Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Efeito comparativo de dietas ricas em linhaça
marrom e dourada no câncer de mama**

Alice Gomes Lichtenthäler

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição em Saúde
Pública para obtenção do título de
Mestre em Nutrição em Saúde Pública.**

**Orientador: Prof. Dr. José Alfredo
Gomes Arêas**

São Paulo

2009

Efeito comparativo de dietas ricas em linhaça marrom e dourada no câncer de mama

Alice Gomes Lichtenthäler

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição em Saúde
Pública da Faculdade de Saúde Pública
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Nutrição em Saúde Pública.**

**Orientador: Prof. Dr. José Alfredo
Gomes Arêas**

São Paulo

2009

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos ou científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

Agradecimentos

- ❖ À FAPESP pelo apoio financeiro.
- ❖ Ao meu orientador prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas pela oportunidade.
- ❖ A todo pessoal do laboratório, em especial à Rosana, Karol, Karen, Bruna e Renée.
- ❖ À Pazze Indústria de Alimentos Ltda. por fornecer a linhaça utilizada na execução deste trabalho.
- ❖ À Vanessa Freitas e à profa. Dra. Glaucia Santelli pelo fornecimento das células.
- ❖ Ao prof. Dr. Thomas Ong e à Letícia Okamoto por terem colaborado conosco na análise de apoptose; e ao pessoal do seu laboratório.
- ❖ Ao meu avô por ter se envolvido significativamente ($p < < < 0,05$) na análise dos resultados. Muito obrigada vô!!!!!!!
- ❖ A toda minha família (pai, mãe, irmão, tia Isolda, vó Célia, vó Ione e Marta) e amigos, inclusive ao Paulo, que estiveram comigo durante todo ou parte do desenvolvimento deste estudo.
- ❖ Um agradecimento especial à minha avó Ione e à Dra. Ângela Maggio da Fonseca, sem as quais não sei se teria encontrado solução para o fornecimento do hormônio aos animais.
- ❖ À profa. Lilian U. Thompson por esclarecer prontamente minhas dúvidas em relação ao experimento.
- ❖ À Neide e aos funcionários do biotério do IPEN.
- ❖ À profa. Nágila Damasceno e ao prof. Thomas Ong por suas sugestões na qualificação do projeto de pesquisa.
- ❖ Às profas. Maria Lúcia Zaidan Dagli e Deborah Helena Markowicz Bastos por comporem a banca de defesa.

RESUMO

Lichtenthäler AG. Efeito comparativo de dietas ricas em linhaça marrom e dourada no câncer de mama [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2009.

Introdução. O câncer é responsável por uma das principais causas de morte entre mulheres e nota-se um aumento na sua incidência. A linhaça tem sido preconizada como capaz de reduzir o risco do câncer de mama. **Objetivo.** Verificar o efeito de dietas ricas em linhaça marrom e dourada na evolução do câncer de mama. **Métodos.** Células cancerosas mamárias humanas (tipo MCF-7) foram inseridas no tecido subcutâneo de camundongos fêmeas nude. Quando os tumores já puderam ser claramente identificados, após 7 semanas, os animais constituíram 3 grupos, um com dieta controle e os outros dois com as variedades de linhaça marrom e dourada. As sementes de linhaça foram moídas para produção de farinhas que foram utilizadas na suplementação das dietas oferecidas aos animais. O crescimento dos tumores implantados nos animais foi acompanhado por oito semanas. **Resultados.** As linhaças das variedades marrom e dourada mostraram-se eficazes na diminuição da taxa de crescimento dos tumores MCF-7, não sendo verificada nenhuma diferença entre elas. **Conclusão.** Ambas variedades de linhaça reduziram o crescimento dos tumores. Assim, o consumo de linhaça deve ser estimulado a fim de diminuir a incidência do câncer de mama.

Descritores: Ácido α -linolênico. Camundongos nude. Câncer de mama. Fitoestrógenos. Lignana. Linhaça. MCF-7.

ABSTRACT

Lichtenthäler AG. Efeito comparativo de dietas ricas em linhaça marrom e dourada no câncer de mama / The effect of diets rich in brown and golden flaxseed on breast cancer [dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2009.

Introduction. Breast cancer is one of the main causes of death among women and an increase in its incidence has been noticed. There is evidence that flaxseed intake could reduce breast cancer risk. **Objective.** To verify the effect of brown and golden flaxseed rich diets on breast cancer. **Methods.** Cancer cells of the MCF-7 line were injected subcutaneously into athymic mice. After seven weeks, when tumors were already established, the animals were randomly divided in three groups: (1) control, fed on a basal diet; (2) and (3) mice fed on the basal diet supplemented with 10% brown and with 10% golden flaxseed, respectively. Flaxseed was freshly ground for production of the diets offered to the animals. Tumor growth was monitored weekly for eight weeks. **Results.** The two varieties of flaxseed inhibited tumor growth, without any difference between them. **Conclusion.** Both flaxseed varieties were able to reduce tumor growth. Therefore, their intake should be stimulated with the aim to reduce breast cancer incidence.

Keywords: α -linolenic acid. Breast cancer. Flaxseed. Lignan. MCF-7. Nude mice. Phytoestrogen.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1.1 Câncer	1
1.1.2 Nutrição e câncer.....	3
1.1.3 Epidemiologia do câncer de mama	4
1.1.4 Câncer de mama e linhagem	5
1.1.4.1 Estudos experimentais em animais	15
1.1.4.2 Ensaio clínico	18
1.1.5 justificativa	18
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo geral	19
1.2.2 Objetivos específicos	19
CAPÍTULO 2: EXPERIMENTO PILOTO.....	20
2.1 INTRODUÇÃO E OBJETIVO	20
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	20
2.2.1 Linhagem e cultura celular	21
2.2.2 Animais e implante das células tumorais.....	21
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
2.4 CONCLUSÃO.....	24
CAPÍTULO 3: LINHAÇAS E DIETAS	25
3.1 INTRODUÇÃO.....	25
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.2.1 Composição centesimal	25

3.2.2 Perfil de ácidos graxos	26
3.2.3 Produção das dietas	27
3.2.4 Análise dos resultados.....	28
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
CAPÍTULO 4: EXPERIMENTO	32
4.1 MODELO EXPERIMENTAL.....	32
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.2.1 Cultura da linhagem de células tumorais.....	35
4.2.2 Implante das células tumorais nos animais.....	35
4.2.3 Animais e dietas	37
4.2.4 Acompanhamento da evolução dos tumores	38
4.2.5 Comitê de ética	38
4.2.6 Análise dos dados.....	38
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.3.1 Adesivos de estradiol, consumo de ração e peso dos animais.....	40
4.3.2 Efeito das dietas no tamanho dos tumores.....	41
CAPÍTULO 5: ANÁLISE DE APOPTOSE NOS TUMORES	47
5.1 INTRODUÇÃO.....	47
5.2 MATERIAL E MÉTODO	49
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
CAPÍTULO 6: DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO	53
6.1 DISCUSSÃO GERAL	53
6.2 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

Anexos	63
Anexo 1 – Certificado de irradiação das rações.	63
Anexo 2 – Parecer do comitê de ética em pesquisa.....	64
Currículo Lattes.....	65
Da autora	65
Do orientador	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Datas em que os adesivos foram colocados nos camundongos	23
Tabela 2. Composição de ingredientes nas dietas (g/kg)	28
Tabela 3. Composição centesimal das linhaças marrom e dourada	29
Tabela 4. Perfil de ácidos graxos nas linhaças e dietas (%)	30
Tabela 5. Composição centesimal das três dietas	31
Tabela 6. Dias com adesivo em cada grupo por semana	41
Tabela 7. Teste t de comparação dos tamanhos dos tumores entre as semanas	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das lignanas mamíferas e seus precursores comparada a do 17 β -estradiol (Thompson 2003a).....	10
Figura 2. Crescimento tumoral a partir da quinta semana de experimento	24
Figura 3. Q-Q plot dos desvios obtidos das medidas em triplicatas realizadas nos tumores.....	42
Figura 4. Evolução do crescimento médio dos tumores MCF-7 em cada grupo. Os coeficientes lineares e angulares das retas aproximadas para os pontos são os valores de a e b, respectivamente	44
Figura 5. Evolução do crescimento médio dos tumores MCF-7 em cada grupo. Os respectivos coeficientes angulares das retas aproximadas para os pontos estão representados por $b \pm$ erro padrão de b. As linhas tracejadas representam os limites dos erros dos coeficientes angulares de cada reta	45
Figura 6. Padrão apoptótico característico.....	49
Figura 7. Eletroforese do DNA dos tumores MCF-7.....	52

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Câncer

Células cancerosas quebram as regras mais básicas de comportamento pelo qual organismos multicelulares são construídos e mantidos, e elas exploram todo tipo de oportunidade para fazer isto.

(Alberts et al. 2002)

Câncer é o resultado de um acúmulo de alterações genéticas, algumas podendo ser adquiridas e outras herdadas, resultando no aparecimento de tumores. Os genes que estão alterados são aqueles envolvidos em processos celulares normais e fundamentais, tais como, regulação do ciclo celular, sinalização e diferenciação. Tumores também apresentam uma série de alterações epigenéticas, caracterizadas como modificações na expressão gênica em que são observadas diferentes consequências fenotípicas, sem haver nenhuma mudança na sequência de DNA. Diversos agentes ambientais causam anormalidades genéticas, como vírus, químicos, dieta e radiação (Savage 1999, Beltrão-Braga *et al.* 2004).

Os processos de carcinogênese pelo qual uma célula normal é transformada em uma maligna dependem de classes de genes e sistemas genéticos que foram alterados (Savage 1999).

A homeostase da maior parte das células resulta do equilíbrio entre processos opostos. A regulação do ciclo celular (que determina a taxa de replicação das células) é um balanço entre proteínas que induzem a replicação celular e proteínas que detêm

a replicação celular. Um dos objetivos desta regulação é garantir que o DNA seja totalmente replicado (Savage 1999, Brentani 2004).

O mecanismo desenvolvido na célula de forma que a progressão do ciclo aconteça apropriadamente resulta no estabelecimento de uma série de pontos de checagem que impedem a célula de entrar em uma nova fase sem ter completado a anterior. A ocorrência de lesões no DNA requer parada temporária da progressão no ciclo para haver tempo para o reparo e prevenir a fixação de mutações deletérias (Brentani 2004). Em células em que ocorreram mutações, mecanismos operantes reparam as lesões no DNA ou induzem sua morte. Porém, a eficiência desse processo não é absoluta (Beltrão-Braga *et al.* 2004).

Em muitos cânceres, ocorrem defeitos neste sistema regulatório, levando as células a serem replicadas descontroladamente. Genes que levam células em repouso a se dividirem estão numa classe de genes chamada de proto-oncogenes, enquanto que genes que podem prevenir uma célula de se dividir são membros da família de genes supressores de tumor. Proto-oncogenes são genes celulares normais que participam do controle das funções celulares vitais, como proliferação, diferenciação, migração e apoptose. Quando esses genes sofreram mutação ou sua expressão está descontrolada, diz-se que estão ativados, e passam a ser chamados de oncogenes. O câncer sempre resulta, em parte, da ausência de atividade supressora de tumor, da atividade excessiva de oncogenes, ou de ambas (Savage 1999, Beltrão-Braga *et al.* 2004). No câncer, a maior parte dos genes mutados codifica proteínas de vias que regulam o comportamento social e proliferativo de células no corpo, em particular, regulam os mecanismos pelos quais sinais de uma célula vizinha podem levá-la a se

dividir, se diferenciar ou morrer. Outros genes estão envolvidos na manutenção da integridade do genoma e na proteção contra dano (Alberts *et al.* 2002).

Em geral, o câncer parece originar-se de um processo pelo qual uma população inicial de células pouco anormais, descendentes de uma única mutante, evolui para sucessivos ciclos de mutação e seleção natural. Em cada estágio, uma célula adquire uma mutação adicional com uma vantagem seletiva sobre sua vizinhança, se tornando mais apta a prosperar em seu ambiente. Um ambiente que no interior do tumor pode ser severo, com baixo nível de oxigênio, escassez de nutrientes, e barreiras naturais para o crescimento, apresentados pelos tecidos normais envoltos. A descendente desta célula bem adaptada irá continuar a se dividir e se tornará o clone dominante no tumor. Então, assim que mutações favoráveis adicionais aumentam e as células se distinguem em vantagem, o tumor se torna cada vez mais adaptado e se inicia. Sua evolução depende em grande parte do acaso e normalmente leva muitos anos; muitas pessoas morrem de outras doenças antes do câncer ter tido tempo de se desenvolver (Alberts *et al.* 2002).

1.1.2 Nutrição e câncer

No câncer, a nutrição tem a função de atuar tanto na prevenção primária como na redução do risco de recidiva. A importante função da nutrição no câncer é sustentada por muitas descobertas alcançadas nas ciências nutricionais durante as últimas décadas, como resultado dos avanços na genética humana. Tais avanços determinaram a função da nutrição em muitos níveis no processo da carcinogênese (Heber *et al.* 2006).

O genoma humano possui mais de 30000 genes e é responsável por mais de 100000 proteínas, as quais podem iniciar inúmeros eventos metabólicos celulares. O

conceito geral da nutrigenômica é baseado na hipótese de que (1) padrões dietéticos ou componentes específicos da dieta podem influenciar o risco de câncer pela modificação de múltiplos processos celulares envolvidos com o início, a incidência, a progressão, ou a severidade dessas doenças, (2) componentes bioativos alimentares podem influenciar o genoma humano direta ou indiretamente e, assim, influenciar a expressão de genes e proteínas, e (3) as consequências de uma dieta na saúde são dependentes do balanço dos estados de saúde e doença e da nutrigenética (diferenças individuais na resposta a um mesmo componente alimentar) (Milner 2006).

Componentes dietéticos influenciam eventos genéticos e epigenéticos, modificando o risco de desenvolvimento do câncer e o comportamento tumoral. Propriedades anticâncer podem provir de uma ou mais modificações em muitos mecanismos celulares, incluindo aqueles associados com o metabolismo carcinogênico, homeostase hormonal, regulação de sinais celulares, controle do ciclo celular, morte celular e angiogênese (Milner 2006).

1.1.3 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer de mama é o mais temido entre as mulheres, devido a sua alta frequência e efeitos psicológicos que afetam a imagem pessoal e a sexualidade. Nos países ocidentais, o câncer de mama é responsável por uma das principais causas de morte entre mulheres (INCA 2009) e nota-se um aumento nas suas taxas na maioria dos países, tanto naqueles desenvolvidos quanto em desenvolvimento (INCA 2009, Willett 1997).

O câncer de mama é a forma de câncer mais comum em mulheres e a segunda causa de morte feminina mais comum relacionada ao câncer. O câncer de mama é responsável por 22% de todos os cânceres femininos e 15% das mortes por câncer

entre mulheres (Heber & Blackburn 2006). No Brasil, o câncer de mama é a maior causa de óbitos por câncer na população feminina (INCA 2009).

Apesar de o câncer ser caracterizado por alterações no DNA e algumas destas alterações serem hereditárias, mutações hereditárias não podem justificar a grande diferença nas prevalências de câncer observadas no mundo. Populações que migram de países com baixas taxas de câncer para áreas com altas taxas e vice-versa quase invariavelmente atingem as taxas características da região onde passam a viver (Ziegler *et al.* 1993, Willett 1997, Alberts *et al.* 2002).

As grandes variações nas taxas de câncer em diferentes países e as alterações ao longo do tempo implicam que tais patologias são também afetadas por fatores ambientais, entre eles a alimentação. Desta forma, esta incidência pode ser potencialmente evitada caso tenhamos conhecimento de alguns destes mecanismos e, com isso, sejamos capazes de alterar seus fatores causais (Willett 1997).

1.1.4 Câncer de mama e linhaça

A epidemiologia nutricional examina fatores dietéticos em relação à ocorrência de doenças em populações. Descobertas da epidemiologia nutricional frequentemente contribuem para recomendações que visam prevenção de várias doenças, entre elas o câncer (McCullough & Giovannucci 2006).

Diversos estudos têm demonstrado a estreita relação entre dieta e câncer. Na patogênese do câncer, fatores dietéticos atuam de modo a aumentar ou diminuir a probabilidade de desenvolvimento do câncer clínico (Willett 1997).

A hipótese de que a dieta controla e modula funções orgânicas, podendo contribuir para a manutenção da saúde e prevenção de doenças, levou ao conceito de alimentos funcionais (Borges 2000): aqueles com alegação de promover saúde e/ou

prevenir doenças além das funções nutricionais básicas do fornecimento de nutrientes (Arabbi 2001, Codex Alimentarius 2009).

Estudos em animais têm demonstrado que a linhaça possui efeitos protetores contra o câncer, particularmente os de mama, de próstata e de cólon, com efeitos dependendo do estágio da carcinogênese (Thompson 2006).

Devido aos cânceres hormônio-dependentes terem uma frequência bastante alta no ocidente, foi postulado que a dieta ocidental, comparada à vegetariana ou semi-vegetariana, possa alterar a produção hormonal, o metabolismo ou o funcionamento num nível celular por alguns mecanismos bioquímicos (Adlercreutz 1995).

Estrógenos, produzidos nos ovários e testículos, causam proliferação celular e crescimento dos tecidos dos órgãos sexuais e de outros tecidos relacionados com a reprodução (Guyton & Hall 1997). Seus maiores órgãos alvo em mulheres são a glândula mamária e o útero. O estrógeno está fortemente associado com a indução e o crescimento do câncer de mama, o qual é influenciado pela obesidade e dieta (Heber & Cohen 2006).

A proliferação de células epiteliais mamárias está correlacionada com os níveis séricos dos hormônios ovarianos. As taxas de proliferação estão baixas na fase folicular do ciclo menstrual, quando níveis de estradiol e progesterona também se encontram baixos; enquanto que durante a fase lútea, as taxas de proliferação estão duas vezes mais altas e correlacionadas com níveis hormonais ovarianos significativamente aumentados. Taxas aumentadas de proliferação celular epitelial da mama expõem o DNA dessas células a riscos aumentados de mutação (Heber & Blackburn 2006).

As ações biológicas do estrógeno são mediadas por receptores estrogênicos. Existem dois receptores de estrógeno conhecidos: receptores de estrógeno α e β (ER α e ER β), que são produtos de diferentes genes e exibem expressão específica em tecidos e células (Heber & Cohen 2006).

A maior parte dos receptores de estrógeno está localizada no núcleo e apenas uma pequena parte (2-3%) está na membrana celular e contribui para os efeitos não genômicos do hormônio (Cornwell *et al.* 2004). Diferentes ligantes levam a diferentes conformações dos receptores. Apesar de esses receptores poderem estar localizados na mesma célula, eles variam sua distribuição nos tecidos e seu estímulo pode resultar em diferentes efeitos, combinando agonistas e antagonistas da atividade estrogênica. Receptores de estrógeno atuam no desenvolvimento folicular ovariano normal, células endoteliais vasculares, células miocárdicas, músculo liso, tecido mamário, tecido ósseo e trato urogenital (Nilsson & Gustafsson 2002).

Estudos clínicos mostram que uma resposta benéfica do câncer de mama para o tamoxifeno, assim como para outras terapias endócrinas, incluindo inibição da atividade da aromatase, está relacionada à presença de ER α . Além disso, triagens de prevenção do câncer de mama demonstram que existe uma redução na incidência do câncer ER α positivo, mas não de ER α negativo em grupos tratados com tamoxifeno (Heber & Cohen 2006).

Tem sido demonstrado que receptores de estrógeno β contribuem para iniciação e progressão da carcinogênese. Porém, sua função específica na carcinogênese mamária ainda precisa ser definida (Heber & Cohen 2006).

Receptores de estrógeno localizados nos núcleos formam dímeros quando ligados a este hormônio. Os dímeros interagem com um centro regulador chamado

elemento de resposta estrogênica (ERE), o qual regula a transcrição de genes responsivos ao estrógeno. A forma dominante de estrógeno no corpo é 17 β -estradiol, embora qualquer composto que induza a dimerização e subsequente ligação com o ERE possa ser considerado um estrógeno. Efeitos antagonistas podem acontecer quando um composto é capaz de se ligar ao receptor, mas a formação de dímeros não ocorre, ou a configuração correta para ativar o ERE não é obtida. Alguns compostos são denominados moduladores seletivos do receptor de estrógeno (MSREs), pois atuam como estrógeno agonista e antagonista. Acredita-se que esses efeitos agonistas/antagonistas sejam responsáveis pelos diferentes efeitos dos fitoestrógenos comparados ao estradiol (Cornwell *et al.* 2004).

Os fitoestrógenos são componentes naturais de plantas de estrutura não esteróide. Em âmbito nutricional, as principais classes de fitoestrógenos são as isoflavonas e as lignanas (Setchell 1998). Estas têm peso molecular e metabolismo semelhantes aos do estrógeno, porém com efeitos biológicos claramente diferentes em nível celular (Adlercreutz 1995).

Essas substâncias influenciam não apenas as atividades biológicas e metabólicas dos hormônios sexuais como também enzimas intracelulares, síntese de proteínas, ação do fator de crescimento, proliferação de células malignas, diferenciação e angiogênese de modo a torná-las grandes candidatas a substâncias naturais protetoras contra o câncer. Investigações epidemiológicas confirmam estas hipóteses, uma vez que altos níveis desses fitoestrógenos na dieta são encontrados em países ou regiões com baixa incidência de câncer (Adlercreutz 1995).

Tais compostos estão principalmente presentes na soja, produtos de grão integral, diversas sementes e outros componentes alimentares diferentes, e

encontram-se em menor concentração no feijão preto e na lentilha, por exemplo. A linhaça contém as mais altas concentrações de lignanas, precursores das formas ativas encontradas nos mamíferos (Fletcher 2003, Thompson *et al.* 2006). Diversas lignanas têm sido identificadas na linhaça, sendo que a maior parte é de secoisolariciresinol com 375321,9 µg/100g do alimento. Outros precursores de lignanas mamíferas na linhaça estão em menor concentração: matairesinol (153,3 µg/100g), lariciresinol (2807,5 µg/100g) e pinoresinol (729, µg/100g) (Adlercreutz 1995, Thompson 2003b, Thompson *et al.* 2006).

As lignanas e isoflavonóides são convertidos pelas bactérias intestinais a compostos semelhantes a hormônios biologicamente ativos (Adlercreutz 1995, Glitsø *et al.* 2000) e são excretados na urina, bile e fezes (Setchell *et al.* 1980, Setchell *et al.* 1981). Apesar da diferença na microbiota intestinal, ratos e camundongos nude, assim como humanos, são capazes de converter precursores de lignanas purificadas em enterodiol e enterolactona (Saarinen *et al.* 2007).

A lignana matairesinol é convertida a enterolactona e o secoisolariciresinol é convertido a enterodiol; o enterodiol pode ser oxidado até a enterolactona. Outras lignanas também são metabolizadas até as lignanas mamíferas enterolactona e enterodiol (Heinonen *et al.* 2001), como pode ser visto na figura 1.

A enterolactona, principal lignana mamífera, é uma inibidora moderada ou fraca da enzima aromatase. Assim, sugere-se que altas concentrações de lignanas em vegetarianos, através da inibição da aromatase em células periféricas e/ou cancerosas e da diminuição dos níveis estrogênicos, podem proteger contra o crescimento de cânceres estrógeno dependente (Adlercreutz *et al.* 1993). A similaridade da estrutura do enterodiol e da enterolactona ao estrógeno sugere que tais lignanas possam ter

propriedades estrogênicas fracas ou antiestrogênicas e, portanto, efeitos contra o câncer de mama. No entanto, evidências dessas propriedades ainda são inconclusivas (Thompson 2003b).

Figura 1. Estrutura química das lignanas mamíferas e seus precursors comparada a do 17β-estradiol (Thompson 2003a).

Lignanas e isoflavonóides parecem estimular a síntese de globulina de ligação a hormônios sexuais (SHBG) no fígado. Um aumento nas SHBG leva a uma diminuição das porcentagens de testosterona e estradiol livres e reduz tanto a fração de albumina ligada como a fração livre de hormônios sexuais. Deste modo, provavelmente há uma redução dos efeitos biológicos desses hormônios (Adlercreutz *et al.* 1987). Enquanto alguns trabalhos mostram que a suplementação dietética com lignanas aumenta os níveis de SHBG (Adlercreutz *et al.* 1992), outros não mostram a

associação do consumo de linhaça com um aumento das concentrações de SHBG (Hutchins *et al.* 2001).

Fitoquímicos dietéticos podem contribuir para o controle de reações oxidativas (Andlauer & Fürst 1998). Acumulação dos inevitáveis danos oxidativos ao longo da vida contribui para o envelhecimento e doenças crônicas, incluindo o câncer. No corpo humano, radicais livres reagem com proteínas, lipídeos e nucleotídeos, podendo resultar em mutações, e alterações em atividades enzimáticas e em vias de transdução de sinais (Davis *et al.* 2006). Foi demonstrado por Kitts *et al.* (1999) que a lignana secoisolarisiresinol da linhaça e seus metabólitos enterodiol e enterolactona apresentam atividade antioxidante, sendo um potencial mecanismo anticarcinogênico.

Indivíduos com câncer de mama ou com alto risco de câncer de mama consomem baixas quantidades de lignanas (Adlercreutz *et al.* 1982). Alta concentração plasmática de enterolactona é correlacionada com risco reduzido de câncer de mama (Pietinen *et al.* 2001, Boccardo *et al.* 2004), embora Kilkkinen *et al.* (2003) não tenham encontrado correlação entre concentração sérica de enterolactona e risco de câncer de mama em mulheres na pré e pós-menopausa.

A influência da ingestão de gordura no câncer de mama é de grande interesse e controvérsia. Uma possível explicação para as divergências encontradas entre gordura dietética e risco de câncer de mama é que se tem dado grande ênfase no consumo total de gordura, mais do que na qualidade dos ácidos graxos (Rose & Connolly 1999).

Além das lignanas, a linhaça também possui alta concentração de ácido graxo α -linolênico, ômega 3 (Daun *et al.* 2003). Tem sido demonstrado que ácidos graxos

poliinsaturados ômega 3 (n-3), incluindo ácidos graxos α -linolênico, são protetores contra o câncer de mama (Heber & Blackburn 2006, Padilha & Pinheiro 2004).

Tanto o ácido α -linolênico como o ácido linoléico (n-6) são metabolizados em ácidos graxos de cadeia longa. O ácido α -linolênico é convertido em ácido eicosapentaenóico (EPA) e depois em ácido decosaheptaenóico (DHA), enquanto o ácido linoléico é convertido em ácido araquidônico. Nessas reações, os ácidos graxos n-3 e n-6 competem por enzimas (elongases e dessaturases); assim, aumentando a ingestão dietética de ácidos graxos n-3, reduz a dessaturação do ácido linoléico e, portanto, a produção de ácido araquidônico. Os ácidos araquidônico e eicosapentaenóico são convertidos em eicosanóides, lipídeos semelhantes a hormônios com 20 átomos de carbonos que possuem uma grande variedade de atividades: modulam respostas imunes e inflamatórias, agem na agregação de plaquetas, e no crescimento e diferenciação celular (Rose & Connolly 1999, Larsson *et al.* 2004).

A produção de eicosanóides começa com a liberação de ácidos graxos poliinsaturados da membrana de fosfolipídeos. Pelo fato do principal ácido graxo poliinsaturado em membranas celulares ser o ácido araquidônico, a maior parte dos eicosanóides produzidos serão os derivados deste (prostanóides da série 2 e leucotrienos da série 4). EPA é um substrato para prostanóides da série 3 e leucotrienos da série 5. Em geral, eicosanóides derivados do ácido araquidônico possuem efeitos pró-inflamatórios e têm sido positivamente vinculados à carcinogênese, enquanto que eicosanóides derivados do EPA possuem efeitos antiinflamatórios. A inflamação parece aumentar a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, os quais levam à carcinogênese. Um eicosanóide

derivado do ácido araquidônico, o PGE_2 , parece estimular a atividade da aromatase, enquanto que o PGE_3 , um produto do metabolismo do EPA, não possui tal efeito. Assim, com um aumento na ingestão de EPA, espera-se diminuir a produção de estrógeno. O mecanismo mais notável pelo qual ácidos graxos n-3 possam diminuir o risco de câncer é através da supressão na biossíntese de eicosanóides derivados do ácido araquidônico. Alta ingestão de ácido graxo n-3 resulta na sua incorporação na membrana fosfolipídica, onde eles substituem parcialmente o ácido araquidônico (Larsson *et al.* 2004).

Os ácidos graxos poliinsaturados dietéticos e seus metabólitos podem afetar a expressão de genes ou atividades de moléculas envolvidas no controle do crescimento celular, apoptose, angiogênese e metástase, como por exemplo, do NF- κ B que parece ter função no crescimento tumoral (Larsson *et al.* 2004).

Tem sido enfatizada a importância da razão dos ácidos graxos n-3:n-6 na modulação da biossíntese de eicosanóides a partir do ácido araquidônico. Isso é devido à capacidade do n-3 inibir a conversão do ácido linoléico em ácido araquidônico através da competição por enzimas, ou seja, não depende somente da quantidade de n-3, mas também da quantidade de ácido graxo n-6 na dieta (Rose & Connolly 1999).

Maillard *et al.* (2002) examinaram a composição de ácido graxo no tecido adiposo mamário de pacientes com câncer de mama invasivo não metastático (casos) e de pacientes com doença mamária benigna (controle). A composição de ácido graxo no tecido adiposo mamário foi usada como um biomarcador qualitativo da ingestão dietética passada de ácidos graxos. Foi encontrada associação inversa entre risco de câncer de mama e níveis de ácido graxo n-3 no tecido adiposo mamário.

Já é bem determinado que a carcinogênese mamária induzida quimicamente em ratos é promovida pelo ácido graxo n-6, mas é inibida pela ingestão de óleo de savelha (um tipo de peixe), rico em ácido graxo n-3 (Rose & Connolly 1999).

Numerosos estudos têm demonstrado que dietas ricas em ácido graxo de cadeia longa n-3 inibem o crescimento e a metástase de linhagens de células de câncer de mama humano transplantadas em camundongos nude (Rose & Connolly 1999).

Alguns estudos foram realizados a fim de determinar quais componentes são responsáveis pelos efeitos anticâncer da linhaça (Thompson 2006). Thompson *et al.* (1996a) estudaram o efeito de uma dieta com 5% de linhaça, ou secoisolariciresinol, ou óleo de linhaça em níveis presentes em uma dieta com 5% de linhaça em ratos com tumores de mama induzidos com DMBA. Foi encontrada redução no tamanho do tumor em todos os tratamentos, indicando que tanto o secoisolariciresinol como o óleo de linhaça contribuem para o efeito da linhaça. Outro estudo também concluiu que a lignana e o óleo da linhaça são responsáveis pelos efeitos antitumorais desta; porém, com uma metodologia bastante diferente do primeiro. Neste, células de câncer de mama receptoras de estrógeno negativas (MDA-MB-435) foram injetadas ortotopicamente em camundongos nude e oito semanas depois, os animais passaram a receber dieta basal (controle), ou dieta basal suplementada com 10% de linhaça, ou óleo de linhaça, ou secoisolariciresinol, ou secoisolariciresinol com óleo de linhaça. As quantidades de secoisolariciresinol e de óleo nas dietas foram equivalentes às encontradas na dieta com 10% de linhaça. Os tratamentos com linhaça, óleo de linhaça, e secoisolariciresinol com óleo de linhaça tiveram efeito no tamanho dos

tumores e na incidência de metástase (Wang *et al.* 2005). Dessa forma, o efeito da linhaça pode ser atribuído à sua composição de lignana e ao seu perfil lipídico.

1.1.4.1 Estudos experimentais em animais

Há evidências de que a linhaça inibe a carcinogênese mamária em animais (Thompson 2003b).

Em estudos realizados com ratos tratados com carcinógeno, observou-se que a linhaça e a lignana podem influenciar estágios específicos do processo canceroso (Serraino & Thompson 1991, Serraino & Thompson 1992, Thompson *et al.* 1996a).

Ratas que foram alimentadas com 5 ou 10% de linhaça ou de linhaça desengordurada no estágio de pré iniciação, ou seja, 4 semanas antes da injeção com o carcinógeno 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), tiveram redução significativa na proliferação celular epitelial e aberração nuclear na glândula mamária em comparação com aquelas que comeram uma dieta controle (Serraino & Thompson 1991). Em outro estudo, ratas foram alimentadas com 5% de linhaça no estágio de promoção da carcinogênese (depois da administração de DMBA). Foi observada redução significativa no tamanho dos tumores em comparação ao grupo controle (Serraino & Thompson 1992). Thompson *et al.* (1996a) observaram que, mesmo iniciando a suplementação da linhaça, de sua lignana e de sua fração lipídica num estágio tardio da carcinogênese (depois de 13 semanas da administração de DMBA), houve redução no crescimento dos tumores estabelecidos nos grupos tratados em relação ao controle.

Entretanto, estudo realizado por Rickard *et al.* (1999) não encontrou efeito significativo de uma dieta suplementada com linhaça no tamanho, multiplicidade ou incidência de tumores mamários induzidos por metilnitrosouréia (MNU) em ratas,

com o tratamento sendo iniciado durante a fase de promoção do tumor. Diferenças no desenho experimental desse estudo quando comparado aos anteriores podem ter contribuído para esse resultado: tipo e dose do carcinógeno utilizado (5 mg de DMBA/rato *vs.* $\approx$ 9 mg de MNU/rato), e tipo da dieta controle. Neste estudo a dieta controle possuía grandes quantidades de ácido graxo α -linolênico proveniente do óleo de soja, podendo este ter mascarado o efeito da linhaça, enquanto que nos anteriores a ração foi elaborada com óleo de milho. Porém, outro estudo observou efeito antitumoral do secoisolariciresinol em ratas tratadas com DMBA durante a fase de promoção da tumorigênese, no qual houve redução no número de tumores (Thompson *et al.* 1996b).

Para verificar o efeito da linhaça em câncer de mama humano, estudos foram realizados em camundongos nude que, por serem imunodeficientes, aceitam tecidos humanos (Thompson 2003b). Células MDA-MB-435 foram testadas devido sua capacidade de metastatizar em modelo animal (Chen *et al.* 2002). A linhaça reduziu o crescimento e inibiu a metástase do câncer de mama receptor de estrógeno negativo. Tal efeito pode ser em parte explicado pelas reduções na expressão do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) observadas neste estudo. IGF-1 e EGF pertencem à família da tirosina quinase, promovem mitose e têm função crucial na regulação do desenvolvimento do câncer de mama. Dabrosin *et al.* (2002) observaram efeito semelhante na redução do crescimento tumoral e na incidência de metástase de tumores MDA-MB-435. Eles também verificaram que as concentrações do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um potente estimulador da angiogênese,

eram menores nos tumores, em especial nos tumores maiores, dos animais que ingeriram linhaça em comparação com aquelas nos tumores do grupo controle.

Verificou-se, também, que a linhaça pode inibir o crescimento do câncer de mama humano receptor de estrógeno positivo (MCF-7), além de aumentar o efeito anti-câncer do tamoxifeno (droga usada no tratamento do câncer de mama, atuando no receptor de estrógeno). Observou-se aumento no número de células apoptóticas e diminuição no índice de proliferação celular (Ki-67) nos tumores dos animais tratados com a linhaça e com o tamoxifeno (Chen *et al.* 2004, Chen *et al.* 2007a). Foi notado efeito dose dependente da linhaça no crescimento dos tumores, e redução significativa na expressão da proteína IGF-1, a qual age de forma sinérgica com o estradiol na indução da proliferação de células cancerosas (Chen *et al.* 2007a). Jungeström *et al.* (2007) mostraram que a linhaça, o enterodiol e a enterolactona têm a capacidade de contrabalancear o crescimento e a angiogênese induzida pelo estradiol no câncer de mama ER+ (MCF-7) *in vivo*. A diminuição da angiogênese ocorreu devido à diminuição da secreção de VEGF. Outro estudo mostrou que, em animais que não receberam estradiol extra, 5 e 10% de linhaça não estimulam o crescimento de tumores MCF-7 estabelecidos; e que 10% de linhaça pode atenuar o efeito estimulante do tamoxifeno no crescimento do tumor. Embora 5% de linhaça em combinação com tamoxifeno tenham reduzido alguns biomarcadores celulares, isso não foi forte o suficiente no efeito inibitório do crescimento tumoral induzido pelo tamoxifeno. A linhaça combinada com o tratamento com tamoxifeno reduziu significativamente a expressão de ER α e ciclina D1 e receptores de fatores de crescimento, tais como HER2 e IGF-IR (Chen *et al.* 2007b).

Foi demonstrado por Saarinen *et al.* (2008) que a administração oral de secoisolariciresinol marcado radioativamente em camundongos nude aumentou a radioatividade no tumor MCF-7 implantado na glândula mamária, e em tecidos normais. Neste estudo, as lignanas foram mais acessíveis em tumores menores do que nos grandes, sugerindo que tumores menores podem ser mais suscetíveis aos efeitos locais da lignana.

1.1.4.2 Ensaio clínico

Estudo prospectivo randomizado duplo-cego foi conduzido com pacientes com câncer de mama que consumiram “muffin” (um tipo de bolo) contendo 25 g de linhaça ou “muffin” controle (placebo) uma vez por dia do momento do diagnóstico até a cirurgia (duração média de 39 dias). Houve redução na proliferação celular tumoral (estimada pelo marcador Ki67) e na expressão de c-erbB2, e aumento no índice apoptótico no grupo linhaça quando comparados ao controle. Notou-se nível de lignana urinária (um marcador da ingestão deste composto) aumentada no grupo que consumiu “muffin” com linhaça no pós tratamento em relação ao nível no pré tratamento e do grupo controle. Tais resultados sugerem que a ingestão de linhaça possui potencial para retardar a progressão do câncer de mama pré invasivo ou invasivo pela alteração no fenótipo das células cancerosas para uma forma menos agressiva (Thompson *et al.* 2005).

1.1.5 justificativa

Considerando tantas evidências do efeito protetor da linhaça no câncer de mama, o presente estudo foi conduzido com ênfase na comparação do efeito das variedades de linhaça marrom e dourada.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Comparar o efeito de uma dieta rica em linhaça marrom e dourada na evolução do câncer de mama humano desenvolvido em camundongos fêmeas.

1.2.2 Objetivos específicos

- Comparar as linhaças brasileiras das variedades marrom e dourada quanto à sua composição centesimal (proteína, lipídeo, fibra solúvel, fibra insolúvel e perfil de ácidos graxos, incluindo ômega 3).
- Verificar o efeito da farinha de linhaça marrom e dourada na evolução do tamanho dos tumores ao longo do ensaio, e compará-los.
- Verificar o efeito da farinha de linhaça marrom e dourada na indução da apoptose nos tumores.

CAPÍTULO 2: EXPERIMENTO PILOTO

2.1 INTRODUÇÃO E OBJETIVO

Foi realizado experimento piloto com o intuito de verificar se os tumores cresceriam nas condições em que o experimento seria conduzido. Foi utilizada uma metodologia nova devido à dificuldade de se encontrar e importar material necessário para condução do experimento em condições já conhecidas e descritas anteriormente.

Para que o tumor MCF-7 cresça *in vivo* é necessário que camundongos nude tenham altas concentrações de estradiol sérico. Para conseguir isto, estudos anteriores (Chen *et al.* 2004; Chen *et al.* 2007a; Jungeström *et al.* 2007) descrevem a inserção de comprimidos (*pellets*) de estradiol no tecido subcutâneo dos animais. Estes comprimidos liberam uma quantidade constante e contínua de hormônio durante um tempo conhecido, como, por exemplo, dois meses. A dificuldade que se teve e que levou ao atraso no início do experimento foi a de se obter tais comprimidos.¹ Dessa forma, optou-se por aplicar o hormônio utilizando-se adesivos transdérmicos (System[®]), a serem trocados semanalmente.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os animais receberam a ração fornecida no biotério (Nuvilab CR-1 Autoclavável), pois a intenção deste experimento era apenas verificar se haveria ou não crescimento de tumor.

¹ Os comprimidos não foram encontrados no Brasil e a importação seria muito arriscada, pois poderia demorar muito tempo (seis meses) e teria o risco do produto ficar preso na alfândega.

2.2.1 Linhagem e cultura celular

Linhagem MCF-7 foi cultivada em meio de cultura DMEM/Ham's F-12 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em frascos de 25 cm² a 37°C, em atmosfera contendo 5% CO₂.

O crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio invertido com contraste de fase, e o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Após atingirem a sub-confluência (ocupando aproximadamente 70% dos frascos), as células foram sub-cultivadas e utilizadas no experimento como descrito a seguir. Amostras representativas da cultura foram posteriormente congeladas e mantidas em recipientes contendo nitrogênio líquido, crio-protegidas com 5-10% de dimetil sulfoxido (DMSO-Sigma).

2.2.2 Animais e implante das células tumorais

Utilizaram-se três camundongos fêmeas BALB/c nu/nu. Esses animais, mais conhecidos como camundongos nude, possuem uma mutação genética que leva à ausência da glândula timo, resultando num sistema imune deficiente devido à grande redução no número de células T. Assim, camundongos nude podem receber diferentes tecidos e enxertos tumorais de outras espécies uma vez que não os rejeitam (Fogh & Giovanella 1978). Para injeção das células nos camundongos, estas foram tripsinizadas e ressuspensas em meio sem soro e com Matrigel² e mantidas em

² Membrana basal extraída do sarcoma de camundongo Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), um tumor rico em proteínas de matriz extracelular. Seus maiores componentes são laminina (componente protéico), colágeno IV, perlecan (proteoglicano de sulfato de heparan) e as glicoproteínas entactina e nidogênio. Com o uso de Matrigel, a incidência de transplante bem sucedido de tumores humanos em camundongos imunodeficientes pode ser aumentada para muitas células tumorais humanas testadas (BD Biosciences 2007).

gelo. Foram injetados subcutaneamente em cada animal uma suspensão de 5×10^5 células em 75 μL de meio e 25 μL de Matrigel.

Para estimular o crescimento do tumor, os camundongos receberam estradiol proveniente de adesivos transdérmicos (System[®]). Considerando que Chen *et al.* (2004) e Chen *et al.* (2007a) inseriram um comprimido de 1,7 mg de estradiol em cada animal e que cada comprimido tinha duração de 60 dias, optou-se pelo adesivo System[®] 25 μg com composição de 1,6 mg de estradiol, a mais próxima do comprimido usado. Cada adesivo foi cortado em oito partes, sendo colada no dorso de cada animal apenas uma parte por vez, e cada parte deveria durar uma semana para que um adesivo durasse aproximadamente 60 dias. Porém, no início do experimento, notou-se que, apesar de testadas várias formas de colar os adesivos, os camundongos os retiravam antes de completar uma semana. Dessa forma, inicialmente, decidiu-se colocar novos adesivos assim que se percebesse que estes tivessem sido retirados. No entanto, os adesivos permaneciam por diferentes períodos de tempo em cada animal e imagina-se que o camundongo absorva mais estradiol com um adesivo novo do que com um com que já está há 3 ou 4 dias. Então, a partir da quarta semana de experimento, iniciou-se a colagem dos adesivos uma vez por semana independentemente de o adesivo ser retirado antes (tabela 1).

A partir da quinta semana do início do experimento, os tumores foram medidos semanalmente com paquímetro digital, sendo realizadas duas medidas perpendiculares entre si. A fim de minimizar o erro ao medir os tumores, da segunda medida em diante, estas foram realizadas em triplicata. Com tais medidas foram calculadas as áreas superficiais dos tumores com a fórmula $(\text{comprimento}/2 \times \text{largura}/2) \times \pi$.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 2 pode ser visualizado o crescimento dos tumores dos três animais. Nota-se que no animal 2 o tumor ficou menor e suas medidas tiveram bastante erro. Isso se deu porque no momento em que as células foram injetadas, vazou parte do conteúdo, sendo este recuperado e injetado novamente. O resultado disto foi um tumor disforme difícil de ser medido e com um crescimento mais lento. O crescimento tumoral dos animais 1 e 3 foi semelhante.

Após 13 semanas de experimento os camundongos foram eutanasiados por meio de exposição a CO₂ em câmara fechada.

Tabela 1. Datas em que os adesivos foram colocados nos camundongos.

Dias	Animal 1	Animal 2	Animal 3
2/abr	X	X	X
7/abr	X	X	X
11/abr	X	X	X
14/4/2008*		X	
16/abr	X	X	X
18/abr	X	X	X
24/abr	X	X	X
30/abr	X	X	X
7/mai	X	X	X
14/mai	X	X	X
21/mai	X	X	X
28/mai	X	X	X
4/jun	X	X	X
11/jun	X	X	X
18/jun	X	X	X
25/jun	X	X	X

*tumores identificados

Figura 2. Crescimento tumoral a partir da quinta semana de experimento.

O tempo de crescimento dos tumores foi bastante parecido com o encontrado por Chen *et al.* (2004) e Chen *et al.* (2007a). Nestes, assim como no presente estudo, os tumores atingiram cerca de 40 mm² por volta da sexta semana de experimento e na 13ª semana, estavam com aproximadamente 120 - 140 mm².

2.4 CONCLUSÃO

O uso do adesivo transdérmico (System®) mostrou-se eficaz no fornecimento de estradiol aos animais para que tumores MCF-7 cresçam *in vivo*.

CAPÍTULO 3: LINHAÇAS E DIETAS

3.1 INTRODUÇÃO

Foram utilizadas linhaças (*Linum usitatissimum* L.) das variedades marrom e dourada produzidas no Brasil, fornecida pela Pazze, Indústria e Comércio, RS. Cada uma dessas variedades de linhaça foi moída, formando, assim, uma farinha que foi utilizada na suplementação das rações oferecidas aos animais. Foram produzidas três rações, cada uma compondo um grupo experimental: ração controle ou dieta basal (DB), ração com 10% de linhaça marrom (DLM) e 10% de linhaça dourada (DLD).

A moagem da linhaça, assim como a elaboração das rações foram realizadas pela PragSoluções Biociências, Jaú – SP, uma empresa que atua na produção e desenvolvimento de dietas para experimentação animal.

Foram realizadas análises para determinação da composição centesimal e do perfil de ácidos graxos das duas variedades de linhaça e das dietas. A quantificação de fibras foi feita apenas nas linhaças.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Composição centesimal

As análises para a determinação da composição centesimal das variedades de linhaça marrom e dourada e das três dietas foram feitas de acordo com metodologia da AOAC (1984) e AOAC (1990). Para todas as análises foram feitas medidas em triplicata e foram calculados os coeficientes de variação, sendo aceitos somente coeficientes de variação inferiores a 5%. A análise de fibra das linhaças foi realizada de acordo com metodologia proposta por Prosky *et al.* (1988)

- Umidade por dessecação em estufa a 105°C até peso constante.

- Proteína pelo método de Micro-Kjeldhal.
- Lipídeos por extração em Soxhlet, com uso de éter de petróleo.
- Cinzas por incineração em mufla a 550°C por 12 horas.
- Fibras dietéticas pelo método de Prosky *et al.* (1988).

3.2.2 Perfil de ácidos graxos

Para identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos, uma alíquota contendo 150 mg de lipídios foi saponificada (Metcalf *et al.* 1966) e esterificada (Morrison & Smith 1964). O perfil de ácidos graxos foi determinado em cromatógrafo a gás marca Shimadzu modelo GC-2010.

As condições cromatográficas foram as seguintes:

- Injetor tipo “split/splitless” a 250°C com razão de divisão de 1:20
- Coluna capilar “SP-2560” da Supelco de 100 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,20 µm
- Gás de arraste: hidrogênio a 1 mL por minuto
- Temperatura do forno: inicial de 140°C mantida por 5 minutos com posterior aumento de 4°C por minuto até 230°C e de 5°C por minuto até 240°C, mantendo esta temperatura por 11 minutos.
- Temperatura do detector FID de 260°C

O volume injetado de cada amostra e do padrão no cromatógrafo a gás foi de 1 µL. Os picos dos principais ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados através de comparação com o tempo de retenção do padrão e sua quantificação foi baseada na razão entre a área do pico e a somatória das áreas de cada pico referente aos ácidos graxos identificados.

A análise de ácidos graxos foi realizada em duplicata, sendo calculada a média desses valores para apresentação dos resultados.

3.2.3 Produção das dietas

A ração controle ou dieta basal (DB) foi baseada na AIN-93G (Reeves *et al.* 1993) modificada para ter 20% de lipídeo para que o crescimento tumoral ocorra mais rápido do que ocorreria com uma dieta com baixos níveis de gordura. O acréscimo na composição lipídica se deu pela diminuição no conteúdo de amido de milho. As outras duas rações têm como base a DB, porém acrescidas de 10% de linhaça marrom (DLM) e 10% de linhaça dourada (DLD).

A fim de que as dietas fossem isocalóricas, isoprotéicas e isolipídicas foram utilizados os valores obtidos na análise de composição centesimal das linhaças (tabela 3) para o cálculo da quantidade de ingredientes utilizados na produção das três rações. Na época em que as rações estavam sendo produzidas ainda não havia sido realizada análise de fibra das linhaças; assim, considerando estudo de Simbalista (2007) e o valor de carboidrato como sendo $[100 - (\text{cinza} + \text{lipídeo} + \text{proteína})]$, calculado no presente estudo, foi utilizado o valor de 30% deste nutriente para as duas variedades de linhaça. A tabela 2 apresenta os ingredientes e suas respectivas quantidades utilizadas na formulação das dietas. Como encontrado em estudo realizado por Stavro (2000), no qual não foram especificados níveis de fibra solúvel e insolúvel, utilizou-se na formulação das rações apenas celulose microcristalina.

Como o óleo de soja possui grandes quantidades do ácido graxo ômega 3, protetor contra o câncer, as três dietas são isentas de óleo de soja. Utilizou-se o óleo de milho como substituto deste para evitar altos níveis do ácido graxo ômega 3 na dieta controle. Em estudo realizado com ratos usando o modelo MNU para indução

de câncer, a dieta controle rica em óleo de soja pode ter mascarado o efeito antitumoral da linhaça, devido ao seu conteúdo de ácido alfa linolênico (Rickard *et al.* 1999).

Tabela 2. Composição de ingredientes nas dietas (g/kg).

<i>Ingredientes</i>	<i>Dietas</i>		
	Controle AIN-93G (DB)	10% linhaça marrom (DLM)	10% linhaça dourada (DLD)
Amido de milho	287,486	288,536	288,565
Caseína	210,000	187,950	187,352
Amido dextrinizado	132,000	132,000	132,000
Sacarose	100,000	89,440	94,720
Óleo de milho	170,000	131,560	126,850
Celulose microcristalina	50,000	20,000	20,000
L-cistina	3,000	3,000	3,000
Bitartarato de colina	2,500	2,500	2,500
Terti-butil-hidroquinona	0,014	0,014	0,014
Mix mineral	35,000	35,000	35,000
Mix vitamínico	10,000	10,000	10,000
Farinha de linhaça		100,000	100,000

As dietas foram analisadas para confirmação de suas composições (AOAC 1984; AOAC 1990), segundo metodologia descrita anteriormente. Também foi realizada análise de seus perfis de ácidos graxos, segundo metodologia descrita anteriormente; porém, a análise não foi realizada em duplicata.

Para esterilizar as rações, estas foram irradiadas com radiação gama (Cobalto-60) pelo Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (anexo 1) e mantidas em temperatura ambiente durante todo o experimento.

3.2.4 Análise dos resultados

As composições das linhaças e das dietas foram comparadas por teste t. Foi adotado um intervalo de confiança de 95% ($p \geq 0,05$) para testar a igualdade das composições. As análises foram realizadas pelo programa R versão 2.8.1 (2008-12-

22) Copyright (C) 2008 The R Foundation for Statistical Computing ISBN 3-900051-07-0.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 3 estão apresentadas as médias das triplicatas da análise de composição centesimal das duas variedades de linhaça. Nota-se que a linhaça marrom possui menor concentração de lipídeos do que a dourada.

Tabela 3. Composição centesimal das linhaças marrom e dourada.

% de matéria prima em base seca*	Linhaça marrom	Linhaça dourada
Cinzas	4,12 (0,13)	4,25 (0,16)
Lipídeos	38,4 (0,32) ^a	43,2 (0,36) ^b
Proteínas	21,0 (0,80)	21,6 (0,44)
Fibras solúveis	9,13 (0,36)	8,89 (0,81)
Fibras insolúveis	33,0 (2,41)	30,0 (1,38)
*umidade	6,64 (0,09) ^a	6,46 (0,05) ^b

Valores são médias (desvio padrão). Na linha, letras diferentes indicam diferença significante entre as linhaças.

Após a análise de fibra das duas variedades de linhaça (tabela 3), nota-se que as rações ficaram com valores semelhantes de fibra insolúvel, proveniente da adição de celulose (tabela 2), porém, com uma quantidade pequena de fibra solúvel a mais nas dietas com linhaça marrom (DLM) e dourada (DLD), por conta da quantidade deste nutriente presente nas linhaças. Nota-se também que os valores de fibras quantificados pela metodologia utilizada nas linhaças marrom e dourada são superiores aos de carboidrato (calculado por diferença). Isso pode ter acontecido porque algum outro nutriente presente na linhaça pode ter um efeito fibra, ou seja, pode não ter sido digerido no decorrer da análise.

O resultado da análise de ácidos graxos das duas variedades de linhaça e das três dietas está apresentado na tabela 4.

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos nas linhaças e dietas (%).

Ácidos graxos	Linhaça marrom	Linhaça dourada	DB	DLM	DLD
Palmítico (C16:0)	9,14 (0,22)	4,39 (0,07)	13,0	11,4	11,2
Esteárico (C18:0)	6,92 (0,23)	3,23 (0,01)	0,00	2,48	2,28
Oléico (C18:1n9c)	30,6 (0,64)	22,5 (0,10)	37,3	32,7	32,8
Linoléico (C18:2n6c)	11,2 (0,07)	17,2 (0,11)	49,7	42,6	41,5
Linolênico (C18:3n3)	41,2 (1,06)	52,7 (0,26)	0,00	10,9	12,3
média (desvio padrão)					

De acordo com a análise de ácidos graxos das linhaças e das dietas, percebe-se que o óleo de milho utilizado na produção das dietas evitará que o possível efeito antitumoral do ácido graxo ômega 3 presente nas linhaças seja mascarado, uma vez que tal óleo é isento deste ácido graxo. Percebe-se também que a linhaça dourada possui uma maior concentração desse ácido graxo em comparação à linhaça marrom. Isso pode em parte justificar um possível efeito antitumoral maior da linhaça dourada em relação à marrom; que será discutido mais tarde, quando tais efeitos forem avaliados.

Comparando-se a composição das linhaças brasileiras com aquelas apresentadas por Daun *et al.* (2003), percebe-se algumas diferenças. As linhaças brasileiras apresentam maior concentração de fibras: 38,89 – 42,13 g/100g, enquanto que nas canadenses as concentrações variam de 30,5 a 36,8 g/100g. O conteúdo de lipídeo da linhaça marrom também é menor do que os encontrados nas canadenses (39,8 - 45,6 g/100g). Quanto ao perfil de ácidos graxos, a linhaça dourada se assemelha mais à canadense, sendo a última mais rica em ácido graxo ômega 3 (57,4%).

A tabela 5 apresenta as médias obtidas de triplicatas das análises de cada macronutriente das três dietas, exceto dos carboidratos que foi calculado por diferença. Observa-se que os resultados encontrados foram semelhantes nas três

dietas. O conteúdo de cinzas encontrado diferiu entre as dietas, pois foi solicitada a adição do mesmo conteúdo de mix mineral nas três rações para que não houvesse risco de deficiência de minerais. O conteúdo de mineral adicionado somou-se aos minerais encontrados na linhaça no caso da DLM e DLD.

Tabela 5. Composição centesimal das três dietas.

% de matéria prima em base seca*	DB	DLM	DLD
Cinzas	2,79 (0,02) ^a	3,10 (0,02) ^b	3,03 (0,05) ^b
Lipídeos	22,0 (0,37)	22,7 (0,02)	22,3 (0,48)
Proteínas	15,2 (2,40)	17,5 (0,87)	17,2 (0,79)
Carboidratos	60,1	56,6	57,5
*umidade	10,4 (0,25) ^a	12,9 (0,26) ^b	12,1 (0,15) ^c

Valores são médias (desvio padrão). Na linha, letras diferentes indicam diferença significativa entre as dietas.

CAPÍTULO 4: EXPERIMENTO

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

O desenvolvimento de estratégias nutricionais preventivas efetivas contra o câncer requer evidência conclusiva de sua eficácia em modelos animais, que simulem muito bem a doença humana. A quimioprevenção do câncer é a prevenção do câncer pela administração de um ou mais compostos químicos, como drogas ou suplementos nutricionais. A prevenção do câncer através de manipulação nutricional pode oferecer importantes meios de inibir seu desenvolvimento e progressão. No entanto, estudos para avaliar a eficácia de compostos potencialmente quimiopreventivos são difíceis de serem conduzidos em grandes populações (Zhou 2006).

Estudos experimentais, especialmente estudos em animais, são absolutos para determinar os efeitos de componentes nutricionais. Porém, devido à complexidade de processos carcinogênicos, um único modelo animal não pode representar todos os aspectos celulares, moleculares e patológicos envolvidos no câncer humano (Zhou 2006).

Modelos tumorais que têm sido utilizados incluem:

- *Modelos de tumor espontâneo.* Tumores são desenvolvidos espontaneamente. Diferentes espécies animais possuem diferentes susceptibilidades para desenvolver tumores espontâneos devido à história genética específica. As maiores vantagens desse modelo são que tumores são desenvolvidos espontaneamente e podem representar processos naturais do desenvolvimento e progressão tumorais. No entanto, em comparação

com outros modelos, tumores espontâneos normalmente levam um longo tempo para se desenvolverem e apresentam baixa incidência tumoral. Além disso, tumores espontâneos podem desenvolver-se em diferentes órgãos, mas não em um órgão específico. Como exemplo tem-se gatos e cachorros que naturalmente desenvolvem câncer.

- *Modelos de tumor induzidos por hormônios ou carcinógenos químicos.*

Tumores são desenvolvidos por uma série de processos progressivos envolvendo iniciação, promoção, progressão e metástase, sendo, assim, um modelo adequado para avaliar a eficácia de componentes dietéticos em etapas específicas da carcinogênese. Porém, esse modelo apresenta algumas limitações. Hormônios e carcinógenos químicos precisam ser usados em níveis altos e/ou administrados por um longo período; e carcinógenos químicos são tóxicos e podem causar dano àqueles que os manipulam.

- *Modelos de tumor xenoenxerto.* Tumores desenvolvidos de células de câncer humano representam muito bem fenótipos da doença humana. Nesse modelo, células tumorais são transplantadas subcutaneamente ou ortotopicamente (injeção das células no tecido ou órgão de sua origem) em camundongos. As vantagens do transplante subcutâneo são a rapidez, custo mais baixo, e que a atividade antitumoral pode ser determinada pela medida do tamanho do tumor. Em comparação com o modelo de tumor subcutâneo, o modelo de tumor ortotópico é clinicamente mais relevante pela representação de interações celulares epitélio-estroma, presença de fatores endógenos (fatores de crescimento, fatores angiogênicos etc.), retenção de características histológicas originais do tumor, e presença de moléculas da

matriz extracelular e receptores. Uma restrição deste modelo é que tumores precisam ser desenvolvidos em animais imunologicamente deficientes. Outra limitação é devido ao processo de cultura *in vitro*, no qual clones são selecionados, podendo estes não ser similares aos clones originais obtidos dos pacientes; dessa forma, esse modelo pode não necessariamente refletir o desenvolvimento do tumor em humanos.

- *Modelos de tumor com camundongo geneticamente modificado.* Inclui super expressão de oncogenes ou deleção/mutação de genes supressores de tumores. Nesse modelo, tumores se desenvolvem espontaneamente, permitindo avaliação preventiva e terapêutica das etapas específicas de desenvolvimento do câncer. Animais geneticamente modificados possuem sistema imune intacto, permitindo também a avaliação de modalidades terapêuticas e preventivas que visam o aumento da atividade imunológica e da resposta ao câncer (Zhou 2006).

Uma vez que o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da linhaça, que possui propriedades antiestrogênicas, optou-se pelo uso de células de câncer de mama dependentes de estrógeno.

Além disso, cerca de dois terços dos cânceres de mama são receptores de estrógeno positivos. Sabendo-se que entre as diferentes linhagens celulares de câncer de mama humano, a linhagem celular MCF-7 é a mais utilizada no desenvolvimento de um modelo de tumor mamário estrógeno dependente, e que tumores MCF-7 representam as características de tumores de mama humanos estrógeno dependentes, tais como a expressão de ER α e ER β , células MCF-7 foram utilizadas (Zhou 2006).

Assim, o experimento foi realizado com camundongos nude atímicos (imunologicamente deficientes) nos quais foram implantadas células humanas de câncer de mama (MCF-7).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Cultura da linhagem de células tumorais

Células cancerosas mamárias humanas foram obtidas junto ao grupo da Dra. Gláucia Santelli, do ICB/USP. Foi utilizada linhagem de células humanas de câncer de mama receptoras positivas de estrógeno (MCF-7).

Linhagem MCF-7 foi cultivada em meio de cultura DMEM/Ham's F-12 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em frascos de 25 cm² a 37°C, em atmosfera contendo 5% CO₂ e 98% de umidade relativa.

O crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio invertido com contraste de fase, e o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Após atingirem a sub-confluência, as células foram sub-cultivadas. Amostras representativas da cultura foram posteriormente congeladas e mantidas em recipientes contendo nitrogênio líquido, crio-protegidas com 5-10% de dimetil sulfoxido (DMSO-Sigma).

4.2.2 Implante das células tumorais nos animais

As células foram injetadas nos animais na segunda semana de experimento.

Para a injeção das células nos camundongos, estas foram tripsinizadas e ressuspendidas em meio sem soro. A viabilidade das células foi avaliada por meio do Tripán blue, um corante que atravessa apenas membranas de células mortas.

Levou-se para o biotério uma suspensão de 5×10^5 células em 50 μL de meio sem soro em eppendorfs, e uma solução, deixada no gelo, de Matrigel com meio sem soro (1:1) para que o Matrigel ficasse menos viscoso e facilitasse sua transferência. Isso foi feito para que as células não “sofressem estresse” pelo frio quando mantidas no gelo até serem injetadas (o Matrigel tem que ficar no gelo para se manter líquido). No biotério, misturou-se em cada eppendorf 50 μL da solução de Matrigel com meio sem soro, formando uma suspensão de 5×10^5 células em 75 μL de meio e 25 μL de Matrigel. Essa suspensão de 100 μL foi injetada no tecido subcutâneo de cada animal.

O desenvolvimento do tumor MCF-7 em camundongos fêmeas com ovário intacto requer estrógeno adicional apesar dos níveis circulantes desse hormônio nestes animais serem similares aqueles em mulheres na pré menopausa (Zhou 2006). Dessa forma, após a injeção das células, foram colocados adesivos transdérmicos de estradiol (System[®] 25 μg) nos animais, com composição de 1,6 mg de estradiol. Cada adesivo foi cortado em oito partes, sendo colada no dorso de cada animal apenas uma parte por vez. A partir de então, os adesivos foram colocados semanalmente. Porém, em geral, os animais não permaneciam com os adesivos fixados a semana toda, eles os removiam; apesar dos adesivos serem colocados com um reforço de esparadrapo que envolvia os camundongos. Assim, para estimar o número de dias que cada animal ficou com adesivo e poder comparar a quantidade de hormônio recebida pelos animais, foi anotado o dia em que se percebesse que cada animal estivesse sem seu adesivo.

4.2.3 Animais e dietas

Foram utilizadas 45 camundongos BALB/c nude (*nu/nu*) fêmeas adquiridas no Biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), onde o experimento foi conduzido. O padrão sanitário do biotério é SPF (Specific Pathogen Free), ou seja, isento de microbiota patogênica. Os animais foram submetidos a 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Eles foram mantidos em gaiolas do tipo micro-isoladores (5 animais por gaiola). As gaiolas e a água eram trocadas uma vez por semana.

Após a primeira semana de aclimatização, na qual os animais passaram a receber ração controle, o tumor foi implantado nos animais pela injeção das células mamárias cancerosas juntamente com Matrigel. Após sete semanas, ou seja, quando os tumores já puderam ser claramente identificados e medidos, os animais passaram a receber dietas diferentes, sendo que até então, todos os animais haviam recebido a dieta basal (DB) e água *ad libidum*. Assim, o grupo (1) continuou recebendo a dieta basal e serviu como controle (DB); o grupo (2) passou a receber uma dieta semelhante à basal acrescida de 10% de farinha de linhaça marrom (DLM) e o grupo (3) passou a receber uma dieta semelhante à basal acrescida de 10% de farinha de linhaça dourada (DLD).

Os animais foram pesados semanalmente. As rações eram colocadas nas gaiolas duas vezes por semana, sendo a quantidade colocada bem como sua sobra pesadas para o cálculo do consumo.

Após oito semanas do início da administração das dietas com linhaça (DLM e DLD), os animais foram eutanasiados por meio de exposição a CO₂ em câmara fechada.

4.2.4 Acompanhamento da evolução dos tumores

Após o início das dietas com linhaça, os tumores passaram a ser medidos semanalmente durante oito semanas. O tamanho do tumor foi obtido por meio de duas medidas perpendiculares realizadas com paquímetro digital, sendo cada medida realizada em triplicata. O volume do tumor foi estimado com a seguinte fórmula:

$$\frac{\pi xy \sqrt{xy}}{6}, \text{ sendo } x=\text{média da triplicata do comprimento e } y=\text{média da triplicata da}$$

largura. Como só foram medidas duas dimensões dos tumores, a terceira dimensão, a profundidade, foi estimada como a média geométrica das outras duas. Foi utilizado o volume do tumor para estimar seu tamanho, porque o tumor possui três dimensões e cresce proporcionalmente ao número de células tumorais, assim, conceitualmente, o volume é mais correto do que a área.

Após a eutanásia dos animais, os tumores foram extraídos, pesados e cortados em duas partes, uma parte foi colocada em solução de formol e a outra em nitrogênio líquido. Esta última foi posteriormente armazenada à -80°C .

4.2.5 Comitê de ética

O projeto de pesquisa que deu origem ao experimento descrito acima foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, protocolo número 11/07 (Anexo 2).

4.2.6 Análise dos dados

Foi realizada análise de variância (ANOVA) para verificar se os três grupos foram tratados sob as mesmas condições. Assim, a ANOVA foi aplicada no cálculo (i) do tempo médio que cada grupo ficou com adesivo por semana, (ii) do consumo

médio de ração e (iii) do peso médio dos animais por grupo. Para que a hipótese nula fosse rejeitada, foi assumido um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Para verificar como se deu a evolução do tamanho dos tumores ao longo do experimento, primeiramente, foi realizada ANOVA, na qual foram comparados os tamanhos médios dos tumores dentro de cada grupo ao longo das semanas e teste t para comparar semana a semana. Posteriormente, foi realizada análise de regressão linear, na qual se comparou a taxa de crescimento médio dos tumores de cada grupo, ou seja, o coeficiente angular da reta ajustada em cada regressão. Para isto, considerou-se o tumor como sendo uma população de células e, assim, seu crescimento ocorrendo da mesma maneira que o crescimento de populações. Sabendo-se que o crescimento de populações ocorre exponencialmente, foi utilizado o logaritmo do volume dos tumores para que o crescimento fosse analisado linearmente.

Também foi analisado o erro intrapessoal ao medir os tumores. Para isso, com as triplicatas das medidas de comprimento (x) e largura (y), foram calculadas as médias de cada triplicata e a variância de seus desvios. Aplicou-se o teste t para verificar diferença estatística entre as variâncias de x e y. Calculou-se o desvio padrão e, uma vez que os desvios das medidas estão distribuídos em uma curva normal, este foi multiplicado por 2 para se obter o erro das medidas de x e y com um intervalo de confiança de 95%.

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa R versão 2.8.1 (2008-12-22) Copyright (C) 2008 The R Foundation for Statistical Computing ISBN 3-900051-07-0.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo do experimento, apenas dois animais morreram. Em um deles o tumor atingiu um tamanho muito grande em pouco tempo, optando-se por sua eutanásia para evitar o sofrimento do animal. O outro foi encontrado morto na gaiola na última semana de experimento. Não se sabe o motivo de tal morte; porém, este animal não foi excluído da análise dos dados.

Outras perdas ocorreram. Mais dez animais foram excluídos por seus tumores terem atingido um tamanho muito grande e, para que o tumor não crescesse ainda mais, não foram colocados mais adesivos nestes camundongos. Outros seis animais foram excluídos, porque seus tumores não cresceram. Assim, o número de animais cujos dados foram analisados foi de 28 (DB=9, DLM=9 e DLD=10).

4.3.1 Adesivos de estradiol, consumo de ração e peso dos animais

O número de dias por semana em que os animais permaneceram com os adesivos durante todo o experimento não diferiu estatisticamente nos três grupos ($p=0,1209$). Na tabela 6 são apresentadas as médias do número de dias por semana em que os animais de cada grupo permaneceram com os adesivos. O consumo médio de ração por semana foi o mesmo nos três grupos ($p=0,7518$). A análise do peso médio dos animais foi realizada apenas com os dados da terceira semana (início do experimento – p_0) e da décima sexta semana (final do experimento – p_1) de experimento. Entre os três grupos, os valores não diferiram estatisticamente nas semanas ($p_0=0,06835$; $p_1=0,1416$). Assim, pode-se dizer que os tratamentos nos três grupos foram semelhantes e, portanto, esses vieses não serão considerados na discussão.

Tabela 6. Dias com adesivo em cada grupo por semana.

<i>Semanas</i>	<i>Grupos</i>		
	DLB	DLM	DLD
2	4,6 (1,7)	4,6 (1,9)	4,0 (1,2)
3	5,1 (1,8)	5,4 (0,7)	4,7 (1,2)
4	5,1 (1,9)	5,0 (1,2)	4,5 (0,7)
5	4,0 (1,8)	5,1 (1,4)	4,7 (1,3)
6	4,3 (1,4)	5,3 (1,0)	5,2 (1,1)
7	5,9 (1,2)	5,4 (0,7)	5,0 (0,9)
8	4,6 (1,4)	5,1 (1,5)	5,0 (1,2)
9	5,2 (1,2)	5,0 (1,9)	5,2 (1,4)
10	5,9 (1,2)	6,0 (1,0)	4,8 (1,2)
11	4,8 (1,7)	5,9 (0,8)	5,2 (1,3)
12	5,7 (1,0)	5,9 (1,1)	5,3 (1,5)
13	5,3 (1,8)	5,8 (1,0)	5,2 (1,3)
14	5,4 (1,4)	5,2 (1,5)	5,8 (1,2)
15	5,0 (1,5)	5,7 (0,9)	4,9 (1,2)
Total	5,1 (1,5)	5,4 (1,2)	5,0 (1,2)

Valores são médias (desvio padrão).

DLB=controle; DLM=linhaça marrom; DLD=linhaça dourada.

4.3.2 Efeito das dietas no tamanho dos tumores

Primeiramente, em relação à análise do erro obtido pelas medidas em triplicatas dos tumores, verificou-se que as variâncias das medidas de x e y são estatisticamente iguais. Dessa forma, foi utilizada a média dessas duas variâncias para o cálculo do erro. O valor do erro encontrado foi de 0,34 mm, o que justifica terem sido tomados dados somente quando os tumores ficaram maiores do que 3,61 mm (o erro representa $\approx 10\%$ desse tamanho). A figura 3 mostra a normalidade da distribuição dos desvios, indicando que o erro intrapessoal é aleatório e, portanto, sem vícios.

Figura 3. Q-Q plot dos desvios obtidos das medidas em triplicatas realizadas nos tumores.

Com a ANOVA verificou-se que o tempo é um fator importante na análise da variação do tamanho dos tumores ao longo do experimento. O valor de p encontrado na análise dos dados dos grupos controle, linhaça marrom e linhaça dourada foram de 0,0000009896; 0,03428 e 0,535, respectivamente. Isso demonstra que os três grupos tiveram os tumores variando de forma diferente com o passar do tempo. A tabela 7 apresenta as probabilidades da hipótese nula (os tumores apresentarem valores iguais) ser aceita, ou seja, os valores de p obtidos com o teste t na comparação dos tamanhos dos tumores entre as semanas. Na mesma tabela, estão destacados (em **negrito**) os valores de $p < 0,05$, mostrando que o grupo controle apresentou uma variação no tamanho dos tumores ao longo das semanas maior do que a encontrada no grupo linhaça marrom; sendo que no grupo linhaça dourada não foi observada variação.

Dessa forma, decidiu-se fazer análise de regressão linear, uma análise quantitativa dos dados que apresenta a taxa de crescimento dos tumores por unidade de tempo: no caso, semana.

Tabela 7. Teste t de comparação dos tamanhos dos tumores entre as semanas.

p (grupo controle)								
Semanas*	0	1	2	3	4	5	6	7
1	1,00							
2	1,00	1,00						
3	0,19	1,00	1,00					
4	0,03	0,77	1,00	1,00				
5	0,02	0,67	1,00	1,00	1,00			
6	0,00	0,05	0,21	1,00	1,00	1,00		
7	0,00	0,02	0,08	0,60	1,00	1,00	1,00	
8	0,00	0,00	0,01	0,08	0,44	0,52	1,00	1,00
p (grupo linhaça marrom)								
Semanas*	0	1	2	3	4	5	6	7
1	1,00							
2	1,00	1,00						
3	1,00	1,00	1,00					
4	0,83	1,00	1,00	1,00				
5	0,43	1,00	1,00	1,00	1,00			
6	0,21	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		
7	0,21	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
8	0,03	0,637	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
p (grupo linhaça dourada)								
Semanas*	0	1	2	3	4	5	6	7
1	1,00							
2	1,00	1,00						
3	1,00	1,00	1,00					
4	1,00	1,00	1,00	1,00				
5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00			
6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		
7	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
8	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

*Após a introdução das dietas experimentais.

As figuras 4 e 5 mostram como evoluiu, em média, o tamanho dos tumores de cada grupo. É evidente que os tumores nos animais que consumiram linhaça marrom e dourada cresceram de forma mais lenta ao longo de todo experimento. A taxa de crescimento dos tumores pode ser quantificada pelo coeficiente angular da reta (valor de b apresentado na figura 5 $\pm$ erro padrão de b). Nos grupos DLM e DLD, as taxas de crescimento dos tumores foram aproximadamente dois terços da taxa apresentada pelo grupo DB.

Figura 4. Evolução do crescimento médio dos tumores MCF-7 em cada grupo. O grupo controle está representado por quadrados, o grupo linhaça marrom por círculos, e o grupo linhaça dourada por triângulos. Os coeficientes lineares e angulares das retas aproximadas para os pontos são os valores de a e b , respectivamente.

Figura 5. Evolução do crescimento médio dos tumores MCF-7 em cada grupo. O grupo controle está representado por quadrados, o grupo linhaça marrom por círculos, e o grupo linhaça dourada por triângulos. Os respectivos coeficientes angulares das retas aproximadas para os pontos estão representados por $b \pm \text{erro padrão de } b$. As linhas tracejadas representam os limites dos erros dos coeficientes angulares de cada reta.

A figura 4 apresenta os dados originais dos tumores. Para uma melhor visualização da taxa de crescimento (coeficiente angular) dos tumores de cada grupo, a figura 5 mostra as três retas saindo do mesmo ponto. Esse ajuste foi feito, porque o que importa é a taxa de crescimento (coeficiente angular), e não o coeficiente linear (valor de a na figura 4), assim, na figura 5, os coeficientes lineares de cada reta foram eliminados.

Nota-se que as retas que representam a evolução do tamanho dos tumores referentes aos grupos que consumiram linhaça marrom e dourada são praticamente paralelas na figura 4 e os limites dos erros dos coeficientes angulares (linhas tracejadas na figura 5) se sobrepõem, ou seja, não houve diferença estatística na taxa de crescimento dos tumores com o consumo de linhaça das duas variedades.

A maior concentração de ácido graxo α -linolênico na linhaça dourada não resultou em efeito significativo maior desta em comparação à marrom. Isso pode ser explicado pela diminuição da diferença de concentração desse nutriente quando as linhaças foram incorporadas nas rações (tabela 4), uma vez que a ração possuía 10% de linhaça e que o perfil de ácidos graxos das rações foi reduzido com a adição de outros ingredientes.

CAPÍTULO 5: ANÁLISE DE APOPTOSE NOS TUMORES

5.1 INTRODUÇÃO

O número de células de organismos multicelulares é estritamente regulado, não apenas pelo controle da taxa de divisão celular, mas também pelo controle da taxa de morte celular. No caso de células não serem mais necessárias, elas se autodestroem pela ativação de um programa de morte celular. Esse processo é chamado morte celular programada, ou apoptose (Alberts *et al.* 2002).

Células que morrem por um processo chamado de necrose, como resultado de injúria aguda, derramam seu conteúdo no meio envolto, causando uma resposta potencialmente inflamatória. Já no caso da apoptose, células morrem de forma “limpa”, sem prejudicar sua vizinhança. A célula se contrai e condensa. (Alberts *et al.* 2002). Apoptose é caracterizada pela ativação de endonucleases endógenas que quebram a cromatina em fragmentos de nucleossomos de 180 pares de base (bp) e múltiplos disso (Matassov 2004).

Muitos processos patológicos estão relacionados com alterações na via apoptótica. No câncer a sensibilidade para a apoptose está reduzida, o que leva a uma sobrevivência celular inapropriada e progressão maligna do tumor. No entanto, células cancerosas podem ser mais propensas para apoptose do que células normais. Esse fenótipo propenso para apoptose é mascarado e contrabalanceado pela supregulação de um ou mais mecanismos antiapoptóticos. Por isso, é de enorme interesse terapêutico levar seletivamente células cancerosas para apoptose (Bremer 2006).

De fato, o desenvolvimento de novos agentes que podem induzir seletivamente a apoptose em células cancerosas (eliminação de células cancerosas pela indução preferencial da apoptose nestas células, enquanto células normais são poupadas) é um campo em rápido desenvolvimento, como exemplificado pela enorme quantidade de tais agentes descritos na literatura contemporânea (Bremer 2006).

Terapias de indução da apoptose seletiva em células cancerosas são atualmente as estratégias anticâncer mais promissoras. Estas estratégias visam atingir e destruir especificamente células tumorais com nenhum ou um mínimo de dano colateral. No entanto, um problema fundamental ainda é que o alvo não é suficientemente específico para permitir que agentes altamente tóxicos o atinjam seletivamente (Bremer 2006).

Estudos em câncer de mama vêm evidenciando que a linhaça induz a apoptose em tumores. Tal efeito foi verificado em tumores MDA-MB-435 (Wang *et al.* 2005) e MCF-7 (Chen *et al.* 2004, Chen *et al.* 2007a). A linhaça também foi descrita como capaz de aumentar a apoptose em tumores de pacientes com câncer de mama primário (Thompson *et al.* 2005).

Alguns membros da família bcl-2 (uma família de genes e de proteínas a que esses genes dão origem) são inibidores da apoptose, incluindo bcl-2, bcl-X_L, BAG-1 e mcl-1, enquanto outros induzem a morte celular, incluindo bax, bad e bcl-X_S. Foi demonstrado que o tamoxifeno induz a apoptose por meio da modulação dos níveis de bcl-2 em células MCF-7. O tratamento com tamoxifeno leva à sub regulação da expressão de mRNA de bcl-2, e à redução na expressão da proteína bcl-2 (Zhang *et al.* 1999).

Talvez o mecanismo pelo qual a linhaça induza a apoptose seja semelhante ao do tamoxifeno.

5.2 MATERIAL E MÉTODO

A análise de apoptose dos tumores foi realizada em colaboração com o grupo do Dr. Thomas Ong, no departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Existem diversas metodologias para se analisar apoptose. Optou-se pela análise de apoptose por eletroforese, por ser uma análise barata e relativamente rápida.

A verificação da apoptose por esta análise se dá pela visualização de um padrão de escada (“ladder”) no gel de agarose, como pode ser observado na figura 5 (Simão *et al.* 1999) devido à quebra da cromatina em fragmentos de nucleossomos (Matassov 2004).

Figura 6. Padrão apoptótico característico indicado pelas setas, observado por Simão *et al.* (2000), presente em células sanguíneas periféricas de pacientes com câncer de mama.

Primeiramente, foi realizada a extração de DNA dos tumores pelo método clássico utilizando fenol e fenol-clorofórmio álcool isoamílico (Yu *et al.* 2000). Inicialmente, cerca de 100 mg de cada tumor foram incubados em 4 mL de solução

de lise SNET (Tris HCl 20 mM pH 8,0, EDTA 5 mM, SDS 1%) acrescidos de 80 μ L de Proteinase K (20 mg/mL) sob agitação, por aproximadamente 18 horas a 55,5°C.

No dia seguinte, foram adicionados 4 mL de fenol equilibrado (Invitrogen pH=8,0), e agitou-se por 30 min. em agitador mecânico. A seguir, foi realizada centrifugação a 4°C por 5 minutos a 2320 rpm para separar a fase aquosa da fase oleosa. A fase aquosa foi então transferida para um tubo, realizando-se novamente a extração com 4 mL de fenol equilibrado e agitando-se por 30 min em agitador mecânico. A seguir, foi realizada outra centrifugação a 4°C por 5 min. a 2320 rpm. E, novamente, a fase aquosa foi transferida para outro tubo. A última extração foi realizada com fenol-clorofórmio-alcool isoamílico (Invitrogen 25:24:1, v/v). Após nova centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um eppendorf, no qual foi adicionado 1 mL de isopropanol para precipitação do DNA. Em seguida, outra centrifugação foi realizada a 4°C por 15 min. a 11000 rpm. O isopropanol foi removido e o pellet foi lavado com 1 mL de etanol gelado a 70% para retirar as impurezas eventualmente presentes. Uma nova centrifugação foi realizada por 5 minutos e o etanol foi removido. O pellet de DNA foi diluído em 500 μ L de TE (Tris 100 mM, EDTA 10 mM, pH=8,0) e foi armazenado a -20°C.

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (Gene-Quant Pro (Amersham Pharmacia Biotec, EUA)).

Para verificação do padrão de escada do DNA dos tumores MCF-7 foi realizada eletroforese. Dez microgramas de DNA foram aplicados no gel de agarose a 1%, utilizando-se TAE (Tris-Acetato-EDTA) como tampão. Para que o volume total aplicado em cada poço fosse o mesmo, o volume foi completado com água quando se tinha soluções de DNA mais concentradas. A eletroforese foi realizada a

40 volts (1,3 V/cm) por aproximadamente 4 horas. O gel foi corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10000X em água (Uniscience). Foram adicionados 8 µL de GelRed em 200 mL de gel de agarose durante preparo deste. O gel foi visualizado sob luz UV.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 6 mostra o gel obtido da eletroforese do DNA extraído dos tumores MCF-7, isolados dos animais utilizados no experimento.

Não foi observado o padrão de escada no gel. O que indica que as células tumorais, tanto as do grupo controle como aquelas dos que ingeriram linhaça, não estavam em apoptose. O que é notado é um arraste (*smear*), o que indica dano no DNA, ou seja, que o DNA está parcialmente degradado, característico de células cancerosas.

Outras metodologias para análise de apoptose poderiam ser testadas para confirmação deste resultado. O método TUNEL, que detecta DNA fragmentado por apoptose através de núcleos celulares marcados quando o DNA encontra-se fragmentado, vem sendo bastante utilizado (Chen *et al.* 2004, Wang *et al.* 2005), e foi considerado por Kikuchi *et al.* (1998) a ferramenta mais acurada para detectar dano no DNA.

Figura 7. Eletroforese do DNA dos tumores MCF-7. O primeiro poço representa o padrão de peso molecular. Do segundo ao quinto poço o DNA foi extraído dos tumores dos animais do grupo controle (DB), o sexto ao nono corresponde aos animais que consumiram linhaça marrom (DLM), e do décimo ao décimo terceiro o DNA provém dos tumores dos animais que consumiram linhaça dourada (DLD).

CAPÍTULO 6: DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO

6.1 DISCUSSÃO GERAL

Observou-se que as linhaças marrom e dourada diminuem a taxa de crescimento dos tumores MCF-7 em camundongos nude em relação ao grupo controle. Esse resultado está de acordo com outros estudos que verificaram o efeito da linhaça em tumores MCF-7 (Chen *et al.* 2004, Chen *et al.* 2007a, Jungeström *et al.* 2007) e MDA-MB-435 (Chen *et al.* 2002, Dabrosin *et al.* 2002, Wang *et al.* 2005) implantados em camundongos nude. Os efeitos da linhaça em tumores receptores de estrógeno negativos demonstram que este alimento possui efeitos não endócrinos, como suas propriedades antioxidantes, antiangiogênicas e inibição de fatores de crescimento, que se somam aos hormonais quando o tumor é responsivo ao estrógeno.

Apesar de o presente estudo ter verificado o efeito da linhaça após o estabelecimento tumoral, o tratamento do câncer com linhaça não é uma pretensão. O que se propôs foi verificar se a linhaça teria efeito na evolução do tamanho tumor e, assim, sugerir, através dos mesmos mecanismos ou de parte dos mecanismos ocorridos, um efeito preventivo no câncer de mama. Tal mecanismo não foi explorado, mas, de acordo com evidências de que a lignana/linhaça possuem efeito antiestrogênico (Thompson 2003b), atividade antioxidante (Kitts *et al.* 1999), inibe a angiogênese (Dabrosin *et al.* 2002, Jungeström *et al.* 2007) e proliferação celular (Chen *et al.* 2004, Thompson *et al.* 2005, Chen *et al.* 2007a), e altera a expressão de fatores de crescimento (Chen *et al.* 2002, Dabrosin *et al.* 2002, Chen *et al.* 2007a, Jungeström *et al.* 2007), e de que o ácido graxo n-3 possui efeito antiinflamatório e

pode afetar a expressão de genes ou atividades de moléculas envolvidas no controle do crescimento celular, apoptose e angiogênese (Larsson *et al.* 2004), sugere-se que o resultado observado com o consumo das duas variedades de linhaça tenha sido uma somatória de tais propriedades.

Baseado em estudos que verificaram efeito positivo da linhaça utilizada juntamente com o tamoxifeno (Chen *et al.* 2004, Chen *et al.* 2007a), foi proposto também seu uso em conjunto com esta droga no tratamento do câncer responsivo ao estrógeno. A linhaça aumentou o efeito anti-câncer do tamoxifeno, aumentando o número de células apoptóticas e diminuindo o índice de proliferação celular. Chen *et al.* (2007a) verificou que 5% e 10% de linhaça, e tamoxifeno com linhaça reduziram significativamente a expressão da proteína IGF-1 no tumor MCF-7, a qual age sinergicamente com o estradiol na indução da proliferação de células cancerosas; assim, pode ter sido suprimido o efeito estimulante do estradiol no tumor. A expressão do HER2 foi significativamente menor no grupo que consumiu linhaça do que naquele tratado apenas com tamoxifeno, indicando que a linhaça pode complementar o efeito inibitório do tamoxifeno.

Considerando que o consumo diário de uma mulher é de aproximadamente 1150-2250 gramas de alimentos com uma média de 80% de umidade, em base seca, este consumo seria de 230-450 gramas. Portanto, 10% de linhaça utilizada na dieta oferecida aos animais equivalem a aproximadamente 23-45 gramas de linhaça por dia (Chen *et al.* 2007a).

Não se observou efeito da dieta com linhaça na indução da apoptose nos tumores. Tal resultado não condiz com o de estudos anteriores que encontraram essa indução pelo consumo de linhaça (Chen *et al.* 2004, Thompson *et al.* 2005, Chen *et*

al. 2007a). Essa discordância pode ser devido à diferença na metodologia utilizada. No presente estudo, foi utilizado um método não quantitativo, no qual é ou não é observado padrão apoptótico; já nos outros, o método utilizado quantifica células em apoptose, tornando a comparação mais sensível.

A quantificação de lignanas é bastante relevante para o presente estudo. Porém, não foi realizada análise deste fitoestrógeno nas linhaças nem nas rações, devido a sua complexidade e ao tempo que levaria para ser realizada.

Apesar das diferenças encontradas na composição das duas variedades de linhaça e outras possíveis, estas não são suficientes para causar diferentes efeitos no crescimento do tumor de mama implantado com células MCF-7, quando esta representou 10% na dieta.

Estudo que comparou a composição da linhaça marrom canadense com a linhaça "Dakota Gold", uma linhaça dourada originária do sul de Dakota, não observou diferença na composição lipídica total, mas a quantidade de ácido α -linolênico foi de 59% na linhaça marrom e 51% na linhaça dourada do total de ácidos graxos (Flax Council of Canada 2009). Dessa forma, a linhaça dourada "Dakota Gold" e a linhaça marrom canadense não podem ser comparadas (iguais) às linhaças dourada e marrom, respectivamente, utilizadas no presente estudo, devido às suas diferenças na composição lipídica e outras possíveis. Portanto, neste trabalho foi mostrado o efeito da linhaça brasileira, além da comparação das duas variedades.

Durante o desenvolvimento deste estudo, duas grandes dificuldades foram encontradas. A primeira ocorreu quando estava se procurando local para realização do experimento, pois existem poucos biotérios com capacidade de manter camundongos nude. A segunda foi a tentativa sem sucesso de importar os *pellets*

(comprimidos) de estradiol e, conseqüentemente, de encontrar alternativa para o fornecimento do hormônio aos animais. A solução encontrada pode não ter sido a melhor. Pelo fato dos animais retirarem os adesivos, a quantidade de estradiol absorvida deve ter oscilado durante o experimento e variado entre os camundongos. A meu ver, uma opção possivelmente melhor seria a injeção de uma solução de estradiol. Isso não foi feito porque além da compra do estradiol ser demorada, o risco de contaminação dos camundongos seria maior com as injeções. Assim, optou-se pelo uso dos adesivos.

6.2 CONCLUSÃO

O câncer de mama foi implantado nos camundongos nude a partir da linhagem de células humanas de câncer de mama dependentes de estrógeno (MCF-7). Foi mostrado efeito da farinha de linhaça marrom e dourada na evolução do tamanho dos tumores ao longo do ensaio, com diminuição na taxa de crescimento. Não se observou, porém, diferença entre as duas variedades de linhaça.

Através da metodologia utilizada, não foi detectada indução da apoptose nos tumores pelas dietas contendo linhaça marrom e dourada.

O consumo de linhaça, um alimento cuja ingestão é bastante tolerável, pode ser estimulado com potencial efeito na diminuição da incidência de câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adlercreutz H, Heikkinen R, Woods M, Fotsis T, Dwyer JT, Goldin BR, Gorbach SL. Excretion of the lignans enterolactone and enterodiol and of equol in omnivorous and vegetarian postmenopausal women and in women with breast cancer. **Lancet** 1982; 320:1295-99.
- Adlercreutz H, Höckerstedt K, Bannwart C, Bloigu S, Hämäläinen E, Fotsis T, Ollus A. Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens, and on sex hormone binding globulin (SHBG). **J Steroid Biochem** 1987; 27:1135-44.
- Adlercreutz H, Mousavi Y, Clark J, Höckerstedt K, Hamalainen E, Wahala K, Makela TH, Hase T. Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1992; 41: 331-7.
- Adlercreutz H, Bannwart C, Wähälä K, Mäkelä T, Brunow G, Hase T, Arosemena PJ, Kellis JT Jr, Vickery LE. Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1993; 44: 147-53.
- Adlercreutz H. Phytoestrogens: Epidemiology and a Possible Role in Cancer Protection. **Environ Health Perspect** 1995; 103 (Suppl 7): 103-12.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
- Andlauer W, Fürst P. Antioxidative power of phytochemicals with special reference to cereals. **Cereal foods world** 1998; 43 (5): 356-60.
- Arabbi PR. Alimentos funcionais: aspectos gerais. **Nutrire: Rev Soc Bras Alim Nutr** 2001; 21: 87-102.
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC. **Official Methods of Analysis**. 14th ed. Washington DC: AOAC; 1984.
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC. **Official Methods of Analysis**. Washington DC: AOAC; 1990. p. 342.
- BD Biosciences 2007. Disponível em: <URL: <http://www.bdbiosciences.com>> [2007 Ago 10].
- Beltrão-Braga PCB, Teixeira VR, Chammas R. Aspectos Moleculares da Transformação Celular: Conceitos e Implicações. In: Waitzberg DL. **Dieta, nutrição e câncer**. São Paulo: Editora Atheneu; 2004. p. 79-87.

- Boccardo F, Lunardi G, Guglielmini P, Parodi M, Murialdo R, Schettini G, Rubagotti A. Serum enterolactone levels and the risk of breast cancer in women with palpable cysts. **Eur J Cancer** 2004; 40: 84–9.
- Borges VC. Alimentos Funcionais: Prebióticos, Probióticos, Fitoquímicos e Simbióticos. In: Waitzberg DL. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2000. p. 1495–1509.
- Bremer E. **Targeted induction of apoptosis for cancer therapy**. Groningen; 2006. [Tese de Doutorado - University of Groningen].
- Brentani MM. Célula Normal, Ciclo Celular e Alterações da Proliferação Celular no Câncer. In: Waitzberg DL. **Dieta, nutrição e câncer**. São Paulo: Editora Atheneu; 2004. p. 73-8.
- Chen J, Stavro PM, Thompson LU. Dietary Flaxseed Inhibits Human Breast Cancer Growth and Metastasis and Downregulates Expression of Insulin-Like Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor. **Nutr Cancer** 2002; 43 (2): 187–92.
- Chen J, Hui E, Ip T, Thompson LU. Dietary Flaxseed Enhances the Inhibitory Effect of Tamoxifen on the Growth of Estrogen-Dependent Human Breast Cancer (MCF-7) in Nude Mice. **Clin Cancer Res** 2004; 10: 7703–11.
- Chen J, Power KA, Mann J, Cheng A, Thompson LU. Flaxseed Alone or in Combination with Tamoxifen Inhibits MCF-7 Breast Tumor Growth in Ovariectomized Athymic Mice with High Circulating Levels of Estrogen. **Exp Biol Med** 2007a; 232: 1071-80.
- Chen J, Power KA, Mann J, Cheng A, Thompson LU. Dietary Flaxseed Interaction With Tamoxifen Induced Tumor Regression in Athymic Mice With MCF-7 Xenografts by Downregulating the Expression of Estrogen Related Gene Products and Signal Transduction Pathways. **Nutr Cancer** 2007b; 58(2): 162–70.
- Codex Alimentarius. Disponível em: <URL: www.codexalimentarius.net/download/standards/351/CXG_023e_u.pdf> [2009 July 07].
- Cornwell T, Cohick W, Raskin I. Dietary phytoestrogens and health. **Phytochem** 2004; 65: 995–1016.
- Dabrosin C, Chen J, Wang L, Thompson LU. Flaxseed inhibits metastasis and decreases extracellular vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts. **Cancer Lett** 2002; 185: 31–7.
- Daun JK, Barthet VJ, Chornick TL, Duguid S. Structure, Composition, and Variety Development of Flaxseed. In: Thompson LU & Cunnane SC. **Flaxseed in Human Nutrition**. 2nd ed. Champaign, Illinois: AOCS Press; 2003. p.1–40.

- Davis P, Heber D, Packer L. Oxidation and Antioxidation in Cancer. In: Heber D, Blackburn GL, Go VLW, Milner J. **Nutritional Oncology**. 2nd ed. Burlington: Elsevier; 2006. p. 297 - 305.
- Flax Council of Canada. Disponível em: <URL: <http://www.flaxcouncil.ca/english/index.jsp?p=g7&mp=nutrition>> [2009 Maio 20].
- Fletcher RJ. Food sources of phyto-oestrogens and their precursors in Europe. **Br J Nutr** 2003; 89 (Suppl 1): 39–43.
- Fogh J, Giovanella BC. Preface. In: Fogh J, Giovanella BC. **The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research**. London: Academic Press; 1978. p. xv – xvi.
- Glitsø LV, Mazur WM, Adlercreutz H, Wähälä K, Mäkelä T, Sandström B, Bach Knudsen KE. Intestinal metabolism of rye lignans in pigs. **Br J Nutr** 2000; 84: 429-37.
- Guyton AC, Hall JE. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1997.
- Heber D, Blackburn G. Breast Cancer. In: Heber D, Blackburn GL, Go VLW, Milner J. **Nutritional Oncology**. 2nd ed. Burlington: Elsevier; 2006. p. 393 - 404.
- Heber D, Blackburn GL, Go VLW, Milner J. Introduction: The Principles of Nutritional Oncology. In: Heber D, Blackburn GL, Go VLW, Milner J. **Nutritional Oncology**. 2nd ed. Burlington: Elsevier; 2006. p. xix-xxiv.
- Heber D, Cohen P. Endocrine and Paracrine Factors in Carcinogenesis. In: Heber D, Blackburn GL, Go VLW, Milner J. **Nutritional Oncology**. 2nd ed. Burlington: Elsevier; 2006. p. 283-96.
- Heinonen S, Nurmi T, Liukkonen K, Poutanen K, Wähälä K, Deyama T, Nishibe S, Adlercreutz H. In Vitro Metabolism of Plant Lignans: New Precursors of Mammalian Lignans Enterolactone and Enterodiol. **J Agric Food Chem** 2001; 49 (7): 3178-86.
- Hutchins AM, Martini MC, Olson BA, Thomas W, Slavin JL. Flaxseed consumption influences endogenous hormone concentrations in postmenopausal women. **Nutr Cancer** 2001; 39: 58–65.
- Instituto Nacional do Câncer - INCA 2009. Disponível em: <URL: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=336> [2009 Maio 05].
- Jungeström MB, Thompson LU, Dabrosin C. Flaxseed and Its Lignans Inhibit Estradiol-Induced Growth, Angiogenesis, and Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Breast Cancer Xenografts *In vivo*. **Clin Cancer Res** 2007; 13(3): 1061-7.

- Kikuchi H, Ujiie S, Kanamaru R. The TdT-mediated dUTP Nick End Labeling Assay Precisely Assesses the DNA Damage in Human Tumor Xenografts. **Jpn J Cancer Res** 1998; 89: 862–9.
- Kilkinen A, Virtamo J, Vartiainen E, Sankila R, Virtanen MJ, Adlercreutz H, Pietinen P. Serum enterolactone concentration is not associated with breast cancer risk in a nested case-control study. **Int J Cancer** 2004; 108 (2): 277–80.
- Kitts DD, Yuan YV, Wijewickreme AN, Thompson LU. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiols and enterolactone. **Mol Cell Biochem** 1999; 202: 91–100.
- Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. **Am J Clin Nutr** 2004; 79: 935–45.
- Maillard V, Bougnoux P, Ferrari P, Jourdan ML, Pinault M, Lavillonnière F, Body G, Le Floch O, Chajès V. N-3 and n-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France. **Int J Cancer** 2002; 98: 78–83.
- Matassov D, Kagan T, Leblanc J, Sikorska M, Zakeri Z. Measurement of apoptosis by DNA fragmentation. **Methods Mol Biol** 2004; 282: 1-17.
- McCullough M, Giovannucci E. Nutritional Epidemiology. In: Heber D, Blackburn GL, Go VLW, Milner J. **Nutritional Oncology**. 2nd ed. Burlington: Elsevier; 2006. p. 85-96.
- Milner J. Nutrigenomics and Nutrigenetics. In: Heber D, Blackburn GL, Go VLW, Milner J. **Nutritional Oncology**. 2nd ed. Burlington: Elsevier; 2006. p. 15-24.
- Morrison WR, Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. **J Lipid Res** 1964; 5: 600-8.
- Nilsson S, Gustafsson JA. Biological role of estrogen and estrogen receptors. **Crit Rev Biochem Mol Biol** 2002; 37(1): 1–28.
- Padilha PC, Pinheiro RL. O Papel dos Alimentos Funcionais na Prevenção e Controle do Câncer de Mama. **Rev Bras Cancerol** 2004; 50(3): 251-60.
- Pietinen P, Stumpf K, Männistö S, Kataja V, Uusitupa M, Adlercreutz H. Serum Enterolactone and Risk of Breast Cancer: a Case-Control Study in Eastern Finland. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2001; 10: 339–44.
- Prosky L, Asp NG, Schweiser TF, DeVries JW, Furda I. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. **J Assoc Off Anal Chem** 1988; 71 (5): 1017-23.

- Rickard SE., Yuan YV, Chen J, Thompson LU. Dose Effects of Flaxseed and Its Lignan on N-Methyl-N-Nitrosourea-Induced Mammary Tumorigenesis in Rats. **Nutr Cancer** 1999; 35 (1): 50-7.
- Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther* 1999; 83: 217–44.
- Saarinen NM, Wärrä A, Airio M, Smeds A, Mäkelä S. Role of dietary lignans in the reduction of breast cancer risk. **Mol Nutr Food Res** 2007; 51: 857–66.
- Saarinen NM, Power KA, Chen J, Thompson LU. Lignans are Accessible to Human Breast Cancer Xenografts in Athymic Mice. **Nutr Cancer** 2008; 60(2): 245-50.
- Savage PD. Molecular Basis of Human Neoplasia: A Tutorial. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p. 1235-42.
- Serraino M, Thompson LU. The effect of flaxseed supplementation on early risk markers for mammary carcinogenesis. **Cancer Lett** 1991; 60 (2):135-42. [Abstract]
- Serraino M, Thompson LU. The effect of flaxseed supplementation on the initiation and promotional stages of mammary tumorigenesis. **Nutr Cancer** 1992; 17 (2):153-9. [Abstract]
- Setchell KDR, Lawson AM, Mitchell FL, Adlercreutz H, Kirk DN, Axelson M. Lignans in man and in animal species. **Nature** 1980; 287: 740-2.
- Setchell KDR, Borriello SP, Gordon H, Lawson AM, Harkness R, Morgan DML, Kirk DN, Adlercreutz H, Anderson LC, Axelson M. Lignan formation in man-microbial involvement and possible roles in relation to cancer. **Lancet** 1981; 2: 4-7.
- Setchell KDR. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **Am J Clin Nutr** 1998; 68 (suppl): 1333S–46S.
- Simão TA, Andrada-Serpa MJ, Mendonça GAS, Marques DD, Braga MA, Santos ALS, Amorim LMF, Cardoso LEB, Carmo PAO, De-Moura-Gallo CV. Detection and analysis of apoptosis in peripheral blood cells from breast cancer patients. **Braz J Med Biol Res** 1999; 32(4).
- Simbalista RL. **Efeitos da suplementação da dieta com linhaça nos sintomas climatéricos de mulheres na pós-menopausa**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].
- Thompson LU, Rickard SE, Orcheson LJ, Seidl MM. Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. **Carcinogenesis** 1996a; 17 (6): 1373-6.

- Thompson LU, Seidl MM, Rickard SE, Orcheson LJ, Fong HH. Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed. **Nutr Cancer** 1996b; 26(2): 159-65. [Abstract]
- Thompson LU. Analysis and Bioavailability of Lignans. In: Thompson LU & Cunnane SC. **Flaxseed in Human Nutrition**. 2nd ed. Champaign, Illinois: AOCS Press; 2003a. p. 92-116.
- Thompson LU. Flaxseed, Lignans, and Cancer. In: Thompson LU & Cunnane SC. **Flaxseed in Human Nutrition**. 2nd ed. Champaign, Illinois: AOCS Press; 2003b. p. 194-222.
- Thompson LU, Chen JM, Li T, Strasser-Weippl K, Goss PE. Dietary Flaxseed Alters Tumor Biological Markers in Postmenopausal Breast Cancer. **Clin Cancer Res** 2005; 11(10): 3828-35.
- Thompson LU. Flaxseed, Lignans, n-3 Fatty Acids, and Drug Synergy in the Prevention and Treatment of Cancer. In: Thompson LU & Ward WE. **Food-Drug Synergy and Safety**. Boca Raton: CRC Press; 2006. p. 147-73.
- Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N. Phytoestrogen Content of Foods Consumed in Canada, Including Isoflavones, Lignans, and Coumestan. **Nutr Cancer** 2006; 54 (2): 184–201.
- Wang L, Chen J, Thompson LU. The inhibitory effect of flaxseed on the growth and metastasis of estrogen receptor negative human breast cancer xenografts is attributed to both its lignan and oil components. **Int J Cancer** 2005; 116: 793–8.
- Willett WC. Nutrition and cancer. **Salud pública Méx** 1997; 39 (4): 298-309.
- Yu M, Ryu DY, Snyderwine EG. Genomic imbalance in rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine. **Mol Carcinog** 2000; 27(2): 76-83.
- Zhang GJ, Kimijima I, Onda M, Kanno M, Sato H, Watanabe T, Tsuchiya A, Abe R, Takenoshita S. Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-x_l, without alteration of p53 protein levels. **Clin Cancer Res** 1999; 5: 2971-7.
- Zhou JR. Animal Models in Nutritional Oncology Research. In: Heber D, Blackburn GL, Go VLW, Milner J. **Nutritional Oncology**. 2nd ed. Burlington: Elsevier; 2006. p. 333-47.
- Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AMY, West DW, Wu-Williams AH, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF, Hyer MB. Migration patterns and breast cancer risk in asian-american women. **JNCI** 1993; 85 (22):1819-27.

ANEXOS

ANEXO 1 – CERTIFICADO DE IRRADIAÇÃO DAS RAÇÕES.

CERTIFICADO DE IRRADIAÇÃO DE PRODUTO

Nº : CTR-CI-CBM-006/08

O CENTRO DE TECNOLOGIA DAS RADIAÇÕES (CTR) do INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES – IPEN certifica que os produtos abaixo relacionados foram tratados por radiação gama (Cobalto-60) no irradiador multipropósito no dia 01/08/2008 e receberam a dose mínima de 10 kGy conforme certificado de dosimetria LDPI 261/2008.

Relação de produtos:

- 39 pacotes contendo ração da Prag Soluções Biociências, com 1 kg cada.

Emitido por

MSc. Yasko Kodama

CTRD

Data: 05/08/08

Revisado por

Dr. Paulo Roberto Rela

CTRD

Data: 05/08/08

ANEXO 2 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470

CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil

Telefone: (55-11) 3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 08 de outubro de 2007.

Ilma. Sra.

Alice Gomes Lichtenthäler

Faculdade de Saúde Pública – U.S.P.

Prezada Senhora:

Em reunião realizada na presente data o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (CEP-IMT) analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza ética o projeto classificado sob no. 11/07, intitulado “**Efeito de uma dieta rica em linhaça no câncer de mama**”, encaminhado por Vossa Senhoria.

Atenciosamente

Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi

Coordenador do CEP-IMT

CURRÍCULO LATTES

DA AUTORA

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Alice Gomes Lichtenthäler)

Page 1 of 3

Alice Gomes Lichtenthäler

Graduação em Nutrição pela Universidade de São Paulo (2006). Fez Iniciação Científica Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP com bolsa do CNPq, sob orientação da Profa. Célia Colli.
(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 15/09/2007

Nome	Alice Gomes Lichtenthäler
Nome em citações bibliográficas	Lichtenthäler, A. G.
Sexo	Feminino
Endereço profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. Av. Dr. Arnaldo, 715 Cerqueira César 01246-904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 84649034
Endereço eletrônico	alice@usp.br

Formação acadêmica/Titulação

2007 Mestrado em Nutrição Humana Aplicada.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Efeito de uma dieta rica em linhaça no câncer de mama., *Orientador:* José Alfredo Gomes A.
Palavras-chave: alimentos funcionais; camundongos; câncer de mama; linhaça.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos.
Sectores de atividade: Saúde humana.

2002 - 2006 Graduação em Nutrição. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Atuação profissional

Unidade Básica de Saúde Jardim Jaqueline, UBS, Brasil.

Vínculo institucional

2006 - 2006 Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 30

Outras informações Foram realizadas intervenções nutricionais em gestantes.

Restaurante Universitário da USP, RUUSP, Brasil.

Vínculo institucional

2006 - 2006 Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 30

Instituto Brasileiro de Educação Nutricional, IBEN, Brasil.

Vínculo institucional

2006 - 2006 Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 30

Outras informações Foram elaborados materiais educativos em Nutrição para pais e educadores de crianças com 3 anos realizados experimentos com alimentos na cozinha experimental do Instituto.

DO ORIENTADOR

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (José Alfredo Gomes Arêas)

Page 1 of 23

José Alfredo Gomes Arêas
Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1C

Graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade de São Paulo (1973), Mestrado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (1979), Doutorado em Food Science, University of Nottingham, Inglaterra (1983), Pós-doutorado junto ao Biomembrane Unit, Dep. of Biochemistry, University of Oxford, Inglaterra (1990-1993), Vice-Presidente da SBCTA (2004-2005). Atualmente é Professor Titular da Universidade de São Paulo junto ao Dep. de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública, Coordenador da área de Alimentos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) de 2001 a 2008. Tem experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Nutrição e Saúde Pública, com ênfase em Alimentos e Saúde, Propriedades Funcionais de Alimentos e Alimentos Funcionais, atuando principalmente nos seguintes temas: alimentos funcionais, alimentos não convencionais, alimentos especiais, intervenções nutricionais, processamento de alimentos e valor nutritivo, ressonância magnética nuclear aplicada a alimentos, extrusão.
(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 26/05/2009

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/5885518243056121>

Links para
Outras Bases:

[Diretório de grupos de pesquisa](#)

[SciELO - artigos em texto completo](#)

Dados pessoais

Nome	José Alfredo Gomes Arêas
Nome em citações bibliográficas	Arêas, J.A.G.
Sexo	Masculino
Endereço profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição, Av. Dr. Arnaldo, 715, Cerqueira César, 01246-904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 8526748 Fax: (11) 8526748 URL da Homepage: http://www.nutricao.fsp.usp.br/funcionais

Formação acadêmica/Titulação

- 1986** Livre-docência.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Interrelação entre estrutura e textura de isolados proteicos de pulmão bovino. *Ano de obtenção:* 1986.
Palavras-chave: Propriedades Funcionais; Interação lipíde-proteína; Extrusão termoplástica; Espectroscopia de Alimentos; Atividade de água; Proteínas alimentares.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Tecnologia de Alimentos / *Especialidade:* Aproveitamento de Subprodutos.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Tecnologia de Alimentos / *Especialidade:* Tecnologia de Produtos de Origem Animal.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Propriedades Funcionais de Alimentos.
Setores de atividade: Nutrição e alimentação; Produção animal, inclusive serviços veterinários; Fabricação de Equipamentos de Instrumentação médico-hospitalares, instrumentos de precisão e ópticos, equipamentos para automação industrial, cronômetros e relógios.
- 1990 - 1993** Pós-Doutorado.
University of Oxford.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, . .
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Biofísica / *Subárea:* Biofísica Molecular.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Propriedades Funcionais de Alimentos.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Química, Física, Físico-Química e Bioquímica dos Alim. e das Mat-Primas Alimentares.
- 1980 - 1983** Doutorado em Food Science.
University of Nottingham, NOTTINGHAM, Inglaterra.
Título: Influence of Lipid-protein Interactions on Characteristics of Extruded Offal Protein. *Ano de Obtenção:* 1983.
Orientador: Ralston A Lawrie.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, . .
Palavras-chave: Food Protein; Extrusion of Protein; Recovery of Abattoir; Functional Properties; Novel Products; Protein Upgrade.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Tecnologia de Alimentos / *Especialidade:* Aproveitamento de Subprodutos.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Química, Física, Físico-Química e Bioquímica dos Alim. e das Mat-Primas Alimentares.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Propriedades Funcionais de Alimentos.
Setores de atividade: Nutrição e alimentação; Produção animal, inclusive serviços veterinários; Produtos e processos biotecnológicos.
- 1974 - 1979** Mestrado em Ciências dos Alimentos.