

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR, PELO MÉTODO DE MEAL-FEEDING, E DA SUPLEMENTAÇÃO DE SEMENTE DE LINHAÇA (LINUM USITATISSIMUM) NO CÂNCER DE COLORRETAL DE CAMUNDONGOS SWISS**  
**EFFECTS OF FOOD RESTRICTION BY MEAL-FEEDING METHOD AND SUPPLEMENTATION OF SEED LINSEED (*Linum usitatissimum*) IN COLORECTAL CANCER IN MICE *Swiss***

*Rita de Cássia Pereira da Silva* \*

*Mariana Garcia Perez*

*Paula Thaissa Zaninetti*

*Denise dos Santos Escobar*

*Juliana Ferreira Varjão*

*Carla Kobbi Pedroso*

*Priscila Lumi Ishii*

*Sara Monalisa Alencar Lemeiras* \*\*

*Stephanie Dynczuki Navarro*

*Mariana de Oliveira Mauro* \*\*\*

*Rodrigo Juliano Oliveira* \*\*\*\*

**RESUMO:**

No Brasil, principalmente nos estados do Nordeste, há um grande número de pessoas que estão em quadro de desnutrição protéico-calórica. Este fato se deve em especial à ingestão de alimentos em quantidade e qualidade inadequadas. Não há registros conclusivos do que este quadro carencial pode causar em pacientes com câncer ou predispostos a tal doença. Outro fato que chama a atenção é que existe uma tendência destas populações ingerirem grãos em sua dieta devido ao baixo custo e fácil armazenamento e este pode ser um fator favorável à prevenção de neoplasias. A presente pesquisa teve por objetivo avaliar o processo de desnutrição causado pela técnica de *Meal-Feeding* (MF), que consiste na oferta da ração por somente 2 horas ao dia, e a suplementação de sementes de linhaça na carcinogênese química. Os machos *Swiss* foram divididos em 4 grupos experimentais (n = 9). Todos os grupos foram submetidos ao processo de MF por um período de 28 dias. Dois grupos (Grupo 1 e 2) foram suplementados com ração comercial (RC) sendo um deles tratado com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o outro com 1,2-dimetilhidrazina (DMH). Os outros dois grupos (Grupo 3 e 4) foram suplementados com ração linhaça (RL = RC + 10% de semente de linhaça) sendo um deles tratado com EDTA e o outro com DMH. A

\*Graduada em Nutrição pelo Centro Universitário Filadélfia - UniFil, Londrina, Paraná, Brasil.

\*\*Graduada em Biomedicina pelo Centro Universitário Filadélfia - UniFil, Londrina, Paraná, Brasil.

\*\*\*Mestre e Doutoranda em Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBRC/UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

\*\*\*\*Graduado em Ciências Biológicas (Bacharelado/Licenciatura), Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – IBB/UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. Especialista em Análises Clínicas Aplicada à Reprodução Humana, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FMB/UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. Mestre em Genética e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina – CCB/UEL, Londrina, Paraná, Brasil. Doutor em Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBRC/UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil. Professor Adjunto I da Faculdade de Medicina “Dr. Hélio Mandetta”, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil – rodrigo.oliveira@ufms.br

análise dos pesos indicou que no início do experimento o grupo 2 possuía uma menor média de peso se comparado aos demais e este fato se manteve até o final do período de repleção. No entanto, a perda de peso durante o período de repleção foi similar para todos os grupos. Ao final do experimento e no ganho de peso após o período de repleção todos os grupos possuíam médias semelhantes entre si. O processo de desnutrição não se correlaciona ao desenvolvimento de focos de criptas aberrantes assim como a suplementação de linhaça. No entanto, a associação de linhaça e DMH indica que esta vibra tem atividade anticarcinogênica. Frente a estes resultados sugere-se o uso da linhaça no processo de quimioprevenção e anticarcinogênese.

**PALAVRAS-CHAVE:** anticarcinogênese, câncer de colorretal, desnutrição, linhaça, *meal-feeding*.

#### **ABSTRACT:**

In Brazil, mainly in the states of the Northeast, there are a large number of people who are part of protein-calorie malnutrition. This fact is due in particular to the ingestion of food in quantity and quality inadequate. There is no conclusive records of carencial that it may cause in patients with cancer or predisposed to such disease. Another fact that draws attention is that there is a tendency these people eat grains in their diet because of its low cost and easy storage and this may be a factor conducive to the prevention of cancer. This study aimed to evaluate the process of malnutrition caused by the technique of Meal-Feeding (MF), which is the supply of rations for only 2 hours a day, and supplementation of flaxseed in chemical carcinogenesis. The Swiss males were divided into 4 experimental groups (n = 9). All groups were submitted to the MF for a period of 28 days. Two groups (Group 1 and 2) were fed with rations (RC) one being treated with ethylenediaminetetraacetic acid and the other with 1.2-dimethylhydrazine. The other two groups (Group 3 and 4) were fed diets with flaxseed (RL = CR + 10% of flaxseed) one being treated with ethylenediaminetetraacetic acid and the other with 1.2-dimethylhydrazine. Analysis of weights indicated at the beginning of the experiment group 2 had a lower average weight than the others and this fact was kept until the end of repletion. However, the weight loss during the repletion was similar for all groups. At the end of the experiment and in weight gain after the repletion all groups had similar average among themselves. The process of malnutrition is not correlated to the development of aberrant crypt foci of as well as flaxseed supplementation. However, the combination of flaxseed and HMD indicates that vibrates has anticarcinogenic activity. In view of these results it is suggested the use of flaxseed in the process of quimioprevenção and anticarcinogênese.

**KEY WORDS:** anticarcinogênese, of colorectal cancer, malnutrition, flaxseed, meal-feeding.

#### **INTRODUÇÃO**

A desnutrição é caracterizada por um desequilíbrio e/ou uma deficiência de nutrientes no organismo. Tais desequilíbrios são frequentemente produzidos pela deficiência relativa de proteínas, carboidratos e gorduras como fontes de energia e micronutrientes. Essas deficiências são seguidas de alterações fisiopatológicas que primeiro traduzem-se em prejuízo funcional e, posteriormente, em danos bioquímicos e físicos (GURMINI *et al.*, 2005).

O estudo deste quadro carencial em seres humanos nem sempre responde as perguntas de pesquisadores. Assim, modelos experimentais foram criados para estudos de desnutrição

desencadeada por restrição protéico-calórica. Uma forma de se proceder esta desnutrição pode ser por meio de restrição alimentar.

O esquema de restrição alimentar usualmente denominado de *Meal-Feeding* (MF), consiste na oferta de uma única refeição diária de 2 horas, sem restringir a disponibilidade de ração durante esse período desenvolvendo muitas adaptações morfo-metabólicas (SUMIDA *et al.*, 2000). Desta forma, consegue simular situações que representem populações que encontram-se em situações precárias onde fazem apenas uma refeição diária.

A literatura consultada demonstra trabalhos realizados com MF. No entanto, não demonstra qual a influência da desnutrição, causada por MF, na carcinogênese química.

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2010) o número de casos novos de câncer de cólon e reto estimados para o Brasil no ano de 2008 é de 12.490 casos em homens e de 14.500 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres.

O fator de risco mais importante para este tipo de neoplasia é a história familiar de câncer de cólon e reto e predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino, além de uma dieta rica em gorduras animais, baixa ingestão de frutas, vegetais e cereais; assim como, consumo excessivo de álcool e tabagismo (INCA, 2010).

Para Hass *et al.* (2007) o desenvolvimento das formas mais comuns de câncer resulta de uma interação entre fatores endógenos e ambientais, sendo o mais notável desses fatores a dieta. De todos os casos de câncer 80 a 90% estão associados a fatores ambientais.

Como o câncer no ser humano leva desde seu início até a manifestação algumas décadas, é provável que medidas de intervenção sejam mais eficazes que medidas terapêuticas para o controle da morbimortalidade causada por essa doença (CAMARGO *et al.*, 1994).

Uma tentativa de se promover esta prevenção pode ser por meio do uso de alimentos funcionais.

O termo alimentos funcionais foi inicialmente introduzido pelo governo do Japão em meados dos anos 80 como o resultado de esforços para desenvolver alimentos que possibilitassem a redução dos gastos com saúde pública, considerando a elevada expectativa de vida naquele país. O Japão foi pioneiro na formulação do processo de regulamentação específica para os alimentos funcionais. O termo em questão refere-se aos alimentos processados, similares em aparência aos alimentos convencionais, usados como parte de uma dieta normal e que demonstraram benefícios fisiológicos e/ou reduzem o risco de doenças crônicas além de suas funções básicas nutricionais (STRINGHETA *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, os estudos têm comprovado que as dietas com quantidades adequadas de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 desempenham papel importante na prevenção e tratamento de várias doenças. Desta forma, a suplementação dietética de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 pode associar-se à redução de doenças cardiovasculares, neoplasias e colite ulcerativa, podendo também proteger pacientes com lesões pré-neoplásicas de cólon (PITA *et al.*, 2006).

As sementes de linhaça (*Linum usitatissimum*) recebem grande atenção da população em decorrência de suas alegações nutricionais e funcionais à saúde, uma vez que estes grãos apresentam significativos teores de fibras alimentares (MATIAS, 2007) e ômega 3.

Nenhum relato de prevenção de carcinogênese colorretal em seres humanos por linhaça foi encontrada na literatura pesquisada e tão logo a correlação desta suplementação em pacientes desnutridos. Assim, a experimentação animal pode auxiliar na compreensão do trinômio carcinogênese-desnutrição-linhaça. Desta forma, percebe-se que a utilização de animais

nos trabalhos experimentais de pesquisa científica é de fundamental importância, não só pelos avanços que permite no conhecimento dos mecanismos dos processos vitais, mas também no aperfeiçoamento dos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças tanto na medicina humana como na própria medicina veterinária (COBEA, 2004).

Frente a estes relatos a presente pesquisa teve por objetivo avaliar a correlação do processo de *Meal-Feeding* e a suplementação de sementes de linhaça na carcinogênese colorretal de camundongos Swiss.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Agentes químicos

#### 1,2-Dimetilhidrazina (DMH)

Para a indução de danos no DNA utilizou-se a 1,2-Dimetilhidrazina (DMH; Sigma®, CAS No. 306-37-6) na concentração de 2 e 20mg/Kg peso corpóreo (p.c) diluída em solução de EDTA, na concentração de 0,37mg/ml, e administrada aos animais por via intraperitoneal (i.p) na proporção de 0,1mL/10g de peso corpóreo (c.p.). Utilizou-se, para a indução dos focos de criptas aberrantes, o protocolo sugerido por Silva (1999) modificado, em que quatro doses de DMH foram administradas, sendo duas doses por semana durante duas semanas na concentração de 2mg/Kg (p.c.; i.p.) e o procedimento se estendeu por outras duas semanas usando a dose de 20mg/Kg (p.c.; i.p.).

A administração de EDTA ou DMH aos animais aconteceu após 4 semanas de restrição alimentar (período de depleção).

54

### Animais

Foram utilizados camundongos da variedade *Swiss (Mus musculus)* machos (n=36), adultos, com o peso médio de 30g, provenientes do Centro de Estudos em Nutrição e Genética Toxicológica – CENUGEN do Centro Universitário Filadélfia – UniFil. Os animais foram mantidos e tratados no mesmo centro.

Os animais foram mantidos em caixas de propileno, forradas com maravalha branca de pinho, e trocadas semanalmente. Receberam ração comercial (marca Nuvital®) e água filtrada *ad libitum* durante o período de adaptação e depois tiveram restrição alimentar com explicado a seguir. A iluminação e temperatura foram controlados, utilizando-se 12/12h de claro/escuro (período claro iniciado às 7h e escuro às 19h), temperatura constante de 22±2°C e umidade de 55%±10.

O experimento foi conduzido segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2004).

### Dietas

Utilizou-se dois tipos de dieta: ração comercial Nuvital® e esta mesma ração suplementada com 10% de linhaça. Para a preparação desta última foi utilizada semente de linhaça triturada e misturadas com a ração comercial previamente moída. Em seguida adicionou-se água filtrada para dar liga à massa. Em seguida a ração foi então peletizada e seca em estufa à 40°C por aproximadamente 12h.

### **Delineamento experimental**

Os animais foram subdivididos em 4 grupos experimentais (n=9): Grupo 1 e 3 os animais receberam 8 aplicações de EDTA (0,37mg/mL, 0,1mL/10g (p.c.; i.p.) na 5ª, 6ª, 9ª e 10ª semanas de experimentação; Grupo 2 e 4 - os animais foram submetidos à 4 semanas em restrição alimentar por MF, na 5ª e 6ª semanas os animais receberam 4 doses de DMH, 2 doses por semana, (2mg/Kg c.p.; i.p.) e nas 9ª e 10ª semanas outras quatro doses (20mg/Kg, p.c.; i.p.).

Todos os animais passaram por um período de restrição alimentar de 4 semanas anteriormente à aplicação de EDTA ou DMH. Durante a administração das drogas e por 15 dias após, a restrição alimentar foi mantida. A este período deu-se o nome de período de depleção. Em seguida os animais foram mantidos se alimentando das mesmas rações. No entanto, estas foram administradas *ad libitum* e caracterizou o período de repleção.

Os grupos 1 e 2 foram suplementados sempre com ração comercial e os grupos 3 e 4 com ração comercial + 10% de semente de linhaça.

Os animais foram mantidos por 8 semanas e então foram coletados os intestinos para a avaliação da presença de focos de criptas aberrantes.

### **Ensaio Biológico - Teste de Focos de Criptas Aberrantes**

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical no final da 24ª semana para retirada da porção final do intestino. Logo após o cólon ser retirado este ficou em uma solução tamponada de formalina 10% por um período mínimo de 24 horas.

No momento da análise, cada segmento do cólon foi corado com solução de azul de metileno 10% por 10 minutos e depositado em uma lâmina com a mucosa voltada para cima. A análise foi realizada em microscópio óptico (Microscope DBG) em aumento de 10 vezes. Toda a mucosa foi avaliada para a identificação e quantificação dos focos de criptas aberrantes. A identificação dos FCA foi baseada nos critérios utilizados por Bird (1987): (I) foco constituído de uma única cripta - a cripta aberrante apresenta revestimento por camada epitelial espessa, com abertura luminal elíptica e de tamanho superior (ao menos 2 vezes) aos das criptas normais circunvizinhas; (II) foco com duas ou mais criptas - as criptas aberrantes formam blocos distintos e ocupam uma área maior que a ocupada por um número equivalente de criptas de morfologia normal. Não há presença de criptas normais separando as criptas aberrantes dentro desses focos.

Para análise estatística dos dados provenientes do teste de focos de criptas aberrantes o número total de focos de criptas aberrantes, de criptas aberrantes por focos e a relação cripta/foco, nos diferentes grupos foram comparados, utilizando-se ANOVA/Tukey ( $p < 0,05$ ).

### **Porcentagem de redução de danos**

A porcentagem de redução de danos do agente DMH pela linhaça foi calculada pelo número de focos de criptas aberrantes observados no tratamento com DMH menos o número de focos de criptas aberrantes observadas no grupo associado (DMH + linhaça) x 100, dividido pelo número de focos de criptas aberrantes observados no tratamento com DMH menos o número de focos de criptas aberrantes no controle.

### **RESULTADOS**

A Tabela 1 apresenta a média do peso inicial, peso ao final do período de depleção,

perda de peso no período de depleção, peso ao final do período de repleção e ganho de peso no período de repleção dos diferentes grupos experimentais. No início do experimento e ao final de depleção os animais do grupo 2 apresentavam a menor média de pesos e esta diferença mostrou-se estatisticamente significativa. No início do experimento a média de peso variou de  $37,33 \pm 3,00$  a  $42,00 \pm 3,61$ . Ao final do período de depleção as médias variaram de  $32,00 \pm 5,66$  a  $26,85 \pm 3,02$ . Apesar das diferenças encontradas a perda de peso durante o período de depleção foi semelhante para todos os grupos e variou de  $-7,67 \pm 7,53$  a  $-10,57 \pm 3,21$ . Quando da avaliação do peso final do período de repleção e ganho de peso neste mesmo período verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas para os mesmos parâmetros.

A análise da frequência de focos de criptas aberrantes permite verificar que a DMH é eficiente em causar o aparecimento deste marcador biológico e a frequência foi de  $5,83 \pm 2,50$ . Já para os animais que somente passaram por restrição alimentar e que foram suplementados com ração comercial ou ração suplementada com 10% de linhaça não houve ocorrência de focos de criptas aberrantes. Já para o grupo que recebeu a DMH associada à linhaça pode-se verificar uma incidência de  $2,00 \pm 1,12$  indicando uma porcentagem de redução de danos para a linhaça de 65,69%.

## DISCUSSÃO

São pobres as pessoas que não suprem permanentemente necessidades humanas elementares como comida, abrigo, vestuário, educação, cuidados de saúde dentre outros. Tem fome aqueles cuja alimentação diária não aporta a energia requerida para a manutenção do organismo e para o exercício das atividades ordinárias do ser humano. Sofrem de desnutrição os indivíduos cujos organismos manifestam sinais clínicos provenientes da inadequação quantitativa (energia) ou qualitativa (nutrientes) da dieta ou decorrentes de doenças que determinem o mau aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos (MONTEIRO, 2003).

Fome e desnutrição não são conceitos equivalentes. No entanto, uma vez que, se toda fome leva obrigatoriamente à desnutrição, nem toda desnutrição se origina da deficiência energética das dietas. A deficiência específica de macro e micronutrientes, o desmame precoce, a higiene alimentar precária e a ocorrência excessiva de infecções são causas bastante comuns na desnutrição (MONTEIRO, 2003).

Segundo Burlandy & Anjos (1997) as áreas que concentram os maiores percentuais de desnutrição no Brasil é a Região Nordeste e as áreas rurais em geral.

A desnutrição nestas áreas pode associar-se a duas questões importantes: (I) esta população está em estado de fome ou (II) ingere alimentos não balanceados que são capazes de saciar a fome, mas não de promover nutrição adequada.

Um estudo realizado por Teodósio *et al.* (1990) estabeleceu uma dieta básica regional. Esta dieta foi estabelecida a partir de inquéritos dietéticos, conduzidos na Zona da Mata de Pernambuco e determinou-se que para cada 100g de dieta estava presente 18,3g de feijão mulatinho, 64,8g de farinha de mandioca, 4,1g de charque e 12,8g de batata doce. Esta preparação apresenta a seguinte composição centesimal: proteína (7,8%), carboidrato (73,2%), gordura (1,5%), fibras (7,2%), cinzas (1,3%) e umidade (9,0%).

Atualmente, esta dieta é usada como modelo experimental para estudo da desnutrição, por induzir, no rato, quadro carencial semelhante ao marasmo verificado em populações humanas (TEODÓSIO *et al.*, 1990; FERREIRA *et al.*, 2005). No entanto, outra forma de se estudar o estado de desnutrição em animais experimentais, e que refleti a condição humana, é por meio da técnica

de *Meal Feeding*. Nestes protocolos os animais possuem dietas adequadamente balanceadas disponíveis apenas por duas horas diariamente (SUMIDA *et al.*, 2000).

Apesar de bem estabelecidos algumas formas de causar desnutrição em animais experimentais, a literatura pesquisada não possui nenhum trabalho que desnutrição e carcinogênese química em camundongos. Assim, este trabalho mostra-se pioneiro. Outra questão importante a ser levantada é que também não foi encontrado nenhum trabalho que versasse sobre o trinômio carcinogênese-desnutrição-linhaça. Assim, este trabalho mostra-se mais uma vez pioneiro por demonstrar a influência na linhaça na carcinogênese colorretal causada por DMH em camundongos *Swiss*.

Frente a estas considerações e analisando o resultados obtidos por esta pesquisa pode-se inferir que o processo de *Meal Feeding*, realizado durante 4 semanas anteriores à indução das lesões pré-neoplásicas, mais duas semanas de indução das lesões pré-neoplásicas e outras duas semanas posteriores à indução, aqui chamado de período de depleção, foi eficiente em causar a desnutrição nos camundongos. Este relato está de acordo com os resultados encontrados por Teodósio *et al.* (1990) e Ferreira *et al.* (2005).

O período de depleção causou perda de peso em todos os grupos visto que todos estavam sobre regime de *Meal Feeding*. Os grupos que receberam EDTA+ RC, DMH+RC, EDTA+RL e DMH+RL apresentaram perda de peso de 25,17%, 20,18%, 23,27% e 25,23%, respectivamente. Segundo Ferreira *et al.* (2005) esta perda em animais experimentais é um importante indicativo do quadro carencial semelhante ao marasmo verificado em populações humanas. Apesar destas importantes reduções de peso verifica-se que elas foram semelhantes entre os diferentes grupos.

Após este período os animais entraram em processo de repleção onde as dietas foram mantidas *ad libitum*. Esta alteração no processo alimentar dos animais deveu-se à perda de peso e marasmo ser tão significativo que em experimentos pilotos estava diretamente relacionado à morte dos animais caso o período de depleção fosse estendido por mais tempo.

Após 8 semanas em processo de repleção verificou-se incremento do peso da ordem de 45,80%, 47,91%, 43,67% e 48,42% para os grupos EDTA+ RC, DMH+RC, EDTA+RL e DMH+RL, respectivamente. Este fato pode sugerir que o animal mesmo após estado debilitado, pelo processo de desnutrição e indução das lesões pré-neoplásicas, apresenta grande plasticidade e capacidade de recuperação da composição corporal desde que seja suplementado com uma dieta balanceada e em quantidade adequada para a manutenção de suas condições vitais.

A análise da frequência de focos de criptas aberrantes na mucosa intestinal indica que o processo de desnutrição por si só bem como a suplementação com linhaça não se correlaciona ao aparecimento de lesões pré-neoplásicas.

Quando avaliado o grupo submetido à suplementação com ração comercial e tratado com DMH verificou-se a ocorrência média de focos de criptas aberrantes na ordem de  $5,83 \pm 2,50$ . Já para o grupo suplementado com 10% de linhaça e tratado com DMH verificou-se uma média de  $2,00 \pm 1,12$  focos de criptas aberrantes. Desta forma, verifica-se uma porcentagem de redução de danos de 65,69% para aquele grupo que consumiu a linhaça. Assim, supõe-se que a suplementação desta fibra foi capaz de prevenir o aparecimento de lesões pré-neoplásicas que são determinadas pela administração sucessiva de DMH.

Vários estudos comprovam que a ingestão de fibras e grãos inteiros tende a reduzir a incidência de câncer de cólon (JENAB *et al.*, 2004; SCHATZKIN *et al.*, 2007; SLATTERY *et al.*, 2004)

Atualmente há grande interesse em promover a ingestão de linhaça na dieta, devido aos seus potenciais benefícios à saúde, especificamente anticarcinogênico. Esta atividade está

ligada à presença de lignanos e aos ácidos graxos ômega-3 contidos nesta semente. A semente de linhaça é uma excelente fonte de fibras alimentares, ácido  $\alpha$ -linolênico, precursores de lignanas dos mamíferos e secoisolariciresinol-diglucósido. As lignanas de mamíferos como enterodiol e enterolactona são produzidas pela ação da microflora presente no intestino a partir de precursores da lignana vegetal. Após a produção estes são subseqüentemente absorvidos e submetidos à circulação enterohepática (YUAN et al., 1999) desencadeando assim ações benéficas ao organismo que diminuiria a incidência de câncer.

Devido a sua constituição, a linhaça tem um grande potencial antioxidante e é usada com amplo sucesso na redução de doenças cardiovasculares. Os ácidos graxos (ômega-3) ajudam a reduzir a inflamação e pode ser útil no tratamento de uma variedade de doenças auto-imunes e cardiovasculares (KINNIRY *et al.*, 2006).

Após os estudos apresentados pode-se inferir que a linhaça possa agir na prevenção da carcinogenicidade pelas seguintes frentes: atividade antioxidante, propriedade antiinflamatória, capacidade adsortiva, aumento de trânsito intestinal e por fim pela indução de fermentação por bactérias específicas.

O principal grupo de agentes inibidores da carcinogênese é representado por antioxidantes, bloqueadores de radicais livres (KLEINER, 1997; KELLOFF et al., 1999). Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação (MAXWELL, 1995; SIES, 1999). A classificação mais utilizada para estas substâncias é a que as divide em dois sistemas: enzimático, composto pelas enzimas produzidas no organismo e não enzimático, composto pelas vitaminas e outros compostos naturais tais como flavonóides, licopenos e bilirrubinas (SIES, 1999).

58

Os antioxidantes agem em três linhas de defesa orgânica contra as espécies de oxigênio reativas que podem desencadear o câncer: (I) prevenção, que se caracteriza pela proteção contra formação das substâncias agressoras; (II) interceptação de radicais livres, os quais uma vez formados iniciam suas atividades de danificação do DNA (KONG & LILLEHEI, 1998; SANTOS & CRUZ, 2001); (III) quando a prevenção e interceptação não foram efetivas e os subprodutos da atividade dos radicais livres estão sendo continuamente formados em baixas quantidades, podendo se acumular no organismo, há a necessidade dos mesmos serem encaminhados à excreção pelas enzimas de detoxificação ao mesmo tempo que os mesmos antioxidantes modulem o sistema de reparo de DNA das células que estão sendo atacadas. Assim, supõe-se que a linhaça também possa promover estas atividades.

Outro modo de ação para a atividade anticarcinogênica da linhaça pode ser pela sua capacidade de diminuir os processos inflamatórios e percebe-se neste contexto uma importante informação para indicar como a suplementação desta fibra poderia influenciar na formação de lesões pré-neoplásicas.

Em roedores a administração da DMH desencadeia uma reação inflamatória leve e um aumento da proliferação celular na mucosa do cólon (KRUTOVSKIKH & TUROSOV, 1994). Sua aplicação sucessiva resulta na proliferação contínua, havendo um aumento do número de células em fase de síntese de DNA (DESCHNER, 1978; WARGOVICH *et al.*, 1983) e, dessa forma há uma hiperplasia progressiva das criptas e hipertrofia da mucosa (WIEBECKE *et al.*, 1973; RICHADS, 1977) que podem culminar na formação de lesões pré-neoplásicas que evoluiriam para tumores de cólon e reto. No entanto, como a linhaça tem a propriedade de reduzir esta atividade inflamatória indiretamente ela adquire a capacidade anticarcinogênica que está diretamente relacionada à inflamação na mucosa intestinal.

Outro fato a ser considerado a respeito da capacidade anticarcinogênica de fibras, assim

como da linhaça, é que estas quando presentes na dieta podem atuar como antimutágenos, ou seja, as fibras dietéticas preparadas a partir do parênquima celular de frutas e vegetais, em geral, apresentam capacidade adsorviva. Desta forma, quanto mais hidrofóbica esta preparação (menor hidrólise da fibra), melhor a capacidade em adsorver a substância indutora de mutações (FERGUSON, 1994) facilitando a sua excreção do organismo juntamente às fezes e as fibras que as compõem visto que estas também aumentam o trânsito intestinal. Este fato impede a absorção de carcinógenos ou pró-carcinógenos que poderia levar a alterações no DNA que se correlacionam ao desenvolvimento de câncer.

Por fim acredita-se que o último modo de ação anticarcinogênico da linhaça possa se dar devido à capacidade dos prebióticos, tais como a linhaça, estimularem seletivamente o crescimento de bactérias intestinais benéficas, que atuam indiretamente no processo de prevenção de mutações e de tumores (ROBERFROID, 2000).

A linhaça, devido possuir pectina, um tipo de fibra solúvel em sua constituição, pode apresentar ação estimulatória de um determinado grupo de bactérias, as bifidobactérias. Tais bactérias apresentam capacidade moduladora da expressão da apoptose, evento este antitumorigênico (REDDY, 1999). Existem relatos de que a fermentação da inulina, um outro tipo de fibra solúvel, permite a formação de ácidos graxos de cadeia curta, mais especificamente o butirato (ácido butírico), que constitui fonte de energia para os enterócitos, estimula a proliferação celular do epitélio e aumenta o fluxo sanguíneo visceral (ROBERFROID, 2005). Logo devido à presença de pectina na linhaça acredita-se que as considerações feitas para inulina também sejam esperadas para a suplementação de sementes de linhaça.

Um fato importante que pode relacionar-se à ingestão de linhaça e/ou inulina é que estas fibras propiciam uma competição benéfica na microflora residente no intestino, devido à estimulação específica das bifidobactérias, que diferentemente das outras bactérias intestinais produzem pouca ou nenhuma enzima  $\beta$ -glicuronidase. Esta enzima atua ativando metabólitos gliconorídeos de contaminantes alimentares e aminas heterocíclicas (POOL-ZOBEL *et al.*, 2002; HAULY & MOSCATTO, 2002). Desta forma, a diminuição desta enzima reduz a metabolização destes compostos cancerígenos como é o caso da DMH utilizada neste estudo.

No fígado o produto da hidrólise da DMH, o metilazoximetanol, que é conjugado com o ácido  $\beta$ -glicurônico, é levado até a luz intestinal, onde a  $\beta$ -glicuronidase bacteriana libera o metabólito ativo da DMH, o azoximetano (LAMONT & O'GORMAN, 1978).

Pool-Zobel *et al.* (2002) afirmam que a fibra inulina é metabolizada preferencialmente pelas bifidobactérias presentes no intestino humano e também de roedores. Esta relação relatada ocorre por competição sendo esta benéfica, visto que as bifidobactérias, ao contrário de outras espécies presentes no intestino humano, produzem em pouca ou em nenhuma quantidade a enzima  $\beta$ -glicuronidase, levando assim uma diminuição da metabolização da droga indutora de danos e conseqüentemente diminuindo a carcinogenicidade presente na mucosa colorretal. Outro mecanismo adjuvante é que esta competitividade da flora bacteriana faz com que bactérias produtoras de outras enzimas metabolizadoras de pró-carcinógenos tenham seu crescimento diminuído, reduzindo a presença destas enzimas na mucosa colorretal e, por conseguinte a carcinogenicidade (HAULY & MOSCATTO, 2002). Desta forma, devido à similaridade da inulina e da pectina presente na linhaça acredita-se que ambas possuam a mesma capacidade.

Ainda é lícito destacar que os estudo de LIN *et al.* (2002) afirmam que por meio de uma dieta suplementada com 5% linhaça pode ocorrer a inibição do crescimento e desenvolvimento do câncer de próstata em ratos. Destaca-se também que de acordo com Yuan *et al.* (1999) as lignanas da linhaça, um outro tipo de fibra e insolúvel, possuem atividade antioxidante, funcionariam não

somente inativando os radicais livres dos ácidos graxos e espécies reativas de oxigênio, mas também, tendo um efeito indireto *in vivo* nos sistemas antioxidantes endógenos. De acordo com o estudo de Bhatena *et al.* (2002) o efeito protetor da linhaça contra o câncer de cólon é atribuído também às lignanas e em particular ao SDG (secoisolariciresinol-diglucósido). Outro fato que chama a atenção é que este tipo de fibra também possui a capacidade de adsorver compostos carcinogênicos e aumentar o trânsito intestinal diminuindo o contato da mucosa com substâncias prejudiciais.

Outro relato feito por Turatti (2001) diz que a parte oleaginosa da semente de linhaça é composta por 57% de ácidos graxos ômega-3, 16% de ômega-6, 18% de ácido graxo monoinsaturado e somente 9% de insaturados. A predominância do ômega-3 na mesma pode correlacionar-se com a prevenção das doenças coronarianas e câncer corroborando assim os resultados deste trabalho. Este achado também pode ser corroborado pelos comentários de Jenab & Thompson (1996) que afirmam que a linhaça é a fonte mais rica de precursores lignanas, tais como *secoisolariciresinol diglycoside*. O uso da linhaça, a curto prazo, pode diminuir alguns biomarcadores precoce de câncer de cólon; e, a longo prazo, a linhaça ainda exerce um efeito protetor contra o câncer de cólon devido ao seu alto teor de *secoisolariciresinol diglycoside*.

A atividade antioxidante e quimiopreventiva da linhaça também pode ser corroborada pelo estudo de Oomah *et al.* (1997) que relata que os tocoferóis possuem uma forte atividade antioxidante, portanto a sua presença na semente de linhaça, especialmente  $\alpha$ -tocoferol estaria colaborando com a atividade antioxidante e quimiopreventiva da semente desta semente.

Todos estes achados anteriormente discutidos também foram verificados pelos trabalhos de Mauro (2008) e Takahachi (2008). Estes autores realizaram o ensaio biológico de focos de criptas aberrantes e prevenção por fibra solúvel, inulina. Takahachi também estudou a prevenção de carcinogênese colorretal em animais desnutrido e este estudo demonstrou que a inulina é um forte candidato a compor o grupo de alimentos funcionais utilizado para a prevenção do câncer tanto em pessoas com nutrição adequada quanto para pessoas em desnutrição. Outro fato que é necessário salientar quando os autores relatam que o quadro de restrição protéico-calórica pode alterar a resposta de indução de focos de criptas aberrantes pela DMH e a suplementação de inulina poderá auxiliar na prevenção de danos que causem a iniciação de células da mucosa intestinal que poderão relacionar-se ao desenvolvimento do câncer. No entanto, se comparada à frequência de focos de criptas aberrantes em animais nutridos e tratados com DMH ( $5,10 \pm 2,69$ ) com a frequência de focos nos animais nutridos desta pesquisa ( $5,83 \pm 2,50$ ) não se pode supor a mesma interferência sugerido por Takahachi (2008). Porém, vale ressaltar que a linhaça também é capaz de prevenir lesões pré-neoplásicas em animais desnutridos assim como citado por este autor. As porcentagens de redução de danos para animais nutridos e desnutridos foram de 47,05 e 59,25%, respectivamente. Enquanto que neste estudo a porcentagem de lesões pré-neoplásicas foi da ordem de 65,69%. Desta forma, e em uma análise geral verifica-se que a linhaça possui uma prevenção maior para os animais desnutridos.

Frente a estas considerações percebe-se que a linhaça poderá em futuro próximo ser um importante alimento funcional a ser utilizado na prevenção de câncer e em especial o de cólon e reto. Devido aos relatos dos diferentes modos de ação que podem ser inferidos, para a suplementação de linhaça, nota-se também que esta semente poderá ser utilizada como um adjuvante do tratamento quimioterápico e com possibilidades de bons resultados. Ainda é cedo o fechamento do assunto e novos trabalhos envolvendo a suplementação de linhaça a animais nutridos e desnutridos precisam ser realizados para que se possa melhor compreender a ação desta fibra na prevenção da carcinogênese e uma possível aplicação da mesma em seres humanos.

60

R  
E  
V  
I  
S  
T  
A

Apoio Financeiro: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação do Centro Universitário Filadélfia - UniFil.

**Tabela 1** – Média do peso inicial, peso ao final do período de depleção, ganho de peso no período de depleção, peso ao final do período de repleção e ganho de peso no período de repleção dos diferentes grupos experimentais:

Grupos	Peso inicial	Período de Depleção		Período de Repleção	
		Peso Final	Perda de Peso	Peso Final	Ganho de Peso
1	42,00 ± 3,61 <sup>b</sup>	30,57 ± 2,22 <sup>b</sup>	-10,57 ± 3,21 <sup>a</sup>	46,86 ± 6,82 <sup>b</sup>	14,00 ± 5,66 <sup>a</sup>
2	38,00 ± 5,74 <sup>a</sup>	32,00 ± 5,66 <sup>a</sup>	-7,67 ± 7,53 <sup>a</sup>	47,33 ± 4,13 <sup>b</sup>	15,33 ± 4,50 <sup>a</sup>
3	38,67 ± 4,35 <sup>b</sup>	30,75 ± 4,65 <sup>b</sup>	-9,00 ± 5,01 <sup>a</sup>	47,42 ± 2,22 <sup>b</sup>	13,43 ± 2,51 <sup>a</sup>
4	37,33 ± 3,00 <sup>b</sup>	26,85 ± 3,02 <sup>b</sup>	-9,42 ± 5,13 <sup>a</sup>	47,00 ± 3,74 <sup>b</sup>	13,00 ± 3,29 <sup>a</sup>

Legenda: Grupo 1: Ração comercial (RC) + EDTA; Grupo 2: RC + DMH; Grupo 3: Ração Comercial + Linhaça 10% (RL) + EDTA; Grupo 4: RL + DMH. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Estatística: ANOVA/Tukey;  $p < 0,05$ ).

**Tabela 2** – Média de frequência de focos de criptas aberrantes e porcentagem de redução de danos:

Grupos	Média da frequência de FCA	Porcentagem de Redução de Danos
1	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	-
2	5,83 ± 2,50 <sup>b</sup>	-
3	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	-
4	2,00 ± 1,12 <sup>a</sup>	65,69

Legenda: Grupo 1: Ração comercial (RC) + EDTA; Grupo 2: RC + DMH; Grupo 3: Ração Comercial + Linhaça 10% (RL) + EDTA; Grupo 4: RL + DMH. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Estatística: ANOVA/Tukey;  $p < 0,05$ ).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHATHENA, S.J.; ALI, A.A.; MOHAMED, A.I.; HANSEN, C.T.; VELASQUEZ, M.T.. Differential effects of dietary flaxseed protein and soy protein on plasma triglyceride and uric acid levels in animal models. *Journal of Nutritional Biochemistry*, n.13,p.684, 2002.

BURLANDY, L.; ANJOS, L.A.. Acesso a vale-refeição e estado nutricional de adultos beneficiários do Programa de Alimentação do Trabalhador no Nordeste e Sudeste do Brasil, 1997. *Cad. Saúde Pública*, v. 17, n. 6, p.1457-1464, 2001.

CAMARGO J.L.V.; OLIVEIRA M.L.C.S.; ROCHA N.S.; NOBUYUKITO. A detecção de substâncias cancerígenas em estudos experimentais. *Rev. Bras. Cancerol.*, v. 40, n.1, p. 21-30, 1994.

COBEA (2004), *Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório*. Disponível em: <[www.cobea.org.br](http://www.cobea.org.br)>. Acesso em: agosto de 2004.

DESCHNER, E.E. *Early proliferative defects induced by six weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine in epithelial cells of mouse distal colon*. *Z. Krebsforsch.*, v. 91, p.205-16, 1978.

FERREIRA, H.S.; Assunção, M.L.; França, A.O.S.; Cardoso, E.P.C.; Moura, F.A.. Efetividade da “multimistura” como suplemento de dietas deficientes em vitaminas e/ou minerais na recuperação ponderal de ratos submetidos à desnutrição pós-natal. *Rev. Nutr.*, v.18 (1), p. 63-74, 2005.

FERGUSON, L.R. *Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet*. *Mutation Research.*, v. 307, p. 395-410, 1994.

GURMINI, J.; CECÍLIO, W.A.C.; SCHULER, S.L.; OLANDOSKI, M.; NORONHA L.. *Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação*. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 41 (4), p. 271-278, 2005.

HAAS, P.; ANTON, A.; FRANCISCO, A.. *Câncer colo retal no Brasil: consumo de grãos integrais como prevenção*. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v. 39, n.3, p. 231-235, 2007.

62

HAULY, M.C.; MOSCATTO, J.A.; *Inulin and Oligofructosis: a review about functional properties, prebiotic effects an importanc for food industry*. *Semina: Ciências Exatas e Tecnologia*, v. 23, p. 105-118, 2002.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). *Estimativa, 2010*. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa>> Acesso em: 26 de junho de 2011.

JENAB M. et al. *Association of nut and seed intake with colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* v.13, n.10, p.1595-603, Oct, 2004.

JENAB, M.; THOMPSON. L.U.. *The influence of flaxseed and lignans on colon carcinogenesis and P-glucuronidase activity* *Carcinogenesis*, v.17, n.6, p.1343-1348, 1996.

KINNIRY,P. et al. *Dietary Flaxseed Supplementation Ameliorates Inflammation and Oxidative Tissue Damage in Experimental Models of Acute Lung Injury in Mice*. *The Journal of Nutrition*, v.136, p. 1545–1551, 2006.

KELLOFF G.J. et al. *Progress in cancer chemoprevention*, N. Y. Acad. Sci. 1999.

KLEINER SM. *Defense plants: foods that fight disease*. 28 set. 1997. Available in: <<http://www.physsportsmed.com>>. Access in: 28 september 1998.

KONG, Q. & LILLEHEI, K.O.. *Antioxidant inhibitors for cancer therapy*. Med. Hypotheses, v. 51, p. 405-409, 1998.

KRUTOVSKIKH, V.A.; TUROSOV, V.S. *Tumors of intestines*. In: Turosov, V.S Mohr, U. (Eds.) *Pathology of tumors in laboratory animals*, 2. ed., v. 2., p. 195-211. Lyon: Yarc, 1994.

LAMONT, J.T.; O’GORMAN, T.A. *Experimental colon cancer*. Gastroenterology., v. 75, p. 1157-69, 1978.

LIN,X.; GINGRICH, J. R.; BAO,W.; JIE, L.; HAROON, Z.A. E WAHNEFRIED, W.D.. *Effect of flaxseed supplementation on prostatic carcinoma in transgenic mice*. UROLOGY, v. 60, p. 919-924, 2002.

MATIAS, A.C.G.. *Avaliação de efeitos fisiológicos da fração fibra alimentar dos grãos de amaranto (Amaranthus cruentus L.) e linhaça (Linum usitatissimum L.)*. 2007. 93f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo – São Paulo, 2007.

MAURO, M.O. *Efeito antimutagênico e anticarcinogênico do oligossacarídeo inulina in vivo*. 2008. 84f. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) – Centro de Estudos em Nutrição e Genética Toxicológica, Centro Universitário Filadélfia, Londrina – PR, 2008.

MAXWELL, S.R.J.. *Prospects for the use antioxidant therapies*. Drugs., v. 49, p. 345-61, 1995.

63

MONTEIRO, C.A.. *A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil*. Estud. Av., v.17(48), p. 7-20, 2003.

OOMAH, B.D.; KENASCHUK, E.O.; MAZZA, G. *Tocopherols in flaxseed*. J Agric Food Chem, v.43, p.2076-2080, 1997.

PITA, M.C.G.; PIBER-NETO, E.; CARVALHO, P.R.; MENDONÇA-JUNIOR, C.X.. *Efeito da suplementação de linhaça, óleo de canola e vitamina E na dieta sobre as concentrações de ácidos graxos poliinsaturados em ovos de galinha*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. , v. 58, n.5, p.925-931, 2006.

POOL-ZOBEL; B. VAN LOO, J.; ROWLAND, I.; ROBERFROID, M.B. *Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer*. *British J. Of Nutr.*, v. 87, p. S273-S281, 2002.

REDDY, B.S.; *Possible Mechanisms by Which Pro- and Prebiotics Influence Colon Carcinogenesis and Tumor Growth*. J. Nutr., v. 129, p. 1478s-1482S, 1999.

RICHARDS, T.C. *Early changes in the dynamics of crypt cell populations in mouse colon following administration of 1,2- dimethylhydrazine*. Cancer Res., v.37, p. 1680-5, 1977.

R  
E  
V  
I  
S  
T  
A

ROBERFROID, M.B. *Prebiotics and Probiotics: are they functional foods?* Am. J. Clin. Nutr., v. 71, p. 1682S-1687S, 2000.

ROBERFROID, M.B. *Introducing inulin-type fructans.* British J. Nutr., v. 93, p. S13-S25, 2005.

SANTOS, H.S. & CRUZ, W.M.S.. The antioxidant vitamin nutritional therapy and the chemotherapy treatment in oncology. *Rev. Bras. Canc.*, v. 47, p. 303-308, 2001.

SCHATZKIN A. et al. *Dietary fiber and whole-grain consumption in relation to colorectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study.* Am J Clin Nutr. v.85, n.5, p.1353-60, May, 2007.

SIES, H.. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, v. 215, p. 213-219, 1999.

SILVA, L.A.G. *Criptas aberrantes como biomarcador da oncogenese do cólon: análise comparativa entre testes de curta e média duração em modelo de carcinogênese pela DMH no rato.* 1999 .95p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina - UNESP-Botucatu- São Paulo, 1999.

SLATTERY ML, CURTIN KP, EDWARDS SL, SCHAFFER DM. Plant foods, fiber, and rectal cancer. *Am J Clin Nutr.*v.79, n. 2, p.274-81, Feb, 2004.

64 SUMIDA, D.H.; OKAMOTO, M.M.; LIMA, F.B.; MACHADO, U.F.; HELL, N.S.. Esquema de restrição alimentar altera a resposta celular à insulina em ratos diabéticos. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, v. 44, n.4, p. 339-346, 2000.

STRINGHETA, P.C. et al. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.43, n.2, p.181-194, 2007.

TAKAHACHI, N.A. *Efeitos da restrição protéico-calórica e da suplementação de inulina na carcinogênese colorretal.* 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) – Centro de Estudos em Nutrição e Genética Toxicológica, Centro Universitário Filadélfia, Londrina – PR, 2008.

TEODÓSIO, N.R.; LAGO, E.S.; ROMANI, S.A.M.; GUEDES, R.C.A.. Regional Basic Diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch. Latinoamer. Nut.*, v.40, n.4, p.532-547, 1990.

TURATTI, J.M.. *A importância dos ovos numa dieta saudável.* Óleos & Grãos, 59, p.22-2, 2001.

WARGOVICH, M.J.; et al. Nuclear aberrations as a short term for genotoxicity to the colon: evaluation of nineteen agents in mice. *J. Nat. Cancer Inst.*, v. 71, p.133-7, 1983.

WIEBECKE, B.; KREY, B.; LÖHRS, U. Morphological and autoradiographical investigations on experimental carcinogenesis and polyp development in the intestinal tract of rats and mice. *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, v. 360, p. 179-93, 1973.

YUAN, Y.V.; RICKARD, S.E.; THOMPSON, L.U. Short-term feeding of flaxseed or its lignan has less influence on in vivo hepatic antioxidant status in young rats. *Nutr. Res.*, v.19, n.8, p.1233-1243, 1999.