

Minyak Ikan dari Limbah Pengalengan Ikan Berpotensi Menurunkan Ekspresi Penanda Inflamasi pada Proses Keganasan Kolon Mencit yang Diinduksi Azoksimetan dan *Dextran Sodium Sulfate*

Kusmardi¹⁾, Aryo Tedjo²⁾

¹⁾Departemen Patologi Anatomi, ²⁾Departemen Kimia Kedokteran
Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia
Jakarta

ABSTRAK

Studi epidemiologi yang menghubungkan diet minyak ikan diet dengan risiko kanker kolorektal telah banyak dilaporkan walaupun hasilnya tidak konsisten. Kebanyakan laporan menunjukkan adanya hubungan yang positif. Penelitian ini dilakukan untuk memahami efek penghambatan minyak ikan yang diperoleh dari sisa produk pengalengan ikan pada ekspresi penanda inflamasi dari preneoplasia kolorektal mencit yang diinduksi oleh azoxymetane (AOM) dan dekstran natrium sulfat (DSS). Dalam penelitian ini, mencit Balb/c diinduksi dengan AOM 10 mg/kg berat badan diikuti dengan pemberian 1% DSS selama seminggu. Minyak ikan diberikan secara oral dengan dosis 1,5 mg, 3 mg, dan 6 mg pada setiap mencit percobaan per hari. Ekspresi PGE2 diamati pada sel epitel kript pada mukosa kolon. Pada bulan kedua, ekspresi PGE2 menurun dengan pemberian dosis sedang (3 mg/hari) dan tinggi (6 mg/hari) minyak ikan. Sedangkan pada bulan ketiga dan keempat, penurunan ekspresi PGE2 diamati karena pemberian minyak ikan dosis rendah, sedang dan tinggi ($p=0,010$ dan $0,005$ m). Kesimpulannya, pemberian dosis sedang minyak ikan pada mencit yang diinduksi AOM/DSS telah menurunkan ekspresi PGE2 pada bulan kedua adalah dosis yang paling efektif.

Kata kunci : azoxymetane, inflamasi, kanker kolorektal, minyak ikan, PGE.

ABSTRACT

Epidemiologic studies of dietary fish oil and risk of colorectal cancer have been inconsistent, and their relation to risk of colorectal cancer has not been evaluated in detail. The study was conducted to understand the inhibitory effect of fish oil on inflammation marker expression in the colorectal preneoplasia of mice induced by azoxymetane (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS). In this study, Balb/c mice was induced by AOM 10 mg/kg body weight followed by administration of 1 % DSS during a week. Fish oil administered orally at a dose of 1.5 mg, 3 mg and 6 mg in each testing mouse per day. The expression of PGE was observed in the crypt epithelial cells of colon mucosa. In the second month, the PGE expression was decreased by medium (3 mg/day) and high (6 mg/day) dose of fish oil. While in the third and fourth month, decreasing in the PGE expression were observed due to administration of low, medium and high doses of fish oil ($p=0.010$ and $0,005$ respectively). In conclusion, administration of medium dose of fish oil in mice induced AOM/DSS has decreased the expression of PGE in the second month was the most effective doses.

Key words : azoxymetane, colorectal cancer, fish oil, inflammation, PGE

PENDAHULUAN

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa terbentuknya kanker kolorektal berhubungan dengan faktor nutrisi. Minyak ikan merupakan bahan yang mengandung *poly-unsaturated fatty acid* (PUFA) ω -3 seperti asam eikosapentaenoat (EPA) dan asam dokosaheksaenoat (DHA) yang berperan dalam menginduksi apoptosis dan diferensiasi, serta menghambat proliferasi sel. Penumpukan PUFA ω -3 pada membran sel diperkirakan mempertahankan fluiditas, ikatan reseptor dengan ligannya, menentukan aktivitas enzim seperti dekarboksilase ornitin (ODC), dan jaras transduksi.¹

Selain berkaitan dengan nutrisi, karsinogenesis kolorektal juga berkaitan dengan radang yang terjadi pada jaringan kolorektal. Kolitis ulseratif dan IBD yang terjadi pada jaringan kolorektal meningkatkan potensi terjadinya kanker kolorektal. Terjadinya radang pada sel epitel kriptol kolorektal menyebabkan pembentukan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) dan siklooksigenasi-2 (COX-2) yang mengakibatkan upregulasi produksi prostaglandin E₂ (PGE₂) dan oksida nitrit (NO). Kedua molekul tersebut menyebabkan peningkatan *reactive oxygen species* (ROS). ROS mengakibatkan berbagai kerusakan pada gen baik protoonkogen maupun gen supresor tumor. Kerusakan yang disebabkan oleh ROS terhadap gen memacu inisiasi perkembangan sel epitel normal menjadi preneoplasia dan neoplasia.² β -katenin merupakan salah satu gen supresor tumor yang berkaitan dengan terjadinya kanker kolorektal. Mutasi pada gen β -katenin mengakibatkan overekspresi protein β -katenin pada sitoplasma dan inti sel epitel kriptol kolorektal.³ Dengan meneliti ekspresi β -katenin sebagai hasil upregulasi produksi iNOs dan COX-2 pada sel epitel kolorektal mencit yang mendapat tambahan minyak ikan, diharapkan dapat diketahui pengaruh minyak ikan pada ekspresi ketiga protein tersebut dalam karsinogenesis kolorektal khususnya yang didahului oleh terjadinya peradangan. Untuk mendapatkan model karsinogenesis kolorektal yang didahului oleh peradangan, mencit diinduksi dengan azoksimetan (AOM), sebagai bahan yang memiliki efek genotoksik, dan *dextran sodium sulfate* (DSS), sebagai senyawa yang memacu terjadinya peradangan.

METODE PENELITIAN**1. Produksi minyak ikan dari limbah pengalengan**

Limah minyak ikan diperoleh dari PT Maya Food Industries, Pekalongan. Limbah ikan sebagai bahan sisa pengalengan dipanaskan untuk menghasilkan minyak ikan dan tepung ikan. Papain juga digunakan sebagai bahan penghancur sisa atau buangan hasil industri pengalengan ikan menjadi bubur ikan atau kosentrat protein hewani. Dengan kemampuan enzim papain tersebut diatas maka penggunaan ini diharapkan mampu memecahkan jaringan protein pengikat (Stroma) yang ada pada daging ikan. Protein stroma merupakan jaringan pengikat yang terdiri dari komponen kolagen dan elastin. Kolagen dalam jumlah banyak bila dipanaskan di dalam air mendidih, maka kolagen akan berubah sifatnya menjadi gelatin yang mampu membentuk gel pada suhu 35-40°C dan akan berfungsi sebagai stabilisator dan dapat mempertahankan sifat emulsifer. Sifat emulsifer yang dimiliki protein ini yang diharapkan dihancurkan oleh enzim papain. Dengan terpecahkannya jaringan pengikat ini diharapkan minyak yang terdistribusi ke dalam berbagai jaringan tubuh termasuk pada seluruh daging ikan dapat keluar dengan mudah ketika dipanasi pada temperatur tertentu.

2. Hewan coba

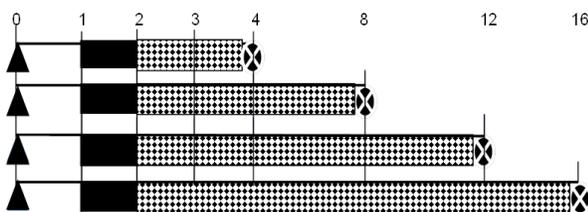
Mencit jantan Balb/C berumur 5 minggu diperoleh, dipelihara dan diberikan perlakuan di Laboratorium Patologi Eksperimental, Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. Hewan dipelihara dan diperlakukan sesuai *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* dari *Animal Care and Use Committee*, dan telah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian dari Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Mencit dipelihara pada kondisi temperatur terkontrol yaitu 23°C, kelembaban 55% dengan siklus 12 jam terang/gelap. Mencit diberi pakan standar pada kelompok kontrol dan kelompok uji. Selain itu, pada kelompok uji diberikan minyak ikan dengan cara pencekakan dengan dosis 1,5 mg, 3 mg dan 6 mg per mencit per hari.

3. Induksi karsinogenesis kolon dengan azoksimetan (AOM) dan dextran sodium sulfate (DSS)

Induksi karsinogenesis kolon mencit dilakukan melalui diinjeksi intraperitoneal mencit dengan AOM yang dilarutkan dalam 0,9% NaCl dengan dosis 10 mg/kg berat badan sekali pemberian. Mencit diberikan makanan standar dan minum air mineral selama satu minggu pasca induksi. Selanjutnya selama satu minggu, minuman diganti dengan air mineral yang mengandung 1% DSS.^{4,5} Protokol penelitian disajikan pada Gambar 1.

4. Preparasi sampel jaringan

Mencit dikorbankan dengan eter setelah 4, 8, 12, dan 16 minggu pasca induksi karsinogenesis dengan AOM. Kolon mencit diambil, sisa kotoran dibersihkan dari lumen kolon dengan air. Jaringan difiksasi menggunakan buffer formalin fosfat 10%.



Gambar 1. Protokol penelitian (▲ AOM 10 mg/kg bb. i.p.; ■ % DSS; ▨ minyak ikan; ⊗ mencit dikorbankan; angka menunjukkan minggu).

5. Pewarnaan PGE

Jaringan dipotong dengan ketebalan 4 µm untuk pewarnaan imunohistokimia. Setelah dilakukan deparafinasi dan rehidrasi, preparat dicelup pada buffer sitrat 0,01 M (pH6,0) di dalam microwave selama 5 menit. Sediaan ditetesi 3% hidrogen peroksida untuk menghilangkan peroksida endogen selama 5 menit pada temperatur kamar. Sediaan diinkubasi dengan antibodi PGE rabbit polyclonal (pengenceran 1:200; Abcam, Inc, Cambridge, MA) dalam PBS selama 2 jam pada suhu kamar dalam humidity chamber, dilanjutkan dengan inkubasi overnight pada 4°C. Sebagai kontrol negatif digunakan N-Universal (Dako). Sediaan kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder yang sesuai selama 1 jam pada suhu kamar yang dilanjutkan dengan inkubasi selama 30 menit dengan HRP-conjugated streptavidin. Protein divisualisasi menggunakan 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) selama 10 menit pada suhu kamar. Sediaan

ditambahkan counterstain dengan hematoksilin Harris, dehidrasi dan dilakukan mounting.

6. Interpretasi pewarnaan imunohistokimia

Eksresi PGE pada membran dan sitoplasma sel epitel kriptas jaringan kolon dinilai secara semikuantitatif menggunakan kriteria Walker. Eksresi dinyatakan dalam skor sebagai berikut: 0=negatif, 1=kurang dari 10% sel terwarnai, 2=10-50% sel terwarnai, dan 3=lebih dari 50% sel terwarnai. Dari sepuluh lapang pandang dengan pembesaran 400x pada sediaan kolon, skor ekspresi dijumlah kemudian dihitung reratanya.⁶ Sebagai kontrol positif pada pewarnaan PGE digunakan jaringan tonsil. Sedangkan sebagai kontrol negatif ketiga jenis pewarnaan tersebut, pada sediaan jaringan yang sama, tidak dilakukan penambahan antibodi primer pada tahap pewarnaan imunohistokimia.

7. Analisis data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian tiga dosis minyak ikan (1,5; 3 dan 6 mg/hari) serta pengaruh lama pemberian minyak ikan (1, 2, 3, dan 4 bulan) terhadap karsinogenesis kolorektal yang dilihat dari penilaian terhadap ekspresi PGE, dilakukan uji analisis varians dua arah. Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok dilakukan uji multiple comparison Tukey. Sebelum dilakukan analisis varian, kenormalan distribusi data diuji menggunakan uji Levene, begitu pula kehomogenan variansnya diuji menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov.

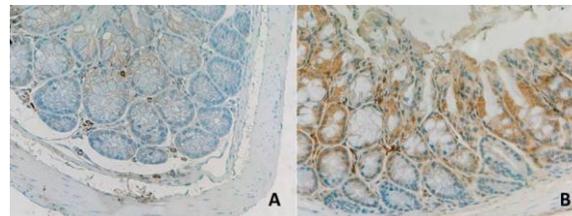
HASIL DAN PEMBAHASAN

Melalui uji statistik menggunakan analisis varians dua arah, ditunjukkan perbedaan yang bermakna antara ekspresi PGE dari setiap bulan pengambilan sampel jaringan kolon mencit. Juga ditunjukkan terdapat perbedaan ekspresi PGE berdasarkan dosis minyak ikan yang digunakan. Interaksi antara kedua variabel tersebut tidak ditemukan (p=0,591). Melalui uji multiple comparison Tukey, ditunjukkan bahwa pada kelompok kontrol tidak terjadi perubahan ekspresi PGE. Pada dosis rendah dan sedang terjadi penurunan ekspresi PGE yang dijumpai pada bulan keempat. Sedangkan pada dosis tinggi, penurunan ekspresi PGE yang berbeda nyata terjadi mulai bulan ketiga. Bila dilihat dari perbandingan ekspresi PGE setiap bulannya, maka pada bulan pertama belum dijumpai perbedaan yang nyata ekspresi PGE. Pada

bulan kedua baru ditemukan ekspresi PGE yang berbeda nyata dimulai sejak penggunaan dosis sedang. Begitu pula pada bulan ketiga dan keempat dimana penggunaan dosis sedang sudah dapat menurunkan ekspresi PGE (Tabel 1). Dari penjelasan tersebut disimpulkan bahwa pemberian minyak ikan mulai menunjukkan penurunan ekspresi PGE sejak bulan kedua dengan menggunakan dosis sedang (3 mg/hari).

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya bahwa pemberian asam lemak yang terdapat pada minyak ikan memiliki efek penghambatan pada mencit yang diinduksi terjadinya kanker kolon.⁷ Penelitian lain menggunakan 1,2-dimetilhidrazin (DMH) dalam menginduksi terjadinya kanker kolorektal pada tikus juga memberikan hasil penurunan ekspresi penanda radang pada sel epitel kriptal kolon dan meningkatkan apoptosis sel epitel kriptal setelah pemberian pakan PUFA ω-3.⁸ Pemberian ω-3 menurunkan penanda radang pada sel kanker kolorektal yang terjadi pada tikus setelah induksi dengan AOM. Penurunan ini terjadi karena PGE

yang merupakan substansi yang dihasilkan pada proses radang mengalami penurunan produksi sejalan dengan menurunnya derajat radang. Pada karsinogenesis kanker kolorektal melalui jalur radang, hambatan radang oleh pemberian ω-3 menyebabkan proses karsinogenesis selanjutnya tidak terjadi.⁹



Gambar 2 Ekspresi PGE pada jaringan mukosa kolon mencit yang diinduksi AOM dan DSS. A. Ekspresi PGE skor 0 (negatif) dari jaringan kolon kelompok pemberian minyak ikan dosis besar pada bulan keempat, B. Skor 3 dari kelompok kontrol bulan keempat (D) (pembesaran 400x).

Tabel 1. Ekspresi PGE pada sel epitel kriptal kolon mencit yang diinduksi AOM dan DSS bulan kesatu sampai keempat.

Ekspresi	Kelompok	Bulan ke-1	Bulan ke-2	Bulan ke-3	Bulan ke-4	p
PGE	kontrol	29,38±3,26 ^{ab}	33,20±4,26 ^d	33,83±4,25 ^c	30,00±2,34 ^d	0,423
	dosis rendah	33,20±2,41 ^{bb}	30,24±5,34 ^{bb}	28,22±4,19 ^{bcAB}	20,54±4,23 ^{abA}	0,045
	dosis sedang	20,42±2,78 ^{abB}	19,97±2,57 ^{abAB}	16,43±3,42 ^{abAB}	12,65±4,76 ^{abA}	0,024
	dosis tinggi	14,22±2,87 ^{abAB}	17,89±4,65 ^{ab}	10,53±2,41 ^{abA}	12,44±2,56 ^{abA}	0,010
p		0,023	0,042	0,001	0,005	

Keterangan: dosis rendah (1,5 mg/hari), dosis sedang (3 mg/hari), dosis tinggi (6 mg/hari),^{A,B} menunjukkan kemaknaan rerata per bulan (komparasi horizontal),^{a,b,c} menunjukkan kemaknaan rerata antar kelompok (komparasi vertikal) dengan p < 0,05 melalui uji *multiple comparison* Tukey.

Adanya korelasi antara karsinogenesis kolorektal dengan peningkatan ekspresi penanda inflamasi menggunakan mencit transgenik telah dilaporkan (Ishikawa & Herschman 2010). Penelitian lain yang memberikan hasil selaras dengan penelitian yang telah dilakukan ini menunjukkan bahwa ekspresi penanda inflamasi pada sel epitel kolon mencit transgenik dihambat oleh pemberian PUFA ω-3.⁷ Pemberian pakan mengandung asam lemak desaturasi pada mencit transgenik kolitis menunjukkan ekspresi PGE menurun.⁸ Penambahan minyak ikan dalam diet berpengaruh dalam mengurangi PGE2 dan PGE3 dimana kedua mediator ini berperan dalam peradangan dan pada peningkatan apoptosis sel kolon.

Namun demikian, penelitian menggunakan sampel jaringan kolon pasien kanker

kolorektal menunjukkan tidak ada korelasi antara ekspresi COX-2 dengan ketahanan hidup pasien kanker. Ternyata hanya 37% dari jaringan penderita kanker yang diteliti yang memiliki ekspresi COX-2 positif.¹⁰ Laporan yang lebih kontroversi menggunakan mencit transgenik, menyatakan bahwa COX-2 justru merangsang tahap progresi tumor dan tidak berpengaruh pada tahap inisiasi.¹¹ Peningkatan ekspresi COX-2 pada penelitian ini yang terjadi pada kelompok kontrol dengan perkembangan waktu, menunjukkan bahwa tahap inisiasi sudah dilewati.

Penelitian yang dilakukan ini menunjukkan pemberian minyak ikan menurunkan reaksi radang. Dari beberapa kepustakaan disebutkan bahwa minyak ikan yang mengandung asam lemak tidak jenuh memiliki potensi menurunkan

derajat radang pada *inflammatory bowel diseases/IBD*.^{7,11} Minyak ikan dapat mempengaruhi sel yang berperan dalam reaksi radang melalui berbagai mekanisme, yaitu: mempengaruhi kompleks lipid, lipoprotein, hormon dan metabolit yang berperan dalam reaksi radang. Kandungan PUFA yang terdapat pada minyak ikan berpengaruh langsung terhadap sel radang melalui reseptor asam lemak yang terdapat pada permukaan sel maupun intraseluler yang akhirnya berpengaruh pada faktor transkripsi seperti *peroxisome proliferator activated receptors* (PPARs). Selain itu, PUFA dapat dioksidasi melalui proses enzimatis maupun nonenzimatis yang derifatnya bekerja langsung pada reseptor permukaan sel radang.⁹

Dilaporkan bahwa perubahan dari asam linoleat (LA) menjadi asam arakhidonat (AA) dihambat oleh EPA, DHA dan ALA yang terkandung dalam minyak ikan. AA berkompetisi dengan EPA yang merupakan substrat COX-2 dalam pembentukan PG dan tromboksan (TX), dan substrat dari enzim lipooksigenase (LOX) dalam pembentukan leukotrin.¹² PG, TX dan leukotrin merupakan protein yang berperan dalam reaksi radang dan proliferasi, namun ketiga protein tersebut yang dibentuk dari EPA, kurang memiliki kemampuan merangsang reaksi radang dan proliferasi. Selain itu EPA dan DHA memiliki kemampuan menghambat produksi COX-2 sehingga menghambat produksi ketiga protein proinflamasi dan proproliferasi tersebut. Telah diketahui bahwa reaksi radang dan proliferasi berhubungan dengan terjadinya tumor.^{13,14}

Eksresi yang ditunjukkan oleh tiga protein penanda yang berhubungan dengan karsinogenesis kolorektal, secara keseluruhan menunjukkan pemberian minyak ikan mengurangi ekspresi ketiga jenis protein tersebut. Keseragaman tersebut menunjukkan adanya hubungan antara ketiga protein tersebut. Hubungan tersebut dijelaskan berikut. NO dan PG adalah mediator radang yang mempengaruhi patogenesis radang pada kolon seperti kolitis dan IBD. Pada keadaan terjadi kenaikan kadar NO dan PG, terjadi juga peningkatan ekspresi iNOS dan COX-2 pada sel epitel mukosa kolon.¹⁵ Begitu pula pada keganasan kolon manusia yang didahului oleh terjadinya radang dan pada mencit yang diinduksi DSS, terjadi peningkatan ekspresi iNOS dan COX-2 pada sel epitel kolon.² Penjelasan yang bisa

digunakan untuk menerangkan hal ini adalah terdapatnya interaksi antara NO endogen dengan COX-2, dan antara *pathway* β -katenin/APC dengan COX-2. β -Catenin/APC memegang peran dalam penginduksi peningkatan COX-2 yang diperantarai NO pada sel epitel kolon. Kompleks β -katenin/Tcf-4 mengaktifkan faktor transkripsi PEA3 yang selanjutnya merangsang ekspresi COX-2.^{16,17,18}

KESIMPULAN

Pemberian minyak ikan pada mencit yang diinduksi AOM dan DSS yang ditujukan agar mengalami perkembangan preneoplasia kolorektal melalui jalur radang, menurunkan ekspresi penanda inflamasi pada sel epitel kript mukosa kolon. Penurunan ekspresi kedua protein tersebut tercapai pada bulan kedua pemberian minyak ikan dengan dosis sedang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan kepada Kementerian Ristek dan Pendidikan Tinggi yang memberikan dana riset melalui Program Hibah Pengembangan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi tahun 2016, Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Universitas Indonesia, PT Maya Food Industries yang telah memfasilitasi pembuatan minyak ikan dari sisa pengalengan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Moreira AP, Sabarense CM, Dias CM, Lunz W, Natali AJ, Glória MB, Peluzio MC. Fish oil ingestion reduces the number of aberrant crypt foci and adenoma in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42(12): 1167-72.
2. Ridnour LA, Thomas DD, Switzer C, Flores-Santana W, Isenberg JS, Ambros S, *et al.* Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. *Nitric Oxide.* 2008; 19:73-6.
3. Gochman E, Mahajna J, Shenzer P, Dahan A, Blatt A, Elyakim R, Reznick A. The expression of iNOS and nitrotyrosine in colitis and colon cancer in humans. *Acta Histochem.* 2012; 114:827-35.
4. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Nakagama H, Tanaka T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogen-

- esis in mice. *Carcinogenesis*. 2006; 27: 162-9.
5. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*. 2003; 94: 965-973.
 6. Walker RA. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathol*. 2006; 49(4): 406-10.
 7. Gravaghi C, La Perle KMD, Ogrodzki P, Kang JX, Quimby F, *et al*. Cox-2 expression, PGE2 and cytokines production are inhibited by endogenously synthesized n-3 PUFAs in inflamed colon of fat-1 mice. *J Nutr Biochem*. 2011; 22: 360-5.
 8. Jia Q, Lupton JR, Smith R, Weeks BR, Callaway E, *et al*. Reduced colitis-associated colon cancer in fat-1 (n-3 fatty acid desaturase) transgenic mice. *Cancer Res*. 2008; 68: 3985-91.
 9. Vanamala J, Glagolenko A, Yang P, Carroll RJ, Murphy ME, *et al*. Dietary fish oil and pectin enhance colonocyte apoptosis in part through suppression of PPAR{delta}/PGE2 and elevation of PGE3. *Carcinogenesis*. 2008; 29: 790-6 .
 10. Shin IY, Sung NY, Lee YS, Kwon TS, Si Y, Lee YS, Oh ST. The expression of multiple proteins as prognostic factors in colorectal cancer: cathepsin D, p53, COX-2, EGFR, C-erbB-2, and Ki-67. *Gut Liver*. 2014; 8(1): 13-23.
 11. Al-Salihi MA, Terrece PA, Doan T, Reichert EC, Rosenberg DW, *et al*. Transgenic expression of COX-2 in mouse intestine epithelium is insufficient to initiate tumorigenesis but promotes tumor progression. *Cancer*. 2009; 273: 225-32.
 12. Sasazuki S, Inoue M, Iwasaki M. Intake of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids and development of colorectal cancer by subsite: Japan Public Health Center-based prospective study. *Int J Cancer*. 2011; 129: 1718-29.
 13. Butler LM, Wang R, Koh W-P, Stern MC, Yuan J-M, Yu MC. Marine n-3 and saturated fatty acids in relation to risk of colorectal cancer in Singapore Chinese: A prospective study. *Int J Cancer*. 2009; 124(3): 678-86.
 14. Daniel CR, McCullough ML, Patel RC, Jacobs EJ, Flanders WD, Thun MJ, *et al*. Dietary intake of ω -6 and ω -3 fatty acids and risk of colorectal cancer in a prospective cohort of U.S. men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18(2): 23-42.
 15. Ishikawa T-O, Herschman HR. Tumor formation in a mouse model of colitis-associated colon cancer does not require COX-1 or COX-2 expression. *Carcinogenesis*. 2010; 31: 729-36.
 16. Sergei IG, Florian RG, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140: 883-99.
 17. Serafino A, Moroni N, Zonfrillo M, Andreola F, Mercuri L, Nicotera G, *et al*. WNT-pathway components as predictive markers useful for diagnosis, prevention and therapy in inflammatory bowel disease and sporadic colorectal cancer. *Oncotarget*. 2014; 5(4): 978-92.
 18. Burlamaqui IM, Dornelas CA, Valenca JT, Mota DM, Mesquita FJ, *et al*. Effect of a hyperlipidic diet rich in omegas 3, 6 and 9 on aberrant crypt formation in rat colonic mucosa. *Acta Cir Bras*. 2012; 27(1): 30-6.