana Semim**, pelo auxílio nas atividades do Biotério, tratamentos, sacrifícios e necropsias dos animais, sempre com muito bom humor, paciência e profissionalismo.*

*À **Karina "Lesma", Marina e Tony**, pela disposição e auxílio imprescindíveis na etapa reprodutiva.*

*À **Viviane e Alexandre Domingues**, pela amizade e disposição em ajudar na confecção da primeira ração peletizada manualmente.*

*Aos **companheiros do Anexo**, parte integrante da pós-graduação em Patologia. Pelos momentos de aprendizado e descontração.*

*Ao técnico de laboratório **Marquinhos**, que deixou seus afazeres de lado para me auxiliar com a imunohistoquímica.*

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e de Patologia, e aos funcionários da Pós-Graduação, pelo auxílio e paciência.

À Profa. Dra. Patrícia Alne Boer e Dra. Carla Adriene da Silva Franchi, pela contribuição inestimável na etapa da qualificação.

Aos animais de experimentação, vítimas solicitadas pela ciência para benefício da humanidade.

Vendo assim, parece que tudo é lindo na vida acadêmica. Nem sempre! Olho para trás e lembro as dificuldades enfrentadas no início do delineamento experimental em Biotério e a busca por alternativas de modo a viabilizar o presente estudo. Amigos vão embora. Nem tudo sai como o previsto e o prazo para conclusão vai chegando. Finalmente a versão final, no entanto, não o fim dos agradecimentos. Carrego comigo amigos de anos, alguns de uma vida toda e que, apesar de não terem contribuído diretamente nesta saga, são fundamentais em minha vida: Xumbrek, Giletão, Flaura, Nulo, 100 Prega, Rexona, Sissão, Minhão, Kenga, Emília, Evandro, André, Gisele Ferreira, Loriza, Felipe e Marcelo.

Muito obrigada!

Este estudo recebeu o apoio financeiro das seguintes instituições:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp (bolsa de Mestrado 07/57408-0)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp (auxílio-pesquisa 08/53366-4)

Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (bolsa PIBIC/CNPQ 107517/2009-4)

Curso de Pós-Graduação em Patologia - Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp - SP

Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp - SP

Departamento de Morfologia - Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp - SP

Sumário

I. Revisão de literatura.....	01
I.1) Conceito de programação fetal e fenótipo econômico (thrifty phenotype)	02
I.2) Câncer do cólon	07
I.3) Carcinogênese experimental	09
I.4) Dieta ocidental como fator de risco para câncer	12
I.5) Carcinogênese do cólon e 1,2-dimetilhidrazina (DMH)	16
I.6) Focos de Criptas Aberrantes (FCAs)	18
I.7) Referências bibliográficas	20

Sumário

II. Artigo.....	35
III. Anexos	42

Lista de Figuras

I. Revisão de literatura	01
Figura 1. Representação diagramática da programação.....	03
Figura 2. Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2008	08
Figura 3. Etapas da carcinogênese química	09
Figura 4. Esquema de biotransformação da 1,2-dimetilhidrazina	17

Lista de Figuras

II. Artigo.....	35
-----------------	----

Figura 1. Peletização manual das dietas semi-purificadas

Figura 2. Acondicionamento das dietas semi-purificadas em embalagens de tecido

Figura 3. Protocolo experimental dieta Ocidental

Figura 4. Procedimento de esfregaço vaginal em ratas SD

Figura 5. Cólon fixado corado com azul de metileno a 0,2%

Figura 6. Cólon nas porções distal, medial e proximal

Figura 7. Prole tratada com dieta padrão no DPN 11

Figura 8. Prole tratada com dieta Ocidental no DPN 11

Figura 9. Taxa de sobrevida dos animais dos diferentes grupos experimentais após a administração das quatro doses de DMH

Figura 10. Focos de criptas aberrantes (FCA) identificados pela coloração de azul de metileno

Figura 11. Focos de criptas aberrantes (FCA) identificados pela coloração de hematoxilina-eosina

Lista de abreviaturas

DMH = 1,2-dimetilhidrazina

AOM= azoximetano

EDTA= ácido etilenodiamino tetra-acético

SD= Sprague-Dawley

DG = dia gestacional

DPN = dia pós-natal

FCA= focos de criptas aberrantes

CA= cripta aberrante

M1, M2, M3= 1ª, 2ª e 3ª porção do cólon medial

WD= Western Style Diet

NWD= Newmark Western Diet

HE= hematoxilina-eosina

CEMIB= Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica

CEEA= Comissão de Ética em Experimentação Animal

TOXICAM= Núcleo do Impacto Ambiental na Saúde Humana da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Lista de Tabelas

II. Artigo.....	35
-----------------	----

Tabela 1. Composição das rações semi-purificadas

Tabela 2. Consumo estimado de ração e líquidos, peso corpóreo final e ganho de peso das fêmeas prenhes expostas à dieta padrão ou Ocidental durante a fase de gestação. Razão sexual

Tabela 3. Consumo estimado de ração e líquidos e perda de peso das fêmeas lactantes e ganho de peso corpóreo da prole de machos, expostos à dieta padrão ou Ocidental durante a fase de lactação

Tabela 4. Consumo estimado de ração da prole de ratos machos não-iniciados pela DMH, do DPN 21 ao DPN 42

Tabela 5. Consumo estimado de ração pela prole de ratos machos iniciados pela DMH, do DPN 21 ao DPN 140

Tabela 6. Evolução do peso corpóreo da prole de ratos machos iniciados pela DMH, do DPN 21 ao DPN 140

Tabela 7. Efeitos da exposição à dieta ocidental sobre o número e multiplicidade dos FCA identificados pela coloração de azul de metileno

Tabela 8. Efeitos da exposição à dieta ocidental sobre o número e multiplicidade dos FCA identificados pela coloração de hematoxilina-eosina

Tabela 9. Graus de displasia das lesões pré-neoplásicas induzidas pela DMH

I. Revisão de Literatura

I. 1) Programação fetal e fenótipo econômico (thrifty phenotype)

Diversos estudos têm sido desenvolvidos e apontam evidências crescentes da contribuição da programação nutricional no desenvolvimento de doenças na vida adulta (Wells, 2003).

O desenvolvimento do embrião humano não é isolado de seu ambiente. Os fatores ambientais são uma parte fundamental do ciclo de vida do organismo. A remoção ou alteração desses fatores podem alterar o desenvolvimento. A relação entre a nutrição materna e o desenvolvimento de doenças na vida adulta tem sido considerada por várias décadas (Wells, 2003).

Widdowson & McCance (1960) demonstraram efeitos permanentes da nutrição nas fases iniciais do desenvolvimento sobre o tamanho de ratos na vida adulta, enquanto Davison & Dobbing (1968) formularam a “hipótese de período crítico” para descrever os efeitos irreversíveis da nutrição materna sobre o desenvolvimento cerebral. Barker (1992, 1998b) contribuiu com evidências epidemiológicas que indicaram que a subnutrição, durante a vida fetal e infância, predispõe a uma série de doenças na vida adulta. Este mecanismo é denominado “programação”, e o termo foi empregado pela primeira vez por Lucas (1991). O autor define o termo como um estímulo ambiental ou injúria durante períodos críticos do crescimento e desenvolvimento que podem alterar permanentemente estruturas e funções teciduais.

O conceito de programação fetal sugere que o feto pode ser programado durante o desenvolvimento intra-uterino para desenvolver doenças na vida adulta (Langley-Evans, 2004). Décadas mais tarde, os efeitos da programação podem ser refletidos por adaptações irreversíveis que acarretam mal funcionamento de um órgão e até mesmo diminuição na longevidade. (Lucas, 1991). Este fenômeno é mostrado diagramaticamente na **Figura 1**.

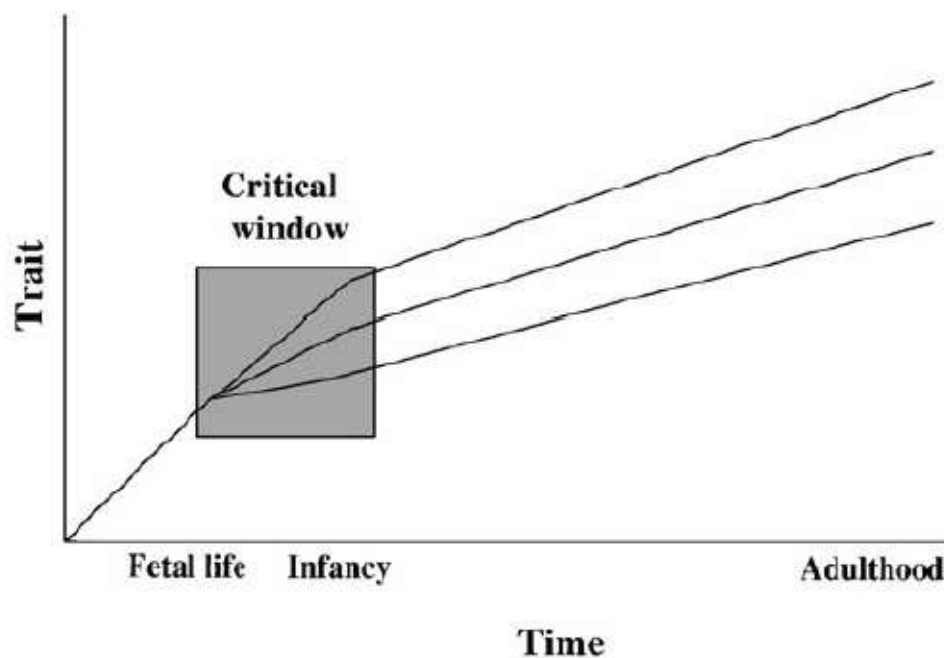


Figura 1- Representação diagramática da programação

A programação pode determinar de forma profunda o perfil da saúde e as doenças que irão acometer um indivíduo ao longo de sua vida (Wells, 2003). De fato, quando o feto é colocado sob a influência de determinados estímulos durante o desenvolvimento embrionário, as respostas adaptativas que ocorrem nesse período podem ser memorizadas e fixadas permanentemente (Lucas, 1991). Estudos apontam ainda que as implicações da manipulação do ambiente fetal podem não estar limitadas apenas à primeira gestação, e os efeitos da programação se prolonguem pelas gerações subseqüentes (Drake & Walker, 2004).

Este novo paradigma também sugere que a susceptibilidade a doenças (incluindo disfunções reprodutivas) é resultado da influência da nutrição e da exposição ambiental a agentes tóxicos e ao estresse durante o período fetal e neonatal (Heindel, 2007). Estas incluem doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, diabetes do tipo II, doenças renais, doenças

pulmonares crônicas obstrutivas, osteoporose, esquizofrenia, depressão, câncer de mama e síndrome dos ovários policísticos (Ozane et al., 2004).

O interesse no potencial para doenças humanas serem programadas no útero tem sido crescente nos últimos anos. As implicações para a saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, tem resultado em grande número de pesquisas experimentais unindo-se às epidemiológicas com a finalidade de explorar a natureza do problema e desvendar os mecanismos biológicos e moleculares da programação. Um grande número de pesquisadores internacionais nesse campo promoveu a fundação de uma sociedade voltada para o estudo das origens fetais das doenças da vida adulta, denominada DOHaD (International Society for Developmental Origins of Health Disease) (Langley-Evans, 2004).

Evidências epidemiológicas apontam que tanto a redução quanto o aumento do crescimento no período fetal podem estar associados ao aumento do risco para câncer. O consenso atual aponta que o tamanho na infância e vida adulta estão relacionados a aumento do risco para câncer de mama, próstata, do cólon e reto, sistema hematopoético e endométrio. (Ozane et al., 2004). Estudos epidemiológicos que relacionem o estado de nutrição materna e seus efeitos nos descendentes são necessários a fim de se examinar a hipótese de que as doenças da vida adulta na população humana podem ter origem fetal (Xiao et al., 2007).

O uso de modelos animais favoreceu o entendimento das relações entre modificações do ambiente materno e a saúde da prole ao longo da vida. A natureza dos estudos em animais concentra-se tipicamente na alteração de aspectos específicos da nutrição materna (redução do conteúdo protéico, restrição alimentar global ou menor consumo de calorias) durante períodos críticos do desenvolvimento (início do desenvolvimento, períodos de organogênese, crescimento fetal) e os resultados destas alterações na saúde e na fisiologia da prole (Watkins & Fleming, 2009).

Fetos de rato ou cabra expostos à restrição alimentar materna (desnutrição total), ou deficiência de nutrientes específicos resulta em programação que leva a alterações na fisiologia e no início de processos patológicos na idade adulta (Bertram & Hanson, 2001; Langley-Evans, 2001). A deficiência materna de vitamina B e metionina, durante o período periconceitual em ovelhas induz na prole valores maiores de peso e gordura corpóreas associados à hipertensão, com evidências de mudanças epigenéticas associadas com o perfil de metilação do DNA de muitos genes (Sinclair et al., 2007). Xial et al. (2007) demonstraram que o desenvolvimento de múltiplos tumores do cólon em roedores induzidos pelo azoximetano (AOM) possui um componente fetal via programação nutricional. Em macacos, a exposição materna a uma dieta rica em gordura foi associada a alterações epigenéticas e do perfil metabólico fetal (Cox et al., 2009).

Uma das consequências da programação fetal é a geração do fenótipo econômico. Hales & Barker (1992) propuseram a hipótese do fenótipo econômico (thrifty phenotype) como uma explicação para a associação entre o desenvolvimento inicial e doenças da vida adulta. O feto pode adaptar seu próprio desenvolvimento em resposta direta ao ambiente uterino, mediado por fatores como nutrição materna e fisiologia (Gluckman & Hanson, 2004; McMillen & Robinson, 2005; Hanson e Gluckman, 2008). A resposta à dieta materna permite que o feto faça ajustes no seu crescimento e metabolismo de forma que sua morfofisiologia seja compatível com a disponibilidade pós-natal de nutrientes sugeridas pelo ambiente uterino. Se o ambiente é privado de nutrientes, o organismo se adapta a essa condição (Wells, 2003). Em termos mais simples, ou o feto se adapta ou morre (Lucas, 1991). A hipótese do fenótipo econômico propõe que condições adversas nas fases iniciais do desenvolvimento levam a alterações metabólicas e fisiológicas que promovem a sobrevivência do organismo, selecionando uma via de crescimento adequado ao ambiente.

A hipótese do fenótipo econômico é uma plausível explicação para descrever a aparente associação entre o desenvolvimento inicial e doenças da vida adulta. Entretanto, é cada vez mais aceitável a importância da epigenética como via comum de interação entre os genes e fatores ambientais como a dieta. Mudanças ocorridas durante as fases iniciais do desenvolvimento podem influenciar a predisposição a diversas doenças crônicas, como o câncer. Dessa forma, é cada vez mais cabível o conceito de que os processos epigenéticos programam o desenvolvimento e interagem com o ambiente nutricional uterino para influenciar doenças na vida adulta. A importância de que o mosaico epigenético pode ser modulado pelo ambiente nutricional uterino e como cada fenótipo dentro desse mosaico altera a susceptibilidade a doenças crônicas na vida adulta, demanda estudos adicionais (Ross & Milner, 2007).

O fenótipo econômico refere-se, portanto ao desenvolvimento da plasticidade (Wells, 2007). A condição de plasticidade fenotípica relata a habilidade de um organismo alterar sua fisiologia e/ou morfologia em decorrência de sua interação com o ambiente. Entretanto, a plasticidade fenotípica é perdida precocemente durante o período de desenvolvimento humano, e subseqüentemente, mudanças ambientais podem selecionar uma via inapropriada, levando a efeitos adversos sobre a saúde. Esse paradoxo gera incerteza se o fenótipo econômico é de fato adaptativo ao organismo. O fenótipo econômico não deve ser considerado um conceito dicotômico. Em vez disso, deve referir-se à capacidade de todos os descendentes responderem a informações sobre o ambiente durante o desenvolvimento ontogenético inicial (Wells, 2007).

A investigação dos impactos da programação fetal sobre a fisiologia e saúde humana encontra-se em estágio inicial e não são conhecidos os agentes ou cenários intra-uterinos capazes de agir como insulto ou estímulo (Wells, 2003).

I. 2) Câncer do cólon

O câncer do cólon é um dos principais responsáveis pelas mortes por neoplasias malignas, principalmente em países do ocidente, e o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo (Parkin et al., 2001, 2005). Globalmente, este tipo de câncer é um importante problema de saúde e sua incidência tende a aumentar com a “ocidentalização” do padrão alimentar adotado pela população. (Ries et al., 2000; Howe et al., 2001).

Nos Estados Unidos, é considerada a terceira causa de morte por câncer (Jemal et al., 2003). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2008), figura entre as cinco principais causas de morte por câncer e a distribuição percentual de tumores malignos do cólon e reto aproxima-se dos registros encontrados em países desenvolvidos. O número de casos novos de câncer de cólon e reto estimados no ano de 2008 é de 12.490 casos em homens e de 14.500 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres. Na região Sudeste, sem considerar os casos de câncer de pele não-melanoma, o câncer de cólon e reto foi o terceiro mais incidente (21 novos casos a cada 100.000 mulheres) entre a população feminina em 2008. Entre os homens, foi o terceiro mais incidente (19 novos casos a cada 100.000). **(Figura 2)**

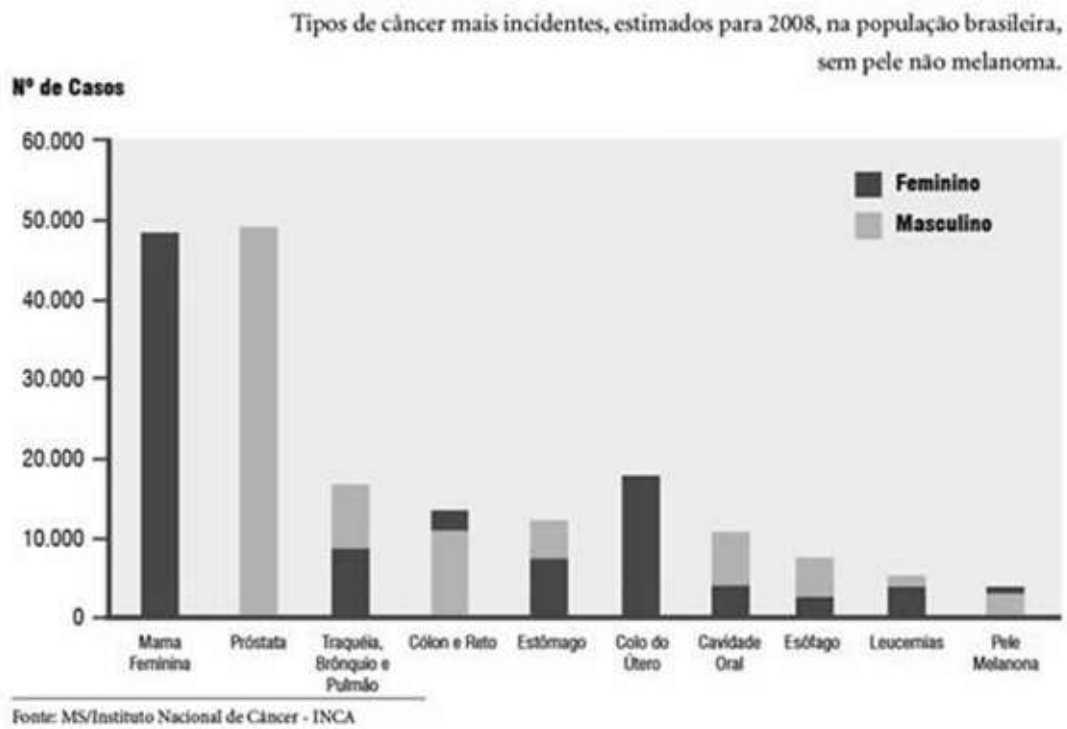


Figura 2- Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2008, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA)

I. 3) *Carcinogênese experimental*

O desenvolvimento do câncer ou carcinogênese, tal como analisado em modelos experimentais, é um processo extremamente complexo dividido em pelo menos três etapas: iniciação, promoção e progressão (Dragan & Pitot, 1991).

Na carcinogênese química, a **iniciação** é caracterizada pela exposição de células-alvo a uma dose apropriada de cancerígeno (iniciador), o que resulta em lesões permanentes no DNA, após um ciclo de divisão celular (**Figura 3**)

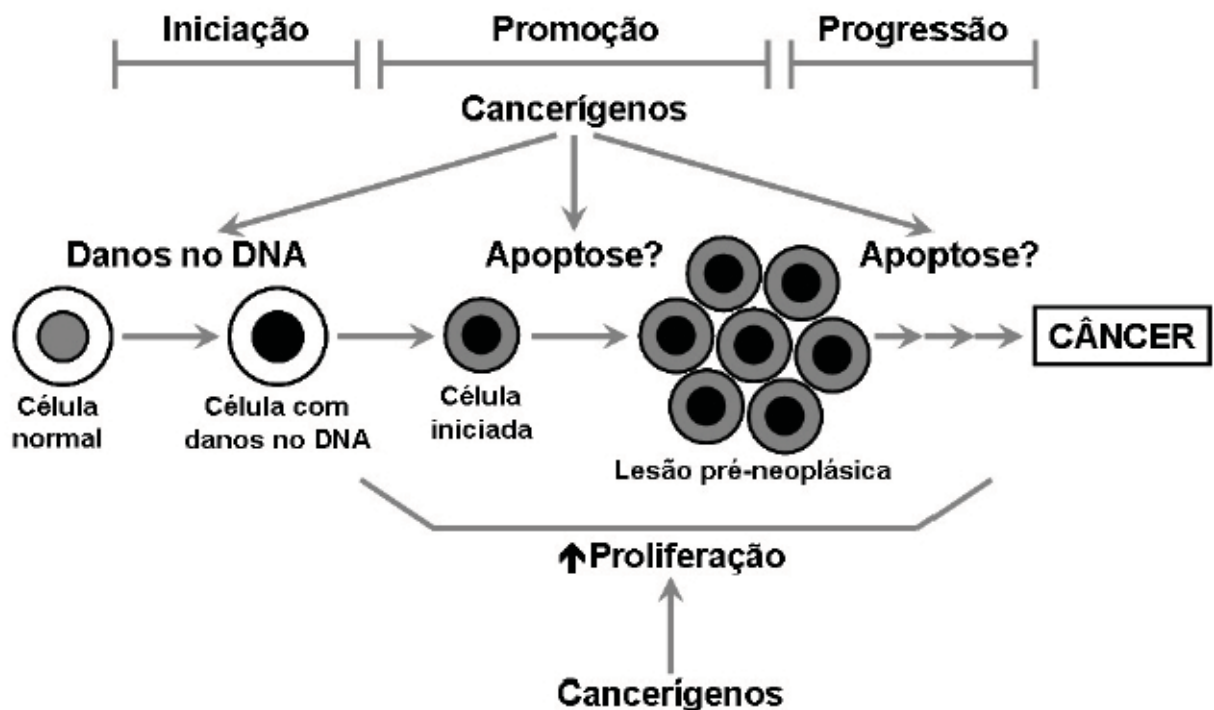


Figura 3- Etapas da carcinogênese química (Dragan & Pitot, 1991)

Os cancerígenos químicos (molécula original ou seu metabólito) possuem átomos altamente reativos capazes de capturar elétrons de sítios nucleofílicos como DNA, RNA, proteínas e lipídeos em células-alvo específicas (Baird et al., 2005). Essa interação resulta em

alterações profundas no DNA, que podem levar a célula à morte ou à aquisição de mutações em genes críticos que controlam o ciclo celular e a apoptose (Rundle, 2006; Ushijima et al., 2006). As células-alvo se tornam células iniciadas quando sobreviveram ao estímulo mutagênico sobre o seu DNA (Schulte-Hermann et al., 1999).

Na promoção, as células iniciadas com alterações genéticas sofrem um processo de expansão clonal originando lesões pré-neoplásicas. Nessa fase, a presença de substâncias cancerígenas promotoras ou não genotóxicas aceleram o desenvolvimento dessas lesões proliferativas e o surgimento de lesões displásicas (**Figura 3**). Os agentes promotores ou epigenéticos, como a dieta, atuam sobre as células iniciadas por diversos mecanismos, dentre os quais, a ativação de proteínas quinases envolvidas na fosforilação de diversos substratos das vias de transdução de sinais, principalmente as relacionadas a fatores de crescimento (Herman, 2005). Além disso, as células iniciadas respondem diferentemente a promotores, se comparadas a células normais, resultando em expansão celular seletiva. A multiplicação celular excessiva desses clones celulares possibilita um maior acúmulo de mutações e instabilidade no DNA e o desenvolvimento de anaplasia que levam as células envolvidas à conversão maligna e evolução para a etapa seguinte da carcinogênese.

Na etapa final ou de **progressão** do processo de carcinogênese, as células neoplásicas apresentam grau elevado de anaplasia, com elevados índices de proliferação e índices de apoptose reduzidos, caracterizando o fenótipo maligno (**Figura 3**). O agente promotor é dispensável nessa fase, pois as células que atingiram esse estágio de desenvolvimento tumoral são auto-suficientes aos estímulos para crescimento e multiplicação celular. O próximo passo dessas células malignas é a infiltração d matriz extracelular e a disseminação por via linfática e vascular para outros tecidos do hospedeiro, caracterizando a etapa de metástases. Esse fenômeno é dependente de uma série de características adquiridas pelas células malignas no

decorrer das transformações celulares como: (a) descolamento (“afrouxamento das junções intercelulares”) das células tumorais umas das outras e do tecido adjacente, (b) degradação da matriz extracelular e da membrana basal, (c) fixação a componentes ancoradouros de locomoção da matriz (fibronectina, laminina e colágeno principalmente) e (d) migração intertecidual. Isso significa que as células malignas se tornam capazes de romper a lâmina basal endotelial, atravessar a parede vascular e cair em sua luz, onde podem circular para locais a distância e interagir com células do sistema imunológico (Robbins & Cotran, 2005).

Há várias evidências de que a alimentação tem papel importante nos estágios de iniciação, promoção e progressão do desenvolvimento neoplásico, destacando-se como importante modulador do risco ou de proteção contra o desenvolvimento de neoplasias específicas (Garofolo et al., 2004).

1. 4) Dieta ocidental como fator de risco para câncer

A etiologia dos tumores malignos do cólon é extremamente complexa e não bem definida, porém a importante influência de fatores ambientais é reconhecida como moduladora do processo de carcinogênese (Tacla & Neves, 2001).

O padrão alimentar das populações de muitos países mudou substancialmente na segunda metade do século 20, geralmente com aumento do consumo de carne, e diminuição do consumo de alimentos ricos em amido e fibras (Yoshiike et al., 1996). A alimentação rica em gordura, pobre em fibras e oligoelementos, designada dieta do tipo ocidental, tem sido há tempos fortemente associada ao aumento da incidência de câncer do cólon no homem (Armstrong & Doll, 1975). Por outro lado, a alimentação pobre em gordura, rica em fibras e cálcio, vegetais e frutas parece proteger contra o desenvolvimento deste tipo de câncer (Negri et al., 1994).

Essa alta incidência de câncer pode ser atribuída ao padrão alimentar adotado por estes países, caracterizado por alimentação excessiva de gorduras e proteínas de origem animal, incluindo carne vermelha ou processada e pobre em fibras. Isso favorece a fermentação de ácidos graxos e biliares pela ação de bactérias anaeróbias, levando a formação de substâncias carcinogênicas, que atuam na luz intestinal, alterando o DNA das células e promovendo a sequência adenoma-adenocarcinoma. Esse padrão alimentar designado como ocidental é pobre em substâncias antioxidantes, que possuem ação reconhecidamente inibidora do processo carcinogênico (Tacla & Neves, 2001).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como o consumo de carne vermelha correlaciona-se com o aumento do risco para câncer do cólon e reto: aminas heterocíclicas mutagênicas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são formados quando a carne é preparada em altas temperaturas (Gooderham et al., 1997, Kazerouni et al., 2001).

Nitritos e componentes liberados na fumaça, sal, e em carnes processadas são convertidos em compostos N-nitrosos, carcinogênicos para o cólon (Bingham et al., 1996).

Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado evidências crescentes da contribuição de fatores alimentares no desenvolvimento de neoplasias (Glade, 1999).

Em estudos epidemiológicos, as investigações concluíram que, o risco é maior com o aumento do consumo de carne vermelha e processada, mas não está associado com o consumo total de carne (Norah et al., 2002). Entretanto, estudos de cohort de vegetarianos de países desenvolvidos não apresentaram baixas taxas de morte por câncer do cólon e reto, sugerindo que a carne não parece ser o elemento-chave das altas taxas deste tipo de câncer em países desenvolvidos (Key et al., 1998).

Experimentalmente, a exposição à dieta ocidental durante a vida adulta constitui fator de risco para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no cólon de roedores (Newmark et al., 2001).

Camundongos alimentados com dieta ocidental apresentaram aumento significativo das taxas de proliferação celular no pâncreas (Xue et al., 1995), próstata (Xue et al., 1997), cólon (Newmark et al., 1990, 2001) e nos ductos terminais das glândulas mamárias (Khan et al., 1994). Newmark et al. (2001), demonstraram a indução de tumores intestinais em camundongos através de alimentação com dieta do tipo ocidental, rica em gordura, e pobre em cálcio, vitamina D, ácido fólico, colina e fibras, na ausência de exposição a cancerígenos químicos. Estes autores em estudo de 20 semanas com roedores normais, expostos à dieta ocidental observaram hiperproliferação e hiperplasia das células epiteliais colônicas (Newmark et al., 1990), que foram revertidas pelo aumento da ingestão de cálcio e vitamina D (Newmark et al., 1991, Richter et al., 1995). A dieta ocidental também induziu

hiperproliferação e hiperplasia das células epiteliais mamárias (Khan et al., 1994, Xue et al., 1996a, 1999), do pâncreas exócrino (Xue et al., 1996a, 1999) e da próstata (Xue et al., 1997, 1999) em roedores.

Risio et al. (1996), observaram lesões displásicas nas criptas do cólon de camundongos normais expostos à dieta ocidental em estudo de 104 semanas. Entretanto, não houve o desenvolvimento de adenoma ou adenocarcinoma na mucosa do cólon. Em estudos com camundongos das linhagens *Apc 1638N*, *ApcMin* e *Mcc*, portadores de mutações-alvo para o desenvolvimento de neoplasias intestinais, demonstram que exposição à dieta ocidental aumentou a incidência de lesões neoplásicas (Yang et al., 1997, 1998, 1999).

Vários estudos revelam que o aumento da entrada de compostos alimentares bioativos no organismo como fibras, ácido fólico, cálcio, vitamina D e colina podem modular o risco para câncer do cólon (Baig, 2007).

A utilização de dietas ricas em fibras, pela ingestão de frutas e legumes, além da liberação de substâncias antioxidantes, promove o aceleração do trânsito intestinal e, dessa forma, reduz o tempo de contato das substâncias carcinogênicas com a luz intestinal (Ferguson et al., 1990). A fermentação das fibras no intestino grosso leva à produção de ácidos graxos de cadeia curta, tais como butirato, que parece exercer atividade protetora contra o câncer do cólon, através de sua habilidade para promover diferenciação celular, indução da apoptose e inibir a produção de ácidos biliares secundários, através da redução do pH do conteúdo intestinal (Hague et al., 1995; Nagengast et al., 1995). Os resultados de estudos epidemiológicos demonstraram baixo risco para câncer do cólon associado a alto consumo de fibras, frutas, e vegetais (Potter & Steinmetz, 1996; Jacobs et al., 1998). Entretanto, estudos experimentais não referendaram essa correlação. (Fuchs et al., 1999; Michels et al., 2000; Terry et al., 2001).

Compostos bioativos como o ácido fólico, que é elemento essencial na síntese *de novo* de purinas (A e G) e do timidilato, apresenta um papel essencial na replicação do DNA e na divisão celular e podem modular a carcinogênese (James et al., 1994; Blount et al., 1997). O ácido fólico exerce importante papel no metabolismo do DNA, e sua deficiência parece aumentar o risco para câncer através de vários mecanismos, que incluem a redução na metilação do DNA e a incorporação de uracil ao invés de timina na cadeia do DNA (Chen et al., 1999) e justamente a depuração é a forma mais comum de dano espontâneo ao DNA (Robien & Ulrich, 2003).

A colina foi reconhecida oficialmente como um nutriente essencial pelo Instituto de Medicina (IOM) em 1998. É um nutriente essencial para o transporte de lipídios no fígado e é a principal fonte de grupos metil na dieta. A colina é importante durante o desenvolvimento fetal, quando influencia na proliferação celular e apoptose, alterando a estrutura e função cerebral (Zeisel, 2006).

A alta ingestão de cálcio, vitamina D, ou ambos pode reduzir o risco para câncer do cólon e reto (WCRF 1997; COMA 1998; Wu et al., 2002). Há evidências de um efeito protetor do cálcio e vitamina D em neoplasias do cólon e reto em animais (Lipkin et al., 1999). Ratos expostos a uma dieta com deficiência em vitamina D por seis semanas apresentaram aumento da proliferação celular do cólon, e o desenvolvimento de carcinomas e adenomas (Mokady et al., 2000; Newmark, 1991).

1. 5) Carcinogênese do cólon e 1,2-dimetilhidrazina (DMH)

Em 1967, Druckrey et al. demonstraram que a administração parenteral de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) resultou no desenvolvimento de câncer, tanto no intestino delgado quanto no cólon de ratos (Druckrey et al., 1967). Todos os animais desenvolveram neoplasia e o cancerígeno mostrou-se seletivo em seus efeitos, pois foram encontradas somente neoplasias intestinais. A partir de então, a DMH tem sido amplamente utilizada em pesquisas de carcinogênese do cólon (Martin et al., 1973; Sunter et al., 1978).

A 1,2-dimetilhidrazina (DMH) é um composto químico genotóxico e um dos mais freqüentes agentes usados em modelos experimentais para a carcinogênese do cólon em roedores (Sunter et al., 1978; Ohno et al., 2001). É um cancerígeno completo, que atua nas fases de iniciação e promoção do câncer, capaz de induzir tumores no intestino delgado e no cólon com alto grau de seletividade (Thurnher et al., 1973). Para os experimentos de carcinogênese do cólon têm sido utilizadas preferencialmente a via subcutânea e intraperitoneal (Martin et al., 1973; Richards, 1977; Rubio et al., 1982). A DMH apresenta alta especificidade para a mucosa do cólon, induzindo grande número de tumores no cólon de roedores, semelhantes aos tumores de cólon humano (Martin et al., 1973; Richards, 1977; Rubio et al., 1982).

Sua ação genotóxica está relacionada com a metilação do material genético das células epiteliais do cólon (Lamont & O'Gorman, 1978). Esta iniciação pode ocorrer por duas vias. Após ser injetada subcutaneamente, a DMH é duplamente oxidada no fígado em axoximetano e posteriormente, em metilazoximetanol, o qual é conjugado ao ácido glicurônico e secretado pela bile. Ao atingir o intestino, sofre hidrolização por β -glicuronidases produzidas pelas bactérias intestinais formando novamente metilazoximetanol, que sofre oxidação convertendo na forma extremamente instável metilazoxiformaldeído. Este último sofre decomposição

formando finalmente o íon carbônio (Lamont & O’Gorman, 1978; Sohn et al., 1991; Weisburger, 1971). Alguns autores relatam que a DMH e seus metabólitos hepáticos podem ser transportados até as células epiteliais do cólon via corrente sanguínea, sem serem secretados via bile (Zedek et al., 1977). O íon carbônio reativo formado é capaz de metilar DNA, RNA ou proteínas de células epiteliais colônicas (Matsumoto & Higa, 1966). Além disso, a DMH produz aumento de radicais livres no sangue, fígado e cólon em modelos experimentais (Arutiunian et al., 1997).

Na **Figura 4** está demonstrado o esquema da biotransformação da DMH.

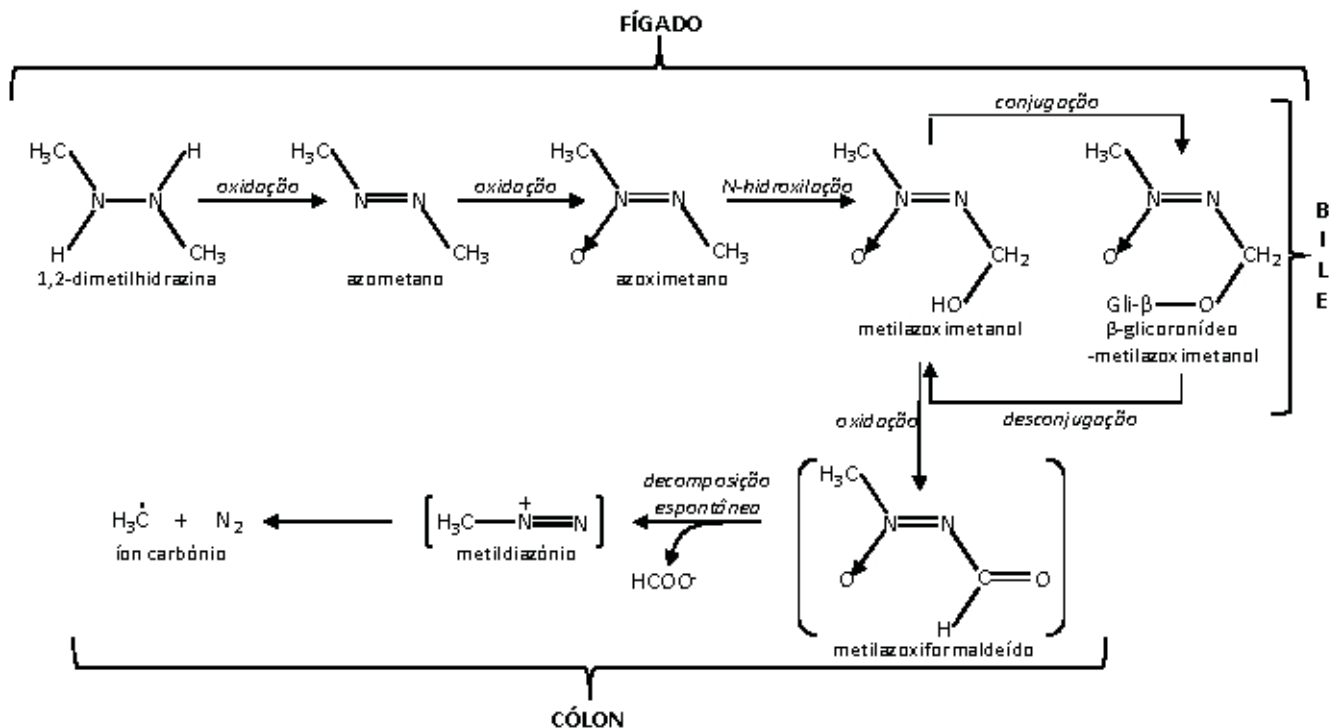


Figura 4- Esquema de biotransformação da 1,2-dimetilhidrazina

1. 6) Focos de criptas aberrantes (FCAs)

Entre os biomarcadores da carcinogênese do cólon destacam-se os de proliferação celular e os morfológicos, que correspondem a alterações estruturais precoces da mucosa do cólon, denominadas focos de criptas aberrantes (FCA). As criptas aberrantes (CA) foram primeiramente descritas por Bird (1987) no cólon de roedores tratados com cancerígenos químicos e, posteriormente em humanos, por Pretlow et al., (1991), no cólon de pacientes portadores de adenocarcinomas. As criptas aberrantes podem ser identificadas na mucosa do cólon, como únicas ou na forma de focos, sendo, então, designados de FCA (Tudek et al., 1989). Os FCA são observados com maior frequência no cólon médio e distal, tanto em roedores como no homem (Di Gregorio et al., 1997; Rodrigues et al., 2002). Em roedores, as criptas aberrantes são induzidas por compostos químicos genotóxicos e não genotóxicos (McLellan & Bird, 1988a,b; Bird, 1995; Whiteley et al., 1996). Os cancerígenos químicos mais utilizados para a indução de FCA no cólon de roedores são a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) ou seu metabólito, a azoximetano (AOM) (Rodrigues et al., 2002).

Os focos de criptas aberrantes (FCA) são considerados como lesões pré-neoplásicas induzidas por cancerígenos químicos no cólon de ratos (Tudek et al., 1989; Shamsuddin & Trump, 1981; Mc Lellan et al., 1991a) e camundongos (Mc lellan & Bird, 1988b; Bird, 1987). O modelo de câncer do cólon induzido pela DMH em roedores é uma ferramenta importante para se investigar a relação entre os FCAs e o câncer de cólon (Rodrigues et al., 2002). Tem sido proposto que o número total, a distribuição e a multiplicidade dos FCA correlacionam-se com a incidência de tumores do cólon (Tudek et al., 1989; Mc Lellan & Bird, 1988a,b; Bird, 1987, Magnuson et al., 1993). Esta relação parece não ser direta e depende de vários fatores, tais como componentes alimentares, capazes de interferir na indução ou na promoção dos FCA (Magnuson et al., 1993; Hardman et al., 1991).

Acredita-se que os FCA sejam a expressão morfológica de alterações da proliferação e diferenciação celular que ocorrem durante o processo de carcinogênese do cólon (Lamprecht & Lipkin, 2002). De fato, na mucosa do cólon de animais tratados com cancerígenos químicos, as criptas aberrantes são revestidas por células epiteliais com diferentes graus de maturação celular e displasia (Bird, 1995). Há trabalhos que demonstraram que os índices de proliferação celular são maiores nos FCA do que os da mucosa normal (Polyak et al., 1996; Shpitz et al., 1997). Além disso, foi observado que os FCA apresentam mudanças no padrão de atividade enzimática, como redução das taxas da hexosaminidase (Barrow et al., 1990; Pretlow et al., 1990, 1993) e da produção de mucinas, com aumento de sialomucinas e perda de sulfomucinas, fenômeno geralmente associado ao grau de displasia e multiplicidade das criptas (Sandforth et al., 1988; Uchida et al., 1997; Femia et al., 2004).

Foram observadas alterações genéticas nos FCAs, tais como mutações nos genes K-ras, APC e TP53, relacionadas à proliferação celular, presença de instabilidade de microsatélites, um marcador de erros no sistema de reparo do DNA e alterações em genes associados à inflamação tais como o INOS e COX-2 (Jen et al., 1994; Smith et al., 1994; Nucci et al., 1997; Takahashi & Wakabayashi, 2004). Os FCAs com maior grau de displasia podem apresentar acúmulo citoplasmático e nuclear de β -catenina, que é um marcador potencial de progressão neoplásica (Yamada et al., 2000, 2003; Hata et al., 2004).

Desta forma, os FCA detectados durante o processo de carcinogênese do cólon possivelmente correspondem à expressão, em nível morfológico, do desenvolvimento neoplásico, sendo, portanto, propostos como biomarcadores para testes de carcinogenicidade e anti-carcinogenicidade, neste órgão (McLellan et al., 1991a,b; Bird, 1995; Wargovich et al., 1996; Fenoglio-Preiser & Noffsinger, 1999; Schmelz et al., 2000), especialmente, quando associado à detecção de acúmulo de β -catenina (Yamada et al., 2000, 2003).

*I. 71 Referências Bibliográficas **

*UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. Editora Unesp. **Normas para publicações da Unesp**. São Paulo: Ed. Unesp, 1994. 4v., v.2: Referências Bibliográficas.

<i>I. 7) Referências bibliográficas</i>

- Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer*. 1975;15:617-631.
- Arutiunian AV, Prokopenko VM, Burmistrov SO, Oparina TI, Frolova EV, Zabezhinskii MA, et al. Free-radical processes in blood serum, liver and large bowel during 1,2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis in rats. *Vopr Onkol*. 1997;43:618-622.
- Baig LS, Peterson NW, Wehrli MW. Wnt signal transduction requires distinct initiation and amplification steps that both depend on Arrow. *LRP Dev Biol*. 2007;306:94-111.
- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2005;45:106-114.
- Barker DJP. Mothers, babies and health in later life. Context Book. Edinburg: Churchill Livingstone; 1998b.
- Barker DJP. Fetal and infant origins of adult disease. London: BMJ Books; 1992.
- Barrow BJ, O' Riordan MA, Stellato TA, Calkins BM, Pretlow TP. Enzyme-altered foci in colons of carcinogen-treated rats. *Cancer Res*. 1990;50:1911-1916.
- Bertram CE, Hanson MA. Animal models and programming of the metabolic syndrome. *Br Med Bull*. 2001;60:103-121.
- Bingham SA, Pignatelli B, Pollock JR, Ellul A, Malaveille C, Gross G, et al. Does increases endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *Carcinogenesis*. 1996;17:515-523.

- Bird RP. Observation and qualification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* 1987;37:147-151.
- Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.* 1995;93:55-71.
- Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implication for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad.* 1997; 94:3290-3295.
- Chen J, Giovannucci EL, Hunter DJ. MTHFR polymorphism, methyl-replete diets and the risk of colorectal carcinoma and adenoma among US men and women: an example of gene-environment interactions in colorectal tumorigenesis. *J Nutr.* 1999;129 (suppl): 560S-64S.
- Cox J, Williams S, Grove K, Lane RH, Aagaard-Tillery KM. A maternal high-fat diet is accompanied by alterations in the fetal primate metabolome. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;201:281.e1-9.
- Davison NA, Dobbing J. The developing brain. *Applied Neurochemistry.* 1968;1:253-286.
- Di Gregorio C, Losi L, Fante R, Modica S, Ghidoni M, Pedroni M, et al. Histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathol.* 1997;30:328-334.
- Dragan YP, Pitot HC. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *Faseb J.* 1991;5:2280-2286.
- Drake AJ, Walker BR. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *Journal of Endocrinology.* 2004;180:1-16.

- Druckrey H, Preussmann R, Matzkies F, Ivankovic S. Selective production of intestinal cancer in rats by 1,2-dimethylhydrazine. *Naturwissenschaften*. 1967;54:285-286.
- Femia AP, Dolara P, Caderni G. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoximethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2004;25:277-281.
- Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger A. Aberrant crypt foci: a review. *Toxicol Pathol*. 1999;27:632-642.
- Ferguson LR, Harris PJ, Hollands HJ, Robertson AM. Effects of bile salts on the adsorption of a hydrophobic mutagen to dietary fiber. *Mutation Res*. 1990;245:111-117.
- Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, et al. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med*. 1990;340:169-176.
- Garófalo A, Avesani CM, Camargo KG, Barros ME, Silva SRJ, Taddei JAAC, et al. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. *Rev Nutr*. 2004;17:491-505.
- Glade MJ. Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. *Nutrition*. 1999;15:523-526.
- Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15:183-187.
- Gooderham NJ, Murray S, Lynch AM, Yadollahi-Farsani M, Zhao K, Rich K, et al. Assessing human risk to heterocyclic amines. *Mutat Res*. 1997;376:53-60.

- Hague A, Elder DJ, Hicks DJ, Paraskeva C. Apoptosis in colorectal tumour cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. *Int J Cancer*. 1995; 60:400-406.
- Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992;35:595-601.
- Hanson MA, Gluckman PD. Developmental origins of health and disease: new insights. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008;102:90-93.
- Hardman WE, Cameron IL, Heitman DW, Contreras E. Demonstration of the need for end point validation of putative biomarkers: Failure of aberrant crypt foci to predict colon cancer incidence. *Cancer Res*. 1991;51:6388-6392.
- Hata K, Yamada Y, Kuno T, Hirose Y, Hara A, Qiang SH, et al. Tumor formation is correlated with expression of B-catenin-accumulated crypts in azoximethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Cancer Sci* 2004;95:316-320.
- Heindel JJ. Role of exposure to environmental chemicals in the developmental basis of disease and dysfunction. *Reprod Toxicol*. 2007;23:257-259.
- Herman JG. Epigenetic changes in cancer and preneoplasia. *Cold Spring Hard Symp Quant Biol*. 2005;70:329-333.
- Howe HL, Wingo PA, Thun MJ, Ries LA, Rosenberg HM, Feigal EG. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst*. 2001, 93:824-842.
- Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 15/11/2009.

- Jacobs DRJ, Marquart L, Slavin J, Kushi LH. Whole-grain intake and cancer: an expanded review and meta-analysis. *Nutr Cancer*. 1998;30:85-96.
- James SJ, Basnakian AG, Miller BJ. In vitro folate deficiency induces deoxynucleotide pool imbalance, apoptosis, and mutagenesis in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*. 1994; 19:5075-5080.
- Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ: Cancer Statistics, 2003. *CA Cancer J Clin*. 2003;53:5-26.
- Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B, et al. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res*. 1994;54:5523-5526.
- Kazerouni N, Sinha R, Hsu CH, Greenberg A, Rothman N. Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem Toxicol*. 2001;39:423-436.
- Key TJ, Fraser GE, Thorogood M, Appleby PN, Beral V, Reeves G, et al. Mortality in vegetarians and non-vegetarians: a collaborative analysis of 8300 deaths among 76,000 men and women in five prospective studies. *Public Health Nutr*. 1998;1:33-41.
- Khan N, Yahg K, Newmark H, Wong G, Telang N, Rivlin R, et al. Mammary duct epithelial cell proliferation and hyperplasia induced by a nutritional stress diet containing four components of a Western-style diet. *Carcinogenesis*. 1994;15:2645-2648.
- Lamont JT, O'Gorman TA. Experimental colon cancer. *Gastroenterology*. 1978;75:1157-1169.
- Lamprecht SA, Lipkin M. Migration colonic crypt epithelial cells: primary targets for transformation. *Carcinogenesis*. 2002;1777-1780.

- Langley-Evans SC. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc Nutr Soc.* 2001;60:505-513.
- Langley-Evans SC. Fetal nutrition and adult disease: Programming of chronic disease through fetal exposure to undernutrition. UK: CABI Publising; 2004.
- Lipkin M, Reddy B, Newmark H, Lamprecht SA. Dietary factors in human colorectal cancer. *Annu Rev Nutr.* 1999;19:545-586.
- Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 1991;156:38-50.
- Magnuson BA, Carr L, Bird RP. Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid. *Cancer Res.* 1993;53:4499-4504.
- Martin MS, Martin F, Michiels R, Bastien H, Justrabo E, Bordes M, et al. An experimental model for cancer of the colon and rectum. Intestinal carcinoma induced in the rat 1,2-dimethylhydrazine. *Digestion.* 1973;8:22-34.
- Matsumoto H, Higa HH. Studies on methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin: methylation of nucleic acids in vitro. *Biochem J.* 1966;98:20-22.
- McLellan EA, Bird RP. Specificity study to evaluate induction of aberrant crypts in murine colon. *Cancer Res.* 1988a;48:6183-6186.
- McLellan, EA, Bird RP. Aberrant crypts: potential preneoplastic lesion in the murine colon. *Cancer Res.* 1988b;48:6186-6192.
- McLellan, EA, Medlin A, Bird RP. Sequential analysis of the growth and morphological characteristics of aberrant of aberrant crypt foci: Putative preneoplastic lesions. *Cancer Res.* 1991a;51:5270-5274.

- McLellan EA, Medlin A, Bird RP. Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: Putative preneoplastic lesions in rat colon. *Carcinogenesis*. 1991b;12:2093-2098.
- McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity and programming. *Physiol Rev*. 2005;85:571-633.
- Michels KB, Giovannucci E, Joshipura KJ, Rosner BA, Stampfer MJ, Fuchs CS, et al. Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers. *Natl Cancer Inst*. 2000;92:1740-1752.
- Mokady E, Schwartz B, Shany S, Lamprecht SA. A protective role of dietary vitamin D3 in rat colon carcinogenesis. *Nutr Cancer*. 2000;38:65-73.
- Nagengast FM, Grubben MJ, Van Munster IP. Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer*. 1995;311:1067-1070.
- Negri E, D'Avanzo B, Tavani A. The role of vegetables and fruit in cancer risk. *J Carcinogenesis*; 1994:327-334.
- Newmark HL, Lipkin M, Maheshwari N. Colonic hyperplasia and hyperproliferation induced by a nutritional stress diet with four components of a Western-style diet. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82:491-496.
- Newmark HL, Lipkin M, Maheswari N. Colonic hyperproliferation induced in rats and mice by nutritional stress diets containing four components of human Western-style diet (Series 2). *Am J Clin Nutr*. 1991;54(suppl 1):209S-214S.

- Newmark HL, Yang K, Liplin M, Kopelovich L, Liu Y, Shinozaki H. A Western-style diet induces benign and malignant neoplasms in the colon of normal C56BL/6 mice, *Carcinogenesis*. 2001;22:1871-1875.
- Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E. Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2002;98:241-256.
- Nucci MR, Robinson CR, Longo P, Campbell P, Hamilton SR. Nucci MR, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci human colorectal mucosa. *Hum Pathol*. 1997;28:1396-407.
- Ohno K, Namshima S, Takeuchi S, Itoh K, Itoh T, Hioki K, et al. Effect of bacterial metabolism in the intestine on colorectal tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in transgenic mice harboring human prototype C-Haras genes. *J Exp Clin Can Res*. 2001;20:51-56.
- Ozane SE, Fernandez-Twinn D, Hales CN. Fetal growth and adult diseases. *Seminars in Perinatology*. 2004;28:81-87.
- Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*. 2001;2:533-543.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:74-108.
- Polyak K, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colon-rectal neoplasia. *Am J Pathol*. 1996;149:381-387.
- Potter JD, Steinmetz K. Vegetables, fruit and phytoestrogens as preventive agents. IARC Scientific Publication. 1996;139:61-90.

- Pretlow TP, O'Riordan MA, Kolman MF, Jurcisek JA. Colonic aberrant crypts in azoximethane-treated F334 rats have decreased hexosaminidase activity. *Am J Pathol.* 1990;136:13-26.
- Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG, Jurcisek JA, et al. Aberrant crypts: Putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res.* 1991;51:1564-1567.
- Pretlow TP, O'Riordan MA, Spancake KM, Pretlow TG. Two types of putative preneoplastic lesions identified by hexosaminidase activity in whole-mounts of colons from F344 rats treated with carcinogen. *Am J Pathol.* 1993;142:1695-1700.
- Richards TC. Early changes in the dynamics of crypts cell populations in mouse colon following administration of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res* 1977;37:1680-1685.
- Richter F, Newmark HL, Richter A, Leung D, Lipkin M. Inhibition of western-diet induced hyperproliferation and hyperplasia in mouse colon by two sources of calcium. *Carcinogenesis* 1995;16:2685-2689.
- Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weir HK, Rosenberg HM, et al. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973–1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer.* 2000;88:2398-2424.
- Risio M, Lipkin M, Newmark HL, Yang K, Rossini FP, Steele VE, et al. Apoptosis cell replication and Western-style diet-induced tumorigenesis in mouse colon. *Cancer Res.* 1996;56:4910-4916.
- Robbins SL. & Cotran RS. *Bases Patológicas das Doenças.* 7th ed. R.J: Guanabara koogan; 2005.

- Robien K, Ulrich CM. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview. *Am J Epidemiol.* 2003; 157: 571-582.
- Ross SA, Milner JA. Epigenetic modulation and cancer: effect of metabolic syndrome? *Am J Clin Nutr.* 2007;86(suppl):872S-7S.
- Rodrigues MA, Silva LA, Salvadori DM, De Camargo JL, Montenegro MR. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short-and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35:351-355.
- Rubio CA, Nylander G. Surgical resection of the rat colon: effects on carcinogenesis by 1,2-dimethylhydrazine. *J Natl Cancer Inst.* 1982;68:813-815.
- Rundle A. Carcinogen-DNA adducts as a biomarker for cancer risk. *Mutat Res.* 2006; 600:23-36.
- Sandforth F, Heimpel S, Balzer T, Gutschmidt S, Riecken EO. Characterization of stereomicroscopically identified preneoplastic lesions during dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis. *Eur J Clin Invest.* 1988;18:655-662.
- Schulte-Hermann R, Bursch W, Marian B, Grasl-Kraupp B. Active cell death (apoptosis) and cellular proliferation as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci. Publ.* 1999;146:273-85.
- Shamsuddin A, Trump BF. Colon Epithelium II. In vivo studies of colon carcinogenesis. Light microscopic, histochemical and ultrastructural studies of histogenesis of azoxymethane-induced colon carcinomas in Fisher F334 rats. *J Natl Cancer Inst.* 1981;66:389-401.

- Shpitz B, Bornstein Y, Mekori Y, Cohen R, Kaufman Z, Grankin M, et al. Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the human colon. *Am J Surg* 1997;174:425-430.
- Sinclair KD, Singh R. Modelling the developmental origins of health and disease in the early embryo. *Theriogenology*. 2007;67:43-53.
- Smith AJ, Stern HS, Penner M, Hay K, Mitri A, Bapat BV, et al. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res*. 1994;54:5527-5530.
- Sohn OS, Ishizaki H, Yang CS, Fiala ES. Metabolismo of azoxymethane, methylazoxymethanol and N-nitrosodimethylamine by cytochrome P450IIE1. *Carcinogenesis*. 1991;12:127-131.
- Sunter JP, Appleton DR, Wright NA, Watson AJ. Pathological features of the colonic tumours induced in rats by the administration of 1.2-dimethylhydrazine. *Virchows Arch B Cell Pathol*. 1978;21:211-223.
- Tacla M, Neves AJP. Tumores malignos colorretais. *Gastroenterologia Essencial*. 2001;2:341.
- Takahashi M, Wakabayashi K. Gene mutations and altered gene expression in azoximethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci*. 2004;95:475-480.
- Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L, et al. Fruit, vegetables, dietary fiber and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:525-533.

- Thurnherr N, Deschner EE, Stonehill EH, Lipkin M. Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res.* 1973;33:940-945.
- Tudek B, Bird RP, Bruce WR. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. *Cancer Res.* 1989;49:1236-1240.
- Uchida K, Kado S, Onoue M, Tohyama K. Relationship between the nature of mucus and crypt multiplicity in aberrant crypt foci in the rat colon. *J Cancer Res.* 1997;88:807-814.
- Ushijima T, Nakajima T, Maekita T. DNA methylation as a marker for the past and future. *J Gastroenterol.* 2006;41:401-407.
- Wargovich MJ, Chen C, Jimenez A, Steele VE, Velasco M, Stephens LC, et al. Aberrant crypts as a biomarker for colon cancer: evaluation of potential chemopreventive agents in the rat. *Cancer Epidemiol Biomarkers and Prev.* 1996;5:355-360.
- Watkins AJ, Fleming TP. Blastocyst environment and its influence on offspring cardiovascular health: the heart of the matter. *J Anatomy.* 2009;215:52-59.
- Weisburger JH. Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. *Cancer.* 1971. 28:60-70.
- Wells JCK. The thrifty phenotype hypothesis: thrifty offspring or thrifty mother? *J Theor Biol.* 2003;221:143-161.
- Wells JCK. The thrifty phenotype as an adaptative maternal effect. *Biol Rev.* 2007;82:143-172.

- Whiteley LO, Hudson LJR, Pretlow T. Aberrant crypt foci in the colonic mucosa of rats treated with a genotoxic and non-genotoxic colon carcinogen. *Toxicol Pathol.* 1996;24:681-689.
- Widdowson EM, McCance RA. Some effects of accelerating growth I. General somatic development. *Proc R Soc Ser.* 1960;152:188-206.
- Xiao R, Hennings LJ, Badger TM, Simmen FA. Fetal programming of colon cancer in adult rats: correlations with altered neonatal growth trajectory, circulating IGF-I and IGF binding proteins, and testosterone. *J Endocrinology.* 2007;195:79-87.
- Xue L, Yang K, Newmark H, Leung D, Lipkin M. Epithelial cell hyper-proliferation induced in the exocrine pancreas of mice by a Western-style diet. *J Natl Cancer Inst.* 1995;88:1586-1590.
- Xue L, Newmark HL, Yang K, Lipkin M. Model of mouse mammary gland hyperproliferation and hyperplasia induced by a Western-style diet. *Nutr Cancer.* 1996a; 26:281-287.
- Xue L, Yang K, Newmark H, Lipkin M. Induced hyperproliferation in epithelial cells of mouse prostate by a Western-style diet. *Carcinogenesis.* 1997;18:995-999.
- Xue L, Lipkin M, Newmark H, Wang J. Influence of dietary calcium and vitamin D on diet-induced epithelial cell hyperproliferation in mice. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:176-181.
- Yamada T, Takaoka AS, Naishiro Y, Hayashi R, Maruyama K., Maesawa C, et al. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* 2000;60:4761-4766.

- Yamada Y, Mori H. Pre-cancerous lesions of colorectal cancers in rodents: a new concept. *Carcinogenesis*. 2003;24:1015-1019.
- Yang K, Edelmann W, Fan KH, Lau K, Leung D, Newmark H, et al. Dietary modulation of carcinoma development in a mouse model for human familial adenomatous polyposis. *Cancer Res*. 1998;58:5713-5717.
- Yang K, Fan K, Shinozaki H, Newmark H, Edelmann W, Kucherlapati R, et al. Sulindac increases carcinoma development in the colons of mice with Apc mutations. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 1999;40:529.
- Yang K, Foodle R, Fan K, Edelmann W, Newmark H, Lau K, et al. Tumorigenesis induced by a germline mutation in the MCC gene. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 1997;38:354.
- Yoshike N, Matsumura Y, Iwawa M, Sugiyama M, Yamaguchi M. National Nutrition Survey in Japan, *J Epidemiol*. 1996;6:S189-200.
- Zedek MS, Grab DJ, Sternberg SS. Differences in the acute response of the various segments of rat intestine to treatment with the intestinal carcinogen methylazoxymethanol acetate. *Cancer Res*. 1977;37:32-36.
- Zeisel SH. Choline: Critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annu Rev Nutr*. 2006;26:229–250.

*II. Artigo **

* De acordo com as normas da revista **Carcinogenesis**

Maternal and Post-Weaning Western Diet Exposure Modifies Susceptibility to Development of Colon Carcinogenesis Induced by DMH in F1 Male Sprague-Dawley Pups

Gisele Aparecida Dionísio Lopes¹, Marcos Correa Dias¹, Luís Fernando Barbisan², Maria Aparecida Marchesan Rodrigues^{1,*}

¹Department of Pathology, Botucatu Medical School, UNESP - Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, 18603-970, Brazil

²Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP - Univ Estadual Paulista, SP, 18603-970, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Department of Pathology, Botucatu Medical School, UNESP - Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, 18603-970, Brazil. Tel/fax: + 55 14 38116238

Email: mariam@fmb.unesp.br (MAM Rodrigues).

Abstract

Colon cancer, which is considered to be a cancer of the elderly, may be influenced by dietary programming occurring during development. We examined the effects of a Western Style Diet (WD), high in fat (corn oil) (20%) and low in micronutrients [i.e.; folic acid (1 mg/g), choline (0.12%) and fiber (2%)] during pregnancy, lactation and post-weaning in order to examine the susceptibility to development of colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in male Sprague-Dawley (SD) rats. We evaluated whether WD reintroduction during adulthood can modify colon carcinogenesis susceptibility. WD was started at 12 days of pregnancy. F1 male pups were weaned (21d) and fed the WD until post-weaning (42d). Subsequently, they received a control diet (AIN-76A) until 70 days of age. At this point, they were given four subcutaneous injections of carcinogen DMH (40 mg/body weight). One group was reintroduced to WD during adulthood. Both the groups, fed on WD or control diet, were euthanized at the end of the 20th week (medium-term assay) and ACF (aberrant crypt foci) were stereoscopically and histologically scored for number, distribution and multiplicity along the colon. Maternal and post-weaning WD exposure decreased the susceptibility to development of ACF induced by DMH in the group with WD reintroduction during adulthood, which demonstrates WD reintroduction during adulthood recovers adaptative response programmed during fetal development by preparing the organism for its likely adult environment. These findings indicate that maternal and post-weaning WD exposure modifies the susceptibility to development of ACF induced by DMH in F1 male Sprague-Dawley pups.

Key-words: fetal programming, thrifty phenotype, western diet, colon cancer, aberrant crypt foci (ACF).

A exposição à dieta ocidental durante a gestação, lactação, fase juvenil modifica a susceptibilidade à carcinogênese química do cólon induzida pela DMH na primeira geração de descendentes em ratos machos Sprague-Dawley

Lopes GAD, Dias MC, Barbisan LF, Rodrigues MAM.

1) Resumo

O câncer do cólon, que é uma das principais neoplasias do mundo ocidental moderno, pode ter entre seus fatores moduladores a via de programação nutricional na fase fetal. Investigamos os efeitos da exposição à dieta ocidental, rica em gordura (óleo de milho) (20%) e pobre em micronutrientes [ácido fólico (1 mg/g), colina (0,12%) e fibra (2%)], durante a gestação, lactação e fase juvenil aumenta a susceptibilidade à carcinogênese do cólon pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em ratos machos Sprague-Dawley (SD). Avaliamos se a re-introdução da dieta ocidental durante a vida adulta em animais SD previamente expostos à dieta ocidental (vida intra-uterina, lactação e juvenil) modifica a susceptibilidade à carcinogênese do cólon pela DMH. Ratas fêmeas Sprague-Dawley (SD) prenhes foram tratadas com dieta semi-purificada do tipo Ocidental a partir do 12º dia gestacional (DG 12). Após o desmame (DPN 21), a prole de machos foi tratada com dieta Ocidental até o final da fase juvenil (DPN 42). Em seguida, foram tratados com dieta padrão (AIN-76A) até o DPN 70. Neste período, foram iniciados com quatro doses subcutâneas (s.c) de DMH (40 mg/kg). Um grupo foi reintroduzido à dieta Ocidental durante a vida adulta. Ambos os grupos, tratados com dieta padrão ou ocidental foram eutanasiados ao final da 20ª semana de experimento (estudo de média duração) e o cólon foi submetido à análise estereoscópica e histológica para detecção de FCA (focos de criptas aberrantes). Foram analisadas a incidência

e características das lesões pré-neoplásicas (FCA) do cólon. A exposição à dieta Ocidental durante a fase de gestação, lactação e fase juvenil diminuiu a susceptibilidade ao desenvolvimento de FCA induzidos pela DMH, quando reintroduzida durante a fase adulta, o que demonstra que a reintrodução da dieta Ocidental durante a fase adulta resgata uma resposta adaptativa programada durante o desenvolvimento fetal. Os resultados indicam que a exposição à dieta Ocidental modifica a susceptibilidade ao desenvolvimento de FCA induzido quimicamente na primeira geração de descendentes em ratos Sprague-Dawley.

Palavras-chave: programação fetal, fenótipo econômico, dieta ocidental, câncer do cólon, focos de criptas aberrantes (FCA).

2) Introdução

O câncer do cólon é um dos principais responsáveis pelas mortes por neoplasias malignas, principalmente em países do ocidente, e o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo (Parkin et al., 2001, 2005). Globalmente, este tipo de câncer é um importante problema de saúde e sua incidência tende a aumentar com a “ocidentalização” do padrão alimentar adotado pela população. (Ries et al., 2000; Howe et al., 2001).

Os focos de criptas aberrantes (FCA) são considerados como lesões pré-neoplásicas induzidas por cancerígenos químicos no cólon de ratos (Tudek et al., 1989; Shamsuddin & Trump, 1981; Mc Lellan et al., 1991a) e camundongos (Mc lellan & Bird, 1988a,b; Bird, 1987). O modelo de câncer do cólon induzido pela DMH em roedores é uma ferramenta importante para se investigar a relação entre os FCAs e câncer do cólon (Rodrigues et al., 2002). Tem sido proposto que o número total, a distribuição e a multiplicidade dos FCA correlacionam-se com a incidência de tumores do cólon (Tudek et al., 1989; Mc Lellan & Bird, 1988a,b; Bird, 1987; Magnuson et al., 1993). Esta relação parece não ser direta e depende de vários fatores, tais como componentes alimentares, capazes de interferir na indução ou na promoção dos FCA (Magnuson et al., 1993; Hardman et al., 1991).

A alimentação rica em gordura, com baixo teor de fibras e oligoelementos, designada dieta do tipo ocidental, tem sido há tempos fortemente associada ao aumento da incidência de câncer do cólon no homem (Armstrong & Doll, 1975). Por outro lado, a alimentação pobre em gordura, rica em fibras, vegetais e frutas parece proteger contra o desenvolvimento deste tipo de câncer (Negri et al., 1994). Newmark et al. (2001) demonstrou pela primeira vez a indução de tumores colônicos e intestinais através da dieta de estilo ocidental de Newmark (Newmark Western Diet) (NWD), rica em gordura e pobre em cálcio, vitamina D, ácido fólico, colina e fibras, após 18 semanas de exposição, na ausência de cancerígenos químicos.

Fatores adversos durante a vida fetal ou na primeira fase da infância podem predispor ou programar o indivíduo a predisposição a algumas doenças específicas na idade adulta (Barker, 1998; Langley-Evans, 2004). Este novo paradigma também sugere que a susceptibilidade a doenças, é resultado da influência da nutrição e da exposição ambiental a agentes tóxicos e ao estresse durante o período fetal e neonatal (Heindel, 2007). Estas incluem doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, diabetes do tipo II, doenças renais, doenças pulmonares crônicas obstrutivas, osteoporose, esquizofrenia, depressão, câncer de mama e síndrome dos ovários policísticos (Ozane et al., 2004).

O uso de modelos animais favoreceu o entendimento das relações entre modificações do ambiente materno e a saúde da prole ao longo da vida. A deficiência materna de vitamina B e metionina durante o período periconceitual em ovelhas induz a uma prole com maiores valores de peso e gordura corpóreas associados à hipertensão, com evidências de mudanças epigenéticas associadas com o perfil de metilação do DNA de muitos genes (Sinclair et al., 2007). Xial et al., (2007) demonstraram que o desenvolvimento de múltiplos tumores do cólon em roedores induzidos pelo azoximetano (AOM) possui um componente fetal via programação nutricional. Em macacos, a exposição materna a uma dieta rica em gordura foi associada a alterações epigenéticas e do perfil metabólico fetal (Cox et al., 2009).

Uma das consequências da programação fetal é a geração do fenótipo econômico. Em 1992, Hales & Barker propuseram a hipótese do fenótipo econômico (thrifty phenotype) como uma explicação para a associação entre o desenvolvimento inicial e doenças da vida adulta. O feto pode adaptar seu próprio desenvolvimento em resposta direta ao ambiente uterino, mediado por fatores como nutrição e fisiologia materna (Gluckman & Hanson, 2004; McMillen & Robinson, 2005; Hanson e Gluckman, 2008). A resposta à dieta materna permite que o feto faça ajustes no seu crescimento e metabolismo de forma que sua fisiologia e seu tamanho sejam compatíveis com a disponibilidade pós-natal de nutrientes sugeridas pelo

ambiente uterino. Se o ambiente é privado de nutrientes, o organismo se adapta a essa condição (Wells, 2003).

A hipótese do fenótipo econômico é uma plausível explicação para descrever a aparente associação entre o desenvolvimento inicial e doenças da vida adulta. Entretanto, é cada vez mais aceitável a importância da epigenética como via comum de interação entre os genes e fatores ambientais, como a dieta. Mudanças ocorridas durante as fases iniciais do desenvolvimento podem influenciar a predisposição a diversas doenças crônicas, como o câncer. Dessa forma, é cada vez mais cabível o conceito de que os processos epigenéticos programam o desenvolvimento e interagem com o ambiente nutricional uterino para influenciar doenças na vida adulta. A importância de que o mosaico epigenético pode ser modulado pelo ambiente nutricional uterino e como cada fenótipo dentro desse mosaico altera a susceptibilidade a doenças crônicas na vida adulta, demanda estudos adicionais (Ross & Milner, 2007). O fenótipo econômico refere-se à capacidade de todos os descendentes responderem a informações sobre o ambiente durante o desenvolvimento ontogenético inicial (Wells, 2007).

A investigação dos impactos da programação fetal sobre a fisiologia e saúde humana encontra-se em estágio inicial e não são conhecidos todos os agentes ou cenários intra-uterinos capazes de agir como insulto ou estímulo (Wells, 2003).

3) Objetivos

Considerando a hipótese de que o feto pode adaptar o seu desenvolvimento em resposta a modificações do ambiente uterino, e tendo em vista a escassez de estudos que relacionem os possíveis efeitos do padrão alimentar ocidental durante as fases de gestação e lactação e suas repercussões na prole para a vida adulta, tais como susceptibilidade ao câncer, torna-se de fundamental importância examinar as consequências dessa exposição precoce sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do cólon em ratos adultos. Considerando o padrão alimentar ocidental adotado pela população na vida adulta, o presente estudo tem os objetivos indicados a seguir:

3.1) *Objetivos específicos*

Investigar se a exposição precoce à dieta Ocidental durante a gestação, lactação e fase juvenil aumenta a susceptibilidade à oncogênese do cólon pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em ratos machos Sprague-Dawley (SD).

Avaliar se a re-introdução da dieta Ocidental durante a vida adulta em animais SD previamente expostos à dieta ocidental (vida intra-uterina, lactação e juvenil) modifica a susceptibilidade à oncogênese do cólon pela DMH.

3.2) *Objetivo geral*

Investigar se a exposição à dieta Ocidental durante a vida adulta interfere no desenvolvimento dos FCA induzidos pela DMH na mucosa do cólon em ratos machos SD.

4. Material e métodos

4.1) Animais e ambiente de experimentação (Biotério)

Ratos da linhagem Sprague-Dawley (SD), machos (n=15) e fêmeas (n=50) foram adquiridos no segundo semestre de 2008 do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Campinas – SP). Os machos e fêmeas foram instalados separadamente no Biotério da Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp até atingir a idade reprodutiva (12 semanas para machos e fêmeas). Foram mantidos cinco animais por gaiola de polipropileno de 41 x 34 x 16 cm, com tampa de aço inox na forma de grade e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada, sendo as trocas das gaiolas e da maravalha realizadas três vezes por semana (segundas, quartas, e sextas-feiras). Todos os animais receberam água filtrada e ração comercial (NUVILAB CR1 – NUVITAL, PR).

Após atingir a idade reprodutiva, duas fêmeas sexualmente virgens foram colocadas com um macho por gaiola por 12h (período escuro). A presença de espermatozoóides no esfregaço vaginal e identificação da fase estro do ciclo foi considerada como dia gestacional 0 (DG0). As fêmeas consideradas prenhes foram mantidas em gaiolas individuais com água e ração comercial (NUVILAB CR1 – NUVITAL, PR) *ad libitum* até o 12º dia gestacional (DG 12). A partir do DG 12 (final do período de organogênese), as fêmeas consideradas prenhes receberam dieta padrão ou Ocidental (HN & C – CONSULTORIA EM NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL) (**Tabela 1**).

A dieta Ocidental proposta no presente estudo teve como referência a dieta de estilo ocidental de Newmark (NWD) (Newmark et al., 2001), a qual foi delineada para simular o

padrão alimentar médio da população dos Estados Unidos. A densidade diária de nutrientes de 2000 kcal em humanos foi convertida pela densidade de nutrientes adequada para roedores.

A composição da dieta Ocidental proposta no presente estudo sofreu alterações quanto à porcentagem de vitamina D, fósforo, ácido fólico e DL-Metionina. A dieta padrão escolhida foi a AIN-76A, a mesma dieta padrão utilizada por Newmark et al. (2001). Segundo <http://www.testdiet.com/PDF/58B0.pdf> esta dieta pode ser modificada em estudos de deficiência.

A água filtrada foi oferecida em bebedouros de vidro com tampa de borracha e bico metálico, com capacidade para 500 ml. A água e a ração foram fornecidas *ad libitum*. Durante todo o experimento foram controladas as condições ambientais do biotério como: temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão contínua do ar.

Todos os procedimentos seguiram as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de Botucatu, protocolo nº 663/08 – CEEA (**Anexo**).

4.2) *Reagentes*

Como substância iniciadora do processo de carcinogênese do cólon foi utilizada a 1, 2-dimethilhidrazina (DMH, Sigma Chemical CO, Mo, EUA) em quatro doses de 40mg/kg via subcutânea (s.c). A DMH foi diluída em EDTA (veículo de diluição da DMH, 5ml/kg) no momento da aplicação. O manuseio e aplicação da DMH foram realizados mediante utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs) tais como aventais, luvas, touca, óculos de proteção e máscaras contra gases. O resíduo do cancerígeno foi neutralizado em solução saturada de NaOH e aparas de papel alumínio seguindo procedimento operacional padrão adotado no laboratório do Núcleo do Impacto Ambiental na Saúde Humana da Faculdade de Medicina de Botucatu (TOXICAM).

4.3) *Preparo das dietas padrão (AIN-76A) ou Ocidental*

As dietas padrão ou Ocidental foram adquiridas de HN & C - CONSULTORIA EM NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL sob a forma de pó. Ambas as dietas foram peletizadas manualmente no Dietário da Unidade Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu utilizando-se EPIs tais como aventais, luvas, touca, óculos de proteção e máscara. A ração em pó foi despejada em recipiente higienizado, sendo adicionada água aos poucos até dar “ponto de liga”. Após completa homogeneização e umidificação foi modelada manualmente em superfície protegida com papel manteiga (**Figura 1**). Em seguida foi acondicionada em embalagens de tecido (**Figura 2**) que foram lacradas e submetidas à secagem. A dieta não foi secada em estufa para evitar possível perda de suas propriedades com o aquecimento. A seguir a dieta foi acondicionada em sacos plásticos identificados e mantida sobre refrigeração (-5°C) até o momento do uso.

4.4) *Delineamento experimental*

Protocolo Experimental

O protocolo experimental está representado na **figura 3**.

Animais não iniciados com DMH e tratados com dieta Ocidental (delineamento gestacional)

Ratas fêmeas Sprague-Dawley (SD) prenhes foram expostas à dieta semi-purificada do tipo Ocidental *ad libitum* do 12º dia gestacional (DG 12) até o DPN 21 (final do período de amamentação). Após o desmame, a prole de machos foi dividida em dois grupos (grupos **G1** e **G2**) (n= 27) os quais receberam duas doses subcutâneas (s.c) de EDTA (veículo) no DPN 33 e 40. Ambos os grupos, tratados com dieta padrão ou Ocidental foram eutanasiados ao final do DPN 42 (estudo de curta duração).

Animais iniciados com DMH e expostos à dieta Ocidental durante a vida adulta (delineamento pós-gestacional)

Ratos machos Sprague-Dawley foram expostos à dieta semi-purificada padrão *ad libitum* nas fases de gestação, lactação e juvenil. A partir do DPN 70 foram iniciados com quatro doses subcutâneas (s.c) de DMH (40 mg/kg) e divididos em dois grupos (**grupos G3** e **G4**) (n=24). Os animais do **grupo G4** passaram a receber dieta ocidental. Os animais do **grupo G3** receberam dieta padrão durante todo o período. Ambos os grupos, tratados com dieta padrão ou Ocidental foram eutanasiados ao final da 20ª semana de experimento (estudo de média duração).

Animais iniciados com DMH e expostos à dieta Ocidental durante a gestação, lactação, fase juvenil e sua reintrodução na vida adulta (delineamento gestacional)

Ratas fêmeas Sprague-Dawley (SD) prenhes foram expostas à dieta semi-purificada do tipo Ocidental *ad libitum* do 12º dia gestacional (DG 12) até o DPN 21 (final do período de amamentação). Após o desmame, a prole de machos foi dividida em dois grupos (**G5** e **G6**) (n=30) os quais receberam dieta Padrão do DPN 42 até o DPN 70, quando foram iniciados com quatro doses subcutâneas (s.c) de DMH (40 mg/kg). O **grupo G6** foi reintroduzido à dieta Ocidental durante a vida adulta. O **grupo G5** continuou recebendo dieta padrão até o final do experimento. Ambos os grupos, tratados com dieta padrão ou Ocidental foram eutanasiados ao final da 20ª semana de experimento (estudo de média duração).

Acasalamentos

As fêmeas foram mantidas no Biotério até atingirem a idade reprodutiva (12 semanas). O período de aclimação foi de duas semanas no próprio ambiente experimental e os acasalamentos tiveram início em 22/09/2008.

Foram separados 15 machos que foram colocados em gaiolas individuais para o coito. 30 fêmeas sexualmente virgens foram separadas e colocadas duas por gaiola, totalizando 15 gaiolas com duas fêmeas/cada. Todos os animais receberam ração comercial e água filtrada *ad libitum*. Cada fêmea recebeu marcação provisória na cauda com uma caneta de ponta porosa com as seguintes cores: animal um (branco) e dois (azul).

O sistema de acasalamento utilizado foi o poligâmico, onde em cada gaiola com um macho foram colocadas duas fêmeas por 12 horas (período escuro), que foram retiradas na manhã seguinte. Logo pela manhã foi colhido esfregaço vaginal com um cotonete umedecido em solução salina 0,9% (**Figura 4**). Após coleta do material contendo as células epiteliais, foi feita análise citológica para identificação do ciclo reprodutivo (diestro, proestro, estro e metaestro) por análise dos esfregaços vaginais. O sucesso do acasalamento foi confirmado pela identificação de espermatozóides nos esfregaços vaginais e pela fase de estro. Esta data foi considerada como dia gestacional 0 (DG 0). Foram realizados no total, 14 acasalamentos.

Período gestacional

As fêmeas consideradas prenhes (n=34) foram separadas em gaiolas individuais no DG 0. Como este número de fêmeas prenhes foi suficiente, as fêmeas sexualmente virgens residuais foram doadas para outros experimentos.

Ao longo desse período as fêmeas prenhes passaram por avaliação clínica semanal e foi avaliada a evolução de peso corpóreo nos seguintes momentos do período gestacional: DG 0, DG 6, DG 9, DG 12, DG 15, DG18 e DG20. As 34 fêmeas prenhes foram mantidas em gaiolas identificadas com etiqueta quanto ao seu DG 0 (ex: prenhe dia 23/09/08 - Gaiola 1) e tratadas com ração comercial até o DG 12. A partir do DG 12 receberam ração Padrão ou Ocidental. Foram avaliados a evolução de peso corpóreo e o controle da ingestão de ração e água. O consumo de ração e água foi baseado na diferença de peso entre ração fornecida e residual e diferença entre os pesos dos bebedouros nos seguintes momentos do período gestacional: DG 0, DG 6, DG 9, DG 12, DG 15, DG18 e DG20.

Período Lactacional

Durante a lactação, foi avaliada a ingestão de ração e água das mães nos seguintes momentos do período pós-natal: DPN 3, DPN 6, DPN 9, DPN 12, DPN 15, DPN 18 e DPN 21. Os critérios de evolução de peso corpóreo da prole de machos e de perda de peso pelas mães lactantes foram registrados nos seguintes momentos do período lactacional: DPN 13 e DPN 21, a fim de se evitar manipulação excessiva e risco de precipitar comportamentos de canibalismo decorrentes de efeitos traumáticos nos filhotes.

A sexagem dos filhotes foi feita por comparação da distância anogenital (esta distância no macho é duas vezes maior do que na fêmea), observação da papila genital (saliente no macho) e identificação dos mamilos nas fêmeas, que se tornam visíveis por volta de uma semana de vida. Antes de qualquer manipulação dos filhotes, as luvas foram esfregadas em maravalha da gaiola do animal (evitando desfazer o ninho) e só então os filhotes foram apanhados de forma rápida e suave. Esses cuidados foram tomados para que a mãe não

rejeitasse o filhote ao retorná-lo para a gaiola devido ao odor estranho da mão do manipulador.

Foram mantidos oito filhotes por gaiola com a mãe (seis machos+duas fêmeas) de modo a garantir disponibilidade de alimento igualitária entre todos os filhotes. Os filhotes excedentes foram doados para outros experimentos.

A sexagem e redução do número de filhotes por gaiola foi realizada no DPN 11, e os critérios de peso corpóreo dos filhotes foram registrados a partir do DPN 11 até o DPN 21. Os oito filhotes foram mantidos em gaiolas individuais com as mães até a idade do desmame quando foram separados para experimentação. As mães foram encaminhadas para eutanásia.

Após o desmame, a prole de fêmeas (n=25) foi separada para um estudo de susceptibilidade à carcinogênese química mamária em colaboração com o Prof^o. Dr^o. Luís Fernando Barbisan (Departamento de Morfologia do IBB/UNESP), o que explica a escolha da linhagem Sprague-Dawley. Um projeto de Iniciação Científica foi desenvolvido e este experimento com a prole de fêmeas encontra-se em andamento (bolsa PIBIC/CNPQ 107517/2009-4).

A prole de machos (n= 84) foi separada para o presente estudo de susceptibilidade à carcinogênese química do cólon. Neste estudo de susceptibilidade, após randomização, a prole de machos derivados de 23 mães (n= 23 fêmeas prenhes) tratadas com dieta padrão ou do tipo Ocidental, foi distribuída nos diferentes grupos experimentais compostos por dois a três irmãos de cada ninhada. Em cada gaiola dos diferentes grupos experimentais foi preservada uma etiqueta para identificar a prole de machos e sua respectiva mãe [ex: mãe prenhe 23/09/08 gaiola 1 - prole: animal um (branco) e dois (cauda)] a fim de facilitar a análise dos dados quantitativos do período gestacional e lactacional.

Os grupos **G1** totalizaram n=12 machos derivados da gestação das fêmeas, o **G2** n=15 machos derivados da gestação das fêmeas, **G5** e **G6** totalizaram n=15 machos derivados da gestação das fêmeas cada e os grupos **G3** e **G4** totalizaram n=12 machos derivados da gestação das fêmeas cada, contendo duas gaiolas com cinco animais e uma gaiola com dois animais cada grupo, identificados com ácido pícrico (2,0 %) da seguinte maneira: o animal branco correspondia ao número um, a marcação (mancha) na cauda o número dois, na cabeça o três, na pata dianteira o quatro e na pata traseira o cinco. Esta marcação foi mantida durante toda a fase de experimentação.

Fase Juvenil e Adulta

Durante a fase juvenil e adulta, a ingestão de ração e água da prole de machos foi avaliada três vezes por semana. Os critérios de evolução de peso corpóreo foram registrados mensalmente.

Nos DPNs 33 e 40, os animais dos grupos **G1** e **G2** receberam duas doses subcutâneas (s.c) de EDTA (veículo). Ambos os grupos, tratados com dieta padrão ou Ocidental foram eutanasiados ao final do DPN 42 (estudo de curta duração).

No DPN 70, os animais foram iniciados com quatro doses subcutâneas de DMH (grupos **G3**, **G4**, **G5** e **G6**). Ambos os grupos, tratados com dieta padrão ou Ocidental foram eutanasiados ao final da 20ª semana de experimento (estudo de média duração).

4.5) *Eutanásia, processamento do cólon e quantificação de FCA*

Imediatamente após a anestesia com pentobarbital sódico (45 mg/Kg de p.c., i.p.), em cada animal foi feita incisão na face ventral ao longo da linha média, da região púbica até o processo xifóide. Os músculos do abdômen e pelve foram rebatidos lateralmente expondo todos os órgãos abdominais do animal sendo então realizado abertura do diafragma seguida da incisão da veia cava caudal.

O osso púbico foi seccionado, expondo o reto e, então, o cólon inteiro foi removido. Após a ligação na região do cólon proximal adjacente ao ceco, foi injetada solução de NaCl 0,9% no seu interior para a retirada dos resíduos fecais. Com uma tesoura procedeu-se a incisão da parede longitudinalmente na linha mesentérica no sentido cólon proximal/reto.

O cólon de cada animal foi identificado, estirado e preso por alfinetes em prancha de isopor 7x10 cm e mergulhados em formalina a 10% tamponada por 24 horas. Posteriormente foram lavados em água por 12 horas e mantidos em álcool 70% até o momento de sua análise.

Para a contagem de focos de criptas aberrantes (FCA), os cólons foram retirados do álcool 70%, lavados em água corrente e, subsequentemente, corados em solução de azul de metileno a 0,2% em PBS por aproximadamente 2 minutos (**Figura 5**).

O cólon foi cortado com uma navalha nas porções distal, medial e proximal, e cada porção foi colocada sobre uma lâmina (**Figura 6**). As criptas aberrantes (CA) e os FCA foram analisados em microscópio de luz convencional no aumento final de 40x (Axiostar plus, Zeiss). A identificação das CA e FCA foi baseada em seus aspectos morfológicos diferenciais segundo Bird (1995), Bird & Good (2000) e Rodrigues et al. (2002): 1) tamanho aumentado e aspecto mais corado (camada de células epiteliais mais espessa) em plano diferente (mais elevado) das criptas intestinais normais circunjacentes; 2) abertura das criptas de aspecto

alterado (circular a alongada, elíptica ou tortuosa); 3) CAs isoladas ou em focos, e estes os chamados FCA ocupam área maior que a ocupada por um número equivalente de criptas morfológicamente normais. Não existem criptas de morfologia normal entre as criptas aberrantes dentro desses focos.

Foram quantificados os FCAs com 1, 2, 3, 4 ou mais criptas aberrantes, além de número total de CAs, número total de FCAs por segmento de cólon analisado. Foram analisados pela varredura de todo o cólon, sendo padronizado o sentido de análise (sentido cólon distal-cólon proximal).

Posteriormente à análise dos FCA, o cólon proximal e distal foi descartado, pois não apresentou número de FCAs que justificasse seu processamento histológico. O cólon dos animais iniciados foi cortado com uma preparação “em face”, fornecendo uma vista de criptas colônicas cortadas transversalmente para identificação e quantificação dos FCAs, resultando em um total de três fragmentos de cólon medial para cada animal (M1, M2 e M3). Todos os fragmentos foram colocados em cassetes plásticos, identificados e, então processados para a obtenção de cortes histológicos em coloração de hematoxilina-eosina (HE).

4.6) *Processamento histológico*

Ao sair do álcool 70%, os fragmentos do cólon foram desidratados em banhos sucessivos em álcool 85%, álcool 95% e álcool absoluto (3 vezes) por uma hora cada. Os tecidos foram diafanizados em xilol I, II e III e banhados em parafina I, II e III por uma hora cada reagente. Nessa etapa utilizou-se um processador automático de tecidos (LEICA TP 1020, Alemanha). Após o processamento inicial, o material foi emblocado em parafina à 60°C no autoinfusor (LEICA EG 1160, Alemanha).

Cortes histológicos de espessura entre 4 a 6 μm foram obtidos em micrótomo (LEICA RM 2145, Alemanha). Estes foram colocados sobre lâminas codificadas e, então, levadas para estufa (FAMEN 002 CB, Brasil) à 60°C por 24 horas, a fim de se obter maior adesão dos cortes histológicos às lâminas. Em seguida, as lâminas foram colocadas em suporte.

Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE)

Para a coloração de HE, as lâminas passaram pelas seguintes etapas: bateria de hidratação (xilol I, II e III por 5 minutos em cada; álcool absoluto I, II e III por 8 segundos cada passagem; água corrente), lavagem em água corrente, hematoxilina de Harris por 5 minutos, diferenciador por 8 segundos, água amoniacal 8 segundos, álcool absoluto por 8 segundos e eosina por 2 minutos e bateria de desidratação (álcool I, II, III, IV e V por 8 segundos cada passagem). Todos os reagentes utilizados na coloração foram obtidos da Merck (Alemanha).

Terminada a coloração, as lâminas foram transferidas para outro suporte e levadas para a montagem automática (LEICA CV 5000, Alemanha) de lamínulas (24x32mm) em meio Permount (FISHER, EUA). Após montagem, as lâminas histológicas foram rotuladas e identificadas.

4.7) Análise histológica

Os critérios utilizados para definição e classificação histológica de lesões pré-neoplásicas do cólon foram segundo o descrito por Tunusov & Mohr (1994).

4.8) *Análise estatística*

A análise estatística de todos os parâmetros analisados foi feita através do uso do programa estatístico SPSS for Windows 13.0. Os dados de peso corpóreo, o consumo de ração e água foram comparados entre os diferentes grupos experimentais utilizando-se testes de ANOVA ou Kruskal-Wallis. A análise da incidência e multiplicidade de lesões neoplásicas foi comparada entre os diferentes grupos experimentais utilizando-se o teste T de Student. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

5) Resultados

5.1) *Observações de biotério*

As diretrizes experimentais empregadas tais como: manutenção em biotério e tratamento com dieta Ocidental durante o período gestacional e lactacional, foram bem aceitas pelos animais. As fêmeas prenhes mostraram-se aparentemente saudáveis ao longo da gestação e lactação. Não foi observada perda de animais ao longo da fase de adaptação. Durante a fase de experimentação, tanto uma fêmea prenhe tratada com dieta padrão quanto uma tratada com dieta Ocidental vieram a óbito no DG 10.

5.2) *Exposição gestacional*

A gestação das fêmeas tratadas com dieta padrão ou Ocidental durou 23 dias, e o parto ocorreu predominantemente durante o período diurno. O tamanho da ninhada foi de cinco a quinze nas fêmeas prenhes tratadas com dieta padrão, e de três a dezesseis nas fêmeas prenhes tratadas com dieta Ocidental.

Uma fêmea prenhe tratada com dieta Ocidental desenvolveu um tumor abdominal espontâneo durante a fase de gestação. O tamanho desta ninhada foi de três animais, os quais foram descartados por se apresentarem debilitados.

As fêmeas prenhes tratadas com dieta padrão (n=11) aproveitadas no estudo somaram um total de 110 filhotes, sendo 56 machos e 54 fêmeas, enquanto as fêmeas prenhes tratadas com dieta Ocidental (n=12) aproveitadas no estudo somaram um total de 127 filhotes, sendo 71 machos e 56 fêmeas.

5.2.1) *Consumo de água e ração, peso corpóreo e razão sexual*

A **Tabela 2** indica os valores de média e desvio-padrão do consumo médio de ração (g/rato/dia) e líquidos (ml/rato/dia), peso corpóreo final e ganho de peso das fêmeas prenhes expostas à dieta padrão ou Ocidental durante a fase de gestação, além de indicar a razão sexual (número de fêmeas dividido pelo número de machos). Não houve diferença significativa entre o consumo de ração e líquidos em relação ao peso corpóreo entre os dois tratamentos.

5.3) *Exposição lactacional*

A manutenção em biotério e tratamento com dieta Ocidental durante o período lactacional foi bem aceita pelos animais. As fêmeas lactantes mostraram-se aparentemente saudáveis ao longo da lactação.

O crescimento da pelugem foi mais lento na prole que recebeu dieta Ocidental, e esta também exibiu comportamento de desarranjo do ninho quando comparado ao grupo que recebeu dieta padrão (**Figuras 7 e 8**). Os animais de ambos os grupos se mostraram ativos.

5.3.1) *Consumo de água e ração e peso corpóreo*

A **tabela 3** indica os valores de média e desvio-padrão do consumo estimado de ração basal (g/rato/dia) e líquidos (ml/rato/dia), perda de peso das fêmeas lactantes e ganho de peso corpóreo da prole de machos, expostos à dieta padrão ou Ocidental durante a fase de lactação.

As fêmeas lactantes expostas à dieta Ocidental apresentaram valores médios de consumo de ração menores que as que receberam dieta padrão ($p=0,0015$). É possível

observar que houve perda fisiológica de peso corpóreo nas fêmeas lactantes de ambos os tratamentos durante esta fase.

A prole de machos expostas à dieta Ocidental apresentou valores médios de ganho de peso corpóreos menores quando comparados aos que receberam dieta padrão ($p=0,0013$).

5.4) *Exposição fase juvenil e vida adulta*

5.4.1) *Consumo de ração e evolução de peso corpóreo*

A **tabela 4** indica os valores de média e desvio-padrão do consumo estimado de ração basal (g/rato/dia) pela prole de machos dos grupos **G1 e G2** (animais não iniciados), do DPN 21 ao DPN 42 (final da fase juvenil).

A prole de machos exposta à dieta Ocidental (**G2**) apresentou valores médios de consumo de ração menores ($p=0,001$) e peso corpóreo final menor ($p=0,01$) quando comparado ao grupo que recebeu dieta padrão (**G1**).

A **Tabela 5** indica os valores de média e desvio-padrão do consumo estimado de ração basal (g/rato/dia) e a **Tabela 6** a evolução do peso corpóreo pela prole de machos dos grupos **G3, G4, G5 e G6** (animais iniciados), do DPN 21 ao DPN 140. Uma diferença significativa no consumo de ração e evolução do peso corpóreo foi observada ao longo do tempo entre os grupos que foram expostos à dieta Ocidental durante a gestação, lactação, fase juvenil (**G5**) e entre o grupo que sofreu reintrodução da dieta Ocidental na vida adulta (**G6**), quando comparados ao grupo que recebeu dieta padrão desde a vida fetal ao DPN 140 (**G3**) e ao grupo que recebeu dieta padrão da vida fetal ao DPN 70, e foi introduzido à dieta Ocidental na vida adulta (**G4**), respectivamente.

5.5) *Óbito de animais no período experimental*

Entre os intervalos de administração das quatro doses de DMH, foram a óbito dois animais tratados com dieta do tipo Ocidental (**G5** e **G6**, respectivamente), e três animais tratados com dieta padrão (um do grupo **G3** e dois do grupo **G4**) (**Figura 9**). Os animais foram encontrados em estágio avançado de autólise, por isso a causa de morte não pode ser diagnosticada.

5.6) *Análise quantitativa de focos de criptas aberrantes detectados estereoscopicamente pela coloração de azul de metileno (FCA)*

A **Tabela 7** indica os valores de média e desvio-padrão dos parâmetros de avaliação de FCA no cólon dos animais dos grupos **G3**, **G4**, **G5** e **G6** detectados estereoscopicamente pela coloração de azul de metileno (**Figura 10**), ao final da fase experimental.

Em relação ao grupo **G4**, a exposição à dieta ocidental durante a fase adulta aumentou significativamente o número de criptas aberrantes (CA) totais ($p=0,05$), FCA de 1 a 3 CA ($p=0,05$), e os FCA totais por cólon ($p=0,04$) induzidos pela DMH, quando comparado ao grupo que foi exposto à dieta padrão desde a vida fetal até 20 semanas de experimento (**G3**). Embora fosse observado aumento no número de FCA ≥ 4 CA, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,19$).

Em relação ao grupo **G5**, a exposição à dieta ocidental durante a gestação, lactação e fase juvenil aumentou significativamente o número de FCA ≥ 4 CA ($p=0,05$) induzidos pela DMH, quando comparado ao grupo que foi exposto à dieta padrão desde a vida fetal até 20 semanas de experimento (**G3**).

Em relação ao grupo **G6 e G3**, o número e multiplicidade de lesões foram menores nestes grupos quando comparados ao grupo **G4** (exposição à dieta ocidental durante a fase adulta) e **G5** (exposição à dieta ocidental durante a gestação, lactação e fase juvenil).

Nenhuma lesão pré-neoplásica foi diagnosticada em animais não iniciados pela DMH grupos (**G1 e G2**).

5.7) Análise quantitativa de focos de criptas aberrantes (FCA) detectados histologicamente pela coloração de hematoxilina-eosina (HE)

A **Tabela 8** indica os valores de média e desvio-padrão dos parâmetros de avaliação de FCA no cólon dos animais dos grupos **G3, G4, G5 e G6** detectados histologicamente pela coloração de hematoxilina-eosina (**Figura 11**), ao final da fase experimental.

Em relação ao grupo **G4**, a análise da histologia do cólon corroborou que a exposição à dieta ocidental durante a fase adulta aumentou significativamente o número de CA total ($p=0,01$) e FCA totais por cólon ($p=0,03$). Além disso, essa exposição aumentou o número de $FCA \geq 4$ CA ($p=0,01$) e CA/FCA ($p=0,05$), induzidos pela DMH, quando comparado ao grupo que foi exposto à dieta padrão desde a vida fetal até 20 semanas de experimento (**G3**).

Em relação ao grupo **G5** (exposição à dieta ocidental durante a gestação, lactação e fase juvenil), embora sem diferença significativa, o número e a multiplicidade de FCA foram maiores, quando comparado ao **G3** (exposto à dieta padrão desde a vida fetal até 20 semanas de experimento).

Em relação ao grupo **G6**, a análise da histologia do cólon demonstra que a reintrodução à dieta Ocidental durante a fase adulta diminuiu significativamente o número de CA total ($p=0,01$) e FCA total por cólon ($p=0,01$). Além disso, essa exposição

significativamente os FCA de 1 a 3 ($p=0,01$) e $FCA \geq 4$ CA ($p=0,03$), induzidos pela DMH, quando comparado ao grupo que foi exposto à dieta Ocidental somente na fase adulta (**G4**).

Em relação ao grupo **G6 e G3**, o número e multiplicidade de lesões foram menores nestes grupos quando comparados ao grupo **G4** (exposição à dieta ocidental durante a fase adulta) e **G5** (exposição à dieta ocidental durante a gestação, lactação e fase juvenil).

Nenhuma lesão pré-neoplásica foi diagnosticada em animais não iniciados pela DMH grupos (**G1 e G2**).

5.8) Graus de displasia das lesões pré-neoplásicas

A **Tabela 9** indica os valores de média e desvio-padrão dos parâmetros de graus de displasia na mucosa do cólon dos animais dos grupos **G3, G4, G5 e G6** detectados histologicamente pela coloração de hematoxilina-eosina, ao final da fase experimental.

Em relação ao grupo **G4**, a exposição à dieta ocidental durante a vida adulta aumentou significativamente o número médio de lesões com displasia de alto grau na mucosa do cólon de roedores iniciados pela DMH, quando comparado ao grupo exposto à dieta padrão desde a vida fetal até 20 semanas de experimento (**G3**) ($p<0,001$).

Em relação ao grupo **G5** (exposição à dieta ocidental durante a gestação, lactação e fase juvenil), embora sem diferença significativa, o número médio de lesões com displasia de baixo grau e de alto grau foram maiores, quando comparado ao **G3** (exposto à dieta padrão desde a vida fetal até 20 semanas de experimento).

Em relação ao grupo **G6**, a reintrodução da dieta Ocidental na vida adulta, (animais previamente expostos durante a vida intra-uterina, lactação e fase juvenil) o número médio de lesões displásicas de alto grau ($p=0,0001$) e de baixo grau ($p=0,004$), diminuiu

significativamente quando comparado ao grupo ao grupo que foi exposto à dieta Ocidental somente na fase adulta (**G4**).

Em relação ao grupo **G6 e G3**, o número médio de lesões displásicas de baixo e de alto grau foram menores quando comparados ao grupo **G4** (exposição à dieta ocidental durante a fase adulta) e **G5** (exposição à dieta ocidental durante a gestação, lactação e fase juvenil).

6) *Discussão*

O termo “programação fetal” foi empregado pela primeira vez por Lucas (1991). A hipótese de programação fetal descreve o processo pelo qual um estímulo ou injúria durante períodos críticos do desenvolvimento e crescimento podem alterar permanentemente estruturas e funções teciduais (Lucas, 1991). Dessa maneira, o feto pode ser programado durante a embriogênese para desenvolver doenças na vida adulta (Langley-Evans, 2004). Décadas mais tarde, os efeitos da programação podem ser refletidos por adaptações irreversíveis que acarretam mal funcionamento de um órgão e diminuição na longevidade. (Lucas, 1991).

A programação pode determinar de forma profunda o perfil da saúde e as doenças que irão acometer um indivíduo ao longo de sua vida (Wells, 2003). Este novo paradigma também sugere que a susceptibilidade a doenças, incluindo disfunções reprodutivas, é resultado da influência da nutrição e da exposição ambiental a agentes tóxicos e ao estresse durante o período fetal e neonatal (Heindel, 2007).

Uma das consequências da programação fetal é a geração do fenótipo econômico. Em 1992, Hales & Barker propuseram a hipótese do fenótipo econômico (thrifty phenotype) como explicação para a associação entre o desenvolvimento inicial e doenças da vida adulta. O feto pode adaptar seu próprio desenvolvimento em resposta direta ao ambiente uterino, mediado por fatores como nutrição materna (redução do conteúdo protéico, restrição alimentar global ou menor consumo de calorias) e fisiologia (Gluckman & Hanson, 2004; McMillen & Robinson, 2005; Hanson e Gluckman, 2008). A resposta à dieta materna permite que o feto faça ajustes no seu crescimento e metabolismo de forma que sua morfofisiologia e seu tamanho sejam compatíveis com a disponibilidade pós-natal de nutrientes sugeridas pelo ambiente uterino. Se o ambiente é privado de nutrientes, o organismo se adapta a essa

condição (Wells, 2003). A hipótese do fenótipo econômico propõe que condições adversas nas fases iniciais do desenvolvimento levam a alterações metabólicas e fisiológicas que promovem a sobrevivência do organismo, selecionando uma via de crescimento adequado a ambiente. Recentemente, alguns autores têm proposto que o fenótipo econômico também é adaptável à longo prazo, preparando o organismo para a vida adulta (Wells, 2007).

O conceito de fenótipo econômico refere-se, portanto à capacidade de todos os descendentes responderem a informações sobre o ambiente durante o desenvolvimento ontogenético inicial (Wells, 2007).

Esta hipótese nos estimulou a investigar os possíveis efeitos do padrão alimentar ocidental (rico em gordura e pobre em fibras, folato e colina) durante as fases de gestação, lactação, fase juvenil e suas repercussões na prole para a vida adulta, tais como a susceptibilidade ao câncer do cólon, induzido quimicamente em ratos machos.

Globalmente, este tipo de câncer é um importante problema de saúde e sua incidência tende a aumentar com a “ocidentalização” do padrão alimentar adotado pela população moderna. (Ries et al., 2000; Howe et al., 2001).

Dentre os inúmeros modelos experimentais usados para o estudo do processo de carcinogênese do cólon, destacam-se os que avaliam alterações estruturais precoces da mucosa do cólon, sendo bastante aceitas as lesões pré-neoplásicas denominadas focos de criptas aberrantes (FCA) (Cheng & Lai, 2003; Shiptz et al., 1996). Nos modelos de curta e média duração, FCAs são observados após iniciação com carcinógenos conhecidos, como a 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e seu metabólito azoximetano (AOM) (Bird 1987; Rodrigues et al., 2002). Após ser injetada subcutaneamente, a DMH é convertida no fígado em AOM e metilazoximetanol, o qual é conjugado ao ácido glicurônico e secretado pela bile, sendo hidrolizado por β -glicuronidases bacterianas e, finalmente formando o íon carbônio, responsável pela etapa de iniciação (Lamont & O’Gorman, 1978; Sohn et al., 1991;

Weisburger, 1971). Tem sido proposto que o número total, a distribuição e a multiplicidade dos FCA correlacionam-se com a incidência de tumores do cólon (Tudek et al., 1989; McLellan & Bird, 1988a,b; Bird, 1987; Magnuson et al., 1993). Esta relação parece não ser direta e depende de vários fatores, tais como componentes alimentares, capazes de interferir na indução ou na promoção dos FCA (Magnuson et al., 1993; Hardman et al., 1991).

Dessa maneira, a exposição ao padrão alimentar ocidental adotado pela população durante a vida adulta nos estimulou a investigar sua possível relação com o desenvolvimento dos FCA induzidos pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH) na mucosa do cólon em ratos machos.

Nossos resultados demonstram que a exposição à dieta Ocidental durante a fase de gestação não alterou o consumo médio de ração, não alterou o peso corpóreo médio e o ganho de peso corpóreo das fêmeas prenhes quando comparado as fêmeas tratadas com dieta padrão.

Durante a fase de lactação, houve perda fisiológica de peso corpóreo nas fêmeas lactantes de ambos os tratamentos. As fêmeas prenhes expostas à dieta Ocidental apresentaram valores médios de consumo de ração menores que as fêmeas que receberam dieta padrão, enquanto a prole de machos exposta à dieta Ocidental apresentou valores médios de ganho de peso corpóreos menores quando comparados aos que receberam dieta padrão. Esses resultados podem ser atribuídos à sensação de saciedade proporcionada pela dieta hiperlipídica.

Na fase juvenil, a parcela da prole de machos exposta à dieta Ocidental desde a vida intra-uterina até ao DPN 42 (**G2**) apresentou valores médios de consumo de ração menores e valores de peso corpóreos finais menores, quando comparados ao grupo que recebeu dieta padrão (**G1**) (animais não iniciados), atribuídos à sensação de saciedade proporcionada pela dieta hiperlipídica. Observamos que em roedores, uma dieta rica em gordura e pobre em ácido fólico, fibra e colina, induz a diminuição do peso corpóreo, respectivamente.

Na fase juvenil e vida adulta, a parcela da prole de machos dos grupos **G5** (expostos à dieta ocidental na vida intra-uterina, lactação e fase juvenil) e **G6** (animais previamente expostos à dieta ocidental durante a gestação, lactação, fase juvenil e sua reintrodução na vida adulta), o consumo médio de ração foi menor no primeiro e no segundo mês de exposição quando comparados ao grupo **G3** (exposto à dieta padrão desde a vida fetal até 20 semanas de experimento) e **G4** (exposição à dieta ocidental durante a fase adulta). A partir do terceiro mês, o consumo médio de ração foi equivalente nos quatro grupos experimentais, o que fundamenta a hipótese da adaptabilidade ao fenótipo econômico, descrita por Wells (2003): se o ambiente é privado de nutrientes, o organismo se adapta a essa condição. A hipótese do fenótipo econômico propõe que condições adversas nas fases iniciais do desenvolvimento levam a alterações metabólicas e fisiológicas que garantem a sobrevivência do organismo, selecionando uma via de crescimento adequado. Quanto aos critérios de peso corpóreo médio, a evolução foi menor no primeiro e no segundo mês de exposição, o que também fundamenta a hipótese da adaptabilidade ao fenótipo econômico descrita por Wells, 2003.

Em relação à análise quantitativa de focos de criptas aberrantes (FCAs) detectados estereoscopicamente pela coloração de azul de metileno, a exposição à dieta Ocidental durante a fase de gestação, lactação e fase juvenil aumentou significativamente a multiplicidade de criptas nos FCA induzidos pela DMH no grupo **G5** quando comparado ao **G3**. Nossos resultados são similares aos descritos por Xial et al., (2007), que observou o desenvolvimento de múltiplos tumores do cólon induzidos pelo azoximetano (AOM) por via de programação nutricional na fase fetal.

A exposição à dieta Ocidental durante a fase de gestação, lactação e fase juvenil diminuiu a susceptibilidade à carcinogênese do cólon pela DMH quando reintroduzida durante a fase adulta (**G6**). Embora não observada significância estatística, o número e

multiplicidade de lesões foram menores neste grupo, **G6**, submetido a programação nutricional na fase fetal.

Em relação ao número e multiplicidade de lesões pré-neoplásicas do cólon, a exposição à dieta ocidental durante a vida adulta (**G4**) aumentou significativamente o número e a multiplicidade de FCA induzidos pela DMH na mucosa do cólon quando comparado ao grupo **G3**. Dessa maneira, a exposição à dieta ocidental durante a vida adulta constitui fator de risco para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no cólon de roedores. Nossos resultados estão de acordo com os dados relatados por Newmark et al., (2001, 2009).

Em relação à análise quantitativa de focos de criptas aberrantes (FCAs) detectados histologicamente pela coloração de hematoxilina-eosina, embora não observada significância estatística, a exposição à dieta Ocidental durante a fase de gestação, lactação e fase juvenil (**G5**) aumentou a multiplicidade de criptas nos FCA induzidos pela DMH quando comparado ao grupo **G3**.

A exposição à dieta Ocidental durante a fase de gestação, lactação e fase juvenil (**G6**) modificou a susceptibilidade à carcinogênese do cólon pela DMH quando reintroduzida durante a fase adulta. Surpreendentemente, verificou-se neste grupo (**G6**) redução significativa do número e da multiplicidade de FCA induzidos pela DMH, o que demonstra que a reintrodução da dieta Ocidental durante a vida adulta resgata uma resposta adaptativa programada precocemente durante o desenvolvimento do organismo. Nossos resultados são similares a proposta de Wells (2007) referente à hipótese do fenótipo econômico, que se fundamenta na característica de adaptabilidade à longo prazo, preparando o organismo para a vida adulta (Wells, 2007).

Em relação ao número e multiplicidade de lesões pré-neoplásicas do cólon, a análise histológica do cólon corroborou os dados obtidos na análise estereoscópica dos FCAs, que a

exposição à dieta ocidental durante a vida adulta (**G4**) aumentou significativamente o número e a multiplicidade de FCA induzidos pela DMH, quando comparado ao grupo **G3** que foi exposto à dieta padrão desde a vida fetal até 20 semanas de experimento.

Histologicamente, os FCAs apresentaram alterações progressivas.

Embora não observada significância estatística, a exposição à dieta Ocidental durante a fase de gestação, lactação e fase juvenil (**G5**) aumentou o número médio de lesões displásicas de alto grau e de baixo grau, quando comparado ao grupo **G3**.

A reintrodução da dieta Ocidental na vida adulta, em animais previamente expostos durante a vida intra-uterina, lactação e fase juvenil (**G6**) diminuiu significativamente o número médio de lesões hiperplásicas e de displasia de baixo grau, quando comparado ao grupo **G4**, o que corrobora a hipótese do fenótipo econômico, conforme descrita por Wells (2007).

A exposição à dieta ocidental durante a vida adulta (**G4**) induziu aumento significativo do número médio de lesões com displasia de alto grau na mucosa do cólon de roedores iniciados pela DMH, quando comparado ao grupo **G3**. Nossos resultados referendam os relatados por Risio et al., 1996.

7) Conclusão

O câncer do cólon, que é uma das principais neoplasias do mundo ocidental moderno, pode ter entre seus fatores moduladores a via de programação nutricional na fase fetal.

A exposição à dieta Ocidental durante a fase de gestação, lactação e fase juvenil diminuiu a susceptibilidade à carcinogênese do cólon pela DMH quando reintroduzida durante a fase adulta, o que demonstra que a reintrodução da dieta Ocidental durante a vida adulta resgata uma resposta adaptativa programada durante o desenvolvimento fetal.

A exposição à dieta Ocidental durante a vida adulta constitui fator de risco para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no cólon de roedores.

Portanto, a exposição à dieta Ocidental constitui fator de risco para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e sua reintrodução na vida adulta modifica a susceptibilidade ao desenvolvimento de FCA induzido quimicamente na primeira geração de descendentes em ratos machos SD.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CnPq (Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

8) Referências bibliográficas

- Armstrong,B. and Doll, R. (1975) Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer.*, **15**, 617-631.
- Barker,D.J.P. (1998b) Mothers, babies and health in later life. Edinburg: Churchill Livingstone.
- Bird,R.P. (1987) Observation and qualification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Lett.*, **37**,147-151.
- Bird,R.P. (1995) Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.*, **93**,55-71.
- Bird,R.P. and Good CK. (2000) The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol Lett.*, **15**,112-113:395-402.
- Cheng,L. and Lai,M. (2003) Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroent.*, **9**, 2642-2649.
- Cox,J., Williams,S., Grove, K., et al. (2009) A maternal high-fat diet is accompanied by alterations in the fetal primate metabolome. *Am J Obstet Gynecol.*, **1-9**,201:281.
- Gluckman,P.D. and Hanson,M.A. (2004) The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab.*, **15**, 183-187.
- Hales,C.N. and Barker,D.J.P. (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.*, **35**, 595-601.
- Hanson,M.A. and Gluckman,P.D. (2008) Developmental origins of health and disease: new insights. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, **102**, 90-93.

- Hardman,W.E., Cameron,I.L., Heitman,D.W., Contreras,E. (1991) Demonstration of the need for end point validation of putative biomarkers: Failure of aberrant crypt foci to predict colon cancer incidence. *Cancer Res.*, **51**, 6388-6392.
- Heindel,J.J. (2007) Role of exposure to environmental chemicals in the developmental basis of disease and dysfunction. *Reprod Toxicol.*, **23**, 257-259.
- Hernández,L.G. and Heddle,J.A. (2005) A carcinogenic western diet does not induce somatic mutations in various target tissues of transgenic C56BL/6 mice. *Mutation Research.*, **570**, 185-196.
- Howe,H.L., Wingo,P.A., Thun,M.J., Ries,L.A., Rosenberg,H.M., Feigal,E.G. et al. (2001) Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst.*, **93**, 824-842.
- Lamont,J.T., O’Gorman,T.A. Experimental colon cancer. (1978) *Gastroenterology.*, **75**, 1157-1169.
- Langley-Evans,S.C. (2004) Fetal nutrition and adult disease: Programming of chronic disease through fetal exposure to undernutrition. *CABI Publishing*, UK.
- Lucas,A. Programming by early nutrition in man. (1991) *Ciba Found Symp.*, **156**, 38-50.
- Magnuson,B.A., Carr,I., Bird,R.P. (1993) Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid. *Cancer Res.*, **53**, 4499-4504.
- McLellan,E.A., Bird,R.P. (1988a) Specificity study to evaluate induction of aberrant crypts in murine colon. *Cancer Res.*, **48**, 6183-6186.
- McLellan,E.A., Bird,R.P. (1988b) Aberrant crypts: potential preneoplastic lesion in the murine colon. *Cancer Res.*, **48**, 6186-6192.

- McLellan.E.A., Medlin.A., Bird.R.P. (1991a) Sequential analysis of the growth and morphological characteristics of aberrant of aberrant crypt foci: Putative preneoplastic lesions. *Cancer Res.*, **51**, 5270-5274.
- McMillen, I.C. and Robinson, J.S. (2005) Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity and programming. *Physiol Rev.*, **85**, 571-633.
- Negri, E., D'Avanzo, B., Tavani, A. (1994) The role of vegetables and fruit in cancer risk. *J Carcinogenesis.*, 327-334.
- Newmark, H.L., Yang, K., Lipkin, M., Kopelovich, L., Liu, Y., Shinozaki, H. (2001) A Western-style diet induces benign and malignant neoplasms in the colon of normal C56BL/6 mice, *Carcinogenesis.*, **22**, 1871-1875.
- Newmark, H.L., Yang, K., Kurihara, N., Fan, K., Augenlicht, L.H., Lipkin, M. (2009) Western-style diet-induced colonic tumors and their modulation by calcium and vitamin D in C57BL/6 mice: a preclinical model for human sporadic colon cancer. *Carcinogenesis.*, **30**, 88-92.
- Ozane, S.E., Fernandez-Twinn, D., Hales, C.N. (2004) Fetal growth and adult diseases. *Seminars in Perinatology.*, **28**, 81-87.
- Parkin, D.M. (2001) Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.*, **2**, 533-543.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.*, **55**, 74-108.
- Ries, L.A., Wingo, P.A., Miller, D.S., Howe, H.L., Weir, H.K., Rosenberg, H.M. et al. (2000) The annual report to the nation on the status of cancer, 1973–1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer.*, **88**, 2398-2424.

- Risio,M., Lipkin,M., Newmark,H.L., Yang,K., Rossini,F.P., Steele,V.E. et al. (1996) Apoptosis cell replication and Western-style diet-induced tumorigenesis in mouse colon. *Cancer Res.*, **56**, 4910-4916.
- Rodrigues,M.A.M., Silva,L.A., Salvadori,D.M.F., De Camargo, J.L.V., Montenegro,M.R. (2002) Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short-and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.*, **35**, 351-355.
- Ross,S.A. and Milner,J.A. (2007) Epigenetic modulation and cancer: effect of metabolic syndrome? *Am J Clin Nutr.*, **86** (suppl), 872S-7S.
- Shamsuddin,A., Trump,B.F. Colon Epithelium II. (1981) In vivo studies of colon carcinogenesis. Light microscopic, histochemical and ultrastructural studies of histogenesis of azoxymethane-induced colon carcinomas in Fisher F334 rats. *J Natl Cancer Inst.*, **66**, 389-401.
- Shiptz,B., Hay,K., Medline,A., Bruce,W.R., Bull,S.B., Gallinger,S. et al. (1996) Natural history of aberrant crypt foci: a surgical approach. *Dis Colon Rectum.*, **39**, 763-767.
- Sinclair,K.D., Singh,R. (2007) Modelling the developmental origins of health and disease in the early embryo. *Theriogenology.*, **67**, 43-53.
- Sohn,O.S., Ishizaki,H., Yang,C.S., Fiala,E.S. (1991) Metabolism of axoxymethane, methylazoxymethanol and N-nitrosodimethylamine by cytochrome P450IIE1. *Carcinogenesis.*, **12**, 127-131.
- Tudek,B., Bird,R.P., Bruce,W.R. (1989) Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. *Cancer Res.*, **49**, 1236-1240.

- Tunusov,V. and Mohr,U. (1994) Pathology of tumors in laboratory animals. *International Agency for Research on Cancer.*, **2**, 776.
- Weisburguer,J.H. (1971) Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. *Cancer.*, **28**,60-70.
- Wells,J.C.K. (2003) The thrifty phenotype hypotesis: thrifty offspring or thrifty mother? *J Theor Biol.*, **221**,143-161.
- Wells,J.C.K. (2007) The thrifty phenotype as an adaptative maternal effect. *Biol Rev.*, **82**,143-172.
- Xiao,R., Hennings,L.J., Badger,T.M., Simmen,F.A. (2007) Fetal programming of colon cancer in adult rats: correlations with altered neonatal growth trajectory, circulating IGF-I and IGF binding proteins, and testosterone. *J Endocrinology.*, **195**,79-87.

Figura 1



Figura 2



Figura 3

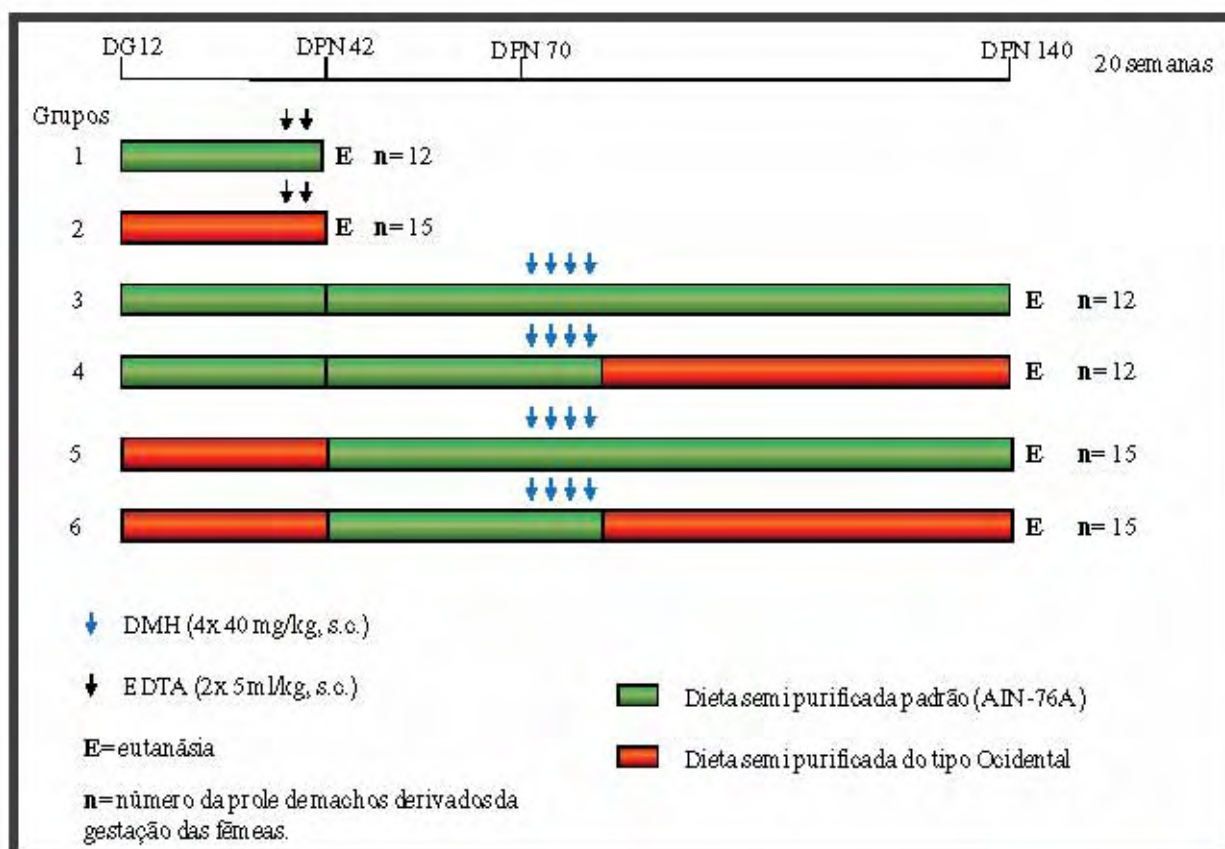


Figura 4



Figura 5



Figura 6



Figura 7



Figura 8



Figura 9

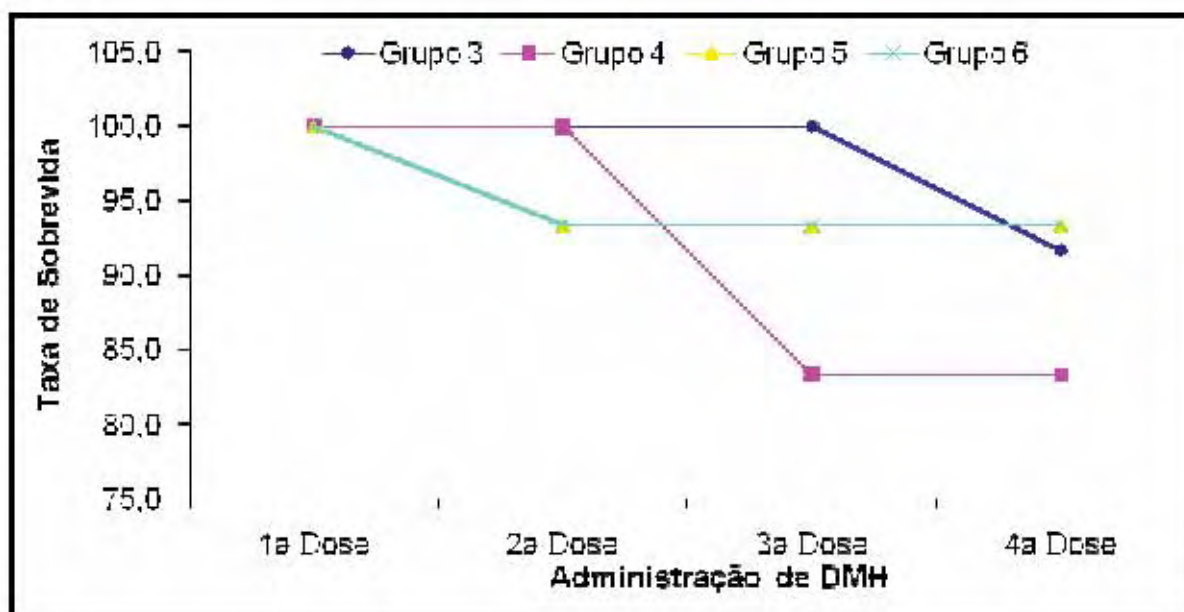
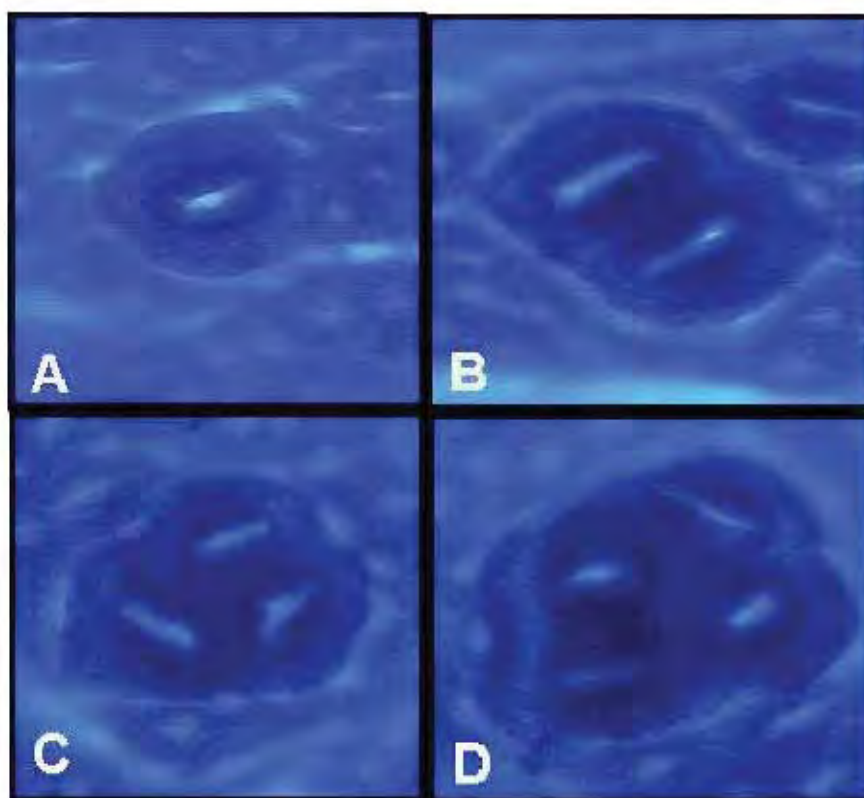
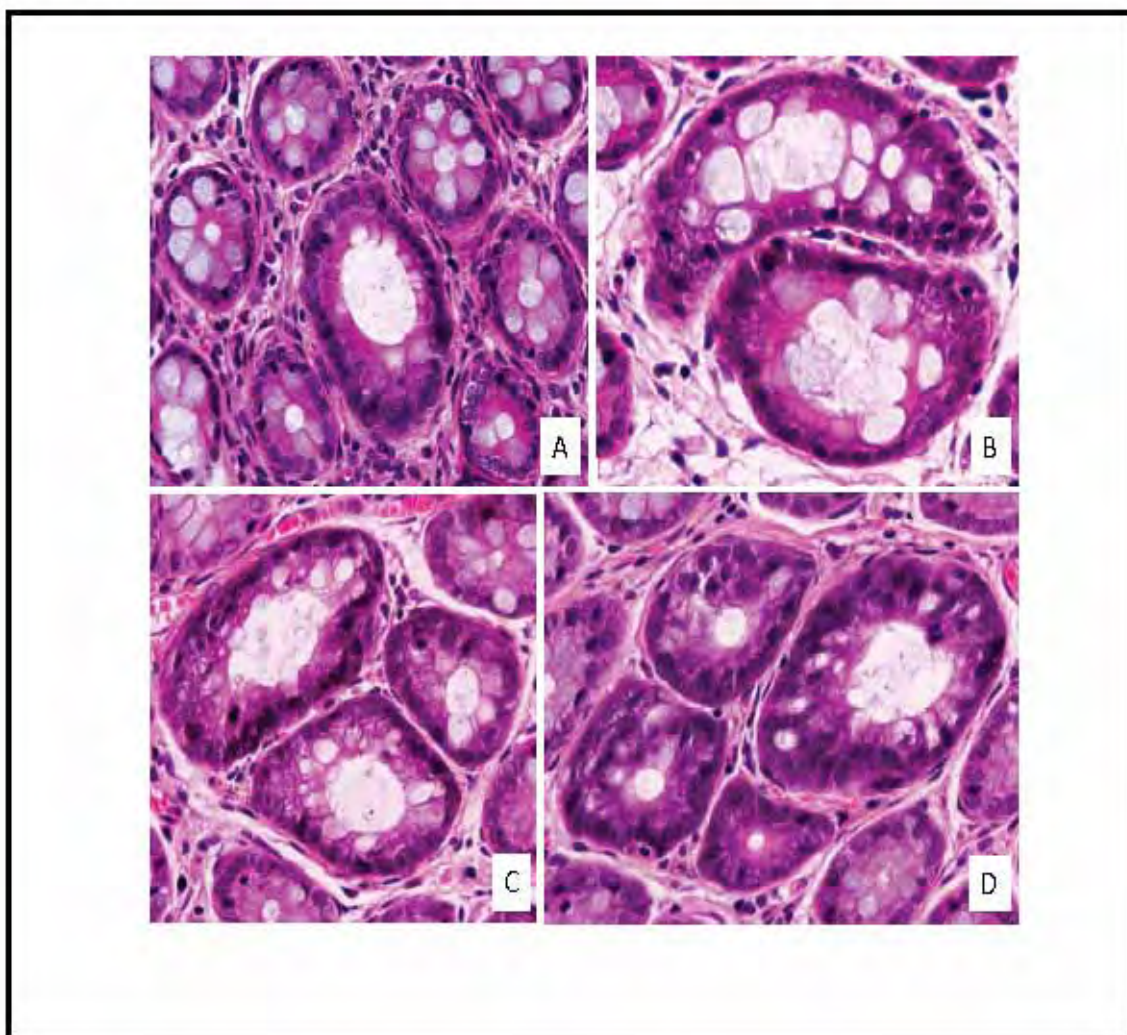


Figura 10



Focos de criptas aberrantes (FCA) identificados pela coloração de azul de metileno: A) FCA com uma cripta aberrante; B) FCA com duas criptas aberrantes; C) FCA com três criptas aberrantes; D) FCA com quatro criptas aberrantes. Objetiva de 40x

Figura 11



Focos de criptas aberrantes (FCA) identificados pela coloração de hematoxilina-eosina: A) FCA com uma cripta aberrante; B) FCA com duas criptas aberrantes; C) FCA com três criptas aberrantes, D) FCA com quatro criptas aberrantes. Objetiva de 40x

Tabela 1. Composição das rações semi purificadas (Modificado de Hernández & Heddle, 2005).

Ingredientes	Dieta padrão AIN-76A¹	Dieta ocidental (teste)
Gordura (mg) (óleo de milho %)	5	20
Proteína (mg) (%)	20	20
Carboidrato (mg) (%)	66	66
Cálcio (mg/g) ²	0,5	0,5
Vitamina D3 (IU/g) ²	1	1
Fósforo (PO ₄) (mg/g) ²	0,6	0,6
Fibra (celulose) (%)	5	2
Ácido fólico (mg/g) ²	2	1
DL-Metionina (%)	0,3	0,3
L-Cisteína (%)	-	0,3
Colina (%)	0,2	0,12
Kcal/g (aproximadamente)	3,6	4,5

¹AIN-76A Purified Diet, Rat or Mouse (also known as # 5800-B). ²mg/g ou IU/g da Mistura de Vitaminas.

Tabela 2. Consumo estimado de ração e líquidos, peso corpóreo final e ganho de peso das fêmeas prenhes expostas à dieta padrão ou Ocidental durante a fase de gestação.¹ Razão sexual.

Grupo/Tratamento	Número de gaiolas	Consumo de ração (g/rato/dia) ²	Consumo de líquidos (g/rato/dia) ²	Peso corpóreo final ³	Ganho de peso ⁴	Razão Sexual ⁵
Dieta padrão (AIN-76A)	11	24,86 ± 3,91	34,12 ± 9,25	388,55 ± 32,97	139,91 ± 16,86	0,964
	12	23,12 ± 5,83	33,15 ± 7,63	384,42 ± 21,49	132,67 ± 16,93	0,789
Dieta Ocidental						

¹ Valores representados por média ± SD. ² Valor estimado individual (n=1) mensurado no DG 0, DG 6, DG 9, DG 12, DG 15, DG 18 e DG 20. ³ Mensurado no DG 20; Baseado na diferença entre DG 20 e DG 0. ⁴ Número da prole de fêmeas dividido pelo número da prole de machos.

Tabela 3. Consumo estimado de ração e líquidos e perda de peso das fêmeas lactantes e ganho de peso corpóreo da prole de machos, expostos à dieta padrão ou Ocidental durante a fase de lactação.¹

Grupo/Tratamento	Número de gaiolas	Consumo de ração (g/rato/dia) ²	Consumo de líquidos (g/rato/dia) ²	Perda de peso fêmeas lactantes ³	Ganho de peso prole de machos ³
Dieta padrão (AIN-76A)	11	33,44 ± 6,86	41,66 ± 11,06	29,55 ± 22,17	16,64 ± 5,99 (56) ⁴
	12	18,57 ± 4,87*	32,45 ± 6,73	22,00 ± 10,97	7,32 ± 1,90** (71) ⁴
Dieta Ocidental					

¹ Valores representados por média ± SD; ² Valor estimado individual (n=1) mensurado no DPN 3, DPN 6, DPN 9, DPN 12, DPN 15, DPN 18 e DPN 21; ³ Mensurado no DPN 13 e DPN 21; ⁴ número da prole de machos; *, ** Diferença significativa em relação ao grupo controle (p=0,0015 e p=0,0013, respectivamente).

Tabela 4. Consumo estimado de ração da prole de ratos machos não-iniciados pela DMH, do DPN 21 ao DPN 42.¹

Grupo/Tratamento ²	Número de animais	Consumo de ração (g)	Peso Corpóreo final (g)
(G1) Dieta padrão ³	12	8,55 ± 2,28	107,05 ± 22,80
(G2) Dieta Ocidental ⁴	15	3,10 ± 0,80*	38,47 ± 9,90*

¹ Valores representados por média ± SD; ² EDTA= ácido etileno diamino tetra-acético (2 x 5 mg p.o.) (s.c.); ³ Consumo de ração baseado no valor estimado por gaiola (n=4);

⁴ Consumo de ração baseado no valor estimado por gaiola (n=5); *Diferença significativa em relação ao grupo G1 (p=0,001).

Tabela 5. Consumo estimado de ração pela prole de ratos machos iniciados pela DMH, do DPN 21 ao DPN 140.¹

Grupo/Tratamento ²	Consumo de ração (g)		
	Novembro	Dezembro	Janeiro
(G3)	8,65 ± 1,44	10,83 ± 3,34	15,99 ± 4,46
Dieta padrão+DMH ⁴	(12) ³	(12) ³	(11) ³
(G4)	6,60 ± 1,27	12,38 ± 4,95	15,18 ± 4,16
Dieta padrão+DMH+Dieta Ocidental ⁴	(12) ³	(12) ³	(10) ³
(G5)	2,84 ± 0,6 *	8,06 ± 3,36 *	15,48 ± 4,18
Dieta Ocidental+DMH ⁵	(15) ³	(14) ³	(13) ³
(G6)	3,86 ± 0,82 *	7,69 ± 3,46	16,51 ± 4,42
Dieta Ocidental+DMH+Dieta Ocidental ⁵	(15) ³	(14) ³	(13) ³

¹ Valores representados por média ± SD; ² DMH= 1,2-dimetilhidrazina (4 x 40 mg/kg p.o.) (s.c.); ³ número de animais; ⁴ Consumo de ração baseado no valor estimado por gaiola (n=4); ⁵ Consumo de ração baseado no valor estimado por gaiola (n=5); * Diferença significativa em relação à G3 e G4 (p≤0,05).

Tabela 6. Evolução do peso corpóreo da prole de ratos machos iniciados pela DMH, do DPN 21 ao DPN 140¹.

Grupo/Tratamento ²	Peso corpóreo (g)		
	Dezembro	Janeiro	Fevereiro
(G3)	149,92 ± 54,07 (12) ³	234,83 ± 84,55 (12) ³	289,42 ± 96,75 (11) ³
Dieta padrão+DMH			311,10 ± 47,60 (11) ³
(G4)	184,83 ± 51,37 (12) ³	237,25 ± 115,64 (12) ³	272,33 ± 128,75 (10) ³
Dieta padrão+DMH+Dieta Ocidental			321,40 ± 57,90 (10) ³
(G5)	78,53 ± 18,45* (15) ³	145,53 ± 53,62* (14) ³	232,67 ± 77,86* (13) ³
Dieta Ocidental+DMH			293,8 ± 28,40 (13) ³
(G6)	76,21±8,71* (15) ³	167,67 ± 54,77* (14) ³	216,07 ± 71,71* (13) ³
Dieta Ocidental+DMH+Dieta Ocidental			248,80 ± 37,70* (13) ³

¹Valores representados por média ± SD; ²DMH= 1,2-dimetilhidrazina (4 x 40 mg/kg p.c.) (s.c.); ³número de animais; ⁴Eutanásia DPN 140; * Diferença significativa em relação a G3 e G4 (p<0,01).

Tabela 7. Efeitos da exposição à dieta ocidental sobre o número e multiplicidade dos FCA identificados pela coloração de azul de metileno. Valores apresentados em Média \pm SD.

Grupo/Tratamento ¹	N	CA Total ²	FCA Total ²	FCA 1 a 3 ³	FCA > 4 ³	CA/FCA ²
(G3) Dieta padrão+DMH	11	116,45 \pm 61,57	46,9 \pm 22,81	38,55 \pm 21,30	8,36 \pm 9,53	2,48 \pm 0,52
(G4) Dieta padrão+DMH+Dieta Ocidental	10	201,90 \pm 119,71*	83,10 \pm 49,71*	69,40 \pm 44,16*	13,7 \pm 8,27	2,44 \pm 0,36
(G5) Dieta Ocidental+DMH	13	186,38 \pm 133,23	58,55 \pm 40,89	39,62 \pm 29,34	19,23 \pm 15,16*	2,96 \pm 1,08
(G6) Dieta Ocidental+DMH+Dieta Ocidental	13	130,38 \pm 126,54	48,08 \pm 46,41	37,62 \pm 37,60	10,46 \pm 10,20	2,54 \pm 1,01

¹DMH=1,2-dimetilhidrazina (4x40 mg/kg p.o, s.c); ²Número, ³Multiplicidade. *Diferença significativa em relação a G3 (p \leq 0,05).

Tabela 8. Efeitos da exposição à dieta ocidental sobre o número e multiplicidade dos FCA identificados pela coloração de hematoxilina-eosina. Valores apresentados em Média \pm SD.

Grupo/Tratamento ¹	N	CA Total ²	FCA Total ²	FCA 1 a 3 ³	FCA > 4 ³	CA/FCA ²
(G3) Dieta padrão+DMH	11	28,55 \pm 16,72	11,09 \pm 5,97	8,91 \pm 5,24	2,18 \pm 2,04	2,30 \pm 0,92
(G4) Dieta padrão+DMH+Dieta Ocidental	10	60,50 \pm 29,78*	20,90 \pm 11,68*	14,70 \pm 10,23	6,20 \pm 3,68*	3,02 \pm 0,60*
(G5) Dieta Ocidental+DMH	13	49,54 \pm 46,57	16,00 \pm 13,16	10,54 \pm 8,38	5,38 \pm 5,53	2,88 \pm 1,26
(G6) Dieta Ocidental+DMH+Dieta Ocidental	13	26,00 \pm 24,91**	8,23 \pm 8,17**	5,46 \pm 5,58**	2,77 \pm 3,35**	2,68 \pm 1,65

¹DMH=1,2-dimetilhidrazina (4x40 mg/kg p. o.); Número, Multiplicidade. * Diferença significativa em relação a G3 (p \leq 0,05); ** Diferença significativa em relação a G4 (p \leq 0,03).

Tabela 9. Graus de displasia das lesões pré-neoplásicas induzidas pela DMH. Valores apresentados em Média \pm SD.

Grupo/Tratamento ²	N	ACF não displásico	Displasia de baixo grau	Displasia de alto grau
(G3) Dieta padrão+DMH	11	3,45 \pm 2,91	5,82 \pm 3,87	0,55 \pm 0,52
(G4) Dieta padrão+DMH+Dieta Ocidental	13	6,60 \pm 5,23	10,10 \pm 6,31	2,10 \pm 1,10*
(G5) Dieta Ocidental+DMH	13	5,62 \pm 5,17	6,62 \pm 5,08	1,23 \pm 2,24
(G6) Dieta Ocidental+DMH+Dieta Ocidental	13	3,62 \pm 4,01	3,54 \pm 3,45**	0,38 \pm 0,65**

¹DMH=1,2-dimetilhidrazina (4x40 mg/kg p.o. s.c). * Diferença significativa em relação a G3 (p<0,001); ** Diferença significativa em relação a G4 (p \leq 0,004).

III. Anexos



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º **663** sobre o projeto de pesquisa " **Exposição à dieta ocidental durante a gestação, lactação, fase juvenil e susceptibilidade a carcinogênese química do cólon em ratos adultos da linhagem Sprague-Dawley** ", a ser conduzido por Gisele Aparecida Dionísio Lopes, orientada pela Profª. Drª. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues, co-orientada pelo Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan, relatado pela Profª. Maria Luiza Cassetari, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) com a ressalva que os "**ratos**" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de certificar a sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 28 de fevereiro de 2008



Prof. Drª Regina Helena G. Martins
Presidente da CEEA



Sueli Aparecida Garcia
Secretário da CEEA/subst.