

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MICHELE OLIVEIRA CARVALHO

**EFEITO DA DIETA CETOGÊNICA NA PROMOÇÃO DA TUMORIGÊNESE
COLORRETAL INDUZIDA EM RATOS**

ALFENAS/MG

2022

MICHELE OLIVEIRA CARVALHO

**EFEITO DA DIETA CETOGÊNICA NA PROMOÇÃO DA TUMORIGÊNESE
COLORRETAL INDUZIDA EM RATOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Nutrição e Longevidade pela Universidade Federal de Alfnas.

Área de concentração: Nutrição e Longevidade.

Orientadora: Profa. Dra. Pollyanna Francielli de Oliveira

ALFENAS/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Carvalho, Michele Oliveira .

Efeito da dieta cetogênica na promoção da tumorigênese colorretal induzida em ratos / Michele Oliveira Carvalho. - Alfenas, MG, 2022.

112 f. : il. -

Orientador(a): Pollyanna Francielli de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Nutrição e Longevidade) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Dieta cetogênica. 2. Efeito Warburg. 3. Quimioprevenção. 4. Triglicerídeos de cadeia média. 5. Lesões pré-neoplásicas. I. de Oliveira, Pollyanna Francielli, orient. II. Título.

MICHELE OLIVEIRA CARVALHO

EFEITOS DA DIETA CETOGÊNICA NA PROMOÇÃO DA TUMORIGÊNESE COLORRETAL INDUZIDA EM RATOS

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Nutrição e Longevidade pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Nutrição e Longevidade.

Aprovada em: 29 de novembro de 2022

Profa. Dra. Pollyanna Francielli de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira
Instituição: Universidade de Araraquara

Profa. Dra. Tania Mara Rodrigues Simões
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Pollyanna Francielli de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2022, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávia Aparecida Resende Nogueira, Usuário Externo**, em 29/11/2022, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tânia Mara Rodrigues Simões, Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2022, às 10:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0869150** e o código CRC **63D563C9**.

Para os meus familiares e demais pacientes no qual foram acometidos pelo câncer.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por traçar meu caminho e conduzir-me até aqui. A minha família, agradeço pelo apoio e confiança depositados em mim, vocês foram base essencial para que eu pudesse alcançar mais essa etapa. Aos amigos de longa data, por compreenderem a ausência em muitos momentos especiais, e aos novos amigos por tornarem a rotina mais leve.

A Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Longevidade pela assistência sempre concedida. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

A Prof^a Dr^a Pollyanna Francielli de Oliveira, por abrir caminhos e criar possibilidades para a produção e construção de conhecimento, além de orientar-me e conduzir o trabalho da melhor maneira possível, com certeza a terei como exemplo profissional.

Ao Laboratório de Genética Humana, seus colaboradores e aos demais pesquisadores envolvidos neste trabalho, sem a cooperação e parceria de todos seria improvável a produção deste.

Em especial a Carolina Sales e Mariane Baptistella, por fazerem parte dessa trajetória, por todos ensinamentos profissionais e apoio pessoal.

E aos demais pesquisadores, obrigada por também enfrentarem e acreditarem na ciência como modo de revolução, que continuemos resistentes e persistentes.

“Que possamos nos multiplicar, nos unir e ocupar espaços tão nossos quanto nossos ideais. Assim nossas vozes não serão silenciadas e nosso conhecimento será semente para outras flores”

(Autor desconhecido)

RESUMO

O estilo de vida está fortemente relacionado com a qualidade e duração da vida, sendo a alimentação um dos fatores que podem influenciar positivamente no desenvolvimento de doenças quando o padrão alimentar é baseado em alimentos industrializados, refinados, ricos em gorduras saturadas, *trans* e açúcares. Apesar de a média global da expectativa de vida ter aumentado nos últimos anos, a qualidade de vida diminuiu devido ao aumento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), entre elas o câncer. O câncer colorretal (CCR), o terceiro mais diagnosticado em todo mundo, é um tipo tumoral que traz sérias consequências à longevidade, uma vez que as taxas de incidência e prevalência têm aumentado em indivíduos jovens embora seja comum em pessoas acima de 70 anos. A ocorrência do CCR tem sido associada ao estilo de vida baseado em dietas com baixo consumo de fibras, excesso de consumo de carne vermelha e gorduras saturadas. No contexto da prevenção do câncer bem como na atuação coadjuvante ao tratamento, encontramos a dieta cetogênica (DC), caracterizada pelo seu alto teor de gordura, proteína suficiente para manutenção das atividades e baixo teor de carboidrato que, propicia a utilização dos ácidos graxos como fonte de energia, por meio da produção de corpos cetônicos. Utilizada para tratamento da epilepsia e distúrbios do sistema nervoso, a DC tem demonstrado, quase que empiricamente, efeitos sobre carcinogênese por direcionar a glicose anaeróbia (efeito Warburg) e modulação dos níveis de insulina. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da DC na promoção da tumorigênese colorretal induzida em ratos. O estudo foi realizado utilizando dois modelos de dieta: uma baseada em um perfil lipídico rico em gordura saturada (DC) e outra rica em triglicerídeos de cadeia média (DCTCM) e perfil lipídico ainda rico em gorduras insaturadas. Foram realizadas análises *in vitro* para determinação do potencial antioxidante e do teor de flavonoides e fenólicos totais. *In vivo*, lesões pré-neoplásicas foram induzidas no cólon de ratos Wistar com o carcinógeno 1,2 dimetilhidrazina [DMH 40mg/kg peso corpóreo (p.c.)], por 6 semanas e, imediatamente após a indução das lesões, os animais foram submetidos, por 6 semanas, aos dois modelos de dieta. Os animais foram monitorados diariamente quanto ao peso, circunferência abdominal, comprimento naso-anal, consumo de água, ração e dietas. Após o tratamento, para avaliação da segurança e do potencial quimiopreventivo, foram quantificados os Focos de Criptas Aberrantes (FCA) e as Criptas Aberrantes (CA) na mucosa colônica, além da análise de mutagenicidade pelo ensaio de micronúcleo. O estudo dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito quimiopreventivo foi realizado empregando a marcação imunohistoquímica para ciclooxigenase (COX-2), antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e β -catenina. Antes do início e ao final do período experimental foram realizadas medições dos níveis de glicose e cetose. Nossos resultados demonstraram que os perfis cetogênicos não apresentaram potencial antioxidante. Nenhum dos tratamentos demonstrou influenciar na composição corporal e o monitoramento do consumo de água e ração indicou ausência de toxicidade. Os perfis cetogênicos induziram o organismo ao estado de cetose sem modular os níveis de glicose e foram capazes de reduzir os cromossômicos na medula óssea causados pelo carcinógeno DMH. As análises da mucosa colônica demonstraram que ambas as dietas foram capazes de reduzir a frequência de FCA e CA sendo que o efeito quimiopreventivo mais evidenciado foi observado no grupo de DCTCM, evidenciando relevância da qualidade do perfil lipídico para o efeito protetor. Dados obtidos no ensaio de imunohistoquímica demonstraram atuação das dietas na regulação da atividade inflamatória de COX₂ e ainda, em vias de proliferação e modulação transcricional como a via Wnt/ β -catenina e do Antígeno

Nuclear de Proliferação Celular (PCNA). Nas condições experimentais avaliadas, os resultados sugerem que os perfis cetogênicos apresentam efeitos sobre diferentes vias da carcinogênese colorretal e o que fornece prévias informações para outros estudos que possam futuramente recomendar, de forma segura e eficaz, tal estratégia nutricional, tanto para pacientes oncológicos quanto para grupos de risco.

Palavras-chave: dieta cetogênica; efeito Warburg; quimioprevenção; triglicerídeos de cadeia média; lesões pré-neoplásicas

ABSTRACT

Lifestyle is strongly related to the quality and length of life, and food is one of the factors that can positively influence the development of diseases when the eating pattern is based on processed foods, refined foods, rich in saturated and trans fats and sugars. Although the global average life expectancy has increased in recent years, life quality has decreased due to the increase in chronic non-communicable diseases (NCDs), including cancer. Colorectal cancer (CRC), the third most diagnosed cancer worldwide, is a tumor type that brings serious consequences to longevity, since the incidence and prevalence rates have increased in young individuals even though it is common in people over 70 years old. The occurrence of CRC has been associated with a lifestyle based on low-fiber diets, excessive consumption of red meat, and saturated fats. The ketogenic diet (KD) has been strongly associated in the context of cancer prevention, as well as an important adjuvant to cancer treatment. It is characterized by its high fat content, sufficient protein for maintenance of activities and low carbohydrate content, which enables the use of fatty acids as an energy source, through the production of ketone bodies. Used for the treatment of epilepsy and nervous system disorders, KD has demonstrated, almost empirically, effects on carcinogenesis by directing anaerobic glucose (Warburg effect) modulating insulin levels. In this regard, the present study aimed to evaluate the effects of KD in the promotion of induced colorectal tumorigenesis in rats. The study was performed using two diet models: one based on a lipid profile rich in saturated fats (KD) and another rich in medium-chain triglycerides and lipid profile still rich in unsaturated fats (MCTKD). *In vitro* analyses were performed to determine antioxidant potential and total flavonoid and phenolic content. *In vivo*, preneoplastic lesions were induced in the colon of Wistar rats with the carcinogen 1,2 dimethylhydrazine [DMH 40mg/kg body weight (b.w.)] for 6 weeks. Immediately after the induction of lesions, the animals were subjected to the two diet models for 6 weeks. The animals were monitored daily for weight, abdominal circumference, naso-anal length, water, feed and diet consumption. After treatment, to evaluate the safety and chemopreventive potential, Aberrant Crypt Foci (ACF) and Aberrant Crypts (AC) in the colonic mucosa were quantified. The study of possible mechanisms involved in the chemopreventive effect was performed by employing immunohistochemical labeling for cyclooxygenase (COX-2), Cell Proliferation Nuclear Antigen (PCNA) and β -catenin. Measurements of glucose and ketosis levels were performed before the start and at the end of the experimental period. Our results showed that the ketogenic profiles did not show antioxidant potential. None of the treatments were shown to influence body composition and monitoring of water and feed intake indicated no toxicity. The ketogenic profiles induced the body to a state of ketosis without modulating glucose levels and were able to reduce chromosomal damage in the bone marrow caused by the carcinogen DMH. Colonic mucosa analyses demonstrated that both diets were able to reduce the frequency of ACF and AC and that the most evident chemopreventive effect was observed in the MCTKD group. MCTKD group shows the relevance of the quality of the lipid profile for the protective effect. Data obtained in the immunohistochemistry assay showed that the diets act in the regulation of the inflammatory activity of COX2 and also in pathways of proliferation and transcriptional modulation as the Wnt/ β -catenin pathway and Cell Proliferation Nuclear Antigen (PCNA). In the experimental conditions evaluated, the results suggest that ketogenic profiles have effects on different pathways of colorectal carcinogenesis, which provides previous information for other studies that can safely and effectively recommend this nutritional strategy in the future, both for cancer patients and for risk groups.

Keywords: ketogenic diet; Warburg effect; chemoprevention; medium-chain triglycerides; precancerous lesions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Valores médios e desvio padrão do consumo de água dos ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controles.....	56
Figura 2-	Valores médios e desvio padrão do consumo de ração padrão dos ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controles.....	57
Figura 3-	Valores médios e desvio padrão do consumo da Dieta Cetogênica (DC) e da Dieta Cetogênica com Triglicérides de Cadeia Média (DCTCM) de ratos Wistar.....	58
Figura 4-	Valores médios e desvio padrão de ganho de peso obtidos de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controles.....	60
Figura 5-	Valores médios e desvio padrão de ganho de circunferência abdominal de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controles.....	61
Figura 6-	Valores médios e desvio padrão do ganho no comprimento naso-anal ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controles.....	63
Figura 7-	Valores médios e desvio padrão do IMC (A) e índice de Lee (B) de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controles.....	64
Figura 8-	Valores médios e desvio padrão das concentrações de glicose de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e seus respectivos controles.....	65
Figura 9-	Valores médios e desvio padrão da concentração de cetona no sangue de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e seus respectivos controles.....	69
Figura 10-	Média de focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controle.....	71
Figura 11-	Média da razão de eritrocitos policromáticos (PCE)/ eritrócitos normocromáticos (NCE) e de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) observadas na medula óssea de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controles.....	72

Figura 12- Quantificação imunohistoquímica de COX-2, PCNA e β -catenina no tecido colorretal distal de ratos Wistar tratados com DC, DCTCM e TCM após a indução de lesões pré-neoplásicas com 1,2-dimetilhidrazina 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Informação nutricional dos macronutrientes da dieta padrão, dieta cetogênica (DC) e da dieta cetogênica de triglicerídeos de cadeia média (DCTCM).....	50
Tabela 2-	Perfil lipídico da dieta cetogênica (DC) e da dieta cetogênica de triglicerídeos de cadeia média (DCTCM).....	50
Tabela 3-	Informação nutricional dos micronutrientes dos diferentes tipos de dieta utilizados no estudo.....	51
Tabela 4-	Potencial antioxidante e conteúdo de fenólicos e flavonoides totais das dietas cetogênicas após extração com dois solventes [i. metanol 80%; ii. acetona:metanol:água (7:7:6)].....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5- FU	5-fluorouracil
4-HNE	4-hidroxinonenal
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ALA	Ácido graxo alfa-linolênico
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i> (Proteína quinase ativada por AMP)
<i>APC</i>	<i>Adenomatosis polyposis coli</i> (Polipose adenomatosa do cólon)
<i>AXIN2</i>	<i>Axin 2</i> (Axina 2)
<i>BCL2</i>	<i>BCL2 apoptosis regulator</i> (Regulador de apoptose BCL2)
CA	Cripta aberrante
C.Ab	Circunferência abdominal
CCR	Câncer Colorretal
<i>CDKN2A-INK4a</i>	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i> (Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A)
<i>CDKN2AA-INK4b</i>	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 4b</i> (Inibidor de quinase dependente de ciclina 4b)
<i>CDKN2AARF</i>	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor ARF</i> (Inibidor de quinase dependente de ciclina ARF)
CK1 α	caseína quinase 1 α
<i>c-Myc</i>	<i>MYC proto-oncogene</i>
CNA	Comprimento naso-anal
CPT1	Carnitina palmitoiltransferase 1 ^a
DAM	Dieta Atkins modificada
DASH	<i>Dietary Approach to Stop Hypertension</i> (Abordagem dietética para interromper a hipertensão)
DC	Dieta cetogênica
DCC	Dieta cetogênica clássica
DCC	<i>DCC netrin 1 receptor</i> (Receptor DCC netrina 1)
DCIG	Dieta cetogênica com baixo índice glicêmico
DCTCM	Dieta cetogênica com triglicerídeos de cadeia média
DHA	Ácido docosa-hexaenóico

<i>DKK1</i>	<i>Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1</i> (Inibidor 1 da via de Sinalização Dickkopf WNT)
DL	Dose letal
DMH	1,2 Dimetilhidrazina
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (Receptor do fator de crescimento epidérmico)
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FCA	Foco de cripta aberrante
g	Gramma
G6PC	Glicose-6-fosfatase
GSSG	Dissulfeto de glutationa
HDAC1	<i>Histone deacetylase 1</i> (Histona desacetilase 1)
HDAC2	<i>Histone deacetylase 2</i> (Histona desacetilase 2)
<i>HDL</i>	<i>High density lipoprotein</i> (Lipoproteína de alta densidade)
<i>hMLH1</i>	<i>MutL homolog 1</i> (MutL homólogo 1)
<i>hMLH2</i>	<i>PMS1 homolog 1</i> (PMS homólogo 1)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer)
IG	Índice glicêmico
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor I</i> (Fator de crescimento semelhante à insulina I)
IGFBP-3	<i>Insulin-like growth factor binding protein 3</i> (Proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina)
IMC	Índice de massa corporal
<i>KRAS</i>	<i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i> (Proto-oncogene KRAS, GTPase)
MI	Mililitros
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	<i>GDP-D-glucose phosphorylase</i> (GDP-D-glicose fosforilase 1)
<i>MGMT</i>	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i> (O-6-metilguanina-DNA metiltransferase)
MN	Micronúcleo

<i>mTOR</i>	<i>Mechanistic target of rapamycin kinase</i> (Alvo mecanicista da rapamicina quinase)
MUFA	Ácido graxo monoinsaturado
NF-Kb	<i>Nuclear factor kappa B subunit 1A</i> (Subunidade 1A do fator nuclear kappa B)
OC	Orégano comum
OG	Orégano grego
OMS	Organização Mundial de Saúde
p.c	Peso corpóreo
PCEMNs	Eritrócitos policromáticos micronucleado
<i>PCK1</i>	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1</i> (<i>Fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1</i>)
PCU	Protocianidinas de sementes de uva
<i>PIK3CA</i>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i> (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase catalítica subunidade alfa)
PG	Prostaglandina
PUFA	Ácido eicosapentaenoico
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> (<i>fosfatase e homólogo de tensina</i>)
RAS	<i>RAt Sarcoma vírus</i> (<i>RAt Sarcoma vírus</i>)
<i>RASSF1A</i>	<i>Ras association domain-containing protein 1</i> (<i>Proteína 1 contendo domínio de associação Ras</i>)
SCOT	Succinil-CoA transferase
<i>SFRP1</i>	<i>Secreted frizzled related protein 1</i> (proteína relacionada ao frizz 1 secretada)
<i>SFRP2</i>	<i>Secreted frizzled related protein 2</i> (Proteína relacionada ao frizz 2 secretada)
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TCL	Triglicerídeo de cadeia longa
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
TLR4	Tool – like 4 (Toll like receptor 4)
TP53	<i>Tumor protein p53</i> (Proteína tumoral p53)
TS	Thymidylate synthase (Timidilato sintase)
VLDL	<i>Very low density lipoproteins</i> (Lipoproteínas de muito baixa densidade)
<i>Wnt</i>	Wingless/integrase-1

WNT5A

Wnt family member 5A (Wnt membro da família 5A)

β HB

β -hidroxibutirato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1	LONGEVIDADE E FATORES ASSOCIADOS	23
2.2	PAPEL DA NUTRIÇÃO NA SAÚDE E LONGEVIDADE	24
2.3	DIETA CETOGÊNICA (DC).....	27
2.4	CÂNCER: UM PROCESSO “MULTI-ETAPAS”	29
2.5	POTENCIAIS EFEITOS DA DIETA CETOGÊNICA NAS CÉLULAS CANCEROSAS	31
2.6	CÂNCER COLORRETAL: ASPECTOS MOLECULARES E PROBLEMÁTICA DOS TRATAMENTOS	33
3	JUSTIFICATIVA	37
4	OBJETIVOS	39
4.1	OBJETIVO GERAL	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5	MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1	PREPARO DAS DIETAS	40
5.2	SISTEMA-TESTE <i>IN VITRO</i>	40
5.2.1	Obtenção de componentes antioxidantes	40
5.2.2	Determinação do potencial antioxidante.....	41
5.2.3	Determinação dos compostos fenólicos totais	41
5.2.4	Determinação de flavonoides totais	42
5.3	SISTEMA-TESTE <i>IN VIVO</i>	43
5.3.1.	Agente indutor de lesões pré-neoplásicas	43
5.3.2	Animais	43
5.3.3	Delineamento experimental	44
5.3.4	Avaliação das lesões pré-neoplásicas	45
5.3.5.	Determinação da cetose	46
5.3.6	Avaliação da composição corporal	46
5.3.7	Avaliação de mutagenicidade	47
5.3.8	Imunoistoquímica	47
5.4	Análise estatística	48
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1	CONSTITUIÇÃO DAS DIETAS: PERFIL DIETÉTICO DE MACRO E MICRONUTRIENTES	49
6.2	SISTEMA-TESTE <i>IN VITRO</i>	51
6.2.1	Potencial antioxidante e teor de flavonoides e fenólicos totais.....	51
6.3	SISTEMA-TESTE <i>IN VIVO</i>	54
6.3.1	Parâmetros toxicológicos	54
6.3.2	Composição corporal	59
6.3.3	Determinação da glicose e cetose	66
6.3.4	Avaliação do potencial quimiopreventivo na carcinogênese colorretal	70
6.3.5	Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico dos perfis cetogênicos	75
6.3.6	Avaliação Imunohistoquímica.....	80

7	CONCLUSÃO	92
	REFERENCIAS	93
	APÊNDICE A	111
	ANEXO A	112

1 INTRODUÇÃO

A longevidade pode ser definida pela obtenção de uma vida produtiva e de qualidade pelo maior tempo possível, considerando a faixa etária de 85 anos para longevos e 95 anos com uma vida saudável para longevidade excepcional. Inovações em saneamento, saúde, nutrição e apoio social estão diretamente relacionadas à qualidade de vida, influenciando por consequência na expectativa de vida e longevidade (OEPPEN; VAUPEL, 2002; RILEY, 2005).

Como a expectativa de vida tem aumentado nos últimos anos, aumenta-se também as causas de mortes relacionadas a condições crônicas de início tardio, como doenças cardiovasculares, respiratórias, metabólicas e câncer de maneira que, este aumento na incidência, acaba por influenciar a qualidade de vida e longevidade (NAGHAVI *et al.*, 2017),

Entre as Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT) que interferem na longevidade e na qualidade de vida, temos o câncer. De acordo com os dados da IARC (*International Agency for Research on Cancer*), o câncer apresentou no ano de 2020 uma incidência de aproximadamente 19 milhões de casos em todo mundo com cerca de 10 milhões de mortes. Neste cenário, o câncer colorretal (CCR) apresenta-se como um dos mais prevalentes e incidentes (ZYGULSKA; PIERZCHALSKI, 2022).

O CRR representa um grupo heterogêneo de tumores (SCHNEIDER; LANGNER, 2014) que tem como fatores de risco a idade e a hereditariedade, porém, fatores relacionados a urbanização e ao estilo de vida também contribuem para o desenvolvimento desta doença. Estudos apontam que consumo excessivo de álcool, tabagismo, prática de atividade física insuficientes, além de dietas nutricionalmente incompletas, nas quais são ricas em carne vermelha e calorias, e pobres em fibras, mostram-se como fatores de risco determinantes, porém, modificáveis de acordo com os hábitos e o estilo de vida, podendo dessa forma também reduzir as chances de desenvolver a doença (LEWANDOWSKA *et al.*, 2022).

Os sintomas do CCR não são específicos e quando se manifestam já estão associados a tumores relativamente grandes e em estágio avançado, apresentando dessa forma, um prognóstico ruim, reduzindo assim a sobrevida e, conseqüentemente, a longevidade do paciente (BRENNER; KLOOR; POX, 2014; NIKOLAOU *et al.*, 2018). Por outro lado, a detecção em estágio inicial apresenta maiores chances de cura, reduzindo dessa forma a mortalidade (ZYGULSKA; PIERZCHALSKI, 2022).

Ainda é preciso mencionar que o câncer influencia de forma direta no estado físico e psicológico (LANG-ROLLIN; BERBERICH, 2018). A carcinogênese interfere de forma

negativa no bem-estar físico, social, mental e emocional, somado aos sintomas e efeitos colaterais precoces e tardios do tratamento oncológico, além de problemas nutricionais como a desnutrição, a sarcopenia, a caquexia e a resposta inflamatória sistêmica, frequentemente presentes em pacientes com CCR (MA *et al.*, 2021; NAYAK *et al.*, 2017). Em conjunto, esses sintomas levam a comprometimentos na qualidade e na extensão da vida (SHRESTHA *et al.*, 2019).

Visto que a longevidade é um fator ajustável, há espaço para estender a vida a partir de intervenções que melhorem a qualidade de vida de um modo geral e que possam prevenir doenças relacionadas à idade, em especial, o câncer colorretal (SEBASTIANI; PERLS, 2012). Estudos tem demonstrado ao longo dos anos que, a utilização de medicamentos, suplementos nutricionais e até mesmo perfis dietéticos específicos podem contribuir para a longevidade, visto que esses reduzem o risco de desenvolvimento de diferentes doenças e morbidades associadas (LONGO *et al.*, 2015; VAISERMAN; LUSHCHAK, 2017).

Nesse sentido, a utilização da dieta cetogênica (DC) vem sendo bastante estudada no contexto oncológico, apresentando efeitos promissores em relação a inibição do crescimento tumoral, aumento na toxicidade das terapias convencionais, proteção de células não diferenciadas, além de outros desfechos positivos (WANG; SUK; LIAO, 2020). O mecanismo de ação da DC ainda não está bem estabelecido, porém muitos estudos direcionam os resultados ao efeito Warburg (TRAN *et al.*, 2020), metabolismo dos corpos cetônicos séricos (POFF *et al.*, 2014), redução da insulina (LI *et al.*, 2019) e qualidade lipídica da dieta (KADOCHI *et al.*, 2017).

Atualmente uma das principais abordagens estabelecidas para diminuir a incidência de câncer é a quimioprevenção (LOOMANS-KROPP; UMAR, 2019). Visto que a utilização da DC ainda apresenta resultados heterogêneos em relação a sua utilização nesse contexto, além de seus mecanismos ainda não serem totalmente descritos (WEBER *et al.*, 2020), o presente pretende sanar estas lacunas com o objetivo de estudar os efeitos da DC na promoção da tumorigênese colorretal induzida em roedores.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 LONGEVIDADE E FATORES ASSOCIADOS

Segundo relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), a expectativa de vida global sofreu um aumento de mais de seis anos, passando de 66,8 anos em 2000 para 73,4 anos em 2019, porém, segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), em 2021 houve uma redução de três anos na expectativa de vida devido ao impacto da pandemia de COVID-19. Em relação a expectativa de vida saudável, esta passou de 58,3 anos para 63,7 anos. Entre as doenças consideradas as principais causas de morte no mundo estão as DCNTs na qual o câncer aparece como uma das principais (OMS, 2020). O câncer, em 2020, apresentou uma incidência de 19,3 milhões de novos casos e causou mais de 10 milhões de morte em todo mundo. Entre os diferentes tipos de tumores, o câncer colorretal é apontado como o terceiro câncer mais comumente diagnosticado e o segundo tipo principal de causa de morte por câncer (SUNG *et al.*, 2021).

Fatores genéticos, ambientais, sociais e econômicos são grandes influenciadores no processo saúde e doença, refletindo diretamente a expectativa e a qualidade de vida. Diante deste cenário, indivíduo longevos apresentam envelhecimento saudável, driblando as doenças relacionadas à idade como diabetes, doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos, câncer entre outros que apresentam alta morbidade e mortalidade (YANG *et al.*, 2017).

A longevidade pode ser definida pela obtenção de uma vida produtiva e de qualidade pelo maior tempo possível. Não há um limite de idade aceito para longevidade, mas a faixa etária de 85 anos é utilizada para esta caracterização, além da longevidade excepcional considerada acima de 95 anos e com uma vida saudável (MARTIN *et al.*, 2015; NEWMAN; MURABITO, 2013), essa é consequência da interação entre fatores genéticos herdados e influências ambientais (SANTOS-LOZANO *et al.*, 2016)

Devido ao aumento da população centenária, a longevidade vem tomando espaço e se tornando foco das pesquisas que trazem como base o mapeamento dos genes relacionados à longevidade, ao envelhecimento saudável e o modo como agem, bem como, estudos acerca da interação gene-ambiente, deixando cada vez mais claro a influência do material genético sob o desenvolvimento das doenças associadas a idade (SGARBIERI; PACHECO, 2017).

A longevidade é uma característica complexa e com progresso demográfico desigual, onde as condições sociais, e ambientais possuem influências significantes. Fatores como apoio social, saneamento básico, melhorias socioeconômicas, nível educacional, introdução

de antibióticos, criação e acesso às vacinas, avanços médicos e não médicos proporcionaram aumento da sobrevivência adulta e infantil, favorecendo a queda nas taxas de mortalidade e aumentando a expectativa de vida (MIAO *et al.*, 2022; SEBASTIAN; PERLS, 2012).

Ao contrário da longevidade, o envelhecimento populacional tem levado a uma alta prevalência de doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer. Uma vez acometidos por essas condições crônicas, a expectativa de vida tende a diminuir, sendo que uma redução média de 7,5 a 20 anos de vida é apontada para indivíduos no contexto oncológico (CAPOCACCIA; GATTA; DAL MASO, 2015). Além disso, os sobreviventes de câncer convivem com efeitos tardios dos tratamentos de quimioterapia, radioterapia e cirurgias, tendendo os pacientes a sofrerem prejuízos na saúde geral, implicando em sofrimento físico e psicológico, além de problemas nutricionais com consequente redução da qualidade de vida (LECHELT *et al.*, 2018).

A redução da expectativa e qualidade de vida são fatores que influenciam de forma direta na extensão da vida. Dessa forma, é evidente que o câncer interfere na longevidade e torna-se emergente a necessidade de estratégias que reduzam a incidência dessa doença, que melhorem a qualidade de vida dos pacientes submetidos aos tratamentos convencionais, e, que, principalmente previnam o seu desenvolvimento (RAPPANGE; BROUWER; VAN EXEL, 2016). O estilo de vida saudável se mostra uma estratégia precisa na redução das DCNT, melhorando a qualidade de vida, aumentando sua expectativa e potencializando a longevidade (LI *et al.*, 2020). Diante deste cenário, a nutrição, um dos principais pilares do estilo de vida, com seu efeito epigenético possui a capacidade de modular a expressão de genes característicos envolvidos no processo de carcinogênese, fator crucial para a redução dos encargos com a saúde, baseado na prevenção de desenvolvimento da doença (GALOW; PELEG, 2022; REA *et al.*, 2015;).

2.2 PAPEL DA NUTRIÇÃO NA SAÚDE E LONGEVIDADE

Componentes dietéticos são capazes de modular vias metabólicas e atividades celulares de um organismo, de modo que, dietas e nutrientes específicos possuem efeitos sob o processo de crescimento e envelhecimento (KITADA *et al.*, 2019). Segundo Ekmekcioglu (2020), entre as principais estratégias e/ou compostos bioativos presentes no alimentos relacionados a longevidade e ao antienvhecimento, a restrição calórica é apresentada como um dos principais métodos estudados, pois apresenta efeitos benéficos sobre o peso corporal, inibindo a obesidade e o avanço da instabilidade genômica (HOFFMEISTER *et al.* 2013), o

encurtamento telomérico (VALDES *et al.* 2005), as alterações nos marcadores epigenéticos (ROHDE *et al.* 2019), a perda de proteases (CAVADAS *et al.* 2016), o desequilíbrio nutricional (BETTEDI; FOUKAS 2017), a disfunção mitocondrial (SRIPETCHWANDEE *et al.*, 2018), vias moleculares importantes para indução da senescência celular (BURTON; FARAGHER 2018), a exaustão de células-tronco (LI *et al.*, 2012) e as alterações na comunicação intracelular (LOPEZ-OTIN *et al.* 2013; NAGAREDDY *et al.* 2014).

A restrição de proteína e de metionina também já foram apontadas como associadas à redução de tumores e ao aumento da longevidade, pois, levam a redução dos níveis de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*IGF-1*) (*insulin-like growth factor 1*) e da proteína ligadora IGF-I tipo 3 (IGFBP-3) (*insulin-like growth factor binding protein 3*) (FONTANA *et al.*, 2006; FONTANA *et al.* 2008). Destaca-se também a supressão do alvo mTOR (*mechanistic target of rapamycin kinase*) (JOHNSON *et al.*, 2013; WEICHHART, 2018), ativação de *O* FOXO (*Forkhead box*) (FONTANA; PARTRIDGE 2015; MURTAZA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2014; WEBB; BRUNET 2014;) ativação da AMPK (*AMP-activated protein kinase*) (APFELD *et al.* 2004; TEMPLEMAN; MURPHY 2018) e indução de autofagia como possíveis mecanismos envolvidos na longevidade (MADEO *et al.*, 2015).

Embora muitas estratégias e componentes da dieta ainda precisem de maiores estudos que comprovem seus efeitos em humanos, o consumo de alimentos ricos em espermidina por exemplo, pode ser uma estratégia antienvelhecimento, visto que este bioativo elimina radicais livre, induz a autofagia citoprotetora, influencia positivamente funções enzimáticas e aumenta a apoptose (BARDÓCZ *et al.*, 1995; IGARASHI; KASHIWAGI 2010; MADEO *et al.*, 2018; PEGG, 2016). Outro exemplo pode ser dado pelo resveratrol, um polifenol que possui efeito antioxidante, anti-inflamatório e citoprotetor (KULKARNI; CANTO 2015; LI *et al.*, 2018), sendo também um nutriente importante contra doenças relacionadas a idade (SEALS *et al.*, 2016). Em uma análise com 60 pacientes, se mostrou que a associação entre interferon β -1a (IFN- β 1), fármaco usado no tratamento da esclerose múltipla, e suplementação dietética de 200 mg/dia de coenzima Q10, durante um período de três meses, foi capaz de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), alterar o ambiente sanguíneo para um perfil anti-inflamatório e proporcionar melhora clínica dos sintomas depressivos, incapacidade, dor e fadiga (MOCCIA *et al.*, 2019). Em um outro estudo, foi avaliado o papel das protocianidinas de sementes de uva na inflamação hepática induzida por cádmio visto que esse é um dos materiais mais tóxicos liberados no meio ambiente. Nesse trabalho, ratos Wistar receberam oralmente 100 mg/kg p.c. de protocianidinas de sementes de uva em solução salina uma vez ao dia por quatro semanas consecutivas, e dose hepatotóxica de cádmio de 5 mg/kg p.c./dia,

por 28 dias. Após o período experimental pode-se observar que protocianidinas de sementes de uva apresentaram proteção contra hepatotoxicidade induzida por cádmio, recuperando os danos no DNA hepático, reduzindo a inflamação, neutralizando alterações bioquímicas e estruturais nas mitocôndrias, devido às suas propriedades antioxidantes e quelantes de metais, promovendo eliminação de radicais livres (MILTONPRABU; NAZIMABASHIR; MANOHARAN, 2016). Dessa forma, muitos outros compostos tem demonstrado serem capazes de proteger o genoma de alterações fenotípicas e funcionais advindas da idade prevenindo ou reduzindo a incidência de doenças e estendendo a vida útil (LEE *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2022; ZHENG *et al.*, 2022)

Por outro lado, componentes alimentares característicos da dieta ocidental como gordura hidrogenada, carboidratos refinados, sódio e fósforo presentes em grandes quantidades em refrigerantes, alimentos fritos, carnes e produtos industrializados, doces e grãos refinados (MOVASSAGH; VATANPARAST, 2017) se apresentam como relacionados com o desenvolvimento de obesidade, doença intestinal inflamatória, doenças metabólicas e vários tipos de câncer (DIANATINASAB *et al.*, 2020). Como já mencionado, todas estas doenças ameaçam reduzir a qualidade e a expectativa de vida, impondo assim um grave ônus à longevidade (HOSSAIN; KAWAR; EL NAHAS, 2009).

De modo geral, apesar de a literatura apontar diversos compostos geroprotetores, não há um padrão dietético estabelecido, grupos alimentares e alimentos com doses e quantidades específicas que levem a longevidade. Considera-se que é necessária uma alimentação saudável, na qual atenda os “princípios da alimentação” em qualidade, quantidade, adequação e harmonia, sendo suficiente em calorias e nutrientes, respeitando as diferenças individuais e/ou coletivas relativas a características biológicas, socioeconômicas e culturais (BRASIL, 2012).

Além dos bioativos apontados como geroprotetores, diversas dietas têm sido associadas à melhora da qualidade de vida e conseqüentemente aumento da longevidade. A abordagem dietética para interromper a hipertensão (*Dietary Approach to Stop Hypertension*) (DASH) é caracterizada pela combinação de frutas, vegetais e laticínios com baixo teor de gordura, conteúdo reduzido de gordura total, saturada e colesterol, além de quantidades consideráveis de grãos inteiros, nozes, aves e peixes que além de controlar a pressão arterial, também promovem perda de peso, redução da circunferência abdominal, diminuição da concentração plasmática de triglicerídeos e da lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoproteins-VLDL*), melhora no estado mineral ósseo, traz menor risco de danos renais e diabetes tipo 1 e tipo 2. Quando associada à prática de exercícios físicos melhora à sensibilidade à insulina e reduz a concentração sérica de ácido úrico (SURI *et al.*, 2020).

As dietas do mediterrâneo e paleolítica também podem influenciar positivamente no metabolismo fisiopatológico reduzindo os fatores de risco para a saúde. A dieta mediterrânea refere-se ao padrão dietético sustentável, rico em vitaminas, fitoquímicos e minerais dos países e populações que vivem na bacia do Mar Mediterrâneo, sendo reconhecida com um exemplo alimentar saudável pelas diretrizes dietéticas americanas de 2015-2020 (MCGUIRE, 2015). Essa dieta prioriza o consumo de alimentos *in natura* como vegetais, leguminosas e frutas, considera-se a ingestão moderada de bebida alcoólica fermentada como vinho tinto e apresenta consumo de baixo a moderado de peixes e aves (BARQUERO *et al.*, 2020). Já a dieta paleolítica é baseada nos padrões alimentares de 2,6 milhões a 10 mil anos atrás, período anterior à agricultura industrial. Nessa época a alimentação era diversificada, dependente da localização geográfica, clima e disponibilidade de alimentos (MENEZES *et al.*, 2019). Atualmente a dieta paleolítica moderna compartilha vários componentes de outras dietas saudáveis como alto consumo de alimentos *in natura* como carnes magras, peixes e ovos, nozes e sementes, além da exclusão de alimentos processados, laticínios e alguns óleos vegetais (KLEMENT; PAZIENZA, 2019).

2.3 DIETA CETOGÊNICA (DC)

Entre as estratégias dietéticas que podem ser exploradas também no âmbito da longevidade, está a dieta cetogênica, desenvolvida originalmente em 1921 pelo Dr. Wilder na Clínica Mayo, a partir de percepções de que assim como o jejum, uma dieta composta em sua maioria por gordura também seria eficaz na supressão de convulsões. Dessa maneira, a dieta cetogênica se tornou popular no tratamento de epilepsia, mas com o surgimento, disponibilidade e praticidade dos medicamentos anticonvulsivantes orais, caiu em desuso, visto que apresenta perfil alimentar rigoroso e exigente. Nos últimos anos, diversos estudos têm comprovado os efeitos desse perfil dietético no tratamento da epilepsia resistente a medicamentos e outras doenças neurológicas (ROGAWSKI *et al.*, 2016), além de especulações no campo oncológico (KLEMENT; PAZIENZA, 2019).

De forma geral, a dieta cetogênica apresenta alto teor de gordura, fornece proteína suficiente para o crescimento e desenvolvimento celular e possui baixo teor de carboidrato produzindo corpos cetônicos (β -hidroxibutirato e acetoacetato) no fígado, na matriz mitocondrial dos hepatócitos. A partir da dieta cetogênica clássica, novas variantes foram surgindo, seguindo o mesmo padrão de distribuição de macronutrientes, mas alterando suas fontes (ULAMEK-KOZIOL *et al.*, 2019). Assim, dentro das dietas cetogênicas, uma série de

variações são descritas como a dieta cetogênica clássica (DCC), dieta Atkins modificada (DAM), dieta cetogênica com triglicerídeos de cadeia média (DCTCM) e dieta cetogênica com baixo índice glicêmico (DCIG).

A DCC foi a primeira dieta cetogênica a ser introduzida no tratamento da epilepsia refratária, tanto em crianças como em adultos. Esse perfil dietético induz a cetose por apresentar em sua composição 80% a 90% de gordura, 6% a 8% de proteínas e 2% a 4% de carboidratos (VERROTTI *et al.*, 2020), apresentando uma proporção de 4:1, sendo 4 gramas de ácidos graxos para cada grama da soma de proteína e carboidrato (NONINO-BORGES *et al.*, 2004). Essa proporção pode ser alterada para 3,5:1 ou 3:1, conforme a necessidade. Neste modelo, o consumo de frutas, verduras, leites e derivados é reduzido, sendo necessário a utilização de complexos vitamínicos e suplementos minerais (VERROTTI *et al.*, 2020).

Em 1970, Robert C. Atkins desenvolveu uma dieta para perda de peso restrita em carboidrato chamada de Dieta Atkins modificada (DAM). Posteriormente, essa dieta foi alterada por apresentar potencial no tratamento e controle de convulsões. Diferente da dieta cetogênica clássica, a DAM proporciona maior palatabilidade contendo em torno de 65% de gordura, 25% de proteína e 10% de carboidrato limitando-se a 10–20 g/dia em crianças e 15–20 g/dia em adultos. A DAM apresenta proporção de 1:1 de gordura para carboidratos mais proteínas, proporcionando assim maior flexibilidade, além de não exigir restrição calórica de líquidos e de proteínas. É uma boa opção para pacientes que não conseguem tolerar uma dieta mais restritiva como a dieta cetogênica clássica (MEIRA *et al.*, 2019).

A Dieta cetogênica com triglicerídeos com cadeia média (DCTCM) é uma variante da dieta cetogênica clássica, baseada no fornecimento de calorias predominantemente por meio de triglicerídeos de cadeia média (TCM), tendo como fonte principal os óleos de coco e palma (WELLS *et al.*, 2020). A Dieta cetogênica baseada em TCM possui maior potencial cetogênico do que dieta cetogênica a base de triglicerídeos de cadeia longa (TCL), pois os TCMs são absorvidos e atingem o fígado rapidamente. A maior produção de cetonas faz com que nessa variante seja permitido uma maior quantidade de carboidratos e proteínas, sendo constituída por 30% a 60% gordura (em média 30% TCM), 10% de proteína e 15% a 19% de carboidratos, o que torna a dieta mais palatável e provavelmente resultando maior diversidade nas escolhas alimentares (GOSWAMI; SHARMA, 2019).

Outro modelo de dieta cetogênica é a de baixo índice glicêmico (DCIG), utilizada pela primeira vez em 2005 para reduzir o limiar de convulsão no Massachusetts General Hospital, Boston (EUA). Esse perfil dietético possui uma maior quantidade de carboidratos de 40g a 60g, restringindo-se a alimentos com índice glicêmico (IG) inferior a 50, como carnes,

laticínios, algumas frutas, alguns vegetais e alguns grãos inteiros não processados, com o objetivo de evitar o aumento da glicose pós-prandial, além de apresentar quantidades irrestritas de gordura e proteína, apresentando uma proporção de 1:0,6 de gordura para carboidrato mais proteína (WELLS *et al.*, 2020).

De maneira geral, a dieta cetogênica em suas diversas variações, quando bem tolerada, apresenta benefícios, porém, geralmente, apresenta efeitos adversos quando é estendida por muito tempo. Entre eles destacam-se efeitos gastrointestinais, principalmente em crianças, como náuseas, vômitos, diarreia e constipação, especialmente durante a fase de iniciação. Pode haver alterações bioquímicas como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e níveis reduzidos de lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein*) (HDL) (GOSWAMI; SHARMA, 2019). A energia gerada na dieta cetogênica é em média 90% advinda de gordura, 6% de proteína e apenas 4% de carboidrato. Essa restrição de carboidrato desencadeia mudanças metabólicas fazendo com que o ácido graxo seja a principal fonte de energia para o corpo e simultaneamente eleva a produção de corpos cetônicos, principalmente acetoacetato e β -hidroxibutirato (β HB), levando a condição de cetose (ULAMEK-KOZIOL *et al.*, 2019). Com tais características, muito vem se estudando sobre o potencial da dieta cetogênica na oncologia, bem como sua viabilidade e os possíveis mecanismos envolvidos. Muitas pesquisas apontam diferentes efeitos desse perfil dietético sob a carcinogênese, necessitando assim mais estudos conclusivos para que seu papel seja devidamente estabelecido (ZHANG *et al.*, 2018).

2.4 CÂNCER: UM PROCESSO “MULTI-ETAPAS”

O processo de carcinogênese caracteriza uma doença agressiva e maligna, na qual é caracterizada, principalmente pela proliferação celular descontrolada levando ao desenvolvimento de tumores com potencial metastático, oriundo de mutações. A mutação, evento inicial no processo de transformação maligna, têm íntima correlação com a frequência, exposição e interação de carcinógenos ambientais com o material genético, levando à ativação dos oncogenes, inativação dos genes supressores de tumor e de reparo, transformando as células normais em cancerosas (SAHU *et al.*, 2021; SENGA; GROSE, 2021). De maneira geral, a etiologia do câncer é variada e convenientemente associada ao estilo de vida (fatores extrínsecos) como tabagismo, exposição solar, alimentação inadequada etc. Para grande parte dos tumores, há também os fatores intrínsecos, ditos não modificáveis, que se referem a mutações espontâneas inevitáveis que surgem como resultado de erros aleatórios na replicação do DNA (WU *et al.*, 2018).

O processo da carcinogênese se dá em etapas sendo a iniciação o primeiro estágio, favorecida pela predisposição e susceptibilidade das células normais em se tornarem malignas. A expansão clonal de células iniciadas leva a um aumento no número de novas células, mas não na diferenciação destas, apesar de nesta fase já haver inibição de apoptose. Quando a divisão celular ocorre, antes que os sistemas de reparo de DNA possam agir, a lesão torna-se permanente e irreversível e, nessa fase, as células iniciadas podem permanecer latentes por semanas, meses ou anos (OLIVEIRA *et al.*, 2007; PATTERSON *et al.*, 2018). Na fase seguinte, chamada de promoção, os carcinógenos atuam na alteração do genoma, aumentando a proliferação celular e consequentemente a probabilidade de alterações genéticas adicionais nas células iniciadas, isto é, uma segunda mutação, o que leva à etapa subsequente de progressão do tumor. Ao contrário da iniciação, a promoção é um estágio reversível, é uma fase que pode ser moldada por fatores fisiológicos e, portanto, limitar a extensão da carcinogênese (OLIVEIRA *et al.*, 2007; PATTERSON *et al.*, 2018). O último estágio é a progressão, quando as células ou aglomerados celulares já apresentam características malignas, proliferação celular independente, irreversibilidade, instabilidade genética, crescimento descontrolado, invasão, metastização, e mudanças nas características bioquímicas, metabólicas e morfológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2007; PATTERSON *et al.*, 2018). A partir daí, apresentam-se como marcas do câncer a auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anti-crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG; 2000). Além destas, instabilidade genômica, inflamação, capacidade de reprogramação do metabolismo energético e evasão da resposta imune podem facilitar o desenvolvimento e a progressão de tumores (HANAHAN E WEINBERG; 2011). Mais recentemente acrescenta-se a estas marcas, a capacidade de disdiferenciação e transdiferenciação, desregulação epigenética, alterações no microbioma e sinalização neural alterada (SENGA; GROSE, 2021).

Dados sobre a mortalidade do câncer no Brasil confirmam que a doença é uma das que mais interferem na longevidade e na qualidade de vida, visto que sua terapêutica desencadeia inúmeros efeitos colaterais influenciando nas condições de vida e no envelhecimento saudável (SELUANOV *et al.*, 2019). Segundo Csiszar *et al.* (2019), metade dos cânceres são diagnosticados em pacientes com mais de 70 anos, explicado pela sobreposição dos mecanismos de carcinogênese como instabilidade genômica, aumento do estresse oxidativo, mudanças epigenéticas, proteostase alterada, diminuição da sensibilidade e do metabolismo de nutrientes e mudanças nas vias de senescência que estão também envolvidas no envelhecimento.

Diante de tais condições, a quimioprevenção se mostra como estratégia sublime para reduzir a carga de câncer global, sendo este, fator importante para potencializar a longevidade. Nesse contexto, investigar novos modelos dietéticos para prevenir a malignidade em populações saudáveis se mostra uma alternativa atraente por possivelmente apresentarem bom perfil de segurança, enquanto as drogas sintéticas desencadeiam efeitos colaterais graves (KLEIN *et al.*, 2011).

2.5. POTENCIAIS EFEITOS DA DIETA CETOGÊNICA NAS CÉLULAS CANCEROSAS

A dieta cetogênica demonstra ser benéfica não apenas no tratamento antiepiléptico. Esse perfil dietético também vem mostrando efeitos sobre a carcinogênese, onde alguns estudos que se concentram nesta área de pesquisa têm demonstrado resultados ainda obscuros e, até certo ponto, controversos. No entanto, experimentos em modelos celulares e animais apontam inibição do crescimento tumoral, proteção às células saudáveis dos danos da quimioterapia e radioterapia, além do aumento de toxicidade em células cancerosas. Embora os mecanismos por trás dos efeitos descritos ainda não sejam completamente esclarecidos, esta ainda é uma dieta sugerida como terapia adjuvante (WANG *et al.*, 2020).

Quando submetidas à cetose, as células cancerosas sofrem mudanças metabólicas conhecidas como “efeito Warburg”, descrito pela primeira vez por Otto Warburg ao observar que os tumores requerem maior necessidade de glicose quando comparados com tecidos normais (WARBURG, 1956). O Efeito Warburg consiste no processo de glicólise aeróbica, onde a glicose é fermentada para produzir lactato, mesmo na presença de oxigênio, oferecendo suporte e ambiente metabolicamente favorável para o crescimento e proliferação celular. Diante disso, foi concluído que as células tumorais poderiam ser combatidas com a privação de oxigênio e de energia advinda dos carboidratos (TRAN *et al.*, 2020). Deste modo, a dieta cetogênica pode direcionar ao efeito de Warburg, visto que é uma dieta com baixo teor de carboidrato e que induz a redução dos níveis séricos de glicose, o que esgotaria as fontes de energia rápida (glicose) das células tumorais. O alto teor de gordura desse perfil dietético eleva a oxidação de ácidos graxos levando a altas taxas de acetil-CoA e aumento na produção dos corpos cetônicos que são utilizados prontamente como fonte de energia alternativa para os tecidos normais (WOOLF *et al.*, 2016). Este é um novo paradigma terapêutico que apresenta uma abordagem racional, mas com suporte praticamente empírico e com sucesso limitado (HAGIHARA *et al.*, 2020; WEBER *et al.*, 2020).

Apesar do potencial de utilização da dieta cetogênica como terapia coadjuvante para o tratamento do câncer, há experimentos que apontam que a dieta cetogênica não mostra eficácia e apresenta, inclusive, efeitos pró-tumorais e colaterais graves (WEBER *et al.*, 2020). Segundo Liskiewicz *et al.* (2016) a dieta cetogênica, por possuir um alto teor de lipídeos, quando usada a longo prazo (de seis a oito meses), pode aumentar o crescimento tumoral a partir da ativação de proteínas da via das quinases ativadas por mitógeno (*mitogen-activated protein kinases*) (MAPK) e da mTOR, nas quais se revelaram hiperativadas dentro das lesões tumorais, além de apresentar maior fosforilação nos grupos tratados com dieta cetogênica a longo prazo. Acredita-se que esses efeitos controversos se dão devido a heterogeneidade dos tumores e tempo de tratamento, de modo que, alguns podem não apresentar exclusivamente necessidade de glicose, utilizando outros compostos como fonte de energia e como substrato para proliferação celular, além de responderem de formas diferentes à dieta cetogênica, mesmo compartilhando a mesma assinatura metabólica (SPERRY *et al.*, 2020).

A hiperinsulinemia também é um fator de risco para o câncer. Essa condição é capaz de aumentar de forma considerável os níveis de espécie reativa de oxigênio (ERO), resultando na perda da homeostase redox e contribuindo para danos no DNA e mutações genéticas (LIN; CHUANG; ZUO, 2017). Essa condição também promove acúmulo aberrante e uma alta expressão de β -catenina, sendo este um sinal para iniciação e progressão tumoral, especialmente na carcinogênese colorretal (LI *et al.*, 2019; TRAN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2017). Ademais, estudos com células epiteliais intestinais mostram que a partir do momento em que a insulina se liga ao seu receptor na superfície de células cancerosas além de estimular seu crescimento, também é capaz de inibir a apoptose, dessa forma, esses fatores mostram ter importante influência no desenvolvimento da carcinogênese (SUN; JIN, 2008; TRAN *et al.*, 2006). A diminuição dos níveis de insulina, que geralmente acompanha a condição de cetose, provavelmente, faz-se reduzidas as chances de efeitos carcinogênicos e mutagênicos, visto que excesso de insulina, consequência do estilo de vida, incluindo a má qualidade da alimentação, é um fator de risco para diferentes tipos de câncer (ZHANG *et al.*, 2021).

Com relação a elevação dos corpos cetônicos, proporcionado pela dieta cetogênica a partir da restrição de carboidrato, alguns estudos apontam que o estado de cetose seja o elemento fundamental na eficácia anticancerígena da dieta cetogênica (POFF *et al.*, 2014), uma vez que o organismo nessa situação é capaz de reduzir atividade inflamatória (NAKAMURA *et al.*, 2018), aumentar a tolerância de células não diferenciadas à hipóxia (SEYFRIED *et al.*, 2003), além de diminuir a viabilidade e proliferação de células diferenciadas, resultados esses evidentes tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* (POFF *et al.*, 2014). Estudos especulam

ainda que, as células cancerosas possuem uma disfunção mitocondrial além de expressão reduzida de enzimas cetolítica, ambos processos importantes para metabolismo das cetonas (DABEK *et al.*, 2020). Em contrapartida, trabalhos sugerem que os corpos cetônicos servem como substrato energético para alguns tipos de cânceres, e assim, contribuam para o desenvolvimento tumoral (BONUCCELLI *et al.*, 2010; XIA *et al.*, 2017). A discrepância entre esses achados se dá justamente pela heterogeneidade dos tumores, expressões variadas de enzimas-chave e individualidade metabólica dos tumores (CHANG; OLSON; SCHWARTZ, 2013).

Embora ainda inconclusivos, muitos estudos vêm demonstrado o papel promissor da dieta cetogênica na redução do crescimento de tumor, proteção das células normais contra a quimioterapia e sensibilização das células cancerosas ao tratamento (LEE *et al.*, 2012). Khodadadi *et al.* (2017) apontam os resultados da dieta cetogênica sob as células tumorais em modelos animais. Entre os achados foi possível observar que a dieta cetogênica aumentou significativamente o tempo de sobrevivência e promoveu redução do crescimento tumoral (ALLEN *et al.*, 2013; KLEMENT RJ, 2013; OTTO *et al.*, 2008). Hao *et al.* (2015) demonstraram que a dieta cetogênica rica em ácidos graxos ômega-3, TCM e banha de porco retardou o crescimento de tumor colorretal, quando comparados com grupo controle.

Considerando os aspectos controversos apresentados acerca da dieta cetogênica e seus efeitos sobre células tumorais, faz-se relevante estudar sua ação e compreender os mecanismos propostos por trás dos efeitos terapêuticos apresentados em trabalhos da literatura sob o processo de carcinogênese.

2.6 CÂNCER COLORRETAL: ASPECTOS MOLECULARES E PROBLEMÁTICA DOS TRATAMENTOS

Entre os tipos tumorais mais associados ao envelhecimento está o câncer colorretal (CCR) que abrange os tumores que atingem da porção inicial do intestino (colón) até sua porção final (reto). Quase metade dos casos de câncer colorretal podem ser evitados a partir da associação entre alimentação saudável, prática de atividade física e manutenção de peso adequado. É importante ressaltar o consumo de fibras dentro da alimentação saudável, pois este apresenta papel relevante na proteção e redução dos riscos de CCR. As fibras aumentam o bolo fecal e promovem a diluição dos carcinógenos presentes na dieta no qual o epitélio intestinal está exposto, além de seu efeito prebiótico e sua ação na metabolização da microbiota intestinal (LOKE *et al.* 2020). O risco elevado de CCR está associado também à ingestão

excessiva de carne vermelha e processada além de gorduras saturadas. O alto consumo de carne vermelha está associado, dada à presença de ferro heme e ao cozimento em altas temperaturas, que produz aminas heterocíclicas aromáticas e hidrocarbonetos policíclicos com propriedades carcinogênicas (SAFIRI *et al.*, 2019; SANTARELLI *et al.*, 2008).

O câncer colorretal é o terceiro mais diagnosticado em todo o mundo e uma das principais causas de mortalidade e morbidade. Estima-se que até o ano de 2035, o número total de mortes por câncer de reto e cólon aumentará em 60% e 71,5%, respectivamente (DOUAIHER *et al.*, 2017). De acordo com a GLOBOCAN, houve mais de 1,9 milhão de novos casos de CCR em 2020 (SUNG *et al.*, 2021). À essas estatísticas foram atribuídas o maior envelhecimento populacional, maior exposição aos fatores de risco como tabagismo, sedentarismo, obesidade e qualidade da alimentação (TESTA *et al.*, 2018). O Brasil é o país da América do Sul com maior número estimado de casos em ambos os sexos e em todas as idades. Nos últimos 5 anos, o país apresentou 141.004 casos, sendo mais prevalente em mulheres (51,36%) do que em homens (48,63%), de acordo com IARC (2020).

Grande parte dos casos de câncer de colón e reto surgem a partir de um pólipó. Inicia-se com a cripta aberrante, na qual progride para um adenoma inicial, em seguida adenoma avançado, até se tornar um tumor maligno. Esse processo é impulsionado pelas alterações genéticas e epigenéticas que ativam os oncogenes e inativam os genes supressores de tumor, conduzindo a transformações celulares que levam de 10 a 15 anos para se manifestar, podendo progredir com maior rapidez dependendo do ambiente (KUIPERS *et al.*, 2015). No processo de desenvolvimento do CCR por meio da conversão do epitélio colônico normal em adenocarcinoma há a perda de função no gene *APC* (5q) (*APC regulator of WNT signaling pathway*) que ocorre em mais de 70% dos adenomas, há ganho de função do oncogene *KRAS* (12p12) (*RAS protooncogene, GTPase*) que favorece a progressão para adenoma, além, da perda de função dos genes supressores de tumor *TP53* (17p) (*tumor protein p53*) e *DCC* (18q) (*DCC netrin 1 receptor*), favorecendo assim a transição de adenoma a adenocarcinoma (FEARON E VOGELSTEIN, 1990; TESTA; PELOSI; CASTELLI, 2018). Em relação as alterações epigenéticas, a metilação do DNA é o processo mais estudado e já foram apontados diversos genes metilados de forma aberrante em CCR, incluindo genes da via de sinalização Wnt, tais como *APC*, *AXIN2* (*axin 2*), *DKK1* (*ickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1*), *SFRP1* (*secreted frizzled related protein 1*), *SFRP2* (*secreted frizzled related protein 2*), *WNT5A* (*Wnt family member 5A*), genes de reparo de DNA (*MGMT* (*O-6methylguanine-DNA methyltransferase*), *hMLH1* (*mutL homolog 1*) e *hMLH2* (*PMS1 homolog 1*)), genes relacionados com o ciclo celular [(*CDKN2A-INK4a* (p14) (*cyclin dependent kinase inhibitor*

2A), *CDKN2AA-INK4b (p15) (cyclin dependent kinase inhibitor 4b)*, *CDKN2A-ARF (p16) (cyclin dependent kinase inhibitor ARF)* e a sinalização RAS (Rat Sarcoma vírus) (*RASSF1A (Ras association domain family 1 A)* e *RASSF1B (ras association domain family)*) (COPPEDÈ, 2014).

O diagnóstico do CCR é realizado por análise histopatológica do cólon (colonoscopia), onde são atribuídas um grau de malignidade às lesões observadas (RATHORE *et al.*, 2013). A taxa de sobrevida em 5 anos é de 90% caso diagnosticado precocemente (BRENNER *et al.*, 2014), quando diagnosticados tardiamente este apresenta prognóstico ruim, abaixo de 50% (NIKOLAOU *et al.*, 2018), reduzindo a sobrevida para 14% (BRENNER *et al.*, 2014). Quanto ao tratamento, além da cirurgia, é amplamente empregada a quimioterapia que traz inúmeros efeitos colaterais, dentre eles a ação não seletiva dos quimioterápicos que atingem todas as células que apresentam divisão rápida como células do folículo piloso, mucosa, membrana da cavidade oral e do trato gastrointestinal, eritrócitos e leucócitos (GERBER, 2008). Além disso a maioria das drogas anticâncer tem efeito apenas antiproliferativo, demonstrando pouco efeito sobre processos posteriores como invasão e metástase (PENNY; WALLACE, 2015).

Diante de tais evidências, da problemática do diagnóstico tardio e dos tratamentos invasivos, a quimioprevenção surge como uma estratégia interessante para prevenir e frear o desenvolvimento do câncer. A quimioprevenção se caracteriza pelo uso de agentes bloqueadores que inibem o desenvolvimento de células neoplásicas e de agentes supressores que desregulam a promoção e progressão das células neoplásicas já iniciadas (PENNY; WALLACE, 2015). As abordagens quimiopreventivas podem ser classificadas em primárias, secundárias e terciárias. A quimioprevenção primária é aquela aplicada com o intuito de prevenir lesões precursoras da carcinogênese (mutações) sendo direcionada à população saudável ou que possui determinados fatores de risco. A abordagem secundária, tem o objetivo de regredir e evitar a doença invasiva, focando nos indivíduos com lesões pré-malignas. Já a quimioprevenção em sua forma terciária possui o objetivo de impedir a recorrência ou o surgimento de novos tumores, sendo destinada aos pacientes já diagnosticados e tratados na fase inicial (PENNY; WALLACE, 2015). Muitos dos agentes com potencial quimiopreventivo são componentes dietéticos, facilmente encontrados nos alimentos de maneira isolada ou conjunta na forma de dieta.

Muitos compostos alimentares que atuam na prevenção e ou bloqueio do início da carcinogênese ainda não tem seus mecanismos claros e estabelecidos, mas sabe-se que a dieta e os hábitos nutricionais são fortemente associados ao câncer colorretal. A tumorigênese colorretal é acompanhada pelo processo inflamatório que pode ser modulado por compostos

alimentares específicos que possuem efeito na fase de iniciação, mas também efeito na promoção da carcinogênese (PAN *et al.*, 2011; PIAZZI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2020) A obesidade, principalmente relacionada com adiposidade visceral se torna um fator de risco adicional associado a incidência de câncer colorretal. Ainda assim, o estilo de vida saudável pode reverter esse quadro por meio da modulação da microbiota intestinal que por sua vez converte componentes alimentares em metabólitos que atuam como reguladores epigenéticos no câncer, bem como a absorção de nutrientes e recuperação epitelial (CORNÓ *et al.*, 2017). Considerando os aspectos aqui relacionados sobre a biologia do câncer colorretal a pesquisa de novas estratégias que possam reduzir sua ocorrência, associadas à identificação de alterações genéticas no tumor após a exposição é de suma importância para o entendimento dos mecanismos de ação para que se possa recomendar de forma segura e eficaz tal estratégia nutricional, seja para pacientes oncológicos em tratamento, seja para grupos de risco oncológico (WEBER *et al.*, 2020).

3 JUSTIFICATIVA

A incidência do CCR, tem aumentado em todo o mundo de modo que a maioria dos casos são condicionados à fatores ambientais que envolvem o estilo de vida que, em grande parte são modificáveis, podendo influenciar também nos tumores em desenvolvimento. Devido a maioria dos pacientes serem assintomáticos ou apresentarem sintomas inespecíficos nos estágios iniciais da doença, o prognóstico é ruim, tornando a intervenção terapêutica bastante agressiva e ainda, pouco efetiva, que de certa forma acaba por agravar a condição do paciente devido aos seus efeitos tóxicos, citotoxicidade sistêmica e resistência às drogas quimioterapêuticas. Essa prática retrata e confirma a problemática de que o câncer colorretal é uma doença que interfere na qualidade de vida e conseqüentemente, na longevidade e no envelhecimento saudável (SELUANOV *et al.*, 2019).

Torna-se cada vez mais evidente que a nutrição e a dietética são consideradas um dos fatores externos mais influentes na ocorrência de doenças. Esses se associam com a oncologia como fator de risco para seu desenvolvimento, especialmente quando a alimentação é baseada em uma dieta rica em alimentos ultraprocessados, de alta energia e baixo teor de nutrientes, afetando a atividade transcricional e a expressão de diversos genes. O perfil alimentar, dependendo de sua qualidade e quantidade também se apresenta como fator protetor, pois determinados compostos presentes nos alimentos dispõem da capacidade de direcionar, tratar e prevenir o precoce aparecimento do câncer, podendo alguns perfis dietéticos até contribuir como estratégias terapêuticas adjuvantes (DANIEL; TOLLEFSBOL, 2015).

Considerando ser o efeito Warburg uma propriedade importante, muitas pesquisas têm estudado a aplicação da dieta cetogênica nos diferentes tipos de cânceres, principalmente no que tange ao tratamento oncológico (LEE *et al.*, 2012; VAN DER LOUW *et al.*, 2019). Estudos apontam que a DC possui um papel adjuvante no tratamento e apresenta resultados que poderiam auxiliar na melhora da qualidade de vida durante os tratamentos convencionais, além de inibir o crescimento tumoral, prolongar a longevidade e reduzir metástases em modelo animal (ALLEN *et al.*, 2013; KASUMI; SATO, 2019; KHODADAD *et al.*, 2017; POFF *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2020;). Apesar destes dados, os mecanismos de modulação em que se relacionam perfil dietético cetogênico e a carcinogênese não são completamente estabelecidos.

Diante destes achados, faz-se necessário não só descrever melhor a influência que a DC tem sob a promoção da carcinogênese colônica, mas também esclarecer os mecanismos envolvidos. Considerando que os casos de câncer colorretal vem aumentando anualmente e que este aumento influencia diretamente na longevidade, estudos de novos métodos que

trabalhem a prevenção desta patologia são bem-vindos. Baseado nos resultados já encontrados sobre a DC e câncer, torna-se plausível estudar também suas variantes e seu efeito protetor, visto que estudos comparativos nessa vertente são escassos na literatura e este perfil dietético já possui resultados significativos na terapêutica, controle e proteção de outras patologias, além de que, apresenta baixo custo e fácil acesso. Esta avaliação contribui para esclarecer os efeitos da DC sobre a tumorigênese colorretal e fornecer prévias informações para outros estudos que possam futuramente recomendar, de forma segura e eficaz, tal estratégia nutricional.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito da dieta cetogênica na promoção da tumorigênese colorretal.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudar o efeito da dieta cetogênica (DC) e da dieta cetogênica com triglicerídeos de cadeia média (DCTCM) na tumorigênese colorretal
- b) Desenvolver o plano alimentar de macro e micronutrientes da DC e da DCTCM, bem como avaliar sua composição centesimal
- c) Determinar o potencial antioxidante e os teores de compostos fenólicos e flavonóides totais das dietas;
- d) Avaliar a segurança genotóxica (mutagenicidade na medula óssea e carcinogênese no cólon) da DC e da DCTCM;
- e) Avaliar o potencial quimiopreventivo da DC e DCTCM e, comparar o aumento e ou/redução de lesões pré-neoplásicas no cólon entre ambas;
- f) Monitorar os níveis de β -hidroxibutirato e glicose para acompanhamento do processo de cetose;
- g) Quantificar a expressão imunohistoquímica no cólon de proteínas associadas à proliferação celular;
- h) Comparar a influência dos diferentes perfis lipídicos sob o efeito das dietas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 PREPARO DAS DIETAS

A elaboração das dietas cetogênicas foi realizada utilizando o software de nutrição DietBox®. As informações nutricionais foram utilizadas para calcular a ingestão calórica e a porcentagem de macro e micronutrientes a partir das tabelas de composição de alimentos Tucunduva e Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) nele disponível, bem como informações presentes nos rótulos nutricionais de alguns insumos.

Foram elaborados dois modelos de dieta para serem utilizados neste estudo. Uma dieta cetogênica (DC) com perfil lipídico rico em gordura saturada e uma dieta cetogênica com triglicerídeos de cadeia média (DCTCM), mas com perfil lipídico ainda rico em gorduras insaturadas. Todos os ingredientes foram pesados de acordo com sua proporção, misturados manualmente e preparados diariamente em porções de 100g e ofertado aos animais conforme consumo.

5.2 SISTEMA-TESTE IN VITRO

5.2.1 Obtenção de componentes antioxidantes

Componentes antioxidantes foram obtidos das amostras de DC e DCTCM para posterior determinação e avaliação do potencial antioxidante pela captura do radical ABTS. A atividade antioxidante está diretamente relacionada à presença de compostos fenólicos e flavonoides totais.

Alíquotas de mais ou menos 0,5 g das amostras das dietas (DC e DCTCM) foram pesadas em Tubo de Falcon de 15 mL e em seguida, foram adicionados de 5 mL de solução de metanol 80% (v: v) ou solução de acetona: metanol: água (7:7:6, v:v:v), na tentativa de se buscar melhores condições de extração das amostras. Os tubos foram agitados em vórtex de bancada por 30 segundos (s), sendo incubados por 30 minutos (min) em banho de ultrassom (40 KHz), a 25 °C. Ao final do processo, os tubos foram centrifugados a 3.000 rotações por minuto (rpm), por 10 min a 25 °C, sendo os sobrenadantes separados do pellet e reservado. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume inicial de solvente e o procedimento de extração foi repetido. Os sobrenadantes de ambas extrações foram juntados em tubo único e o volume final

foi ajustado para 10 mL com o mesmo solvente utilizado. Os extratos foram armazenados à temperatura de -18 °C até o momento das análises. Cada amostra (DC e DCTCM) foi extraída duas vezes, de forma independente e as análises de cada extrato de DC e DCTCM foram realizadas em triplicada.

5.2.2 Determinação do potencial antioxidante

Para a determinação do potencial antioxidante foi realizada a técnica de captura do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico). O método baseia-se na geração do ABTS⁺, de cor azul esverdeado, por meio da reação da solução estoque de ABTS com persulfato de potássio. Com a adição de um antioxidante ocorre a redução do ABTS⁺ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional (RE *et al.*, 1999).

As alíquotas de 250 µL dos extratos de cada amostra (DC e DCTCM) anteriormente preparados foram adicionados 750 µL da solução de ABTS, resultando em volume final de 1 ml. As amostras foram incubadas ao abrigo da luz por 15 minutos e analisadas em espectrofotômetro BelPhotonics Ultraviolet/ Visible-M51 (Bel) em comprimento de onda de 734 nm. Foram preparadas, em triplicata, soluções de branco, substituindo as alíquotas de amostra pelo solvente utilizado e mantendo a solução de ABTS. Os valores de absorbância encontrados nas leituras de cada amostra foram descontados das soluções de branco. Na sequência, o potencial antioxidante foi calculado por meio da equação da reta obtida em curva padrão de Trolox, construída a partir de faixa de sete pontos entre as concentrações que variaram de 0 a 7 nmol. Os resultados foram expressos em equivalente de trolox (nmol/g) (MARGRAF; GRANATO, 2016; RE *et al.*, 1999).

5.2.3 Determinação dos compostos fenólicos totais

Para a determinação de fenólicos totais foi utilizado o método Folin-Ciocalteu (mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato) segundo a metodologia descrita por Wang *et al.* (2020), com modificações. O método baseia-se na oxidação dos polifenóis e na consequente redução do reagente Folin-Ciocalteu, resultando na formação de um complexo de cor azul, proporcional à concentração dos fenólicos. Em condições alcalinas, ocorre a desprotonação dos grupos hidroxila da molécula dos polifenóis e a consequente liberação de elétrons que, por sua vez, levarão à redução do reagente (WANG *et al.*, 2020).

Em alíquotas de 160 μL de cada amostra foram adicionados 80 μL de Folin-Ciocalteu. As misturas foram manualmente homogeneizadas por 10s e incubadas ao abrigo da luz, a 25 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Um volume de 640 μL de Na_2CO_3 (7,5% p/v) foi adicionado, sendo os tubos homogeneizados e incubados ao abrigo da luz a 25 $^{\circ}\text{C}$ por mais 30 min. A absorbância foi mensurada a 756 nm em espectrofotômetro BelPhotonics Ultraviolet/ VisibleM51 (Bel). Os resultados foram calculados a partir da equação da reta obtida em uma curva de quantificação de sete pontos construída pela análise de padrão de ácido gálico. Os resultados de compostos fenólicos totais foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg/g).

5.2.4 Determinação de flavonoides totais

Os teores de flavonoides totais das amostras foram determinados conforme o método descrito por Boateng *et al.* (2018), com modificações. Este método se baseia na complexação do cátion alumínio (Al^{+3}) com as moléculas de flavonoides presentes na amostra, formando um complexo estável flavonóide- Al^{+3} de coloração amarelada a vermelho-tijolo, cuja intensidade é proporcional à concentração de flavonoide na amostra (PEIXOTO SOBRINHO *et al.*, 2010).

Foram colocados 625 μL de cada amostra em tubos de ensaio contendo 37,5 μL de nitrito de sódio (NaNO_2) a 5% (p/v). As misturas foram manualmente agitadas por 10s e incubadas ao abrigo da luz, à 25 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Após o período de incubação foram adicionados 37,5 μL de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 10% (p/v) e a mistura foi manualmente agitada por 10 s, sendo os tubos incubados a 25 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Na sequência, foram adicionados 250 μL de NaOH 1 M e 350 μL de água ultrapura, sendo os tubos novamente agitados incubados nas mesmas condições anteriormente descritas. A absorbância das amostras foi mensurada em espectrofotômetro BelPhotonics Ultraviolet/ Visible-M51 (Bel) em comprimento de onda de 510 nm. O conteúdo de flavonoides totais foi calculado a partir da equação da reta obtida de uma curva de quantificação construída por meio de padrão de catequina. Os resultados de flavonoides totais foram expressos em equivalente de catequina (mg/g).

5.3 SISTEMA-TESTE IN VIVO

5.3.1 Agente indutor de lesões pré-neoplásicas

Para indução de lesões pré-neoplásicas no colón de ratos Wistar foi utilizado 1,2 Dimetilhitrazina [DMH, 40mg/kg p.c. (peso corpóreo), Sigma-Aldrich], administrado de modo subcutâneo (s.c.), uma vez por semana, no quinto dia de cada semana durante 6 semanas, resultando em uma dose final de 240mg/kg p.c. (WALIA *et al.*, 2018). O ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA, 1mM) foi utilizado para dissolver o DMH momentos antes do seu uso (KAWANISHI; YAMAMOTO, 1991). A escolha da dose foi realizada com base em dados da literatura que descrevem que a dose letal (DL50) de DMH em ratos Wistar foi determinada em 1g/kg p.c enquanto doses de trabalho na carcinogênese variam entre 10 a 375mg/kg p.c (DAVIS *et al.*, 2002; MOURA *et al.*, 2019; PERSE; CERAR, 2005). O DMH é um carcinógeno genotóxico que quando metabolizado gera íons capazes de metilar o DNA, RNA e proteínas, além de gerar radicais livres (KAWANISHI; YAMAMOTO, 1991).

5.3.2 Animais

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar machos, espécie *Ratus norvegicus*, com aproximadamente 100-120g peso corpóreo (p.c), provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos em caixas plásticas em uma sala experimental, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($50 \pm 10\%$), 12 horas de ciclo claro-escuro, com acesso *ad libitum* à alimentação e água. Os protocolos de tratamentos realizados neste estudo foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas e aprovados (Anexo A). Cada grupo experimental consistiu em 10 animais. O peso corpóreo, o comprimento naso-anal e a circunferência abdominal foram avaliados semanalmente. O consumo de ração padrão e água foram avaliados no segundo e no quinto dia da semana, enquanto o consumo das dietas cetogênicas e de ração padrão consumida pelos grupos tratados com TCM foram mensurados diariamente. O volume de água e ração ofertados foram baseados no consumo do grupo controle. O consumo dos grupos foi avaliado com base na diferença entre o volume inicial ofertado e o volume final obtido após pesagem. A quantidade de DC e DCTCM oferecida diariamente atendia as necessidades calóricas dos animais, sendo estas baseadas na quantidade calórica normalmente consumida pelo grupo controle em ração padrão.

5.3.3 Delineamento experimental

O período experimental, teve ao todo duração de 14 semanas. Após retirada, os animais permaneceram por 1 semana em aclimatação. Da 2ª a 7ª semana (período de 6 semanas) foi realizada a indução das lesões pré-neoplásicas utilizando o carcinógeno DMH conforme anteriormente descrito. Passado o período de indução das lesões, no início da 8ª semana os animais foram submetidos aos dois protocolos de dieta (DC e DCTCM) por 6 semanas (anterior a este período, durante o intervalo para indução das lesões pré-neoplásicas, todos os animais receberam ração padrão). Na 14ª semana foi realizada a coleta das amostras e processamento das análises e resultados. Segundo Sengupta (2013), em ratos adultos, o período de 6 semanas é relativamente equivalente a 3 anos em humanos, sendo assim, um tempo considerado razoável para exposição à cetose gerada pelos modelos de dieta. Um grupo de TCM foi incluído para excluir o viés relacionado ao perfil lipídico, caso houvesse efeito na DCTCM. O TCM escolhido foi o óleo de coco, administrado aos animais via *gavage* no volume de 1mL/dia (correspondente a 1,04g ou 25% aproximadamente).

Os animais, que foram divididos em grupos abaixo, tiveram acesso *ad libitum* a água, dieta padrão Nuvilab CR-1, DC e DCTCM:

- 1) Controle negativo (CN - Dieta padrão + EDTA 1mM 0,3mL sc.),
- 2) Dieta cetogênica (DC + EDTA, 1mM 0,3mL sc.),
- 3) Dieta cetogênica de triglicerídeos de cadeia média (DCTCM + EDTA, 1mM 0,3mL sc.)
- 4) Triglicerídeos de cadeia média (TCM) (Dieta padrão + óleo de coco 1mL [TCM 25%] + EDTA 1mM 0,3mL sc).
- 5) Controle positivo (DMH 40 mg/kg s.c. + dieta padrão),
- 6) DMH + DC (DMH 40 mg/kg s.c. e DC),
- 7) DMH + DCTCM (DMH 40 mg/kg s.c. e DCTCM),
- 8) DMH + TCM (DMH 40 mg/kg s.c. + Dieta padrão + óleo de coco 1mL [TCM 25%]).

Embora a oferta alimentar tenha sido *ad libitum*, limitamos o consumo para que não ultrapassasse o valor calórico sabidamente consumido diariamente pelos animais do grupo controle que ingeriam apenas ração padrão.

Após o período de tratamento, no primeiro dia da 14ª semana, os animais receberam o analgésico Tramadol [12,5 mg/kg p.c.; intraperitoneal (i.p.)] e foram anestesiados com 0,5 mL de Tiopentax® [Tiopental sódico - 40 mg/kg p.c., i.p.; Cristália] para a coleta de 6mL de

sangue por punção cardíaca para posterior avaliação bioquímica. Em seguida, nos casos necessários, os animais receberam 0,5 mL de Tiopentax® (120 mg/kg p.c.; i.p.) para eutanásia. Em seguida, foi realizada a laparotomia para a obtenção de diferentes órgãos. Inicialmente coletou-se a porção distal do cólon, no qual foi retirado uma amostra de fezes, armazenada em microtubo de 2 mL estéril e posteriormente acondicionada em freezer para futuras análises do microbioma fecal. Em seguida, o cólon foi lavado com solução salina, sendo coletada uma amostra da porção distal para análise de imunohistoquímica que foi armazenada em microtubo de 1,5 mL contendo formalina e após 24h transferida para microtubo 1,5 mL com etanol 70%. Outra amostra da porção distal do cólon também foi armazenada em microtubo de 1,5 mL com trizol para análise de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR), além de amostras para análises de citocinas inflamatórias nas quais foram armazenadas em microtubo de 1,5 mL contendo tampão fosfato e trizol, separadamente. O restante da porção distal do cólon foi fixado em placa de isopor para posterior realização de teste de foco de criptas aberrantes (FCA). Uma porção de 400mg (em média) de fígado foi coletada à qual foi picotada com Meio de Merchan, em placas de 35mm, filtrado em gaze, sendo o conteúdo armazenado em microtubos de 1,5 mL e armazenados em biofreezer -80°C para posterior realização do ensaio cometa. O restante do fígado assim como a porção proximal e medial do colón, juntamente com o trato gastrointestinal, além do coração, pulmão, baço, fígado e rins foram retirados, pesados, embalados em papel alumínio, identificados de forma individual e armazenados a -80°C. As carcaças foram separadas em sacos plásticos de acordo com respectivos grupos de tratamento, identificadas e armazenadas em freezer. O conteúdo cecal foi coletado e armazenado em Tubo Falcon de 15 mL contendo soro fetal bovino, para posterior análise da imunidade inata. Ao final, foi realizada a coleta de um dos fêmures dos animais, o qual foi lavado em Tubo Falcon de 15 mL, com auxílio de seringa de 1 mL, com soro fetal bovino (SFB), a fim de coletar a medula óssea para a realização do teste do micronúcleo.

5.3.4 Avaliação das lesões pré-neoplásicas

O teste de FCA em lesões pré-neoplásicas induzidas no colón de ratos Wistar com o carcinógeno DMH foi realizado a fim de avaliar os possíveis efeitos carcinogênicos e quimiopreventivo das dietas na promoção da carcinogênese colorretal. Após a eutanásia dos animais, os cólons foram excisados, abertos longitudinalmente, lavados com solução salina para remoção das fezes, presos em placas de isopor por meio de alfinetes e fixados com solução de formaldeído (10%) durante 24 h. No dia seguinte, os cólons foram corados com solução de

azul de metileno (0,02%) por 10 minutos e colocados sobre uma lâmina de microscopia com a parte interna da mucosa voltada para cima para a visualização dos FCA.

Os procedimentos para a análise histológica do cólon foram realizados de acordo com Bird (1987). A análise de FCA foi realizada em microscopia óptica com amplificação de 40X onde foi realizada a contagem de 50 campos sequenciais na porção distal do cólon, sendo os FCA caracterizados pela espessa camada epitelial que se cora mais intensamente, abertura luminal alongada, tortuosa e maior em relação às criptas normais circunvizinhas. Foram quantificados o número de FCA e as criptas aberrante (CA). A multiplicidade de criptas foi expressa CA/foco.

5.3.5 Determinação da cetose

Visto que os níveis de β -Hidroxiacetato normalmente se apresentam elevados e os níveis de glicose reduzidos durante uma dieta cetogênica (SAMPAIO *et al.*, 2018), realizamos a medição destes parâmetros no sangue da cauda dos animais previamente ao início dos protocolos de dietas e ao final do experimento. As medições foram realizadas utilizando-se o sistema de monitoramento de glicose e cetonas no sangue (Freestyle Optium Neo, Abbott) com tiras de testes compatíveis para glicemia (Tiras Abbott Teste para glicose no Sangue Freestyle Optium) e cetose (Tiras Abbott Teste para Cetona no Sangue Freestyle Optium).

5.3.6 Avaliação da composição corporal

Para avaliação da composição corporal, a massa gorda foi avaliada semanalmente e o Índice de Lee foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula: [$\sqrt[3]{}$ peso corporal (g) / distância naso-anal (cm)]. A distância naso-anal e a circunferência abdominal foram mensuradas utilizando uma fita métrica. O índice de Lee e a massa gorda apresentam uma correlação, de modo que, o aumento ou a redução na massa gorda reflete na classificação do índice de Lee, podendo este ser usado como forma acurada e rápida para determinar o acúmulo de gordura corporal. Valores abaixo de 0,300 g/cm² são considerados normais. Com os dados coletados foi determinado o índice de massa corporal (IMC) a partir da razão entre peso corporal (g)/comprimento nasoanal (cm²).

5.3.7 Avaliação de mutagenicidade

A avaliação da mutagenicidade foi realizada em células da medula óssea seguindo a técnica descrita por Schmid (1975). Após a eutanásia dos animais, um dos fêmures traseiros foram retirados, limpos em gaze e tiveram suas epífises cortadas. O fêmur foi armazenado em um tubo Falcon de 15ml contendo 2,5ml de soro fetal bovino onde a medula óssea foi retirada com o auxílio de uma seringa contendo agulha a partir de movimentos de aspiração e expiração, repetido até a retirada completa do conteúdo medular. Em seguida, o material foi centrifugado a 800 rpm por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* do material foi homogeneizado e gotejado diretamente sobre uma lâmina limpa que, com o auxílio de outra lâmina foi realizado um esfregão. As lâminas foram fixadas em metanol por 5 minutos coradas com Giemsa diluído em tampão fosfato (pH 6,8) na proporção de 1:30 por 5 min.

A análise foi realizada em microscópio comum em aumento de 1000x. A citotoxicidade foi monitorada a partir da contagem de 1000 eritrócitos totais, quantificando os que se apresentavam como normocromáticos (NCEs) e policromáticos (PCEs) para posterior obtenção da razão $PCEs+NCEs/Total$. A frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) foi determinada a partir da análise de 2000 PCEs por animal.

5.3.8 Imunoistoquímica

O tecido colorretal coletado foi fixado em formalina e, em seguida, incluído em parafina, e então foram realizados cortes histológicos de 3-4 μ m de espessura. Os cortes foram desparafinizados anteriormente à realização da técnica em temperatura de 60°C por 1 hora, associada a três banhos de xilol (15 min cada), seguidas de dois banhos em álcool etílico (100 e 70%, 15 min cada). Após a desparafinização, foi realizada a recuperação antigênica através da imersão das lâminas em tampão citrato, em panela de pressão, por 3 min.

A fim de se reduzir a marcação inespecífica, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por meio da incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio 3% por 15 min. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com a incubação por 10 min em solução de leite desnatado (molico) a 5%. Esta solução foi preparada em TBST (Tris-Buffered Saline Tween 20) em pH 7,6. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com TBST e incubadas overnight em câmara úmida na geladeira com os seguintes anticorpos primários anti- β -catenina (Abcam, Cambridge, UK, Cat.: ab32572; monoclonal): diluição 1:1000, anti-PCNA (Abcam, Cambridge, UK, Cat.: ab29; monoclonal): diluição 1:2000 e anti-COX2 (Abcam, Cambridge,

UK, Cat.: ab15191; policlonal): diluição 1:1000. No dia seguinte, realizou-se a incubação dos cortes com o anticorpo secundário IgG anti-coelho produzido em cabras conjugado com peroxidase Dako EnVision™ + Dual Link System-HRP (Agilent, Santa Clara, CA, USA) por 1 hora. Após esse período, os cortes foram corados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; 0,5%) por 5 min., contracorados por 15s com hematoxilina filtrada (100%).

A determinação semi-quantitativa da expressão proteica foi avaliada utilizando o software ImageJ Fiji® (versão 1.2; WS Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD), conforme descrito por Crowe e Yue (2019).

5.4 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (*One-way* ANOVA) para experimentos inteiramente aleatorizados, com o cálculo da estatística F e de seu respectivo “p-value”. Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$, utilizando o programa Graph Pad Prism (Versão 8.0).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CONSTITUIÇÃO DAS DIETAS: PERFIL DIETÉTICO DE MACRO E MICRONUTRIENTES

Com a finalidade não só de avaliar o efeito da cetose sobre a carcinogênese colorretal, mas também de comparar se o perfil lipídico neste processo exerce alguma influência, foram elaborados dois modelos de dieta cetogênica. Uma delas, com perfil lipídico rico em gordura saturada (DC) e outra com perfil lipídico rico em gorduras insaturadas onde o triglicerídeo de cadeia média foi acrescentado (DCTCM). Segundo Woolf *et al.* (2016), a composição da dieta pode alterar seus efeitos. Diante disso, uma dieta cetogênica que apresenta em sua composição 25% de TCM possui efeito antitumoral mais elevado quando comparada à uma dieta cetogênica com totalidade lipídica de TCL (WEBER *et al.*, 2018).

A informação nutricional dos macronutrientes para os dois modelos de dieta estão apresentados na Tabela 1. A DC foi composta por uma mistura de 72g de margarina, 13g de óleo de soja, 8g de proteína concentrada do soro do leite em pó, 7 gramas de módulo de fibras (constituído de *psyllium*, fibra de maçã, fibra de aveia e inulina) e um mix de micronutrientes (vitaminas e minerais) (ARSYAD *et al.*, 2020) para cada 100g de preparo (Tabela 1). A DCTCM, além de um perfil lipídico mais saudável, rico em gorduras monoinsaturadas e poliinsaturadas, foi desenvolvida contendo 25% de TCM (WEBER *et al.*, 2018), sendo composta por 40g de abacate, 26g de óleo de canola, 24g de óleo de coco, 3g de proteína concentrada do soro do leite em pó, 7g de módulo de fibras (contendo *psyllium*, fibra de maçã, fibra de aveia e inulina) e mix de micronutrientes (vitaminas e minerais) (ARSYAD *et al.*, 2020) para cada 100g de preparo (Tabela 1).

Ambas as dietas cetogênicas foram calculadas para apresentarem em média 7g de lipídeos para 1g de carboidrato mais proteína (7:1) (Tabela 1). Após diversos testes, com proporções maiores, somente esta proporção (7:1) apresentou consistência adequada para o tratamento dos animais. A definição desta razão cetogênica foi ainda, baseada em dados da literatura que mostram que em razões próximas (8:1) é possível encontrar níveis bastante elevados de β -hidroxibutirato em animais de experimentação (SU *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2004).

Tabela 1 - Informação nutricional dos macronutrientes da dieta padrão, dieta cetogênica (DC) e da dieta cetogênica de triglicerídeos de cadeia média (DCTCM).

Macronutrientes em	DP	VCT	DC	VCT	DCTCM	VCT
100g	(g)	(%)	(g)	(%)	(g)	(%)
Energia (kcal)	336	100,00	577,96	100	522,46	100
Proteína	22	26,19	6,21	4	3,13	2
Gordura	4	10,71	60,22	94	54,54	94
Carboidratos	53	63,09	2,49	2	4,77	4
Razão cetogênica	0,053:1		7:1		7:1	

Fonte: Nuvilab® e DietBox®

Legenda: VCT – Valor calórico total, DP – Dieta padrão

O perfil lipídico das dietas seguiu cálculos aproximados, realizados no DietBox® (Tabela 2), comparados ao perfil de indicado na tabela TACO e dados da literatura acerca da avaliação centesimal (MIGUEL *et al.*, 2009).

Como controle experimental de macro e micronutrientes, foi utilizada uma dieta padrão correspondente a alimentação com ração padrão Nuvilab CR-1 irradiada utilizada pelos animais do grupo controle negativo, cuja razão cetogênica é de 0,053:1 (Tabela 1). O mix de micronutrientes foi manipulado em farmácia de manipulação com base nas informações nutricionais dos micronutrientes apresentados na informação nutricional da dieta padrão Nuvilab CR-1 irradiada (DP) (Tabela 3). Para a manipulação do mix de micronutrientes, foi realizado o cálculo dos micronutrientes naturalmente presentes em cada modelo de dieta e os valores de micronutrientes da dieta padrão foram diminuídos destes para que a quantidade de micronutrientes das três dietas (DC, DCTCM e DP) fossem exatamente os mesmos (Tabela 3). A adição dos micronutrientes foi pensada para eliminar o viés da experimentação pois como a DC e DCTCM apresentam perfis dietéticos muito restritivos, a carência de nutrientes poderia modular os resultados obtidos nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle negativo (ração padrão).

Tabela 2 – Perfil lipídico da dieta cetogênica (DC) e da dieta cetogênica de triglicerídeos de cadeia média (DCTCM).

Composição lipídica	DC(g)	DCTCM(g)
A.G. Monoinsaturado	6,66	19,10
A.G. Poli-insaturado	11,81	8,44
A.G. Saturada	42,11	23,47

Fonte: DietBox®

Legenda: A.G. – ácido graxo

6.2 SISTEMA-TESTE *IN VITRO*

6.2.1 Potencial antioxidante e teor de flavonoides e fenólicos totais

A mutagênese e a carcinogênese por consequência, são resultados de múltiplas lesões não reparadas que resultam em prejuízos à estrutura e ao funcionamento do DNA, sendo o estresse oxidativo um dos mecanismos responsáveis por essa indução de danos (LIMOLI; GIEDZINSKI, 2003; PINO; CHUNG, 2010). O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e proteção antioxidante leva, por conseguinte a tal processo (MENA; ORTEGA; ESTRELA, 2009). Vários estudos postulam uma convergência entre a capacidade antioxidante das dietas e seu efeito na proteção da carcinogênese colorretal (AMIANO *et al.*, 2019; LA VECCHIA *et al.*, 2013; MEKARY *et al.*, 2010; VECE *et al.*, 2015;). Considerando o objetivo do atual estudo e, com a finalidade de direcionar para posteriores análises moleculares que investiguem o mecanismo de ação, julgamos ser importante realizar a avaliação do potencial antioxidante das diferentes dietas, o qual normalmente é diretamente relacionado ao teor de flavonoides e compostos fenólicos.

Tabela 3 - Informação nutricional dos micronutrientes dos diferentes tipos de dieta utilizados no estudo.

	(continua)		
Micronutriente	DP*	DC*	DCTCM*
Fibra bruta	7g	1,4g	0g
Cálcio	1g – 1.4g	1g – 1.4g	0,99g
Fósforo	600mg	600mg	583,6 mg
Vit A	1300mg	1300mg	1300mg
Vit D3	200mg	200mg	200mg
Vit E	3.4 UI	0 UI	0UI
Vit K3	0.3mg	0.3mg	0.3mg
Vit B1	0.5mg	0.5mg	0.5mg
Vit B2	0.6mg	0.6mg	0.6mg
Vit B6	0.7mg	0.7mg	0mg
Vit B12	2.2 mcg	2.2 mcg	0mg
Niacina	6mg	6mg	6mg
Biotina	0,005mg	0,005mg	0,005mg

Tabela 3- Informação nutricional dos micronutrientes dos diferentes tipos de dieta utilizados no estudo.

Micronutrientes	DP*	DC*	DCTCM (conclusão)
Ácido pantotênico	2,1mg	2,1mg	2,1mg
Colina	190mg	190mg	190mg
Sódio	270mg	256mg	260,7mg
Ferro	5mg	5mg	458mg
Manganês	6mg	6mg	5,91mg
Zinco	6mg	6mg	5,83mg
Cobre	1mg	1mg	1mg
Iodo	0.2mg	0.2mg	0.2mg
Selênio	0.005mg	0.005mg	0.005mg
Cobalto	0.15mg	0.15mg	0.15mg
Fluor	6mg	6mg	6mg
Lisina	1.2g	1.2g	1.2g
Metionina	400mg	400mg	400mg
BHT	10mg	10mg	10mg

Fonte: Nuvilab® CR-1 Irradiada e DietBox

Legenda: DC – Dieta cetogênica, DCTCM- Dieta cetogênica com triglicerídeos de cadeia média, DP – Dieta padrão, BTH - Hidroxitolueno butilado*Quantidade presente em 100g de dieta.

Inicialmente, para verificar qual o solvente seria mais efetivo em carrear os compostos fenólicos e flavonóides das dietas, foi realizado as análises utilizando dois solventes, sendo eles o metanol 80% e uma combinação de metanol, acetona e água (7:7:6). O potencial antioxidante e o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais encontrados nas DC e DCTM estão apresentados na Tabela 4. De maneira geral, a mistura de solventes que foi capaz de carregar maior conteúdo de fenólicos totais e conseqüentemente apresentou maior potencial antioxidante foi a combinação de metanol, acetona e água (7:7:6). Os teores de flavonoides a partir da extração com a combinação de metanol, acetona e água (7:7:6) foram praticamente iguais aos teores obtidos na extração com metanol 80% (Tabela 4). O potencial antioxidante apresentado pela DC equivalente a radical trolox (nmol/g) utilizando metanol 80% como solvente foi de $13,38 \pm 1,02$ nmol/g, enquanto DCTCM foi de $19,92 \pm 2,50$ nmol/g. Quando foi utilizada a mistura de solventes (acetona: metanol: água; 7:7:6), a DC apresentou um

equivalente de $46,64 \pm 2,63$ nmol/g enquanto a DCTCM $44,95 \pm 2,67$ nmol/g. No que diz respeito aos fenólicos totais equivalentes a ácido gálico (mg/g), a DC na extração com metanol 80% apresentou $0,27 \pm 0,04$ mg/g e a DCTCM $0,36 \pm 0,04$ mg/g, enquanto que na extração com a combinação de solventes (acetona: metanol: água; 7:7:6), a DC apresentou o equivalente de $0,46 \pm 0,02$ mg/g e a DCTCM $0,41 \pm 0,04$ mg/g. Em relação aos flavonoides totais equivalentes a catequina (mg/g), a DC apresentou $0,25 \pm 0,01$ mg/g e a DCTCM $0,17 \pm 0,02$ mg/g quando se empregou o solvente metanol 80%, já em acetona: metanol: água; 7:7:6, a DC também apresentou $0,25 \pm 0,01$ mg/g e DCTCM $0,19 \pm 0,02$ mg/g.

Tabela 4 - Potencial antioxidante e conteúdo de fenólicos e flavonoides totais das dietas cetogênicas após extração com dois solventes [i. metanol 80%; ii. acetona:metanol:água (7:7:6)].

Amostra	Potencial antioxidante*	Fenólicos totais**	Flavonoides totais***
DC (metanol 80%)	$13,38 \pm 1,02^c$	$0,27 \pm 0,04^c$	$0,25 \pm 0,04^a$
DC (acetona: metanol: água 7:7:6)	$46,64 \pm 2,63^a$	$0,46 \pm 0,02^a$	$0,25 \pm 0,01^a$
DCTCM metanol 80%)	$19,92 \pm 2,50^b$	$0,36 \pm 0,04^b$	$0,17 \pm 0,02^b$
DCTCM (acetona: metanol: água; 7:7:6)	$44,95 \pm 2,67^a$	$0,41 \pm 0,04^{ab}$	$0,19 \pm 0,02^b$

Fonte: Do autor (2022).

Legenda: *Equivalente em trolox (nmol/g), **equivalentes em ácido gálico (mg/g), ***equivalente em catequina (mg/g), DC: Dieta cetogenica, DCTCM: Dieta cetogênica com triglicerídeos de cadeia média. Resultados acompanhados de mesma letra em uma mesma coluna não diferem entre si segundo a Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

De maneira geral, os níveis de flavonoides e fenólicos totais e o potencial antioxidante observados em nosso estudo estão muito abaixo dos níveis encontrados em alimentos considerados como fontes de compostos polifenólicos os quais apresentam potencial antioxidante expressivo. Esses por sua vez, são provenientes de matéria vegetal como frutas, vegetais, ervas e especiarias (HALVORSEN *et al.*, 2002). O orégano é uma especiaria com potencial antioxidante considerado expressivo (EMBUSCADO, 2015). Por meio do ensaio de análise de ABTS, Kosakowska *et al.* (2021) fizeram a avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial e do extrato de orégano grego (OG) e do orégano comum (OC). O estudo revelou notável potencial antioxidante (nmol Trolox/g) nas diferentes amostras, apresentando óleo essencial de OG um equivalente de $3,40 \times 10^5 \pm 3,10 \times 10^3$ nmol, o óleo essencial de OC $3,42 \times 10^5 \pm 2,90 \times 10^3$ nmol, o extrato de OG $3,81 \times 10^5 \pm 2,40 \times 10^3$ nmol e extrato de OC $3,97 \times 10^5 \pm 2,90 \times 10^3$ nmol. Esses resultados são claramente superiores aos apresentados pelas dietas neste estudo e servem como referência do potencial antioxidante.

Quanto aos compostos fenólicos totais, em uma análise sobre a caracterização fitoquímica, cinco vegetais, a saber, chicória vermelha, cebola roxa, berinjela, batata-doce roxa e cenoura preta foram submetidos a análise do conteúdo total de fenólicos e potencial antioxidante. Tais vegetais apresentaram elevado conteúdo de fenólicos totais, contendo a chicória vermelha a maior quantidade de fenólicos ($2,16\text{mg} \pm 0,02$ /g equivalentes a ácido gálico), enquanto a berinjela continha menor quantidade ($1,32 \pm 0,1$) (FROND *et al.*, 2019).

Em relação aos flavonoides totais, o cacau é um fruto conhecido por conceder muitos benefícios a saúde devido a presença de polifenóis que possuem alta capacidade antioxidante. Estudos epidemiológicos estabelecem a correlação inversa entre a ingestão de polifenóis e o aparecimento de DCNT, dentre elas o câncer (KOCH, 2019). Com isso, Carrillo; Londoño-Londoño e Gil (2013) compararam a quantidade de flavonóide equivalentes a catequinas em grãos de *Theobroma cacao* de diferentes áreas de cultivo de cacau na Colômbia. Dentre as 18 cultivares analisadas, a que apontou maior teor de catequinas apresentou $1,297 \pm 0,031$ mg/g e o menor teor ficou em torno de $0,226 \pm 0,006$ mg/g.

Todas as concentrações de polifenólicos apresentados nos trabalhos citados foram superiores aos teores apresentados para as dietas cetogênicas deste estudo, somente o menor teor de flavonoides totais em grãos de cacau que se mostrou bem próximo ao teor encontrado na DC e DCTCM. Diante dessas comparações, ao baixo potencial antioxidante das DC e DCTCM investigadas neste estudo, se atribuem as baixas concentrações de fenólicos e flavonoides totais que, devido a quantidade presente não contribuiriam para redução de oxidantes e consequentemente eliminação de radicais livres. Em outros estudos, no qual foram utilizados modelos de DC comerciais ou mesmo que desenvolvidas, como nesse trabalho, não foram realizadas análises do potencial antioxidante (ARSYAD *et al.*, 2020; DOURIS *et al.*, 2017; HERNANDEZ *et al.*, 2018; OGURA *et al.*, 2020), provavelmente devido a composição destas serem pobres em alimentos fontes de polifenólicos como chá, café, vinho tinto, frutas e hortaliças (DEL BO *et al.*, 2019).

6.3 SISTEMA-TESTE *IN VIVO*

6.3.1 Parâmetros toxicológicos

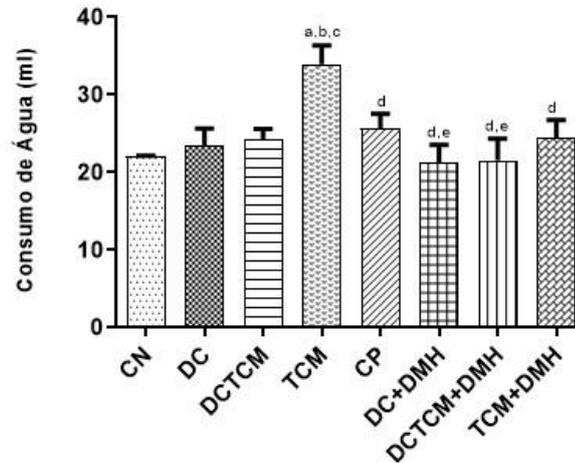
Durante todo o período experimental que compreendeu desde a prévia indução das lesões pré-neoplásicas no cólon dos animais até a exposição aos modelos de dieta cetogênica, o consumo de água e o peso corpóreo dos animais foram mensurados a fim de detectar

possíveis sinais de toxicidade provenientes dos tratamentos. Durante o período experimental de 13 semanas, não foram observadas nenhuma alteração comportamental que indicasse toxicidade nos grupos os quais foram submetidos aos modelos de dieta.

Os resultados do consumo de água de todo o período de tratamento (13 semanas) são apresentados na Figura 1. A Figura 2 apresenta os resultados de consumo alimentar de ração padrão dos grupos CN, TCM, CP e TCM combinado ao DMH referente ao período de 13 semanas, e o consumo dos grupos DC, DCTCM, DC combinado ao DMH referente as 6 primeiras semanas que antecederam a exposição dos animais às dietas cetogênicas, ou seja, período em que se realizou a indução das lesões pré-neoplásicas onde todos os animais se alimentaram com ração padrão. A Figura 3 apresenta os resultados de consumo alimentar referente ao período no qual os animais se alimentaram com os dois modelos de dieta (6 semanas).

Os resultados obtidos demonstraram que o grupo de animais que recebeu dieta padrão e foram suplementados com TCM apresentou um consumo hídrico significativamente maior quando comparado ao grupo controle negativo (que recebeu apenas dieta padrão), DC e a DCTCM. Os resultados obtidos mostram ainda que, a indução das lesões com o carcinógeno DMH não promoveu diferenças no consumo hídrico quando comparados ao controle negativo. Os animais pertencentes aos grupos de DC e DCTCM combinados ao DMH demonstram uma redução no consumo hídrico quando comparados ao grupo de animais que recebeu apenas o DMH, no entanto, apresentaram consumo hídrico semelhante ao grupo controle negativo (Figura 1). Na literatura, nenhum trabalho envolvendo dietas hiperlipídicas realizaram tal análise (DO AMARAL *et al.*, 2021; JIN *et al.*, 2021; TRIPATHY *et al.*, 2021).

Figura 1- Valores médios e desvio padrão do consumo de água dos ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controles.



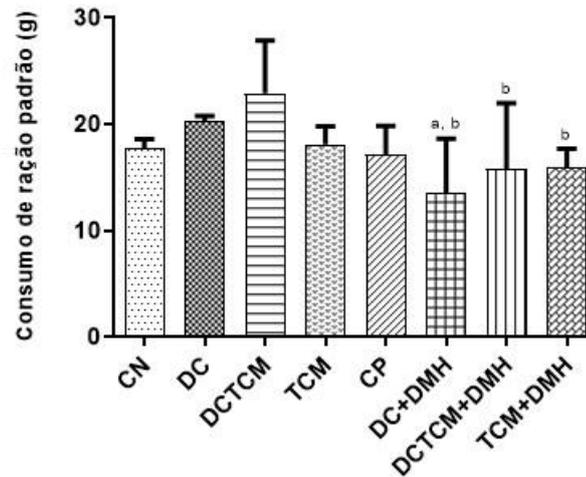
Fonte: Do autor (2022).

Legenda: CN – Controle negativo (Dieta padrão + EDTA 1mM 0,3), DC – Dieta cetogenica, DCTCM – Dieta cetogênica com triglicérideo de cadeia média, TCM – Triglicérideo de cadeia média, CP – Controle positivo (DMH – 1,2 dimetilhidrazina 40 mg/kg p.c). Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey, $n = 6$ animais por grupo). ^aSignificativamente diferente do grupo controle negativo, ^bSignificativamente diferente do grupo DC, ^cSignificativamente diferente do grupo DCTCM, ^dSignificativamente diferente do grupo TCM, ^eSignificativamente diferente do grupo controle positivo.

Conforme mencionado anteriormente, durante as 6 primeiras semanas todos os grupos consumiram ração padrão, posteriormente, continuaram em ração padrão até a 13^o semana somente aqueles animais pertencentes aos grupos de CN, TCM, CP e TCM combinado ao DMH. De maneira geral, alguns grupos apresentaram diferenças significativas entre si no que se refere ao consumo da dieta padrão (Figura 2). O grupo de animais tratados com DC combinado ao DMH apresentaram consumo reduzido quando comparado aos demais grupos, incluindo o controle negativo e positivo. Os grupos de animais que receberam a DC combinado ao DMH, a DCTCM combinado ao DMH e o TCM combinado ao DMH também apresentaram menor consumo que o grupo que recebeu apenas DCTCM. O consumo de ração pelos grupos DC, DCTCM e TCM combinados ao DMH se deu concomitantemente com a indução do DMH, dessa forma sugere-se que a carcinogênese do cólon induzida por DMH afeta o consumo de ração pelos animais tratados (VENKATACHALAM *et al.*, 2020). O consumo mais elevado de ração padrão pelo grupo DCTCM, pode ser justificada pela pequena elevação de peso corpóreo

desse grupo no início do experimento, porém essa variável não apresentou diferença estatística significativa em relação à média de peso inicial dos demais grupos.

Figura 2- Valores médios e desvio padrão do consumo de ração padrão dos ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controles.

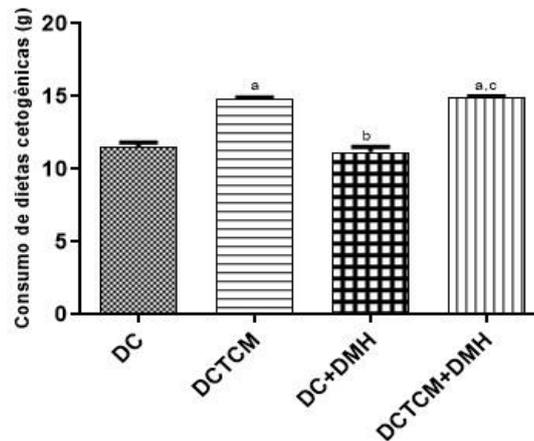


Fonte: Do autor (2022).

Legenda: CN – Controle negativo (Dieta padrão + EDTA 1mM 0,3), DC – Dieta cetogênica, DCTCM – Dieta cetogênica com triglicerídeo de cadeia média, TCM – Triglicerídeo de cadeia média, CP – Controle positivo (DMH – 1,2 dimetilhidrazina 40 mg/kg p.c). Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey, $n = 6$ animais por grupo). ^aSignificativamente diferente do grupo DC, ^bSignificativamente diferente do grupo DCTCM.

Quanto aos dados de consumo das dietas (DC e DCTCM), estas foram ofertadas durante 6 semanas, a partir da 7^o semana até ao final do experimento. Os modelos cetogênicos atenderam as necessidades energéticas dos animais, a qual foi baseada na quantidade calórica consumida pelos grupos em dieta padrão. Dessa forma, possíveis alterações na composição corporal serão decorrentes do efeito das dietas cetogênicas e não do aporte calórico ofertado. A respeito do consumo de DC e DCTCM, os resultados obtidos mostram que não houve diferenças significativas em relação ao consumo entre os grupos de DC e DC combinado com DMH e sequer entre os grupos de DCTCM e DCTCM combinado com DMH. Apesar de ambas as dietas serem bem aceitas, teve-se um maior consumo nos grupos de DCTCM e DCTCM combinado ao DMH quando comparados com os demais grupos, DC e DC combinado ao DMH (Figura3)

Figura 3- Valores médios e desvio padrão do consumo da Dieta Cetogênica (DC) e da Dieta Cetogênica com Triglicerídeos de Cadeia Média (DCTCM) de ratos Wistar.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: DMH – 1,2 dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c). Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey, $n = 6$ animais por grupo). ^a Significativamente diferente do grupo DC, ^b Significativamente diferente do grupo DCTCM, ^c Significativamente diferente do grupo DC + DMH.

Em um estudo no qual os animais foram alimentados com dieta para roedores e suplementados com éster de cetona, amido, ou gordura, encontrou-se um consumo reduzido de dieta padrão para roedores e aumento sérico de Malonil-CoA justamente no grupo suplementado com éster de cetona. Este grupo também apresentou elevação nos níveis de corpos cetônicos (KASHIWAYA *et al.*, 2010). Dados similares foram obtidos em nosso estudo quando avaliamos o grupo de DC e DC combinado ao DMH que apresentaram menor consumo (Figura 3) e níveis mais elevados de corpos cetônicos (dados apresentados na sequência) quando comparados com DCTCM e DCTCM combinado ao DMH. Apesar de não termos avaliado os níveis malonil-CoA, com base na literatura, acredita-se que possivelmente os níveis de malonil-CoA se elevaram em ambos os grupos tratados com os diferentes perfis cetogênicos, visto que estes grupos também apresentaram elevação nos níveis de corpos cetônicos. Dessa forma uma possível hipótese para o consumo reduzido dos grupos de DC e DC combinado com DMH em relação aos grupos DCTCM e DCTCM combinado ao DMH é a maior elevação dos níveis de corpos cetônicos apresentado pelos grupos de DC e DC combinado ao DMH. Com isso, presume-se que estes grupos também tenham níveis mais altos de malonil-CoA sendo este um

hormônio anorexígeno o que explicaria a diminuição da ingestão alimentar. Os mecanismos de ação da cetose na redução do apetite ainda não são completamente compreendidos, porém Ma *et al* (2018) utilizaram uma dieta cetogênica com distribuição de macronutrientes semelhante a utilizada no presente estudo, contendo 7g lipídeo: 1g carboidrato mais proteína, durante 8 semanas. Essa razão cetogênica também foi capaz de induzir o organismo de camundongos ao estado de cetose, além da dieta se mostrar capaz de influenciar nos níveis de malonil-CoA. Outros estudos como o de Kashiwaya *et al.* (2010) também sugerem a mesma associação. Outra possível explicação para a diferença da ingestão alimentar é simplesmente aceitação, palatabilidade e textura da DC (CALCATERRA *et al.*, 2021).

6.3.2 Composição corporal

Muitos são os efeitos colaterais ocasionados pelos tratamentos do câncer e pela própria doença em si. Não é incomum que pacientes oncológicos apresentem redução do consumo alimentar progredindo para quadros de desnutrição e caquexia, sendo este último caracterizado por uma síndrome multifatorial, definida por uma perda de peso contínua de massa muscular e esquelética, na qual evolui para comprometimento funcional progressivo (ARENDS *et al.*, 2017).

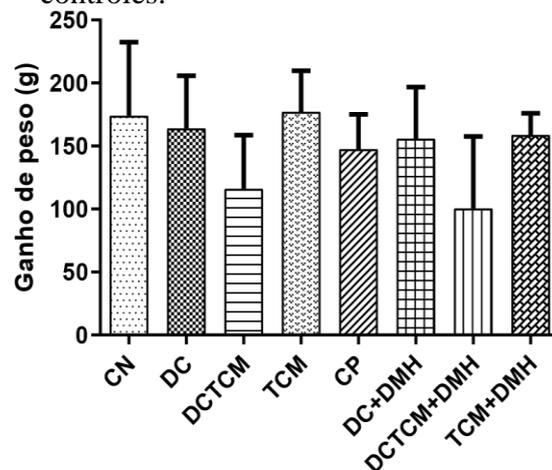
Apesar da extensa associação com morbidade e mortalidade por câncer, não foram desenvolvidas intervenções eficazes para a caquexia. Dessa forma, se faz necessário estratégias pelas quais essa síndrome seja prevenida (LUNDHOLM *et al.*, 2004). Nesse sentido, as intervenções nutricionais precoces se mostram relevantes na melhoria do estado nutricional do paciente oncológico, bem como estratégia significativa para redução dos riscos de caquexia (PRADO; PURCELL; LAVIANO, 2020).

Logo, no atual trabalho, monitoramos uma possível perda de peso durante o período experimental e os resultados baseados no ganho de peso obtido durante o período experimental pelos animais estão apresentados na Figura 4. Foi possível observar que a utilização de diferentes perfis dietéticos cetogênicos não demonstraram diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo, de forma que não influenciaram expressivamente sobre o peso dos animais que, por sua vez, ganharam em média 140g durante o todo o período experimental (Figura 4).

Nossos resultados estão de acordo com achados da literatura. Hao *et al.* (2015) também utilizaram uma dieta cetogênica composta por TCM e ainda ômega-3, ofertada de forma *ad libitum*, durante 45 dias. Os animais do experimento demonstraram aumento constante no peso

corporal, assim como também no grupo que recebeu dieta cetogênica com TCL. Esses resultados mostram que quando ofertada de modo irrestrita, a dieta cetogênica não é capaz de modular o peso, ou seja, não influencia na perda de peso. Resultados similares também já foram obtidos em outros tipos tumorais. Camundongos saudáveis e camundongos que foram submetidos a xenotransplantes de câncer de mama e receberam quimioterapia com ciclofosfamida concomitantemente à alimentação com dieta cetogênica com TCM, dieta cetogênica com TCL e dieta controle demonstraram uma pequena perda de peso devido a adaptação inicial e, posteriormente também mantiveram peso constante durante o experimento (LICHA *et al.*, 2019). Estudos mais longos, com 22 semanas de duração, demonstraram que a dieta cetogênica não foi capaz de influenciar negativamente no peso corpóreo, além disso, os animais submetidos ao tratamento cetogênico ainda revelaram ganho de peso equivalente entre o grupo controle a partir da 12^o semana (ELLENBROEK *et al.*, 2014). Por outro lado, dados da literatura apontam que a dieta cetogênica pode ser uma eficiente estratégia para perda de peso, visto que há mobilização de ácidos graxos para geração de energia (PAOLI, 2014). A divergência entre os resultados, pode estar relacionado as diferentes composições dos modelos cetogênicos, aporte calórico e suas respectivas proporções de macronutrientes e micronutrientes (BIELOHUBY *et al.*, 2011).

Figura 4- Valores médios e desvio padrão de ganho de peso obtidos de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controles.

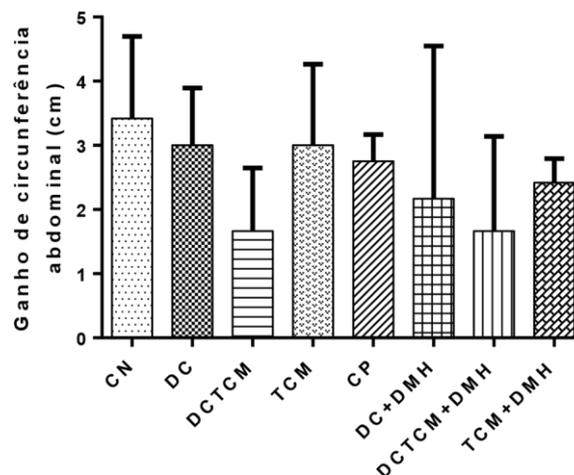


Fonte: Do autor (2022).

Legenda: CN – Controle negativo (Dieta padrão – EDTA 1Mm 0,3), DC – Dieta cetogênica, DCTCM – Dieta cetogênica com triglicerídeo de cadeia média, TCM – Triglicerídeo de cadeia média, CP- Controle positivo (DMH – 1,2 dimetilhidrazina 40 mg/kg p.c). Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey, $n = 6$ animais por grupo).

Considerando todo o período experimental, no qual a circunferência abdominal (C.Ab) foi semanalmente avaliada e os resultados estão apresentados na Figura 5. Demonstramos a ausência de diferenças significativas nos grupos estudados em relação ao grupo controle negativo. Todos os animais, dos diferentes grupos, apresentaram em média uma C.Ab inicial de 14 cm e média de C.Ab final de 16,5 cm. De maneira geral, os animais ganharam 2,5 cm de circunferência abdominal durante o tempo de experimento (Figura 5), foi possível observar um ganho de circunferência abdominal 50% menor nos grupos que receberam DCTCM (1,66cm) e DCTCM combinado ao DMH (1,66cm) em relação ao grupo controle (3,41 cm).

Figura 5- Valores médios e desvio padrão de ganho de circunferência abdominal de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controles.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: CN – Controle negativo (Dieta padrão – EDTA 1Mm 0,3), DC – Dieta cetogênica, DCTCM – Dieta cetogênica com triglicerídeo de cadeia média, TCM – Triglicerídeo de cadeia média, CP- Controle positivo (DMH – 1,2 dimetilhidrazina 40 mg/kg p.c). Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey, $n = 6$ animais por grupo).

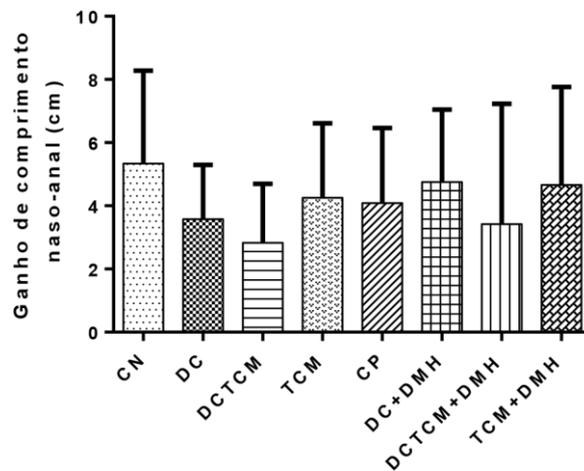
A circunferência da cintura, em humanos, é um parâmetro bastante sensível e que apresenta melhor correlação com a quantidade absoluta de gordura intra-abdominal e visceral, (POULIOT *et al.*, 1994; ROSS *et al.*, 2020). Apesar da necessidade de análises mais profundas em relação a composição corporal, nossos dados permitem sugerir que a dieta cetogênica, composta por 25% de TCM e quantidade significativa de ácido graxo insaturado, pode ter desempenhado um papel positivo na modulação da composição corporal, visto que os animais submetidos a essa combinação apresentaram menor ganho de circunferência abdominal, ainda

que sem resultados estatísticos significativos, sugerindo menor quantidade de acúmulo de gordura intra-abdominal e visceral nestes grupos.

Fukazawa *et al.* (2020), em seu estudo com ratos machos, tratados com dietas cetogênicas com diferentes tipos de gorduras, mostraram que o grupo que recebeu DCTCM também apresentou peso total de gordura intra-abdominal significativamente menor em comparação com os grupos em dieta padrão e dieta cetogênica contendo TCL. Está bem documentado na literatura que os ácidos graxos de cadeia média possuem um metabolismo diferente dos ácidos graxos de cadeia curta. Os TCMs por sua vez, são principalmente absorvidos pela veia porta, dessa forma rapidamente atingem o fígado e o músculo, independentemente da disponibilidade do sistema de transporte da carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT-1) e assim alimentam vias de β -oxidação e geração de ATP, sendo minimamente armazenados (LEMARIÉ *et al.*, 2016; MARTEN; PFEUFFER; SCHREZENMEIR, 2006). As evidências apresentadas até agora apoiam a ideia de que os TCMs podem modular a composição corporal por induzirem a termogênese e reduzirem a lipogênese (AKPA *et al.*, 2010).

A fim de aprofundar a interpretação sobre o peso dos animais, avaliamos ainda, o comprimento naso-anal (CNA) semanalmente durante as 13 semanas do experimento e os resultados estão apresentados na Figura 6. Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados. Os animais ganharam em média 4 cm durante as 13 semanas de tratamento (Figura 6). Esse resultado, juntamente com os demais apresentados, apoia o parecer que os tratamentos utilizados no presente estudo não influenciaram no desenvolvimento dos animais.

Figura 6 – Valores médios e desvio padrão do ganho no comprimento naso-anal ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controles.



Fonte: Do autor (2022).

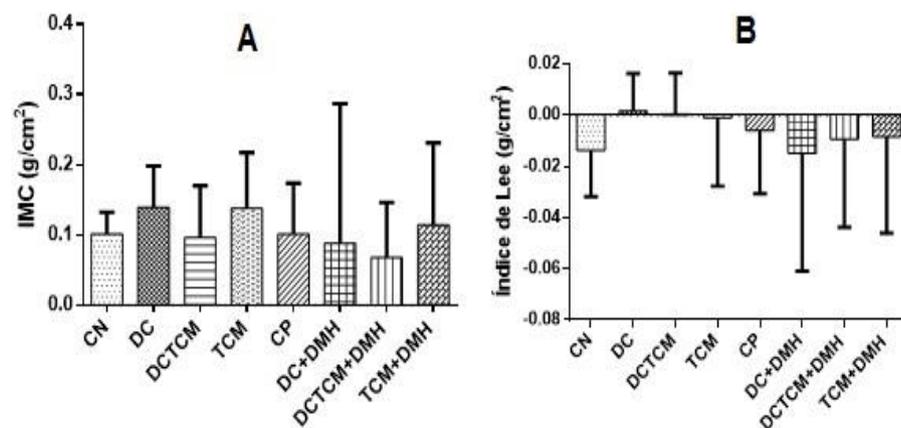
Legenda: CN – Controle negativo (Dieta padrão – EDTA 1Mm 0,3), DC – Dieta cetogênica, DCTCM – Dieta cetogênica com triglicerídeo de cadeia média, TCM – Triglicerídeo de cadeia média, CP- Controle positivo (DMH – 1,2 dimetilhidrazina 40 mg/kg p.c). Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey, $n = 6$ animais por grupo).

Dados similares são evidenciados no estudo observacional prospectivo de Tagliabue *et al.* (2012), que por sua vez analisaram a composição corporal de 18 pacientes infantis com epilepsia refratária antes e após 6 meses de tratamento com DC (4g gordura:1g de carboidrato + proteína). Dentre os parâmetros analisados, a altura não apresentou diferença significativa quando comparada com a linha de base. Ao contrário, um estudo com uma duração maior, realizado por Kim *et al.* (2013), no qual estudaram retrospectivamente prontuários de 40 crianças portadoras de epilepsia intratável após 2 anos em DC clássica (4:1), foi documentado uma redução significativa no ganho de altura.

As evidências apresentadas até agora apoiam a ideia que o tempo de exposição ao tratamento pode ser um fator importante em relação a avaliação do desenvolvimento a partir do comprimento naso-anal (GROLEAU *et al.*, 2014). Provavelmente, o tempo de 6 semanas em que os animais do presente estudo permaneceram nos protocolos de dieta tenha sido muito curto para revelar mudanças que poderiam ser observadas em estudos mais longos. Juntos, as aferições e interpretações desses pontos são importantes para avaliação da composição corporal realizada neste trabalho juntamente com a quantificação do IMC e Índice de Lee, um método rápido e acurado de investigar obesidade em roedores.

A Figura 7 apresenta valores médios e desvio padrão do IMC (A) e índice de Lee (B) de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta durante o período experimental. Tais resultados foram obtidos a partir da diferença entre IMC e índice de Lee encontrado no início e no final do experimento. Nenhuma diferença estatística significativa foi referida entre a diferença inicial e final dos índices murinométricos, mostrando assim que pode não ter havido diferença na composição corporal durante o período experimental de 13 semanas.

Figura 7- Valores médios e desvio padrão do IMC (A) e índice de Lee (B) de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controles.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: IMC- Índice de massa corporal, CN – Controle negativo (Dieta padrão – EDTA 1Mm 0,3), DC – Dieta cetogênica, DCTCM – Dieta cetogênica com triglicerídeo de cadeia média, TCM – Triglicerídeo de cadeia média, CP- Controle positivo (DMH – 1,2 dimetilhidrazina 40 mg/kg p.c). Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey, $n = 6$ animais por grupo). Valores encontrados a partir da diferença entre IMC e índice de Lee iniciais e finais.

De modo geral, os animais, dos diferentes grupos, apresentaram no início do experimento um IMC médio de $0,60 \pm 0,2$ g/cm² e foram classificados como eutróficos (IMC = 0,45 a 0,68 g/cm²) e ao final do experimento, o IMC médio foi de $0,71 \pm 0,03$ g/cm² e foram classificados com obesos (IMC > 0,68 g/cm²) (Figura 7A), segundo a classificação de Novelli *et al.* (2007).

Ainda, em relação a índices preditores de excesso de peso, os animais, dos diferentes grupos de tratamento não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos CN e CP em relação a alteração do Índice de Lee durante o período experimental. Os animais apresentaram índice de Lee inicial de $0,32 \pm 0$ g/cm² e índice de Lee final de $0,31 \pm 0$ cm/g² (Figura 7B), estando estes no limite inferior do excesso de gordura corporal (< 0,30), segundo Bernardis e Patterson (1968).

Um estudo de intervenção nutricional, não randomizado, “Ketogenic or LOGI Diet in a Breast Cancer Rehabilitation Intervention – KOLIBRI” (KÄMMERER *et al.*, 2021), teve como objetivo comparar a dieta cetogênica, dieta low carb e dieta padrão em pacientes com câncer de mama e avaliar a viabilidade, segurança e tolerabilidade destes perfis dietéticos. O estudo contou com 152 participantes e teve duração de 20 semanas. Após esse período, foi possível evidenciar que o grupo em DC apresentou redução significativa em relação ao IMC inicial, bem como redução de massa gorda e gordura visceral (KÄMMERER *et al.*, 2021), podendo a dieta cetogênica auxiliar na redução da obesidade de poupar massa muscular esquelética em pacientes do sexo feminino com câncer (COHEN *et al.*, 2018; KLEMENT *et al.*, 2020).

Em um experimento conduzido como um estudo duplo-cego, randomizado, comparativo de grupos paralelos, nos quais foram submetidos a três dietas diferentes, sendo estas DC com TCM, DC com TCL e dieta controle, três vezes ao dia, de forma restrita, durante 5 dias, demonstrou que ambos os grupos em dieta cetogênica apresentaram alteração significativas na composição corporal, com redução no IMC, massa de gordura corporal, massa muscular da perna direita e massa muscular da perna esquerda. Embora tenha havido perda de massa muscular, esta não gerou preocupação aos autores pois representa perda média de 3% e provavelmente está relacionada ao confinamento por um determinado período de tempo e à diminuição da ingestão alimentar (NAKAMURA *et al.*, 2022).

Dados da literatura de experimentos que avaliaram a DC em conjunto com o índice de Lee são escassos, entretanto Souza *et al.* (2021) em seu trabalho objetivaram investigar a interferência de dieta com ácido graxo moninsaturado e saturado com a infecção por *Trypanosoma cruzi*. Nesse sentido camundongos machos C57BL/6 foram divididos em grupos de dieta normolipídica, dieta de ácidos graxos monoinsaturados e dieta de ácidos graxos saturados. O índice de Lee foi utilizado para determinar a presença de obesidade e quando utilizado de forma isolada não apresentou diferença entre os diferentes grupos de tratamento assim como no nosso estudo, porém, ao analisar o tecido adiposo epididimal e subcutâneo estes se apresentaram em maior quantidade no grupo tratado com ácido graxo saturado. Resultados semelhantes também foram apresentados por Machado *et al.* (2014), onde o índice de Lee não apresentou diferença estatística significativa entres grupos de ratos Wistar machos tratados durante 24 dias com ração comercial para ratos, dieta hiperlipídica ou dieta hiperlipídica acrescida de infusão de erva-mate. Vale ressaltar, portanto, que as utilizações desses critérios de forma individual não são suficientes e adequadas para prever mudanças na composição corporal, pois não retratam as reais alterações possíveis. Tais avaliações antropométricas devem ser interpretadas conjuntamente com outros estudos (FERRAZ *et al.*, 2016).

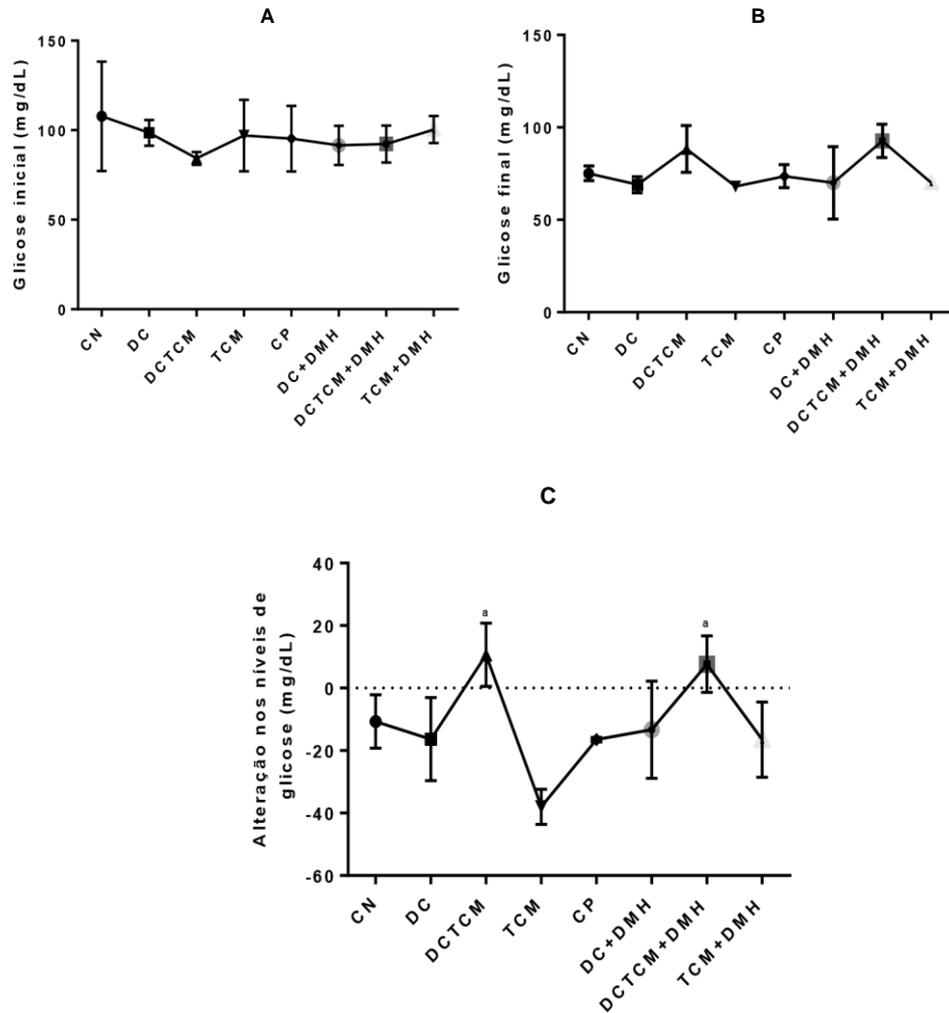
Apesar de ainda serem necessários avaliações mais aprofundadas sobre a composição corporal, esses dados iniciais permitem presumir que ambos os perfis cetogênico utilizados nesse estudo não foram capazes de influenciar no desenvolvimento, embora demonstrem modulação não significativa na composição corporal dos animais. Esses resultados provavelmente estão relacionados ao fato de que as dietas deste estudo não foram pensadas para apresentarem restrição calórica, mas sim ofertarem aporte calórico suficiente aos animais, bem como encontrar-se adequadas em relação aos micronutrientes (ARMENO *et al.*, 2019; FERRARIS *et al.*, 2019; KOSSOFF *et al.*, 2006).

6.3.3 Determinação da glicose e cetose

A diminuição drástica na disponibilidade carboidratos na dieta, como no caso da dieta cetogênica, na maioria das vezes faz-se reduzir também os níveis séricos de glicose e dessa forma reprogramam o organismo para outros substratos do metabolismo energético (KUTER *et al.*, 2021). Os níveis de glicose e cetonas séricas foram medidos antes de se iniciar os protocolos de dietas e ao final do experimento e os resultados obtidos são apresentados na Figura 8.

A princípio, todos os grupos receberam dieta padrão por 6 semanas e na primeira avaliação (antes do primeiro dia de DC), os animais dos diferentes grupos não apresentaram diferença significativa entre si em relação ao nível glicêmico (Figura 8A). Ao final do experimento, não houve diferença na glicemia entre os grupos DC e DC combinado ao DMH e DCTCM e DCTCM combinado ao DMH em relação ao grupo controle, assim como os demais grupos (Figura 8B). Esse desfecho é consistente com o estudo de Zhou *et al.* (2007) que mostra que uma dieta cetogênica quando ofertada de forma *ad libitum* não é capaz de influenciar nos níveis de glicose. Porém, ao avaliar a modulação entre os níveis de glicose inicial e final, observa-se que o grupo TCM apresentou uma redução significativa dos níveis de glicose em relação aos grupos DCTCM e DCTCM combinado ao DMH, sendo que nenhuma outra diferença foi digna de nota (Figura 8C).

Figura 8- Valores médios e desvio padrão das concentrações de glicose de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e seus respectivos controles.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: CN – Controle negativo (Dieta padrão + EDTA 1Mm 0,3), DC – Dieta cetogênica, DCTCM – Dieta cetogênica com triglicerídeo de cadeia média, TCM – Triglicerídeo de cadeia média, CP - Controle Positivo (DMH – 1,2 dimetilhidrazina 40 mg/kg p.c). A: níveis de glicose no início do experimento, B: níveis de glicose no final do experimento e C: alterações do nível de glicose durante o período experimental. Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey, $n = 6$ animais por grupo). ^a Significativamente diferente do grupo TCM.

A normoglicemia no plasma, mesmo após uma dieta que oferece quantidades limitadas de glicose, pode ser justificada pelo fato de que a glicose é capaz de ser sintetizada a partir de precursores não carboidratos, processo esse conhecido como gliconeogênese, pois enzimas chave no processo de gliconeogênese, tais como fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK1) e a glicose-6-fosfatase (G6PC), se mostram aumentadas em organismo em estado de cetose, levando a homeostase glicêmica (KUTER *et al.*, 2021).

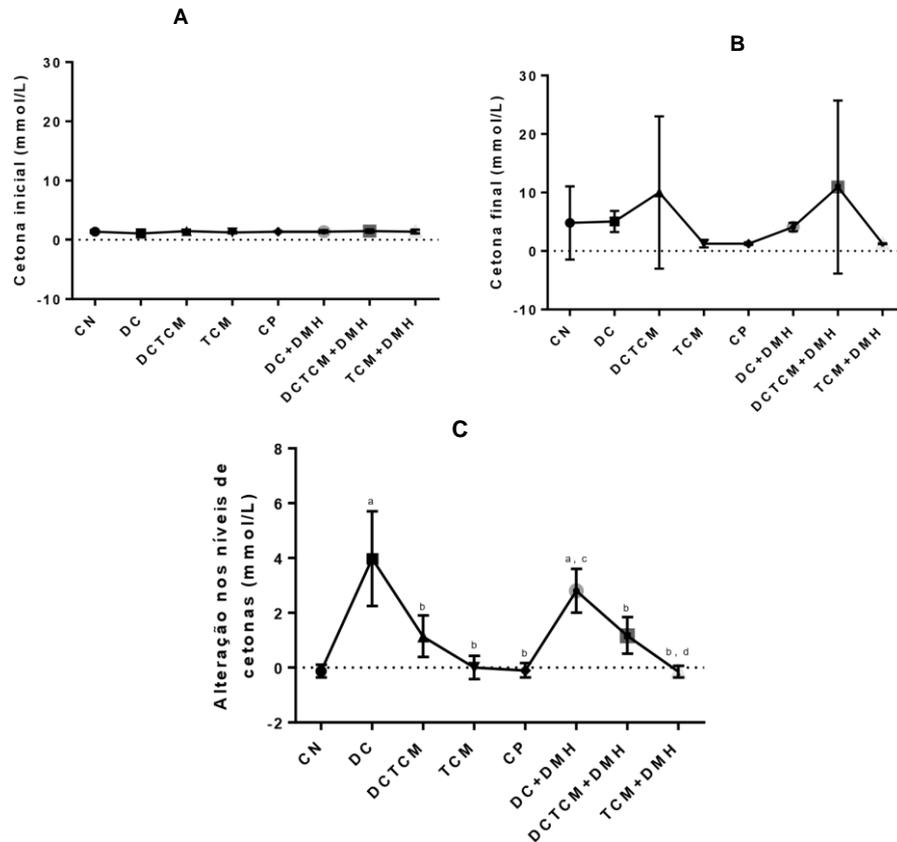
Os TCMs além de estarem associados a redução da inflamação também estão relacionados a melhora da sensibilidade a insulina de forma mais eficiente que os TCLs (THOMAS *et al.*, 2019). No processo de metabolização, os triglicerídeos são hidrolizados a ácidos graxos livres que possuem papel importante para a função normal das células β -pancreáticas amplificando a secreção de insulina e assim apresentando redução na glicose plasmática (NOLAN *et al.*, 2006). Nesse contexto, explica-se a redução apresentada pelo grupo TCM na diferença entre os níveis iniciais e finais de glicose. Resultado similar foi encontrado no estudo de Yeh e Zee (1976) que, em seu trabalho com ratos alimentados com TCM demonstraram após uma hora de ingestão o aumento nas concentrações plasmáticas de insulina e redução nos níveis de glicose, sendo que esses mesmos parâmetros não foram afetados nos animais tratados com TCL.

O ácido β -hidroxibutirato é um dos três corpos cetônicos gerados a partir de ácidos graxos e que pode ser usado para produção de energia nas mitocôndrias por meio do ciclo do ácido tricarboxílico, onde é convertido em ácido acetoacético e depois em acetil-CoA, em condições de privação de glicose (DUEREGGER *et al.*, 2015; NEWMAN; VERDIN, 2014).

Considerando tal abordagem, o presente estudo também avaliou o estado de cetose dos animais e os resultados estão apresentados na Figura 9. Em relação a alteração da concentração plasmática de corpos cetônicos, no início do experimento, os resultados demonstraram que os animais de todos os grupos estudados apresentavam um nível insignificante de cetose (Figura 9A) enquanto que, ao final do período experimental, observou-se que os grupos TCM, CP e TCM combinado ao DMH se mantiveram estáveis quando comparados ao controle negativo (Figura 9B). Os grupos nos quais receberam os tratamentos DC, DC combinado ao DMH, DCTCM e DCTCM combinado ao DMH por seis semanas, ao final do experimento, apresentaram aumento dos níveis de cetonas no sangue, demonstrando que ambas as dietas cetogênicas, no período analisado, foram capazes de induzir o organismo ao estado de cetose (Figura 9B e 9C).

Os grupos DC e DC combinado ao DMH aumentaram os níveis de corpos cetônicos em $3,97 \pm 1,72$ mmol/l e $2,8 \pm 0,79$ mmol/l respectivamente, durante o período de administração da dieta, sendo esse aumento significativo em relação ao grupo controle negativo (dieta padrão). O grupo DCTCM e DCTCM combinado ao DMH não apresentaram diferença estatística significativa quando comparado com grupo que recebeu dieta padrão, mas ainda assim revelou elevação nos níveis de corpos cetônicos em $1,3 \pm 0,75$ mmol/l e $1,16 \pm 0,66$ mmol/l, respectivamente, durante o período experimental (Figura 9C).

Figura 9 - Valores médios e desvio padrão da concentração de cetona no sangue de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e seus respectivos controles.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: CN – Controle negativo (Dieta padrão + EDTA 1Mm 0,3), DC – Dieta cetogênica, DCTCM – Dieta cetogênica com triglicerídeo de cadeia média, TCM – Triglicerídeo de cadeia média, CP - Controle Positivo (DMH – 1,2 dimetilhidrazina (40 mg/kg p.c). A: níveis de cetose no início do experimento, B: níveis de cetose no final do experimento e C: alterações do nível de cetose durante o período experimental. Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey, $n = 6$ animais por grupo. ^aSignificativamente diferente do controle negativo, ^bSignificativamente diferente do grupo DC, ^cSignificativamente diferente do grupo controle positivo (DMH 40 mg/kg p.c), ^dSignificativamente diferente do grupo DC + DMH.

Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com os achados da literatura, onde grupo de animais que são submetidos a dietas cetogênicas atingem estado de cetose em relação a seus controles. Arsyad *et al.* (2020) também trabalharam com perfil cetogênico de forma irrestrita, durante 60 dias, apesar de utilizarem dietas com proporção cetogênica maior do que do presente estudo, 8,6:1 e 7:1, respectivamente, e, também demonstraram elevação nos níveis de corpos cetônicos. Otto *et al.* (2008) avaliaram o efeito de uma dieta cetogênica suplementada com TCM e ômega-3 com razão cetogênica de 2,7:1 sendo gorduras: carboidratos mais proteínas, uma razão cetogênica menor que a utilizado no presente

estudo, no crescimento de células de câncer gástrico humano em camundongos nude, e demonstraram que os animais submetidos a dieta proposta também atingiram estado de cetose.

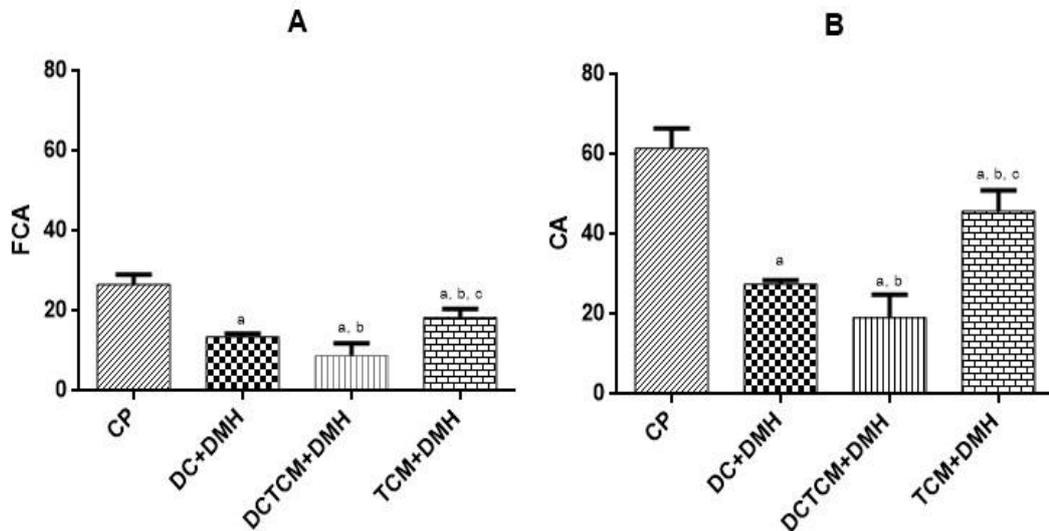
Os dois perfis dietéticos utilizados nesse trabalho direcionaram os animais ao estado de cetose, porém a DC demonstrou elevar ainda mais os níveis de corpos cetônicos quando comparada com DCTCM, sendo os grupos que apresentaram menor consumo de dieta cetogênica justamente aqueles que apresentaram corpos cetônicos séricos mais elevados (DC e DC combinado ao DMH), podendo o organismo em estado de cetose, acordo com Ma *et al* (2018) e Kashiwaya *et al.* (2010), modular os níveis de malonil-CoA, sendo este um hormônio anorexígeno e dessa forma influenciar no consumo alimentar. Na literatura, poucos são os trabalhos que se atentam ao perfil lipídico da dieta cetogênica e ainda os analisam de forma isolada. Nossos achados vão de encontro com os estudos disponíveis na literatura, nos quais mostram o caráter cetogênico dos TCMs que, por sua vez, ao contrário dos TCLs, são transportados para mitocôndria de forma independente do transportador de carnitina, sofrendo β -oxidação com maior eficiência que TCLs e, assim, elevando a produção de corpos cetônicos (MCCARTY; DINICOLANTONIO, 2016).

6.3.4 Avaliação do potencial quimiopreventivo na carcinogênese colorretal

A análise histológica dos FCA e das CA no cólon dos ratos foi realizada para avaliar o potencial carcinogênico e quimiopreventivo da DC e DCTCM sobre o processo de carcinogênese colorretal, após a indução química de lesões pré-neoplásicas. Não foram observadas nenhuma alteração histológica nos grupos controle negativo, DC, DCTCM e TCM de maneira isolada (sem combinação ao DMH – Apêndice A) indicando assim, ausência de potencial carcinogênico dos tratamentos utilizados.

Quanto ao potencial quimiopreventivo, os resultados estão apresentados na Figura 10. Os resultados demonstraram que os grupos de animais tratados com DC combinada ao DMH e DCTCM combinada ao DMH bem como o grupo tratado com TCM combinado ao DMH apresentaram uma redução significativa nos FCA de 49%, 67% e 30% ($p < 0,05$) (Figura 10A) e CA na proporção de 50%, 69% e 25% ($p < 0,05$) (Figura 10B) respectivamente, quando comparados ao grupo controle positivo (DMH) (Figura 10). À vista disso, todos os tratamentos demonstraram potencial quimiopreventivo. Entre os efeitos observados o mais significativo é apresentado para a DCTCM combinada ao DMH nos dois parâmetros avaliados (FCA e CA).

Figura 10 – Média de focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controle.



Fonte: Do autor (2022).

Legenda: FCA – Focos de criptas aberrantes, CA – Criptas aberrantes, DC – Dieta cetogênica, DCTCM – Dieta cetogênica com triglicerídeo de cadeia média, TCM – Triglicerídeo de cadeia média, CP- DMH – 1,2 dimetilhidrazina 40 mg/kg p.c.). A: Focus de criptas aberrantes, B: Criptas aberrantes. Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey, $n = 6$ animais por grupo) ^a Significativamente diferente do grupo controle positivo, ^b Significativamente diferente do grupo DC + DMH, ^c Significativamente diferente do grupo DCTCM + DMH.

A reprogramação metabólica das células cancerosas a partir do aumento da captação de glicose e a fermentação da glicose em lactato é conhecida como teoria do efeito Warburg, que pode explicar os efeitos quimiopreventivos observados em nosso experimento (WARBURG 1956). A DC e DCTCM possuem quantidades reduzidas de carboidratos, com isso, baixas concentrações de glicose estariam disponíveis para a síntese de energia. Dessa forma, as células cancerosas não possuem energia suficientes para se manterem, visto que essas necessitam de uma demanda maior de glicose por gerarem energia através da glicólise ao invés da fosforilação oxidativa como as células não diferenciadas.

A literatura aponta outros plausíveis mecanismos para a redução do número de lesões pré-neoplásicas, apesar dos níveis constantes de glicose no sangue, como encontrado em nosso trabalho. Sugere-se que o aumento expressivo de corpos cetônicos séricos e a provável capacidade da DC de reduzir significativamente os níveis de insulina, como fatores importantes para o possível efeito quimiopreventivo (SHARMAN *et al.*, 2002). Outro possível mecanismo, é a redução dos níveis de insulina baseados na modulação do *insulin-like growth factor I (IGF-I)* associada à tumorigênese (ZHANG *et al.*, 2021) visto que, nas células cancerosas, o receptor de insulina A é superexpresso, desencadeando então efeitos mitogênicos e assim fornecendo

vantagens de crescimento para as células malignas expostas a hiperinsulinemia. Além disso, os níveis elevados de insulina sérica aumentam a biodisponibilidade de IGF-1 e a superprodução de EROs que podem danificar o DNA e assim contribuir para a mutagênese e carcinogênese (ARCIDIACONO *et al.*, 2012; BELFIORE; MALAGUARNERA, 2011; VIGNERI; GOLDFINE; FRITTITTA, 2016).

O estado de hiperinsulinemia contribui para a carcinogênese colorretal por meio de uma cascata de ativações de diferentes vias culminando na ativação da proteína RAS, podendo esta ativar também proteína quinase ativada por AMP (AMPK), resultando assim na atividade mitogênica das células epiteliais colorretais (GOALSTONE *et al.*, 1998). Além disso, os colonócitos naturalmente possuem superexpressão receptores de IGF-1, o que também possibilita a proliferação celular (VALENTINIS; BASERGA, 2001). Vários estudos epidemiológicos confirmam a relação entre aumento na expressão de *IGF-1* e risco de CCR (KNUPPEL *et al.*, 2021; MUC-WIERZGOŃ *et al.*, 2014; MURPHY *et al.*, 2020).

Trabalhos como o nosso, que avaliaram o efeito da dieta cetogênica na redução de lesões pré-neoplásicas de CCR são inexistentes até o momento. Ao passo que a carência de dados traz dificuldades de comparação, mostra também a necessidade de pesquisas voltadas para o efeito quimiopreventivo desse perfil dietético que já se mostra muito utilizado em aplicações clínicas. Apesar de tal limitação, Hao *et al.* (2015), em modelo xenoenxerto em camundongos BALB/C machos, usando células tumorais de câncer de colón demonstraram efeito semelhante para a dieta cetogênica. Os animais foram divididos em grupos que receberam DC rica em TCM e ácido graxo insaturado ômega-3, DC com TCL e um grupo controle que recebeu dieta padrão, todos em forma *ad libitum*. Após o período experimental, foi possível constatar que ambas as dietas apresentaram um efeito retardador no crescimento do tumor e resultou em áreas necróticas maiores dentro dos tumores. Os autores relacionaram esses resultados com as elevadas concentrações de corpos cetônicos séricos e a presença de TCM e gordura insaturada na composição da dieta, visto que não houve diferença na glicemia.

Estudos sugerem que a atividade anti-inflamatória da DC a direciona como um possível instrumento de prevenção do câncer (HURSTING *et al.*, 2013), visto que a inflamação descrita como um aumento de citocinas inflamatórias na circulação local e sistêmica tem sido considerada um traço relevante na carcinogênese (HARVEY; LASHINGER; HURSTING, 2011). A DC por sua vez, quando composta parcialmente por gorduras insaturadas, mostra-se capaz de reduzir os níveis de citocinas circulantes, além de reduzir a sinalização de NF- κ B (*Nuclear factor kappa B subunit 1A*) e expressão de *COX-2* (*Cyclooxygenase 2*) levando assim a um efeito preventivo (ELISIA; KRYSTAL, 2021).

Com relação a elevação plasmática de corpos cetônicos, este se mostra fator fundamental na eficácia anticancerígena da dieta cetogênica. Tal efeito se deve a alteração forçada das células cancerosas em relação ao seu metabolismo energético (HESS; KHASAWNEH, 2015). Estudos apontam que em estado de cetose há a alteração das vias metabólicas glicólise e fosforilação oxidativa (BOLAND; CHOURASIA; MACLEOD, 2013). Notoriamente, a produção excessiva de EROs, a partir da oxidação mitocondrial, induz estresse oxidativo (DUEREGGER *et al.*, 2015), proporcionando um ambiente incompatível com o crescimento e sobrevivência de células tumorais sem causar prejuízos as células normais, resultando dessa forma em efeitos anticancerígenos (RAJ *et al.*, 2011).

No atual estudo, o grupo no qual foi induzido a lesão pré neoplásica e posteriormente tratado com DCTCM apresentou uma redução de FCA e CA maior que os demais grupos. Ademais, o grupo de TCM em associação com carcinógeno químico, também apresentou redução significativa no número de lesões pré neoplásicas. Dessa forma, podemos assegurar que a qualidade lipídica da dieta cetogênica é um fator importante, visto que quando composta por TCM e proporções de gordura insaturada adequada, estes componentes, juntos, podem potencializar os efeitos desse perfil dietético. Estudos mostram que quando a dieta possui em sua composição TCM e ácido graxo insaturado esta se mostra mais efetiva (HAO *et al.*, 2015). Segundo Kadochi *et al* (2017), a utilização de β HB e TCM de forma conjunta ou individual, em presença ou não de glicose, apresenta diferentes efeitos em relação a proliferação celular, estresse oxidativo e remodelação do metabolismo energético direcionando-o para fosforilação oxidativa e conseqüentemente gerando estresse oxidativo que causa danos celulares em células cancerosas (KADOCHI *et al.*, 2017).

Uma das principais preocupações em relação a DC é a alta quantidade de gordura, especialmente quando rica em gordura saturada uma vez que esta pode induzir a inflamação e desencadear diferentes prejuízos a saúde (FRITSCHÉ, 2015), inclusive promover a formação de CCR, visto que o consumo excessivo de gordura estimula a secreção excessiva de ácidos biliares que por sua vez podem ser reciclados no fígado e promover carcinogênese a longo prazo (BERNSTEIN *et al.*, 2011; FU *et al.*, 2019). Em contraste, as gorduras poliinsaturadas como EPA (ácido eicosapentaenoico), DHA (ácido docosa-hexaenóico) e ômega-3 possuem propriedades anti-inflamatórias (ELISIA; KRYSTAL, 2021). Nesse sentido, May-Wilson *et al.* (2017) identificaram a associação entre os níveis plasmáticos de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), moniinsaturados (MUFA) e saturados e o risco de CCR. O ácido oleico (MUFA), o ácido palmitoleico (MUFAs) e o ácido linoleico (PUFA) mostraram associação com a redução do risco de CRR, enquanto o ácido graxo araquidônico (PUFA) e o ácido esteárico (ácido graxo

saturado) foi associado ao risco aumentado de CCR. Com isso, mostra-se o benéfico de aumentar a ingestão de ácidos graxos insaturados e reduzir o consumo de gorduras saturadas.

Devido a escassa literatura associando os efeitos da dieta cetogênica na carcinogênese colorretal em modelos animais e apesar do abismo que há entre os estudos *in vivo* e *in vitro* devido simplificação da realidade, destacando apenas alguns ângulos e não apresentando todas as especificidades do processo (BEKISZ *et al.*, 2022), os estudos *in vitro* podem apoiar os achados do atual trabalho. Em 2017, Kadochi e colaboradores estudaram a influência da cetose e/ou triglicerídeos de cadeia média em células de câncer de cólon de camundongos CT26. De acordo com os autores, o β HB e TCM apresentam papéis diferentes no metabolismo quando utilizados de forma associada ou isolada, na presença ou não de glicose. Em relação a proliferação celular, na presença de glicose, tanto β HB quanto TCM, de forma isolada ou combinada, demonstraram potencial supressor da carcinogênese na presença e na ausência de glicose. Esse efeito se deu em decorrência da regulação positiva do estresse oxidativo, por meio da inibição da peroxidação lipídica consequentemente causando a redução de produtos decorrentes como 4-hidroxinonenal (4-HNE), porém, de forma isolada TCM apresentou melhores resultados.

Estudos mostram que níveis circulantes de fosfatase alcalina dentro dos intervalos normais podem estar associados a menores risco de CCR (HE *et al.*, 2021). A fosfatase alcalina é uma enzima que se mostra supressa em diferentes tipos tumorais e a inibição de sua atividade pode reduzir a viabilidade das células cancerosas e induzir a apoptose (RAO *et al.*, 2017). Nesse sentido, β HB e TCM quando utilizados concomitantemente inibiram a atividade da fosfatase alcalina em diferentes concentrações de glicose, porém, de modo isolado o β HB apresenta capacidade de reduzir a atividade dessa enzima em meio suplementado com glicose, em contraste, TCM induziu sua atividade na presença e ausência de glicose. Além disso, foi possível observar que as células CT26 não conseguiram utilizar corpos cetônicos como fonte de energia devido a uma deficiência cetolítica onde a enzima succinil-CoA transferase (SCOT) que se mostra reduzida, mesmo com tratamento de β HB e TCM. Por outro lado, a carnitina palmitoiltransferase 1A (CPT1), enzima importante para o transporte e controle da oxidação dos ácidos graxos na mitocôndria foi expressa em altos níveis. Por fim, os autores concluíram que, no modelo *in vitro* que β HB e TCM possuem a capacidade de modular positivamente as vias de produção de estresse oxidativo, evitando danos nas células cancerosas (KADOCHI *et al.*, 2017). Esses achados, reforçam mais uma vez o que foi observado em nosso estudo em relação a qualidade lipídica das dietas. Embora a diferença não seja significativa, nossos resultados demonstram que houve uma tendência de que DC com melhor qualidade lipídica,

sendo aquela acrescida de TCM e ácido graxo insaturado, tenha demonstrado ser mais eficaz que a DC com TCL.

Para além disso, a relação das dietas no contexto da modulação da expressão gênica no câncer colorretal é digna de profunda exploração, tendo em vista os resultados expressivos obtidos neste trabalho e os potenciais efeitos quimiopreventivos subsequentes.

6.3.5 Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico dos perfis cetogênicos

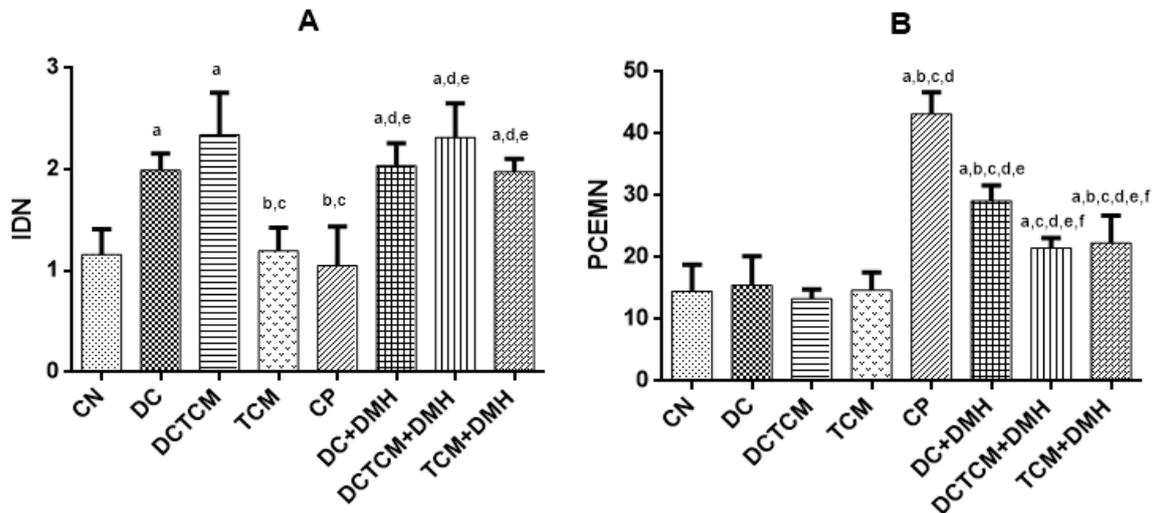
O ensaio do micronúcleo foi realizado com o intuito de avaliar a mutagenicidade proveniente dos tratamentos bem como sua capacidade em reduzir efeitos mutagênicos e, conseqüentemente a carcinogênese. Os resultados da razão de eritrócitos policromáticos/eritrócitos normocromáticos (PCE/NCE) e a frequência média de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) obtidas em células da medula óssea de ratos Wistar tratados com os diferentes perfis cetogênicos e seus respectivos controles estão apresentados na Figura 11.

Não foram observadas reduções significativas em relação a razão PCE/NCE de nenhum dos grupos experimentais quando comparados ao grupo controle negativo, indicando ausência de citotoxicidade nos diferentes tratamentos (Figura 11A). No entanto, um aumento na razão PCE/NCE de células da medula óssea foi observado nos grupos tratados DC, DCTCM isolados e DC, DCTCM e TCM combinado ao DMH quando comparado aos grupos CN, TCM e CP (Figura 11B).

Não foram observadas diferenças significativas entre os valores médios de PCEMN nos grupos tratados com DC, DCTCM e TCM quando comparados ao controle negativo. Como esperado, o grupo CP apresentou elevação de 198% na frequência de PCEMN quando comparado com CN. Os grupos DC, DCTCM e TCM combinados ao DMH apresentaram uma redução significativa de 32%, 50% e 48%, respectivamente, nos PCEMNs quando comparado ao grupo tratado apenas com DMH. Neste sentido, os grupos de DCTCM e TCM combinados ao carcinógeno químico apresentaram os maiores efeitos na de redução de danos (Figura 11B).

Esses achados reforçam os resultados encontrados no teste de focos de criptas aberrantes, onde o efeito quimiopreventivo obtido se dá em partes pela capacidade de os tratamentos reduzirem eventos mutagênicos.

Figura 11 – Média da razão de eritrócitos policromáticos (PCE) / eritrócitos normocromáticos (NCE) e de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) observadas na medula óssea de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controles.



Fonte do autor (2022).

Legenda: NCE – Eritrócitos normocromáticos, PCE – Eritrócitos policromáticos, PCEMN – Eritrócitos policromáticos micronucleados, DC – Dieta cetogênica, DCTCM – Dieta cetogênica com triglicérido de cadeia média, TCM – Triglicérido de cadeia média, CP- DMH – 1,2 dimetilhidrazina 40 mg/kg p.c.). Referência para $p < 0,05$, (ANOVA one-way, e teste de Tukey, $n = 6$ animais por grupo). ^aSignificativamente diferente de CN, ^bSignificativamente diferente de DC, ^cSignificativamente diferente de DCTCM, ^dSignificativamente diferente de TCM, ^eSignificativamente diferente de CP, ^fSignificativamente diferente de DC+DMH.

Os dados desse trabalho comprovam que o carcinógeno na respectiva dose utilizada apresentou características mutagênicas, porém não citotóxicas, além disso os tratamentos empregados mostraram-se capazes de aumentar o número de células da medula óssea. A terapia contínua com DC pode desencadear alguns efeitos adversos, a depender do perfil lipídico e de sua composição, cabendo destacar a hiperlipidemia em decorrência da hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e elevação de outras lipoproteínas. O alto teor de lipídeos, resulta na elevação de ácidos graxos livres que por sua vez são utilizados como fonte de energia para a auto renovação de células tronco hematopoiéticas e diferenciação de células progenitoras (PERNES *et al.*, 2019). Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (60%) por um longo período de tempo, apresentaram por sua vez, aumento na frequência de células tronco intestinais e auto renovação, além disso nesse mesmo estudo, a partir de testes *in vitro* os autores demonstraram que as criptas de animais tratados com dieta hiperlipídica apresentaram maior propensão em se regenerar (BEYAZ *et al.*, 2016).

Para mais, a DC simula em alguns aspectos o estado de jejum por ambas intervenções induzirem a cetogenese. Estudos apontam que a retirada prolongada de alimento por 48 horas

é capaz de reduzir os danos nas células-tronco, proteger animais de experimentação contra a quimiotoxicidade, além de provocar a regeneração hematopoiética via mediação de IGF-1/PKA (cAMP dependent protein kinase). Dessa forma intervenções que reduzam a sinalização de IGF-1, contribuem para reestabelecimento de efeitos adversos proveniente da tumorigenese (CHENG *et al.*, 2014). Ademais, a produção de corpos cetônicos, principalmente β HB, gerado durante o estado de cetose é capaz de promover a auto-renovação de células tronco intestinais a partir da inibição das histonas desacetilases (HDACs) (CHENG *et al.*, 2019), DC também mostrou aumentar o número de células tronco de músculos esqueléticos (FUJIKURA *et al.*, 2021). Além disso suplementos cetogênicos exógenos levam a promoção da proliferação de células neurais saudáveis (KOVÁCS; BRUNNER; ARI, 2021). No entanto, não há estudos na literatura que demonstrem efeitos de uma dieta cetogênica sob células tronco hematopoiéticas, porém, a partir de nossos resultados sugerimos que tal intervenção dietética pode modular a hematopoiese e/o envelhecimento de tais células, sendo este um caminho molecular para a longevidade.

Em suma, nos resultados demonstram um que o aumento na razão PCE/NCE nos grupos tratados com DC e DCTCM tanto isolado quanto combinado com DMH, quando comparados ao grupo controle negativo podem estar relacionados aos lipídeos presentes nas dietas que agem como substrato energético para autorenovação celular, além de possíveis efeitos advindos do estado de cetose como redução de IGF-1 e elevação β HO. Ainda que os tratamentos cetogênicos proporcionam otimização da hematopoiese esse processo torna-se um fator de risco para proliferação celular nos tecidos transformados, em contrapartida, nossos achados demonstram redução de criptas aberrantes nos grupos tratados. Tal resultado se dá pelo fato de que o efeito Warburg é seletivo para células cancerosas, visto que diferentes das células não transformadas as células tumorais direcionam seu metabolismo energético para a glicólise anaeróbia, dessa forma estratégias que induzam à inibição da glicólise, como DCs, podem aumentar a seletividade atingindo e destruindo células cancerosas de forma mais efetiva (SCATENA *et al.*, 2010).

Os eventos que ocorrem durante a divisão celular podem levar a danos no material genético, tais como danos clastogênicos os quais danificam os cromossomos ou aneugênicos que induzem aneuploidia ou segregação anormal do cromossomo (FERRAZ *et al.*, 2016). Esses danos citogenéticos se dão em decorrência de influências genéticas ou ambientais, que, devido ao não reparo ou perda de reparo de lesões no DNA pode resultar em acúmulo de fragmentos no citoplasma das células, havendo posteriormente a formação de uma membrana ao envoltório dessas frações de material genético, formando dessa forma micronúcleos (MN) (HAYASHI, 2016). Tais estruturas foram encontradas em elevada frequência nos grupos em que a lesão pré-

neoplásica foi induzida com DMH com dose final de 240 mg/kg p.c. Estudos apontam que o DMH e seu metabólito azoximetano são potentes agentes mutagênicos, os quais iniciam suas atividades mutagênicas através da metilação da guanina, que por sua vez é pareada com timina ao invés de citosina, provocando dessa forma modificação e emparelhamento incorreto entre as bases nitrogenadas, levando por conseguinte mutações no DNA (VENKATACHALAM *et al.*, 2020). Mesmo que utilizado em doses mais baixas (160 mg/kg p.c), menor que no presente estudo, o DMH demonstrou ter efeito mutagênico, apresentando aumento na frequência de MN em 4,25 vezes em relação ao grupo controle negativo (DO AMARAL *et al.*, 2021).

No presente estudo, os tratamentos utilizados se mostraram seguros e não foram capazes de causar danos no DNA. Ambos os modelos de DC foram capazes de reduzir a frequência de MN induzidos pelo carcinógeno mutagênico DMH, principalmente DCTCM composta por 25% de gordura insaturada. Esses achados complementam e explicam os resultados encontrados no teste de FCA no qual os perfis dietéticos mostraram-se quimiopreventivos. Fatores ambientais e o estilo de vida possuem a capacidade de metilar o DNA, sendo este um dos eventos epigenéticos mais investigados atualmente, no qual consiste na adição catalítica de grupos metil na 5ª posição dos anéis de citosina dos dinucleotídeos CpG mediado pela DNA metiltransferases, culminando na regulação da expressão gênica, sendo este um fator comum e crítico para carcinogênese, onde a grande maioria dos casos de CCR apresentam genes metilados de forma aberrante (OKUGAWA; GRADY; GOEL, 2015). Sugere-se que a redução da frequência de MN observada nos grupos em tratamento com os perfis dietéticos deva ser, pelo menos em parte, em decorrência dos mecanismos epigenéticos modulados pela DC. Estudos que elucidam os mecanismos epigenéticos da DC sob a carcinogênese são escassos na literatura. No entanto, alguns poucos trabalhos mostraram que a DC aumenta a sinalização de adenosina que por sua vez é um bloqueador da metilação de DNA (LUSARDI *et al.*, 2015; WILLIAMS-KARNESKY *et al.*, 2013;).

Outro evento epigenético é a disfunção no padrão de acetilação e desacetilação de histonas que levam a desregulação na expressão gênica, infinitamente relacionado com a etiologia do CCR (BISWAS; RAO, 2017). Estudos apontam que geralmente HDAC1 (histone deacetylase 1) apresenta-se elevada em tecidos de tumores colorretais (SU *et al.*, 2016), bem como HDAC2 (histone deacetylase 2) que mostrou-se regulada positivamente em linhagens de células CCR (YE *et al.*, 2016). Dessa forma, terapias que inibam essas enzimas contribuiriam para a redução de danos no material e conseqüentemente da carcinogênese através de modificações na cromatina. O principal produto da DC, o β HB gerado a partir da metabolização dos ácidos graxos, que age como um inibidor endógeno de HDAC1, visto que um dos principais

inibidores de HDAC de classe I e II é o butirado que está intimamente relacionado com este corpo cetônico. Com a inibição de tais enzimas há a modulação na expressão de proteínas a nível pós-traducional, afetando dessa forma a metilação do DNA e acetilando proteínas histonas e não histonas envolvidas em vias carcinogênicas, o que reduz eventos mutagênicos envolvidos na tumorigênese (BENJAMINA *et al.*, 2017).

Sugerimos ainda que as propriedades lipídicas possam ter influência na redução da frequência de PCEMNs, visto que o grupo DCTCM combinado ao DMH apresentou redução mais acentuada na frequência de PCEMNs quando comparado com o grupo DC associado ao DMH. Propomos que tal redução tenha se dado também em decorrência da presença de PUFA e MUFA, constituintes do óleo de canola utilizado na dieta. Honda *et al.* (2016) empregando o teste de micronúcleos na medula óssea de roedores analisou o efeito mutagênico do ácido alfa-linolênico-diacilglicerol e os resultados revelaram que tal composto não apresentou capacidade em gerar danos aneugênico e nem clastogênico em diferentes doses (HONDA *et al.*, 2016). Além disso, efeito protetor advindo do ácido graxo alfa-linolênico (ALA) foi encontrado em uma meta-análise na qual avaliou quantitativamente a associação dose-resposta dos níveis de ALA na dieta com risco de CCR, e pode-se notar que níveis aumentados de ingestão desse ácido graxo apresentam benefícios na prevenção do desenvolvimento de CCR (DAI *et al.*, 2022). Outro ácido graxo, ômega-6 (ácido di-homo- γ -linolênico) pode ser convertido em prostaglandinas E1 que por sua vez atua como fator anti-inflamatório, contrabalanceando a prostaglandina E2 capaz de mediar a inflamação, dessa forma ácidos graxos derivados do ácido linolênico apresentam elevado efeito protetor contra doenças proliferativas na qual inflamação mostra-se é um fator relevante (WANG; LIN; GU, 2012). Tal vínculo pode estar relacionado ao fato de que o ALA pode ser convertido em ácidos graxos ω -3 de cadeia mais longa como EPA, ácido docosapentaenóico (DPA) e DHA (BARCELÓ-COBLIJN; MURPHY, 2009). Estes ácidos graxos possuem efeito na modulação da atividade das COXs, inibindo assim o crescimento do tumor a partir da redução de prostaglandina de séries 2 derivada de ω -6 PUFA (POOLE *et al.*, 2007). Além disso, tais perfis lipídicos, auxiliam na redução dos níveis de expressão de marcadores pró-inflamatórios como IL-6, IL-1 β , TNF- α e MCP-1 (GDP-D-glucose phosphorylase 1) (PAULS *et al.*, 2018), e por fim, o ALA pode regular o mecanismo de apoptose e a via de sinalização de NF- κ B relacionada à resposta inflamatória e controlar proliferações, migrações e invasões tumorais (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; ORTEA; GUILGUERRERO, 2020).

Outro componente do óleo de canola é o ácido oleico, cujo seu mecanismo de ação na prevenção de eventos mutagênicos foi associado a capacidade de desencadear respostas

autofágicas. Apesar de possuir um papel ambíguo, a autofagia pode evitar o acúmulo de células mutantes ou agregação de EROs, impossibilitando a progressão do câncer em estágios iniciais (BURADA *et al.*, 2015). Tais resultados associados ao do presente trabalho corroboram com os achados de Jiang *et al.* (2017), no qual verificou o efeito do ácido oleico sob carcinoma espinocelular da língua em um modelo de xenoinxerto em camundongos, e observaram que tal MUFA apresenta um efeito quimiopreventivo por induzir a apoptose e autofagia através do bloqueio da via Akt/mTOR. Ainda, Zhang *et al.* (2020) a partir de um estudo de randomização mendeliana encontrou evidências de que elevados níveis ácido oleico sérico esta associado a baixo risco de CCR.

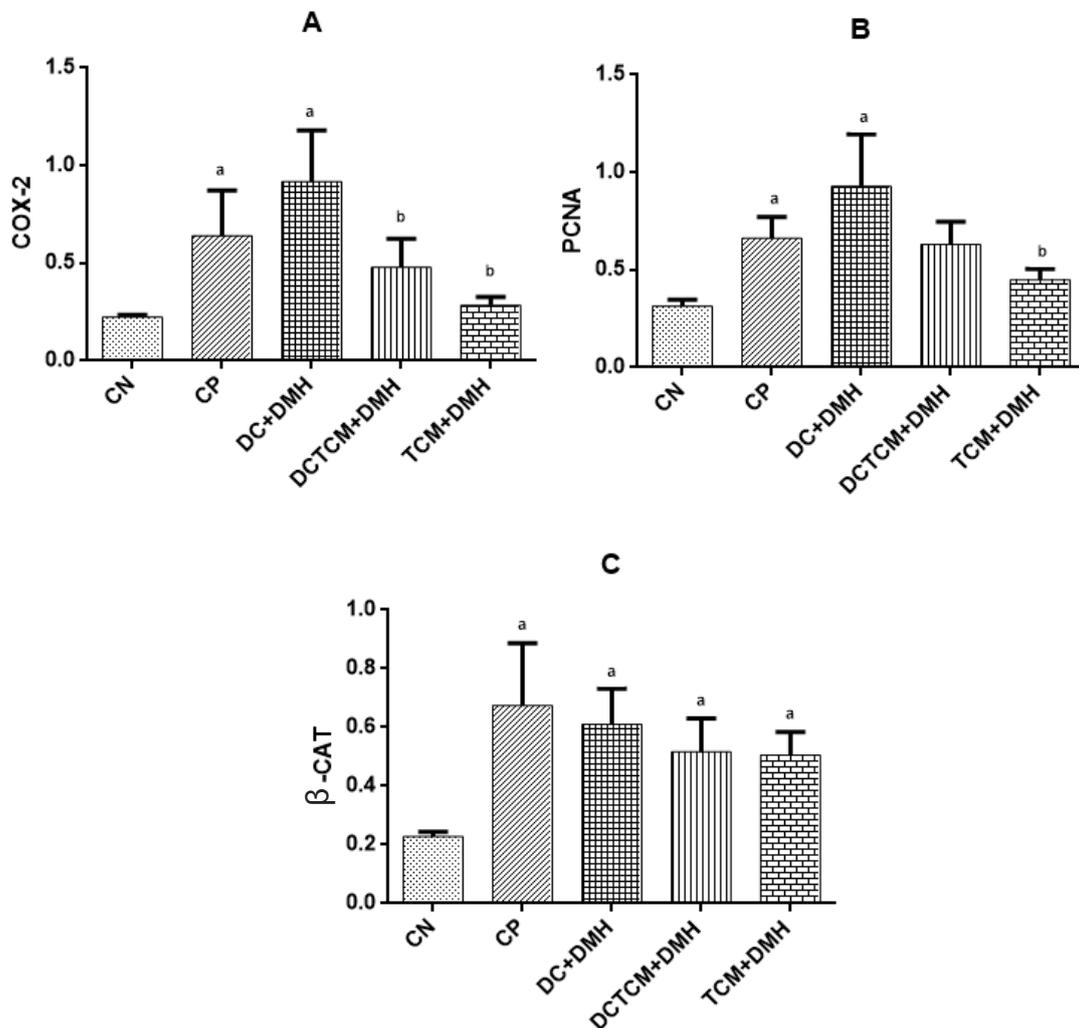
O perfil cetogênico em questão era constituído também por TCM, nossos resultados demonstram que TCM utilizado de forma isolada possui a capacidade de reduzir mecanismos mutagênicos, porém ainda é incompreendido como esse composto age sob a carcinogênese do colón. Ströher *et al.* (2020) ao submeter ratos Wistar a dieta hiperlipídica por 12 semanas e posteriormente trata-los com 2 mL/kg de soro fisiológico ou óleo de coco via *gavage* por 30 dias, respectivamente, demonstram que após o período experimental o óleo de coco associado a uma dieta hiperlipídica não foi capaz de modular danos no DNA visto que os grupos não apresentara diferença significativa entre si em relação a frequência de MN, no qual foi avaliado em células da medula óssea (STRÖHER *et al.*, 2020). No entanto, Ramya *et al.* (2022) analisaram o papel do óleo de coco e seu principal componente o ácido láurico sob a citoproteção e morte de células de neuroblastoma humano *in vitro*, os autores puderam evidenciar que o óleo de coco proporciona manutenção do equilíbrio redox, através modulação de ERO, redução na expressão de genes chaves de resposta ao estresse oxidativo e genes inflamatórios. Já de forma isolado o ácido láurico suprimiu a expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo e genes inflamatórios. Neste sentido, a supressão da inflamação e a eficiente atividade antioxidante advinda do ALA pode ter influenciado na redução de mecanismo mutagênicos e contribuído para a supressão da carcinogênese no grupo TCM combinado ao DMH.

6.3.6 Avaliação Imunohistoquímica

Vias moleculares multifacetadas então envolvidas na prevenção e formação tumoral, visto que os tratamentos dietéticos utilizados no presente trabalho se mostraram eficazes na redução de lesões pré-neoplásicas no colón de ratos, foi-se então realizado a análise de imunohistoquímica a fim de se investigar quais seriam os mecanismos envolvidos no efeito

quimiopreventivo das dietas. Assim, realizamos a imunomarcação de ciclooxigenase-2 (COX-2), do antígeno nuclear de proliferação (PCNA) e de β -catenina. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 12.

Figura 12- Quantificação imunohistoquímica de COX-2, PCNA e β -catenina no tecido colorretal distal de ratos Wistar tratados com DC, DCTCM e TCM após a indução de lesões pré-neoplásicas com 1,2-dimetilhidrazina.



Fonte: do autor (2022).

Legenda: DC – Dieta cetogênica, DCTCM – Dieta cetogênica com triglicerídeos de cadeia média, TCM – Triglicerídeo de cadeia média, CP- DMH – 1,2 dimetilhidrazina 40 mg/kg p.c.). Referência para $p < 0,05$, (ANOVA one-way, e teste de Tukey, $n = 4$ animais por grupo). ^aSignificativamente diferente do grupo controle negativo, ^bSignificativamente diferente do grupo DC + DMH.

A quantificação imuno-histoquímica revelou que as dietas não foram capazes de reduzir a expressão de COX-2, PCNA e β -catenina de maneira significativa. Porém, os resultados demonstram uma elevação significativa na expressão de COX-2 (43%) e PCNA (40%) no grupo

de DC combinado ao DMH quando comparado aos grupos CP. Esses resultados presumem que a DC por sua vez, expõem capacidade de potencializar a inflamação e proliferação celular em organismos predispostos (Figura 12). Não foi possível observar tal modulação em relação a expressão de β -catenina nos diferentes grupos tratados, ou seja, grupos DC, DCTCM e TCM combinados ao carcinógeno químico DMH não mostram diferença entre si em relação ao acúmulo nuclear dessa proteína, porém apresentaram diferença discrepante em relação ao grupo controle negativo (Figura 12). Postulamos que a ausência de modulação significativa para esses marcadores possa estar relacionada ao tempo de exposição as dietas que devido às tendências demonstradas, poderiam ser melhor ajustados. Nossos achados ainda demonstram que, apesar de uma redução significativa de lesões pré-neoplásicas terem sido observadas nos três diferentes tratamentos dietéticos, esse efeito não é advindo da modulação de vias inflamatórias (COX-2) e proliferativas (PCNA e β -catenina), visto que, nenhum grupo de tratamento combinado ao DMH apresentou redução estatisticamente significativa. No entanto, o teor lipídico bem como a diferença da qualidade lipídica dos tratamentos utilizados pode explicar a diferença no perfil de expressão nos marcados avaliados.

A inflamação é um promotor tumoral já bem estabelecido, no qual é indispensável para o crescimento, angiogênese e resistência a apoptose de células cancerosas, além de que, durante o processo inflamatório há exacerbada produção de metabólitos capazes de desencadear lesões citotóxicas e mutagênicas no DNA (FISHBEIN *et al.*, 2021). A ligação entre inflamação e câncer é composta por mediadores de vias inflamatórias, dentre estes, tem destaque o papel da COX-2, uma enzima chave no metabolismo de ácidos graxos, regulada positivamente durante a inflamação e câncer (DESAI; PRICKRIL; RASOOLY, 2018). Nosso trabalho corrobora com essa informação uma vez que foi possível observar uma superexpressão de COX-2 no grupo controle positivo em relação ao grupo controle negativo.

A COX-2 atua catalisando a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina (PG) G2 e H2, sendo posteriormente precursoras de prostaglandinas D2, E2, F2 α , I2 e tramboxanos A2, componentes chaves do processo inflamatório (CHANDRASEKHARAN; SIMMONS, 2004). Esta enzima se mostra um importante biomarcador da carcinogênese colorretal, visto que a inflamação mediada por prostaglandinas, principalmente prostaglandina E2, esta fortemente interligada ao desenvolvimento e progressão desse tipo tumoral. Há evidências que correlacionam a superexpressão de COX-2 com a inibição da apoptose, desencadeando um desequilíbrio na homeostase entre as células colônicas mutantes e a taxa de proliferação continuamente crescente, além de indução da expressão de *BLC2* (*BCL2 apoptosis regulator*), e estimulação da angiogênese (ABBATE *et al.*, 2006; ŞAHIN; GÖMŞLÜ, 2009).

Ao contrário dos nossos resultados, dados disponíveis na literatura atual apontam que diferentes perfis cetogênicos são capazes de reduzir, em diferentes tipos tumorais, biomarcadores de inflamação bem como a expressão de diferentes genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo. Nos estudos de Stafford *et al.* (2010), camundongos portadores de glioma apresentaram redução na expressão de COX-2 após serem tratados com dieta cetogênica composta por 8,36% de proteína, 0,76% de carboidratos e 78,8% de gordura, no qual levou a redução do crescimento tumoral e da angiogênese observada em tumores cerebrais. Em outro estudo também com glioma, foi possível observar que a DC em proporção cetogênica de 4:1, induziu a redução significativa de NF- κ B estando este envolvido na mediação da inflamação, proliferação celular, migração celular e angiogênese (WOOLF *et al.*, 2015). Nessa vertente, são escassos os estudos que abordam os efeitos da DC em tumores de cólon e reto, no entanto Nakamura *et al.* (2018) investigaram o efeito da DC em camundongos com câncer colorretal e relataram que animais desse grupo apresentaram redução do volume tumoral bem como diminuição dos níveis plasmáticos de IL-6. Os autores sugerem que tal efeito é advindo da própria elevação dos corpos cetônicos séricos, visto que outros estudos apontam que β Hb exerce efeito anti-inflamatório em outras patologias como Parkinson por direcionar a supressão e produção de IL-1 β e IL-18 (FU *et al.*, 2015), além disso, os autores ainda sugerem que a supressão da resposta inflamatória pode estar associada ao efeito secundário ao efeito antitumoral da dieta cetogênica.

A discrepância entre os achados da literatura e os encontrados em nosso estudo, podem ser devido a razão cetogênica distinta entre tais trabalhos. Utilizamos de perfis dietéticos com razões cetogênicas de 7:1, enquanto que, a maioria dos estudos que investigaram expressão gênica de biomarcadores trabalharam com dieta cetogênicas com em média 4g de lipídio para 1g de carboidrato mais proteína (4:1). A elevada quantidade de gordura presente nos perfis cetogênicos desenvolvidos por nós certamente influenciou em nossos resultados, visto que, já é claro na literatura que a quantidade e qualidade lipídica influenciam na expressão de vias inflamatórias e proliferativas envolvidas na carcinogênese (HU *et al.*, 2021). No entanto, o presente estudo teve como um dos objetivos principais avaliar o efeito da cetose sob a carcinogênese do colón e para isso foi necessário utilizar perfis dietéticos com razões cetogênicas mais elevadas, as quais foram baseadas em trabalhos que asseguram que razões cetogênicas de 8:1 são capazes de levar animais de experimentação ao estado cetose (SU *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2004).

Dietas com elevado teor lipídico se tornam fatores de risco para o CCR visto que altas

concentrações de gordura promovem um aumento significativo de ácidos biliares secundários, como ácido desoxicólico e ácido litocólico. O ácido desoxicólico causa ativação da proteína quinase C e liberação de ácido araquidônico, que posteriormente é convertido em prostaglandinas pró-inflamatórias e pró-angiogênicas, além de espécies reativas de oxigênio, que acarretam danos ao DNA e inibem a atividade de enzimas de reparo do DNA, tornando-se então fator de risco para inflamação do cólon e conseqüentemente o câncer (CHENG; RAUFMAN, 2005). Além disso, dietas com elevado teor lipídico induzem à alterações na microbiota intestinal, ativação de vias pró-inflamatórias, podem levar a obesidade, além de provocar estresse oxidativo, condições estas que associadas contribuem e culminam em processos inflamatórios (BOJKOVÁ; WINKLEWSKI; WSZEDYBYL-WINKLEWSKA, 2020). Tal relação fica clara ao observar que em nosso trabalho o grupo tratado com TCM associado ao DMH, no qual consumiu dieta padrão para roedores com teor lipídico de apenas 10%, não apresentou superexpressão de COX-2, mas sim uma redução de 70% na expressão dessa proteína em relação ao grupo DC+DMH, e ainda que sem diferença estatística significativa uma redução de 41% em relação ao grupo DCTCM+DMH, onde em ambos os perfis cetogênicos 94% das calorias são provenientes de lipídios.

A DC empregada no presente estudo é composta em sua maioria por gordura saturada, que por sua vez apresenta elevado potencial em promover e potencializar inflamação, assim como observado em nossos resultados, por reproduzir a ação dos lipopolissacarídeos conhecido também como endotoxinas, um componente endógeno da parede celular de todas as bactérias gram-negativas. As endotoxinas quando ligadas ao seu receptor *tool - like 4* (TLR4) estimula certos fatores como NF- κ B, que posteriormente ativa a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8, que possuem a capacidade de romper a barreira epitelial, contribuindo assim para a permeabilidade intestinal. Dessa forma, há a passagem de endotoxinas, ácidos graxos livres e citocinas inflamatórias para a circulação, propiciando dessa maneira inflamação sistêmica (CANI *et al.*, 2007). Visto que a COX-2 é uma enzima induzível, sua expressão em fibroblastos colorretais associados ao câncer pode ser influenciada por estímulos pró-inflamatórios como o consumo excessivo de gordura saturada, na qual contribui para a ativação de inúmeras cascatas moleculares desencadeando assim a diminuição de eventos apoptóticos além de estímulos para a invasão de celular (FRITSCHKE, 2015; LEE *et al.*, 2001). Resultados similares foram encontrados por Cani *et al.* (2007) que demonstraram em seu estudo que, roedores tratados com dieta rica em gordura (76%) apresentaram elevação de biomarcadores de inflamação. Os autores relacionaram esse achado à elevação de endotoxinas circulantes visto que o grupo no qual foi realizado a infusão de endotoxinas, porém, tratados

com dieta controle, apresentaram as mesmas alterações em relação aos biomarcadores inflamatórios.

A DCTCM utilizada em nosso trabalho foi composta por 25% de gordura insaturada oriundo do óleo de canola, conhecida por apresentar propriedades anti-inflamatórias por levar ao aumento de lipoproteínas de alta densidade, redução de triglicerídeos, diminuição da produção de citocinas inflamatórias e do estresse oxidativo, modificação benéfica da microbiota intestinal entre outros fatores (BASSON *et al.*, 2020; HART *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2016). O grupo em foi induzido a lesão pré neoplásica de CCR e posteriormente tratado com DCTCM apresentou uma redução de 52% nos níveis de COX-2 em relação a DC associada ao DMH, tais resultados se relacionam com os mecanismos ligados à ação dos diferentes ácidos graxos insaturados presentes na DCTCM, e sua capacidade em modular vias envolvidas na carcinogênese. O PUFA ômega-3 (ácido graxo linolênico), encontrado em uma proporção de 11% no óleo de canola (SALEEM; AHMAD, 2018), configura redução de metabólitos pró-inflamatórios e pró-angiogênicos por competir com o ácido araquidônico pelo metabolismo enzimático catalisado pela COX-2 (KATO *et al.*, 2022). Já o ômega-9 (ácido oleico), encontrado em uma proporção de 61% no óleo de canola (SALEEM; AHMAD, 2018), é capaz de reduzir a expressão de marcadores pró-inflamatórios IL-1 β , p-IKK, p-IkBa, TNF α e p-JNK, expressão de mRNA *IL-6* e o aumento da expressão do mRNA da *IL-10*, além da ativação do receptor acoplado à proteína G (GRP120). Essa ativação resulta no recrutamento de β -arrestina e, conseqüentemente, no comprometimento da sinalização inflamatória através de TAB1/2, importante via de transdução para receptores como o TRL-4, inibindo assim seu sinal inflamatório, como apresentado por DCTCM. Roedores alimentados com dieta rica em gordura e acrescida de gordura poliinsaturada (assim como DCTCM), demonstraram aumento na resistência transepitelial e redução da permeabilidade intestinal o que levou a impossibilitar a disbiose, na qual apresenta um papel considerável no processo inflamatório e a posteriori na patogênese do câncer colorretal (LAM *et al.*, 2015).

Dessa forma, a microbiota intestinal se mostra outro fator importante na regulação da inflamação estando também relacionada com o desenvolvimento do CCR. Estudos apontam que *Fusobacterium nucleatum* (TUNSIJØ *et al.*, 2019), *Streptococcus gallolyticus* (KWONG *et al.*, 2018), *Clostridium difficile* (ZHENG *et al.*, 2017), *Clostridium septicum* (KWONG *et al.*, 2018), *Enterococcus faecalis* (GERAVAND *et al.*, 2019), *Escherichia coli* (DEJEA *et al.*, 2018), *Peptostreptococcus stomatis* (YU *et al.*, 2017) e *Bacteroides fragilis* (HAGHI *et al.*, 2019) apresentam-se enriquecidos em amostras de mucosa fecal colônica de tecido tumoral de pacientes com CCR em relação a indivíduos saudáveis. Assim, cabe salientar que a interação

entre os produtos finais do metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras são capazes de modular de forma diferente a população microbiana do intestino. Nesse sentido fica claro que, organismos submetidos a dieta cetogênica apesar de possuir um elevado teor lipídico apresenta uma alteração na microbiota intestinal distinta da modulação gerada a partir de dietas hiperlipídicas (LOKE *et al.*, 2020).

A literatura aponta resultados refutáveis em relação a DC e modulação do microbioma intestinal. Estudos *in vitro* e *in vivo* afirmam que corpos cetônicos, β -hidroxibutirato especificamente, inibe seletivamente o crescimento de bifidobactérias (ANG *et al.*, 2020), outros estudos já mostram uma diversidade bacteriana reduzidas devido ao baixo teor de carboidratos (SWIDSINSKI *et al.*, 2017), além de um aumento da quantidade de bactérias pró-inflamatórias (PAOLI, 2014). Apesar dos resultados ainda serem controversos, Kong *et al.* (2021) observaram que camundongos portadores de colite apresentaram redução significativa da respostas inflamatórias após serem tratados com dieta cetogênica que por sua vez atuou sob a modificação da microbiota intestinal aumentando drasticamente a abundância de *Akkermansia*, espécie relacionada com a melhora da homeostase da glicose, modulação das respostas imunes e proteção da função de barreira intestinal. Além disso, a dieta cetogênica foi capaz de elevar bactérias do gênero *Roseburia* produtoras de ácido butírico. Curiosamente, este mesmo estudo mostrou que animais alimentados com DC apresentaram níveis elevados de L-asparagina nas fezes, no qual possui efeitos anti-inflamatórios em animais alimentados com uma dieta rica em gordura e ao mesmo tempo protege a barreira intestinal e reduz os danos causados pelo endotoxinas. Apesar de não termos realizado análises nessa vertente, porém com base na literatura, sugerimos que os diferentes perfis cetogênicos modularam de forma diferente a microbiota intestinal visto que estes apresentam composição lipídica distinta. Acredita-se então que a DC possivelmente tenha aumentado a colonização de bactérias que contribuam para o processo inflamatório, enquanto DCTCM possa ter apresentado modificações benéficas que suprimam a inflamação.

A diferença entre a composição e qualidade lipídica das dietas cetogênicas utilizadas no atual trabalho modularam o ganho de circunferência abdominal entre os animais, onde os grupos em DCTCM apresentaram um ganho de C.Ab 50% menor quando comparado com o grupo controle, sugerindo assim menor acúmulo de gordura visceral, como descrito anteriormente. A composição corporal é um modulador inflamatório bastante importante (WATANABE *et al.*, 2014), na obesidade a inflamação basal se mostra aumentada, onde o tecido adiposo visceral tem maior contribuição por secretar níveis mais elevado de citocinas

pró-inflamatórias em relação aos adipócitos subcutâneos (BLACK *et al.*, 2017). Diante disso e de acordo com os nossos resultados, a redução no ganho de C.Ab também pode ter contribuído para a redução na expressão de COX-2 no grupo DCTCM quando comparado com o grupo DC. Apesar dos mecanismos que explicam o elo entre gordura visceral e CCR ainda serem incertos, essa relação é apoiada por estudos que correlacionam o acúmulo de gordura visceral, inflamação e casos de CCR. Lee *et al.* (2014) investigaram a relação entre a prevalência de CCR e a área de gordura visceral comparando um grupo de câncer colorretal e um grupo de controle pareado de mulheres coreanas e relataram que embora não haja relação de causalidade, a área de gordura visceral mediana foi significativamente maior no grupo CCR em comparação com o grupo controle, além de que, a prevalência de CCR aumentou significativamente com o aumento de gordura visceral.

Outro aspecto significativo na carcinogênese colorretal é a ativação de vias relacionadas a proliferação celular, onde a elevação de PCNA, uma proteína identificada como uma ciclina ou proteína auxiliar da DNA polimerase delta, desencadeia alterações na replicação do DNA, dispõe de um papel importante nas vias de reparo do DNA, além de relevante função na regulação do ciclo celular na fase G1 para a fase M, sendo então considerada um marcador de proliferação de células cancerosas (GBOWMAN *et al.*, 2005; ERDES *et al.*, 1983; STRZALKA; ZIEMIENOWICZ, 2011).

Como já mencionado anteriormente, a expressão proteica de COX-2 se mostrou elevada no grupo de DC combinado ao DMH, assim como a expressão de PCNA. Tais achados se correlacionam, visto que, a inflamação crônica leva ao estresse oxidativo por meio de elevadas concentrações de IL-1, IL-6 e TFN- α , fator este suficiente para ativar e causar mutações em redes de sinalização complexas, como PI3K/Akt (fosfatidilinositol 3-quinase) (ERÄSALO *et al.*, 2018; KREWSKI *et al.*, 2019). A via PI3K quando mutada ou amplificada, a partir de mutação pontual no gene *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) ou inativação do gene *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*), causa ativação da AKT (proteína quinase B), que por meio de uma cascata de sinalização age sob a via mTOR resultando em progressão do ciclo celular, proliferação celular, apoptose retardada além de crescimento celular descontrolado (TIWARI *et al.*, 2018). Mudanças no microambiente tumoral proveniente de processo inflamatório pode gerar mutações em *RAS*, podendo levar a ativação aberrante da via MAPK, principalmente MAPK p38, resultando em uma resposta fraca à inibição EGFR (*epidermal growth factor receptor*) que também possui papel importante na proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte de células tumorais (HIBINO *et al.*, 2021).

Outros estudos também apontam o vínculo entre biomarcadores de inflamação e proliferação celular, com isso nossos resultados vão ao encontro com os achados de Zhu *et al.* (2014), no qual também foi explorado o efeito de uma dieta hiperlipídica, com 45% de calorias provenientes de gordura, na incidência de adenoma colônico induzido por DMH em ratos Wistar machos. Os autores por sua vez encontraram íntima relação entre dieta hiperlipídica e concentrações aumentadas de citocinas pró-inflamatórias, bem como elevada expressão de COX-2 e PCNA em tecidos tumorais, porém tais achados não foram vistos no grupo no qual recebeu dieta hipolipídica.

Para mais, em nossos resultados ainda é possível observar que os diferentes perfis lipídicos das dietas utilizadas modulam de certa forma a expressão de PCNA, visto que o grupo DCTCM combinado ao DMH, apesar de possuir um elevado teor de gordura apresenta proporções significativas de gordura insaturada, não mostrou elevação em ambos os marcadores, PCNA e COX-2. Outros estudos mostram a influência da qualidade lipídica na proliferação celular, Strouch *et al.* (2011) investigaram o efeito de dieta rica em ácido graxo ω -3 em camundongos predispostos ao desenvolvimento de pré-câncer pancreático e puderam observar que essa dieta foi capaz de reduzir a proliferação celular em pré-câncer *in vivo*, onde apenas 7,0% das células pré-cancerosas mostraram-se positivas para PCNA em animais do grupo com dieta suplementado com ω -3, em comparação com camundongos da mesma idade alimentados com a dieta padrão nos quais apresentaram superexpressão de PCNA em 24,3% das células. Os autores relacionaram tais resultados com a influência do ω -3 na inibição da proliferação celular por meio da indução da parada do ciclo celular na fase G1 e apoptose.

Ademais, o ácido láurico encontrado em elevadas concentrações no óleo de coco, apresenta efeitos anticancerígenos em diferentes tipos tumorais. Estudos mostram prevenção da hiperplasia prostática (VEERESH BABU *et al.*, 2010), efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos em câncer de mama e endometrial (LAPPANO *et al.*, 2017), além de apoptose em células de câncer de cólon por meio de estresse oxidativo (FAUSER *et al.*, 2013). Em um estudo *in silico* e *in vitro*, no qual objetivou avaliar o papel dos ácidos graxos presentes no óleo de coco em relação a vias proliferativas, os autores observaram aumento da citotoxicidade em diferentes linhagens celulares de câncer de cólon concomitante ao aumento gradual das doses de ácido láurico, apresentando dessa forma atividade anticancerígena a partir da redução da multiplicação celular por meio da inibição das atividades de TS (*thymidylate synthase*) e EGFR (SHEELA *et al.*, 2019).

Em muitos tipos tumorais é possível observar a superexpressão da via relacionada ao EGFR, essencial para o crescimento, diferenciação e proliferação celular (CHANG *et al.*,

2018). Particularmente, no CCR a regulação positiva do gene *EGFR* aparece em 80% dos casos e está relacionado ao risco de invasão e metástase a partir da capacidade desse receptor em formar um complexo com β -catenina, porém agentes que suspendam a sinalização desta via, assim como o ácido láurico, resultam na interrupção e redução de fatores contribuintes para a carcinogênese (BARBOLINA; BURKHALTER; STACK, 2011).

Além disso, a maioria dos pacientes com CCR apresentam ainda elevada expressão de TS (POPAT; MATAKIDOU; HOULSTON, 2004). O 5-fluorouracil, um análogo do uracil, que em meio celular é convertido em monofosfato de 5-fluoro-2-desoxiuridina, trifosfato de fluorodesoxiuridina e trifosfato de fluorouridina, torna-se o agente quimioterápico mais eficaz no tratamento desse tipo tumoral, por ser um inibidor de TS, bem como pela incorporação de seus metabólitos em RNA e DNA (SAKATANI; SONOHARA; GOEL, 2019). A TS é uma enzima essencial para a replicação do DNA, catalisando a conversão de monofosfato de desoxiuridina em monofosfato de desoxitimina para biossíntese de desoxinucleotídeos, que por sua vez leva a danos no DNA, parada na fase S do ciclo celular e apoptose (YANG *et al.*, 2021). Elevadas concentrações de TS tornam-se então uma limitação crítica para a ação do 5-FU por ser um fator mecanicista na resistência desse fármaco bem como preditor de má resposta terapêutica, além de estar relacionado a piora do prognóstico geral dos pacientes (ANDRÉ *et al.*, 2015), mostrando dessa forma a necessidade de estudos mais aprofundados para avaliar a real capacidade ácido láurico em reduzir a resistência do 5-FU, da mesma maneira que aumentar a sensibilidade desse fármaco no tratamento do CCR, visto que ambos possuem influência sob a mesma enzima (SAKATANI; SONOHARA; GOEL, 2019).

A expressão aberrante de tais vias envolvidas na proliferação e na regulação do ciclo celular, proveniente de mediadores inflamatórios, resulta em crescimento contínuo e descontrolado além de sobrevivência de células cancerosas, mostrando-se, portanto, fator oncogênico no crescimento e desenvolvimento do CCR (KOVEITYPOUR *et al.*, 2019), porém fica claro também que tais vias podem ser moduladas mediante baixas concentrações de lipídios, principalmente quando fontes de ω -3 ou ω -9, mostrando-se dessa forma possíveis agentes adjuvantes na terapêutica do câncer (SHEELA *et al.*, 2019; STROUCH *et al.*, 2011).

Em relação a expressão de β -catenina, já é claro na literatura que tumores colônicos expressam altos níveis desta proteína (LU *et al.*, 2019), dessa forma sugerimos que os elevados níveis β -catenina encontrado nos diferentes grupos seja em decorrência da carcinogênese colorretal induzida quimicamente nos animais. O acúmulo nuclear de β -catenina se relaciona com sinalizações da via Wnt, esta por sua vez em condições de sinalização adequada é extremamente importante para manter o estado indiferenciado da população de células-tronco

do epitélio intestinal, porém quando sinalizada de forma aberrante associa-se com crescimento tumoral, metástase, prognóstico ruim e taxas de sobrevivência mais baixas (STEINHART; ANGERS, 2018).

A ligação existente entre Wnt e β -catenina é iniciada com a ligação entre os componentes da via ao domínio extracelular de um receptor acoplado à proteína GTP e a proteína 5, transmitindo posteriormente um sinal para o citoplasma no qual inibe o complexo de destruição de β -catenina composto por Axina, APC, proteína fosfatase 2A, glicogênio sintase 3 e CK1 α (caseína quinase 1 α) (STAMOS; WEIS, 2013), a β -catenina então se acumula no citoplasma e transloca-se para o núcleo, onde por meio de uma cascata de ligações ativa a transdução gênica alcançando respostas celulares relacionada à proliferação, invasão e metástase de células de CCR, por meio da regulação positiva dos protooncogenes *ciclina D1*, *c-Myc* (*MYC proto-oncogene*) e *PCNA* (ZHANG *et al.*, 2017).

Atualmente sabe-se que há diversas condições que podem influenciar a superexpressão de β -catenina, cabendo destacar os elevados níveis de IGF, que por sua vez possuem a capacidade de gerar acúmulo de β -catenina no núcleo celular através da sua translocação advinda do citoplasma, estimulando, por conseguinte a expressão de genes envolvidos na proliferação celular (MORALI *et al.*, 2001; WEN *et al.*, 2017). Contudo, fatores que diminuam os níveis de IGF, assim como perfis dietéticos cetogênicos (SHARMAN *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2021), levariam a redução da expressão de β -catenina ou não potencializariam sua expressão em organismos pré-dispostos, assim como nossos resultados apontam. Dada relação foi encontrada no estudo de Zhang *et al.* (2015), onde os autores analisaram o papel de IGF1R em linhagens celulares de câncer colorretal e puderam evidenciar atenuação nos níveis de β -catenina, além de inativação da via Wnt após redução das concentrações de IGF1R, proporcionando dessa forma apoptose e inibição do crescimento celular.

Além disso, a literatura apresenta estudos que mostram que outros perfis dietéticos também são capazes de modular os níveis de expressão de β -catenina. Em partes, a dieta hiperlipídica por sua vez acaba apresentando semelhanças com a DC visto que em ambas a maior porção das calorias são advindas de lipídeos. Dessa forma, Garcia-Villatoro *et al.* (2020), revelam que o consumo de dietas com elevado teor de gordura promove proliferação celular em criptas no estágio pré-malígnico de câncer de cólon bem como superexpressão de β -catenina. Liu *et al.* (2012), também obtiveram resultado análogos, onde animais de experimentação quando submetidos a dietas hiperlipídicas desenvolveram obesidade e conseqüentemente aumento da expressão de TNF- α no cólon, que por sua vez levou a inativação de GSK3 β (glycogen synthase

kinase 3 beta), importante inibidor da sinalização *Wnt*, suprimindo dessa forma a degradação de β -catenina e acúmulo dessa proteína.

Tais estudos divergem dos resultados do presente trabalho, apesar dos perfis cetogênicos aqui serem constituídos por 94% de lipídio não foi observado diferença significativa em relação a expressão de β -catenina entre os grupos de tratamento que receberam DC e DCTCM. Tal resultado pode ter se dado pelo fato de que dietas hiperlipídicas em sua maioria se mostram também hipercalóricas, sendo a supernutrição um fator de risco para o CCR (BENNINGHOFF *et al.*, 2020). Isso posto, no nosso trabalho apesar do elevado teor de gordura presente nos perfis dietéticos o consumo calórico foi mensurado, dessa forma todos os grupos experimentais consumiram quantidade energética aproximada, não tendo interferência de tal variável.

Contudo, embora o número de lesões pré-neoplásicas no cólon de roedores tenha diminuído expressivamente nos diferentes tratamentos, o efeito quimiopreventivo não se deu em decorrência da redução da resposta inflamatória e proliferação celular, porém fica claro a influência do teor lipídico, qualidade dos ácidos graxos contidos em cada perfil cetogênico bem como a influência dos corpos cetônicos sob tais vias.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho, mostram que ambas as dietas utilizadas apresentam baixas concentrações de fenólicos e flavonoides totais, em vista de seus alimentos fontes e, conseqüentemente não apresentaram potencial antioxidante. As dietas foram bem aceitas pelos animais e revelam capacidade de induzir o organismo ao estado de cetose sem influenciar nos níveis de glicose, em uma razão cetogênica 7:1. Nenhuma influência em relação ao desenvolvimento dos animais foi notada, embora alguns parâmetros antropométricos levam a presumir que houve modulação na composição corporal. Todos os tratamentos foram eficazes em reduzir significativamente os danos induzidos no DNA de células da medula óssea bem como a formação de lesões pré-neoplásicas no cólon especialmente quando compostas por TCM associado a um perfil lipídico insaturado. Neste sentido, a redução de lesões pré-neoplásicas se dá através da redução da mutagênese. No entanto, o efeito quimiopreventivo apresentado não estão diretamente relacionados a modulação de vias inflamatórias e proliferativas, mas é fato que os diferentes perfis lipídicos apresentados pelas dietas são responsáveis pela variada resposta encontrada para os marcadores avaliados. Em suma, a dieta cetogênica apresenta um potencial quimiopreventivo, tal resultado possivelmente se dá a partir da soma de interações entre diferentes fatores que compõe uma DC, uma vez que perfis dietéticos são compostos por inúmeros fatores complexos que podem influenciar de formas diferentes os variados mecanismos envolvidos nas respostas quimiopreventivas da carcinogênese.

REFERENCIAS

- ABBATE, A. *et al.* Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) inhibition reduces apoptosis in acute myocardial infarction. **Apoptosis**, United States of America, v. 11, n. 6, p. 1061–1063, 14 mar. 2006.
- AKPA, M. M. *et al.* Inhibition of insulin and T3-induced fatty acid synthase by hexanoate. **Lipids**, Canada, v. 45, n. 11, p. 997–1009, 1 nov. 2010.
- ALLEN, B.G. *et al.* Ketogenic diets enhance oxidative stress and radio-chemo-therapy responses in lung cancer xenografts. **Clinical Cancer Research**; United States of America, v. 19, n. 14, p. 3905–3913, 2013
- ANDRÉ, T. *et al.* Adjuvant fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in stage II to III colon cancer: Updated 10-year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC study. **Journal of Clinical Oncology**, Germany, v. 33, n. 35, p. 4176–4187, 10 dez. 2015.
- ANG, Q. Y. *et al.* Ketogenic diets alter the gut microbiome resulting in decreased intestinal Th17 cells. **Cell**, United States of America, v. 181, n. 6, p. 1263, 6 jun. 2020.
- AMIANO, P. *et al.* Association study of dietary non-enzymatic antioxidant capacity (NEAC) and colorectal cancer risk in the Spanish Multicase–Control Cancer (MCC-Spain) study. **European Journal of Nutrition**, Spain, v. 58, n. 6, p. 2229–2242, 1 set. 2019.
- APFELD, J. *et al.* The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. **Genes & development**. United States of America, v 18, n 24, p. 3004-03, 2004.
- ARCIDIACONO, B. *et al.* Insulin Resistance and Cancer Risk: An Overview of the Pathogenetic Mechanisms. **Experimental Diabetes Research**, Italy, v. 2012, p. 1 – 12, 2012.
- ARENDS, J. *et al.* ESPEN expert group recommendations for action against cancer-related malnutrition. **Clinical Nutrition**, Germany, v. 36, n. 5, p. 1187–1196, 1 out. 2017.
- ARMENO, M. *et al.* A Prospective Study on Changes in Nutritional Status and Growth Following Two Years of Ketogenic Diet (KD) Therapy in Children with Refractory Epilepsy. **Nutrients**, Argentina, v. 11, n. 7, 1 jul. 2019.
- ARSYAD, A. *et al.* Long-Term Ketogenic Diet Induces Metabolic Acidosis, Anemia, and Oxidative Stress in Healthy Wistar Rats. **Journal of Nutrition and Metabolism**, Indonesia, v. 2020, 2020.
- BARBOLINA, M. V.; BURKHALTER, R. J.; STACK, M. S. Diverse mechanisms for activation of Wnt signalling in the ovarian tumour microenvironment. **Biochemical Journal**, United States of America, v. 437, n. 1, p. 1, 7 jul. 2011.
- BARCELÓ-COBLIJN, G.; MURPHY, E. J. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n–3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n–3 fatty acid levels. **Progress in Lipid Research**, Spain, v. 48, n. 6, p. 355–374, 1 nov. 2009.
- BARDÓCZ, S. *et al.* White A, Ralph A. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. **The British journal of nutrition**, [s.l.], v. 73, n 6, p. 819-28, 1995.
- BASSON, A. R. *et al.* Regulation of Intestinal Inflammation by Dietary Fats. **Frontiers in Immunology**, United States of America, v. 11, 2 fev. 2020.
- BEKISZ, S. *et al.* In Vitro, In Vivo, and In Silico Models of Lymphangiogenesis in Solid Malignancies. **Cancers**, Belgium, v. 14, n. 6, p. 1525, 16 mar. 2022.
- BELFIORE, A.; MALAGUARNERA, R. Insulin receptor and cancer. **Endocrine-Related Cancer**, Italy, v. 18, n. 4, p. 125–147, 1 ago. 2011.
- BENJAMINA, J. S. *et al.* A ketogenic diet rescues hippocampal memory defects in a mouse model of Kabuki

- syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l], v. 114, n. 1, p. 125–130, 3 jan. 2017.
- BENNINGHOFF, A. D. *et al.* Consumption of the Total Western Diet Promotes Colitis and Inflammation-Associated Colorectal Cancer in Mice. **Nutrients**, United States of America, v. 12, n. 2, 1 fev. 2020.
- BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between “lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, [s.l], v. 40, n. 4, p. 527–528, 1 abr. 1968.
- BERNSTEIN, C. *et al.* Carcinogenicity of deoxycholate, a secondary bile acid. **Archives of Toxicology**, United States of America, v. 85, n. 8, p. 863–871, , 26 ago. 2011.
- BEYAZ, S. *et al.* High fat diet enhances stemness and tumorigenicity of intestinal progenitors. **Nature**, United States of America, v. 531, n. 7592, p. 53, , 3 mar. 2016.
- BIELOHUBY, M. *et al.* Induction of ketosis in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets depends on the relative abundance of dietary fat and protein. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, Germany, v. 300, n. 1, jan. 2011.
- BISWAS, S.; RAO, C. M. Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l], v. 173, p. 118–134, 1 maio 2017.
- BLACK, D. *et al.* Prognostic Value of Computed Tomography: Measured Parameters of Body Composition in Primary Operable Gastrointestinal Cancers. **Annals of Surgical Oncology**, United Kingdom, v. 24, n. 8, p. 2241, 1 ago. 2017.
- BOJKOVÁ, B.; WINKLEWSKI, P. J.; WSZEDYBYL-WINKLEWSKA, M. Dietary Fat and Cancer—Which Is Good, Which Is Bad, and the Body of Evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, Slovakia, v. 21, n. 11, p. 1–56, 1 jun. 2020.
- BOLAND, M. L.; CHOURASIA, A. H.; MACLEOD, K. F. Mitochondrial Dysfunction in Cancer. **Frontiers in Oncology**, United States of America, v. 3, 2013.
- BOWMAN, G. D. *et al.* DNA polymerase clamp loaders and DNA recognition. **FEBS letters**, United States of America, v. 579, n. 4, p. 863–867, 7 fev. 2005.
- BONUCCELLI, G. *et al.* Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. **Cell Cycle**, United States of America, v. 9, n. 17, p. 3506, 1 set. 2010.
- BRENNER, H.; KLOOR, M.; POX, C. P. Colorectal cancer. **The Lancet**, Germany, v. 383, n. 9927, p. 1490–1502, 26 abr. 2014.
- BURADA, F. *et al.* Autophagy in colorectal cancer: An important switch from physiology to pathology. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, Romania, v. 7, n. 11, p. 271, 11 nov. 2015.
- CALCATERRA, V. *et al.* Metabolic derangement in pediatric patient with obesity: The role of ketogenic diet as therapeutic tool. **Nutrients**, Italy, v. 13, n. 8, 1 ago. 2021.
- CANI, P. D. *et al.* Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**, France, v. 56, n. 7, p. 1761–1772, , 1 jul. 2007.
- CAPOCACCIA, R.; GATTA, G.; DAL MASO, L. Life expectancy of colon, breast, and testicular cancer patients: an analysis of US-SEER population-based data. **Annals of Oncology**, Rome, v. 26, n. 6, p. 1263–1268, 1 jun. 2015.
- CARRILLO, L. C.; LONDOÑO-LONDOÑO, J.; GIL, A. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. Colombia,

2013.

CHANDRASEKHARAN, N. V; SIMMONS, D. L. The cyclooxygenases. **Genome Biology**. United States of America, v. 5, n. 9, p. 241 2004.

CHENG, K.; RAUFMAN, J. P. Bile acid-induced proliferation of a human colon cancer cell line is mediated by transactivation of epidermal growth factor receptors. **Biochemical Pharmacology**, United States of America, v. 70, n. 7, p. 1035–1047, , 1 out. 2005.

CHENG, C. W. *et al.* Prolonged Fasting reduces IGF-1/PKA to promote hematopoietic stem cell-based regeneration and reverse immunosuppression. **Cell stem cell**, United States of America, v. 14, n. 6, p. 810, 6 jun. 2014.

CHENG, C. W. *et al.* Ketone body signaling mediates intestinal stem cell homeostasis and adaptation to diet. **Cell**, United States of America, v. 178, n. 5, p. 1115, 8 ago. 2019.

COHEN C. W. *et al.* A Ketogenic Diet Reduces Central Obesity and Serum Insulin in Women with Ovarian or Endometrial Cancer. **The Journal of Nutrition**, United States of America, v. 148, n. 8, p. 1253, , 1 ago. 2018.

COPPEDÈ, F. Epigenetic biomarkers of colorectal cancer: Focus on DNA methylation. **Cancer Letters**. [s.l], v. 324, n 2, p. 238-47, 2014.

CSISZAR, A. *et al.* Chemically induced carcinogenesis in rodent models of aging: assessing organismal resilience to genotoxic stressors in geroscience research. **Geroscience**. United States of America, v. 41, n 2, p. 209-227, 2019.

DĄBEK, A. *et al.* Modulation of Cellular Biochemistry, Epigenetics and Metabolomics by Ketone Bodies. Implications of the Ketogenic Diet in the Physiology of the Organism and Pathological States. **Nutrients**. Poland, v. 12, n. 3, 1 mar. 2020.

DAI, Z. BIN *et al.* Association of Dietary Intake and Biomarker of α -Linolenic Acid With Incident Colorectal Cancer: A Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. **Frontiers in Nutrition**, China, v. 9, 7 jul. 2022.

DANIEL, M.; TOLLEFSBOL, T.O. Epigenetic linkage of aging, cancer and nutrition. **The Journal of experimental biology**. United States of America, v. 2018, n. 1, p. 59-70, 2015.

DAVIS, D.C. UTHUS EO. Dietary Selenite and Azadeoxycytidine Treatments Affect DimethylhydrazineInduced Aberrant Crypt Formation in Rat Colon and DNA Methylation in HT-29 Cells. **The Journal of nutrition**. United States of America, v. 132, n 2, p. 292-7, 2002.

DEJEA, C. M. *et al.* Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. **Science (New York, N.Y.)**, United States of America, v. 359, n. 6375, p. 592, 2 fev. 2018.

DEL BO, C. *et al.* Systematic Review on Polyphenol Intake and Health Outcomes: Is there Sufficient Evidence to Define a Health-Promoting Polyphenol-Rich Dietary Pattern? **Nutrients**, Italy, v. 11, n. 6, 1 jun. 2019.

DE MOURA, N.A. *et al.* Dietary heme promotes colonic preneoplastic lesions and DNA damage but not tumor development in a medium-term model of colon carcinogenesis in rats. **Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis**, Brazil, 2019.

DESAI, S. J.; PRICKRIL, B.; RASOOLY, A. Mechanisms of phytonutrient modulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and inflammation related to cancer. **Nutrition and cancer**, [s.l], v. 70, n. 3, p. 350, 3 abr. 2018.

DIANATINASAB, M. *et al.* Adherence to a Western dietary pattern and risk of bladder cancer: A pooled analysis of 13 cohort studies of the Bladder Cancer Epidemiology and Nutritional Determinants international study. **International journal of cancer**. Iran, p. 3394–3403, 2020.

DO AMARAL, L. A. *et al.* The use of natural fiber-rich food product is safe and reduces aberrant crypt foci in a pre-clinical model. **Nutrients**, Brazil, v. 13, n. 8, 1 ago. 2021.

DOUAIHER, J. *et al.* Colorectal cancer—global burden, trends, and geographical variations. **Journal of Surgical Oncology**, [s.l], v. 115, n. 5, p. 619–630, 1 abr. 2017.

DOURIS, N. *et al.* Beta-adrenergic receptors are critical for weight loss but not for other metabolic adaptations to the consumption of a ketogenic diet in male mice. **Molecular Metabolism**, United States of America, v. 6, n. 8, p. 854, 1 ago. 2017.

DUEREGGER, A. *et al.* Differential Utilization of Dietary Fatty Acids in Benign and Malignant Cells of the Prostate. **PLoS ONE**, Austria, v. 10, n. 8, 18 ago. 2015.

EKMEKCIOGLU, C. Nutrition and longevity - From mechanisms to uncertainties, critical in food science and nutrition. **Critical reviews in food science and nutrition**. v. 60, n 18, p. 3063-3082, Austria, 2020.

ELISIA, I.; KRYSTAL, G. The Pros and Cons of Low Carbohydrate and Ketogenic Diets in the Prevention and Treatment of Cancer. **Frontiers in Nutrition**, Canada, v. 8, p. 57, 25 fev. 2021.

ELLENBROEK, J. H. *et al.* Long-term ketogenic diet causes glucose intolerance and reduced β - and α -cell mass but no weight loss in mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [s.l], v. 306, n. 5, p. 552–558, 2014.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**, United States of America, v. 18, p. 811–819, 1 out. 2015.

ERÄSALO, H. *et al.* Natural Stilbenoids Have Anti-Inflammatory Properties in Vivo and Down-Regulate the Production of Inflammatory Mediators NO, IL6, and MCP1 Possibly in a PI3K/Akt-Dependent Manner. **Journal of Natural Products**, Filand, v. 81, n. 5, p. 1131–1142, 25 maio 2018.

FAUSER, J. K. *et al.* Induction of apoptosis by the medium-chain length fatty acid lauric acid in colon cancer cells due to induction of oxidative stress. **Chemotherapy**, Austria, v. 59, n. 3, p. 214–224, jan. 2013.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**. United States of America, v. 61, n 5, p. 759-67, , 1990.

FERRARIS, C. *et al.* Impact of the Ketogenic Diet on Linear Growth in Children: A Single-Center Retrospective Analysis of 34 Cases. **Nutrients**, Italy, v. 11, n. 7, 1 jul. 2019.

FERRAZ, A. S. M. *et al.* Use of murinometrics indices and bioelectrical impedance (BIA) in the determination of experimental obesity in oophorectomized rats. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Brazil, v. 38, n. 4, p. 451–456, 20 dez. 2016.

FISHBEIN, A. *et al.* Carcinogenesis: Failure of resolution of inflammation? **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 218, p. 107670, 1 fev. 2021.

FONTANA, L.; KLEIN, S.; HOLLOSZY, J.O. Long-term low-protein, low-calorie diet and endurance exercise modulate metabolic factors associated with cancer risk. **The American journal of clinical nutrition**. United States of America, v. 84, n 6, p. 1456-62, 2006.

FONTANA, L.; PARTRIDGE. L. Promoting health and longevity through diet: From model organisms to humans. **Cell**. Italy, v. 161, n 1, p. 106-18, 2015.

FONTANA, L. *et al.* Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. **Aging Cell**. United States of America, v. 7, n 5, p. 681-87, 2008.

FRITSCHKE, K. L. The Science of Fatty Acids and Inflammation. **Advances in Nutrition**, United States of America v. 6, n. 3, p. 293-301, ,1 May 2015.

FROND, A. D. *et al.* Phytochemical Characterization of Five Edible Purple-Reddish Vegetables: Anthocyanins, Flavonoids, and Phenolic Acid Derivatives. **Molecules**, Romania, v. 24, n. 8, 8 Abr. 2019.

- FU, S. P. *et al.* Anti-inflammatory effects of BHBA in both in vivo and in vitro Parkinson's disease models are mediated by GPR109A-dependent mechanisms. **Journal of Neuroinflammation**, China, v. 12, n. 1, 17 jan. 2015.
- FU, T. *et al.* FXR Regulates Intestinal Cancer Stem Cell Proliferation. **Cell**, United States of America, v. 176, n. 5, p. 1098- 1112, 21 fev. 2019.
- FUJIKURA, Y. *et al.* Ketogenic diet with medium-chain triglycerides restores skeletal muscle function and pathology in a rat model of Duchenne muscular dystrophy. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Japan, v. 35, n. 9, 1 set. 2021.
- FUKAZAWA, A. *et al.* Effects of a Ketogenic Diet Containing Medium-Chain Triglycerides and Endurance Training on Metabolic Enzyme Adaptations in Rat Skeletal Muscle. **Nutrients**, Japan, v. 12, n. 5, 1 may 2020.
- GALOW, A. M.; PELEG, S. How to Slow down the Ticking Clock: Age-Associated Epigenetic Alterations and Related Interventions to Extend Life Span. **Cells**, Germany, v. 11, n. 3, 1 fev. 2022.
- GARCIA-VILLATORO, E. L. *et al.* Stem Cells, Tissue Engineering, Development, and Cancer: Effects of high-fat diet and intestinal aryl hydrocarbon receptor deletion on colon carcinogenesis. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, United States of America, v. 318, n. 3, p. G451, 3 mar. 2020.
- GERAVAND, M. *et al.* Investigation of enterococcus faecalis population in patients with polyp and colorectal cancer in comparison of healthy individuals. **Arquivos de gastroenterologia**, [s.l.], v. 56, n. 2, p. 141–145, 1 abr. 2019.
- GERBER, D.E. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. **American family physician**. United States of America, v. 77, n 3, p. 311-9, 2008.
- GERDES, J. *et al.* Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International journal of cancer**, [s.l.], v. 31, n. 1, p. 13–20, 1983.
- GOALSTONE, M. L. *et al.* Effect of Insulin on Farnesyltransferase: specificity of insulin action and potentiation of nuclear effects of insulin-like growth factor-1, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor *. **Journal of Biological Chemistry**, United States of America, v. 273, n. 37, p. 23892–23896, 11 set. 1998.
- GOSWAMI, J.N.; Sharma, S. Current Perspectives On The Role Of The Ketogenic Diet In Epilepsy Management. **Neuropsychiatric disease and treatment**. India, v. 15, p. 3273-3285, 2019.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, M. J.; ORTEA, I.; GUIL-GUERRERO, J. L. α -Linolenic and γ -linolenic acids exercise differential antitumor effects on HT-29 human colorectal cancer cells. **Toxicology Research**, Spain, v. 9, n. 4, p. 474, 2020.
- GROLEAU, V. *et al.* Long-term impact of the ketogenic diet on growth and resting energy expenditure in children with intractable epilepsy. **Developmental medicine and child neurology**, United States of America, v. 56, n. 9, p. 898, 2014.
- HAGHI, F. *et al.* The association between fecal enterotoxigenic B. fragilis with colorectal cancer. **BMC Cancer**, Iran, v. 19, n. 1, p. 879, 5 set. 2019.
- HAGIHARA, K. *et al.* Promising Effect of a New Ketogenic Diet Regimen in Patients with Advanced Cancer. **Nutrients**, Japan, v. 12, n. 5, 1 mai 2020.
- HALVORSEN, B. L. *et al.* A Systematic Screening of Total Antioxidants in Dietary Plants. **The Journal of Nutrition**, Norway, v. 132, n. 3, p. 461–471, 1 mar. 2002.
- HANAHAN, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**. Germany, v. 100, n 1, p. 57-70, 2000.
- HANAHAN, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: the next generation. **Cell**. Switzerland, v. 144, n 5, p. 646-674, 2011.

- HAO, G. W. *et al.* Growth of human colon cancer cells in nude mice is delayed by ketogenic diet with or without omega-3 fatty acids and medium-chain triglycerides. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, China, v. 16, n. 5, p. 2061–2068, 2015.
- HART, A. R. *et al.* Diet in the Aetiology of Ulcerative Colitis: A European Prospective Cohort Study. **Digestion**, United Kingdom, v. 77, n. 1, p. 57–64, abr. 2008
- HARVEY, A. E.; LASHINGER, L. M.; HURSTING, S. D. The growing challenge of obesity and cancer: an inflammatory issue. **Annals of the New York Academy of Sciences**, United States of America, v. 1229, n. 1, p. 45–52, 1 jul. 2011.
- HAYASHI, M. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. **Genes and Environment**, Japan, v. 38, n. 1, 2016.
- HE, M. MING *et al.* Circulating liver function markers and colorectal cancer risk: A prospective cohort study in the UK Biobank. **International journal of cancer**, China, v. 148, n. 8, p. 1867, 15 abr. 2021.
- HERNANDEZ, A. R. *et al.* The Antiepileptic Ketogenic Diet alters Hippocampal Transporter Levels and Reduces Adiposity in Aged Rats. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, United States of America, v. 73, n. 4, p. 450, 14 mar. 2018.
- HESS, J. A.; KHASAWNEH, M. K. Cancer metabolism and oxidative stress: Insights into carcinogenesis and chemotherapy via the non-dihydrofolate reductase effects of methotrexate. **BBA Clinical**, United States of America, 1 v. 3, p. 152, jun. 2015.
- HIBINO, S. *et al.* Inflammation-Induced Tumorigenesis and Metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, Japan, v. 22, n. 11, 1 jun. 2021.
- HOFFMEISTER, M. *et al.* Body mass index and microsatellite instability in colorectal cancer: A populationbased study. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**. Germany, v. 22, n 12, p. 2303-11, Dec. 2013.
- HONDA, H. *et al.* Genotoxicity evaluation of alpha-linolenic acid-diacylglycerol oil. **Toxicology Reports**, Japan, v. 3, p. 716, 2016.
- HOSSAIN, P.; KAWAR, B.; EL NAHAS, M. Obesity and Diabetes in the Developing World — A Growing Challenge. **N Engl J Med**, United Kingdom, v. 356, n. 3, p. 213–215, 9 out. 2009.
- HU, X. *et al.* Toll-like receptor 4 is a master regulator for colorectal cancer growth under high-fat diet by programming cancer metabolism. **Cell Death & Disease**, China, v. 12, n. 8, 1 ago. 2021.
- HURSTING, S. D. *et al.* Calorie Restriction and Cancer Prevention: Established and Emerging Mechanisms. **Obesity, Inflammation and Cancer**, United States of America, p. 363–379, 1 jan. 2013.
- IGARASHI, K.; Kashiwagi, K. Modulation of cellular function by polyamines. **The international journal of biochemistry & cell biology**. Japan, v. 42, n 1, p. 39-51, 2010.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. **Cancer today**. France, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map>.
- JIN, H. *et al.* P-cymene prevent high-fat diet-associated colorectal cancer by improving the structure of intestinal flora. **Journal of Cancer**, China, v. 12, n. 14, p. 4355, 2021.
- JIANG, L. *et al.* Oleic acid induces apoptosis and autophagy in the treatment of Tongue Squamous cell carcinomas. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.
- JOHNSON, S.C.; Rabinovitch, P.S.; Kaeberlein, M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. **Nature**. United States of America, v. 493, n 7432, p. 338-45, 2013.

- KADOCHI, Y. *et al.* Remodeling of energy metabolism by a ketone body and medium-chain fatty acid suppressed the proliferation of CT26 mouse colon cancer cells. **Oncology Letters**, Japan, v. 14, n. 1, p. 673, 2017.
- KÄMMERER, U. *et al.* Low Carb and Ketogenic Diets Increase Quality of Life, Physical Performance, Body Composition, and Metabolic Health of Women with Breast Cancer. **Nutrients**, Germany, v. 13, n. 3, 1 mar. 2021.
- KASHIWAYA, Y. *et al.* A ketone ester diet increases brain malonyl-CoA and uncoupling proteins 4 and 5 while decreasing food intake in the normal Wistar rat. **Journal of Biological Chemistry**, United States of America, v. 285, n. 34, p. 25950–25956, 2010.
- KASUMI, E.; SATO, N. A ketogenic diet improves the prognosis in a mouse model of peritoneal dissemination without tumor regression. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**. Japan, v. 64, n 3, p. 201-208, 2019.
- KATO, Y. *et al.* Vesicular nucleotide transporter is a molecular target of eicosapentaenoic acid for neuropathic and inflammatory pain treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Japan, v. 119, n. 30, p. e2122158119, 26 jul. 2022.
- KAWANISHI, S.; Yamamoto, K. Mechanism of site-specific DNA damage induced by methylhydrazines in the presence of copper (II) or manganese (III). **Biochemistry**. Japan, v. 30, n 12, p. 3069-75, 1991.
- KHODADADI, S. *et al.* Tumor Cells Growth and Survival Time with the Ketogenic Diet in Animal Models: A Systematic Review. **International journal of preventive medicine**. Iran, v. 8, p. 35, 2017
- KIM, J. T. *et al.* Catch-up growth after long-term implementation and weaning from ketogenic diet in pediatric epileptic patients. **Clinical Nutrition**, Republic of Korea, v. 32, n. 1, p. 98–103, 1 fev. 2013.
- KITADA, M. *et al.* Sirtuins and Type 2 Diabetes: Role in Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. **Frontiers in Endocrinology**, Japan, v. 10, 27 mar, 2019.
- KLEIN, E. A. *et al.* Vitamin E and the Risk of Prostate Cancer: Updated Results of The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). **JAMA**, United States of America, v. 306, n. 14, p. 1549, 12 out. 2011.
- KLEMENT, R. J. *et al.* Impact of a ketogenic diet intervention during radiotherapy on body composition: III—final results of the KETOCOMP study for breast cancer patients. **Breast Cancer Research: BCR**, [s.l.], v. 22, n. 1, 20 ago. 2020.
- KLEMENT, R.J.; Paziienza, V. Impact of Different Types of Diet on Gut Microbiota Profiles and Cancer Prevention and Treatment. **Medicina (Kaunas)**. Germany, v. 55, n 4, p. 85, 2019.
- KLEMENT, R.J. Calorie or carbohydrate restriction? The ketogenic diet as another option for supportive cancer treatment. **The Oncologist**. Germany, v. 18, n 9, p. 1056, 2013.
- KNUPPEL, A. *et al.* Circulating insulin-like growth factor-I concentrations and risk of 30 cancers: Prospective analyses in UK biobank. **Cancer Research**, United Kingdom, v. 80, n. 18, p. 4014–4021, 15 set. 2021.
- KOCH, W. Dietary Polyphenols—Important Non-Nutrients in the Prevention of Chronic Noncommunicable Diseases. A Systematic Review. **Nutrients**, Poland, v. 11, n. 5, 1 mai 2019.
- KONG, C. *et al.* Ketogenic diet alleviates colitis by reduction of colonic group 3 innate lymphoid cells through altering gut microbiome. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s.l.], v. 6, n. 1, 1 dez. 2021.
- KOVEITYPOUR, Z. *et al.* Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. **Cell & Bioscience**, [s.l.], v. 9, n. 1, 2 dez. 2019.
- KOSAKOWSKA, O. *et al.* Antioxidant and Antibacterial Activity of Essential Oils and Hydroethanolic Extracts of Greek Oregano (*O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart) and Common Oregano (*O. vulgare* L. subsp. *vulgare*). **Molecules**, Poland, v. 26, n. 4, 2 fev. 2021.

- KOSSOFF, E. H. *et al.* A Modified Atkins Diet Is Effective for the Treatment of Intractable Pediatric Epilepsy. **Epilepsia**, United States of America, v. 47, n. 2, p. 421–424, 1 fev. 2006.
- KREWSKI, D. *et al.* Key characteristics of 86 agents known to cause cancer in humans. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**. Canada, v. 22, n. 7–8, p. 244–263, 17 nov. 2019.
- KOVÁCS, Z.; BRUNNER, B.; ARI, C. Beneficial Effects of Exogenous Ketogenic Supplements on Aging Processes and Age-Related Neurodegenerative Diseases. **Nutrients**, v Hungary, v. 13, n. 7, 1 jul. 2021.
- KUIPERS, E.J. *et al.* Colorectal cancer. **Nature reviews. Disease primers**. [s.l.], v. 1, p. 15065, 2015.
- KULKARNI, S.S.; Canto, C. The molecular targets of resveratrol. **Biochimica Biophysica Acta**. Switzerland, v. 1852, n 5, p. 1114-23, 2015.
- KUTER, K. Z. *et al.* Increased beta-hydroxybutyrate level is not sufficient for the neuroprotective effect of longterm ketogenic diet in an animal model of early parkinson's disease. Exploration of brain and liver energy. **Int J Mol Sci**, Poland, v. 22, n. 14, p. 7556, 14 jul 2021.
- KWONG, T. N. Y. *et al.* Association Between Bacteremia From Specific Microbes and Subsequent Diagnosis of Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, China, v. 155, n. 2, p. 383- 390, 1 ago. 2018.
- LANG-ROLLIN, I.; BERBERICH, G. Psycho-oncology. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 13, 2018.
- LAM, Y. Y. *et al.* Effects of dietary fat profile on gut permeability and microbiota and their relationships with metabolic changes in mice. **Obesity**, United States of America, v. 23, n. 7, p. 1429–1439, 1 jul. 2015.
- LAPPANO, R. *et al.* The lauric acid-activated signaling prompts apoptosis in cancer cells. **Cell Death Discovery**, Italy, v. 3, n. 1, p. 17063, 4 dez. 2017.
- LA VECCHIA, C. *et al.* Dietary total antioxidant capacity and colorectal cancer: A large case–control study in Italy. **International Journal of Cancer**, Italy, v. 133, n. 6, p. 1447–1451, 15 set. 2013.
- LECHELT, L. A. *et al.* Top 10 research priorities in head and neck cancer: Results of an Alberta priority setting partnership of patients, caregivers, family members, and clinicians. **Head & Neck**, Canada, v. 40, n. 3, p. 544–554, 1 mar. 2018.
- LEE, J. Y. *et al.* Visceral Fat Accumulation Is Associated with Colorectal Cancer in Postmenopausal Women. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 17 nov. 2014. LEE, C. *et al.* Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. **Science translational medicine**. United States of America, v. 4, n 124, p. 124-27, 2012.
- LEE, H. *et al.* Metabolite profiling and anti-aging activity of rice koji fermented with *Aspergillus oryzae* and *aspergillus cristatus*: A comparative study. **Metabolites**. Korea, v. 11, n. 8, 1 ago. 2021.
- LEMARIÉ, F. *et al.* Revisiting the metabolism and physiological functions of caprylic acid (C8:0) with special focus on ghrelin octanoylation. **Biochimie**, France, v. 120, p. 40–48, 1 jan. 2016.
- LEWANDOWSKA, A. *et al.* Title: Risk Factors for the Diagnosis of Colorectal Cancer. **Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center**, Poland, v. 29, 6 jan. 2022.
- LI, J.; Tang, Y.; Cai, D. IKK β /NF- κ B disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. **Nature cell biology**, United States of America, v.14, n 10, p. 999-1012, 2012
- LI, S. *et al.* Serum Expression of β -Catenin Is a Potential Detection Marker in Patients with Colorectal Cancer. **Disease Markers**, China, v. 2019, 2019.
- LI, Y. *et al.* Healthy lifestyle and life expectancy free of cancer, cardiovascular disease, and type 2 diabetes:

- prospective cohort study. **The BMJ**, United States of America, v. 368, 2020.
- LI, Y-R, Li S, Lin C-C. Effect of resveratrol and pterostilbene on aging and longevity. **Biofactors**. China, v.44, n 1, p.69–82, jan. 2018.
- LICHA, D. *et al.* Untargeted Metabolomics Reveals Molecular Effects of Ketogenic Diet on Healthy and Tumor Xenograft Mouse Models. **International Journal of Molecular Sciences**, Austria, v. 20, n. 16, 2 ago. 2019.
- LIMOLI, C. L.; GIEDZINSKI, E. Induction of Chromosomal Instability by Chronic Oxidative Stress. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, United States of America v. 5, n. 4, p. 339, , 2003.
- LIN, J.; CHUANG, C. C.; ZUO, L. Potential roles of microRNAs and ROS in colorectal cancer: diagnostic biomarkers and therapeutic targets. **Oncotarget**, United States of America, v. 8, n. 10, p. 17328, 2017.
- LISKIEWICZ, A. D. *et al.* Long-term High Fat Ketogenic Diet Promotes Renal Tumor Growth in a Rat Model of Tuberous Sclerosis. **Scientific Reports**, Poland, v. 6, 19 fev. 2016.
- LIU, X. *et al.* Effects of Canola and High-Oleic Acid Canola Oils on Abdominal Fat Mass in Individuals with Central Obesity. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, United States of America, 1 v. 24, n. 11, p. 2261, nov. 2016.
- LIU, Z. *et al.* Diet-induced obesity elevates colonic TNF- α in mice and is accompanied by an activation of Wnt signaling: a mechanism for obesity-associated colorectal cancer. **The Journal of nutritional biochemistry**, United States of America, v. 23, n. 10, p. 1207, out. 2012.
- LOKE, Y.L. Colon Carcinogenesis: the interplay between diet and gut microbiota. **Frontiers in cellular and infection microbiology**. Malaysia, v. 10, Dec. 2020.
- LONGO, V. D. *et al.* Interventions to Slow Aging in Humans: Are We Ready? **Aging Cell**, United States of America, v. 14, n. 4, p. 497, 1 ago. 2015.
- LOOMANS-KROPP, H. A.; UMAR, A. Cancer prevention and screening: the next step in the era of precision medicine. **NPJ Precision Oncology**, United States of America, v. 3, n. 1, 1 dez. 2019.
- LOPEZ-OTIN, C. *et al.* The hallmarks of aging. **Cell**. Spain, v. 153, n. 6, p. 1194–217, 2013.
- LU, M. L. *et al.* MicroRNA-124 inhibits colorectal cancer cell proliferation and suppresses tumor growth by interacting with PLCB1 and regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, China, v. 23, n. 1, p. 121–136, 2019.
- LUNDHOLM, K. *et al.* Palliative nutritional intervention in addition to cyclooxygenase and erythropoietin treatment for patients with malignant disease: Effects on survival, metabolism, and function. **Cancer**, Sweden, v. 100, n. 9, p. 1967–1977, 1 may 2004.
- LUSARDI, T. A. *et al.* Ketogenic Diet Prevents Epileptogenesis and Disease Progression in Adult Mice and Rats. **Neuropharmacology**, United States of America, v. 99, p. 500, 27 dez. 2015.
- MA, C. J. *et al.* Taiwan Society of Colon and Rectum Surgeons (TSCRS) Consensus for Anti-Inflammatory Nutritional Intervention in Colorectal Cancer. **Frontiers in Oncology**, Taiwan, v. 11, 17 jan. 2021.
- MA, S. *et al.* An 8-week ketogenic diet alternated interleukin-6, ketolytic and lipolytic gene expression, and enhanced exercise capacity in mice. **Nutrients**, Japan, v. 10, n. 11, 2018.
- MACHADO, A. D. *et al.* Efeito do consumo de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre o ganho de peso e a glicemia de jejum em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica. **Ciência & Saúde**, Brasil, v. 7, n. 2, p. 71–75, 11 set. 2014.
- MADEO, F. *et al.* Spermidine in health and disease. **Science**. Austria, v 359, n 6374, 26 Jan 2018.
- MADEO, F. *et al.* Essential role for autophagy in life span extension. **The Journal of clinical investigation**. United States of America, v 125, n 1, p. 85-93, Jan. 2015

MARGRAF, T.; KARNOPP, A. R.; ROSSO, N. D.; GRANTO, D. Determinação de compostos fenólicos totais: comparação entre os métodos azul de prússia e o Folin-Ciocalteu. In: GRANATO, D.; NUNES, D. S. *Análises químicas, propriedades funcionais e controle da qualidade de alimentos e bebidas – Uma abordagem teórico-prática*, Elsevier, Rio de Janeiro: p.1, ed. 1, 2016,

MARTEN, B.; PFEUFFER, M.; SCHREZENMEIR, J. J. Effect of different stress conditions on the stability of quercetin-loaded lipid microparticles produced with babacu (*Orbignya speciosa*) oil: evaluation of their potential use in food applications. **International Dairy Journal**, United Kingdom, v. 16, p. 1374–1382, 2006.

MARTINS, J.S. Estudo comparativo das propriedades do óleo de coco (*Cocos nucifera* L.) obtidos pelo processo industrial e artesanal. [s.l.] 2015.

MARTIN, P. *et al.* Defining Successful Aging: A Tangible or Elusive Concept? **The Gerontologist**, United States, v. 55, n. 1, p. 14, 1 fev. 2015.

MAY-WILSON, S. *et al.* Pro-inflammatory fatty acid profile and colorectal cancer risk: A Mendelian randomisation analysis. **European Journal of Cancer**, United Kingdom, v. 84, p. 228, 1 out. 2017.

MCCARTY, M. F.; DINICOLANTONIO, J. J. Review: Lauric acid-rich medium-chain triglycerides can substitute for other oils in cooking applications and may have limited pathogenicity. **Open Heart**, Canada, v. 3, n. 2, 1 jul. 2016.

MCGUIRE, S. Scientific Report do 2015 Dietary Guidelines Advisory Committee. Washington, DC:US Departments of Agriculture and Health and Human Services, 2015. **Advances in nutrition**. United States, v 7, n 1, p. 202-4, 15 Jan. 2016

MEIRA, ID'A. *et al.* Ketogenic Diet and Epilepsy: What We Know So Far. **Frontiers Neuroscience**. United States, v. 13, n. 5, Jan, 2019.

MEKARY, R. A. *et al.* Total Antioxidant Capacity (TAC) intake and colorectal cancer risk in the Health Professionals Follow-up Study. **Cancer causes & control: CCC**, Netherlands, v. 21, n. 8, p. 1315, ago. 2010.

MENA, S.; ORTEGA, A.; ESTRELA, J. M. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Netherlands, v. 674, n. 1–2, p. 36–44, 31 mar. 2009.

MENEZES, E.V.A. *et al.* Influence of Paleolithic dietonanthropometric markers in chronic diseases: systematic review and meta-analysis. **Nutrition journal**. United States, v. 18, n 1, p. 41, 23 Jul. 2019

MIAO, L. *et al.* Research on the prediction of longevity from both individual and family perspectives. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 17, n. 2, 1 fev. 2022.

MIGUEL, A.C.M.G. Efeitos da suplementação de manteiga e margarinas no metabolismo lipídico e inflamação de portadores de síndrome metabólica que mantiveram seus hábitos usuais de vida. [s.l.] 2009.

MILTONPRABU, S.; NAZIMABASHIR; MANOHARAN, V. Hepatoprotective effect of grape seed proanthocyanidins on Cadmium-induced hepatic injury in rats: Possible involvement of mitochondrial dysfunction, inflammation and apoptosis. **Toxicology Reports**, Netherlands, v. 3, p. 63, 2016.

MOCCIA, M. *et al.* Coenzyme Q10 supplementation reduces peripheral oxidative stress and inflammation in interferon- β 1a-treated multiple sclerosis. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, United Kingdom, v. 12, 1 jan. 2019.

MORALI, O. G. *et al.* IGF-II induces rapid β -catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. **Oncogene**, United Kingdom, v. 20, n. 36, p. 4942–4950, 8 ago. 2001.

MOVASSAGH, E.Z.; VATANPARAST, H. Current Evidence on the Association of Dietary Patterns and Bone Health: A Scoping Review. **Advances in nutrition**. United States, v. 8, n 1, p. 1-16, 17 jan. 2017.

MUC-WIERZGOŃ, M. *et al.* Specific metabolic biomarkers as risk and prognostic factors in colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, United States, v. 20, n. 29, p. 9759, 7 ago. 2014.

- MURPHY, N. *et al.* Circulating Levels of Insulin-like Growth Factor 1 and Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 Associate With Risk of Colorectal Cancer Based on Serologic and Mendelian Randomization Analyses. **Gastroenterology**, United States, v. 158, n. 5, p. 1300, 1 abr. 2020.
- MURTAZA, G. *et al.* FOXO transcriptional factors and long-term living. **Oxidative medicine and cellular longevity**. United Kingdom, v. 2017; 2017.
- NAGHAVI, M. *et al.* Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet**, United Kingdom, v. 390, n. 10100, p. 1151, , 16 set. 2017.
- NAGAREDDY, P.R. *et al.* Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. **Cell Metabolism**. United States, v. 19, n. 5, p. 821-35, , 6 May. 2014.
- NAKAMURA, K. *et al.* A Ketogenic Formula Prevents Tumor Progression and Cancer Cachexia by Attenuating Systemic Inflammation in Colon 26 Tumor-Bearing Mice. **Nutrients**, United States, v. 10, n. 2, 14 fev. 2018.
- NAKAMURA, K. *et al.* Ketogenic Effects of Multiple Doses of a Medium Chain Triglycerides Enriched Ketogenic Formula in Healthy Men under the Ketogenic Diet: A Randomized, Double-Blinded, PlaceboControlled Study. **Nutrients**, United States, v. 14, n. 6, p. 1199, 12 mar. 2022.
- NAYAK, M. G. *et al.* Quality of Life among Cancer Patients. **Indian Journal of Palliative Care**, India, v. 23, n. 4, p. 445, 1 out. 2017.
- NEWMAN, A.B.; MURABITO, J.M. The Epidemiology of longevity and exceptional survival. **Epidemiologic reviews**. United States, v. 35, n 1, p. 181-91, 31 Jan 2013.
- NEWMAN, J. C.; VERDIN, E. β -hydroxybutyrate: Much more than a metabolite. **Diabetes research and clinical practice**, Netherlands, v. 106, n. 2, p. 173, 1 nov. 2014.
- NIKOLAOU, S. *et al.* Systematic review of blood diagnostic markers in colorectal cancer. **Techniques in Coloproctology**, Italy, v. 22, n. 7, p. 481, 1 jul. 2018.
- NOLAN, C. J. *et al.* Fatty Acid Signaling in the β -Cell and Insulin Secretion. **Diabetes**, Dinamarca, v. 55, n. Supplement_2, p. S16–S23, 1 dez. 2006.
- NONINO-BORGES, C.B. *et al.* Dieta cetogênica no tratamento de epilepsias farmacorresistentes. **Revista de Nutrição**. Brasil, v. 17, n 4, p. 515-521, Dec. 2004.
- OGURA, Y. *et al.* Ketogenic diet feeding improves aerobic metabolism property in extensor digitorum longus muscle of sedentary male rats. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 15, n. 10, 1 out. 2020.
- OKUGAWA, Y.; GRADY, W. M.; GOEL, A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. **Gastroenterology**, United States, v. 149, n. 5, p. 1204, 1 out. 2015.
- OLIVEIRA, P.A. *et al.* Cheminal carcinogenesis. **Biomedical and Medical Sciences**. Georgia, v 79, n 4, p. 593-616, Dec. 2007.
- OMS. **As estimativas confirmam a tendência de longevidade: a expectativa de vida está ficando mais longa**. Brasil. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghelife-expectancy-and-healthy-life-expectancy>>. Acesso em: 4 mai. 2022.
- ONU. **Pandemia reduz expectativa de vida em 3 anos na América Latina**. Brasil. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2022-07/onu-pandemia-reduz-expectativa-de-vida-em-3-anos-na-america-latina>. Acesso em: 30 de outubro. 2022.
- OEPPEN, J.; VAUPEL, J. W. Demography: Broken limits to life expectancy. **Science**, Slovakia, v. 296, n. 5570, p. 1029–1031, 10 maio 2002.
- OTTO, C. *et al.* Growth of human gastric cancer cells in nude mice is delayed by a ketogenic diet supplemented with omega-3 fatty acids and medium-chain triglycerides. **BMC Cancer**, United Kingdom, v. 8, p. 122, 30 abr. 2008.

- PAN, M. H. *et al.* Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. **Molecular Nutrition & Food Research**, v Germany, 55, n. 1, p. 32–45, 1 jan. 2011.
- PAOLI, A. Ketogenic Diet for Obesity: Friend or Foe? **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 2092, 19 fev. 2014.
- PATTERSON, A. D. *et al.* Molecular Regulation of Carcinogenesis: Friend and Foe. **Toxicological Sciences**, Japan, v. 165, n. 2, p. 277, 1 out. 2018.
- PAULS, S. D. *et al.* Anti-inflammatory effects of α -linolenic acid in M1-like macrophages are associated with enhanced production of oxylipins from α -linolenic and linoleic acid. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, United States, v. 57, p. 121–129, 1 jul. 2018.
- PEGG, A.E. Functions of polyamines in mammals. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 219, n 29, p. 1490412, 15 Jul. 2016.
- PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; GOMES, T.L.B.; CARDOSO, K.C.M.; AMORIM, E.L.C. Otimização de Metodologia Analítica para o Doseamento de Flavonoides de Bauhinia cheilantha (Bongard) Steudel. **Química Nova**, Brasil, v.33, n. 2, p. 288-291, 2022.
- PENNY, L.K.; WALLACE, H.M. The challenges for câncer chemoprevention. **Chem. Soc. Rev.** [s.l.], v 44, p. 8836, 2015.
- PERNES, G. *et al.* Fat for fuel: lipid metabolism in haematopoiesis. **Clinical & Translational Immunology**, Australia, v. 8, n. 12, 1 jan. 2019.
- PERSE, M.; CERAR, A. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat - experimental colorectal carcinogenesis. **Radiol. Oncol.** [s.l.], v. 39, n 1, p. 61-70, 2005.
- PIAZZI, G. *et al.* Eicosapentaenoic acid free fatty acid prevents and suppresses colonic neoplasia in colitis-associated colorectal cancer acting on Notch signaling and gut microbiota. **International Journal of Cancer**, United States, v. 135, n. 9, p. 2004–2013, 1 nov. 2014.
- PINO, M. S.; CHUNG, D. C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. **Gastroenterology**, United States, v. 138, n. 6, p. 2059, 2010.
- POFF, A. M. *et al.* Ketone supplementation decreases tumor cell viability and prolongs survival of mice with metastatic cancer. **International Journal of Cancer**, United States, v. 135, n. 7, p. 1711, 1 out. 2014.
- POOLE, E. M. *et al.* Genetic variability in prostaglandin synthesis, fish intake and risk of colorectal polyps. **Carcinogenesis**, United Kingdom v. 28, n. 6, p. 1259–1263, 1 jun. 2007.
- POPAT, S.; MATAKIDOU, A.; HOULSTON, R. S. Thymidylate-synthase expression and prognosis in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Oncology**, China, v. 22, n. 3, p. 529–536, 25 jul. 2004.
- POULIOT, M. C. *et al.* Waist circumference and abdominal sagittal diameter: Best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. **American Journal of Cardiology**, United States, v. 73, n. 7, p. 460–468, 1 mar. 1994.
- PRADO, C. M.; PURCELL, S. A.; LAVIANO, A. Nutrition interventions to treat low muscle mass in cancer. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, Germany, v. 11, n. 2, p. 366, 1 abr. 2020.
- RAJ, L. *et al.* Selective killing of cancer cells with a small molecule targeting stress response to ROS. **Nature**, United Kingdom, v. 475, n. 7355, p. 231, 14 jul. 2011.
- RAMYA, V. *et al.* Dual Roles of Coconut Oil and Its Major Component Lauric Acid on Redox Nexus: Focus on Cytoprotection and Cancer Cell Death. **Frontiers in Neuroscience**, United States, v. 16, 11 mar. 2022.

- RAO, S. R. *et al.* Tumour-derived alkaline phosphatase regulates tumour growth, epithelial plasticity and disease-free survival in metastatic prostate cancer. **British Journal of Cancer**, United Kingdom, v. 116, n. 2, p. 227, 17 jan. 2017.
- RAPPANGE, D. R.; BROUWER, W. B. F.; VAN EXEL, J. A long life in good health: subjective expectations regarding length and future health-related quality of life. **The European Journal of Health Economics**, Germany, v. 17, n. 5, p. 577, 1 jun. 2016.
- RATHORE, S. *et al.* A recent survey on colon cancer detection techniques. **IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinformatic**. [s.l.], v. 10, n 3, p. 545-63, May. 2013.
- RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**. United States, v. 26, n. 9-10, p. 1231, May. 1999.
- REA, J. N. M. *et al.* Genes and life-style factors in BELFAST nonagenarians: Nature, Nurture and Narrative. **Biogerontology**, Netherlands, v. 16, n. 5, p. 587, 31 out. 2015.
- RILEY, J. C. Estimates of regional and global life expectancy, 1800-2001. **Population and Development Review**, [s.l.], v. 31, n. 3, p. 537-543, set. 2005.
- ROGAWSKI, M.; LOSCHER, W.; RHO, J.R. Mechanisms of Action of Antiseizure Drugs and the Ketogenic Diet. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**. United States, v. 6, n 5, 2 May. 2016.
- ROHDE, K. *et al.* Genetics and epigenetics in obesity. **Metabolism**. United States, v. 92, p. 37-50, Mar. 2019.
- ROSS, R. *et al.* Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity. **Nature Reviews. Endocrinology**, United Kingdom, v. 16, n. 3, p. 177, 1 mar. 2020.
- SAFIRI, S. *et al.* The global, regional, and national burden of colorectal cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet. Gastroenterology & Hepatology**, United Kingdom, v. 4, n. 12, p. 913, 1 dez. 2019.
- ŞAHİN, M.; ŞAHİN, E.; GÖMŞLÜ, S. Cyclooxygenase-2 in cancer and angiogenesis. **Angiology**, United States, v. 60, n. 2, p. 242-253, 27 abr. 2009.
- SAHU, B. *et al.* Human cell transformation by combined lineage conversion and oncogene expression. **Oncogene**, United Kingdom, v. 40, n. 36, p. 5533, 9 set. 2021.
- SAKATANI, A.; SONOHARA, F.; GOEL, A. Melatonin-mediated downregulation of thymidylate synthase as a novel mechanism for overcoming 5-fluorouracil associated chemoresistance in colorectal cancer cells. **Carcinogenesis**, United Kingdom, v. 40, n. 3, p. 422, 14 maio 2019.
- SALEEM, M.; AHMAD, N. Characterization of canola oil extracted by different methods using fluorescence spectroscopy. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 13, n. 12, 1 dez. 2018.
- SANTARELLI, R.L.; PIERRE, F.; CORPET, D.E. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. **Nutrition and Cancer**. United States, v. 60, n 2, p. 131-44, 2008.
- SANTOS-LOZANO, A. *et al.* The genetics of exceptional longevity: Insights from centenarians. **Maturitas**, Ireland, v. 90, p. 49-57, 1 ago. 2016.
- SCATENA, R. *et al.* Revisiting the Warburg effect in cancer cells with proteomics. The emergence of new approaches to diagnosis, prognosis and therapy. **PROTEOMICS – Clinical Applications**, Germany, v. 4, n. 2, p. 143-158, 1 fev. 2010.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, Netherlands, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.
- SCHNEIDER, N. I.; LANGNER, C. Prognostic stratification of colorectal cancer patients: current perspectives. **Cancer Management and Research**, New Zealand, v. 6, n. 1, p. 291, 2 jul. 2014.

SEALS, D.R.; JUSTICE, J.N.; LAROCCA, T.J. Physiological geroscience: Targeting function to increase healthspan and achieve optimal longevity. **The Journal of physiology**, United States v. 594, n 8, p. 2001-24, , 15 Apr. 2016.

SEBASTIANI, P.; PERLS, T. T. The Genetics of Extreme Longevity: Lessons from the New England Centenarian Study. **Frontiers in Genetics**, Switzerland, v. 3, nov 2012.

SELUANOV, A. *et al.* Mechanisms of cancer resistance in long-lived mammals. **Nature reviews Cancer**. United Kingdom v. 18, n 7, p. 433-441, , jul. 2018.

SENGA, S. S.; GROSE, R. P. Hallmarks of cancer—the new testament. **Open Biology**, United Kingdom, v. 11, n. 1, p. 0–2, 2021.

SEYFRIED, T. N. *et al.* Role of glucose and ketone bodies in the metabolic control of experimental brain cancer. **British Journal of Cancer**, United Kingdom, v. 89, n. 7, p. 1375, 6 out. 2003.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Envelhecimento humano saudável: fatores intrínsecos e ambientais. **Brazilian Journal of Food Technology**, Brasil, v. 20, 31 ago. 2017.

SHARMAN, M. J. *et al.* A Ketogenic Diet Favorably Affects Serum Biomarkers for Cardiovascular Disease in Normal-Weight Men. **The Journal of Nutrition**, France, v. 132, n. 7, p. 1879–1885, 1 jul. 2002.

SHEELA, D. L. *et al.* Lauric acid induce cell death in colon cancer cells mediated by the epidermal growth factor receptor downregulation: An in silico and in vitro study. **Human and Experimental Toxicology**, United Kingdom, v. 38, n. 7, p. 753–761, 1 jul. 2019.

SHRESTHA, A. *et al.* Quality of life versus length of life considerations in cancer patients: A systematic literature review. **Psycho-Oncology**, v United Kingdom,. 28, n. 7, p. 1367, 1 jul. 2019.

SOUZA, D. M. S. DE *et al.* Diet Rich in Lard Promotes a Metabolic Environment Favorable to Trypanosoma cruzi Growth. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, Switzerland, v. 8, 25 maio 2021.

SPERRY, J. *et al.* Glioblastoma Utilizes Fatty Acids and Ketone Bodies for Growth Allowing Progression during Ketogenic Diet Therapy. **iScience**. Netherlands,v. 23, n 9, 13 Aug. 2020.

SRIPETCHWANDEE, J.; CHATTIPAKORN, N.; CHATTIPAKORN, S.C. Links between obesity-induced brain insulin resistance, brain mitochondrial dysfunction, and dementia. **Frontiers in endocrinology**. Switzerland, v. 9, p. 496, 31 Aug. 2018.

STAFFORD, P. *et al.* The ketogenic diet reverses gene expression patterns and reduces reactive oxygen species levels when used as an adjuvant therapy for glioma. **Nutrition & Metabolism**, United States, v. 7, p. 74, 2010.

STAMOS, J. L.; WEIS, W. I. The β -Catenin Destruction Complex. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, United States, v. 5, n. 1, jan. 2013.

STEINHART, Z.; ANGERS, S. Wnt signaling in development and tissue homeostasis. **Development (Cambridge, England)**, United Kingdom, v. 145, n. 11, 8 jun. 2018

STRÖHER, D. J. *et al.* Virgin Coconut Oil Associated with High-Fat Diet Induces Metabolic Dysfunctions, Adipose Inflammation, and Hepatic Lipid Accumulation. **Journal of Medicinal Food**, United States,v. 23, n. 7, p. 689, 1 jul. 2020.

STRZALKA, W.; ZIEMIENOWICZ, A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. **Annals of Botany**, United Kingdom, v. 107, n. 7, p. 1127, may 2011.

STROUCH, M. J. *et al.* A high omega-3 fatty acid diet mitigates murine pancreatic precancer development. **The Journal of surgical research**, United States, v. 165, n. 1, p. 75, jan. 2011.

SU, J. *et al.* The Functional Analysis of Histone Acetyltransferase MOF in Tumorigenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 17, n. 1, 14 jan. 2016.

- SU, S.W. *et al.* Timing of ketogenic diet initiation in an experimental epilepsy model. **Brain research. Developmental brain research**. Netherlands, v 125, n 1-2, p. 131-8, 29 Dec. 2000.
- SUN, J.; JIN, T. Both Wnt and mTOR signaling pathways are involved in insulin-stimulated proto-oncogene expression in intestinal cells. **Cellular Signalling**, United Kingdom, v. 20, n. 1, p. 219–229, 1 jan. 2008.
- SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, United States, v. 71, n. 3, p. 209–249, 1 may 2021.
- SURI, S. *et al.* DASH Dietary Pattern: a treatment for non-communicable diseases. **Current hypertension reviews**. Netherlands, v. 16, n 2, p. 108-114, 2020.
- SWIDSINSKI, A. *et al.* Reduced Mass and Diversity of the Colonic Microbiome in Patients with Multiple Sclerosis and Their Improvement with Ketogenic Diet. **Frontiers in Microbiology**, United States, v. 8, jun, 2017.
- TAGLIABUE, A. *et al.* Effects of the ketogenic diet on nutritional status, resting energy expenditure, and substrate oxidation in patients with medically refractory epilepsy: A 6-month prospective observational study. **Clinical Nutrition**, v[s.l.],. 31, n. 2, p. 246–249, 1 Abr. 2012.
- TEMPLEMAN, N.M.; MURPHY, C.T. Regulation of reproduction and longevity by nutrient-sensing pathways. **The Journal of cell biology**. United States, v. 17, n 1, p. 93-106, 2 Jan. 2018.
- TESTA, U.; PELOSI, E.; CASTELLI, G. Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. **Medical sciences**. [s.l.], v. 6, n 2, p. 31, 13 Apr. 2018.
- THOMAS, D. D. *et al.* Effects of medium chain triglycerides supplementation on insulin sensitivity and beta cell function: A feasibility study. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 14, n. 12, 1 dez. 2019.
- TICE, R.R. *et al.* Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**. United States, v. 35, n 3, p. 206-21, 2000
- TIWARI, A. *et al.* Novel targeting approaches and signaling pathways of colorectal cancer: An insight. **World Journal of Gastroenterology**, United States, v. 24, n. 39, p. 4428, 10 out. 2018.
- TRAN, Q. *et al.* Revisiting the Warburg Effect: Diet-Based Strategies for Cancer Prevention. **BioMed Research International**, United Kingdom, v. 2020, 2020.
- TRAN, T. T. *et al.* Hyperinsulinemia, But Not Other Factors Associated with Insulin Resistance, Acutely Enhances Colorectal Epithelial Proliferation in Vivo. **Endocrinology**, Lithuania, v. 147, n. 4, p. 1830–1837, 1 abr. 2006.
- TRIPATHY, A. *et al.* Probiotics: A Promising Candidate for Management of Colorectal Cancer. **Cancers**, Switzerland, v. 13, n. 13, 1 jul. 2021.
- TUNSIJØ, H. S. *et al.* Detection of *Fusobacterium nucleatum* in stool and colonic tissues from Norwegian colorectal cancer patients. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 38, n. 7, p. 1367–1376, 1 jul. 2019.
- UŁAMEK-KOZIOŁ, M. *et al.* Ketogenic Diet and Epilepsy. **Nutrients**. Switzerland, v. 11, n 10, p. 2510, 2019.
- VAISERMAN, A.; LUSHCHAK, O. Implementation of longevity-promoting supplements and medications in public health practice: achievements, challenges and future perspectives. **Journal of Translational Medicine**, United Kingdom, v. 15, n. 1, 20 jul. 2017.
- VALDES, A.M. *Et al.* Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. **Lancet**. United Kingdom, v. 366, n 9486, p. 662-4, 2005.

- VALENTINIS, B.; BASERGA, R. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. **Molecular Pathology**, United Kingdom, v. 54, n. 3, p. 133, 2001.
- VAN DER LOUW, E.J.T.M. *et al.* Ketogenic diet treatment as adjuvant to standard treatment of glioblastoma multiforme: a feasibility and safety study. **Therapeutic advances in medical oncology**. United Kingdom, v. 11, 21 Jun. 2019.
- VECE, M. M. *et al.* Dietary Total Antioxidant Capacity and Colorectal Cancer in the Italian EPIC Cohort. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 10, n. 11, 1 nov. 2015.
- VEERESH BABU, S. V. *et al.* Lauric acid and myristic acid prevent testosterone induced prostatic hyperplasia in rats. **European Journal of Pharmacology**, Netherlands, v. 626, n. 2–3, p. 262–265, 25 jan. 2010.
- VENKATACHALAM, K. *et al.* Biochemical and molecular aspects of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: a review. **Toxicology Research**, United Kingdom, v. 9, n. 1, p. 2, 2020.
- VERROTTI, A. *et al.* Diet in the Treatment of Epilepsy: What We Know So Far. **Nutrients**. Switzerland, v 12, n 9, p. 2645, 30 Aug. 2020.
- VIGNERI, R.; GOLDFINE, I. D.; FRITTITTA, L. Insulin, insulin receptors, and cancer. **Journal of Endocrinological Investigation**, Italy, v. 39, n. 12, p. 1365–1376, 1 dez. 2016.
- WALIA S, KAMAL R, DHAWAN DK, KANWAR SS. Chemoprevention by Probiotics During 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colon Carcinogenesis in Rats. **Digestive diseases and sciences**. United States, v. 63, n 4, p. 900909, Apr. 2018.
- WANG, S. T. *et al.* Tea polyphenols and their chemopreventive and therapeutic effects on colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, United States, v. 26, n. 6, p. 562, 14 fev. 2020.
- WANG, X.; LIN, H.; GU, Y. Multiple roles of dihomo- γ -linolenic acid against proliferation diseases. **Lipids in Health and Disease**, United Kingdom, v. 11, p. 25, 2012.
- WANG, Y. H.; SUK, F. M.; LIAO, Y. J. Loss of HMGC2 Enhances Lipogenesis and Attenuates the Protective Effect of the Ketogenic Diet in Liver Cancer. **Cancers**, Switzerland, v. 12, n. 7, p. 1–16, 1 jul. 2020.
- WANG, Y.; ZHOU, Y.; GRAVES, D.T. FOXO transcription factors: Their clinical significance and regulation. **BioMed research international**, United Kingdom, v. 2014; 2014.
- WANG, Z. *et al.* Perilla frutescens leaf extract and fractions: polyphenol composition, antioxidant, enzymes (α glucosidase, acetylcholinesterase, and tyrosinase) inhibitory, anticancer and antidiabetic activities. **Foods**. Switzerland, v 10, n 2, p. 1-19, Feb. 2021.
- WANG, Z.-X.; LIN, Q.-Q.; TU, Z.-C.; ZHANG, L. The influence of in vitro gastrointestinal digestion on the Perilla frutescens leaf extract: Changes in the active compounds and bioactivities. **Journal of Food Biochemistry**, United States, v. 44, e13530, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfbc.13530>. Acesso em: 15 nov. 2021.
- WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, Slovakia, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 24 fev 1956.
- WATANABE, J. *et al.* The impact of visceral obesity on surgical outcomes of laparoscopic surgery for colon cancer. **International Journal of Colorectal Disease**, Germany, v. 29, n. 3, p. 343–351, 3 dez. 2014.
- WEBB, A.E.; BRUNET, A. FOXO transcription factors: Key regulators of cellular quality control. **Trends in biochemical sciences**. United Kingdom, v. 39, n 4, p. 159-69, Apr. 2014.
- WEBER, D. D. *et al.* Ketogenic diet in the treatment of cancer – Where do we stand? **Molecular Metabolism**, Amsterdam Elsevier, v. 33, p. 102, 1 mar. 2020.
- WEICHHART, T. mTOR as regulator of lifespan, aging, and cellular senescence: A mini-review. **Gerontology**. Japan, v. 63, n 2, p. 127-34, 2018.

- WELLS, J.; Swaminathan, A.; Pesaka, J.; Hanson, C. Efficacy and Safety of a Ketogenic Diet in Children and Adolescents with Refractory Epilepsy—A Review. **Nutrients**, Switzerland, v. 12, n 6, p. 1809, 17 Jun. 2020.
- WEN, Y. Y. *et al.* IGF-1-mediated PKM2/ β -catenin/miR-152 regulatory circuit in breast cancer. **Scientific Reports**, Switzerland, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.
- WILLIAMS-KARNESKY, R. L. *et al.* Epigenetic changes induced by adenosine augmentation therapy prevent epileptogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, United States, v. 123, n. 8, p. 3552, 8 ago. 2013.
- WOOLF, E.C.; Syed, N.; Scheck, A.C. Tumor Metabolism, the Ketogenic Diet and β -Hydroxybutyrate: Novel Approaches to Adjuvant Brain Tumor Therapy. **Frontiers in molecular neuroscience**. [s.l.], v. 9, p. 122, 19 Nov. 2016.
- WOOLF, E. C. *et al.* The Ketogenic Diet alters the Hypoxic Response and Affects Expression of Proteins Associated with Angiogenesis, Invasive Potential and Vascular Permeability in a Mouse Glioma Model. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 10, n. 6, 17 jun. 2015.
- WU, M. *et al.* The Composition and Anti-Aging Activities of Polyphenol Extract from *Phyllanthus emblica* L. Fruit. **Nutrients**, Switzerland, v. 14, n. 4, 1 fev. 2022.
- WU, S.; Zhu, W.; Thompson, P.; Hannun, Y.A. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature communications**. [s.l.], v. 9, n1, p. 3490, 28 Apr. 2018.
- XIA, S. *et al.* Prevention of dietary fat-fueled ketogenesis attenuates BRAF V600E tumor growth. **Cell metabolism**, United States, v. 25, n. 2, p. 358, 7 fev. 2017.
- YANG, C. *et al.* Apigenin enhances apoptosis induction by 5-fluorouracil through regulation of thymidylate synthase in colorectal cancer cells. **Redox Biology**, Netherlands, v. 47, 1 nov. 2021.
- YANG, F. *et al.* Identification of new genetic variants of HLA-DQB1 associated with human longevity and lipid homeostasis—a cross-sectional study in a Chinese population. **Aging**, [s.l.], v. 9, n. 11, p. 2316, 2017.
- YE, P. *et al.* Histone deacetylase 2 regulates doxorubicin (Dox) sensitivity of colorectal cancer cells by targeting ABCB1 transcription. **Cancer Chemother Pharmacol**, [s.l.], v.77, n. 3, p. 613-21, 5 Feb 2016.
- YEH, Y. Y.; ZEE, P. Relation of Ketosis to Metabolic Changes Induced by Acute Medium-Chain Triglyceride Feeding in Rats. **The Journal of Nutrition**, United States, v. 106, n. 1, p. 58–67, 1 jan. 1976.
- YU, J. *et al.* Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. **Gut**, United Kingdom, v. 66, n. 1, p. 70–78, 2017.
- ZHANG, A. M. Y. *et al.* Hyperinsulinemia in Obesity, Inflammation, and Cancer. **Diabetes & Metabolism Journal**, Korea, v. 45, n. 3, p. 285, 1 maio 2021.
- ZHANG, J. *et al.* Low ketolytic enzyme levels in tumors predict ketogenic diet responses in cancer cell lines in vitro and in vivo. **Journal of lipid research**. United States, v. 59, n 4, p. 625-634, Apr. 2018.
- ZHANG, Q. YUN *et al.* Knockdown of type I insulin-like growth factor receptor inhibits human colorectal cancer cell growth and downstream PI3K/Akt, WNT/ β -catenin signal pathways. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, France, v. 73, p. 12–18, 1 jul. 2015.
- ZHANG, X. *et al.* Long noncoding RNA HNF1A-AS1 indicates a poor prognosis of colorectal cancer and promotes carcinogenesis via activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Biomed Pharmacother**, [s.l.], v. 96, p. 877-883, Dec 2017.
- ZHANG, X. *et al.* Non-genetic biomarkers and colorectal cancer risk: Umbrella review and evidence triangulation. **Cancer Medicine**, United Kingdom, v. 9, n. 13, p. 4823, 1 jul. 2020
- ZHAO, Q. *et al.* Detrimental effects of the ketogenic diet on cognitive function in rats. **Pediatric Research**.

United States, v. 55, p. 498-506, 1 Mar . 2004.

ZHENG, W. V. *et al.* Anti-aging effect of β -carotene through regulating the KAT7-P15 signaling axis, inflammation and oxidative stress process. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Poland, v. 27, n. 1, p. 86, 1 Dez. 2022.

ZHENG, Y. *et al.* Clostridium difficile colonization in preoperative colorectal cancer patients. **Oncotarget**, United States, v. 8, n. 7, p. 11877, 2 Feb. 2017.

ZHOU, W. *et al.* The calorically restricted ketogenic diet, an effective alternative therapy for malignant brain cancer. **Nutrition & Metabolism**, United Kingdom, v. 4, p. 5, 2007.

ZHU, Q. C. *et al.* Effect of a high-fat diet in development of colonic adenoma in an animal model. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, United States, v. 20, n. 25, p. 8119, 7 jul. 2014.

ZYGULSKA, A. L.; PIERZCHALSKI, P. Novel Diagnostic Biomarkers in Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 23, n. 2, 1 jan. 2022.

APÊNDICE A – ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS FCA E DAS CA NO CÓLON DOS RATOS WISTAR

Focos de criptas aberrantes (FCA) e criptas aberrantes (CA) observadas no cólon distal de ratos Wistar submetidos aos diferentes modelos de dieta e respectivos controles.

Tratamento	Número de FCA					Número de FCA	Número de CA	CA/FCA
	1 cripta	2 criptas	3 criptas	4 criptas	5 criptas			
CN	0	0	0	0	0	0	0	0
DC	0	0	0	0	0	0	0	0
DCTCM	0	0	0	0	0	0	0	0
TCM	0	0	0	0	0	0	0	0

FCA – Focos de criptas aberrantes, CA – Criptas aberrantes, CN – Controle negativo, DC – Dieta cetogênica, DCTCM – Dieta cetogênica com triglicérido de cadeia média, TCM – Triglicérido de cadeia média. n = 3 animais por grupo.

ANEXO A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM ANIMAIS

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **EFEITO DA DIETA CETOGÊNICA NA PROMOÇÃO DA TUMORIGÊNESE COLORRETAL INDUZIDA EM RATOS**, registrada com o nº **0018/2021**, sob a responsabilidade de **Pollyanna Francielli de Oliveira**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **26/04/2021 a 24/04/2023**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / Wistar	96	96	0	Biotério central da universidade federal de alfenas

Alfenas, 04 de Maio de 2022

Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira
Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/cons/autenticadocercificado/> e digite a chave: b78c3800E91b68804e21ae4b35d0db7