



Catarina Isabel Braz Guilherme

A influência do consumo de fibra dietética no desenvolvimento do carcinoma colo-rectal

Dissertação de mestrado em Bioquímica,
orientada pela Professora Doutora Ana Margarida Abrantes e co-orientada pelo Professor Doutor Rui Albuquerque de Carvalho.

Apresentada no departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra
Junho 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Catarina Isabel Braz Guilherme

A influência do consumo de fibra dietética no
desenvolvimento do carcinoma colo-rectal



2017

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis is provided on the condition that the consultation recognizes that copyright is owned by the author of the thesis and that no quotation or information obtained from it can be reproduced without the appropriate reference.

Agradecimentos:

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Directora da Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, por me ter acolhido na sua equipa, pelo apoio, disponibilidade, dedicação e orientação.

À Professora Doutora Margarida Abrantes, que me orientou neste trabalho, por toda a sua ajuda, por toda a sua dedicação e simpatia. Por todos os conhecimentos partilhados ao longo deste ano. Por ser um exemplo a seguir, o meu sincero obrigada.

Ao Professor Doutor Rui Albuquerque de Carvalho, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da universidade de Coimbra, meu co-orientador neste trabalho a quem muito tenho a agradecer e que muito contribuiu para a realização do trabalho experimental. Por todos os ensinamentos transmitidos durante este ano, o meu sincero muito obrigada.

À Professora Doutora Salomé Pires, pela disponibilidade, por toda a amizade, pela força e confiança que demonstrou em mim. Pelo seu sorriso e simpatia constante. Por todo o seu apoio e ajuda ao longo da realização deste trabalho.

À Doutora Ivana Jarak por toda a ajuda na análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, o meu mais sincero obrigada.

À Kleine e à Maria Beatriz por toda a preciosa ajuda no laboratório, o meu obrigada.

Aos meus pais a quem tanto devo! Pela preocupação, pelo amor, pela força. A vocês, devo quem sou hoje, pois valores que me ensinaram fazem-me ultrapassar os obstáculos que encontro. Por serem um exemplo a seguir. Aos vós, um eterno obrigado por estarem sempre presentes.

Aos meus avós, por todo o apoio, pelo vosso amor, pela dedicação com que sempre me presentearam, e por todos os valores que me transmitiram. Sempre lutaram para que eu atingisse os meus objectivos, pelo que aqui registo a minha eterna gratidão. Um agradecimento especial ao meu avô Manuel, que me mostrou ao longo deste último ano que nada nos consegue impedir na luta pelos nossos sonhos.

Ao meu tio, por ser um pilar e um exemplo na minha vida, por estar presente em todos os momentos.

Ao meu Rafael, por todo o apoio, paciência, carinho e amor. Serei eternamente grata por ter uma pessoa como tu na minha vida.

A todos os meus amigos, que sempre me ajudaram e incentivaram.

À minha mãe,

por ser tudo,
por ser quem me guia
um agradecimento especial

Índice:

Resumo.....	15
Abstract.....	17
1. Cancro Colo-rectal (CCR).....	21
1.1. Tratamento no CCR.....	26
2. Dieta Mediterrânica.....	28
3. A dieta e o CCR.....	31
4. CCR e fibra dietética.....	37
4.1. Acetato.....	39
4.2. Propionato.....	40
4.3. Butirato.....	40
5. Objetivos do trabalho.....	42
6. Materiais e Métodos.....	43
6.1. População do Estudo.....	43
6.2. Inquérito Alimentar.....	44
6.3. Recolha das amostras biológicas.....	46
6.4. Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	47
6.5. Análise estatística.....	49
7. Resultados e discussão.....	52
7.1. Caracterização das informações recolhidas.....	52
7.2. Análise do inquérito alimentar.....	54
7.3. Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	62
8. Conclusões e perspectivas futuras:.....	74
9. Bibliografia.....	77
10. Anexos.....	88

Lista de Abreviaturas e símbolos:

^1H RMN - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Potrão

5-FU - 5-fluorouracilo

Acetil-coA – Acetil coenzima A

ANOVA - *Analysis of variance*

CCR – Cancro Colo-Rectal

CHUC – Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

CH₄ - Metano

CoA – Coenzima A

COX-2 - Ciclo-Oxigenase-2

CO₂ – Dióxido de carbono

CCR – Cancro Colo-Rectal

CYP450 - Citocromo p450

DNA - Deoxyribonucleic Acid

D₂O – Água deuterada

EPIC - *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*

HDAC - Histona deacetilases

HNPCC - *Hereditary non-polyposis colorectal cancer*

H₂ – Hidrogénio

IPO – Instituto Português de Oncologia

IV – Injecção intra-venosa

KEGG - Enciclopédia de Quioto de Genes e Genomas

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAF - Polipose Adenomatosa Familiar

PCA – *Principal component analysis*

PLA-DS - *Partial Least Squares Discriminant Analysis*

ppm – partes por milhão

PQN – Probabilistic Quocient Normalization

SCFA – *Short Chain Fatty Acid*

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

MVA - Multiple Variate Analysis

TNF- α - *Tumor necrosis factor alpha*

UNESCO - Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura

UV - Ultravioleta

VIP - *Variable Importance to Projection*

Resumo

Introdução e Objetivos:

O cancro é a principal causa de morte em países desenvolvidos e a segunda causa de morte em países em desenvolvimento. O cancro colo-rectal (CCR) é o terceiro tumor mais comum em homens e o segundo em mulheres, representando 10% de todos os tipos de cancro em todo o mundo. Com 608.000 mortes estimadas a cada ano, o CCR é a quarta causa de morte mais comum relacionada ao cancro no Mundo. A Dieta Mediterrânica teve a sua origem nos países banhados pelo Mar Mediterrâneo tendo estado nos últimos anos no centro das atenções. Vários aspectos da Dieta Mediterrânica têm sido associados a um risco reduzido não apenas de CCR, mas também de vários outros tipos de cancro. A fibra dietética foi sugerida como hipótese para reduzir e prevenir o risco e o aparecimento de CCR. A produção de ácidos gordos de cadeia curta (SCFA's do inglês *short chain fatty acids*) é determinada por uma série de factores, incluindo a sua produção pela microflora presente no cólon.

A relevância do presente trabalho apoia-se em estudos que reforçam o facto de uma dieta rica em fibras se relacionar com um menor risco de desenvolvimento de diversas doenças gastrointestinais, nomeadamente o cancro colo-rectal. Assim, com este trabalho pretendemos compreender melhor a influência da dieta e dos ácidos gordos de cadeia curta na regulação e na incidência de CCR, recorrendo a um estudo em ambiente clínico. Esta proposta visa correlacionar as informações nutricionais do indivíduo, obtidas através de um inquérito de frequência alimentar, com a análise metabólica de amostras fecais em termos de concentrações de ácidos gordos de cadeia curta.

Materiais e métodos:

Várias tarefas foram realizadas de forma a cumprir o objectivo deste trabalho. A amostra populacional para a realização deste trabalho é constituída por indivíduos com diagnóstico de cancro colo-rectal e indivíduos controlo sem diagnóstico da patologia. Com o objectivo de avaliar as informações nutricionais recorrentes da alimentação, aos doentes e indivíduos saudáveis que aceitem por assinatura de um Consentimento Informado participar no estudo, foi realizado um questionário de frequência alimentar. Os resultados destes inquéritos foram processados e avaliados pela Unidade de

Epidemiologia Nutricional Serviço de Higiene e Epidemiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Foram avaliados parâmetros como a o consumo de batatas, aves, carnes, peixe, frutas, cereais, leguminosas, vegetais, batatas, lacticínios, azeite e o consumo de bebidas alcoólicas.

A colheita das amostras biológicas (fezes) dos indivíduos foi realizada anteriormente à data colonoscopia ou nos dias seguintes à mesma após regularização do trânsito intestinal. Após recolha, acondicionamento e posterior preparação para análise as amostras biológicas foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de alta resolução (^1H RMN). Este trabalho contou com a participação de 96 indivíduos divididos em dois grupos: com cancro colo-rectal e indivíduos sem a patologia. A amostra foi caracterizada em termos de idade, distribuição por distrito e nível de literacia. Foi também analisada a concentração de acetato, de butirato e de propionato em função da presença ou ausência de CCR, da localização e do estágio do tumor.

Discussão:

Foram encontradas diferenças no consumo de fibra alimentar entre os doentes de CCR e o grupo controlo, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas nos grupos em estudo (localização do tumor, índice de MeDi-score). Também não foram verificadas diferenças na análise de ácidos gordos. Estes resultados podem dever-se à existência de poucos indivíduos no grupo controlo e à absorção intestinal de SCFA's.

Em trabalhos futuros seria importante analisar o microbioma presente nas amostras fecais de forma a correlacionar essas informações com os dados obtidos por RMN, de modo a avaliar de que forma a absorção intestinal pode afectar a presença de SCFA's nas fezes e se seria plausível usar os metabolitos presentes como bioindicador da presença de CCR.

Palavras-chave: Cancro colo-rectal, Dieta Mediterrânica, Ácidos gordos de cadeia curta, Fibra dietética, Análise metabolómica.

Abstract

Introduction and objectives:

Cancer is the leading cause of death in developed countries and the second leading cause of death in developing countries. The colorectal cancer (CRC) is the third most common tumor in men and the second in women, representing 10% of all types of cancer around the world. With 608,000 deaths estimated each year, the CRC is the fourth most common cause of death related to cancer in the world. The Mediterranean Diet has its origins in the countries bordering the Mediterranean Sea and has been in the spotlight in the recent years. Several aspects of the Mediterranean diet have been associated with a reduced risk not only of CRC, but also several other types of cancer. The dietary fiber has been suggested as a possible way to reduce and prevent the risk and the appearance of CRC. The production of short chain fatty acids (SCFA's) is determined by a number of factors, including the numbers and types of microflora present in the colon, substrate source and intestinal time transit.

The relevance of this study is based on studies that reinforce the fact that a diet rich in fibers relate to a lower risk of developing various gastrointestinal diseases, in particular colorectal cancer. So, with this work we intend to better understand the influence of diet and short chain fatty acids on the regulation and incidence of CRC, using a clinical study.

This proposal aims to correlate the nutritional information of the individual, obtained through a food frequency survey, with the metabolomic analysis of fecal samples in terms of short chain fatty acid concentrations.

Materials and methods:

Several tasks were performed in order to fulfill the objective of this work. The population sample for the accomplishment of this work is constituted by individuals with diagnosis of colorectal cancer and control individuals without diagnosis of the pathology. In order to evaluate recurrent nutritional information of the diet, patients and healthy individuals, the sick and healthy individuals who accept by signing a written informed consent to participate in the study, we conducted a questionnaire of food frequency. The results of these surveys were processed and evaluated by the Unit of Nutritional Epidemiology Service of Hygiene and Epidemiology of Porto's University Faculty of Medicine. We evaluated parameters such as the consumption of potatoes,

poultry, meat, fish, fruit, cereals, legumes, vegetables, potatoes, milk products, olive oil and the consumption of alcoholic beverages.

The collection of biological samples (feces) of individuals were performed prior to the colonoscopy date or on the days following the same after regularization of the intestinal transit. After collection, conditioning and subsequent preparation for analysis the biological samples were analyzed by high resolution nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopy. This study had the participation of 96 individuals divided into two groups: with colorectal cancer and individuals without the pathology.

The sample was characterized in terms of age, distribution by district and level of literacy. The concentration of acetate, butyrate and propionate was also analyzed according to the presence or absence of CRC, the location and stage of the tumor.

Discussion:

There were differences in dietary fiber intake between CRC patients and control groups, but no statistically significant differences were observed in the study groups (tumor location, MeDi-score index). There were also no differences in fatty acid analysis. These results may be due to the existence of few individuals in group supervision and the intestinal absorption of SCFA's.

In future studies, it would be important to analyze the microbiome presence in the fecal samples in order to correlate this information with the data obtained by NMR in order to evaluate how intestinal absorption can affect the presence of SCFA's in feces and whether it would be reasonable to use the metabolites present as bioindicator of the presence of CRC.

Key words: Colorectal cancer, Mediterranean diet, Short chain fatty acids, Dietary fiber, Metabolomic analysis

1. Cancro Colo-rectal (CCR)

O cancro, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), define-se pelo crescimento descontrolado e pela propagação das células, podendo frequentemente invadir os tecidos circundantes e mesmo metastizar. Esta patologia é a principal causa de morte em países desenvolvidos e a segunda causa de morte em países em desenvolvimento de acordo com a figura 1 (Siegel, Desantis, and Jemal, 2014).

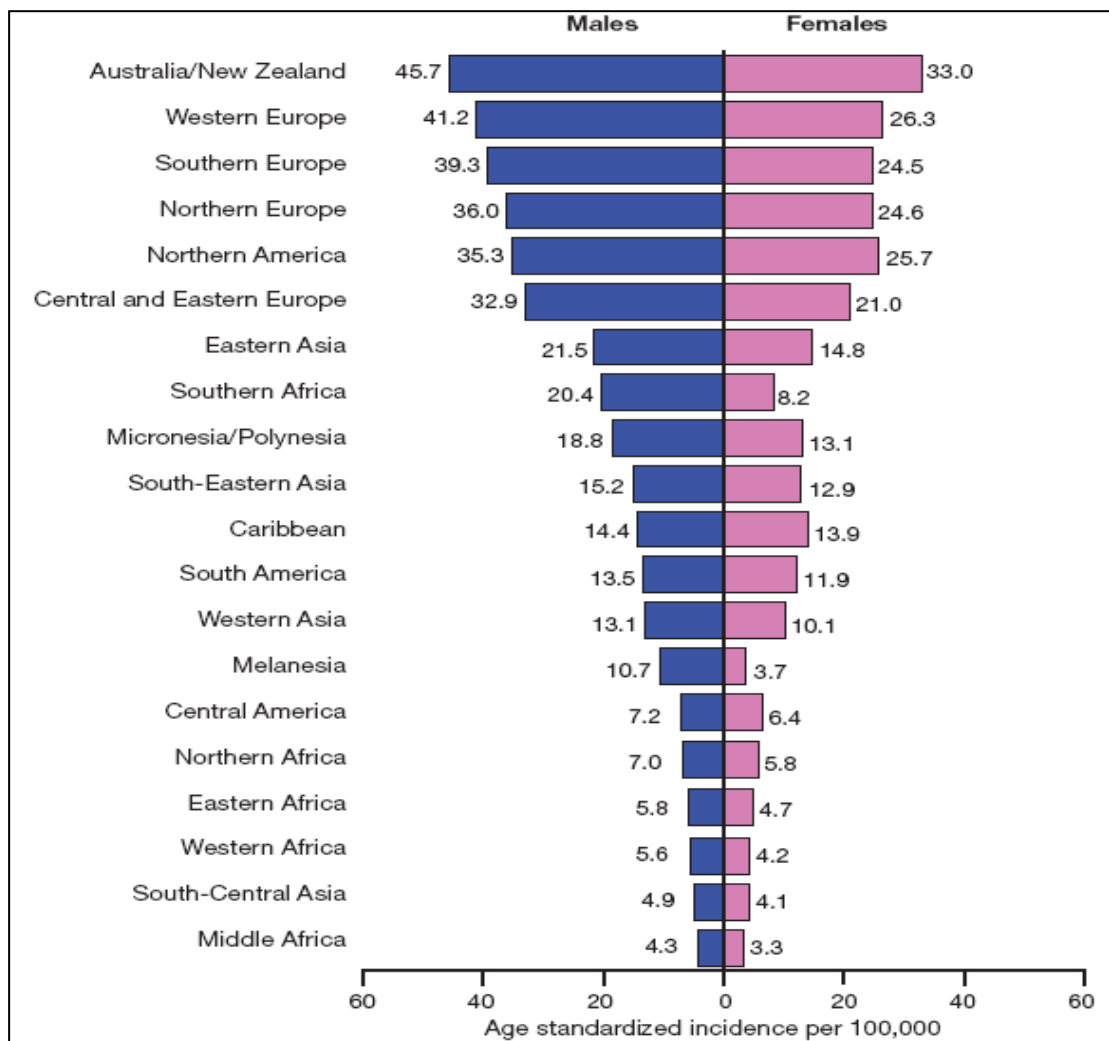


Figura 1: Incidência de cancro CCR por idades e género no mundo. Imagem retirada de Ferlay et al. 2015

Em 2012, na Europa, foram diagnosticados cerca de 3,4 milhões de novos casos de cancro, dos quais 53% em homens e 47% em mulheres, tendo-se verificado que no género masculino os cancros mais comuns são o da próstata (416.700 casos que corresponde a 22,8% do total), o do pulmão (291.000 casos que corresponde a 15,9%

do total), o colo-rectal (CCR) (242.000 casos que corresponde a 13,2% do total) e o da bexiga (118.000 de casos que corresponde a 6,5% do total). Nas mulheres, o cancro da mama é a neoplasia mais diagnosticada (463.800 casos que corresponde a 28,8%), seguida pelo CCR (205.000 casos que corresponde a 12,7% do total), pulmão (119.000 casos que corresponde a 7,4% do total) e colo do útero (99.000 casos que corresponde a 6,1% do total). O número total estimado de mortes por cancro na Europa em 2012 foi de 1,75 milhões como é possível verificar na figura 2 (Ferlay et al., 2013)

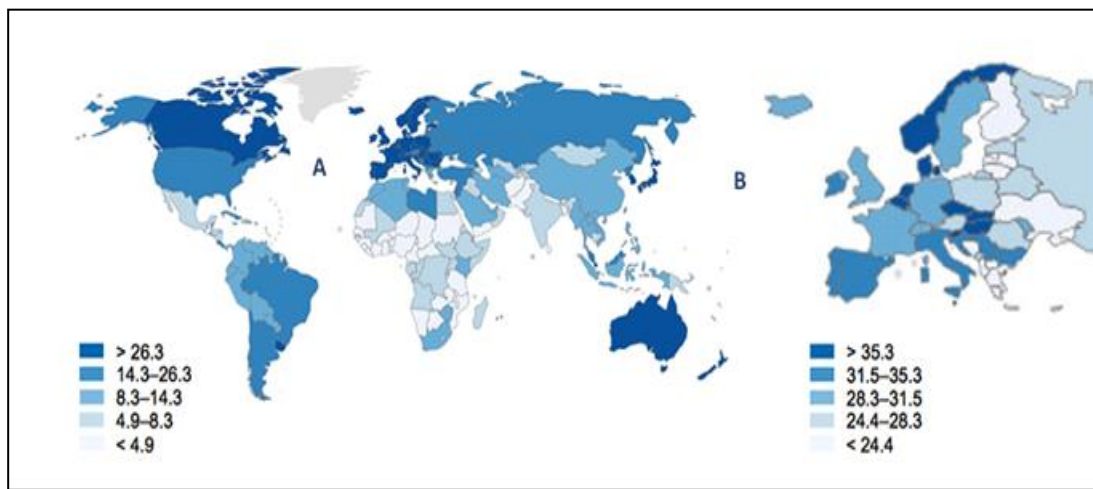


Figura 2: Incidência de CCR no mundo por cada 100.000 habitantes. A imagem da esquerda refere a incidência mundial de CCR (A) e a da direita foca-se nos países europeus(B). Imagem retirada de Ferlay et al. 2015; IARC 2016.

O CCR é o terceiro tumor mais comum em homens e o segundo em mulheres, representando 10% de todos tipos de cancro em todo o mundo. A incidência é maior nos homens numa proporção de um homem em cada quatro mulheres. Com 608.000 mortes estimadas a cada ano (8% de todas as mortes por cancro), o CCR é a quarta causa de morte mais comum relacionada com o cancro no Mundo, sendo que a sua prevalência aumenta a partir dos 70 anos, tal como se verifica na figura 3 (Labianca et al., 2013). Em Portugal, no ano de 2012 a incidência foi de 7.129 casos enquanto a mortalidade foi de 3.797 casos (Ferlay et al., 2013).

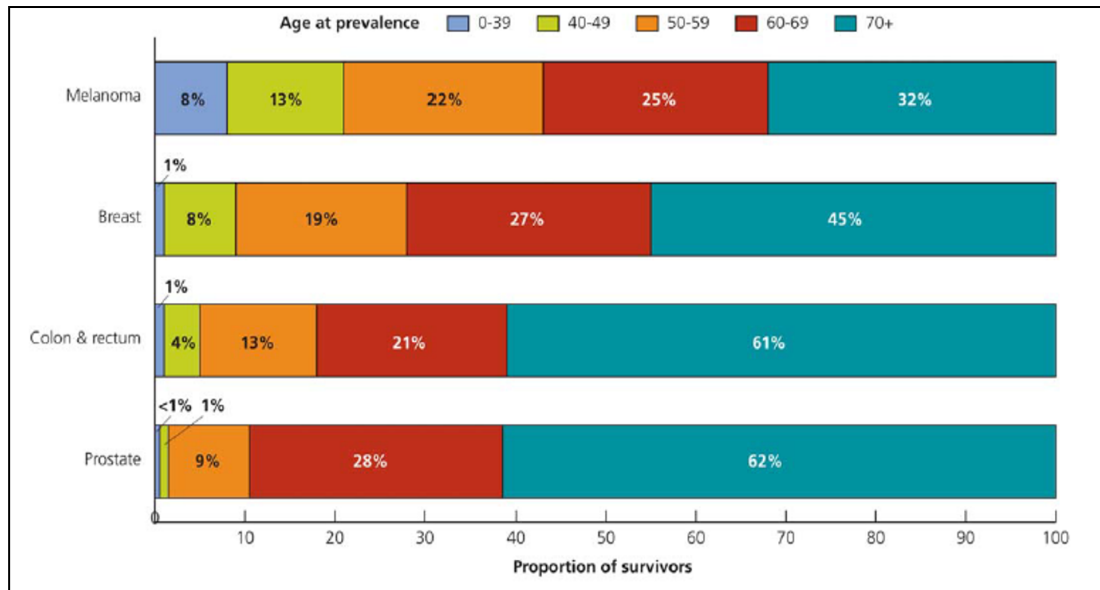


Figura 3: Distribuição de sobreviventes de cancro por idade. Imagem retirada de Miller et al. 2016.

O cólon, um longo órgão tubular, é uma das componentes fundamentais do sistema digestivo, sendo o maior e o primeiro dos segmentos do intestino grosso, localizado entre o intestino delgado e o recto. As suas funções principais são a absorção de água, de sais minerais e de nutrientes, assim como o armazenamento de todo o material residual que constitui as fezes. O cólon divide-se em quatro secções: o cólon ascendente localizado no lado direito; o cólon transverso; o cólon descendente localizado no lado esquerdo e o cólon sigmoide, que é a parte do cólon que se une ao recto como podemos verificar na figura 4.

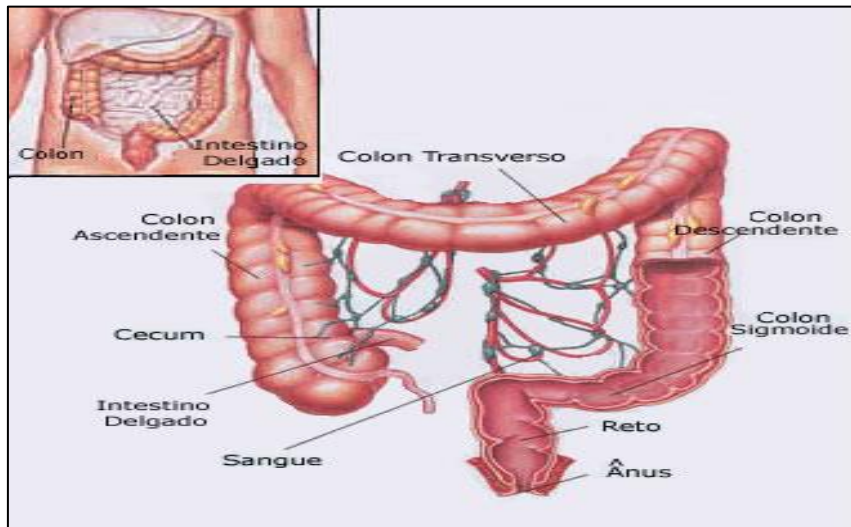


Figura 4: Representação esquemática das partes constituintes do cólon. Imagem retirada de: http://www.cidpitombo.com.br/especialidades_cólon.htm, consultada a 25 de Maio de 2017.

Os alimentos, parcialmente digeridos que constituem o quilo entram no cólon vindos do intestino delgado. No cólon, a água e alguns nutrientes são removidos e o restante irá prosseguir, como desperdício. Esse desperdício passa do cólon para o recto e, posteriormente, para fora do organismo através do ânus (Arvelo, Sojo, and Cotte, 2015).

O risco de desenvolver CCR depende de fatores que podem estar relacionados com o estilo de vida ou hábitos comportamentais, tais como o tabagismo, o consumo elevado de carne vermelha, a obesidade, a inatividade física e factores genéticos. O maior factor de risco para o aparecimento de CCR é a idade, quase 70% dos doentes com este cancro têm mais de 65 anos de idade, sendo esta doença rara antes de 40 anos (Brenner, Kloor, and Pox, 2014). Quando o CCR se dissemina, ou metastiza, para fora do cólon ou do recto, as células tumorais são, muitas vezes, encontradas nos gânglios linfáticos mais próximos. Se as células tumorais já tiverem atingido estes gânglios, é provável que se tenham disseminado, também, para outros gânglios linfáticos, ou mesmo para outros órgãos, como é exemplo o fígado ou os pulmões (Haggar, Boushey, and Ph, 2009).

Existe uma maior preponderância para o aparecimento de CCR em doentes que tenham uma história pessoal de adenoma, ou de doença intestinal inflamatória

(doença de Crohn ou colite ulcerosa). Também uma história familiar significativa de CCR ou de pólipos, de alguma síndrome hereditária como a polipose adenomatosa familiar (PAF), síndromes associados a Lynch (não-polipose hereditário), assim como a síndrome de polipose associadas ao gene *MUTYH*.

Os sintomas de CCR estão associados a tumores relativamente grandes e/ou a estádios avançados da doença (Brenner et al., 2014) e, geralmente, não são específicos para o cancro de cólon. A alteração nos hábitos intestinais, dor abdominal geral ou localizada, perda de peso sem outras causas específicas, astenia, deficiência de ferro e anemia são os sintomas e sinais mais comuns e estão de algum modo dependentes da localização e do estágio do tumor primário. Estes sintomas estão associados a pior prognóstico e seu número, mas não a sua duração, está inversamente relacionado com a sobrevivência (Smyth et al., 2016).

Existem três tipos de CCR que podem ser distinguidos pelas suas formas de origem e de expressão clínica, o tipo esporádico, o tipo familiar e o tipo hereditário. O tipo esporádico é um termo usado para diferenciar tumores que aparecem em indivíduos que não possuem nenhuma mutação que os torne susceptíveis ao desenvolvimento deste tipo de cancro, diferenciando-os assim de cancros que aparecem em pessoas que têm uma mutação associada à doença e se caracterizam por não ter qualquer tipo de relação familiar. Na grande maioria de doentes com CCR, cerca de 70%, o seu tumor é de tipo esporádico e ocorre em indivíduos com mais de 50 anos. Esta forma de CCR pode dever-se a activação de oncogenes, inactivação de genes supressores tumorais ou a uma acumulação de mutações genéticas como *K-Ras* ou *BRAF/V600E* (Raskov et al., 2014). O tipo familiar, para o qual nenhum gene associado foi identificado, constitui cerca de 25% dos casos (Abrantes, 2013). Os estudos populacionais mostram uma maior probabilidade de desenvolver este tumor quando membros da família, de consanguinidade primária, tenham sofrido de cancro do cólon esporádico sendo o risco igual a duas a três vezes maior do que na população normal. Os factores ambientais provavelmente determinam quais dos indivíduos que são geneticamente predispostos desenvolverão este tipo de cancro. O tipo hereditário, com duas variantes tumorais que podem ser distinguidas pela predisposição a estar relacionado à presença de pólipos adenomatosos, ou não, e que constituem cerca de 10% dos casos. No tipo

hereditário podemos distinguir: a PAF, em que os doentes apresentam pólipos múltiplos em que, na ausência de cirurgia preventiva, um ou mais pode-se tornar maligno por volta dos 40 anos de idade; e a variante não associada à polipose, ou cancro colo-rectal hereditário não-poliposo (HNPCC, do inglês, *hereditary non-polyposis colorectal cancer*), que é um tumor maligno com alto risco de desenvolver um cancro não-digestivo (Arvelo et al., 2015).

1.1. Tratamento no CCR

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento progressivo na sobrevivência e na diminuição da mortalidade no que diz respeito ao CCR, atribuível a grandes avanços nas técnicas cirúrgicas, no uso de quimioterapia adjuvante, nas melhores técnicas de radioterapia e nos rastreios mais alargados. Aproximadamente 50% dos doentes recentemente diagnosticados progredirão para o cancro metastático, com uma expectativa de sobrevivência média aos cinco anos de 50-60% (Miller et al., 2016; Smyth et al., 2016). Em 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS) determinou que cerca de 600.000 pessoas morreram em todo o mundo como resultado deste tipo de cancro. Geralmente o diagnóstico de CCR ocorre tarde, com a presença de metástases, um dos principais obstáculos para se conseguir um tratamento mais eficaz (Siegel et al., 2014). O CCR é classificado de acordo com a profundidade de invasão local (estádio T), comprometimento dos nódulos linfáticos (estádio N) e presença de metástases à distância (estádio M) (Lbianca et al., 2013) presente no anexo 1. O estágio do tumor divide-se segundo a classificação AJCC nas categorias I, II (A, B, C), III (A, B, C) e IV (A, B, C) presente no anexo 2. Estas categorias relacionam de uma forma mais geral que a classificação TMN o estado de desenvolvimento do cancro. O estágio 0 corresponde a uma fase muito inicial em que o cancro é localizado e isolado, nos estádios I, II, IIIA o cancro está já numa fase regional, onde se estende para fora do órgão de origem. Nos estádios IIIB e IIIC existe uma maior extensão da lesão e este já ultrapassou vários tecidos do corpo tendo grandes probabilidades de continuar a disseminar-se à distância e formar metástases. O Estádio IV corresponde a uma fase bastante avançada da doença onde o cancro apresenta metástases em várias localizações (Lbianca et al., 2013).

Com base nestas características, o tumor é estadiado e é feita a decisão da abordagem terapêutica, que pode incluir a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia ou ainda uma associação destes tratamentos como mostra a figura 5 (Brenner et al., 2014).

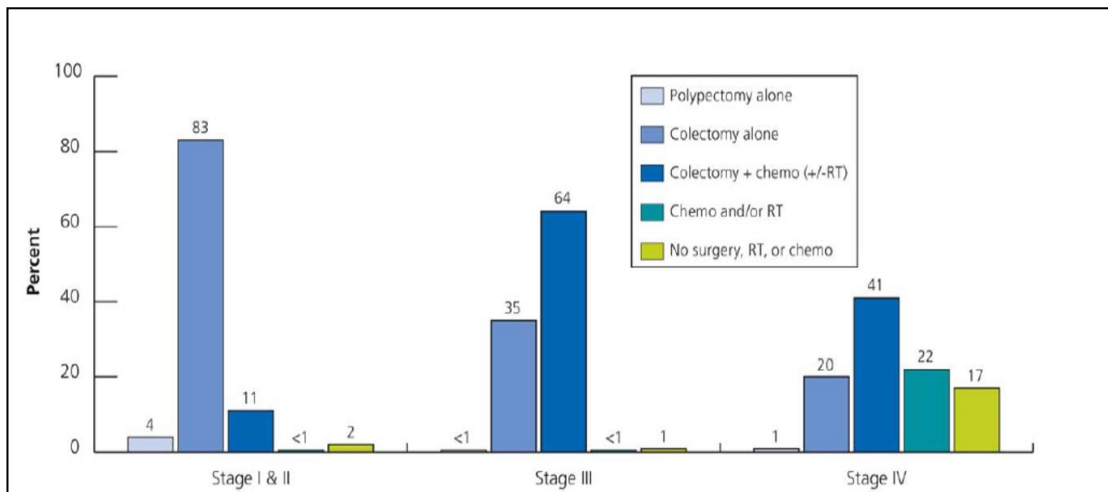


Figura 5: Tratamento em CCR por estágio de doença. Imagem retirada de Miller et al. 2016.

A cirurgia é o método mais comum para o tratamento do CCR, cujo objectivo é remover o cancro na sua totalidade. É um tipo de tratamento local na medida em que é aplicada no cólon ou no recto e na zona peri-tumoral. Um pólipo maligno de pequenas dimensões, pode ser removido do cólon ou da zona superior do recto, com um colonoscópio. Quando os pólipos são de maiores dimensões a abordagem para a sua excisão terá de ser diferente. Neste caso, o cirurgião faz uma incisão no abdómen, para remover o tumor e uma parte de tecido saudável do cólon ou do recto, para ter margens de segurança e verifica se ocorreu já extensão loco-regional. Podem também ser removidos alguns gânglios linfáticos vizinhos (Miller et al., 2016). A quimioterapia consiste na utilização de fármacos para eliminar as células tumorais, e pode ser constituída apenas por um fármaco ou por uma associação de fármacos. Os fármacos podem ser administrados oralmente, sob a forma de comprimidos, ou através de uma injeção intravenosa (IV). Em qualquer das situações, os fármacos entram na corrente sanguínea e circulam por todo o organismo, razão pela qual é chamada terapêutica

sistémica. É geralmente administrada por ciclos de tratamento, repetidos de acordo com uma regularidade específica, de situação para situação (Labianca et al., 2013).

O doente pode realizar apenas quimioterapia, quimioterapia antes ou depois da cirurgia, radioterapia ou ambas. Quando a quimioterapia é administrada antes da cirurgia, é denominada de terapêutica neoadjuvante. O objectivo é diminuir o tamanho do tumor. A quimioterapia administrada logo após a cirurgia é denominada de terapêutica adjuvante sendo o objectivo a destruição de quaisquer células tumorais remanescentes e prevenir uma recidiva do tumor. Este meio de tratamento também é usado para tratar pessoas com doença avançada e, neste caso, o intuito é apenas paliativo, ie, para controlar o tumor e oferecer mais algum tempo de vida ao doente.

As opções de quimioterapia incluem a oxaliplatina, o irinotecano e as fluoropirimidinas, como é exemplo o 5-fluorouracilo (5-FU). A primeira linha de tratamento consiste na administração intravenosa ou oral de fluoropirimidinas, usualmente em várias combinações (Smyth et al., 2016). A radioterapia é um tratamento local e, como tal, afecta apenas as células tumorais na zona tratada: utiliza radiação ionizante com objectivo de matar as células tumorais. No CCR esta técnica só se aplica em tumores do recto (Miller et al., 2016).

2. Dieta Mediterrânica

A Dieta Mediterrânica teve a sua origem nos países banhados pelo Mar Mediterrâneo ou que por ele são influenciados, nomeadamente países do sul da Europa, como Portugal, França, Itália, Espanha e Grécia. Este padrão alimentar começou a ser descrito nos anos 50 e 60 do século XX por Ancel Keys, sobretudo à luz do que se praticava em Creta, em outras regiões da Grécia e no sul de Itália (Davis et al., 2015). A palavra “dieta” deriva do termo grego “*diata*” que significa estilo de vida equilibrado. A Dieta Mediterrânica é precisamente isso, um estilo de vida marcado pela diversidade e conjugado com outras características, como representado na figura 6, tais como o consumo elevado de alimentos de origem vegetal (cereais pouco refinados, produtos hortícolas, fruta, leguminosas secas e frescas e frutos secos e

oleaginosas); o consumo de produtos frescos, pouco processados e locais, respeitando a sua sazonalidade; a utilização do azeite como principal gordura para cozinhar ou temperar alimentos; o consumo baixo a moderado de laticínios; o consumo frequente de pescado e o baixo e pouco frequente consumo de carnes vermelhas; o consumo de água como a bebida de eleição e um baixo e moderado consumo de vinho a acompanhar as refeições principais; a realização de confecções culinárias simples e com os ingredientes nas proporções certas; a prática de atividade física diária; e a realização das refeições em família ou entre amigos, promovendo a convivência entre as pessoas à mesa (Pericleous, Mandair, and Caplin, 2013) .

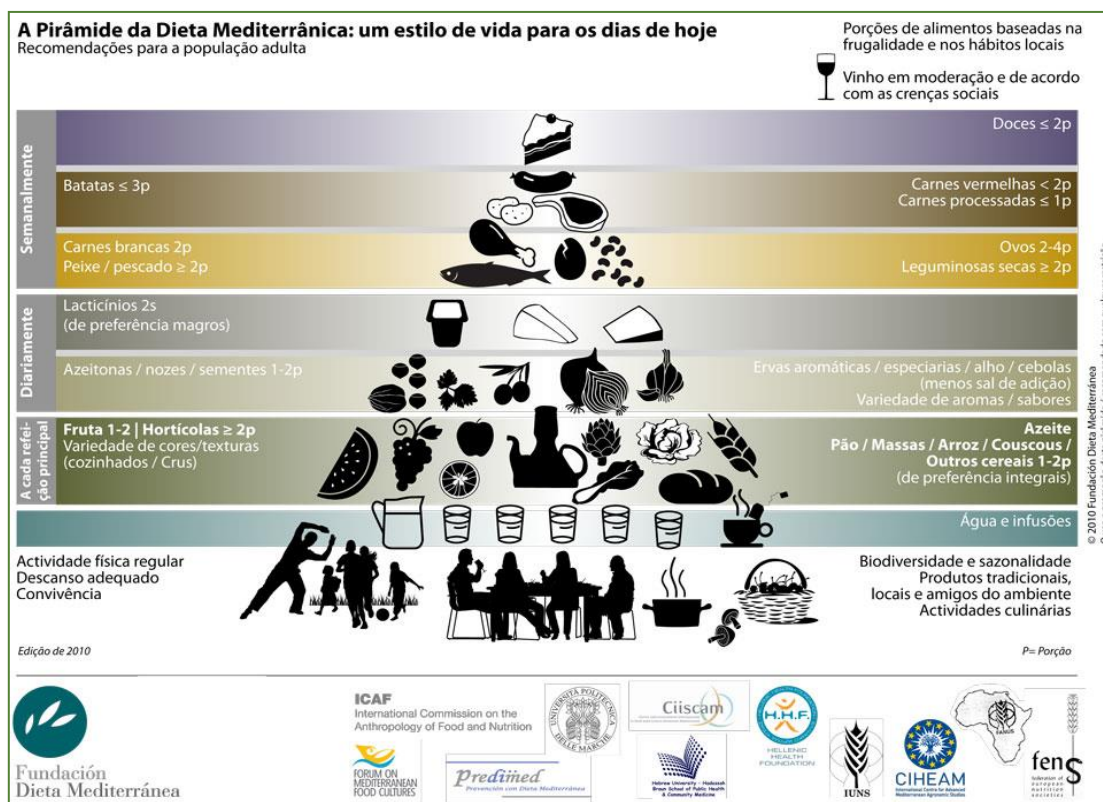


Figura 6: Pirâmide alimentar da Dieta Mediterrânica, Imagem retirada de: Fundación Dieta Mediterránea <https://dietamediterranea.com/nutricion-saludable-ejercicio-fisico/> consultado a 12 de Janeiro de 2017.

Para além da alimentação, a Dieta Mediterrânica assenta em princípios muito importantes para o bem-estar físico e psicológico, como a prática regular de actividade física moderada (pelo menos 30 minutos durante todo o dia) que fornece grandes benefícios à saúde, a regulação do gasto energético e a manutenção do peso corporal.

Caminhar, subir escadas e realizar as tarefas domésticas são um exercício simples e acessível. Sempre que possível, são recomendadas as actividades ao ar livre, para aumentar a atractividade do exercício físico e reforçar os laços com a comunidade. O descansar correctamente é também parte de um estilo de vida saudável e equilibrado. Assim como a convivência, pois além do aspecto nutricional, a comida tem uma conotação social e cultural. Cozinhar e conviver à mesa na companhia de familiares e amigos fomenta o bem-estar; a biodiversidade e sazonalidade - os alimentos sazonais, frescos e minimamente processados contêm mais nutrientes e substâncias protectoras, além de serem mais económicos. Sempre que possível, deve ser dada prioridade aos vários produtos tradicionais do mercado local; actividades culinárias, sendo que é fundamental dedicar tempo à planificação e à preparação das refeições, de modo a que se tornem actividades divertidas e relaxantes, feitas em família ou com os amigos. No que diz respeito à hidratação, um adequado estado de hidratação é essencial na manutenção do equilíbrio dos fluídos corporais. As necessidades hídricas variam de acordo com fatores como a idade, o nível de actividade física, a condição de saúde ou o clima. De um modo geral, deve garantir-se o aporte de 1,5 a 2 litros de água por dia, podendo este aporte ser alcançado através da ingestão de água, por si só, ou sob a forma de infusões de ervas, não açucaradas, ou caldos, com baixo teor de gorduras e sal (Schoenberg, 2016).

O reconhecimento da Dieta Mediterrânica em Portugal, Espanha, Marrocos, Itália, Grécia, Chipre e na Croácia, pela UNESCO como Património Cultural Imaterial da Humanidade, ocorreu em 4 de Dezembro de 2013, o que reforça, juntamente com a evidência científica já existente, que se trata de um modelo cultural, histórico e de saúde. Este padrão alimentar é visto como o mais saudável e mais sustentável no mundo sendo fundamental no campo da saúde pública e da nutrição de forma global, mas em especial na zona mediterrânica. Esta herança cultural deve ser preservada e promovida em diferentes áreas: cultura e turismo, saúde pública, agricultura, política e desenvolvimento económico (Davis et al., 2015; Sofi et al., 2013).

Estudos recentes demonstram que a má qualidade da dieta está ligada a um baixo nível de micronutrientes que é susceptível de desencadear ou agravar um diagnóstico de CCR. Certos micronutrientes têm um impacto no stresse oxidativo e na

diferenciação celular, ambos preditores de risco e da progressão da CCR. Estes estudos recentes apontam também para um microbioma do intestino humano como um potencial mediador de dieta e do desenvolvimento de CCR (Cho et al., 2016; Giacosa et al., 2013; Jacobs et al., 2016; Park et al., 2005; Potter et al., 2016).

Desta forma tornou-se imperativo o estudo de alternativas à nossa alimentação assim, estudos recentes referem a Dieta Mediterrânica como essa possibilidade. A Dieta Mediterrânica não coloca nenhuma restrição no consumo de gordura total e inclui dois ou mais dos seguintes sete componentes: a elevada proporção de gordura mono-insaturada para saturada (por exemplo a utilização do azeite como principal ingrediente culinário), a elevada ingestão de frutas e de vegetais, o elevado consumo de leguminosas, a grande ingestão de grãos e de cereais, o consumo moderado de vinho, o baixo consumo de carne e a maior ingestão de peixe. A Dieta Mediterrânica é caracterizada pela abundância de alimentos de origem vegetal, como o pão, as massas, o arroz, as hortaliças, os legumes, a fruta fresca e os frutos oleaginosos; a utilização do azeite como principal fonte de gordura; o consumo moderado de pescado, de aves, de lacticínios e de ovos; o consumo de pequenas quantidades de carnes vermelhas e a ingestão moderada de vinho, geralmente durante as refeições. A sua importância na saúde do indivíduo não se limita ao facto de se tratar de uma dieta equilibrada, variada e com nutrientes adequados (D'Alessandro, De Pergola, and Silvestris, 2016). Aos benefícios do baixo teor de ácidos gordos saturados e alto teor de mono-insaturados, tal como em glícidos complexos e em fibra alimentar, junta-se a riqueza em antioxidantes, determinantes para o bem-estar. Existem também evidências de que a alta concentração de moléculas antioxidantes e anti-inflamatórias na dieta pode ser benéfico (Bloomfield et al., 2016).

3. A dieta e o CCR

Vários aspectos da Dieta Mediterrânica têm sido associados a um risco reduzido não apenas de CCR, mas também de vários outros tipos de cancro. Foi estimado que até 25% dos casos de CCR, 15% da mama e 10% cancros de próstata, do pâncreas e do endométrio são impedidos pela mudança para a Dieta Mediterrânica. De facto, o

consumo de alimentos como frutas e vegetais leva ao aparecimento reduzido de cânceros do tracto digestivo superior e trato urinário. Para cânceros digestivos o risco diminui entre 15-40%. O papel de micronutrientes e dos antioxidantes foi também analisado, o consumo de β -caroteno, vitamina E e cálcio mostra também uma redução na incidência de CCR (Arbman et al., 1992). Outros aspectos da Dieta Mediterrânica também são suscetíveis de influenciar o risco de cancro, e entre estes, o consumo de carne vermelha é de relevância específica (La Vecchia and La Vecchia, 2004).

Está provado que a dieta desempenha um papel importante no desenvolvimento da CCR e é igualmente aceite que a transformação maligna dos cólonócitos é uma reacção a uma doença pré-existente ou a uma exposição do cólon a agentes carcinogéneos. Dietas ricas em carne, gordura e calorias representam um desafio para que os cólonócitos sobrevivam. O consumo total de energia e exposição a agentes cancerígenos, através do tabagismo e do álcool, representam os principais factores de risco. Os cólonócitos adaptam-se rapidamente às mudanças, mas neste processo acumulam alterações epigenéticas e genéticas muitas vezes resultando em instabilidade do genoma que é um pré-requisito para a formação de cancro. O conceito de que o consumo de carne aumenta o risco de CCR, é a conclusão convincente baseada em evidências de numerosos estudos (Chan et al., 2011; Hill, 1999; Larsson and Wolk, 2006; Leufkens et al., 2011). A carne vermelha aumenta o risco de CCR em cerca de 10% com cada 30 g de carne consumida por dia. A carne vermelha pode estar directamente ligada à incidência de CCR ou indirectamente porque dietas ricas em carne podem ser deficientes em outros componentes dietéticos tais como as fibras e polifenóis presentes em frutas e legumes. Ao cozinhar a carne a altas temperaturas pode-se levar à formação de substâncias mutagénicas e/ou carcinogénicas através da interacção da creatinina muscular com aminoácidos, bem como a formação de compostos N-nitrosos (Pericleous et al., 2013).

Vários estudos de caso-controle demonstraram o aumento de risco de CCR com o aumento do consumo de lípidos dietéticos, ou seja, de energia total (Baena and Salinas, 2015; O'Keefe, 2016; Ravasco et al, 2003). Foi demonstrado que diferentes tipos de gorduras podem desempenhar papéis distintos na carcinogénese colo-rectal, tais como a regulação positiva da apoptose, a inibição da interleucina 1 e da síntese de

fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a inibição de COX-2 e a modulação do ambiente redox nos colónocitos (Pericleous et al., 2013; Vargas and Thompson, 2012).

As gorduras saturadas são principalmente encontradas em produtos animais incluindo a carne vermelha e os produtos lácteos como o queijo e a manteiga. Um estudo prospectivo em mulheres confirmou que a grande ingestão de gordura animal aumenta o risco de cancro de cólon e suporta a substituição da carne vermelha como fonte de proteína pelo peixe ou frango (Park et al., 2005). Estudos epidemiológicos mostram que as populações que consumiam óleos de peixe poli-insaturados tinham taxas mais baixas de CCR. Isto levou à hipótese de que dietas ricas em ácidos gordos n-3 podem diminuir o risco de CCR (Baena and Salinas, 2015; Joseph et al., 2017; Kato et al., 2016). A ingestão elevada de gorduras animais resulta num aumento do volume de ácidos biliares no cólon. Os ácidos biliares sofrem degradação e metabolização, resultando na formação de ácidos biliares secundários, como o ácido desoxicólico e o ácido litocólico, que mostraram ser carcinogénicos em ambientes experimentais (Raskov et al., 2014).

O ácido fólico ou folato (vitamina B9) é uma vitamina solúvel em água encontrada em frutas, legumes verdes e feijões secos. Os seres humanos não são capazes de sintetizar as vitaminas, as quais têm de vir de fontes dietéticas. Foram sugeridos mecanismos para o seu papel de carcinogénese através de mecanismos moleculares de síntese, de reparação e de metilação do DNA. A observação de que a suplementação de ácido fólico está associada a uma diminuição substancial do cancro do cólon em doentes com colite ulcerosa levaram os investigadores a realçar o papel do ácido fólico na prevenção do CCR (Pericleous et al., 2013).

A vitamina D é uma das vitaminas lipossolúveis e mais de 90% é sintetizada endogenamente a partir da exposição da pele a radiação ultravioleta (UV) proveniente da luz solar. O restante vem da dieta como a vitamina D3, que se encontra naturalmente em peixe gordo de água salgada, na gema do ovo e no fígado de animais, sendo a vitamina D2 encontrada em alimentos como os cogumelos. A forma activa da vitamina D é a 1,25-di-hidroxitamina D3 (calcitriol) que é formada por hidroxilação das pró-vitaminas no fígado e nos rins. O uso de calcitriol em estudos experimentais

demonstrou que este é importante para induzir a diferenciação e a inibição de células tumorais, impedindo a proliferação de vários tipos de células tumorais, no entanto, o seu uso é limitado devido ao desenvolvimento de hipercalcemia tóxica. O baixo consumo destes nutrientes está relacionado com o aparecimento de CCR (Chan and Giovannucci, 2010; Mamede et al., 2011; Van Poppel and Van Den Berg, 1997).

O mecanismo pelo qual o álcool pode estar ligado à carcinogénese é desconhecido, mas as vias propostas incluem a sua capacidade de reduzir o folato, de promover a anormal metilação do DNA, de atrasar a sua reparação, de alterar a composição dos sais biliares ou de induzir o citocromo p450 (CYP450) a activar vias que conduzem à carcinogénese. Um grande número de estudos sugeriu uma associação entre o consumo de álcool e o adenoma de cólon, bem como o risco de aparecimento de CCR (Arbman et al., 1992; Haggard et al., 2009; Pericleous et al., 2013; Tuyns, 2001).

Os polifenóis são uma classe de substâncias químicas com inúmeros benefícios, especialmente efeitos antioxidantes, inibição da proliferação celular, indução da paragem do ciclo celular, interacção com vias apoptóticas e anti-angiogénicas e anti-metastáticas. São divididos em flavonóides, os ácidos fenólicos e estilbeno. As fontes dietéticas mais importantes de polifenóis são as frutas, os legumes, as sementes e as bebidas, tais como o sumo de fruta, o chá verde, o café, as bebidas de cacau, o vinho tinto e a cerveja. A apigenina é um flavonóide encontrado na salsa e no aipo e tem sido demonstrado, em modelos animais, que inibe a carcinogénese do cólon induzindo da apoptose. A cianidina, é um flavonóide presente em morangos e nas cerejas, estudada *in vitro* e em modelos animais, e também já foi demonstrado que inibe a carcinogénese do cólon. A quercetina, presente nas cebolas, nos brócolos e nas maçãs mostrou diminuir o crescimento celular interagindo com a β -catenina (Kato et al., 2016; Paparo et al., 2014; Pericleous et al., 2013; Vargas and Thompson, 2012).

O café é uma mistura complexa de cerca de cem produtos químicos incluindo compostos antioxidantes, mutagénicos e anti-mutagénicos. Além disso, demonstrou-se que afecta a fisiologia gastrointestinal pela estimulação de uma resposta do cólon distal, reduzindo o tempo de trânsito fecal e, deste modo, a exposição do intestino a substâncias potencialmente cancerígenas (Pericleous et al., 2013).

Além do álcool e do tabagismo, outros factores do estilo de vida também têm sido associados ao risco de desenvolver CCR. Níveis mais elevados de actividade física reduzem o risco em até 40% (Schoenberg, 2016).

O consumo de fibras alimentares traz benefícios para a saúde das células do cólon, os colónocitos. As fibras são hidratos de carbono, geralmente de origem vegetal que não são digeridos pelo homem, visto que as enzimas humanas não os conseguem hidrolisar. Estas fibras podem dividir-se em duas categorias: as solúveis e as insolúveis. As fibras solúveis dissolvem-se em água e são fermentadas, geralmente no cólon, originando gases ou bioprodutos fisiologicamente activos. As fibras insolúveis não se misturam em água retendo substâncias tóxicas ingeridas e produzidas ao longo do trânsito intestinal. As fibras tornam o movimento dos alimentos pelo organismo mais lento aumentando o volume fecal e estimulando a motilidade intestinal pela distensão do cólon e ajudam a reduzir os níveis de colesterol no sangue, o que leva a um menor risco de doenças cardiovasculares, de diabetes, de hipertensão arterial e de obesidade (Saura-Calixto, 2011; Taberner et al., 2011). Ainda associados aos dois tipos de fibra dietética, existem benefícios como o aumento do volume dos alimentos sem aumentar o conteúdo calórico, o equilíbrio do pH intestinal e a produção de ácidos gordos de cadeia curta (SCFA, do inglês *short-chain fatty acid*) por fermentação das fibras no cólon. Os SCFA têm sido associados a uma redução do risco de algumas doenças como a inflamação do intestino, as doenças cardiovasculares e o cancro, nomeadamente o CCR (Hijova and Chmelarova, 2007), como se pode ver na figura 7.

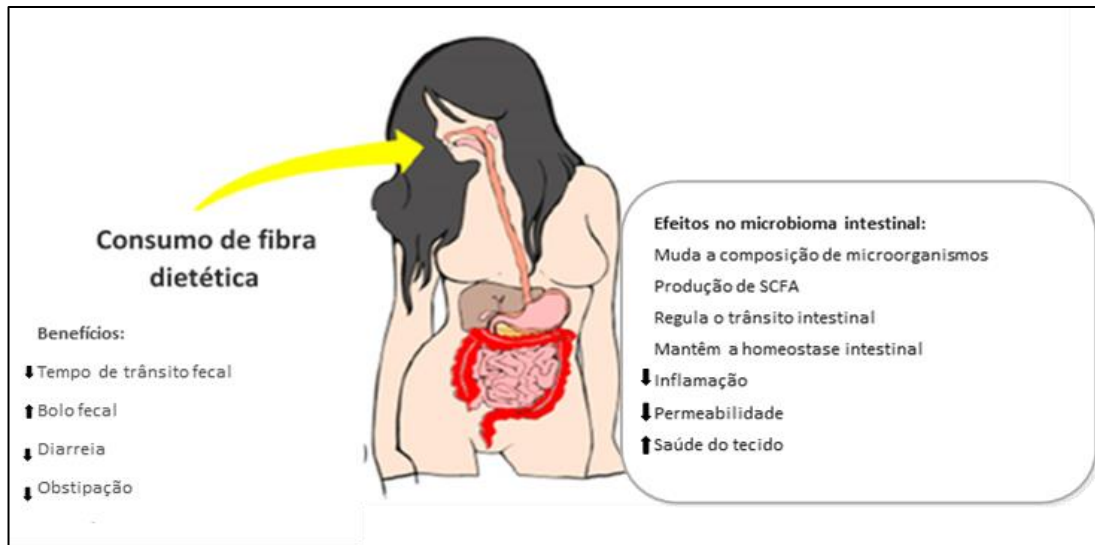


Figura 7: Efeitos da dieta no CCR. Imagem adaptada de Wong, Harris, and Ferguson 2016.

Os SCFA são ácidos gordos de cadeia curta cuja cauda alifática é constituída por um esqueleto de 2 a 6 carbonos e são produzidos pela fermentação de fibra dietética pelas bactérias do cólon (Floch and Hong-Curtiss, 2001). Os principais SCFA são o butirato, o propionato e o acetato. O processo de fermentação dos hidratos de carbono, das proteínas e dos probióticos que provêm da dieta ocorre nas bactérias anaeróbicas do cólon, envolve uma série de reacções metabólicas. A maioria das bactérias usa a via glicolítica para a fermentação, mas, dependendo dos hidratos de carbono, também podem haver bactérias a usar a via das pentoses. Um dos produtos que se forma, como resultado destas vias, é o piruvato que, dependendo da bactéria, irá formar produtos dos quais se destacam o acetato, o propionato e o butirato (Hijova and Chmelarova 2007; Macfarlane and Gibson 1997). A fermentação ocorre preferencialmente no cólon proximal, sendo os SCFA transportados para o cólon distal pelo trânsito intestinal. A concentração de SCFA ao longo do intestino diminui com a proximidade à zona terminal do cólon, sucedendo o mesmo com a sua absorção. Depois de produzidos, cerca de 95% dos SCFA, são absorvidos pelas células do cólon sendo os restantes excretados nas fezes (Macfarlane and Gibson, 1997; Sandra Macfarlane and Macfarlane, 2003). A população bacteriana do intestino humano é única para cada indivíduo e tende a ser estável ao longo do tempo (Cook and Sellin, 1998; Taberero et al., 2011).

4. CCR e fibra dietética

A fibra dietética foi sugerida como hipótese, tal como referido anteriormente, para reduzir e prevenir o risco e o aparecimento de CCR. Dos benefícios dos SCFA destacam-se o efeito protetor, onde se incluem a diluição de componentes carcinogénicos presentes nas fezes, a redução do tempo de trânsito fecal, a produção de ácidos gordos de cadeia curta que promovem a acção anticancerígena e a ligação de ácidos biliares carcinogénicos como é mostrado na figura 8. No entanto, os estudos epidemiológicos têm sido inconsistentes. Estudos de casos-controlo encontraram uma associação inversa entre a ingestão de fibra alimentar e o risco de CCR (Godos et al., 2016; Park et al., 2005; Wong et al., 2016). Por outro lado, a maioria dos estudos prospectivos não encontrou associação entre a ingestão de fibra alimentar e o risco de CCR ou como aparecimento de adenomas (precursores de CCR) e os ensaios clínicos de suplementação com fibra dietética não mostraram reduções na recidiva dos adenomas colo-rectais (Park et al., 2005). Recentemente, o estudo EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*) focado nos cancros da próstata, do pulmão, colo-rectal e do ovário observou um risco estatisticamente significativo de decréscimo de 25% de CCR ou de adenomas, no parâmetro mais alto de ingestão de fibra alimentar quando comparado com o mais baixo. Estes resultados discordantes mantêm o debate sobre se o consumo de fibras dietéticas diminui o risco de CCR (Park et al., 2005).

A fibra alimentar origina em SCFA, estes são ácidos gordos orgânicos com 2 a 6 átomos de carbono e são os aniões principais que resultam da fermentação bacteriana de precursores de polissacarídeos, de oligossacarídeos, de proteínas, de peptídeos e de glicoproteína no cólon. A fermentação envolve uma variedade de reacções e processos metabólicos como a decomposição anaeróbia por bactérias intestinais da matéria orgânica, onde é produzida energia para o crescimento e manutenção destes microrganismos e outros produtos metabólicos finais. Os principais produtos finais desta reacção são SCFA's juntamente com gases (CO_2 , CH_4 e H_2) e com o calor (Macfarlane and Macfarlane, 2011; Taberero et al., 2011).

A produção de SCFA's é determinada por uma série de factores, incluindo os números e os tipos de microrganismos que constituem a microflora presente no cólon, fonte de substrato e tempo de trânsito intestinal. A microflora que está presente no

cólon humano é constituída por cerca de 1000 bactérias sendo que mais de 400 espécies já foram identificadas em fezes humanas. O número de bactérias, a fermentação e a proliferação são maiores no cólon proximal, onde a disponibilidade do substrato é maior e onde ocorre a fermentação, enquanto que o cólon distal é responsável pela absorção de hidratos de carbono. A estimativa da concentração total de SCFA no cólon proximal pode variar de 70 a 140 mM enquanto no cólon distal pode variar de 20 a 70 mM. Em relação ao pH, este é mais baixo no cólon proximal e aumenta distalmente. Espécies como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* têm sido associadas com uma melhoria do estado de saúde, o produto da sua fermentação são os SCFA como acetato, propionato, valerato e butirato (Brown et al., 2016; Hester et al., 2015). A produção de SCFA's também é determinada pela fonte do substrato onde a ingestão dietética é a variável mais importante. Os componentes alimentares não digeríveis são uma fonte de substrato para a fermentação anaeróbia da microflora do cólon, porque são resistentes à hidrólise e à digestão no estômago e no intestino delgado e entram no cólon para a fermentação. Os hidratos de carbono desempenham quantitativamente o papel mais importante na formação de SCFA. No trânsito pelo cólon, os substratos disponíveis para a fermentação estão esgotados, como refletido no declínio da produção de SCFA e em uma série de outros efeitos fisiológicos. Além disso, a disponibilidade do substrato durante o trânsito intestinal também pode alterar as populações e os números bacterianos. A dinâmica da disponibilidade de SCFA no cólon distal depende da absorção de água e da perda de material digestivo e é independente das taxas de produção. Existe uma relação entre o tempo de trânsito intestinal e a concentração de SCFA's fecais totais e de cada um, especialmente butirato. A absorção de SCFA's no cólon é um processo muito eficiente, estimando-se que apenas 5 a 10% destes ácidos gordos são excretados nas fezes. De facto, quando o tempo de trânsito intestinal é superior a 50 horas, o butirato não é detectado, provavelmente devido à absorção do cólon. De realçar que as concentrações reduzidas de SCFA parecem estar implicadas em doenças do cólon, especialmente no cancro e em distúrbios gastrointestinais, onde a patologia ocorre mais distalmente. Por conseguinte, a produção aumentada de SCFA e uma maior distribuição de SCFA distalmente, especialmente de butirato, podem ter um papel na prevenção destas doenças (Wong et al., 2006).

O papel dos SCFA's relaciona-se com o transporte de nutrientes para o epitélio colónico, como moduladores do pH colónico e intracelular, volume celular e outras funções associadas ao transporte de iões e como reguladores de proliferação, de diferenciação e de expressão génica. O aumento de SCFA's resulta na diminuição do pH, o que influencia indiretamente a composição da microflora (por exemplo, reduz a presença de *Clostridium*, potencialmente patogénico, que é eliminado quando o pH é mais ácido), diminui a solubilidade dos ácidos biliares, aumenta a absorção de minerais (indiretamente) e reduz a absorção de amónia pela dissociação protónica de amónia e outras aminas como se verifica na figura 8.

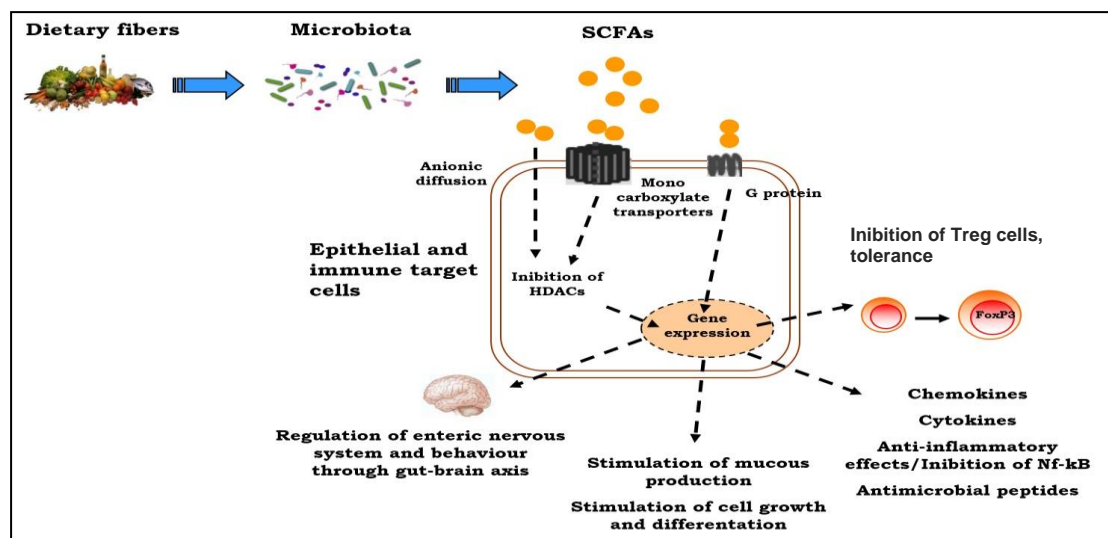


Figura 8: A relação entre a dieta e os SCFA fibra dietética é fermentada pelas bactérias do cólon, dando origem a SCFA. Imagem retirada de Paparo et al. 2014.

4.1. Acetato

O acetato é o SCFA que é formado em maior quantidade no cólon, sendo prontamente absorvido e transportado para o fígado e, portanto, é menos metabolizado no cólon. A presença de acetil-coA sintetase no citosol das células das glândulas adiposas e mamárias permite a utilização de acetato para a lipogénese. O acetato é também o principal substrato para a síntese de colesterol. Os indivíduos que receberam infusões rectais de acetato e de propionato apresentaram um aumento no

soro sanguíneo do colesterol total e de triglicéridos (Miller and Wolin, 1996; Rae et al., 2012), proporcionando evidência de que o acetato é utilizado para a síntese lipídica.

Não há registos na literatura da sua correlação com CCR, contudo neste trabalho optamos por averiguar eventuais correlações entre os seus níveis e a incidência da situação neoplásica.

4.2. Propionato

O propionato é produzido através de duas principais vias: pela via do succinato por descarboxilação (a "via do ácido dicarboxílico"); e a partir de lactato e de acrilato (a "via de acrilato"). O propionato é um substrato para a gliconeogénese hepática e foi relatado como inibidor da síntese de colesterol. No entanto, o propionato parece ter dois efeitos opostos sobre a gliconeogénese. Isto é, tanto pode funcionar como um substrato para a gliconeogénese como um inibidor da gliconeogénese. O propionato entra no ciclo de Krebs a nível do succinil-CoA. O efeito inibidor do propionato sobre a gliconeogénese pode estar relacionada com a acção inibitória específica dos seus produtos, metimalonil-coA e a succinil-CoA, sobre a enzima piruvato carboxilase. O propionato é melhor absorvido que o acetato no cólon humano. Estudos na mucosa de ruminantes mostram que o propionato é activado para seu derivado de coenzima A (um passo necessário para sua oxidação) com uma maior concentração que o acetato. (Cook and Sellin, 1998; S Macfarlane and Macfarlane, 2003; Topping and Clifton, 2001). O fígado extrai 90% de propionato, em comparação com 75% de acetato, durante uma única passagem e as infusões de soluções com quantidades iguais de acetato e propionato sugerem que a concentração de propionato no sangue periférico é de apenas 25% da quantidade de acetato. Não há registos na literatura da sua correlação com CCR.

4.3. Butirato

O butirato é o combustível preferido das células do cólon, mas também desempenha um papel importante na regulação da proliferação e da diferenciação celular. É o SCFA mais importante no metabolismo de colónocitos, os quais

metabolizam 70% a 90% do butirato. A oxidação de butirato mostrou constituir mais de 70% do oxigénio consumido pelo tecido cólico no Homem. O butirato de sódio exerce uma atividade anti-proliferativa em muitos tipos de células e existem provas provenientes de estudos com linhas celulares e com modelos animais que demonstram efeitos preventivos do butirato no cancro do cólon e no desenvolvimento de adenomas (Canani et al., 2011; Vital et al., 2013). O butirato também estimula a imunogenicidade das células tumorais. Actualmente, os mecanismos de acção do butirato em relação ao cancro de cólon não estão claramente definidos. O butirato induz o aumento da expressão da P21 que, por sua vez, leva ao bloqueio do ciclo celular na fase G1, resultando na inibição da proliferação celular. Esse bloqueio do ciclo celular na fase G1 pode permitir a instabilidade genómica ou a mutação do DNA mediado por pontos de verificação. Através da inibição da desacetilase das histonas (HDAC), o butirato tem demonstrado induzir a apoptose através da hiperacetilação das histonas (H3 e H4), resultando numa molécula de DNA mais relaxada. A forma aberta da cadeia de DNA seria ideal se houvesse dano na molécula de DNA e as enzimas de reparação fossem necessárias para reparar o erro no DNA. No entanto, a forma aberta do DNA pode ser mais susceptível à mutação na presença de um carcinogénico. O butirato, por inibir a desacetilase das histonas, pode também ter um papel na reversão de eventos epigenéticos. *In vitro*, o butirato pode também induzir a diferenciação de colónócitos neoplásicos produzindo um fenótipo tipicamente associado com células maduras (Brown et al., 2016; Hamer et al., 2008).

A diminuição do pH colónico é causada pela acumulação de SCFA's que diminuem a solubilidade dos ácidos biliares livres, podendo diminuir a atividade potencial do promotor tumoral dos ácidos biliares secundários (Canani, Costanzo, and Leone, 2012; Sengupta, Muir, and Gibson, 2006). Além disso, o aumento da acidificação causada pelos SCFA's (pH abaixo de 6 a 6,5) pode inibir a enzima bacteriana 7α -desidroxilase, que degrada os ácidos biliares primários em ácidos biliares secundários. Além disso, a diminuição do pH do cólon aumenta a disponibilidade de cálcio para ligação a ácidos biliares livres e ácidos gordos (Hamer et al., 2008; Topping and Clifton, 2001).

As vias metabólicas que originam estes três SCFA, o acetato, o propionato e o butirato estão representadas na figura 9.

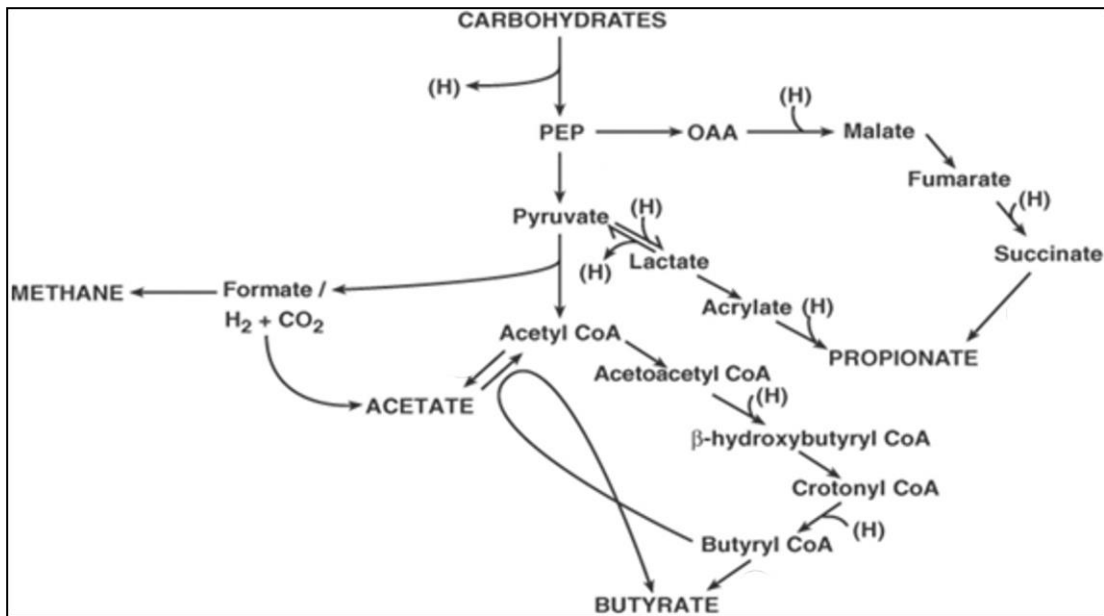


Figura 9: Representação sistemática das vias de formação de SCFA's: butirato, propionato e acetato no cólon. Imagem retirada de Pryde et al. 2002.

5. Objetivos do trabalho

A relevância do presente trabalho apoia-se em estudos que reforçam o facto de uma dieta rica em fibras se relacionar com um menor risco de desenvolvimento de diversas doenças gastrointestinais, nomeadamente o cancro colo-rectal. Assim, com este trabalho pretendemos compreender melhor a influência da dieta e dos ácidos gordos de cadeia curta na regulação e na incidência de CCR, recorrendo a um estudo translacional utilizando amostras de fezes de doentes com CCR e indivíduos saudáveis com ausência de doença comprovada. Para além disso, esta proposta visa correlacionar as informações nutricionais de cada indivíduo, obtidas através de um inquérito de frequência alimentar, com a análise metabólica de amostras fecais.

em termos de concentrações de ácidos gordos de cadeia curta utilizando espectroscopia por ressonância magnética nuclear.

6. Materiais e Métodos

Como referido anteriormente, o objectivo deste trabalho consistiu em avaliar a influência da dieta no aparecimento de CCR. Para isto foram realizadas diferentes tarefas de forma a cumprir este objectivo.

6.1. População do Estudo

A amostra para a realização deste projecto é constituída por indivíduos com diagnóstico de CCR provenientes do Serviço de cirurgia do Instituto português de Oncologia de Coimbra (IPO-Coimbra) e do serviço de cirurgia A do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) e indivíduos sem diagnóstico da patologia, indivíduos controlo provenientes da Unidade Endocentro sediada na Unidade de Saúde Hospitalar Idealmed de Coimbra (Endocentro-Idealmed).

Todos os indivíduos aceitaram participar no estudo tendo procedido à assinatura de um Consentimento Informado. Este estudo foi analisado e recebeu parecer favorável por escrito da *Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra* (anexo 3), *do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra* (anexo 4), *do Instituto Português de Oncologia de Coimbra* (anexo 5) e *da Unidade de saúde Hospitalar Idealmed de Coimbra* (anexo 6). Para o presente estudo foram definidos critérios de inclusão e exclusão. No que diz respeito aos critérios de inclusão são considerados indivíduos com mais de 18 anos de idade; indivíduos que aceitem ser submetidos a procedimentos endoscópicos, como definido pelo protocolo de estudo e indivíduos que assinem *Consentimento Informado* escrito (anexo 7). Foram excluídos os doentes que apresentem um dos seguintes critérios de exclusão: o facto de se demonstrarem incapazes ou não dispostos a dar o seu consentimento livre e esclarecido; indivíduos com menos de 18 anos de idade e mulheres grávidas ou em período de amamentação.

No que diz respeito ao exame endoscópico foram incluídos no estudo todos os indivíduos que apresentem colonoscopias totais (progressão até ao cego) com preparação intestinal descrita como razoável, boa ou excelente. Doentes que apresentem colonoscopias incompletas e má preparação intestinal serão excluídos do estudo.

A classificação da preparação intestinal será aferida usando a escala de Aronchick (tabela 1).

Tabela 1: Escala de preparação intestinal de Aronchick adaptado de Carvalho et al. 2012

ESCALA DE PREPARAÇÃO INTESTINAL	QUALIDADE DE PREPARAÇÃO INTESTINAL
EXCELENTE	Pequena quantidade de liquido claro ou mais de 95% da mucosa visualizada
BOA	Grande volume de liquido claro cobrindo 5 a 25% da mucosa, sendo visualizada mais de 90% da mucosa
RAZOÁVEL	Algumas fezes semissólidas passíveis de aspiração ou lavagem, sendo visualizada menos de 90% da mucosa
MÁ	Fezes semissólidas não passíveis de aspiração ou lavagem, sendo visualizada menos de 90% da mucosa
INADEQUADA	Preparação intestinal incompatível com a realização do exame. Repetir após adequada preparação

6.2. Inquérito Alimentar

Para avaliar a informação nutricional recorrente da dieta, pacientes e indivíduos saudáveis que aceitaram assinando um Consentimento Livre e Esclarecido participaram do estudo, foi realizado um questionário de frequência de alimentos em anexo 11.

A análise das práticas de alimentação de uma população representa um dos maiores desafios epidemiológicos, sendo uma das principais dificuldades estabelecer uma relação entre alimentação e a incidência de CCR devido à inexistência de vários instrumentos reprodutíveis que permitem a avaliação e medição de hábitos alimentares de um grupo de estudo. Ao contrário de outras variáveis, os hábitos alimentares são difíceis de medir devido à complexidade da alimentação. A necessidade de métodos válidos, mas ao mesmo tempo simples e não economicamente e temporariamente dispendiosa, foi cada vez mais invocada.

O questionário de frequência alimentar é o método mais aceite para medir a ingestão de alimentos em estudos de alimentos, especialmente quando se estudam doenças como CCR ou diabetes, por exemplo, onde o interesse está na dieta adoptada até ao diagnóstico da doença. Não existia um questionário deste tipo em uso em Portugal na pesquisa epidemiológica nutricional, nem houve nenhum instrumento de mensuração retrospectiva da frequência de ingestão alimentar validada para a população portuguesa, de modo que a pesquisa realizada foi baseada no trabalho de Carla Lopes, " Reprodutibilidade e validação de um questionário semi-quantitativo de frequência alimentar. ", Infarto agudo do miocárdio e alimento: um estudo de caso-controle baseado na comunidade. (PhD), 2000.

A estrutura do questionário desenvolvido pela investigadora no seu trabalho consistiu em dois componentes: uma lista de alimentos e uma secção de resposta para a frequência e quantidade com que os indivíduos ingerem esses alimentos (Lopes, 2000). A escolha da lista de alimentos a ser incluída no questionário resultou de observações feitas em estudos preliminares de hábitos portugueses, levando em conta a contribuição dos alimentos ingeridos, particularmente energia total, proteína, gordura total, carboidratos, colesterol, fibra dietética, Vitaminas A, C e E, carotenoides, cálcio, etanol e cafeína.

O questionário foi estruturado para avaliar a ingestão de 82 alimentos ou grupos de alimentos em uma secção fechada com dez categorias de frequência, que vão de "nunca menos de uma vez por mês" a "seis ou mais vezes por dia" e porções médias padrão alimentos hábitos e comportamentos, como o número de refeições diárias, a

frequência de uso de diferentes tipos de culinária, o uso de diferentes tipos de gordura dietética e o consumo de bebidas alcoólicas. Os grupos de alimentos foram obtidos pela montagem dos alimentos de acordo com as semelhanças da composição nutricional, e as categorias de alimentos são divididas em produtos lácteos; ovos, carnes e peixes; óleo e gordura; pão, cereais e outros; doces e pastelaria; legumes; frutas; bebidas e alimentos diversos e outros (Lopes, 2000). A escolha das porções médias baseou-se em pesquisas e estudos anteriores que utilizaram questionários precisos, embora tenham sido aplicados a outras populações e foram adaptados ao consumo esperado para a população portuguesa (Lopes et al., 2007).

Os inquéritos foram realizados em doentes do IPO-Coimbra e CHUC e indivíduos controlo provenientes da Endocentro-Idealmed. Um exemplo do inquérito realizado consta do anexo 11 deste trabalho.

Os resultados destes inquéritos foram processados e avaliados pela Unidade de Epidemiologia Nutricional Serviço de Higiene e Epidemiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Foi recolhida informação de parâmetros como as calorias ingeridas, a gordura total, a gordura insaturada, a gordura saturada, o colesterol, os açúcares, os micronutrientes entre eles, minerais e vitaminas. Os macronutrientes entre eles: hidratos de carbono, ácidos gordos e gorduras encontram-se listados em anexo (anexo 10), porém na análise alimentar feita neste estudo avaliou-se a adesão à Dieta Mediterrânica através do consumo de batatas, leguminosas, vegetais, cereais, frutas, peixes, carnes, aves, lacticínios, azeite e consumo de bebidas alcoólicas.

6.3. Recolha das amostras biológicas

A colheita das amostras biológicas (fezes) aos indivíduos foi realizada anteriormente à data da colonoscopia ou nos dias seguintes à mesma após regularização do trânsito intestinal. Todas as amostras com aspecto de fezes líquidas foram descartadas considerando que as substâncias ingeridas para preparação intestinal para realização da colonoscopia influenciaram a análise de metabolitos. No seguimento dos cuidados de saúde prestados pelo médico assistente, com o pedido de colonoscopia, amostras de fezes foram recolhidas para o efeito, não sendo realizada especialmente com o

propósito deste trabalho. As amostras foram recolhidas para tubos de recolha existentes para o efeito. O protocolo de preparação das amostras biológicas para avaliação por espectroscopia de ressonância magnética foi otimizado após recolha de dados de diversas teses e artigos (Abrantes et al., 2014; Brown et al., 2016; Canani et al., 2011; Lin et al., 2016) (Anexo 9). A escolha do protocolo teve em conta a semelhança da obtenção dos metabolitos de interesse (acetato, propionato e butirato).

As amostras de fezes foram recolhidas e acondicionadas a -80°C . De seguida foi transferida 1g de amostra para tubo *ependorf* de 2ml. Para a preparação das amostras para análise adicionaram-se 90mg das amostras de fezes a 350 μL de uma solução de fumarato de sódio na concentração de 2 mM em D_2O (99,9%), usada como padrão interno para efeitos quantitativos. A solução foi centrifugada durante 5 minutos e usado o sobrenadante.

6.4. Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear é uma técnica muito utilizada para efectuar estudos metabólicos tanto *in vivo* como *in vitro* (figura 10). Esta técnica apresenta um carácter não destrutivo e permite-nos estudar vias metabólicas específicas e é ainda robusta e reprodutível (Carvalho et al., 2004; Jones et al., 1997).

A metabolómica oferece algumas vantagens em relação a outras tecnologias “ómicas” como, a genómica, a transcriptómica e a proteómica. Esta tecnologia é bastante robusta e permite medir o fenótipo metabólico, oferecendo um perfil mais integrado no estado biológico (Griffin and Shockcor, 2004).

A espectroscopia por ^1H RMN de alta resolução, em teoria, pode detectar qualquer molécula orgânica, devido a esta possuir protões (núcleos de hidrogénio). A posição espectral ocupada por cada um desses núcleos está intimamente associada ao ambiente electrónico que rodeia o mesmo e, portanto, torna-se possível a distinção de múltiplos grupos químicos quer intra- quer intermoleculares e assim identificar e quantificar a imensa variedade de metabolitos presentes em extratos ou fluidos biológicos. Um espectro RMN proporciona assim uma impressão digital química “*chemical fingerprint*” da amostra biológica (Griffin and Shockcor, 2004). Alterações que

ocorrem nos perfis metabólicos são uma potencial fonte de biomarcadores fisiológicos.



Figura 10: Varian 600 instalado no Departamento de Química da UC pertencente à plataforma RMN.

As amostras de fezes recolhidas foram analisadas a 14.1 Tesla por ^1H -RMN com uma sonda de banda larga de 3 mm. Cada espectro de ^1H -RMN recolhido consiste em 33 k pontos a definir uma largura espectral de 7200 Hz. Para a obtenção de uma razão sinal/ruído adequada para análise quantitativa foram adquiridos um total de 32 transientes (scans), com um pulso de radiofrequências equivalente a 45° e um tempo total de repetição interpulsos de 10 segundos, para possibilitar a completa relaxação nuclear dos prótons de todos os metabolitos presentes.

Posteriormente à aquisição, para analisar os espectros obtidos recorreu-se ao software NUTSpro™ (Acorn NMR Inc., Livermore, CA). Este software possibilita a desconvolução das ressonâncias constantes em cada espectro/multiplete e a subsequente interpretação metabólica. Antes da transformação de Fourier cada espectro foi multiplicado por uma função lorentzinana de 0.2 Hz para melhoria da razão sinal/ruído. Nos espectros obtidos, os metabolitos de interesse foram o acetato

(singuleto a 1,9 ppm), o propionato (triplete a 1,035 ppm e quarteto a 2.163 ppm e o butirato (um triplete a 0.875 ppm, um sexteto a 1.539 ppm e um triplete a 2.139 ppm). Para efeitos quantitativos utilizou-se apenas uma ressonância bem isolada de cada um destes metabolitos, sendo que para o propionato se optou pelo triplete a 1.035 ppm e para o butirato o triplete a 0.875, respeitantes aos grupos metilo.

6.5. Análise estatística

O tratamento estatístico foi efectuado recorrendo ao software *IBM SPSS Statistics*, adequando o tipo de análise aos resultados obtidos e objectivos pretendidos em cada tarefa.

A análise estatística dos estudos de internalização foi realizada com recurso ao software IBM® SPSS® versão 24.0 (IBM Corporation, ARMONK, Nova Iorque, EUA). Para a análise da normalidade de distribuição de variáveis quantitativas foi utilizado o teste Shapiro-Wilk e para a análise da homogeneidade de variâncias o teste de Levene. No caso de variáveis com distribuição normal foram usados testes paramétricos, e em caso contrário, testes não paramétricos. A comparação entre grupos com distribuição normal foi feita com recurso ao teste Kruskal-Wallis. Verificada a existência de significância estatística, foi feita a comparação de médias usando o teste ANOVA (do inglês, Analysis of variance) de um factor. As comparações múltiplas foram feitas usando o teste de Games-Howell (no caso de variâncias não presumidas) ou usando a correção de Bonferroni (caso contrário). Uma significância de 0,05 foi considerada para todas as comparações. A adesão à Dieta Mediterrânica foi medida adaptando as escalas *Mediterranean diet score* (Trichopoulou et al., 2014) e rMED (Buckland et al., 2009), numa escala de 0 a 18 que compara o consumo de oito grupos de alimentos: vegetais, leguminosas, frutas e nozes, cereais, peixe, azeite, carne de porco e vaca, produtos lácteos e álcool. O consumo de cada grupo de alimentos foi medido em gramas/dia e dividido em tercís de consumo diário. Para os seis primeiros grupos de alimentos, correspondentes a itens benéficos e incluídos na Dieta Mediterrânica, zero, um ou dois pontos foram atribuídos quando o consumo diário se enquadrava no primeiro, segundo ou terceiro tercís de ingestão, respectivamente. Para a carne de porco e vaca e produtos lácteos, itens considerados prejudiciais e não enquadrados na

Dieta Mediterrânea, a estratégia de pontuação foi a inversa. Quanto à ingestão de álcool, para as mulheres que consumiram 5 a 25 g de álcool e homens que consumiram 10 a 50 g de álcool por dia, foram administrados mais dois pontos, e zero pontos em caso contrário. O total de pontos dados corresponde ao resultado final do MeDi-score.

A análise multivariada foi aplicada aos espectros de ^1H RMN provenientes das amostras de fezes nas áreas 0,5-2,5 ppm usando todos os valores de intensidade nas regiões escolhidas para construir a matriz de dados. Após o alinhamento recursivo do pico do segmento (Veselkov et al., 2009) para minimizar as variações de mudança química, os espectros foram normalizados usando a normalização do quociente probabilístico (PQN) (Dieterle et al., 2006). O SIMCA-P11.5 (Umetrics, Suécia) foi utilizado para realizar análises estatísticas multivariadas nos espectros escalonados de variância unitária. A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para identificar tendências e valores atípicos, seguindo-se a análise parcial de discriminação parcial (PLS-DA) para maximizar a discriminação de classe. Foi aplicada uma validação cruzada interna padrão de 7 vezes para avaliar a variação observada (R^2) e a capacidade preditiva (Q^2) dos modelos PLS-DA. As cargas correspondentes foram obtidas a partir de modelos PLS-DA multiplicando cada peso variável (w) por seu desvio padrão e foram codificados por cor de acordo com cada importância variável para a projeção (VIP).

Para uma análise quantitativa direta das variações nos principais metabolitos / biomarcadores, os espectros de ^1H -RMN foram adquiridos em condições de relaxamento total de todos os núcleos na amostra.

Foram observados metabolitos presentes nas amostras fecais de 75 indivíduos, 13 controles e 62 pacientes com CCR em diversos estádios de doença e com tumores em várias localizações, tendo sido excluídos grupos de com localizações de tumores com menos de 2 amostras. Os espectros ^1H -RMN obtidos foram subsequentemente processados e os sinais respeitantes aos metabolitos acetato, propionato e butirato, resultantes do metabolismo da microbiota intestinal foram integrados usando o software Amix (Bruker BioSpin). As áreas de sinal foram normalizadas pela área total integrada, e a ANOVA unidirecional seguida de correcção de comparação múltipla (Tukey) foi utilizada para analisar as áreas relativas. Os espectros também foram

sujeitos a análise multivariada que leva em consideração todas as características espectrais (todos os metabolitos presentes na área de interesse). A análise de PCA e PLS-DA foram aplicadas em espectros normalizados e autônomos PQN.

Foi tido como objetivo identificar alterações nos perfis de metabolitos de fezes de controlos saudáveis e pacientes com CCR, procurando biomarcadores diagnósticos chave usando a análise metabólica não segmentada de espectros ^1H -RMN. Esta abordagem foi seguida pela determinação quantitativa dos níveis de SCFA's e outros metabolitos de interesse identificados pela análise não segmentada. Além de comparar o grupo de controle e CCR, os perfis metabólicos fecais também foram comparados nos grupos CCR, levando em consideração vários parâmetros, como a localização do tumor e o estadio da doença, dentre outros. Espectros de RMN 2D selecionados (TOSCY, HSQC, J-resolved) foram adquiridos para amostras específicas no sentido de auxiliar na identificação de metabolitos. Para a atribuição de metabolitos, os dados experimentais foram comparados com os espectros de referência disponíveis em bancos de dados públicos (banco de dados de metabolismo humano HMDB, BMRB-Biological Magnetic Resonance Data Bank). Os espectros foram processados manualmente através do software TopSpin (Bruker). A matriz de dados foi obtida por "bucketing" espectral (Amix, Bruker) e realizado o subsequente alinhamento e normalização (Matlab). A análise multivariada foi aplicada à matriz de dados, por abordagem não supervisionada, Análise de Componentes Principais, visando examinar a estrutura global de dados (tendências e outliers), seguida de métodos supervisionados, como Análise Discriminante de Menores Quadrados Parciais para identificar variáveis (metabolitos) responsáveis pela discriminação grupal (SIMCA, projeto open source R).

As alterações metabólicas observadas foram correlacionadas com as vias metabólicas específicas com a ajuda de bancos de dados, como a Enciclopédia de Quioto de Genes e Genomas (KEGG) e usando o Metabolite Set Enrichment Analysis fornecido pelo MetaboAnalyst. Finalmente, os dados metabólicos foram correlacionados com os resultados de outras tarefas, fornecendo informações integradas sobre os processos celulares subjacentes ao CCR que potencialmente

poderiam levar à definição de biomarcadores mais informativos. (Carrola et al., 2016; Teodoro et al., 2016).

7. Resultados e discussão

O objetivo principal deste trabalho consistiu em relacionar a influência da Dieta Mediterrânica no aparecimento de CCR recorrendo, para isso, à execução de um inquérito alimentar e à recolha de amostras de fezes que foram posteriormente analisadas por espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear com recurso às metodologias descritas no capítulo anterior “Materiais e Métodos”.

7.1. Caracterização das informações recolhidas

Este trabalho contou com a participação de 96 indivíduos divididos em dois grupos principais, o grupo com CCR e o grupo controlo, ou seja, com ausência da patologia. A estes indivíduos foi realizado um inquérito alimentar e feita a recolha de amostras fecais as quais foram sujeitas a análise por RMN. Durante o estudo foram recolhidas um total de 161 amostras biológicas e os respectivos inquéritos alimentares, porém as amostras fecais ou os dados dos inquéritos não puderam ser considerados. Ao longo deste trabalho alguns doentes não realizaram a cirurgia e, apesar da recolha das amostras fecais já ter sido realizada, não foi feito o inquérito alimentar, tendo por isso essas amostras sido descartadas.

Quanto à localização geográfica da amostra total, 38 participantes pertenciam ao distrito de Coimbra, 27 ao distrito de Aveiro, 4 ao distrito de Viseu, 11 ao distrito da Guarda, 2 ao distrito de Castelo-Branco e 6 ao distrito de Leiria. Não obtivemos informação relativa à proveniência de 8 pessoas como podemos ver na Figura 11.

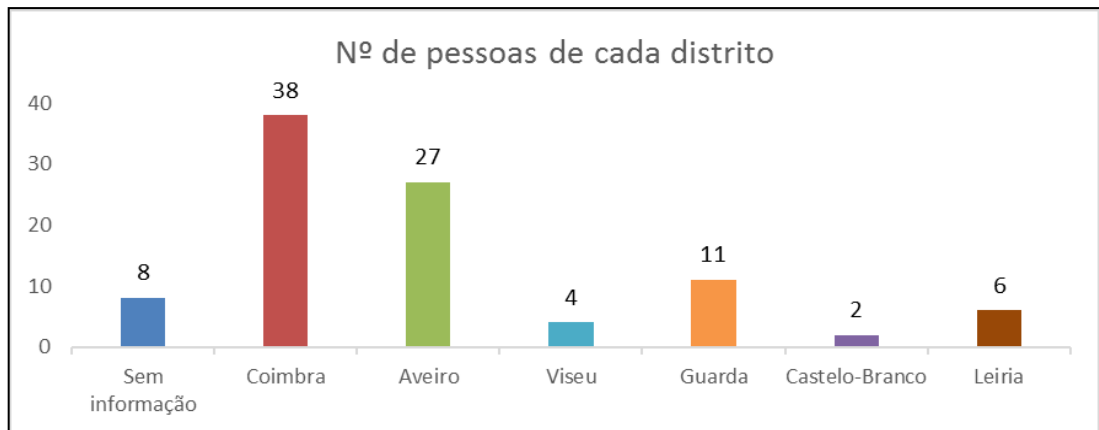


Figura 11: Distribuição do número de participantes em estudo por distrito. O estudo contou com a participação de indivíduos controlos (n=20) e doentes com CCR (n=76).

De acordo com a figura 12 os participantes do estudo tinham uma média de idades de 65,47 anos com desvio padrão de 11,49 anos e foram distribuídos por grupos etários. Foi possível verificar que a maioria das pessoas em estudo se encontra na faixa etária entre os 61 e os 80 anos. Não obtivemos esta informação em sete dos indivíduos em estudo. De acordo com a bibliografia a incidência de CCR aumenta a partir dos 65 anos de idade (Ferlay et al. 2013, 2015). Considera-se assim que 41,66% dos doentes em estudo estão fora desse grupo etário (Miller et al. 2016), tendo esta doença uma maior prevalência no sexo masculino (Siegel et al. 2014), o que também está de acordo com a amostra estudada já que a amostra incluiu mais homens (n=54) relativamente ao número de mulheres (n=42).

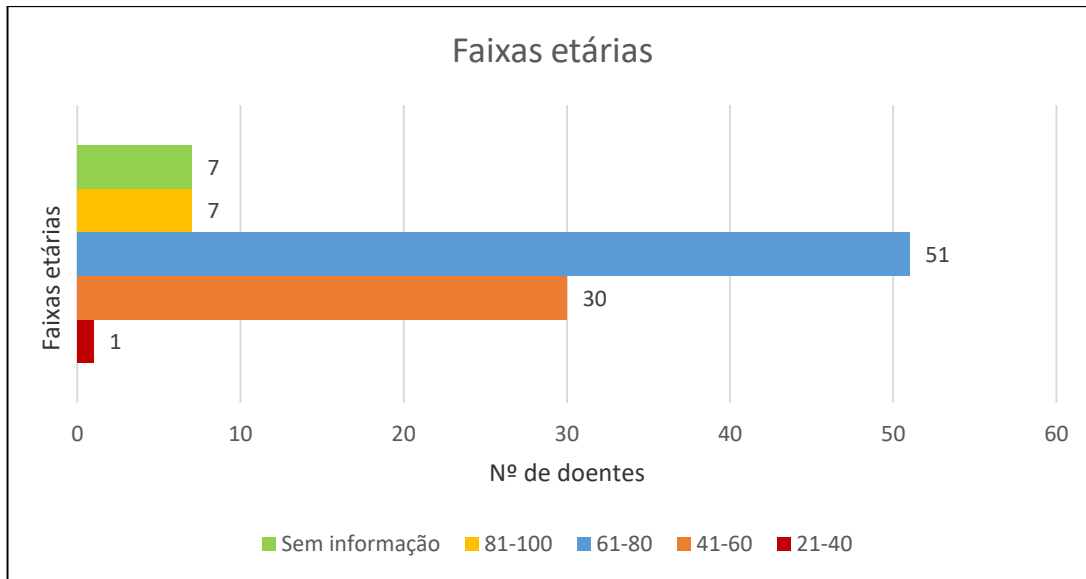


Figura 12: Distribuição de pessoas por grupos etários. O estudo contou com a participação de indivíduos controlos (n=20) e doentes de CCR (n=76). Foram divididos por grupos etários de 0-20 anos, 21-40 anos, 41-60 anos, 61-80 anos, 81-100 anos. Houve sete participantes da qual não se obteve informação referente à sua idade.

Foram também analisadas as habilitações literárias dos participantes no estudo. Verificou-se que 79 dos indivíduos analisados não possuíam educação superior, 10 tinham estudos superiores e não obtivemos informação de sete indivíduos. Pode-se considerar que sendo o CCR um tipo de cancro que depende directamente do estilo de vida, da dieta e dos hábitos alimentares, o nível de literacia pode influenciar o conhecimento de factores de risco e, por conseguinte, a adopção de estilos de vida mais saudáveis diminuindo o aparecimento do CCR (Adams et al. 2013). De salientar que os doentes com CCR tinham idades mais elevadas, sendo a média de 65 anos e, por conseguinte, menos acesso a uma educação graduada (Davis et al. 2002).

7.2. Análise do inquérito alimentar

De seguida foram analisados os dados do inquérito alimentar e avaliada a quantidade de fibra dietética nos indivíduos controlo e com CCR, tendo em conta a localização e o estágio de desenvolvimento do tumor. Os dados do inquérito foram correlacionados com os dados obtidos na espectroscopia por ressonância magnética nuclear averiguando-se se existia correlação entre a quantidade de fibra dietética e a concentração de SCFA nas fezes.

Comparou-se a quantidade de fibra dietética entre o grupo controlo (n=16) e o grupo com CCR (n=56). O grupo controlo apresenta um consumo médio de fibra dietética de $48,64 \pm 16,71$ g/dia (média \pm desvio-padrão) valor mais baixo do que no grupo com CCR o qual apresentou um consumo médio de $45,83 \pm 18,28$ g/dia (média \pm desvio padrão). Estas diferenças são estatisticamente significativas ($p=0,035$), como mostrado na figura 13A. Porém, o número das amostras controlo é muito inferior ao do grupo CCR podendo dever-se a isso estes resultados.

Foram analisados os questionários alimentares de 68 indivíduos e comparada a quantidade de fibra dietética consumida diariamente em relação às várias localizações do tumor, tendo sido avaliados 15 indivíduos controlo e 53 doentes com CCR. As localizações dividem em cego/ascendente, transverso, descendente/sigmoide, recto e múltiplos para os doentes que apresentassem mais de um cancro perfazendo um total de 60 localizações. Foram ainda considerados como controlo indivíduos sem tumor (n=19). Como se pode ver pela figura 13B não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de estudo ($p>0,05$). Porém, o grupo controlo apresenta um consumo de fibra dietética tendencialmente inferior que os sub-grupos com CCR. Esta conclusão pode dever-se ao facto do número de indivíduos controlo ser muito reduzido. Foi também avaliado o consumo de fibra dietética em relação aos vários estádios do tumor em 60 doentes. O estágio do tumor divide-se segundo a classificação AJCC nas categorias I, II (A, B, C), III (A, B, C) e IV (A, B, C). Estas categorias relacionam com a classificação TMN que caracteriza o estado de desenvolvimento do cancro. O estágio 0 corresponde a uma fase muito inicial em que o cancro se encontra localizado e isolado, nos estádios I, II, IIIA o cancro tem uma extensão regional, e estende-se para além do órgão de origem. Nos estádios IIIB e IIIC a extensão da lesão é maior e o cancro já ultrapassou vários órgãos e tem probabilidades de continuar a disseminar-se à distância e a formar metástases. O estágio IV corresponde a uma fase bastante avançada da doença onde o cancro apresenta metástases em várias localizações (Labianca, et al., 2013). Como se pode ver pela figura 13C não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de estudo.

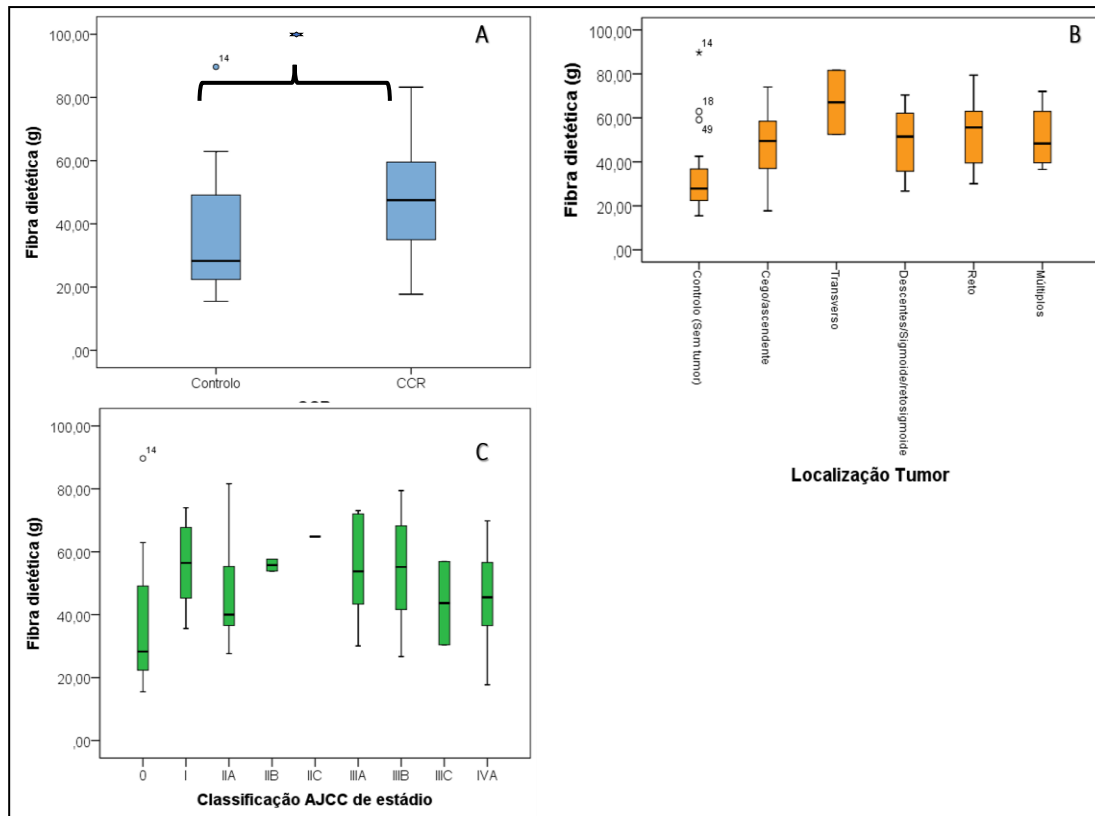


Figura 13: A - Consumo de fibra dietética (g/dia) em indivíduos controlo (n=16) e doentes CCR (n=56); * representa diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,05$; B - Consumo de fibra dietética (g/dia) em indivíduos controlo (n=15) e doentes CCR (n=53) em relação à localização do tumor; C - Consumo de fibra dietética (g/dia) em doentes CCR (n=60) e controlos (n=16) em relação ao estágio do tumor.

Segundo a literatura, existe uma correlação entre o elevado consumo de fibra alimentar e a diminuição de prevalência de CCR (Godos et al., 2016; Park et al., 2005; Wong et al., 2016). Quando avaliado o consumo de fibra alimentar em função da localização do tumor observou-se que os resultados foram tendencialmente semelhantes entre os grupos de estudo. Contudo, mostram tendência a serem menores nos grupos controlo, podendo a reduzida dimensão da amostra controlo explicar estes resultados. Para além disso foi também objectivo averiguar se existia correlação entre as concentrações nas fezes dos SCFA em estudo (acetato, butirato e propionato) e o consumo de fibra dietética, precursora destes ácidos gordos. Os resultados demonstraram que não haver correlação entre o consumo de fibra dietética e a presença de SCFAs nas amostras de fezes. Estes resultados podem dever-se ao facto de os dados sobre o consumo de fibra dietética terem sido obtidos por meio de um inquérito alimentar, enquanto os dados sobre os SCFAs terem sido obtidos por RMN aquando da análise das amostras fecais. Deste modo, os SCFAs presentes nas fezes

foram muito inferiores relativamente à fibra dietética ingerida uma vez que ocorreu uma eficiente absorção destes SCFA's no cólon.

Na análise do consumo de fibra dietética calculou-se também o índice *MeDi-score*. Este índice, utilizado em diferentes áreas médicas, constitui uma medida do grau de adesão à Dieta Mediterrânica, com base nos dados obtidos do inquérito alimentar (Panagiotakos, Pitsavos, and Stefanadis, 2006). Esta análise consiste na atribuição de uma pontuação numa escala de 0-18, identificando-se três grupos: 0-6 corresponde a uma baixa adesão à Dieta Mediterrânica; 7-11 corresponde a uma adesão média à Dieta Mediterrânica e de 12-18 uma elevada adesão à Dieta Mediterrânica (Buckland et al., 2009). No cálculo do *MeDi-score* foram considerados o consumo de vegetais, de leguminosas, de batatas, de frutos, de cereais, de carne, de peixe, de lacticínios e de azeite.

Foi calculada a adesão à Dieta Mediterrânica por género como se pode ver na figura 14. De acordo com a figura 14A, observou-se que a maioria dos indivíduos tem uma adesão média à Dieta Mediterrânica. Na figura 14B observa-se a adesão à Dieta Mediterrânica no sexo feminino onde se verifica que a maioria dos indivíduos tem uma baixa e média adesão a esta dieta.

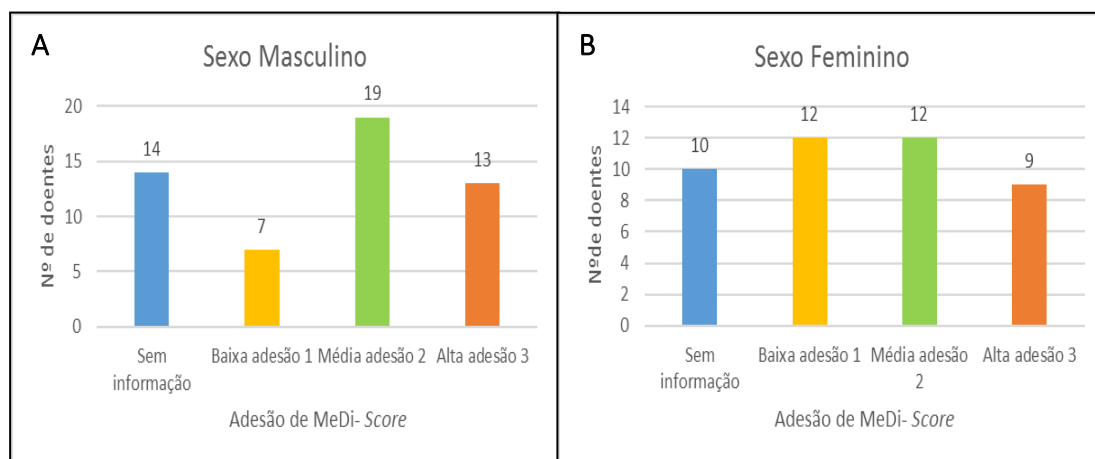


Figura 14: Adesão à Dieta Mediterrânica pelo sexo masculino (A) sexo feminino (B) pelo cálculo do índice *MeDi-score*. A baixa adesão corresponde ao número 1, a média adesão ao número 2 e a alta adesão ao número 3. Não se obteve informações para 14 indivíduos do sexo masculino (A) e para 10 indivíduos do sexo feminino (B).

De seguida calculou-se a adesão à Dieta Mediterrânica por idades, como se pode ver na figura 15 calculada através do índice de *MeDi-score*. Verifica-se que o grupo de *MeDi-score* com maior adesão é o grupo 2 que representa uma média adesão à dieta

mediterrânica. No grupo 3 que representa uma adesão alta, estão identificados apenas 22 indivíduos dos 96 em estudo. No grupo 1 de baixa adesão à Dieta Mediterrânica estão presentes 21 indivíduos. Nesta figura verifica-se que o grupo etário dos 20 aos 40 anos tem apenas um indivíduo representado, no entanto, este indivíduo aparece como alta adesão à Dieta Mediterrânica. No grupo etário dos 41 aos 60 anos está distribuído de forma constante pelos vários grupos de adesão à Dieta Mediterrânica, sendo ligeiramente maior na alta adesão à dieta. Verifica-se que os grupos etários entre 61 e 80 anos apresentam na sua maioria uma adesão média à Dieta Mediterrânica. No grupo etário de 81 a 100 anos verificou-se que existe uma igual distribuição pelos grupos de baixa e alta adesão.

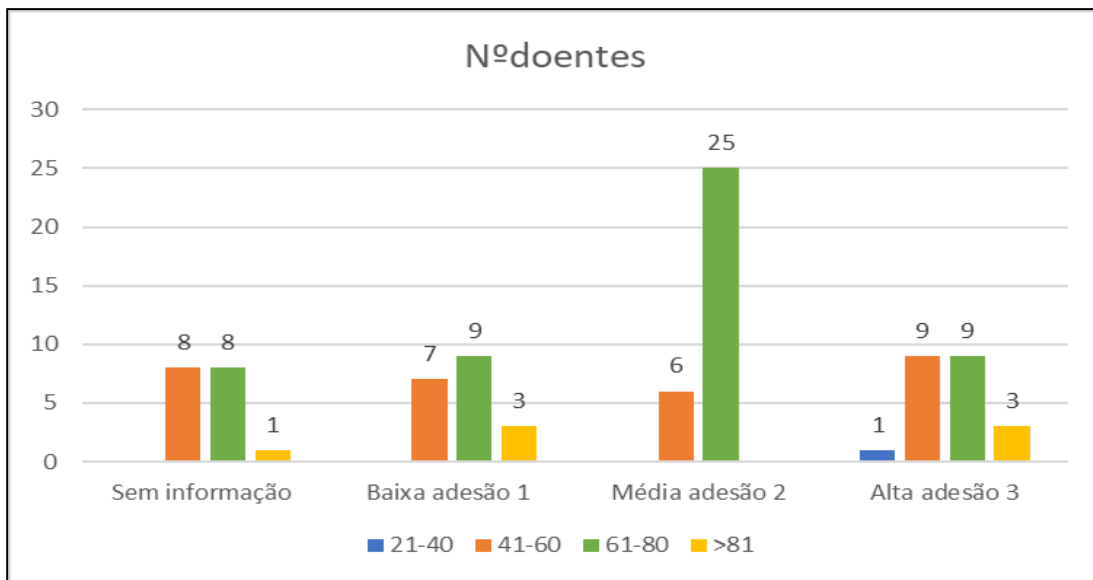


Figura 15: Adesão à Dieta Mediterrânica calculada pelo índice de MeDi-score por grupos etários. O grupo de MeDi-score 1 representa uma baixa adesão à Dieta Mediterrânica, o grupo de MeDi-score 2 representa uma adesão média, e o grupo 3 de MeDi-score representa uma alta adesão à Dieta Mediterrânica. Não se obtiveram dados para 17 indivíduos

O CCR está intimamente ligado ao estilo de vida desregrado, entre eles o consumo de bebidas alcoólicas, o tabagismo, o sedentarismo, e uma dieta desequilibrada. Ao observarmos as figuras 25 e 26 podemos constatar que a maior parte dos doentes inquiridos apresentam na sua maioria baixa ou média adesão à Dieta Mediterrânica, porém, em termos gerais, os indivíduos mais jovens (menos de 60 anos) são os que

mais aderem à Dieta Mediterrânica. Isto pode dever-se ao facto de indivíduos mais jovens apresentarem um nível de literacia mais elevado e, por conseguinte, uma maior informação sobre os riscos de uma má alimentação no aparecimento de CCR (Adams et al., 2013; Davis et al., 2002). A Dieta Mediterrânica, tal como referido anteriormente, privilegia a adoção de estilos de vida saudáveis, a prática de exercício físico e o consumo elevado de alimentos de origem vegetal (cereais pouco refinados, produtos hortícolas, fruta, leguminosas secas e frescas e frutos secos e oleaginosas); consumo de produtos frescos, pouco processados e locais, respeitando a sua sazonalidade; utilização do azeite como principal gordura para cozinhar ou temperar alimentos; consumo baixo a moderado de lacticínios; consumo frequente de pescado e baixo e pouco frequente consumo de carnes vermelhas; consumo de água como a bebida de eleição e baixo e moderado consumo de vinho a acompanhar as refeições principais. Nos dados analisados observou-se que os doentes com CCR apresentam baixas ou médias adesões a esta dieta, sendo que aquando do inquérito muitos deles referiam que só muito recentemente tinham adotado alimentações mais equilibradas. Estes factores puderam contribuir para o aparecimento do cancro tal como refere a literatura (Baena and Salinas, 2015; Cottet et al., 2005; Park et al., 2005).

Na figura 16 foi feita a comparação entre a concentração de cada metabolito, butirato, propionato e acetato em função do grau de adesão à Dieta Mediterrânica, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas nos grupos em estudo ($p > 0,05$). No que diz respeito à concentração de butirato tal como evidenciado na figura 16A, verificou-se é maior para indivíduos onde se observou uma baixa adesão à Dieta Mediterrânica (mediana, mín, máx: 0,38; 0,00; 3,54), sendo mais baixa para adesões médias (mediana, mín, máx: 0,19; 0,00 ;3,39) à Dieta Mediterrânica. No que diz respeito à concentração de propionato na figura 16B, verificou-se que é maior para indivíduos onde se observou uma baixa adesão à Dieta Mediterrânica (mediana, mín, máx: 0,81; 0,00; 3,51), sendo mais baixa para adesões médias à Dieta Mediterrânica (mediana, mín, máx: 0,25; 0,00; 3,45). Na figura 16C comparou-se a concentração de acetato. Sendo que as conclusões foram semelhantes às anteriores. Verificou-se que no cálculo de adesão à Dieta Mediterrânica o metabolito com maior concentração é o acetato (mediana, mín, máx: 0,76; 0,00; 13,81).

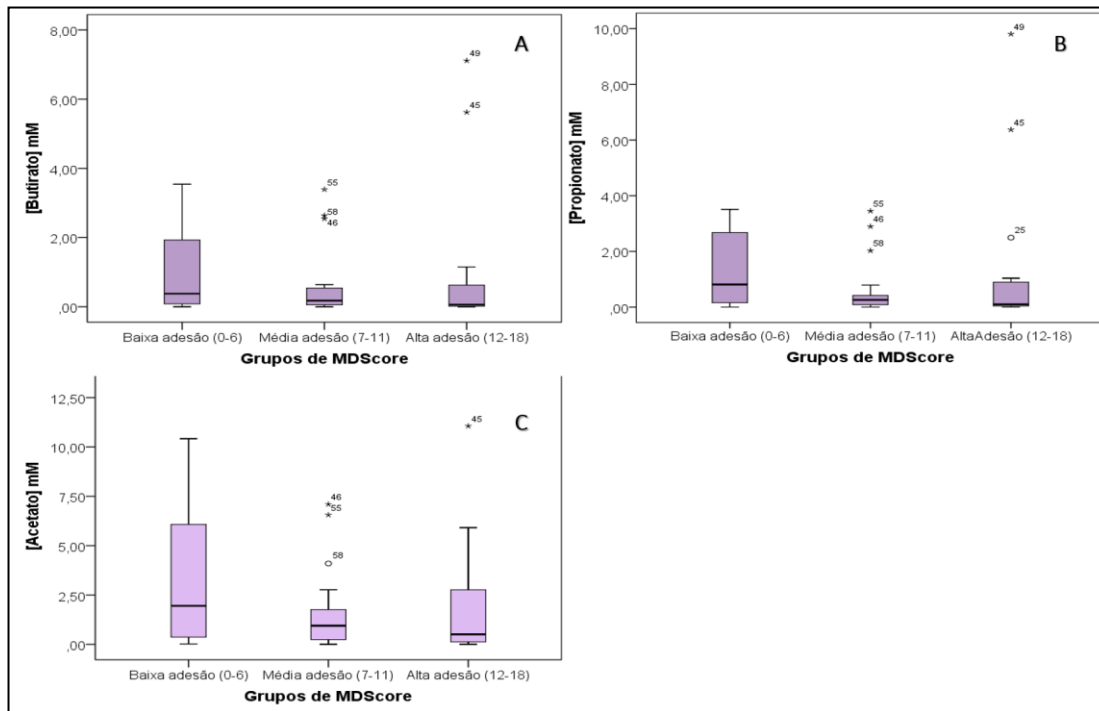


Figura 16: A - Concentração de butirato (A), de propionato (B) e de acetato (C) em função da adesão à Dieta Mediterrânica. Foi avaliado a baixa (0-6), a média (7-11) e a alta adesão (12-18) à dieta pelo índice de MeDi-score.

Com esta análise verificou-se que uma baixa adesão à Dieta Mediterrânica possui concentrações mais elevadas de SCFA's contrariamente ao que era esperado. Os resultados de adesão à Dieta Mediterrânica foram obtidos através do inquérito alimentar. Por este facto, as informações obtidas sobre a dieta podem não ir de encontro aos dados obtidos pela análise das amostras fecais pois a concentração de SCFA's nas amostras fecais é muito reduzida, muito provavelmente devido à sua eficiente absorção intestinal (Borges-Canha et al., 2015; Topping and Clifton, 2001; Wong et al., 2006, 2016).

Comparou-se a adesão à Dieta Mediterrânica com a ingestão de fibra dietética. Na figura 17 verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas nos grupos em estudo. Verifica-se que quanto maior a adesão à Dieta Mediterrânica, maior é o consumo de fibra dietética. Para baixas adesões (mediana, mín, máx: 25,26; 15,49; 72,57) e médias adesões (mediana, mín, máx: 42,75; 25,97 ;74,01), verifica-se que os

valores são significativamente menores que para altas adesões (mediana, mín, máx: 43,06; 15,49; 89,67).

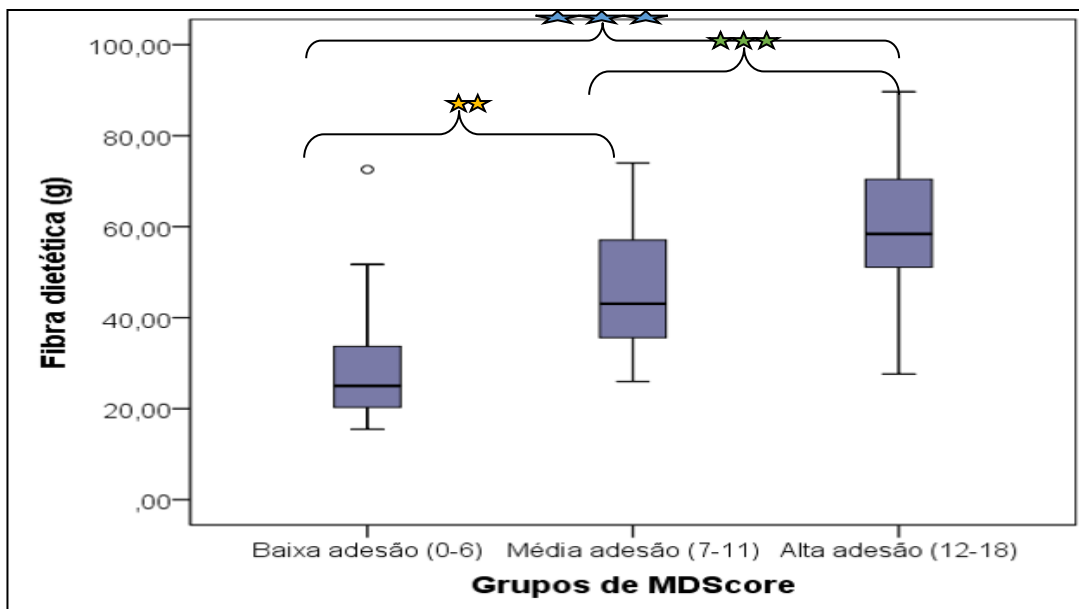


Figura 17: A - Consumo de fibra dietética (g/dia) em função da adesão à Dieta Mediterrânica. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com *, em que ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

Paralelamente, averiguou-se se existia correlação entre o consumo diário de fibra dietética e a adesão à Dieta Mediterrânica calculada pelo índice de MeDi-score e verificou-se a existência de correlação estatisticamente significativa ($r=0,684$, $p < 0,001$).

Podemos verificar que quanto maior é a adesão à Dieta Mediterrânica maiores são os consumos de fibra dietética(g/dia). Estes resultados devem-se ao facto de a Dieta Mediterrânica ser rica em fibra dietética proveniente de cereais, frutas e legumes. É referido na literatura que o consumo de fibra dietética está associado a uma prevenção do aparecimento de CCR (Bamia et al., 2013; Schwingshackl and Hoffmann, 2014; Scoditti et al., 2012).

7.3. Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Para avaliação das concentrações de ácidos gordos de cadeia curta, como o butirato, o propionato e o acetato em função da localização do tumor e do seu estágio recorreu-se à técnica de ressonância magnética nuclear segundo o protocolo descrito nos materiais e métodos.

Analisaram-se as concentrações de SCFA's após terem sido normalizadas as massas das amostras para as condições descritas anteriormente. Na figura 18 estão representadas as concentrações (mM) de butirato (18A), de propionato (18B) e de acetato (18C) em função da presença ou da ausência de CCR. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas para esta condição.

Na figura 18A foi relacionada a concentração de butirato entre os controlos (mediana, mín, máx: 25,46; 0,00; 1127,64) e os portadores de CCR (mediana, mín, máx: 18,08; 0,00; 891,02). Após realização de testes estatísticos concluiu-se que não existiam diferenças significativas entre os grupos analisados. Porém ao analisar a figura verifica-se que existe uma tendência para uma maior concentração de butirato no grupo de controlo. A figura 18B relaciona a concentração de propionato entre os controlos e os portadores de CCR. Ao analisar a figura verifica-se que a concentração de propionato tem uma concentração superior no grupo de controlo. Na figura 18C foi correlacionada a concentração de acetato entre controlos e os portadores de CCR. Ao analisar a figura verifica-se também que a concentração de acetato é tendencialmente superior no grupo de controlo. Após a análise de todos os metabolitos verificou-se que a concentração de acetato é tendencialmente superior em relação ao butirato e propionato, tanto em indivíduos controlo como CCR.

O aumento de concentração de SCFA's em grupos controlo pode justificar-se pelo facto de uma concentração mais elevada de ácidos gordos implicar uma menor incidência de CCR. É referido na literatura que uma elevada concentração destes SCFA's têm um efeito preventivo contra o aparecimento de CCR (Amiot et al. 2015; den Besten et al. 2013; Hijova and Chmelarova 2007).

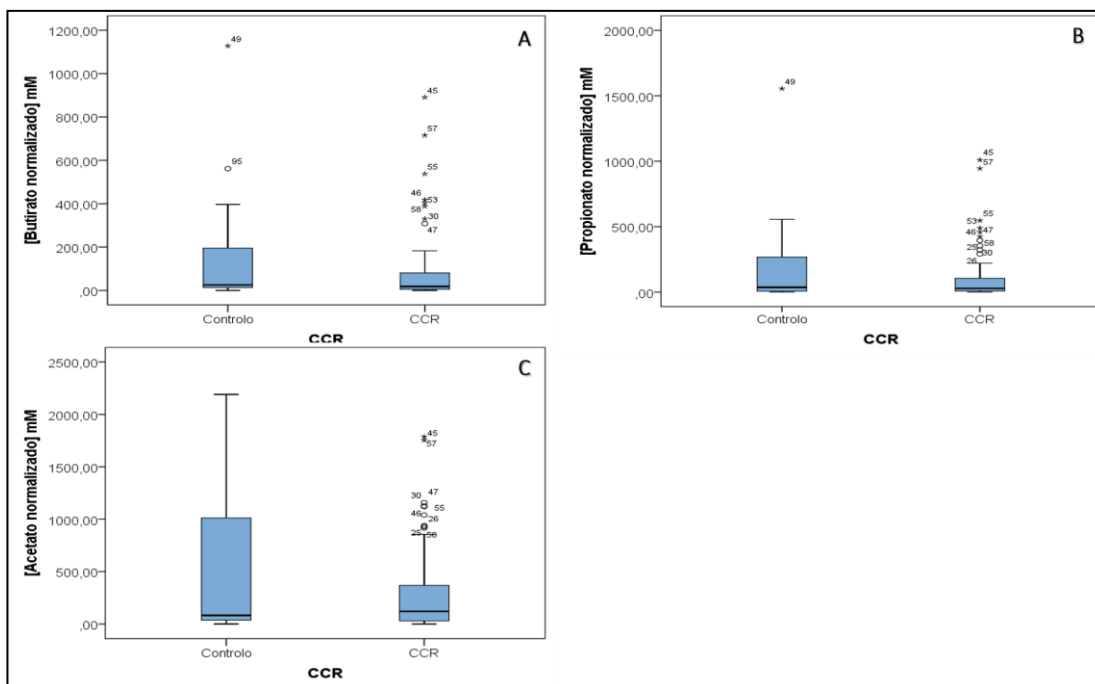


Figura 18: A – Concentração dos SCFA's butirato (mM) (A), propionato (mM) (B) e acetato (mM) (C) com massas normalizadas para doentes com CCR (n=76) e para os controlos(n=20). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p>0.05$).

De seguida correlacionaram-se as concentrações de SCFA's em função da localização do tumor. No que diz respeito à concentração de SCFA's, após normalização das massas das amostras biológicas verificou-se que para o butirato, na figura 19A, e para o propionato, a figura 19B, não existiram diferenças estatisticamente significativas entre as localizações do tumor ($p>0.05$). No que diz respeito ao acetato na figura 19C, verificou-se que para a localização no cólon transverso (n=3), (mediana, mín, máx: 19,57; 14,30; 89,49) e no cólon descendente (n=15), (mediana, mín, máx: 246,18; 16,46; 1753,32) existiram diferenças estatisticamente significativas (* $p=0,049$). Verificou-se que na localização no cólon descendente os valores de mediana, de mínimo e de máximo são maiores relativamente à localização correspondente ao cólon descendente.

Quando analisada a concentração de SCFA's tendo em conta as várias localizações do tumor verificou-se que o acetato é o metabolito que apresenta concentrações mais elevadas em relação à localização do tumor.

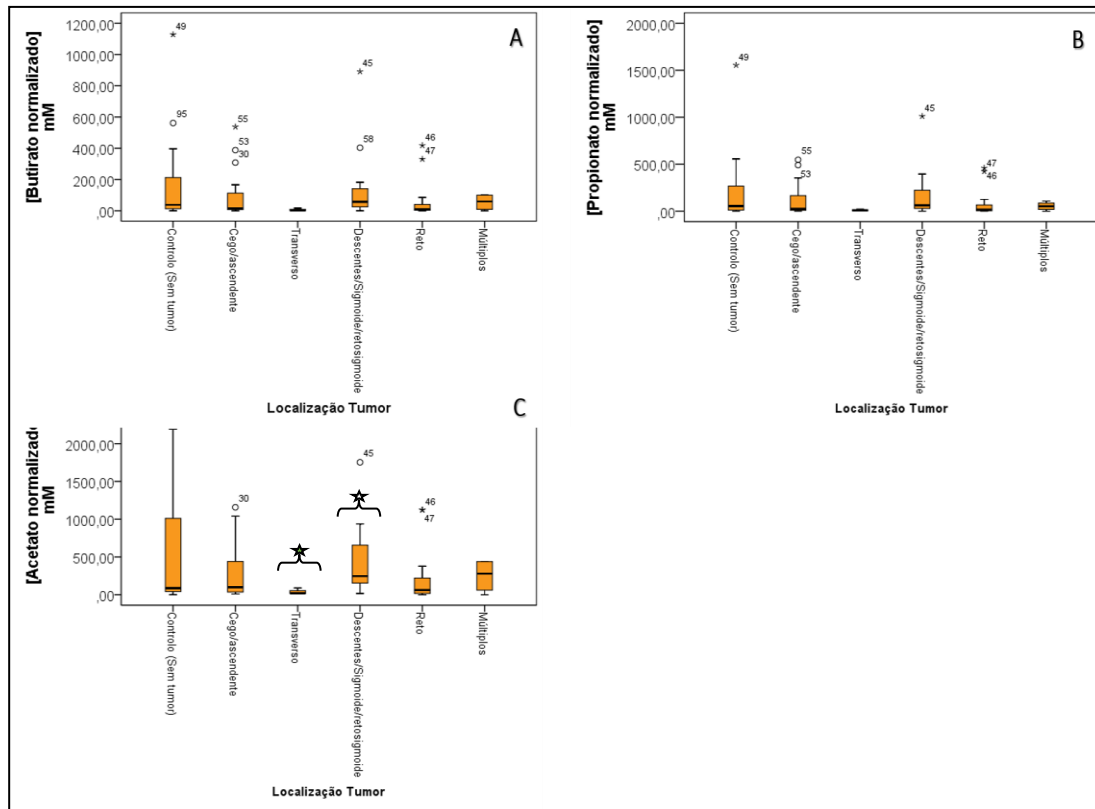


Figura 19: Concentração de butirato (mM) (A), de propionato(mM) (B) e de acetato (mM) (C) com massas normalizadas para as localizações do tumor em controlo (n=20), e em doentes com localização de tumor no cólon ascendente (n=17), no cólon descendente (n=15), no cólon transverso (n=3), no recto (n=26) e em múltiplos locais (n=4). Existem diferenças estatisticamente significativas para o acetato (C) nas localizações no cólon transverso (n=3) e no cólon descendente (n=15) (p=0,049).

Quanto às concentrações de SCFA's em função do estágio do tumor, no que diz respeito à concentração de SCFA's após normalização às massas das amostras biológicas avaliou-se a concentração de butirato nas amostras fecais (figura 20A). Na figura as concentrações de butirato são maiores nos controlos (mediana, mín, máx: 25,46; 0,00; 1127,64) e nos doentes com cancros no estágio I (mediana, mín, máx: 12,68; 3,02; 715,64), porém não se encontraram diferenças estatisticamente significativas (p>0,05). A figura 20B evidencia maiores concentrações de propionato

nos controlos (mediana, mín, máx: 36,49; 0,00; 1554,29) e nos doentes em estádios I (mediana, mín, máx: 27,60; 4,41; 944,41), porém não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$). Por fim, avaliou-se a concentração de acetato (figura 20C), verificando-se que as concentrações do mesmo são maiores nos controlos (mediana, mín, máx: 82,26; 0,46; 2190,03) e nos doentes em estágio I (mediana, mín, máx: 125,61; 16,46; 1786,61), porém não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$).

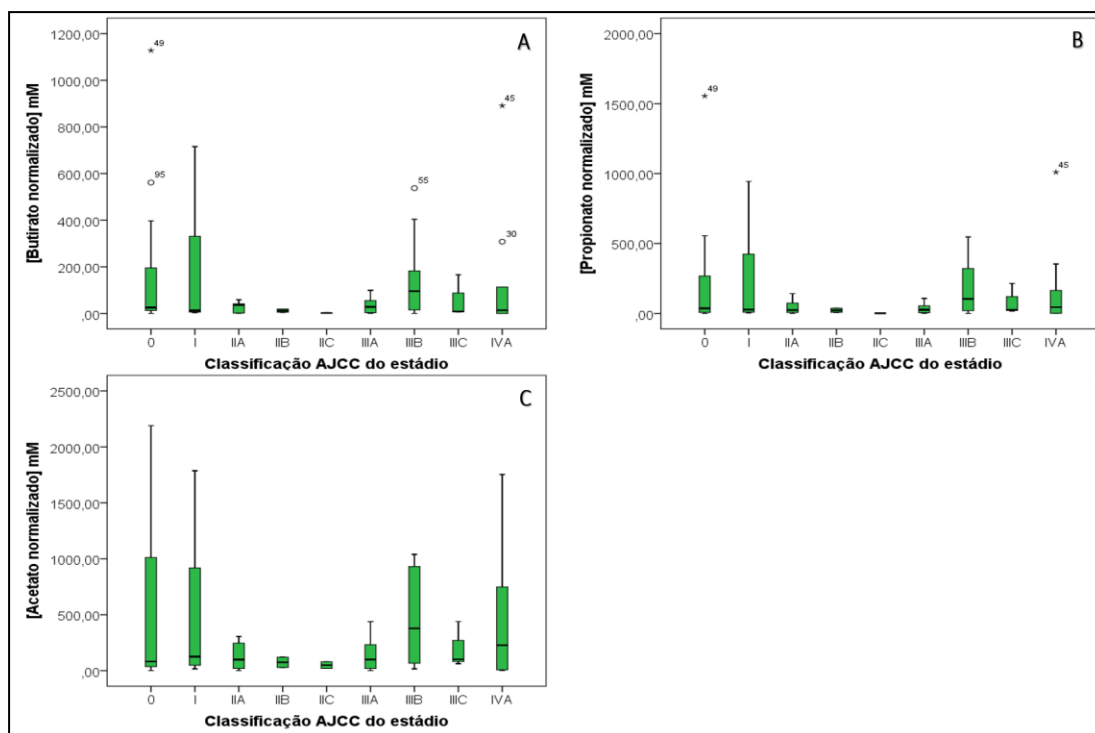


Figura 20: Concentração de butirato (mM) (A), de propionato (mM) (B) e de acetato (mM) (C) com massas normalizadas para indivíduos controlo (0) (n=20) e para doentes com diferentes estádios do tumor segundo a classificação AJCC; I (n=14), IIA (n=9), IIB(n=2), IIC(n=2), IIIA(n=8), IIIB(n=9), IIIC(n=3), IVA(n=10).

A elevada concentração de butirato, propionato e acetato em controlos e em doentes com cânceres em estágio I pode ser um indicador de bom prognóstico na prevenção e cura do CCR uma vez que SCFA's têm um efeito protetor no cólon. Este efeito protetor tem a ver com a diluição de carcinógenos fecais, com a redução do tempo de trânsito das fezes através do intestino, e promovem uma acção

anticancerígena através da ligação de ácidos biliares carcinogénicos (Gonçalves and Martel, 2013; Park et al., 2005). Na figura 21 podem observar-se as vias metabólicas de formação de acetato, de propionato e de butirato, onde o piruvato dará origem a estes três SCFA's, que são os principais produtos da fermentação microbiana de polissacarídeos de fibras vegetais no cólon humano. Nos resultados obtidos verifica-se que quando existe um aumento da concentração de acetato, a concentração de butirato diminui, o que pode dever-se ao organismo preferir a via de formação do acetato em detrimento da de butirato (Miller and Wolin 1996).

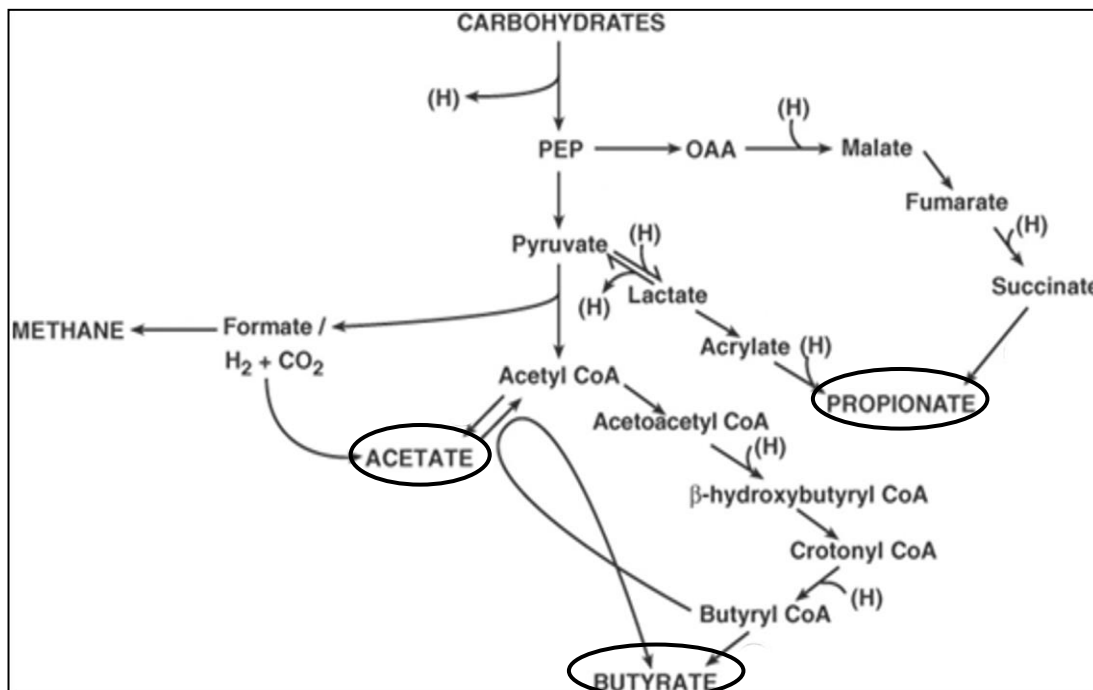


Figura 21: Vias metabólicas representativas de produção de butirato, de propionato e de acetato. Imagem retirada de Pryde et al. 2002.

Tal como já se tinha verificado em relação à localização do tumor vs. concentração de SCFA's, a concentração de acetato é tendencialmente superior em relação à do butirato e do propionato. De salientar que nos estádios iniciais da doença a concentração de SCFA é maior como se verificou nas figuras anteriores, porém nos estádios IIIB e IV a concentração é, por tendência maior.

Não foram verificadas alterações estatisticamente significativas quando analisadas as concentrações de metabolitos com áreas normalizadas. Desta forma e para

investigar se todas as condições analisadas anteriormente não sofriam alterações calculou-se o índice de MeDi-score na figura 22 em função da concentração de butirato (A), de propionato (B) e de acetato (C), onde não se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0.05$).

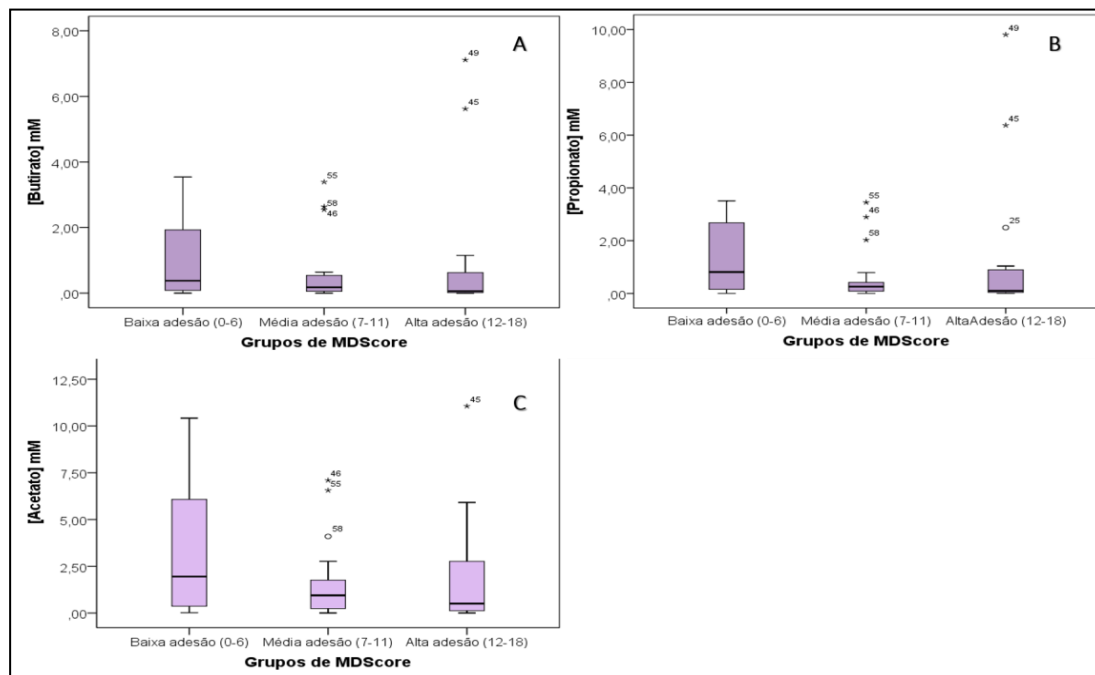


Figura 22: Concentração de cada metabolito, butirato (mM) (A), propionato (mM) (B) e acetato (mM) (C) em função da adesão à Dieta Mediterrânea pelo índice de MeDi-score.

Ao analisar os dados de concentração de butirato, de propionato e de acetato nos doentes de CCR nos controlos, da localização e do estágio do tumor observaram-se grandes discrepâncias na amplitude interquartílica. Estas discordâncias deveram-se ao facto de as amostras fecais analisadas não serem constantes quer no peso, quer na consistência sendo umas amostras mais líquidas que outras. Para controlar este problema procedeu-se à secagem de algumas amostras biológicas, no entanto ao analisar o espectro de RMN dessas amostras verificou-se que tal procedimento não era adequado pois perdiam-se os elementos metabólicos mais voláteis como o acetato e o espectro era dominado por aminoácidos provenientes do metabolismo bacteriano. Como não se verificaram diferenças significativas, normalizou-se a área de cada SCFA pela soma das áreas dos três SCFA's de forma a obter a percentagem de cada

metabolito em estudo, função de serem controlos e CCR, da localização, estágio do tumor e índice de *MeDi-score*, também não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas para esta condição ($p > 0,05$).

Analisou-se igualmente a quantidade total de SCFA's presentes nas amostras biológicas entre doentes CCR e dos indivíduos controlo, nas localizações e estádios do tumor e na adesão à Dieta Mediterrânica, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas, um espectro representativo dos picos das amostras de RMN surge no anexo 8.

Foi efetuada uma análise multivariada (MVA) e comparados os resultados dos controlos e dos doentes com CCR. Dos elementos analisados foram excluídos os grupos de localização 2 (cólón transverso) e 5 (tumores múltiplos) por terem menos de 3 amostras, não sendo por isso considerados representativos. Nesta análise foi selecionada uma área entre 0,5 e 2,5 ppm para a quantificação de ácidos gordos. Foi escolhida esta área específica no espectro e não uma área espectral total devido ao facto de existir um pico a 3,5 ppm que corresponde a um componente da preparação utilizada para limpeza do cólon aquando da colonoscopia. Este pico é largo e muito intenso, sobrepondo-se aos restantes metabolitos, dificultando a aplicação da MVA.

Foram comparados os controlos com a localização 1 (cólón ascendente), 3 (cólón descendente) e 4 (recto). Como podemos verificar na figura 23A, as amostras provenientes do grupo controlo quando comparadas com as localizações tumorais dos doentes de CCR estão bem agrupadas e ainda que se verifique tendencialmente alguma dispersão, esta não é significativa. Quando comparados os indivíduos controlo com os doentes com tumores no cólon ascendentes (1), na figura 23B verifica-se um agrupamento das amostras sendo as suas características semelhantes. Comparando os indivíduos controlo com os doentes com tumores localizados no cólon descendente (3), na figura 23C verifica-se um agrupamento das amostras sendo as suas características semelhantes, mas com mais dispersão entre os grupos quando comparado com os dados da figura 23B. Na figura 23D observa-se a relação entre controlos e doentes com tumores no recto (4) verificando-se uma maior dispersão no

grupo 4 em relação aos dados obtidos para tumores no cólon ascendente e no cólon descendente.

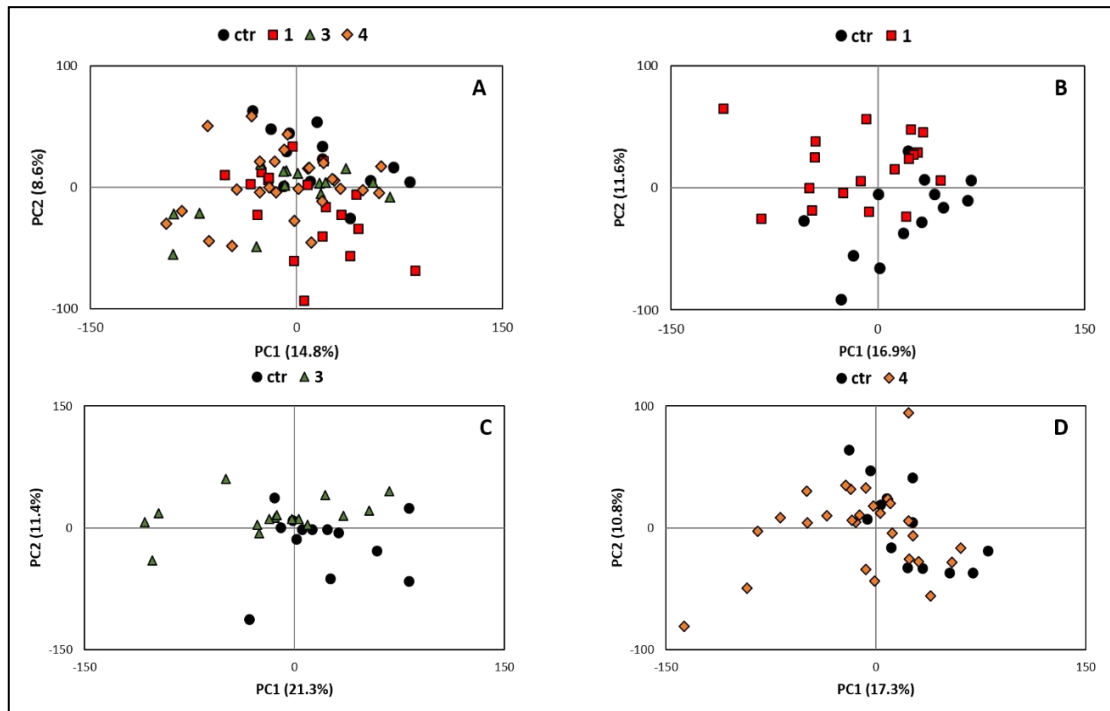


Figura 23: Análise de componentes principais entre controlos e as diferentes localizações dos tumores (A). Foram comparados controlos com localização no cólon ascendente (B), no cólon descendente (C) e no recto (D).

De seguida foi realizada uma análise multivariada (MVA) para as condições estágio do tumor versus adesão à Dieta Mediterrânica. Na figura 24A encontra-se a comparação entre indivíduos controlo (0), em estágio I (1), em estágio IIB (3), em estágio IIIA (6), em estágio IIIB (7) e em estágio IVA (9). Não foram analisados todos os estádios, tendo sido excluídos os estádios que tinham menos de três amostras. Na figura 24B encontra-se a comparação entre a adesão à Dieta Mediterrânica, onde se compararam as diferenças entre baixa adesão (1), média adesão (2) e alta adesão (3). Observa-se na figura 24A que as amostras controlo quando comparadas com as amostras dos doentes em estádios tumorais de CCR estão bem agrupadas e ainda que se verifique tendencialmente alguma dispersão, esta não é significativa. Quando comparados os níveis de adesão por MVA também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas, figura 24B.

Na análise de componentes principais não se verificaram diferenças estatisticamente significativas para nenhuma condição. Isto pode dever-se ao facto de terem sido excluídas condições, quer de localização, quer no estágio por terem um número de amostras inferior a três. Estes estudos requerem um número de amostras mais elevado, o que não foi possível até ao momento. Estes resultados podem ainda dever-se à baixa concentração de metabolitos presentes nas fezes, pois foram absorvidos correctamente ao longo do cólon o que pode ter afectado esta análise.

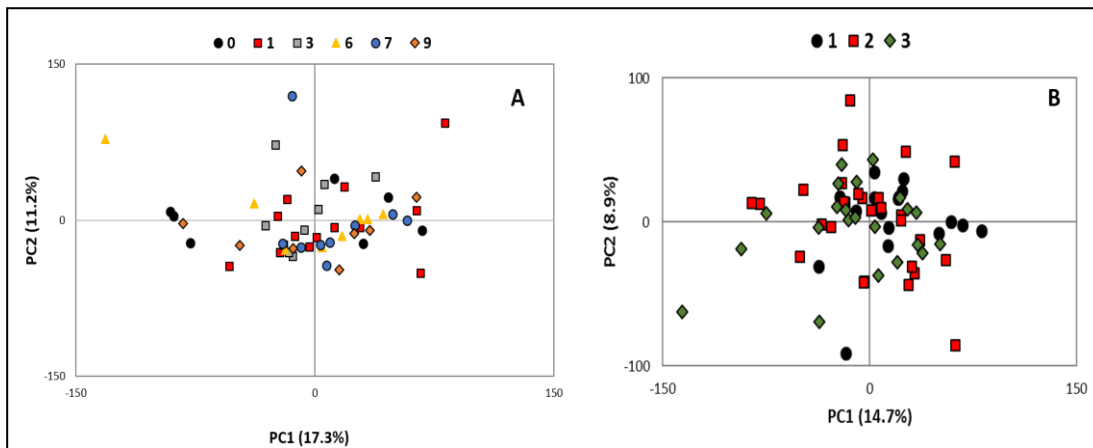


Figura 24: Análise de componentes principais entre controlos e os diferentes estádios dos tumores (A). Foram comparados controlos (0) (n=7) com estádios I (1) (n=14), IIA (3) (n=8), IIIA (6) (n=8), IIIB (7) (n=9) e IVA (9) (n=8). (B) – análise de componentes principais do nível de adesão à Dieta Mediterrânica, baixa adesão (1) (n=17), média adesão (2) (n=28) e alta adesão (3) (n=22).

De seguida foi feita uma análise de *partial least squares discriminant analysis* (PLS-DA) onde são analisados os dados de forma a maximizar as diferenças entre grupos. A figura 25A maximiza as diferenças entre os controlos e os tumores no cólon ascendente (1) podendo verificar-se que existe sobreposição entre grupos em estudo, e que, portanto, têm semelhanças entre si. A figura 25B maximiza as diferenças entre os controlos e os tumores no cólon descendente (3) podendo verificar-se que existe sobreposição e que os grupos em estudo têm semelhanças entre si. A figura 25C maximiza as diferenças entre os controlos e os tumores no recto (4) podendo verificar-se que existe sobreposição e que os grupos em estudo têm semelhanças entre si tal como foi observado para outros grupos.

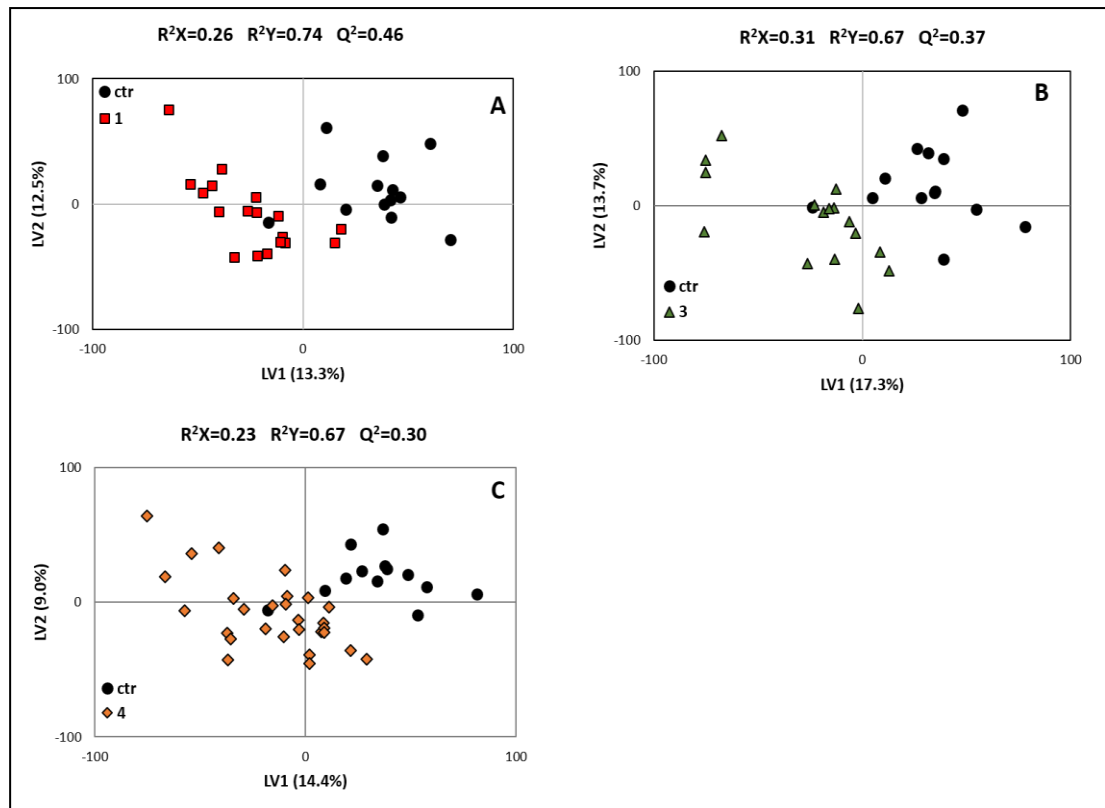


Figura 25: Análise PLS-DA de controlos com localização 1-cólon ascendente (A), 3-cólon descendente(B) e 4-recto(C).

Por fim, foi realizada uma análise VIP (do inglês *variable importance to projection*) de forma a verificar que metabolitos contribuem para as diferenças entre grupos. Estas diferenças acontecem quando o valor de VIP >1. Na figura 26A podemos verificar que o metabolito que mais contribui para as diferenças entre os grupos é o lactato que é mais elevado no grupo controlo (valores positivos no eixo do controlo). Na parte negativa do eixo estão presentes os metabolitos mais abundantes no grupo CCR de localização ascendente do tumor (1), que contribuem para as diferenças, verificando ser o succinato o metabolito que mais contribui. Na figura 26B observamos as diferenças entre os grupos controlo e CCR com tumor descendente (3). Os SCFA's e o lactato são os metabolitos mais abundantes nos controlos e que mais contribuem para as diferenças entre grupos. Na figura 26C surgem as diferenças entre os grupos

controlo e o grupo 5 - localização recto, verificando-se que são as contribuições de do acetato, propionato e butirato que mais distinguem os grupos.

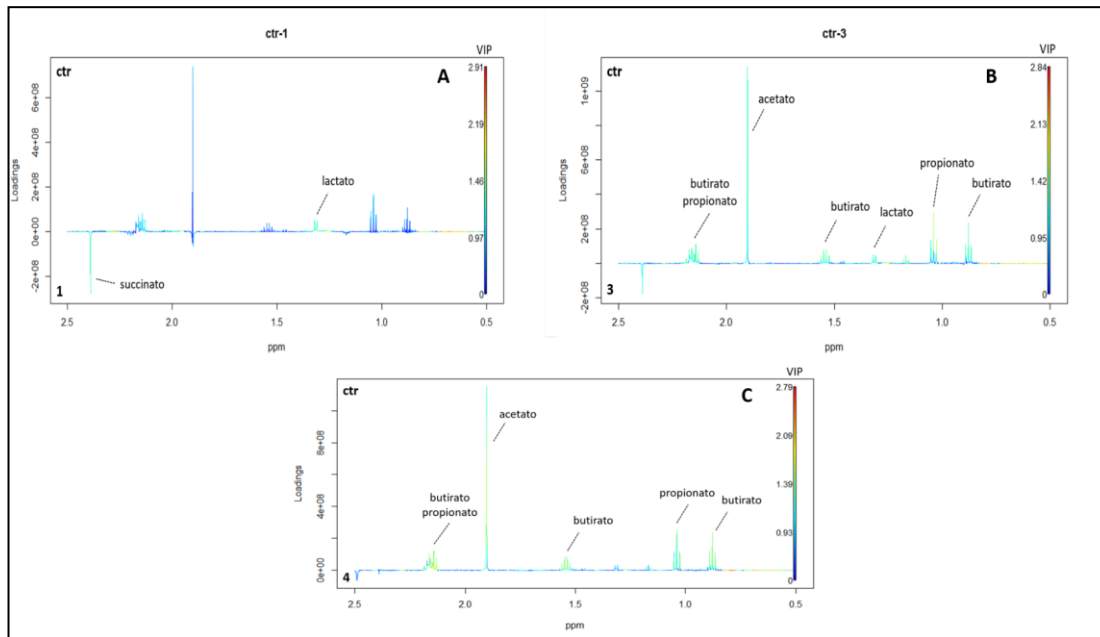


Figura 26: Contribuição de metabolitos na maximização de diferenças entre grupos. A – controlos e localização ascendente (1); B - controlos e localização descendente (3); C – controlos e localização recto (5).

A literatura sugere a análise de amostras fecais e da sua composição em SCFA's como bioindicador da presença de CCR, porém ainda não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na concentração de SCFA's entre estádios de tumores e diferentes localizações do tumor em amostras fecais. A PCA revela algumas separações parciais entre os grupos analisados, mas maior número de amostras parece ser necessário para aferir dessas mesmas separações. As diferenças encontradas nos grupos analisados podem dever-se a variabilidades interpessoais e a diferenças na dieta adoptada (Lin et al. 2016). Os SCFA's são produzidos pelas bactérias presentes no cólon, sendo rapidamente absorvidos como fonte de energia para os colónócitos. Assim, a baixa concentração destes metabolitos nas amostras fecais pode dever-se ao facto de serem eficientemente absorvidos. (De Filippis et al., 2015; Marchesi et al., 2007; Shao et al., 2017)

Neste trabalho, quando analisadas as concentrações de SCFA's como o butirato, o propionato e o acetato em amostras fecais, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre doentes com CCR e os indivíduos do grupo

controlo sem a presença de patologia, entre localizações dos tumores ou os estádios. Porém, quando comparada a ingestão de fibra alimentar (g/dia), foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos grupos em estudo. Isto poderá dever-se ao facto de a absorção de SCFA's no cólon ser um processo altamente eficiente, sendo que apenas 5 a 10% dos ácidos gordos são excretados nas fezes (Herrmann, Hermes, and Breves 2011; Wong et al. 2006). Neste estudo foram analisadas amostras de fezes e não foram observadas diferenças entre os grupos em estudo, o que pode dever-se ao facto de já ter ocorrido absorção intestinal dos metabolitos não estando por isso presentes em grandes concentrações nas fezes. Existem diversos factores, segundo a literatura, que podem afectar a produção de SCFA's no cólon, por exemplo a redução de hidratos de carbono no cólon proximal, a redução de bactérias fermentativas que pode ocorrer quando os resíduos de alimentos se movem para o intestino distal. Esta situação afecta os tipos como as quantidades de SCFA's produzidos (Macfarlane e Macfarlane, 2003). Também é sabido que o elevado tempo de trânsito fecal afecta a actividade das bactérias do cólon, e muitas vezes os doentes de CCR relatam sintomas de obstrução intestinal. Também este facto pode contribuir para as reduzidas concentrações de SCFA's observadas (Macfarlane and Gibson, 1997; Macfarlane and Macfarlane, 2011).

8. Conclusões e perspectivas futuras:

A relevância do presente trabalho apoia-se em estudos que reforçam o facto de uma dieta rica em fibras se relacionar com um menor risco de desenvolvimento de diversas doenças gastrointestinais, nomeadamente o cancro colo-rectal. Assim, com este trabalho pretendemos compreender melhor a influência da dieta e dos ácidos gordos de cadeia curta na regulação e na incidência de CCR. Adicionalmente, este trabalho teve como objectivo correlacionar as informações nutricionais de cada indivíduo, obtidas através de um inquérito de frequência alimentar, com a análise metabolómica de amostras fecais em termos de concentrações de ácidos gordos de cadeia curta, utilizando espectroscopia por ressonância magnética nuclear.

Neste trabalho concluiu-se que os doentes de CCR apresentavam, na sua maioria, idades superiores a 65 anos, sendo a prevalência de CCR maior em homens, em que a maioria dos doentes apresentava baixos níveis de literacia. Estes dados foram de encontro às informações prévias encontradas na bibliografia (Adams et al., 2013; Davis et al., 2002; Ferlay et al., 2015; Hagggar et al., 2009).

Ao comparar o consumo de fibra alimentar entre doentes de CCR e indivíduos controlo, verificou-se que os níveis de consumo eram maiores em doentes de CCR, ao contrário do que era esperado, podendo dever-se ao facto de existirem poucas amostras controlo neste trabalho (Godos et al., 2016). No futuro seria importante diminuir ao máximo a variabilidade interpessoal dos indivíduos em estudo, aplicando a todos iguais condições nas preparações intestinais pré colonoscopia e inquirindo um maior número de doentes.

De seguida foi avaliado o nível de adesão à Dieta Mediterrânica segundo o índice de *MeDi-score* por género e por idade e verificou-se que os indivíduos inquiridos na sua maioria apresentavam baixos ou médios índices de adesão à Dieta Mediterrânica, podendo correlacionar-se este resultado com o facto de indivíduos mais jovens terem maiores níveis de literacia e, por isso, um maior acesso a informações de práticas de vida saudáveis (Buckland et al., 2009; Panagiotakos et al., 2006; Schwingshackl and Hoffmann, 2014).

Quando comparados as concentrações de ácidos gordos em relação ao grau de adesão à Dieta Mediterrânica verificamos que as concentrações eram mais elevadas nas baixas adesões à dieta. Este resultado pode dever-se ao facto de existirem poucos ácidos gordos presentes nas fezes, por terem sido anteriormente absorvidos no cólon (Macfarlane and Macfarlane, 2011; Miller and Wolin, 1996; Wong et al., 2006).

Analisou-se a adesão à Dieta Mediterrânica quando comparada com a quantidade de fibra dietética ingerida. Podemos verificar que quanto maior é a adesão à Dieta Mediterrânica maiores são os níveis de fibra dietética consumida. Estes resultados devem-se ao facto de a Dieta Mediterrânica ser rica em fibra dietética proveniente de cereais, frutas e legumes. É referido na literatura que o consumo de fibra dietética está associado a uma prevenção do aparecimento de CCR (Bamia et al., 2013; Schwingshackl and Hoffmann, 2014; Scoditti et al., 2012).

Quando analisadas as concentrações de butirato, de propionato e de acetato em doentes CCR e em indivíduos controlo, correlacionando-as com a localização e com o estágio do tumor e com índice de MeDi-score, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Porém, nos estádios iniciais de desenvolvimento tumoral as concentrações destes SCFA's foram tendencialmente mais elevadas que nos restantes estádios, podendo deste modo estar associados a um melhor prognóstico da doença (Amiot et al., 2015). Nos resultados obtidos verifica-se que quando existe um aumento das concentrações de acetato, as concentrações de butirato diminuem, isto pode dever-se ao facto de o organismo preferir a via de formação do acetato em detrimento da de butirato (Miller and Wolin, 1996).

Os mecanismos envolvidos para detecção de CCR em amostras fecais ainda não foram completamente esclarecidos e atualmente não é possível estabelecer uma correlação conclusiva entre a carcinogénese do cólon e os metabolitos presentes em amostras fecais, porém este será um tema que poderá ser aprofundado no futuro uma vez que a detecção do CCR em estádios iniciais é importante para uma maior sobrevivência do doente (Miller et al. 2016). Também a investigação de metabolitos presentes nas fezes como biomarcadores de presença de CCR será uma abordagem interessante para

trabalhos futuros, não só analisando a presença de butirato, propionato e acetato, mas alargando o estudo a uma análise metabólica completa da amostra (Kostidis et al. 2017; Lin et al. 2016). Deste modo a técnica de RMN poderá constituir uma abordagem alternativa para o diagnóstico de CCR ao invés da colonoscopia. A colonoscopia é actualmente o método mais utilizado para rastreio ou detecção de CCR, porém é um método invasivo, dispendioso e desconfortável para os doentes. A utilização do RMN como ferramenta de diagnóstico poderá evitar as desvantagens associadas à realização de colonoscopia.

Uma vez que a o microbioma intestinal e a absorção de SCFA's condicionou bastante este estudo, devido à variabilidade interpessoal dos indivíduos incluídos, seria importante analisar o microbioma presente nas amostras fecais de forma a correlacionar essas informações com os dados obtidos por RMN (Amiot et al., 2015; Choo et al., 2017; Shao et al., 2017). Deste modo seria possível obter uma interpretação mais adequada dos dados analisados neste estudo.

9. Bibliografia

- Abrantes, Am. 2013. "Estudo Experimental."
- Abrantes, Ana M. et al. 2014. "Metabolic Effects of Hypoxia in Colorectal Cancer by (13) C NMR Isotopomer Analysis." *BioMed Research International* 2014:759791. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4100400&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Adams, Robert J. et al. 2013. "Functional Health Literacy Mediates the Relationship between Socio-Economic Status, Perceptions and Lifestyle Behaviors Related to Cancer Risk in an Australian Population." *Patient Education and Counseling* 91(2):206–12. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.pec.2012.12.001>).
- Amiot, Aurelien et al. 2015. "¹H NMR Spectroscopy of Fecal Extracts Enables Detection of Advanced Colorectal Neoplasia." *Journal of Proteome Research* 14(9):3871–81.
- Arbman, G. et al. 1992. "Cereal Fiber, Calcium, and Colorectal Cancer." *Cancer* 69(8):2042–48. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1311977>).
- Arvelo, Francisco, Felipe Sojo, and Carlos Cotte. 2015. "Biology of Colorectal Cancer." *Ecancermedicalscience* 9:1–20.
- Baena, Raul and Pedro Salinas. 2015. "Diet and Colorectal Cancer." *Maturitas* 80(3):258–64. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.12.017>).
- Bamia, Christina et al. 2013. "Mediterranean Diet and Colorectal Cancer Risk: Results from a European Cohort." *European Journal of Epidemiology* 28(4):317–28.
- den Besten, G. et al. 2013. "The Role of Short-Chain Fatty Acids in the Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Host Energy Metabolism." *J Lipid Res* 54(9):2325–40. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23821742>).
- Bloomfield, Hanna E. et al. 2016. "Effects on Health Outcomes of a Mediterranean Diet With No Restriction on Fat Intake: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Annals of Internal Medicine* 165(7). Retrieved (<http://annals.org/article.aspx?articleid=2534409>).

- Borges-Canha, Marta, José Pedro Portela-Cidade, Mário Dinis-Ribeiro, Adelino F. Leite-Moreira, and Pedro Pimentel-Nunes. 2015. "Role of Cólonic Microbiota in Colorectal Carcinogenesis: A Systematic Review." *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas* 107(11):659–71.
- Brenner, Hermann, Matthias Kloor, and Christian Peter Pox. 2014. "Colorectal Cancer." *The Lancet* 383(9927):1490–1502. Retrieved ([http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61649-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9)).
- Brown, Dustin G. et al. 2016. "Metabolomics and Metabolic Pathway Networks from Human Colorectal Cancers, Adjacent Mucosa, and Stool." *Cancer & Metabolism* 4(11):1–12. Retrieved (<http://cancerandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40170-016-0151-y>).
- Buckland, Genevieve et al. 2009. "Adherence to the Mediterranean Diet and Risk of Coronary Heart Disease in the Spanish EPIC Cohort Study." *American Journal of Epidemiology* 170(12):1518–29.
- Canani, Roberto Berni et al. 2011. "Potential Beneficial Effects of Butyrate in Intestinal and Extraintestinal Diseases." *World Journal of Gastroenterology* 17(12):1519–28.
- Canani, Roberto Berni, Margherita Di Costanzo, and Ludovica Leone. 2012. "The Epigenetic Effects of Butyrate : Potential Therapeutic Implications for Clinical Practice." 1–7.
- Carvalho, Rita et al. 2012. "Ensaio Clínico Randomizado Para Avaliar O Impacto Do Ensino Personalizado Na Preparac , ão Intestinal Para Colonoscopia - - Resultados Preliminares." 19(4).
- Carvalho, Rui a et al. 2004. "A (13)C Isotopomer Kinetic Analysis of Cardiac Metabolism: Influence of Altered Cytosolic Redox and [Ca(2+)](o)." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 287(2):H889–95.
- Chan, Andrew T. and Edward L. Giovannucci. 2010. "Primary Prevention of Colorectal Cancer." *Gastroenterology* 138(6):2029–2043.e10. Retrieved

(<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.057>).

- Chan, Doris S. M. et al. 2011. "Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies" edited by D. Tomé. *PLoS ONE* 6(6):e20456. Retrieved (<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0020456>).
- Cho, Young Ae, Jeonghee Lee, Jae Hwan Oh, Aesun Shin, and Jeongseon Kim. 2016. "Dietary Inflammatory Index and Risk of Colorectal Cancer: A Case-Control Study in Korea." *Nutrients* 8(8):1–11.
- Choo, Jocelyn M. et al. 2017. "Divergent Relationships between Fecal Microbiota and Metabolome Following Distinct Antibiotic-Induced Disruptions." *mSphere* 2(1):e00005-17. Retrieved (<http://msphere.asm.org/lookup/doi/10.1128/mSphere.00005-17>).
- Cook, S. I. and J. H. Sellin. 1998. "Review Article: Short Chain Fatty Acids in Health and Disease." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 12(6):499–507.
- Cottet, V. et al. 2005. "Dietary Patterns and the Risk of Colorectal Adenoma Recurrence in a European Intervention Trial." *Eur J Cancer Prev* 14(1):21–29. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15677892>).
- D'Alessandro, Annunziata, Giovanni De Pergola, and Franco Silvestris. 2016. "Mediterranean Diet and Cancer Risk: An Open Issue." *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 67(6):593–605. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27251477>).
- Davis, Courtney, Janet Bryan, Jonathan Hodgson, and Karen Murphy. 2015. "Definition of the Mediterranean Diet: A Literature Review." *Nutrients* 7(11):9139–53.
- Davis, T. C., M. V. Williams, E. Marin, R. M. Parker, and J. Glass. 2002. "Health Literacy and Cancer Communication." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 52(3):134–49. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.3322/canjclin.52.3.134>).
- Dieterle, Frank et al. 2006. "Probabilistic Quotient Normalization as Robust Method to Account for Dilution of Complex Biological Mixtures. Application in ¹H NMR Metabonomics." *Analytical Chemistry* 78(13):4281–90. Retrieved (<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac051632c>).

- Ferlay, J. et al. 2013. "Cancer Incidence and Mortality Patterns in Europe: Estimates for 40 Countries in 2012." *European Journal of Cancer* 49(6):1374–1403. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>).
- Ferlay, Jacques et al. 2015. "Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012." *International Journal of Cancer* 136(5):E359–86.
- De Filippis, Francesca et al. 2015. "High-Level Adherence to a Mediterranean Diet Beneficially Impacts the Gut Microbiota and Associated Metabolome." *Gut* gutjnl-2015-309957. Retrieved (<http://gut.bmj.com/content/early/2015/09/03/gutjnl-2015-309957.abstract>).
- Floch, M. H. and J. Hong-Curtiss. 2001. "Probiotics and Functional Foods in Gastrointestinal Disorders." *Current Gastroenterology Reports* 3(4):343–50.
- Giacosa, Attilio et al. 2013. "Cancer Prevention in Europe: The Mediterranean Diet as a Protective Choice." *European Journal of Cancer Prevention* 22(1):90–95.
- Godos, J. et al. 2016. "Dietary Patterns and Risk of Colorectal Adenoma: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies." *Journal of Human Nutrition and Dietetics* (1):1–11.
- Gonçalves, Pedro and Fátima Martel. 2013. "Butyrate and Colorectal Cancer: The Role of Butyrate Transport." *Current Drug Metabolism* 14(9):994–1008. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24160296>).
- Griffin, Julian L. and John P. Shockcor. 2004. "Metabolic Profiles of Cancer Cells." *Nature Reviews Cancer* 4(7):551–61. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc1390>).
- Hagggar, Fatima a, Robin P. Boushey, and D. Ph. 2009. "Colorectal Cancer Epidemiology : Incidence , Mortality , Survival , and Risk Factors." *Clinics in Cólón and Rectal Surgery* 6(212):191–97.
- Hamer, H. M. et al. 2008. "Review Article: The Role of Butyrate on Cólonic Function." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 27(2):104–19.
- Herrmann, Jens, Roland Hermes, and Gerhard Breves. 2011. "Transepithelial

- Transport and Intraepithelial Metabolism of Short-Chain Fatty Acids (SCFA) in the Porcine Proximal C6lon Are Influenced by SCFA Concentration and Luminal pH." *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 158(1):169–76. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.10.018>).
- Hester, Christina M. et al. 2015. "Fecal Microbes, Short Chain Fatty Acids, and Colorectal Cancer across Racial/ethnic Groups." *World Journal of Gastroenterology* 21(9):2759–69.
- Hijova, E. and A. Chmelarova. 2007. "Short Chain Fatty Acids and C6lonic Health." *Bratislavsk6 Lekar6ske Listy* 108(December 2014):354–58. Retrieved (<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2982.2011.01744.x><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18203540>).
- Hill, M. J. 1999. "Meat and Colo-Rectal Cancer." *Proceedings of the Nutrition Society* 58(2):261–64. Retrieved (<http://libaccess.mcmaster.ca/login?url=http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=J&S&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med4&AN=10466164><http://sfx.scholarsportal.info/mcmaster?sid=OVID:medline&id=pmid:10466164&id=doi:&issn=0029-6651&isbn=&volume=58&issue=2&spage=>).
- IARC. 2016. "Globocan 2012." [Http://Www-Dep.iarc.fr/](http://www-dep.iarc.fr/GLOBOCAN) GLOBOCAN(August):2012–13. Retrieved (www-dep.iarc.fr).
- Jacobs, S. et al. 2016. "Among 4 Diet Quality Indexes, Only the Alternate Mediterranean Diet Score Is Associated with Better Colorectal Cancer Survival and Only in African American Women in the Multiethnic Cohort." *Journal of Nutrition* 146(9):1746–55. Retrieved (<http://jn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/jn.116.234237>).
- Jones, John G. et al. 1997. "Measurement of Gluconeogenesis and Pyruvate Recycling in the Rat Liver: A Simple Analysis of Glucose and Glutamate Isotopomers during Metabolism of [1,2,3-13C3]propionate." *FEBS Letters* 412(1):131–37. Retrieved ([http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00764-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00764-3)).
- Joseph, Jamie, Colin Depp, Pei-an B. Shih, Kristen S. Cadenhead, and Geert Schmid-

- Schönbein. 2017. "Modified Mediterranean Diet for Enrichment of Short Chain Fatty Acids: Potential Adjunctive Therapeutic to Target Immune and Metabolic Dysfunction in Schizophrenia?" *Frontiers in Neuroscience* 11(March):1–16. Retrieved (<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2017.00155/full>).
- Kato, Ikuko et al. 2016. "Nutrition and Cancer Prospective Study of Diet and Female Colorectal Cancer: The New York University Women's Health Study Prospective Study of Diet and Female Colorectal Cancer: The New York University Women's Health Study." *Nutrition and Cancer* 28(3):276–81. Retrieved (<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=hnuc20%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1080/01635589709514588>).
- Labianca, R., B. Nordlinger, G. D. Beretta, S. Mosconi, M. Mandalà, et al. 2013. "Early Cólón Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up." *Annals of Oncology* 24(SUPPL.6).
- Labianca, R., B. Nordlinger, G. D. Beretta, S. Mosconi, M. Mandalà, et al. 2013. "Early Cólón Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up." *Annals of Oncology* 24(SUPPL.6).
- Larsson, Susanna C. and Alicja Wolk. 2006. "Meat Consumption and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of Prospective Studies." *International Journal of Cancer* 119(11):2657–64.
- Leufkens, Anke M. et al. 2011. "Cigarette Smoking and Colorectal Cancer Risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study." *Clinical Gastroenterology and Hepatology : The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 9(2):137–44. Retrieved (<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med5&NEWS=N&AN=21029790>).
- Lin, Y. et al. 2016. "NMR-Based Fecal Metabolomics Fingerprinting as Predictors of Earlier Diagnosis in Patients with Colorectal Cancer." *Oncotarget* 16(20):16. Retrieved (<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=medp&AN=27107423>

<http://nt2yt7px7u.search.serialssolutions.com/?sid=OVID:Ovid+MEDLINE%28R%29+Epub+Ahead+of+Print+%3CMay+Week+3+2016%3E&genre=article&id=pmid:27107423&id=doi:10.18632%2Fon>).

- Lopes, Carla. 2000. "Reprodutibilidade E Validação de Um Questionário Semi-Quantitativo de Frequência Alimentar." *Alimentação E Enfarte Agudo Do Miocárdio: Um Estudo de Caso-Controlo de Base Comunitária. (PhD)* 79–115.
- Lopes, Carla, Antti Aro, Ana Azevedo, Elisabete Ramos, and Henrique Barros. 2007. "Intake and Adipose Tissue Composition of Fatty Acids and Risk of Myocardial Infarction in a Male Portuguese Community Sample." *Journal of the American Dietetic Association* 107(2):276–86.
- Macfarlane, George T. and Glenn R. Gibson. 1997. "Carbohydrate Fermentation, Energy Transduction and Gas Metabolism in the Human Large Intestine." Pp. 269–318 in *Gastrointestinal Microbiology*. Retrieved (http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-4111-0_9).
- Macfarlane, George T. and Sandra Macfarlane. 2011. "Fermentation in the Human Large Intestine: Its Physiologic Consequences and the Potential Contribution of Prebiotics." *Journal of Clinical Gastroenterology* 45(3):S120–27. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21992950>).
- Macfarlane, S. and G. T. Macfarlane. 2003. "Regulation of Short-Chain Fatty Acid Production." *The Proceedings of the Nutrition Society* 62:67–72.
- Macfarlane, Sandra and George T. Macfarlane. 2003. "Regulation of Short-Chain Fatty Acid Production." *Proceedings of the Nutrition Society* 62(1):67–72. Retrieved (http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0029665103000120).
- Mamede, Ana Catarina et al. 2011. "The Role of Vitamins in Cancer: A Review." *Nutrition and Cancer* 63(4):479–94.
- Marchesi, Julian R. et al. 2007. "Rapid and Noninvasive Metabonomic Characterization of Inflammatory Bowel Disease." *Journal of Proteome Research* 6(2):546–51.
- Miller, Kimberly D. et al. 2016. "Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2016." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 66(4):271–89. Retrieved

(<http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21149><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27253694>).

- Miller, Terry L. and Meyer J. Wolin. 1996. "Pathways of Acetate , Propionate , and Butyrate Formation by the Human Fecal Microbial Flora . These Include : Pathways of Acetate , Propionate , and Butyrate Formation by the Human Fecal Microbial Flora." 62(5):1589–92.
- O’Keefe, Stephen J. D. 2016. "Diet, Microorganisms and Their Metabolites, and C6lon Cancer." *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrgastro.2016.165>).
- Panagiotakos, Demosthenes B., Christos Pitsavos, and Christodoulos Stefanadis. 2006. "Dietary Patterns: A Mediterranean Diet Score and Its Relation to Clinical and Biological Markers of Cardiovascular Disease Risk." *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 16(8):559–68.
- Paparo, Lorella et al. 2014. "The Influence of Early Life Nutrition on Epigenetic Regulatory Mechanisms of the Immune System." *Nutrients* 6(11):4706–19.
- Park, Yikyung et al. 2005. "Dietary Fiber Intake and Risk of Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies." *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 294(22):2849–57.
- Pericleous, Marinos, Dalvinder Mandair, and Martyn E. Caplin. 2013. "Diet and Supplements and Their Impact on Colorectal Cancer." *Journal of Gastrointestinal Oncology* 4(4):409–23. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3819783&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Van Poppel, Geert and Henk Van Den Berg. 1997. "Vitamins and Cancer." Pp. 195–202 in *Cancer Letters*, vol. 114.
- Potter, Jennifer, Leanne Brown, Rebecca L. Williams, Julie Byles, and Clare E. Collins. 2016. "Diet Quality and Cancer Outcomes in Adults: A Systematic Review of Epidemiological Studies." *International Journal of Molecular Sciences* 17(7):1–30.
- Pryde, Susan E., Sylvia H. Duncan, Georgina L. Hold, Colin S. Stewart, and Harry J. Flint. 2002. "The Microbiology of Butyrate Formation in the Human C6lon -

133.full.pdf." 217:133–39. Retrieved
(<http://femsle.oxfordjournals.org/content/femsle/217/2/133.full.pdf>).

Rae, Caroline, Aurélie D. Fekete, Mohammed A. Kashem, Fatima A. Nasrallah, and Stefan Bröer. 2012. "Metabolism, Compartmentation, Transport and Production of Acetate in the Cortical Brain Tissue Slice." *Neurochemical Research* 37(11):2541–53.

Raskov, Hans, Hans Christian Pommergaard, Jakob Burcharth, and Jacob Rosenberg. 2014. "Colorectal Carcinogenesis-Update and Perspectives." *World Journal of Gastroenterology* 20(48):18151–64.

Ravasco, Paula, I. Monteiro-Grillo, P. M. Vidal, and M. E. Camilo. 2003. "Nutritional Deterioration in Cancer: The Role of Disease and Diet." *Clinical Oncology* 15(8):443–50.

Saura-Calixto, Fulgencio. 2011. "Dietary Fiber as a Carrier of Dietary Antioxidants: An Essential Physiological Function." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(1):43–49.

Schoenberg, M. H. 2016. "Physical Activity and Nutrition in Primary and Tertiary Prevention of Colorectal Cancer." *Visc Med* 32(3):199–204.

Schwingshackl, Lukas and Georg Hoffmann. 2014. "Adherence to Mediterranean Diet and Risk of Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies." *International Journal of Cancer* 135(8):1884–97.

Scoditti, Egeria et al. 2012. "Mediterranean Diet Polyphenols Reduce Inflammatory Angiogenesis through MMP-9 and COX-2 Inhibition in Human Vascular Endothelial Cells: A Potentially Protective Mechanism in Atherosclerotic Vascular Disease and Cancer." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 527(2):81–89. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2012.05.003>).

Sengupta, Shomik, Jane G. Muir, and Peter R. Gibson. 2006. "Does Butyrate Protect from Colorectal Cancer?" *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* 21(1 PART2):209–18.

Shao, Tiejuan et al. 2017. "Combined Signature of the Fecal Microbiome and Metabolome in Patients with Gout." *Frontiers in Microbiology* 8(FEB):1–9.

- Siegel, Rebecca, Carol Desantis, and Ahmedin Jemal. 2014. "Colorectal Cancer Statistics, 2014." *CA: Cancer Journal for Clinicians* 64(1):104–17. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24639052>).
- Smyth, E. C. et al. 2016. "Gastric Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up." *Annals of Oncology* 27(August):v38–49.
- Sofi, Francesco, Claudio Macchi, Rosanna Abbate, Gian Franco Gensini, and Alessandro Casini. 2013. "Mediterranean Diet and Health." *BioFactors* 39(4):335–42.
- Tabernero, Maria, Koen Venema, Annet J. H. Maathuis, and Fulgencio D. Saura-Calixto. 2011. "Metabolite Production during in Vitro Cólonic Fermentation of Dietary Fiber: Analysis and Comparison of Two European Diets." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(16):8968–75.
- Topping, D. L. and P. M. Clifton. 2001. "Short-Chain Fatty Acids and Human Cólonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides." *Physiol Rev* 81(3):1031–64. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427691>).
- Trichopoulou, Antonia et al. 2014. "Definitions and Potential Health Benefits of the Mediterranean Diet: Views from Experts around the World." *BMC Medicine* 12:112. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25055810><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4222885>).
- Tuyns, A. J. 2001. "Alcool et Cancer." *Pathologie Biologie* 49(9):759–63.
- Vargas, a. J. and P. a. Thompson. 2012. "Diet and Nutrient Factors in Colorectal Cancer Risk." *Nutrition in Clinical Practice* 27(August):613–23.
- La Vecchia, Carlo and Carlo La Vecchia. 2004. "Mediterranean Diet and Cancer." *Public Health Nutrition* 7(7):965–68. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15482626>).
- Veselkov, Kirill A. et al. 2009. "Recursive Segment-Wise Peak Alignment of Biological ¹H NMR Spectra for Improved Metabolic Biomarker Recovery." *Analytical Chemistry* 81(1):56–66.

Vital, M. et al. 2013. "A Gene-Targeted Approach to Investigate the Intestinal Butyrate-Producing Bacterial Community." *Microbiome* 1(1):8. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24451334>).

Wong, Celestine, Philip J. Harris, and Lynnette R. Ferguson. 2016. "Potential Benefits of Dietary Fibre Intervention in Inflammatory Bowel Disease." *International Journal of Molecular Sciences* 17(6).

Wong, J. M., R. de Souza, C. W. Kendall, A. Emam, and D. J. Jenkins. 2006. "Cólonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids." *J Clin Gastroenterol* 40(3):235–43. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16633129).

1. Imagem da capa retirada de: <http://www.kikos.com.br/sejafit/a-importancia-da-fibra-alimentar/> e consultada em 6 de Junho de 2016

10. Anexos

Anexo 1: Tabela TMN de cancros gástricos segundo classificação AJCC. Adaptado de Smyth et al. 2016

Tumor primário (T)		Linfo-nódulos regionais (N)		Metástases à distância (M)	
Tx	Sem acesso ao tumor primário	Nx	Sem acesso a nódulos regionais	M0	Sem metástase à distância
T0	Sem evidência de tumor primário	N0	Sem metástase em nódulos regionais	M1	Com metástase à distância ou citologia do peritoneu positiva
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria	N1	Metástase em 1-2 linfo-nódulos regionais		
T1a	Tumor invade lâmina própria ou mucosa muscular	N2	Metástase em 3-6 linfo-nódulos regionais		
T1b	Tumor invade submucosa	N3	Metástase em 7 ou mais linfo-nódulos regionais		
T2	Tumor invade musculatura própria	N3a	Metástase em 7-15 linfo-nódulos regionais		
T3	Tumor penetra em tecido conectivo sem invasão visceral do peritoneu ou estruturas adjacentes	N3b	Metástase 16 ou mais linfo-nódulos regionais		
T4	Tumor invade peritoneu visceral ou estruturas adjacentes				
T4a	Tumor invade peritoneu visceral				
T4b	Tumor invade estruturas adjacentes				

Anexo 2: Estádios anatómicos/prognósticos segundo classificação AJCC. Adaptado de Smyth et al. 2016

Estádio	Estádio T	Estádio N	Estádio M
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio IA	T1	N0	M0
Estádio IB	T2	N0	M0
Estádio IB	T1	N1	M0
Estádio IIA	T3	N0	M0
Estádio IIA	T2	N1	M0
Estádio IIA	T1	N2	M0
Estádio IIB	T4a	N0	M0
Estádio IIB	T3	N1	M0
Estádio IIB	T2	N2	M0
Estádio IIB	T1	N3	M0
Estádio IIIA	T4a	N1	M0
Estádio IIIA	T3	N2	M0
Estádio IIIA	T2	N3	M0
Estádio IIIB	T4b	N0-1	M0
Estádio IIIB	T4a	N2	M0
Estádio IIIB	T3a	N3	M0
Estádio IIIC	T4b	N2-3	M0
Estádio IIIC	T4a	N3	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Anexo 3: Parecer favorável Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

COMISSÃO DE ÉTICA DA FMUC

Of. Refª **117-CE-2014**

Data 22/12/2014

C/C aos Exmos. Senhores
Investigadores e co-investigadores

Exmo Senhor
Prof. Doutor Joaquim Neto Murta
Director da Faculdade de Medicina de
Universidade de Coimbra

Assunto: Pedido de parecer à Comissão de Ética - Projecto de Investigação autónomo (refª CE-112/2014).

Investigador(a) Principal: Maria Filomena Rabaça Roque Botelho

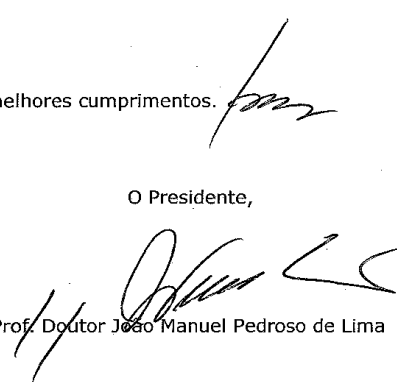
Co-Investigador(es): Rosa Coelho, Guilherme Macedo, Ana Margarida Coelho Abrantes, Lélita Santos e Alexandra Fernandes

Título do Projecto: "Da nutrição à clínica: o papel da microflora e do microbioma intestinal na patologia intestinal"

A Comissão de Ética da Faculdade de Medicina, após análise do projecto de investigação supra identificado, decidiu emitir o parecer que a seguir se transcreve: "**Parecer Favorável**".

Queira aceitar os meus melhores cumprimentos.

O Presidente,


Prof. Doutor João Manuel Pedroso de Lima

GC

SERVIÇOS TÉCNICOS DE APOIO À GESTÃO - STAG • COMISSÃO DE ÉTICA

Pólo das Ciências da Saúde • Unidade Central

Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-354 COIMBRA • PORTUGAL

Tel.: +351 239 857 707 (Ext. 542707) | Fax: +351 239 823 236

E-mail: comissoaetica@fmed.uc.pt | www.fmed.uc.pt

Anexo 4: Parecer favorável Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

COMISSÃO DE ÉTICA PARA A SAÚDE



Visto / À U.I.D.
para difusão

13/5/2016
Prof. Doutor José Pedro Figueiredo

Director Clínico
C.H.U.C. - EPE

Exmo. Senhor
Prof. Doutor José Pedro Figueiredo
Digmº Director Clínico do CHUC

S/Refº	S/Comunicação	N/Ref. – Ofício n.º	Data
		CES/089	09.05.2016

Assunto: [CHUC-033-16] – *Estudo Observacional "Da nutrição à clínica: o papel da microflora e do microbioma intestinal na patologia intestinal"* – Prof. Doutor Guilherme Tralhão – Serviço de Cirurgia A do CHUC e Prof.ª Doutora Maria Filomena Botelho - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (estudo a ser realizado no Serviço de Cirurgia A do CHUC).
(Entrada do processo na CES a 04/03/2016)

Cumprе informar Vossa Ex.ª de que a Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, reunida em 06 de Maio de 2016, com a presença da maioria dos seus membros, após análise do projeto mencionado em epígrafe e ouvido o relator, emitiu **parecer favorável** à sua realização. Parecer aprovado por unanimidade.

Fundamentação:

O estudo tem como objectivos: 1) Obter as informações nutricionais do indivíduo através da realização de um inquérito alimentar; 2) Caracterizar as amostras fecais em termos de concentração de propionato, acetato e butirato, por espectroscopia por ressonância magnética nuclear; 3) Analisar o microbioma das amostras fecais; 4) Correlacionar os dados anteriores com o diagnóstico obtido após colonoscopia.

Chama-se a atenção do seguinte: no modelo específico da CE, no ponto em que se refere - CONTROLES – Número, está referido, *não se aplica*. Mas depois, no ponto - Indique como serão escolhidos: diz-se - Indivíduos das mesmas faixas etárias que os doentes, preferencialmente com colonoscopia, sem alterações. Parece haver aqui uma contradição.

Contacto:

CHUC - Centro Hospitalar
e Universitário de Coimbra
Praça Prof. Mota Pinto,
3000-075 Coimbra - Portugal
Telefone: +351 239 400 400

Telefone: 239 400 408
Telefax: 239 405 646
E-mail: dirclinica@huc.min-saude.pt

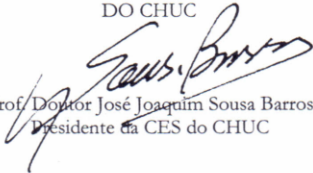
COMISSÃO DE ÉTICA PARA A SAÚDE



Mais se informa que a CES do CHUC deve ser semestralmente actualizada em relação ao desenvolvimento dos estudos favoravelmente analisados e informada da data da conclusão dos mesmos, que deverá ser acompanhada de relatório final.

Com os melhores cumprimentos.

PI'A COMISSÃO DE ÉTICA PARA A SAÚDE
DO CHUC


Prof. Doutor José Joaquim Sousa Barros
Presidente da CES do CHUC

2

A CES do CHUC: Prof. Doutor José Joaquim Sousa Barros; Prof.ª Doutora Maria Fátima Pinto Saraiva Martins; Dr. Mário Rui Almeida Branco; Enf.º Adélio Tinoco Mendes; Prof. Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro; Padre José António Afonso Pais; Dr. José António Feio; Dr. José Alves Grilo Gonçalves; Enf.º Fernando Mateus; Dr. José António Pinheiro; Dra. Cláudia Santos; Dr. Paulo Figueiredo.

Contacto:

CHUC - Centro Hospitalar
e Universitário de Coimbra
Praceta Prof. Mota Pinto,
3000-075 Coimbra - Portugal
Telefone: +351 239 400 400

Telefone: 239 400 408
Telefax: 239 405 646
E-mail: dirclinica@huc.min-saude.pt



CHUC Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E.
Unidade de Inovação e Desenvolvimento
Centro de Ensaios Clínicos

AUTORIZAÇÃO DE PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO

CHUC	033	16
------	-----	----

NOME DO PROJECTO:

DA NUTRIÇÃO À CLÍNICA: O PAPEL DA MICROFLORA E DO MICROBIOMA INTESTINAL NA PATOLOGIA INTESTINAL

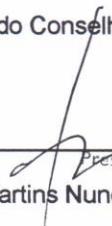
INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Prof.ª Doutora Maria Filomena Botelho e Prof. Doutor José Guilherme Tralhão

Tendo por base o parecer da Comissão de Ética, é autorizada a realização, no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, do Projecto de Investigação supracitado.

DATA: 21/10/16

Presidente do Conselho de Administração


Dr. José Martins Nunes
Presidente do Conselho de Administração
C.H.U.C. - EPE
(Dr. José Martins Nunes)

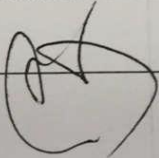
Anexo 5: Parecer favorável Instituto Português de Oncologia de Coimbra

Parecer Final da Comissão de Ética

Trabalho de Investigação nº: 03/TI/16
Data: 11/03/2016

Apreciado na reunião da Comissão de Ética de 21.03.2016
tendo sido (*) deu parecer favorável à realização do trabalho, por unanimidade.

PEL'A COMISSÃO DE ÉTICA



(*) Indicar o resultado da votação de **aprovação** ou **rejeição** e se por unanimidade ou maioria, assinalando e juntando as declarações de voto que houver.

3/3

Anexo 6: Parecer favorável Unidade de Saúde Hospitalar Idealmed de Coimbra
(Endocentro-Idealmed)



Exma. Senhora
Prof.ª Dr.ª Maria Filomena Botelho

PARECER 2016.01

A Comissão de Ética para a Saúde da Idealmed, analisou o projecto de investigação intitulado “Da nutrição à clínica: O papel da microflora e do microbioma na patologia intestinal” e emitir o seguinte parecer:

- No sentido de proteger devidamente os dados pessoais dos indivíduos incluídos neste estudo, é necessário que os mesmos não possam ser identificados, directa ou indirectamente. Ora, o sistema apresentado neste projecto não permite garantir a impossibilidade de identificação, nomeadamente por via indirecta.

Assim, para cumprir o disposto no art.1º, nº 3 da Lei 21/2014, de 16 de Abril e o art.7º, nºs 1 e 2, da Lei 67/98, de 26 de Outubro, será necessário um sistema eficaz de anonimização, de modo a garantir devidamente a impossibilidade de identificação.

Uma vez definido um tal sistema de anonimização, que lhe deverá ser transmitido, a Comissão de Ética para a Saúde da Idealmed aprova o projecto que lhe foi submetido.

Coimbra, 08 de Junho de 2016

O Presidente da Comissão de Ética para a Saúde

A handwritten signature in blue ink, reading 'Henrique Vilaça Ramos'.

(Prof. Doutor Henrique Vilaça Ramos)

Anexo 7: Consentimento informado de acordo assinado pelos participantes

CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM INVESTIGAÇÃO

de acordo com a Declaração de Helsínquia¹ e a Convenção de Oviedo²

Designação do Estudo: O papel da microflora e do microbioma na patologia intestinal: da nutrição à clínica

Eu,

Fui informado que o estudo de investigação acima mencionado se destina a estudar a correlação entre a dieta, a informação recolhida pela análise metabólica e do microbioma das amostras fecais e a presença de patologias no trato intestinal. O investigador principal deste estudo é a Dra. Isabel Cristina do Serviço de Cirurgia do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, EPE (IPOCFG,EPE). Este estudo será conduzido no IPOCFG,EPE.

Sei que neste estudo está prevista a recolha de informações relativas à dieta através de um inquérito alimentar e de amostras de fezes tendo-me sido explicado os procedimentos (recolha tem lugar antes da realização da cirurgia). Sei que as amostras recolhidas de fezes será armazenada para posterior doseamento dos ácidos gordos de cadeia de curta e para análise do microbioma. Também sei que algumas análises não podem ser efectuadas neste hospital e que, por isso, têm de ser realizadas noutras instituições.

Sei que a minha participação é voluntária não havendo lugar a renumeração ou pagamento de deslocações ou contrapartidas. Também sei que o estudo mereceu parecer favorável da Comissão de Ética para a Saúde do IPOCFG,EPE.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper, a qualquer momento, a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos participantes neste estudo são confidenciais e irreversivelmente anonimizados.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado.

Concordo que seja efetuada a colheita da amostra de fezes e recolhida a informação relativa aos hábitos alimentares.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do investigador

Contacto
Data

Nome do doente

Contacto
Data

¹ http://portal.arsnorte.min-saude.pt/portal/page/portal/ARSNorte/Comiss%C3%A3o%20de%20%C3%89tica/Ficheiros/Declaracao_Helsinquia_2008.pdf

² <http://dre.pt/pdf1sdip/2001/01/002A00/00140036.pdf>

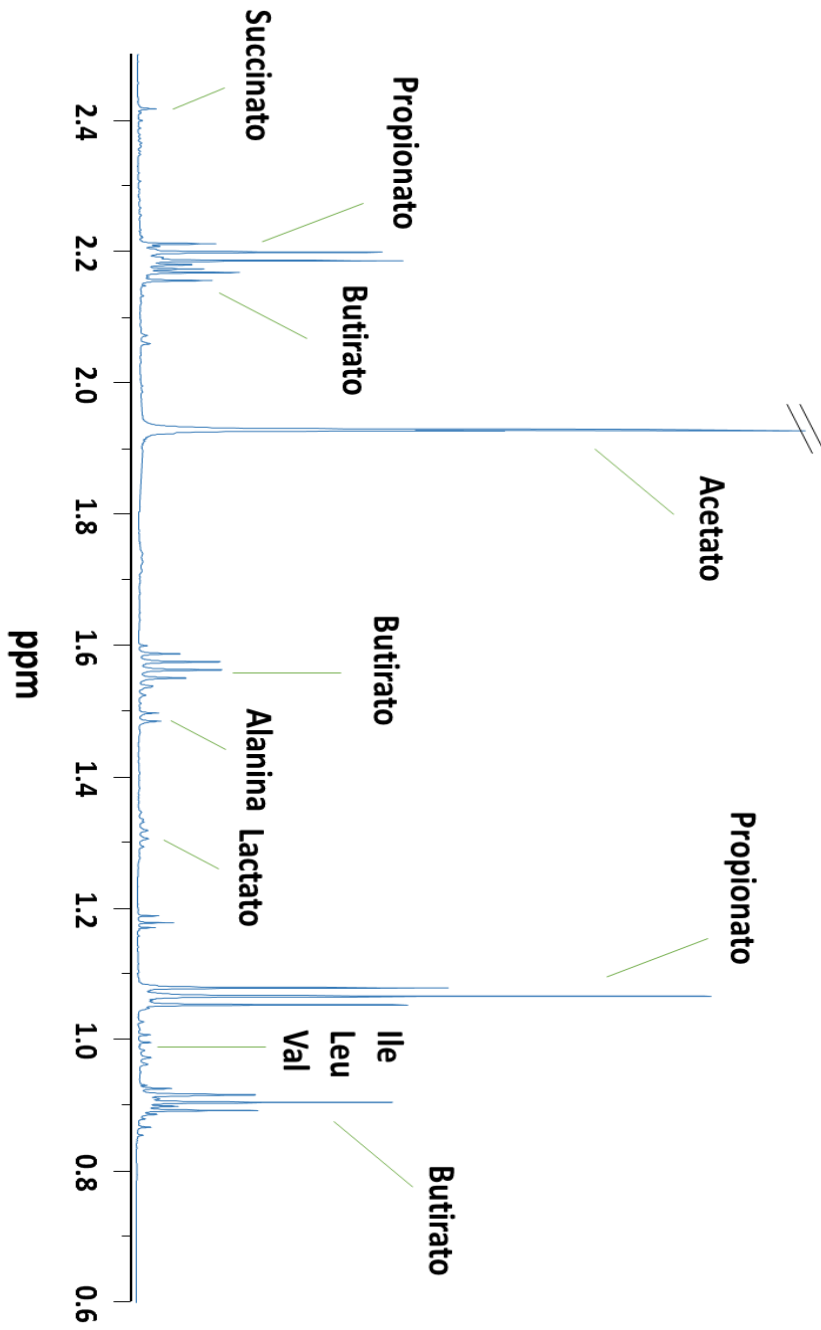
Anexo 8: Tabela de comparação dos protocolos de extracção de metabolitos.

Título do trabalho	Protocolo	Metabolitos analisados	Estudo em que trabalho se foca
"A MICROBIOTA INTESTINAL DE DOENTES JOVENS COM DIABETES MELLITUS TIPO 1: UMA ABORDAGEM PROTEÓMICA E METABOLÓMICA"	<ol style="list-style-type: none"> 1. Adição de cloranfenicol (100µl/10ml) à solução de lavagem NaCl 0,9% (p/v) 2. Sonicação em gelo em períodos de 15, 20 e 30 min 3. Precipitação de proteína por adição de acetona (1350µl acetona: 5g de amostra fecal) 4. Adição de acetona e ácido tricarbóxico (1350µl acetona: 2g ácido tricarbóxico: 5g fezes) -utilização de tampão ureia-tiourea-CHAPS (F500µl por 5g fezes)	Butirato, Propionato, Acetato, Succinato, Formato, Malonato, Feniilacetato, Glicina, Metanol e Acetona	Diabetes mellitus tipo1
"O papel da microflora e do microbioma na patologia intestinal"	Homogeneizar 100mg de amostra fecal numa solução de 0,15M de NaOH em 99% de D ₂ O	propionato, acetato e butirato	Cancro colo-rectal
"Altered gut microbial energy and metabolism in children with non-alcoholic fatty liver disease"	<ol style="list-style-type: none"> 1. Água fecal foi extraída utilizando uma amostra de material fezes descongelada (200 mg) e a adição de cinco volumes de tampão fosfato estéril (Na₂HPO₄ 1,9 mM, NaH₂PO₄ 8,1 mM, pH 7,4). 2. Nos estudos de RMN, 550 µl de extracto fecal foi misturado com 150 µl de uma solução de 9 mM de trimetilsililo propiónico -2,2,3,3-D4 (TSP) 	Etanol, acetato , glucose, fumarato, lactato, alanina, butirato, propionato , valina	Esteatose hepática não-associada ao álcool
"Metabonomics of human fecal extracts characterize ulcerative colitis, Crohn's disease and healthy individuals"	<ol style="list-style-type: none"> 1. Extractos colocados em água com pH acima de 7 2. Água fecal foi extraída de uma amostra de material fecal descongelado e adição de 2 volumes (w/v) de solução salina estéril tamponada de fosfato (PBS, Na₂HPO₄ 1,9 mM, 8,1 mM NaH₂PO₄, 150 mM de NaCl, pH 7,4). 3. Extractos fecais preparados pela mistura de 4 ml de D₂O / 500 lM TSP (propionato de 3-trimetilsililo-2,2,3,3-tetrauterossódio, última TSP = 50 lM) com 40 lM de extracto fecal 	isoleucina, leucina, valina, lisina, alanina, tirosina, fenilalanina, glicina, lactato, butirato, propionato	Doença de Crohn
"Metabonomics of Fecal Extracts Detects Altered Metabolic Activity of Gut Microbiota in Ulcerative Colitis and Irritable Bowel Syndrome"	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aliquotas de 20 mg foram recolhidos e extractos fecais preparados para análise de RMN misturando esses 20 mg e adicionando 1 ml de tampão fosfato salino (1,9 mM Na₂HPO₄, 8,1 mM de NaH₂PO₄, 150 mM de NaCl, e 1 mM de TSP (Sódio 3- (trimetilsilil) propionato-D4)) em D₂O 2. Amostras foram descongeladas e 550 µl de cada filtrado foi transferido para uma D.O. 5 milímetros tubo de RMN 	isoleucina, leucina, valina, lisina, alanina, tirosina, fenilalanina, glicina, lactato, butirato, propionato , iso-butirato, glicina, aspartato, sucinato, glicerol, acetato	Síndrome de intestino irritável
"Metabonomic Analysis of Human Fecal Microbiota: A Comparison of Feces-Derived Communities and Defined Mixed Communities"	<ol style="list-style-type: none"> 1. Cada amostra fecal foi transformada em um 10% (w/v) de pasta fecal através da mistura de 5 g de fezes em 50 ml de meio de crescimento com um Stomacher 	Propionato, iso-butirato, glutamato, feniilacetato, colina, sucinato, acetona, malato, piruvato	

Anexo 9: Tabela de macronutrientes e micronutrientes obtidos por análise do inquérito alimentar.

Macronutrientes	Macronutrientes	Micronutrientes	Outros
Proteínas	Acido Laurico	Retinol	Calorias
Hidratos de carbono	Acido Miristico	Caratenoides	Água
Total de gordura	Acido Palmítico	Tiamina B1	Fibra alimentar
Gordura Saturada	Acido Estearico	Riboflavina B2	Açucars
Gordura monoinsaturada	Acido Araquidico	Niacina B3	Alcool
Gordura polinsaturada	Behenate	Vitamina B6	Cafeína
Colesterol	Acido Miristoleico	Vitamina B12	Água
Hidratos de carbono complexos	Acido Palmitol	Folato	Cinza
Acido Pantoténico	Acido Oleico	Vitamina K	Quantidade total de alimentos
Fibra insolúvel	Acido Eicosanoico	Cobre	
Fibra solúvel	Acido Erucico	Ferro	
Alanina	Acido Linoleico	Magnésio	
Arginina	Acido Linolénico	Manganésio	
Aspartato	Acido Estearidonico	Fósforo	
Cistaina	Acido Araquidónico	Potássio	
Glutamato	Acido Ecosopentanóico	Selénio	
Glicina	Acido docosopentanóico	Sódio intrínseco	
Histidina	Acido docosohexanóico	Sódio intrínseco + adicionado na confeção	
Isoleucina	Acidos gordos Trans	Zinco	
Leucina	Acidos gordos ómega 3	Biotina	
Lisina	Acidos gordos ómega 6	Boro	
Metionina		Cloro	
Fenilalanina		Crómio	
Prolina		Fluor	
Serina		Iodo	
Treonina		Molibidénio	
Triptofano		Cálcio	
Tirosina		Vitamina A	
Valina		Equivalentes de Niacina	
Acido Butírico		Vitamina C	
Acido Caproico		Vitamina D	
Acido Caprílico		Vitamina E	

Anexo 10: Espectro ^1H RMN de extracto aquoso de fezes



Anexo 11: Inquérito alimentar

Por favor, **antes de iniciar o questionário leia as instruções da página anterior.**

Pense durante o último ano quantas vezes por dia, semana ou mês, em média, consumiu cada um dos alimentos referidos. Na coluna referente à quantidade deverá assinalar se sua porção é igual, menor ou maior do que a referida como porção média. Para os alimentos consumidos só em determinadas épocas do ano, anote a frequência com que o alimento é consumido nessa época e assinale com uma cruz (x) na última coluna (Sazonal).

I. P. LÁCTEOS	Frequência alimentar									Quantidade				Sazonal
	Nunca ou <1 mês	1-3 por mês	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6 + por dia	Porção Média	A sua porção é:			
										Menor	Igual	Maior		
1. Leite gordo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 chávena = 250 ml	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
2. Leite meio-gordo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 chávena = 250 ml	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
3. Leite magro	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 chávena = 250 ml	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
4. Iogurte	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Um =125g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
5. Queijo (de qualquer tipo incluindo queijo fresco e requeijão)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia = 30g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
6. Sobremesas lácteas: pudim, aletria e leite creme , etc	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Um ou 1 prato sobremesa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
7. Gelados	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Um ou 2 bolas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
II. OVOS, CARNES E PEIXES	Frequência alimentar									Quantidade				Sazonal
	Nunca ou <1 mês	1-3 por mês	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6 + por dia	Porção Média	A sua porção é:			
										Menor	Igual	Maior		
8. Ovos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Um	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
9. Frango	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 porção ou 2 peças=150g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
10. Peru, coelho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 porção ou 2 peças=150g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
11. Carne vaca, porco, cabrito	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 porção =120g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
12. Fígado de vaca, porco, frango	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 porção = 120g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
13. Língua, mão de vaca, tripas, chispe, coração, rim	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 porção =100g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
14. Fiambre, chouriço, salpição, presunto, etc	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 fatias ou 3 rodela =20g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
15. Salsichas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 médias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
16. Toucinho, bacon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 fatias=50g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
17. Peixe gordo: sardinha, cavala, carapau, salmão,	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 porção =125g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
18. Peixe magro: pescada, faneca, dourada, etc	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 porção =125g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
19. Bacalhau	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 porção =125g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
20. Peixe conserva: atum, sardinhas, etc	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 lata	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
21. Lulas, polvo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 porção =100g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
22. Camarão, amêijoas, mexilhão, etc	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 prato sobremesa =100g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
III. Óleos e Gorduras	Frequência alimentar									Quantidade				Sazonal
	Nunca ou <1 mês	1-3 por mês	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6 + por dia	Porção Média	A sua porção é:			
										Menor	Igual	Maior		
23. Azeite	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 colher sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
24. Óleos: girassol, milho, soja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 colher sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
25. Margarina	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 colher chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
26. Manteiga	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 colher chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>

IV. PÃO, CEREAIS E SIMILARES	Frequência alimentar									Quantidade				Sazonal
	Nunca ou <1 mês	1-3 por mês	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6 + por dia	Porção Média	A sua porção é:			
											Menor	Igual	Maior	
27. Pão branco ou tostas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Um ou 2 tostas = 40g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
28. Pão (ou tostas), integral, centeio, mistura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Um ou 2 tostas = 50g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
29. Broa, broa de avintes	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia = 80g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
30. Flocos cereais (muesli, corn-flakes, chocapic, etc.)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 chávena = 40g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
31. Arroz	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ prato = 100g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
32. Massas: esparguete, macarrão, etc.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ prato = 100g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
33. Batatas fritas caseiras	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ prato = 100g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
34. Batatas fritas de pacote	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pacote pequeno = 30g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
35. Batatas cozidas, assadas, estufadas e puré	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 batatas médias = 160g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
V. DOCES E PASTÉIS	Frequência alimentar									Quantidade				Sazonal
	Nunca ou <1 mês	1-3 por mês	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6 + por dia	Porção Média	A sua porção é:			
											Menor	Igual	Maior	
36. Bolachas tipo maria, água e sal ou integrais	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 bolachas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
37. Outras bolachas ou biscoitos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 bolachas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
38. Croissant, pasteis, bolicao, doughnut ou bolos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Um; 1 fatia = 80g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
39. Chocolate (tablete ou em pó)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 quadrados; 1 colher sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
40. Snacks de chocolate (Mars, Twix, Kit Kat, etc.)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Um	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
41. Marmelada, compota, geleia, mel	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 colher sobremesa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
42. Açúcar	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 colher sobremesa; 1 pacote	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
VI. HORTALIÇAS E LEGUMES	Frequência alimentar									Quantidade				Sazonal
	Nunca ou <1 mês	1-3 por mês	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6 + por dia	Porção Média	A sua porção é:			
											Menor	Igual	Maior	
43. Couve branca, couve lombarda	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ chávena = 75g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
44. Penca, Tronchuda	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ chávena = 65g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
45. Couve galega	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ chávena = 65g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
46. Brócolos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ chávena = 85g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
47. Couve-flor, Couve-bruxelas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ chávena = 65g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
48. Grelhos, Nabiças, Espinafres	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ chávena = 72g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
49. Feijão verde	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ chávena = 65g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
50. Alface, Agrião	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ chávena = 15g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
51. Cebola	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ média = 40g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
52. Cenoura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 média = 80g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
53. Nabo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 médio = 78g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
54. Tomate fresco	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ médio = 63g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
55. Pimento	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ médio = 68g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
56. Pepino	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	¼ médio = 50g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
57. Leguminosas: feijão, grão de bico	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
58. Ervilha grão, Fava	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>

VII. FRUTOS	Frequência alimentar									Quantidade				sazonal
	Nunca ou <1 mês	1-3 por mês	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6 + por dia	Porção Média	A sua porção é:			
											Menor	Igual	Maior	
59. Maça, pêra	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	uma média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
60. Laranja, Tangerinas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 média; 2 médias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
61. Banana	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	uma média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
62. Kiwi	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	um médio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
63. Morangos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
64. Cerejas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
65. Pêssego, Ameixa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 médio; 3 médios	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
66. Melão, Melancia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia média = 150g	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
67. Diospiro	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 médio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
68. Figo fresco, Nêspersas, Damascos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 médios	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
69. Uvas frescas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 cacho médio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
70. Frutos conserva pêssego, ananás	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 metades ou rodela	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
71. Amêndoas, avelãs, nozes, amendoins, pistachio, etc.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ chávena (descascado)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
72. Azeitonas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	6 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
VIII. BEBIDAS E MISCELANEAS	Frequência alimentar									Quantidade				sazonal
	Nunca ou <1 mês	1-3 por mês	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6 + por dia	Porção Média	A sua porção é:			
											Menor	Igual	Maior	
73. Vinho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo=125ml	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
74. Cerveja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 garrafa ou 1 lata=330 ml	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
75. Bebidas brancas: whisky, aguardente, brandy, etc	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 cálice = 40 ml	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
76. Coca-cola, pepsi-cola ou outras colas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 garrafa ou 1 lata=330 ml	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
77. Ice-tea	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 garrafa ou 1 lata=330 ml	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
78. Outros refrigerantes, sumos de fruta ou néctares embalados	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 garrafa ou 1 copo = 250 ml	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
79. Café (incluindo pingo, meia de leite e outras bebidas com café)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 chávena café	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
80. Chá preto e verde	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 chávena	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
81. Croquetes, rissóis, bolinhos de bacalhau, etc.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
82. Maionese	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 colher sobremesa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
83. Molho de tomate, ketchup	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 colher sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
84. Pizza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Meia pizza-normal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
85. Hambúrguer	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Um médio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>
86. Sopa de legumes	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 prato	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>

Existe algum alimento ou bebida que eu não tenha mencionado e que tenha consumido pelo menos 1 vez por semana mesmo em pequenas quantidades, ou numa época em particular. Por ex: **frutos tropicais, sumos de fruta natural, bebidas espirituosas, café de mistura, alheiras, farinheiras, frutos secos (figo, ameixa, damasco), produtos dietéticos, rebuçados, etc.**

Outros Alimentos	Frequência alimentar									Quantidade				sazonal
	Nunca ou <1 mês	1-3 por mês	1 por sem	2-4 por sem	5-6 por sem	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6 + por dia	Porção Média				
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

