

AVALIAÇÃO DA FARINHA DE LINHAÇA NAS CITOCINAS DE CAMUNDONGOS COM CÂNCER DE MAMA.

Janaína Guarino Liria¹, Cristina Pacheco Soaresⁿ

¹ Universidade do Vale do Paraíba/ Nutrição, Av Shishima Hifumi, jana.guarino@gmail.com

ⁿ Universidade do Vale do Paraíba/ Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - Biologia Celula, Av Shishima Hifumi, cpsouares@univap.br

Resumo- Nas últimas décadas o câncer vem ganhando uma enorme dimensão, tornando-se um problema de saúde pública mundial. Algumas substâncias químicas de origem vegetal que são biologicamente ativas e conhecidas como alimentos funcionais, são também substâncias não nutritivas, porém que possuem propriedades altamente benéficas para a defesa e manutenção da saúde e estão sendo estudadas a nível molecular, clínico e epidemiológico. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação da farinha de linhaça sobre o sistema imunológico de camundongos com câncer. Foram utilizados 30 camundongos fêmeas, os quais foram inoculados com 1×10^6 células tumorais de câncer de mama – linhagem M3. Após o desenvolvimento do tumor os animais foram submetidos à Terapia Fotodinâmica – PDT, com quatro sessões em intervalos de 3 a 4 dias. Após a última aplicação coletou-se o sangue dos animais para quantificação de citocinas. Para avaliação de citocinas dos animais tratados ou não com TFD e submetidos a dieta com farinha de linhaça foi utilizada a técnica de Western blotting, sendo os anticorpos para IL-6 e MCP-1 foram avaliados. MCP-1 apresentou aumento no grupo câncer-linhaça, com recrutamento de monócitos para a região da cavidade peritoneal. IL-6 foi negativa para Western blotting.

Palavras-chave: Câncer, Linhaça, Nutrição e Câncer.

Área do Conhecimento: Nutrição

Introdução

Algumas das nossas células perdem a capacidade de responder aos mecanismos de controle do crescimento e se multiplicam de modo descontrolado, essas células são chamadas de células transformadas ou neoplásicas. No geral, essas células dão origem a massas celulares, denominadas tumores (SHARON, 1998).

Nas últimas décadas o câncer vem ganhando uma enorme dimensão, tornando-se um problema de saúde pública mundial. No Brasil, não tem sido diferente, com a chegada dos anos 60, as doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de morte, sendo substituídas pelas doenças crônicas não transmissíveis e pelas neoplasias. O câncer é a terceira maior causa de mortes por doença, entre os brasileiros, sendo 11,84% do total dos óbitos registrados em todo país. Muitos fatores contribuem para isso, destacando principalmente o envelhecimento da população, resultante do intenso processo de urbanização, das ações de promoção e recuperação da saúde, que melhoram a exposição contínua a fatores ambientais e mudanças de comportamento, como má qualidade da alimentação e o sedentarismo, responsáveis pela carcinogênese (KLIGERMAN, 2000).

A semente e o óleo de linhaça reduzem o crescimento de tumores estabilizados. Onde a lignana e o seu precursor secoisolariciresinol diglicosídeo (SDG) exercem um grande efeito inibitório sobre o desenvolvimento de novos tumores (THOMPSON *et al*, 1996).

No estudo realizado por CARMO & CORREIA e publicado em 2009, descreveu-se os principais benefícios da terapia nutricional baseada na suplementação de ômega 3 em pacientes oncológicos, abordando essencialmente a via metabólica desse ácido graxo, teve como conclusão que os benefícios do uso de suplementação contendo ômega 3 em pacientes oncológicos foram claros. Consideram também poucos efeitos colaterais relatados, acreditando então que a suplementação desse nutriente seja indicada para essa população.

Dados epidemiológicos, citados por CORDEIRO *et al* 2009, relatam que uma dieta baseada em vegetais pode diminuir o risco de doenças crônicas, particularmente o câncer. Algumas substâncias químicas de origem vegetal que são biologicamente ativas e conhecidas como alimentos funcionais, são também substâncias não nutritivas, porém possuem propriedades altamente benéficas para a defesa e manutenção da saúde e estão sendo estudadas a nível molecular, clínico e epidemiológico.

O consumo da semente, farinha ou óleo de linhaça vem aumentando muito devido ao conhecimento de suas propriedades benéficas, pois é considerada um alimento funcional e além de suas funções nutricionais básicas, produz efeitos metabólicos e fisiológicos benéficos à saúde (SOARES *apud*, 2009).

A linhaça é rica em precursores de lignina, 75-800 vezes mais que outros vegetais e tem sido investigada devido ao possível efeito protetor contra o câncer. Entretanto, outros compostos da linhaça como: fibras, ácido graxo n-3, ácido fítico, compostos fenólicos podem contribuir para um efeito anticarcinogênico (THOMPSON *et al*, 1996).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da farinha de linhaça na ativação de citocinas MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos) e IL-6 (interleucina 6) em animais com câncer de mama.

Metodologia

O presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), com o número de protocolo nº A008/CEUA/2011.

Os animais foram obtidos do Biotério da UNICAMP- CEMIB – Campinas - São Paulo e mantidos no Biotério de Passagem do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP/SJC. Os camundongos foram mantidos em ambiente com luz e temperatura controladas e alimentados com *ad libitum* e farinha de linhaça compactada, de maneira, igual à ração.

Os animais foram mantidos em biotério de passagem, localizado no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual - IP&D I, ocorrendo alimentação e água *ad libitum*, foram alojados 5 camundongos por gaiola. As fêmeas foram separadas em 3 grupos, sendo **A** - grupo controle; **B** - inoculadas com células da linhagem M3 (câncer de mama), sendo alimentadas com a ração da farinha de linhaça; **C** - inoculadas com células M3 alimentando-as com a ração normal.

Os animais foram injetados na região da última mama do lado direito, com 1×10^6 células, ressuspensas em meio de cultura. Após o desenvolvimento do tumor os animais foram anestesiados e foi coletado sangue por punção cardíaca para quantificação de citocinas.

Para a PDT os animais foram inoculados com 0,05ml de ALA (250mg/mL), sendo aguardado 3 horas para dar início a irradiação. O procedimento de irradiação foi realizado com Laser Kondortech modelo BioWave (P= 30mW, D= 9.0 J/cm², Tempo= 5 minutos) após anestesia dos animais com Cloridrato de xilazine 20mg/Kg(X) intraperitoneal (IP).

Estado nutricional

O estado nutricional dos animais de todos os grupos foi avaliado através da análise de curvas ponderais, obtidas após registro semanal do peso corporal utilizando balança de precisão (Precision: modelo PR 5000), além da observação do aspecto clínico dos animais, tais como pelagem, postura, mobilidade, aumento do tempo de sono, isolamento do resto do grupo e dor ao serem tocados (COUTINHO, 1980; TEODÓSIO *et al.*, 1990). A mortalidade espontânea dos animais, no decorrer do experimento, foi registrada para obtenção da taxa de mortalidade relacionada à infecção e estado nutricional.

Citocinas

Para avaliação de citocinas nos animais submetidos à Terapia Fotodinâmica - PDT, foram utilizados Kits para ELISA - BD Biosciences, para quantificação de IL-6 (555240) e MCP-1 (555260). O tempo previsto para o início e término da pesquisa foi de cinco meses.

Resultados

Para a preparação da ração, foi utilizado 210g de farinha de linhaça dourada e 100 ml de água. O preparo da mesma foi simples, apenas misturou-se os ingredientes até formar uma massa pastosa, que foi colocada em sacos plásticos e com auxílio de um bico de alumínio, utilizado em confeitaria, chegou-se a preparar aproximadamente 100 unidades, que contém 5 cm de largura e 3g de peso, por vez. As rações prontas foram autoclavadas por um período de tempo de 15 minutos à 121°C e armazenadas em saco plástico hermeticamente fechados, cada saco pesava 270g.

Após o inóculo das células de câncer nos camundongos fêmeas, foi realizado o acompanhamento do peso e aspectos clínicos, citados na metodologia, e a TFD, trazendo assim, alguns resultados relevantes em um prazo de seis semanas.

Para fazer a pesagem dos animais, foi utilizada a balança de precisão (Precision: modelo PR 5000), e com o auxílio de um Becker pequeno (100ml), fez-se a pesagem dos animais, como mostra a foto a seguir:

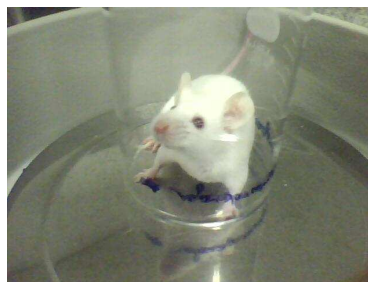


Figura 1 – Pesagem camundongo fêmea.

Em relação ao acompanhamento do peso foram obtidos os seguintes dados:

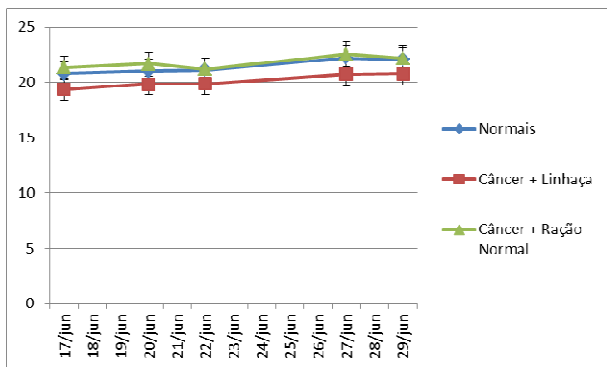


Gráfico 1 - Acompanhamento do peso no mês de junho/2011.

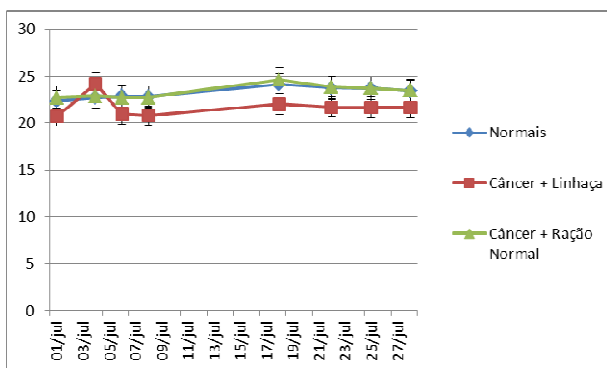


Gráfico 2 - Acompanhamento do peso no mês de julho/2011.

Observou-se que, no período de seis semanas, os animais do grupo controle (normal) e o grupo dos animais com câncer e alimentados com ração normal, ganharam peso normalmente. Já os animais do grupo com câncer e alimentado com a ração de linhaça ganharam peso, porém em menor quantidade.

O tratamento foi realizado em quatro sessões com espaço de tempo de 3 e 4 dias (1º, 3º, 6º e 11º).



Figura 2 – Terapia Fotodinâmica.

Após o término do tratamento com a TFD notou-se a perda de pelos ao redor dos olhos, focinho, abdômen e costas dos animais.

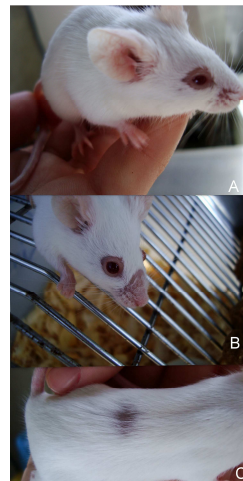


Figura 3 – (A) Perda de pelos ao redor dos olhos; (B) Perda de pelos ao redor dos olhos e focinho; (C) Perda de pelos nas costas.

Em geral a análise do estado nutricional mostrou que dentro das seis semanas de pesquisa, alguns animais alimentados com a ração obtida da farinha da linhaça dourada, apresentaram dores no abdômen ao serem tocados. Os demais sintomas que eram esperados, como: aumento do tempo de sono, isolamento do grupo, mudança de postura, não foram apresentados por nenhum dos grupos.

A avaliação das proteínas MCP-1 e IL-6, foi realizada através do processo de Blotting, para detecção das mesmas.

Houve resposta positiva apenas para a MCP-1, havendo aumento no número de monócitos na região de inoculo (peritônio), para combater as células tumorais, caracterizando ativação do sistema imunológico.

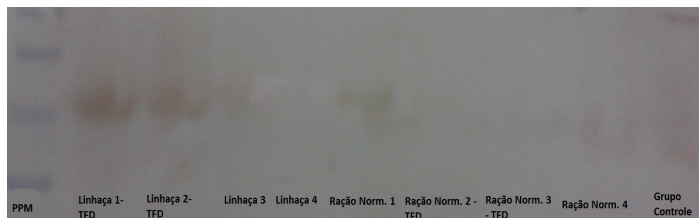


Figura 4 – Blotting de amostras. Identificação da proteína MCP- 1.

Os testes realizados para a identificação de IL-6, apresentaram resultados negativos.

Discussão

De acordo com artigos (FERREIRA, 2006; CORDEIRO et al, 2009), em tumores de mama aparecem múltiplas citocinas produzidas por monócitos, macrófagos e células de estroma como a MCP-1, IL-6, IL-8 entre outras. Essas citocinas citadas são mais abundantes em tumores com alto grau de malignidade. A combinação da IL-8, MCP-1 e MIP-1 β se correlacionam com infiltrado inflamatório intenso (PRADO et al, 2008). Da cavidade peritoneal dos camundongos com câncer e alimentados com linhaça foi possível coletar uma grande população de macrófagos.

IL-6 é uma citocina multifuncional com efeito dependente de célula alvo. No geral, trata-se de uma citocina pró-inflamatória sintetizada por macrófagos, linfócitos T e B, e por células de tumores epiteliais (OKAMOTO et al 1997). Esta citocina tem sido relacionada com a indução da proliferação celular, crescimento tumoral e aparecimento de metástase (OGATA et al, 1997). Entretanto nossos resultados não demonstraram a presença de IL-6 nos animais com câncer alimentados com ração normal, não sendo possível concluir a participação desta citocina no processo.

Observou-se que a linhaça dourada potencializou a taxa de MCP-1, atraindo grande quantidade de monócitos para a região abdominal, impedindo o desenvolvimento de tumor na região da mama em relação ao grupo controle. Esse resultado está de acordo com outros estudos que verificaram os efeitos da linhaça em tumores MCF-7, MDA-MB-435, implantados em camundongos Nude.

Conclusão

Pode-se concluir no presente trabalho, que, o consumo diário da farinha de linhaça somente, não alterou significativamente o peso dos animais. Observou-se que o grupo com câncer e tratado com linhaça apresentou aumento na população de macrófagos, em decorrência de maior concentração da citocina MCP-1, inibindo o desenvolvimento de células tumorais e sua instalação nos animais.

Referências

- CARMO, Maria Carmen Neves Souza, CORREIA, Maria Isabel Toulson Davisson; A Importância dos Ácidos Graxos Ômega-3 no Câncer. Revista Brasileira de Cancerologia, Abril 2009;
- CORDEIRO, Rosângela; FERNANDES, Pedro L.; BARBOSA, Leandro A.; Semente de linhaça e o efeito de seus compostos sobre as células mamárias. Revista Brasileira de Farmacognosia, Jul/Set 2009;
- FERREIRA, Mônica Alves Neves Diniz; Avaliação da Angiogênese, Inflamação e Crescimento Tumoral em Camundongos com Deleção Gênica dos Receptores para o PAF (PAFR-KO); 2006
- KLIGERMAN, Jacob. Revista Brasileira de Cancerologia- Volume 46 nº1 Jan/Fev/Mar 2000;- LODISH, Harvey; BERK, Arnold; ZIPURSKY, S. Lawrence; MTSUDAIRA, Paul; BALTIMORE, David; DARNELL, James. Biologia celular e molecular. 4ª Edição. Editora Revinter, Rio de Janeiro, 2002.
- OGATA, A; CHAUHAN, D; TEOH, G et al. IL-6 triggers cell growth via the Rasdependent mitogen-activated protein kinase cascade. J Immunol, 1997;159:2212-21.

- OKAMOTO, M; HATTORI, K; OYASU, R.

Interlukin-6 functions as an autocrine growth factor human bladder carcinoma cell line in vitro. *Int J Cancer*, 1997; 72:149-54.

- PRADO, Maria del Carmem Arango; GARCIA, Maria Elena Faxas; GOYANES, Irene Álvarez; RODRIGUES, Ronaldo Camacho; PADILHA, Cristina Rodrigues. Compromisso del Sistema Imune em Pacientes com Cáncer de Mama. Arango et al, *Cancerologia* (2008): 191-197.

- SHARON, Jaqueline. *Imunologia básica*. Rio de janeiro; Ed. Guanabara Koogan S.A.; 1998;

- SOARES, Lavínia Leal; PACHECO, Juliana Tomaz; BRITO, Carolina Meano de; TROINA, Aline de Andrade; BOAVENTURA, Gilson Teles; GUZMÁN-SILVA, Maria Angélica. Avaliação dos efeitos da semente de linhaça quando utilizada como fonte de proteína nas fases de crescimento e manutenção em ratos. *Rev. Nutr.*, Campinas, 22(4):483-491, Jul./Ago., 2009;

- THOMPSON L.U., RICKARD S.E., ORCHESON L.J., SEIDL M.M.. Flaxseed and its lignin and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1996.