PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIRURGIA

ALESSANDRO SOARES BOTH

ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS E IMUNOHISTOQUÍMICAS NA ESCLERA, CORÓIDE E RETINA DE COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS TRATADOS COM LINHAÇA

CURITIBA
2012

ALESSANDRO SOARES BOTH

ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS E IMUNOHISTOQUÍMICAS NA ESCLERA, CORÓIDE E RETINA DE COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS ENRIQUECIDOS COM LINHAÇA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Dalton Bertolim Précoma
Co-orientador: Dr. Rogil José de Almeida Torres

CURITIBA

2012

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

ATA DA SESSÃO DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA AO NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ATA DE DISSERTAÇÃO Nº 93

Aos nove dias do mês de março de 2012, realizou-se a sessão de defesa de dissertação **"ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS E IMUNOHISTOQUÍMICAS NA CORÓIDE E RETINA DE COELHOS HIPERCOLESTERÔLEMICOS TRATADOS COM LINHAÇA"** Área de Concentração: Lesão Celular, Reparação e Cicatrização, apresentada por **Alessandro Soares Both** sob orientação do **Prof. Dr. Dalton Bertolim Precoma.**

Requisito para obtenção do título de mestre.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes professores:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profª. Dra. Maria Lourdes Biondo Simões	
Profª. Dra. Lucia de Noronha	
Prof. Dr. Ricardo Zanetti Gomes	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profª. Dra. Maria Lourdes Biondo Simões Avaliação: Aprovado

Profª. Dra. Lucia de Noronha Avaliação: Aprovado

Prof. Dr. Ricardo Zanetti Gomes Avaliação: Aprovado

Parecer Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

Deverá fazer as correções sugeridas para a publicação e versão final da dissertação

Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

ALESSANDRO SOARES BOTH

ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS E IMUNOHISTOQUÍMICAS NA ESCLERA, CORÓIDE E RETINA DE COELHOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS ENRIQUECIDOS COM LINHAÇA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

COMISSÃO EXAMINADORA

Lúcia de Noronha
Professora Doutora
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Drª. Maria de LourdesPessoleBiondo-Simões
Professor Doutor
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Ricardo Zanetti Gomes
Professor Doutor
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Curitiba, 15 de fevereiro de 2012.

Dedico esta dissertação a Deus, à minha família, aos amigos e aos mestres.

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho não seria possível, sem a dedicação voluntária de professores, alunos da graduação e pós-graduação e, principalmente, o incentivo de meus familiares que cederam seu tempo do meu convívio para a realização deste trabalho.Compartilho com todos esta conquista.

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Dalton Bertolim Précoma, que me inseriu no seu projeto de pesquisa e me orientou com dedicação.

Agradeço ao meu co-orientado, Dr. Rogil José de Almeida Torres, pela sua dedicação e pronta disponibilidade para orientar-me.

Agradeço àProfessa Doutora Lúcia de Noronhae equipe do laboratório de patologia da PUC-PR,pelas análises anatomopatológicas e imunohistoquímicas desta tese.

Agradeço ao Professor Doutor João Carlos Repka por ceder o seu laboratório e instalações para os nossos experimentos.

Agradeço à Professora Doutora Márcia Olandoski, pela análise estatística desta dissertação e finalmente a todos os meus professores.

Agradeço também ao Professor Doutor César Busato, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelo incentivo à realização do Mestrado.

Agradeço, em especial, à mestranda em Ciências da Saúde da PUC-PR, Flávia Champoski, que me ajudou muito na conclusão desta tese.

Agradeço também eprincipalmente ao Professor Doutor Ivo José Both, meu pai, por seu incentivo do início ao final desta jornada.

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo investigar os principais efeitos da linhaça na retina, coróide e esclera de coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica. A metodologia de trabalho que norteou a pesquisa observou os passos a seguir. Coelhos *New Zealand*foram organizados em três grupos: O grupo 1 (G1) recebeu nas 8 semanas de experimentação a dieta padrão Nuvital®, acrescida à 0,5 % de colesterol proveniente do ovo liofilizado. O grupo 2 (G2) recebeu nas primeiras 4 semanas a dieta padrão Nuvital®, acrescida à 0,5 % de colesterol proveniente do ovo liofilizado e, a partir da quinta até à oitava semana, foram acrescidos além da dieta hipercolesterolêmica, 8g/kg de peso/coelho de farinha de linhaça. Por sua vez, o grupo 3 (G3) recebeu desde a primeira semana a dieta padrão Nuvital®, acrescida à 0,5% de de colesteral proveniente do ovo liofilizado e também 8g/kg de peso/coelho de farina de linhaça.Foi realizada a dosagem sérica de colesterol total, LDL colesterol, HDL coleterol, triglicerídeos e feito a pesagem dos coelhos no início do experimento e no momento da eutanásia. Ao final do experimento os olhos foram submetidos à análise morfométrica,e imunohistoquímica com o anticorpo Óxido Nítrico Sintetase (NOS). Entre os principais resultados apontados pela pesquisa podem ser apontados que a dieta hipercolesterolêmica acrescida de farinha de linhaça provocou diminuição significativa nos níveis do Colesterol Total, LDL-C, HDL-Centre o início e o final do estudo (p<0,05). Na avaliação imunohistológica que utilizou o anti-corpo monoclonal anti-NOS foi observado diminuição importante na expressão do NOS na coróide e retina entre os grupos (p<0,05), portanto houve diferença estatística entre os grupos estudados. Como conclusão o estudo demonstrou a propriedade hipolipemiante da farinha de linhaça que pode contribuir para a prevenção das doenças degenerativas da coróide e retina tais como a DMRI.

Descritores: Linhaça. Hipercolesterolemia. Degeneração Macular.Óxido Nítrico Sintetase.

ABSTRACT

The present study aims to investigate the main flaxseed effects on the retina, choroid and sclera of rabbits fed on a hypercholesterolemic diet. The research methodology was grounded on the following procedures. New Zealand rabbits were divided into three groups: group 1 (G1) was fed, in the eight experimental weeks, the Nuvital® standard diet supplemented by 0,5 cholesterol from lyophilized egg. Group 2 (G2) was fed the Nuvital®standard diet supplemented by 0,5 cholesterol from lyophilized egg in the first 4 weeks, and from week 5 to week 8, besides the hypercholesterolemic diet, 8g/kg weight/rabbit of flaxseed flour were added. Group 3 (G3), since week 1 of the experiment, was fed the Nuvital® standard diet, supplemented by 0,5 cholesterol from lyophilized egg and the 8g/kg weight/rabbit of flaxseed flour. The rabbits'weight and serum dosages of total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides were calculated at the beginning of the experiment and at euthanasia time. At the end of the experiment, the eyes underwent a morphometric and immunohistochemical analysis with the Nitric Oxide Synthases (NOS). Among the main results obtained by the research is the finding that the hypercholesterolemic died enriched by the flaxseed flour induced a significant decrease in the total cholesterol, LDL-C and HDL-C levels between the beginning and the end of the experiment (p<0,05). The immunohistochemical analysis with the anti-NOS monoclonal antibody presented an important decrease in the NOS expression in the choroid and retina between the groups (p<0,05), revealing a significant difference among them. The findings suggest that the hypolipemiant property of the flaxseed flour may contribute to prevent degenerative diseases of the choroid and retina such as ARMD.

Key-words: Flaxseed. Hypercholesterolemia. Macular Degeneration. Nitric Oxide Synthases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Preparo da ração com ovo liofilizado 16
Figura 2 – Punção intra-cardíaca de sangue para análise bioquímica.....17
Figura 3 – Enucleação do olho esquerdo do coelho 18
Figura 4 – Demonstra a divisão do globo ocular do coelho em 5 áreas para a metodologia da morfometria.....20
Figura 5 – Fotomicrografia que demonstra a coróide (seta branca) e esclera (seta preta) corados com Hematoxilina-eosina (HE). A faixa preta demonstra como foi feita a medida da espessura da esclera em micrômetros e a faixa branca demonstra o mesmo para a coroide.....21
Figura 6 – Imunohistoquímica com anti-NOS na retina e coróide de um coelho do experimento. A seta demonstra áreas imunocoradas pelo anticorpo em castanho escuro 23
Figura 7 – Fotomicrografia de coelho hipercolesterolêmico não tratado com linhaça que demonstra a coróide (seta branca) e esclera (seta preta) corados com Hematoxilina-eosina (HE). A dupla seta vermelha demonstra os histiócitos espumosos na esclera 34
Figura 8 – Fotomicrografia de coelho hipercolesterolêmico tratado com linhaça que demonstra a coróide (seta branca) e esclera (seta preta) corados com Hematoxilina-eosina (HE). A dupla seta vermelha demonstra os histiócitos espumosos na esclera, os quais são menos numerosos que aqueles dos coelhos tratados com este nutracêutico.....35
Figura 9 – Fotomicrografia de coelho não hipercolesterolêmico que demonstra a coróide (seta branca) e esclera (seta preta) corados com Hematoxilina-eosina (HE).Observe que não há histiócitos espumosos na esclera 35

Gráfico 1 – Média dos pesos nos grupos no início, 15º dia e 22º dia do experimento 25
Gráfico 2 – Colesterol Total: avaliação inicial e final entre os grupos 28
Gráfico 3 – LDL-C: avaliação inicial e final entre os grupos 30
Gráfico 4 – HDL-C: avaliação inicial e final entre os grupos 32
Gráfico 5 – Triglicerídeos: avaliação inicial e final entre os grupos.....33
Gráfico 6 – Médias da espessura da Esclera entre os grupos 37

Gráfico 7 – Médias da espessura da Coróide entre os grupos.....37
Gráfico 8 – Médias das áreas coradas pelo NOS nos grupos.....39

Quadro 1 – Demonstrativo do Delineamento Experimental 15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise comparativa da média dos pesos dos coelhos nos três grupos..24
Tabela 2 – Variável peso: avaliação inicial e final entre os grupos 24
Tabela 3 – Médias dos pesos dos grupos no 15º dia 22º dia do experimento 25
Tabela 4 – Médias dos níveis de Colesterol Total.....26
Tabela 5 – Colesterol Total: análise dos grupos dois a dois 27
Tabela 6 – Colesterol Total: avaliação inicial e final entre os grupos.....27
Tabela 7 – Médias do LDL-C inicial, final e a diferença entre os dois nos três grupos 28
Tabela 8–LDL-C: comparação entre os grupos dois a dois 29
Tabela 9 – LDL-C: avaliação inicial e final entre os grupos.....29
Tabela 10 – Médias do HDL-C inicial, final e a diferença entre os dois nos três grupos 30
Tabela 11–HDL-C: comparação entre os grupos dois a dois.....31
Tabela 12 – HDL-C: avaliação inicial e final entre os grupos 31
Tabela 13 – Médias do Triglicerídeos inicial, final e a diferença entre os dois nos três grupos 32
Tabela 14–Triglicerídeos: avaliação inicial e final entre os grupos.....33
Tabela 15 – Médias das espessuras nas variáveis Esclera e Coróide entre os grupos 36
Tabela 16–Médias da imunohistoquímica nos grupos com a utilização do marcador NOS 38
Tabela 17 – Variável NOS: análise comparativa entre os grupos dois a dois 38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAT - Acil-Coenzima colesterol transferase
ALA - Ácido α-linolênico
ApoE - Apolipoproteina E
AREDS - *Age-Related Eye Disease Study*
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CT - Colesterol Total
DART - *Diet and Reinfarction Trial*
DMRI - Doença Macular Relacionado à Idade
EPR - Epitélio Pigmentar da Retina
EUA - Estados Unidos da América
G1 - Grupo Um
G2 - Grupo Dois
G3 - Grupos Três
GFAP - *Anti-glial Fibrillary Acidic Protein*
HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL-C - *High Density Lipoprotein Colestherol*
HMGA - Ácido hidroximetilglutárico
HE - Hematoxilina-eosina
ICAM-1 - Molécula de Adesão Intercelular-1
IMC - Índice de Massa Corpórea
LDL-C - *Low Density Lipoprotein Colestherol*
LSD - *Least Significant Difference*
MCP-1 - Proteína de Quimioatração dos Monócitos-1
NECP - *Third Report of the National Cholesterol Education Program*
NO - Óxido Nítrico
NOS - Óxido Nítrico Sintetase
PCR - Proteina-C Reativa
PUCPR - Pontifícia Universidade Católica do Paraná
SDG - Lignana Secoisolariciresinol
TG - Triglicerídeos
VCAM-1 - Molécula de Adesão da Célula Vascular-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
2 OBJETIVO 3
3 REVISÃO DE LITERATURA 4
3.1 A DOENÇA MACULAR RELACIONADA À IDADE (DMRI) 4
3.2 HIPERCOLESTEROLEMIA E A DOENÇA MACULAR RELACIONADA À IDADE (DMRI) 6
3.3 A ADIÇÃO DE ALIMENTOS FUNCIONAIS NO PROCESSO ATEROSCLERÓTICO 9
3.4 PAPEL DA SEMENTE DE LINHAÇA NA PREVENÇÃO DA DOENÇA MACULAR RELACIONADA À IDADE (DMRI) 11
4 MÉTODO 14
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 14
4.1.1 Ambiente de Experimentação 15
4.1.2 Animais Utilizados 15
4.1.3 Preparo de Ração Suplementar 16
4.1.4 Normas Adotadas 17
4.2 PROCEDIMENTOS 17
4.2.1 Coleta de Sangue 17
4.2.2 Anestesia e Procedimento Cirúrgico 18
4.3 AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS 19
4.3.1 Preparo das Amostras 19
4.3.2 Análise Histológica 19
4.3.3 Análise Morfométrica (Hematoxilina-eosina) 20
4.3.4 Análise Imunohistoquímica da Óxido Nítrico Sintetase (NOS) 21
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 23
5 RESULTADOS 24
5.1 VARIÁVEL PESO 24
5.2 COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS EM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS DE PERFIL LIPÍDICO E COMPARAÇÃO ENTRE AS DUAS AVALIAÇÕES (INICIAL E FINAL) DENTRO DE CADA GRUPO 26
5.2.1 Variável Colesterol Total 26
5.2.2 Variável Lipoproteína de Baixa Densidade 28

5.2.3 Variável Lipoproteína de Alta Densidade 30
5.2.4 Variável Triglicerídeos 32
5.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS EM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS CORÓIDE E ESCLERA ANALISADAS PELA MORFOMETRIA: E DA CORÓIDE E RETINA ANALIZADAS PELA IMUNOHISTOQUÍMICA..... 34
5.3.1 Histopatologia das lesões coriorretinoescleroidais em Coelhos hipercolesterolêmicos tratados com linhaça.....34
5.3.2Análise morfométrica da esclera e da coróide 36
5.3.3 Variável Área Imunocorada com utilização do anticorpo anti- Óxido Nítrico Sintetase (NOS).....38
6 DISCUSSÃO 40
6.1 DIETAS HIPERCOLESTEROLÊMICAS E MODELOS EXPERIMENTAIS.....40
6.2 EFEITO DA SEMENTE DE LINHAÇA NAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS ANALISADAS.....41
6.3 EFEITO DA SEMENTE DE LINHAÇA NA PREVENÇÃO DA LESÃO ATEROSCLERÓTICA E, POR SIMILARIDADE, NA PREVENSÃO DAS LESÕES NOS VASOS DA CORIOCAPILAR, NOS OLHOS COM DMRI.....46
7 CONCLUSÃO 49
REFERÊNCIAS.....50
ANEXO A– PARECER DE PROTOCOLO E PESQUISA DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA PUC-PR.....60

1. INTRODUÇÃO

Das doenças degenerativas da retina, a doença macular relacionada à idade (DMRI) é a mais comum.[1]

Existem duas formas da doença degenerativa macular: a formaexsudativa ou úmida, de progressão rápida, que é causada pela neovascularização da coróide e a forma atrófica ou seca, de instalação lenta, que é caracterizada pela presença de "drusas" com progressão para atrofia da retina e coróide.[1]

A DMRI afeta mais de 1,75 milhões de pessoas na sua forma avançada nos Estados Unidos da América (EUA), sua incidência aumenta dramaticamente com a idade e devido ao rápido envelhecimento da população neste país, este número poderá aumentar para aproximadamente três milhões de pessoas até 2020. Atinge aproximadamente outros 7,3 milhões de pessoas nos EUA na sua forma inicial.[1]

A obesidade, tabagismo, Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), aterosclerose, exposição à luz solar e hipercolesterolemia são alguns dos fatores de risco modificáveis da DMRI. O fator de risco não modificável desta doença seria a idade e a maior expressão gênica de proteínas inflamatórias que estão relacionadas à patogênese da DMRI.[1]

A DMRI pode ser apresentada nas duas formas inflamatórias já descritas, porém mais comumente na forma seca. Nesta doença, a patogênese do processo inflamatório ocorre principalmente por dois motivos: **(a)** acúmulo intracelular de lipofucsina nas células fotorreceptoras da retina e **(b)** depósito extracelular de lipoproteínas, conhecidos como "drusas", na membrana de Bruch e no epitélio pigmentar da retina (EPR), sendo que estas "drusas" contém componentes pró-inflamatórios como as proteínas da cascata do complemento.[2]

Existem diversas semelhanças fisiopatológicas e epidemiológicas entre a DMRI e a aterosclerose, ambas doenças realcionadas a hipercolesterolemia. Em primeiro lugar, parece haver uma semelhança na estrutura histopatológica e bioquímica entre a placa aterosclerótica e as "drusas" da retina, encontradas na

DMRI. Há também semelhanças consideráveis no envolvimento da disfunção endotelial e do estresse oxidativo celular na patogênese destas duas doenças. Além disso, temos o envolvimento do sistema do complemento na exarcebação da resposta inflamatória, a qual contribui para o aparecimento e desenvolvimento dessas duas doenças.[2,3] O sistema do complemento tem um importante papel na geração de “drusas” de retina (forma seca) e na neovascularização coroidal (forma úmida) na DMRI, bem como no dano endotelial, ativação e formação das placas ateroscleróticas arteriais.[4]

Já que o estresse oxidativo tem um papel importante na patogênese da DMRI, a maior concentração/ativação de enzimas envolvidas neste processo, como a óxido nítrico sintetase (NOS), parece exercer papel de manutenção e progressão das lesões na DMRI, bem como a menor concentração do óxido nítrico (NO) por este mesmo mecanismo (aumento da expressão da NOS) está diminuída na DMRI.[5] Sendo assim, ações que possam diminuir sua expressão ou atividade podem, por sua vez, pode ter um papel protetor na progressão desta doença.

A semente de linhaça é considerada um alimento funcional por conter substâncias biologicamente ativas como a lignana, as fibras e o ácido graxo alpha-linolênico os quais apresentam efeitos cardioprotetores e de diminuição das placas ateroscleróticas por diminuir a expressão de proteínas pró-inflamatórias.[6-10] Sendo assim, apesar de estudos controversos acredita-se que este efeitoprotetor também estenda-se a DMRI como demonstrado numa revisão de literatura realizada em 2008.[11] Neste trabalho tentamos demonstrar os benefícios da utilização da semente de linhaça na atenuação das alterações inflamatórias coriorretinianas provocadas pela hipercolesterolemia, especialmente no que tange a expressão da NOS.

2. OBJETIVO

Analisar, na esclera, coróide e retina os principais efeitos anatomopatológicos do acréscimoda semente de linhaça na dieta de coelhos hipercolesterolêmicos, sendo que o objetivo principal foi investigar a sua ação hipolipemiante e a expressão imunohistoquímica da óxido nítrico sintetase nesta região.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A DOENÇA MACULAR RELACIONADA À IDADE

Existem duas formas de DMRI: **(1)** a seca ou atrófica e **(2)** a exsudativa ou neovascular. **(1)** A DMRI seca é a forma mais comum da doença e responde por 90% do total de casos. A lesão clássica na DMRI seca compõem-se de lesões pequenas amareladas chamadas “drusas” que leva ao desenvolvimento de atrofia geográfica**. (2)** A DMRI exsudativa ou neovascular é a forma da doença menos comum, porém mais grave do que a forma seca da doença e corresponde à aproximadamente 10% do total das DMRI, sendo responsável por 90% de toda a cegueira causada pela doença.[12]

Existem 3 tipos de drusas [moles, duras e as mistas]. Drusas moles são amareladas, pálidas, grandes, com margens mal definidas, que ocorrem em pessoas com mais de 55 anos e são as que evoluem para atrofia geográfica e são vistas na progressão para DMRI. As drusas duras são pequenas, pontiformes, bem delimitadas, que ocorrem em mais em jovens, e geralmente não levam à progressão para DMRI. As drusas mistas, por sua vez, são uma mistura das duas. As “drusas” e sua progressão para a atrofia geográfica corioretiniana da região da mácula central pode provocar perda visual grave[12]

O processo inflamatório gerado pelas drusas pode ocasionar uma neovascularização da coróide, atravésdo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos anormais abaixo do EPR e é isto que caracteriza aforma exsudativa ou neovascular da degeneração macular. Esses vasos anormais podem sangrar e eventualmente causar cicatrizes namácula, resultando em profunda perda da visão central, denominada cicatriz disciforme, também vista na DMRI.[12]

Sendo assim, na progressão da DMRI, as drusas moles aumentam em número, tamanho e confluência, evoluindo, eventualmente, para degeneração macular seca (com atrofia corioretiniana geográfica) ou exsudativa (com

neovascularização e cicatriz disciforme). Se, além disso, aparecerem pigmentos na retina, o risco de desenvolver degeneração macular relacionada à idade, aumenta consideravelmente.[12]

Em geral, o risco de desenvolver DMRI [seca ou exsudativa] é fortemente dependente da idade e da fase da da degeneração macular. Portanto, uma pessoa que apresenta grande número de drusas moles e alterações pigmentares,oferece risco elevado de desenvolver a DMRI nos próximos cinco anos.[12]

Além disso, numa retina normal, o risco de desenvolver maculopatia precoce [idade inferior a 60 anos] nos próximos cinco anos será de 0,7%, mas,tal risco aumenta em 22,5% se o indivíduo tiver mais de 80 anos de idade.[13]Sendo assim, aproximadamente 10% dos pacientes entre 66 e 74 anos de idade terão alguma forma de DMRI. A prevalência aumenta para 30% em pacientes com 75 a 85 anos de idade.[14]

Havendo degeneração macular em um olho, aumenta-se o risco de desenvolver a degeneração no outro olho também. O risco de o outro olho desenvolver degeneração macular foi relatado em 55% no *Age-Related Eye Disease Study* (AREDS) e em 38,7% no '*the Rotterdam Elderly Study*'.[13]

O tabagismo é o fator de risco modificável mais consistente estabelecido para a DMRI. Há uma associação significativa entre tabagismo e degeneração macular. O risco de degeneração macular é de duas a três vezes maior em fumantes comparados com aos não fumantes.[14]

Há evidências de que a probabilidade de desenvolver a degeneração macular irá reduzir, se o paciente parar de fumar. Depois de um ano de parar de fumar, a probabilidade de desenvolver a degeneração macular irá reduzir-se em 6,7%. Depois de mais cinco anos sem fumar, o risco é reduzido em mais outros 5%, e, após mais 5 anos sem fumar, o risco de desenvolver degeneração macular poderá diminuirem mais 4.2%. O efeito protetor de parar de fumar parece ser um pouco mais pronunciado nos primeiros anos após a parada.[15]

A degeneração macular e, consequentemente, a DMRI, parece ser hereditária em algumas famílias. Em parentes de primeiro grau que têm degeneração macular, a probabilidade de desenvolver esta doença é de cerca de 2,5 vezes.[16] Pessoas que têm parentes de primeiro grau com estágio avançado da doença, desenvolvem degeneração macular numa taxa aumentada em uma idade relativamente precoce. O risco de desenvolver os últimos estágios de degeneração macular é de 50% para

pessoas que têm um parente com degeneração macular, versus 12% para as pessoas que não têm parentes com esta doença, ou seja, um risco quatro vezes maior.[17]

Em relação à exposição à luz solar, outro fator de risco modificável, um estudo mostrou que pessoas que ficam ao sol no verão por mais de 5 horas por dia têm uma probabilidade duas vezes maior de desenvolver degeneração macular precoce [drusas moles ou aumento da pigmentação da retina], e consequentemente DMRI. Nos indivíduos que têm alta exposição solar, a probabilidade de desenvolver degeneração macular precoce é consideravelmente reduzida pelo uso de chapéus ou óculos de sol.[18]

No que corresponde ao risco cardiovascular, dados já publicados mostram que indivíduos com hipertensão arterial sistêmcia (HAS) previamente controlada [pressão arterial menor que 160/95 mmHg] e indivíduos com HAS não controlada [pressão arterial maiorque 160/95 mmHg] foram aproximadamente duas a três vezes mais propensos a desenvolver degeneração macular exudativa, e consequentemente DMRI, do que indivíduos com pressão arterial normal.[19]

Ainda, segundo um outro estudo,a doença cardiovascular possui correlação significativa com o desenvolvimento da DMRI.Pessoas com HAS aumentaram em 1,5 vezes a probabilidade de desenvolver degeneração macular exudativa em comparação com os indivíduos sem hipertensão.[3]

A correlação entre a hipercolesterolêmica e a DMRI será descrita adiante.

3.2 HIPERCOLESTEROLEMIA E A DOENÇA MACULAR RELACIONADA À IDADE (DMRI).

Hipercolesterolemia é uma condição comum na população dos países industrializados e nos países em desenvolvimento.[20] A alteração do metabolismo do colesterol está envolvida na patogênese de muitas doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.[20,21]Há estudos demonstrando que o desequilíbrio da homeostase do colesterol também possa contribuir para o desenvolvimento da DMRI.[22,23] Uma característica que chama a atenção, comum a todas as doenças

degenerativas corioretinianas, são os depósitos de lipídios contendo colesterol abaixo do EPR.[24,25]

Foi propostoque a DMRI apresenta mecanismo patogenético comumà doença cardiovascular. Em ambas as doenças observam-se acúmulo excessivo de colesterol esterificado.[26] Estudos epidemiológicos parecem suportar esta hipótese. Foi relatado que o consumo exagerado de gordura saturada e colesterol está relacionado com risco maior de desenvolvimento da fase inicial da DMRI. Foi observado neste mesmo estudo que a ingestão de determinados tipos de gorduras podem aumentar o risco de progressão para a DMRI.[27]

Outros estudos têm demonstrado a relação da doença cardiovascular e DMRI, apesar de alguns autores não terem observado tal correlação.[28-33] Mesmo que haja múltiplos outros fatores de risco que estão relacionados com a DMRI, existem fortes evidências que a hipercolesterolemia contribui em muito para o desenvolvimento das doenças degenerativas da coriorretina, tais como a DMRI.

Em um estudo realizado em 2000, foi demonstrado emum modelo animal de camundongo, que a administração de dieta altamente gordurosa [15% gordura total e 1,25% colesterol] durante 30 semanas, provocaram alterações na membrana de Bruch como espessamento, buracos na lâmina elástica e acúmulos de partículas microscópicas densas, quando comparadas com camundongos que receberam dieta normal. Também foram verificadas alterações no EPR como vacúolos citoplasmáticos e acúmulos de gotículas de lipídios no citoplasma.[34]Em outros estudos também foram demonstrados alterações retinianas em camundongos como resultado de dieta altamente gordurosa.[35]

Em estudo realizadoem 2001, foram demonstradas alterações no EPR e membrana de Bruch em olhos de ratos submetidos à dieta hipercolesterolêmica. Avaliações eletroretinográficas, histológicas, microscopia eletrônica de transmissão e imuno-histoquímicas foram realizadas em 4 grupos de ratos, em que um grupo de ratos normais foi submetido à dieta normal (C57-R), outro grupo deratos normais foi submetido à dieta hipercolesterolêmica (C57-C), outro grupo de ratos apresentando deficiência de apolipopreoteina foi submetido à dieta normal (apoE-R) e o quarto grupo de ratos também apresentando deficiência de apolipoproteína foi submetido à dieta hipercolesterolêmica (ApoE-C).[36]

Observou-se, quando submetidos à eletroretinografia, ratos ApoE-C apresentaram aumento significativo das ondas “a”e “b” quando comparados com o grupo C57-R, havendo redução da amplitude do potencial oscilatório.[36]

A microscopia eletrônica revelou que o grupo ApoE-C teve redução significativa no número de células nas camadas nucleares interna e externa. A aplicação da microscopia eletrônica de transmissão nos ratos ApoE-deficiente também revelou condensação da cromatina nuclear e vacuolização perinuclear das células da camada nuclear interna e a membrana de Bruch encontrava-se mais espessa e sua lâmina elástica desorganizada e descontinua.[36]

Com a imunohistoquimica foram observadas diminuição ou não imunoreatividade para anidrase carbônica II e calretinina nas camadas retininas dos ratos ApoE-deficientes. É importante frisar que ratos normais submetidos à dieta hipercolesteolêmica(C57-C) demonstraram alterações em todos os quesitos [eletroretinografia, microscopia eletrônica de transmissão e imunohistoquimica], o que comprova que a ingestão deste tipo de dieta tem potencial para provocar no rato alterações similares à DMRI humana.[36]

Em 2005, demonstrou-se em modelo experimental que a dieta hipercolesterolêmica, assim como a hipertensão ocular induzem à formação de Óxido Nítrico Sintetase (NOS-2).Por sua vez, o exame imunohistoquimico das camadas retinianas de ratos que tiveram dieta normal não apresentou NOS-2, enquanto que ratos que ingeriram dieta hipercolesterolêmica demonstraram presença de NOS-2 na camada de fotorreceptores, plexiforme interna e de células ganglionares.[37]

Num estudo realizado em 2006, analisou-se efeitos ultraestruturais da retina em coelhos quando submetidos à dieta hipercolesterolemica. Coelhos New Zealand foram divididos em dois grupos: o grupo dos coelhos controle (G0; n=10)foi alimentado com dieta padrão durante 8 meses; e outro grupo, o dos hipercolesterolemicos (G1; n=10) foi alimentado com dieta enriquecida com colesterol 0,5% por 8 meses.[38]

Os olhos foram avaliados à microscopia eletrônica de transmissão e imunohistoquimica *Anti-glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP). Fazendo a comparação entre os grupos G0 e G1, verificou-se alterações em todas as camadas retinianas nos do grupo G1, que foram mais intensas em áreas onde EPR encontrava-se alterado.[38]Em G1a membrana de Bruch era mais espessa como resultado de

partículas aumentadas nas camadas colágenas,em que o citoplasma do EPR demonstrou corpos densos, *debris* das membranas celulares, vacúolos e numerosos acúmulos de lipídios, necrose e apoptose foram detectados em diferentes camadas da retina. Células de Muller e astrócitos foram reativos para apoptose e necrose, algumas células de Muller preencheram os espaços vazios deixados por neurônios degenerados em todas as camadas retinianas, alguns núcleos das células de Muller foram deslocados para a camada de fibras nervosas, astrócitos perivasculares epiretinianos continham gotas de lipídios, a camada de fibras nervosas da retina apresentavam poucos astrócitos e a membrana basal dos capilares nesta camada apresentou-se mais espessa.Este estudo demonstrou que o excesso de colesterol induz a alterações ultraestruturais da retina em coelhos similares àquelas da DMRI humana, sendo que a dieta de lipídios poderia ter o potencial de induzir ou prevenir a doença retiniana.[38]

Sendo assim, na dieta hipercolesterolêmica, o aumento da ingestão de gordura parece estar associado ao aumento do risco de degeneração macular em humanos e, consequentemente, ao aumento do risco de desenvolvimento de DMRI.[23,26,27]

3.3 A ADIÇÃO DE ALIMENTOS FUNCIONAIS NO PROCESSO ATEROSCLERÓTICO E NA DMRI.

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que ocasiona disfunção endotelial, acometendo a camada íntima das artérias. Este processo ocorre lentamente ao longo de décadas.[39-42]

O processo aterosclerótico inicia-se com dano ao endotélio, acarretado pelo excesso de lipoproteína de baixa densidade - colesteral (LDL-C) na corrente sanguínea. Após a lesão endotelial inicial, há recrutamento leucocitário e infiltração do LDL-C. Dentro do endotélio, o LDL-C sofrerá ação de radicais livres e de macrófagos, desencadeando assim, um processo inflamatório específico mediado pela exacerbação da secreção de várias substâncias pró-inflamatórias.[43]

Este dano ocasiona menor produção de óxido nítrico, responsável pela inibição da inflamação, da trombose e do crescimento, e proliferação das células musculares lisas.[43]

Há, também, a expressão das moléculas de adesão leucocitária: molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1), que promovem a adesão de monócitos, macrófagos e plaquetas circulantes. Dessa forma, tem início a reação inflamatória e a produção de citocinas, como a proteína de quimioatração dos monócitos-1 (MCP-1), que dirige a migração dos monócitos e macrófagos para a parede vascular.[43]

Nesta sequência fisiopatogênica, o LDL é incorporado à parede vascular e fagocitado pelos macrófagos para formar macrófagos espumosos.[44]

A fagocitose é aumentada quando o LDL é oxidado pelo superóxido produzido pelos leucócitos. As células espumosas saturadas de lipídeos se rompem na parede vascular para formar estrias gordurosas. As células musculares lisas vasculares migram da média para a íntima, onde, através da proliferação, formam uma neoíntima com aumento da produção da matriz extracelular, o que ocasiona o desenvolvimento da placa aterosclerótica.[44]

A teoria do modelo vascular proposto em nosso estudo baseou-se na similaridade encontradoa entre o processo aterosclerótico e o de formação de drusas na DMRI. Sabe-se que a aterosclerose é um processo reconhecidamente inflamatório, onde há deposição de LDL-colesterol na íntima da parede vascular, levando a perda da elasticidade arteriolar. Na esclera o acúmulo de lipídios provoca aumento da resistência pós-capilar da rede vascular da coróide, situada entre a parede escleral progressivamente enrijecida e o conteúdo não compressível do globo. A diminuição do fluxo sanguíneo da coróide e o aumento da resistência tendem a elevar a pressão hidrostática da coriocapilar aumentando o vasamento e a deposição de proteínas extracelulares e lipídios, particularmente no pólo posterior, formando depósitos basais na membrana de Bruch, conhecidas como drusas, que são as primeiras manifestções clínicas da DMRI.[45]

Tanto em ensaios clínicos como em modelos experimentais, demonstrou-se que a inclusão de alimentos funcionais na dieta promove melhoria nos fatores de risco vinculados às doenças ateroscleróticas, como a hipercolesterolemia.[46-48] Já que se acredita que o processo degenerativo da coróide tem similaridade com a

doença aterosclerótica, a administração destes nutracêuticos poderia ter também um papel protetor nesta doença.

3.4 PAPEL DA SEMENTE DE LINHAÇA NA PREVENÇÃO DA DOENÇA MACULAR RELACIONADA À IDADE (DMRI).

A Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) é uma doença degenerativa que afeta a região central da retina. É a mais importante causa de perda da visão entre pessoas idosas em países industrializados. A prevalência da DMRI tardia aumenta excessivamente com a idade, afetando 11.5% das pessoas brancas com mais de 80 anos.[51]

Comprometimento visual ocorre pela presença de atrofia geográfica, neovascularização subretiniana e ou ao descolamento do Epitélio Pigmentar da Retina (EPR).[52]

Acredita-se que a fase inicial desta doença possa estar relacionada com acúmulo de depósitos ricos em lipídios abaixo do EPR.[53,54] Para a DMRI foi proposto um modelo vascular, similar à fisiopatologia da aterosclerose, demonstrando que o acúmulo de lipídios provoca aumento da resistência vascular da coróide.[55] Isto interferiria no alto metabolismo do EPR e conduziria ao desenvolvimento de depósitos subretinianos [drusas], anormalidades do EPR e, finalmente, diminuição significativa da visão pela atrofia geográfica ou pela presença de membrana neovascular subretiniana.

A alteração do metabolismo do colesterol está envolvida na patogênese de muitas doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.[56,57] Há estudos demonstrando que o desequilíbrio da homeostase do colesterol contribui para o desenvolvimento da DMRI e da degeneração retiniana de início tardio. Uma característica que chama a atenção, compartilhada por estas doenças retinianas, é o acúmulo de depósitos de lipídios contendo colesterol abaixo do Epitélio Pigmentar da Retina.[58,59,60]

É importante frisar que ratos normais submetidos à dieta hipercolesteolêmica, demonstraram alterações em todos os quesitos [eletroretinografia, microscopia eletrônica de transmissão e imuno-histoquimica], o que comprova que a ingestão

deste tipo de dieta tem potencial para provocar no rato alterações similares à DMRI humana.[36]

Atualmente muitos dos alimentos com propriedades funcionais/nutracêuticas têm sido considerados como preventivos de lesões ateroscleróticas e de outras doenças cardiovasculares, principalmente por conterem em sua composição, por exemplo, altas porcentagens de ácidos graxos ômega-3, fitoesteróis, e fibras vegetais.[49,50]

O ácido α-linolênico [ácido graxo ômega-3], que é um tipo de gordura poliinsaturada, encontrado principalmente em peixes e no óleo de linhaça,acredita-se estar associadoàum efeito protetor no desenvolvimento daaterosclerose e da degeneração macular e, consequentemente, da DMRI. Segundo um estudo realizado em 2009 o tratamento comácido α-linoleicoaumentou a expressão doNOS e de genes pró-inflamatórios tais com os da ciclooxigenase-2 (COX-2), da prostaglandina-E e do óxido nítrico no epitélio pigmentar da retina. Estesdados sugerem queos ácidos graxos insaturadosespecíficos, particularmente o ácido α-linoleico,podeestimular as célulasdo EPRa expressargenespró-inflamatórios, que podem contribuir para a patogênese daDMRI.[61]

A semente de linhaça (*Linun usitatissimum*) é recomendada como um potente alimento funcional pela '*American Heart Association'*, por possuir três componentes com ações importantes: fitoestrógenos como a Lignana Secoisolariciresinol (SDG), fibra solúvel, Ácido α-linolênico (Ômega-3), os quais atuam como cardioprotetores.[9,10,51,62,63,64]

Quando analisada a composição nutricional da semente de linhaça, observa-se que ela é constituída por 41% de gorduras, 28% de fibra dietética, 21% de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais. A fonte lipídica da linhaça é constituída em 55% por ácidos α-linolênicos.[65]

Os compostos lignânicos, quando ingeridos, são capazes de promover reduções nos níveis séricos de colesterol plasmático., conforme reportado por vários autores.[9,66,67]

Num estudo experimental evidenciaram redução nos níveis de colesterol total (CT) e LDL-C em filhotes de ratos alimentados com dieta enriquecida com semente de linhaça por 90 dias, quando comparados com o grupo controle.[65]

Em estudo randomizado, duplo-cego, realizado com 38 mulheres hipercoleterolêmicas no climatério, foi comprovada que a ingestão de pães integrais

contendo 38 gramas de linhaça, por seis semanas, foi suficiente para uma redução significativa de colesterol total (6,9%) e LDL-C (5,5%).[68]

Um outro estudo em 403 mulheres com menopausa natural, observou-se que os fitoestrógenos apresentaram efeito de proteção cardiovascular, diminuindo o risco de aterosclerose, especialmente nas mulheres mais idosas.[69]

Foi realizado um estudo em 2003 com 76 homens portadores de dislipidemia, os quais foram submetidos a uma dieta enriquecida com Ácido α-linolênico (ALA), durante três meses, que revelou redução na inflamação sistêmica, mensurada pela Proteína-C Reativa (PCR), quando comparados com o grupo controle (que não recebeu dieta enriquecida com ALA).[70]

A linhaça é um nutracêutico, rico em ácido α-linolênico, lignana e fibras solúveis e quedevido às suas propriedades funcionais, sabidamente é um fator de proteção cardiovascular pela diminuição da hipercolesterolemia e,portanto, também fator de proteção neurodegenerativo pela similaridade da patogenia, podendo, deste modo, prevenir ou minimizar as doenças degenerativas da retina como a DMRI.

Diante dos fatores supracitados, é importante para o meio científico e para a população em geral o estudo das propriedades funcionais da semente de linhaça.

4. MÉTODO

Este estudo foi realizado após análise e aprovação do projeto pelaComissão de Ética no Uso de Animais (CEUA),parecer número 681 da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), no Laboratório de Cirurgia Experimental do Hospital Angelina Caron, em convênio com a Pós-Graduação da PUCPR, Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR e Biotério Central da PUCPR.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo experimental foi realizado após a aprovação do protocolo pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal das referidas Instituições.

O período do estudo foi de oito semanas, totalizando 56 dias. Os animais foram randomizados aleatoriamente em três grupos, com um animal em cada gaiola, conforme o tratamento dietético recebido. O grupo 1 (G1) recebeu nas 8 semanas de experimentação a dieta padrão Nuvital®, acrescida à 0,5 % de colesterol proveniente do ovo liofilizado. O grupo 2 (G2) recebeu nas primeiras 4 semanas a dieta padrão Nuvital®, acrescida de 0,5 % de colesterol proveniente do ovo liofilizado e, a partir da quinta até à oitava semana, foram acrescidos além da dieta hipercolesterolêmica, 8g/kg de peso/coelho de farinha de linhaça. Por sua vez, o grupo 3 (G3) recebeu desde a primeira semana a dieta padrão Nuvital®, acrescida de 0,5% de de colesteral proveniente do ovo liofilizado e também 8g/kg de peso/coelho de farina de linhaça.

Assim sendo, foram organizados três grupos de coelhos identificados conforme QUADRO 1.

Quadro 1Demonstrativo do Delineamento Experimental.

Grupos	***Procedimentos***
G1 - dieta padrão Nuvital®.	Ração padrão Nuvital® para coelhos por 8 semanas, acrescida à 0,5 % de colesterol proveniente do ovo liofilizado.
G2 - 0,5 % de colesterol e linhaça a partir da 5ª semana.	Ração padrão Nuvital® acrescida de ovo em pó liofilizado à 0,5% de colesterol por 4 semanas. A partir da 5ª semana foram acrescentadas 8g/kg de peso/coelho de farinha de linhaça, até o final do experimento.
G3 – Linhaça desde o início.	Ração padrão Nuvital® acrescida de ovo em pó liofilizado à 0,5% de colesterol e de 8g/kg de peso/coelho de farinha de linhaça desde a 1ª semana.

Fonte: o autor, 2011

4.1.1 Ambiente de Experimentação

Os coelhos foram mantidos no biotério em macro-ambiente, com ciclos de iluminação de 12 em 12 horas, com trocas de ar e temperatura controlada de 19 a 23ºC.

Para a formalização de microambiente foram utilizadas gaiolas de metal, higienizadas diariamente, em que osanimais receberam durante o experimento água e ração específicas para a espécie (Nuvital®), de forma *ad libitum.* Cada animal foi mantido em uma gaiola individual, identificado com numeração sequencial na orelha direita, o que foi repetido na face frontal da gaiola correspondente.[71]

4.1.2 Animais Utilizados

Para a realização do experimento, foram selecionados 35 coelhos machos albinos [*Oryctolagus cunicullus*] da linhagem *New Zealand,* com aproximadamente 30 dias e pesando 1,5Kg comuma média de idade de 4 meses. Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de metal higienizadas diariamente.

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com base em estudo efetuado Bhathena *et al*. em 2002, com o propósito de detectar uma diferença mínima de 10% na redução do colesterol entre os 3 grupos de coelhos, considerando-se um nível de significância de 5% e um poder de teste de 90%.[72]

4.1.3 Preparo da Ração Suplementar

Para a alimentação dos coelhos, foi preparada uma dieta hipercolesterolêmica, ofertada durante todo o experimento, conforme oQUADRO 1. Para tal foi utilizado 0,5 % de colesterol proveniente de ovo liofilizado, com o objetivo de induzir lesões do complexo coróide-epitélio pigmentar da retina destes animais.

A diluição do ovo em pó liofilizado foi realizada na seguinte proporção: 600 gramas de ovo em pó em 500 ml de água. A ração foi colocada em recipiente plano e largo e distribuída em uma camada fina, sendo acrescida após o ovo diluído e armazenado sobre refrigeração, conforme a FIGURA 1.

Para os grupos que possuam a linhaça acrescida na dieta hipercolesterolêmica, foram utilizadas 8g/kg de peso/coelho de semente de linhaça triturada, em média 30 gramas por coelho, adicionada logo após a mistura da ração padrão com o ovo liofilizado.

Figura1 Preparo da ração com ovo liofilizado.

Fonte: linha de Pesquisa do Dr. Dalton Bertolim Précoma, 2011.

4.1.4 Normas Adotadas

Foram adotados os princípios éticos de experimentação animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1997), Nômina Anatômica Veterinária e as normas de redação de trabalhos científicos de Vancouver.

4.2 PROCEDIMENTOS

4.2.1 Coleta de sangue

Foram coletadas amostras biológicas de sangue de cada coelho para análise bioquímica do colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), lipoproteína de alta densidade (HDL-C) e triglicerídeos (TG).

A coleta do sangue para o perfil lipêmico foi realizada por punção cardíaca e após os coelhos terem sidos anestesiados, conforme a FIGURA 2, com a ajuda do responsável pelo Biotério no tempo zero do estudo e no período pré-operatório (eutanásia), respeitando um jejum de 12 horas antecedentes ao exame. As dosagens bioquímicas foram realizadas por laboratório terceirizado, de acordo com o método enzimático automatizado.[73,74]

Figura 2 Punção cardíaca de sangue para análise bioquímica.

Fonte: linha de pesquisa do Dr. Dalton Bertolim Précoma, 2011.

4.2.2 Anestesia e procedimento cirúrgico

No 56º dia, cada animal foi pesado e anestesiado. Foi realizada a anestesia em coelhos conforme protocolo já utilizado na linha de pesquisa como Précoma *et al*.,Neto *et al*. e Alessi *et al*., utilizou-se xilazina (Coopazine®-Coopers) e a ketamina (Vetanarcol®-König).[75-77]

Os coelhos foram anestesiados com xilazina (Coopazine®-Coopers) na dose de 5 mg/Kg, associada à ketamina (Vetanarcol®-König), na dose de 30 mg/Kg, por via intramuscular, na região da coxa.[78]

Após o período de dois a quatro minutos, os animais foram colocados em canaletas cirúrgicas, tendo os seus quatro membros fixados pelas extremidades. Logo após foi colocado o campo fenestrado estéril.Em seguida foi realizada a enucleação dos 2 olhos, conforme a FIGURA 3. Após a enucleação, os animais foram submetidos a eutanásia com dose letal de barbitúrico - Tiopental sódico (Thionembutal®), conforme resolução 714 de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.[79]

Figura 3 Enucleação do olho esquerdo do coelho.

Fonte: linha de pesquisa do Dr. Dalton Bertolim Précoma, 2011

4.3 AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS

4.3.1 Preparo das Amostras

Após osolhosserem lavados com formaldeído a 10%tamponado com fosfato (pH=7,6), durante 10 minutos, foram armazenados em frascos devidamente identificados contendo formaldeído a 10%tamponado com fosfato (pH=7,6) e encaminhados para o Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, sendo que foram deixados fixando por no mínimo 72 horas**.** Após o período de fixação, os olhos foram cortados, fazendo-se a hemissecção sagital do globo ocular. Posteriormente, uma das hemisecções foi acondicionada em cápsulas histológicas e submetida ao processamento convencional em parafina (a outra parte foi armazenada para estudos posteriores). Estas amostras foram desidratados e embebidos em parafina, sendo então confeccionado o bloco histológico. A partir do bloco histológico foram confeccionadas lâminas histológicas(uma lâmina para cada olho de cada um dos coelhos) contendoum corte histológico de 5 micrômetros de espessura corados com Hematoxilina–eosina (HE) para análise histomorfométrica.

4.3.2 Análise Histológica

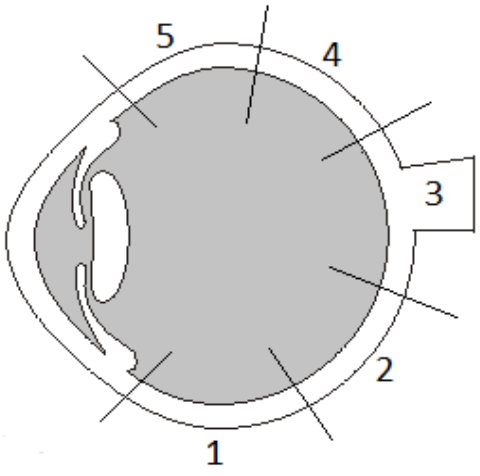
As lâminas coradas em HE foram analisadas de maneira cega, em microscópio medusa de 5 cabeças Olympus® BX50,, sendo observados os aspectos das lesões esclerocorioretinianas. Neste momento foram selecionados os cortes histopatológicos que seriam submetidas a análise morfométrica da região esclero-coroidal e a análise imunohistoquímica da região corioretiniana. Foi selecionado um corte histopatológico para cada um dos coelhos do estudo baseado na sua qualidade e na persistência e não descolamento ou fragmentação da retina.

4.3.3 Análise Morfométrica (Hematoxilina-eosina)

Os cortes selecionados, conforme descrito acima, corados pela HE foram submetidos a análise morfométrica no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR. Esta análise foi feitade maneira cega, em microscópio medusa de 2 cabeças Olympus® BX40com câmera (*Dino Eyepiece camera*) acoplada. Cada lâmina contendo um corte da hemissecção do olho do coelho foi dividida em 5 áreas a partir do corpo ciliar, no sentido dos ponteiros de um relógico conforme Figura 4, sendo que as áreas de número 1 e 5 correspondem àquelas próximas dos corpos ciliareas, a área 3 corresponde àquela do nérvo óptico e as áreas 2 e 4 correspondem aquelas entre os corpos ciliares e os nervos ópticos.De cada uma destas áreas foram retiradas duas fotomicrografias envolvendo a esclera e a coróide (sendo então 10 fotomicrografias por corte histopatológico ou 10 fotomicrografias por animal),utilizando-se a objetiva de 10 vezes de aumento.

Em seguida, conforme FIGURA 4, utilizando o programa Pro Image-plus® 4.5 para Windows®, foram feitas 5 medidas da espessura da esclera e 5 medidas da espessura da coróide em cada fotomicrografia (sendo então 10 medidas por fotomicrografia e consequentemente 100 medidas por corte histopatológico ou 100 medidas por animal experimental). Essas medidas que eram fornecidas automaticamente em micrômetros pelo programa, foram transferidas para uma planilha de dados do Windows Excel®.

Figura 4 – Demonstra a divisão do globo ocular do coelho em 5 áreas para a metodologia da morfometria.



Fonte: o Autor, 2011.

Figura 5 Fotomicrografia que demonstra a coróide (seta branca) e esclera (seta preta). A faixa preta demonstra como foi feita a medida da espessura da esclera em micrômetros e a faixa branca demonstra o mesmo para a coróide (HE – 10X).

Fonte: o autor, 2011.

4.3.4 Análise Imunohistoquímica da Óxido Nítrico Sintetase (NOS)

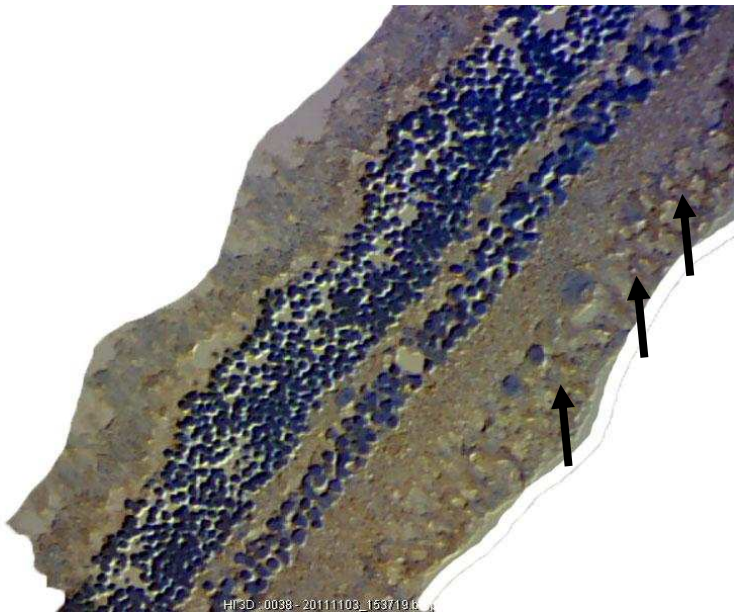
No Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR foi realizada a análise imunohistoquímica. Para a análise imunohistoquímica da NOS utilisou-se o anticorpo monoclonal anti-NOS (Santa Cruz biotechnology, inc) conforme orientações da bula. Inicialmente a técnica foi padronizadacom um controle para o anticorpo, já previamente conhecido e recomendado pelo fabricante (artérias humanas com lesão aterosclerótica). Posteriormente, o anticorpo foi analisado em artérias de coelhos hipercolesterolêmicos com placas ateroscleróticas para normatização desta técnica neste animal de experimentação e, depois disso, ainda foi testado este protocolo de imunohistoquímica em olhos de coelhos normais. Finalmente foi aplicado o protocolo desenvolvido nos animais submetidos a este estudo. Sendo assim, novos cortes histopatológicos de 5 micrômetros foram retirados dos blocos histopatológicos já previamente selecionados para este estudo, para então se proceder a realização da técnica de imunohistoquímica.

O protocolo utilizado incluiu as etapas de deparafinização e rehidratação, 1º e 2º bloqueios da peroxidase endógena, recuperação antigênica, incubação com anticorpo monoclonal primário (anti-NOS) na diluição de 1:50 e com o secundário, revelação, contracoloração e desidratação, clarificação e montagem. Todos os casos foram corados em triplicata, sendouma lâmina como controle negativo, outra como controle negativo e a lâmina do experimento.

Com as lâminas coradas pela técnica de imunistoquímica já prontas foi realizado a análise da expressão deste anticorpo de maneira cega, em microscópio medusa de duas cabeças Olympus® BX40 com câmera (*Dino Eyepiece camera*) acoplada. Cada lâmina contendo um corte da hemissecção do olho do coelho foi dividida em cincoáreas conforme Figura 4.De cada uma destas áreas foram realizadas cinco fotomicrografias envolvendo a retina e a coróide imunocoradas pelo anticorpo anti-NOS em coloração castanha (sendo então 25 fotomicrografias por corte histopatológico ou 25 fotomicrografias por animal),utilizando-se aobjetiva de 20 vezes de aumento.

Com o programa Adobe Photoshop® CS5 foram retirados alguns artefatos que ficaram nas fotomicrografias, que poderiam atrapalhar a morfometria destas áreas. Em seguida, conforme Figura 5, utilizando o programa Pro Image-plus® 4.5 para Windows®, foram medidas as áreas imunocoradas em castanho de cada fotomicrografia, sendo que estas medidas eram fornecidas automaticamente pelo programa em micrômetros quadrados. Essas medidas foram transferidas para uma planilha de dados do Windows Excel®.

Figura6 Imunohistoquímica com anti-NOS na retina e coróide de um coelho do experimento. As setas demonstram áreas imunocoradas pelo anticorpo em castanho escuro (fotomicrografia panorâmica).



Fonte: o autor, 2011.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação dos Grupos Um, Dois e Três (G1, G2 e G3) em relação às variáveis quantitativas, foi considerado o modelo de Análise da Variância (ANOVA) com um fator e o teste *Least Significant Difference*(LSD) para as comparações múltiplas.

A condição de normalidade do experimento foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. Valores de $p<0,05$ indicaram a significância estatística. Os resultados foram analisados com o programa computacional Statistica®8.0.

5. RESULTADOS

5.1 VARIÁVEL PESO

A análise comparativa dos pesos dos coelhos nos três grupos não evidenciou diferença significativa no início e no final do estudo, assim como na diferença entre o final e o início do estudo (p=0,071), como demonstrado na TABELA 1.

Tabela 1 Análise comparativa do peso (medido em gramas) dos coelhos nos 3 grupos.

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padão	Valor de *p* (G1xG2xG3)
Peso – inicial	G1	11	1882	1840	1580	2550	267	
	G2	10	1876	1880	1620	2315	209	
	G3	11	2053	2140	1480	2680	345	0,268
Peso – final	G1	11	2975	3050	2720	3165	165	
	G2	10	3154	3128	2680	3585	268	
	G3	11	3080	3005	2400	3700	380	0,367
Peso (final – inicial)	G1	11	1094	1120	550	1585	277	
	G2	10	1278	1280	985	1600	204	
	G3	11	1028	1015	660	1430	244	0,071

Fonte: 2011.

Na TABELA 2 são apresentados os valores de p das comparações entre os pesosda avaliação inicial e da avaliação final, dentro de cada grupo.A análise comparativa entre a avaliação inicial e a avaliação final dentro de cada grupo, mostrou diferença significativa entre elas.

Tabela 2 Variável peso: avaliação inicial e final entre os grupos.

Grupo	Valor de *p* (inicial x final)
G1	<0,001
G2	<0,001
G3	<0,001

Fonte: 2011.

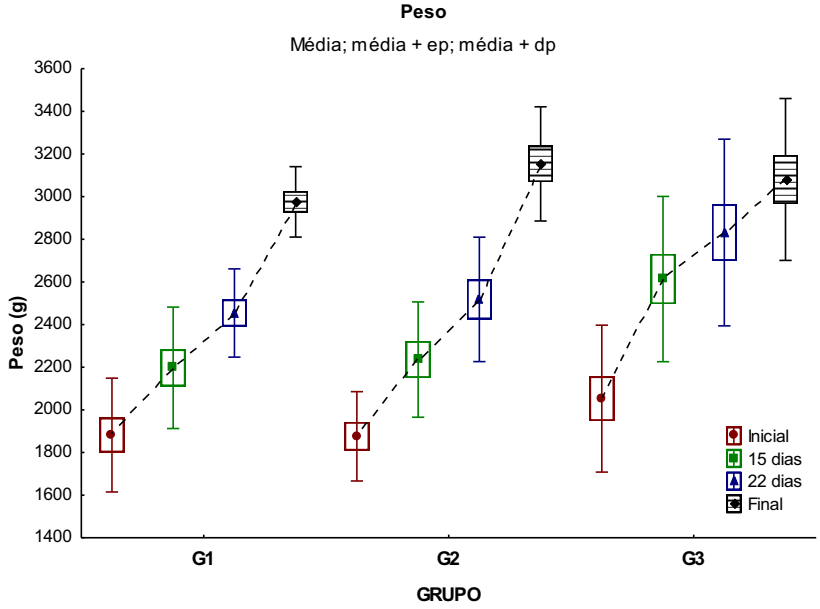
A média dos pesos corporais inicial entre os coelhos do grupo controle G1 e dos grupos estudo G2 e G3 não demonstraram diferenças estatísticas. Os grupos estudo G2 e G3 que receberam a dieta suplementar com semente de linhaça tiveram um ganho de peso superior quando comparados com o grupo controle nos diferentes tempos de pesagens (p<0,05), conforme se observa na TABELA 3 e no GRÁFICO 1.

Tabela 3 Média dos pesos (medido em gramas) dos grupos no 15º dia e 22º dia do experimento.

	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padão	Valor de *p*
Peso 15 dias	G1	11	2197	2115	1855	2845	285	
	G2	10	2236	2185	1870	2905	270	
	G3	11	2614	2640	1970	3350	388	0,008
Peso 22 dias	G1	11	2454	2405	2250	2940	207	
	G2	10	2518	2485	2110	3070	292	
	G3	11	2832	2730	2100	3650	438	0,026

Fonte: 2011.

Gráfico 1 Média dos pesos (medido em gramas) dos grupos no início, 15º dia, 22º dia e final do experimento.



Fonte: 2011.

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS DE PERFIL LIPÍDICO E COMPARAÇÃO ENTRE AS DUAS AVALIAÇÕES (INICIAL E FINAL) DENTRO DE CADA GRUPO

Inicialmente, para cada uma das variáveis: a avaliação inicial, a avaliação final e a diferença entre as duas avaliações testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais nos 3 grupos, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um dos grupos tem média diferente dos demais. No caso de rejeição da hipótese de igualdade dos 3 grupos, estes foram comparados dois a dois.

Em seguida, dentro de cada grupo, testou-se a hipótese nula de que a média na avaliação inicial é igual à média na avaliação final, versus a hipótese alternativa de médias diferentes.

5.2.1 Variável Colesterol Total

Os níveis de Colesterol Total no início do estudo foram semelhantes entre os 3 grupos, porém houve diferença significativa entre os grupos em relação aos níveis de colesterol total no final do estudo, assim como na diferença entre o início e o final do estudo, como demonstrado na TABELA 4.

Tabela 4 Médias dos níveis de Colesterol Total (mg/dl).

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padão	Valor de *p* (G1xG2xG3)
Colesterol Total – inicial	G1	11	75,8	63,0	33,0	138,0	36,7	
	G2	10	73,5	74,5	43,0	131,0	25,3	
	G3	11	61,7	66,0	31,0	91,0	14,9	0,442
Colesterol Total – final	G1	11	642,3	666,0	36,0	1057,0	392,4	
	G2	10	731,6	754,0	192,0	1047,0	258,9	
	G3	11	321,7	294,0	106,0	686,0	215,3	0,009
Colesterol Total - (final – inicial)	G1	11	566,5	603,0	3,0	972,0	372,7	
	G2	10	658,1	696,0	147,0	967,0	250,4	
	G3	11	260,0	228,0	51,0	619,0	208,6	0,009

Fonte: 2011.

Na análise comparativa dos grupos dois a dois, não se evidenciou diferença significativa do Colesterol Total inicial e final entre os grupos G1 e G2,

entretanto,houve diferença significativa quando comparados os grupos G1 e G3; e G2 e G3, demonstrados na TABELA 5.

Tabela 5 Colesterol Total: análise dos grupos dois a dois.

Grupos comparados	Valor de p	
	Colesterol total - final	Diferença (final – inicial)
G1 x G2	0,501	0,471
G1 x G3	0,018	0,018
G2 x G3	0,004	0,004

Fonte: 2011.

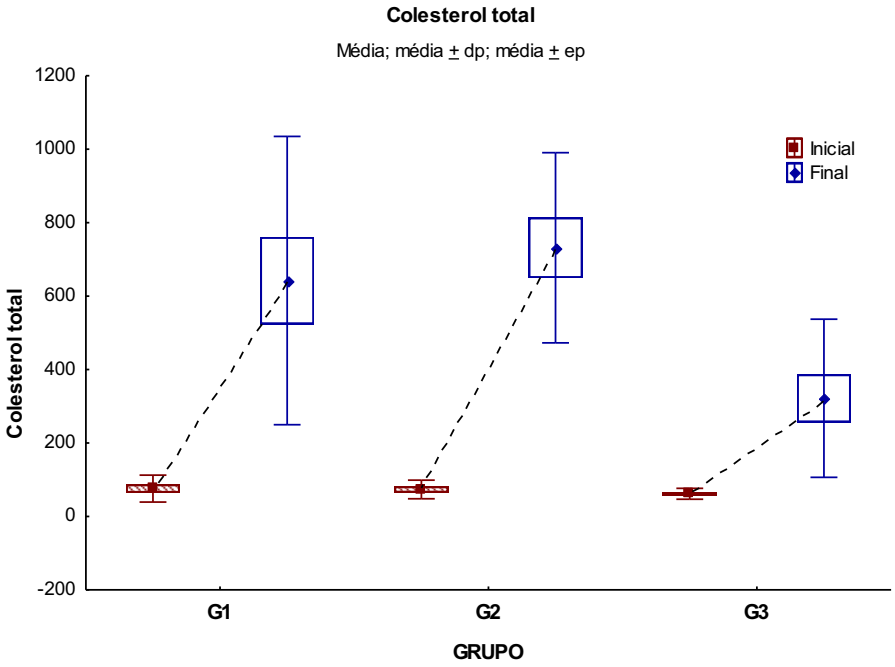
Houve aumento acentuado dos níveis de Colesterol Total no final do estudo em todos os grupos, sendo que no G3 essa variação foi menor em relação aos outros grupos, conforme a TABELA 6 e a GRÁFICO 2.

Tabela 6 Colesterol Total: avaliação inicial e final entre os grupos.

Grupo	Valor de *p* (inicial x final)
G1	0,001
G2	<0,001
G3	0,002

Fonte: 2011.

Gráfico 2 Colesterol Total (mg/dl): avaliação inicial e final entre os grupos.



Fonte: 2011.

5.2.2 Variável Lipoproteína de Baixa Densidade

Os níveis de LDL-C no início do estudo foram semelhantes entre os 3 grupos, porém houve diferença significativa entre os grupos em relação aos níveis de LDL-C no final do estudo, assim como na diferença entre o início e o final do estudo (p<0,05), segundo TABELA 7.

Tabela 7 Médias do LDL-C (mg/dl) inicial, final e a diferença entre os dois nos três grupos.

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padão	Valor de *p* (G1xG2xG3)
LDL-C– inicial	G1	11	34,8	14,7	1,3	97,0	33,7	
	G2	10	30,6	28,5	6,8	83,0	21,7	
	G3	11	12,8	13,2	0,6	22,7	6,6	0,085
LDL-C – final	G1	11	605,4	613,8	8,3	1017,4	390,1	
	G2	10	694,8	724,3	163,8	1014,0	255,1	
	G3	11	294,0	270,6	79,8	649,4	211,4	0,010
LDL-C (final – inicial)	G1	11	570,6	586,8	7,0	971,4	370,2	
	G2	10	664,2	707,8	157,0	958,0	246,0	
	G3	11	281,1	257,4	75,5	626,7	206,9	0,011

Fonte: 2011.

Na análise comparativa dos grupos dois a dois não se evidenciou diferença significativa do LDL-C inicial e final entre os grupos G1 e G2, entretanto, houve diferença significativa quando comparados os grupos G1 e G3 e G2 e G3, como observado na TABELA 8.

Tabela 8 LDL-C: comparação dos grupos dois a dois.

Grupos comparados	Valor de *p*	
	LDL-C– final	Diferença(final -inicial)
G1 x G2	0,496	0,457
G1 x G3	0,020	0,024
G2 x G3	0,004	0,004

Fonte: 2011.

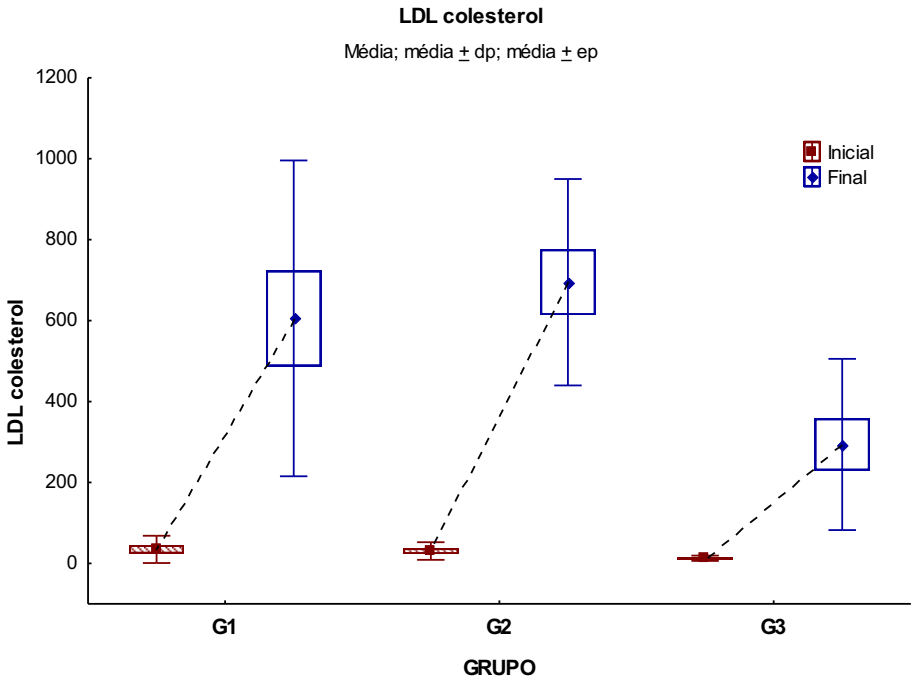
Houve também um aumento acentuado dos níveis de LDL no final do estudo em todos os grupos,conforme demonstração na TABELA 9 e no GRÁFICO 3.

Tabela 9 LDL-C: avaliação inicial e final entre os grupos.

Grupo	Valor de p (inicial x final)
G1	<0,001
G2	<0,001
G3	0,001

Fonte: 2011.

Gráfico 3 LDL-C (mg/dl): avaliação inicial e final entre os grupos.



Fonte: 2011.

5.2.3 Variável Lipoproteína de Alta Densidade

Os níveis de HDL-C no início do estudo foram semelhantes entre os 3 grupos, porém, houve diferença significativa entre os grupos em relação aos níveis de HDL-C no final do estudo, assim como na diferença entre o início e o final do estudo,como demonstrado na TABELA 10.

Tabela 10 Médias do HDL-C(mg/dl) inicial, final e a diferença entre os dois nos três grupos.

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padão	Valor de *p* (G1xG2xG3)
HDL-C - inicial	G1	11	21,3	25,0	5,0	33,0	9,3	
	G2	10	20,3	20,0	11,0	28,0	4,7	
	G3	11	24,4	24,0	13,0	33,0	5,8	0,381
HDL-C – final	G1	11	23,7	22,0	15,0	46,0	8,8	
	G2	10	19,1	20,0	12,0	28,0	4,6	
	G3	11	15,0	14,0	8,0	21,0	3,8	0,010
HDL-C	G1	11	2,5	3,0	-15,0	21,0	11,7	
(final – inicial)	G2	10	-1,2	-1,0	-16,0	11,0	7,8	
	G3	11	-9,4	-11,0	-17,0	2,0	6,6	0,014

Fonte: 2011.

Na análise comparativa dos grupos dois a dois não se evidenciou diferença significativa do colesterol HDL-C inicial e final entre os grupos,como demonstra a TABELA 11.

Tabela 11 HDL-C: comparação dos grupos dois a dois.

Grupos comparados	Valor de *p*	
	HDL-C– final	Diferença (final – inicial)
G1 x G2	0,099	0,362
G1 x G3	0,003	0,005
G2 x G3	0,142	0,047

Fonte: 2011.

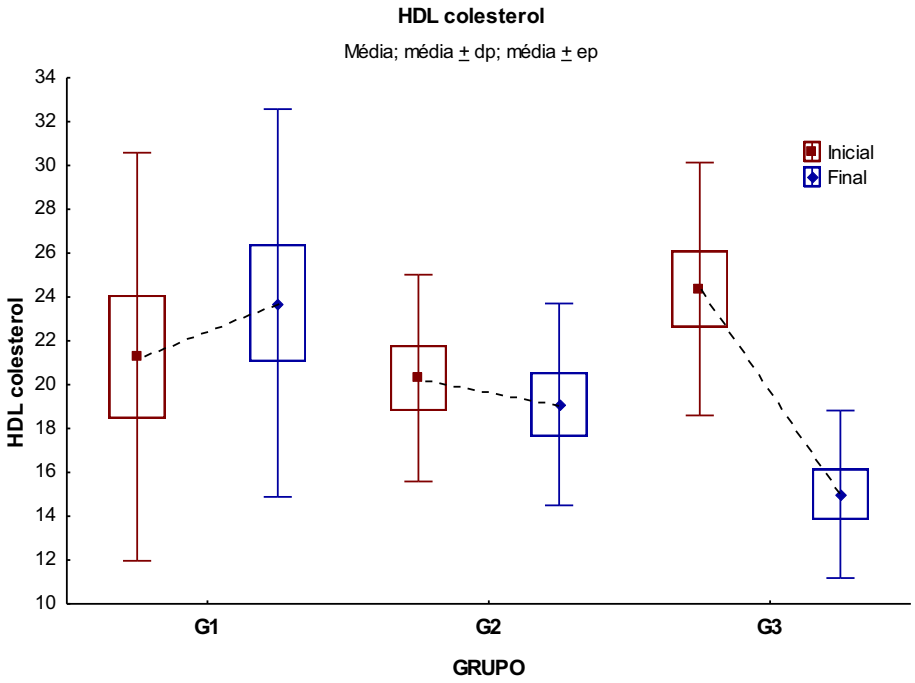
Não houve alteração significativa dos níveis de HDL-C no final do estudo nos grupos G1 e G2, porém, houve grande diminuição nos níveis de HDL-C no final do estudo no grupo G3, demonstrados na TABELA 12e no GRÁFICO 4.

Tabela 12 HDL-C: avaliação inicial e final entre os grupos.

Grupo	Valor de *p* (inicial x final)
G1	0,504
G2	0,640
G3	0,001

Fonte: 2011.

Gráfico 4 HDL-C(mg/dl): avaliação inicial e final entre os grupos.



Fonte: 2011.

5.2.4 Variável Triglicerídeos

Os níveis de triglicerídeos foram semelhantes entre os 3 grupos, tanto no início quanto no final do estudo, e também na diferença entre o início e o final do estudo, como demonstra a TABELA 13.

Tabela 13 Médias do Triglicerídeos (mg/dl) inicial, final e a diferença entre os dois nos três grupos.

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padão	Valor de *p* (G1xG2xG3)
Triglicerídeos - inicial	G1	11	98,5	89,0	54,0	198,0	40,6	
	G2	10	112,2	126,0	54,0	144,0	31,2	
	G3	11	161,0	123,0	72,0	326,0	88,1	0,050
Triglicerídeos – final	G1	11	65,6	58,0	31,0	113,0	26,2	
	G2	10	88,5	79,5	46,0	149,0	37,3	
	G3	11	63,8	58,0	29,0	120,0	31,9	0,166
Triglicerídeos (final – inicial)	G1	11	-32,8	-23,0	-156,0	38,0	48,8	
	G2	10	-23,7	-24,5	-79,0	45,0	45,4	
	G3	11	-97,2	-70,0	-297,0	17,0	98,3	0,166

Fonte: 2011.

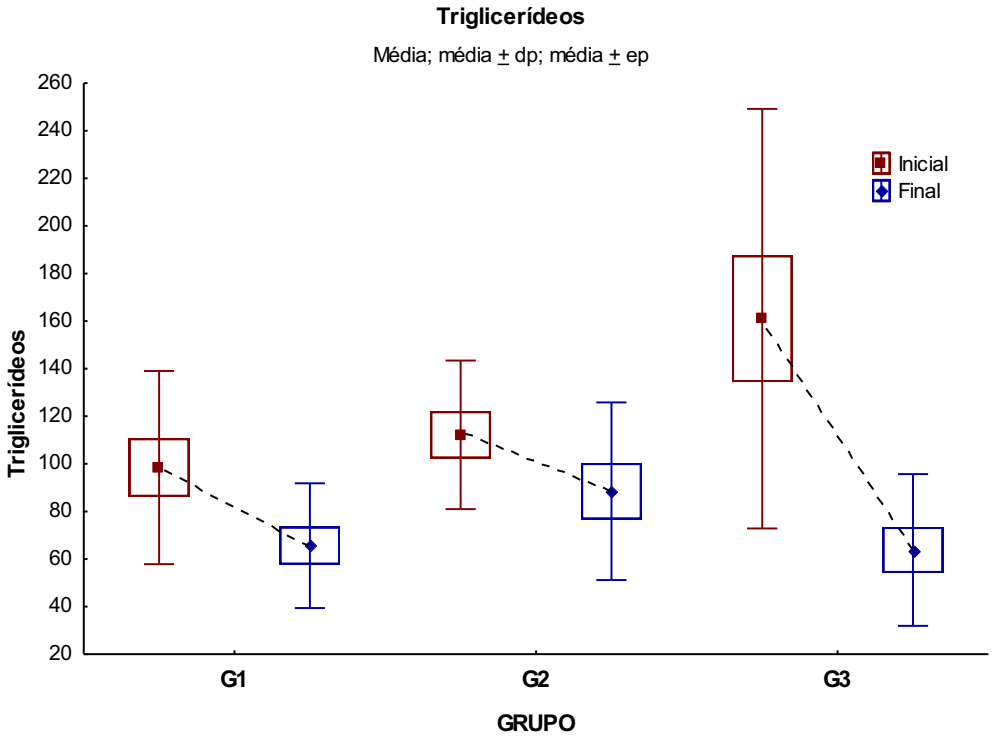
Houve significativa diminuição dos níveis de triglicerídeos no final do estudo no grupo 3, demonstrado na TABELA 14 e no GRÁFICO 5.

Tabela 14 Triglicerídeos: avaliação inicial e final entre os grupos.

Grupo	Valor de *p* (inicial x final)
G1	0,0497
G2	0,133
G3	0,008

Fonte: 2011.

Gráfico 5 Triglicerídeos (mg/dl): avaliação inicial e final entre os grupos.



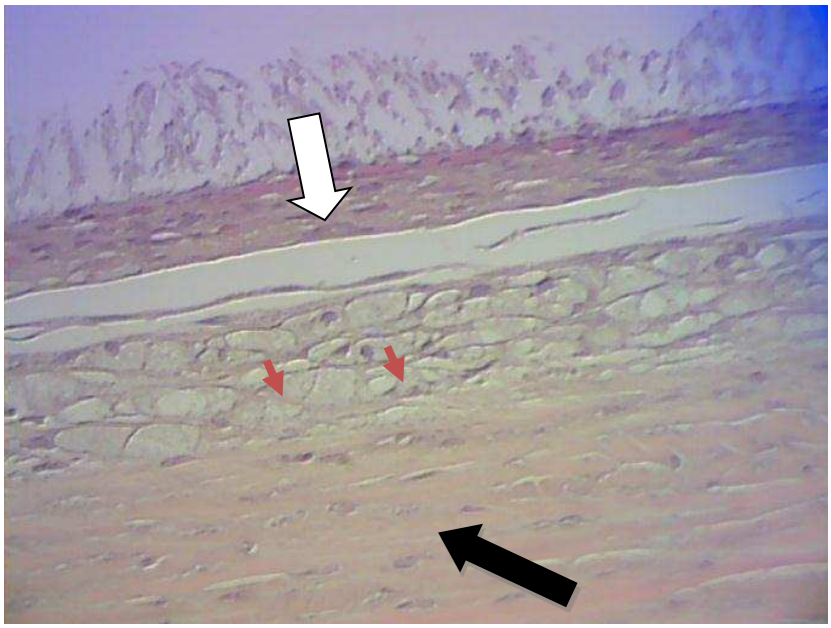
Fonte: 2011.

5.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVES CORÓIDE E ESCLERA ANALISADAS PELA MORFOMETRIA;E DA CORÓIDE E RETINA ANALISADAS PELA IMUNOHISTOQUÍMICA

5.3.1 Histopatologia das lesões coriorretinoescleroidais em Coelhos hipercolesterolêmicos tratados com linhaça

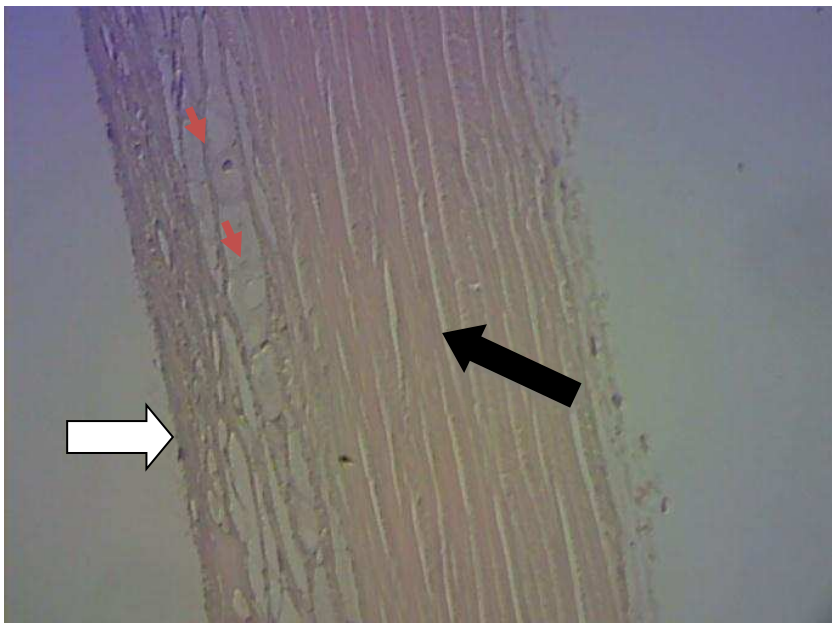
Os coelhos hipercolesterolêmicos do estudo (tratados ou não com linhaça) apresentaram, basicamente, do que se pode observa em microscopia convencional em laminas coradas ao HE, depósitos de histiócitos espumosos na esclera, logo abaixo da coróide como demonstra a FIGURA 7 e 8, sendo que estes depósitos não são vistos na esclera de coelhos não hipercolesterolêmicos conforme se vê na FIGURA 9.

Figura 7– Fotomicrografia corte histológico do olho do coelho hipercolesterolêmico não tratado com linhaça que demonstra a coróide (seta branca) e esclera (seta preta) corados com Hematoxilina-eosina (HE). A dupla seta vermelha demonstra os histiócitos espumosos na esclera.



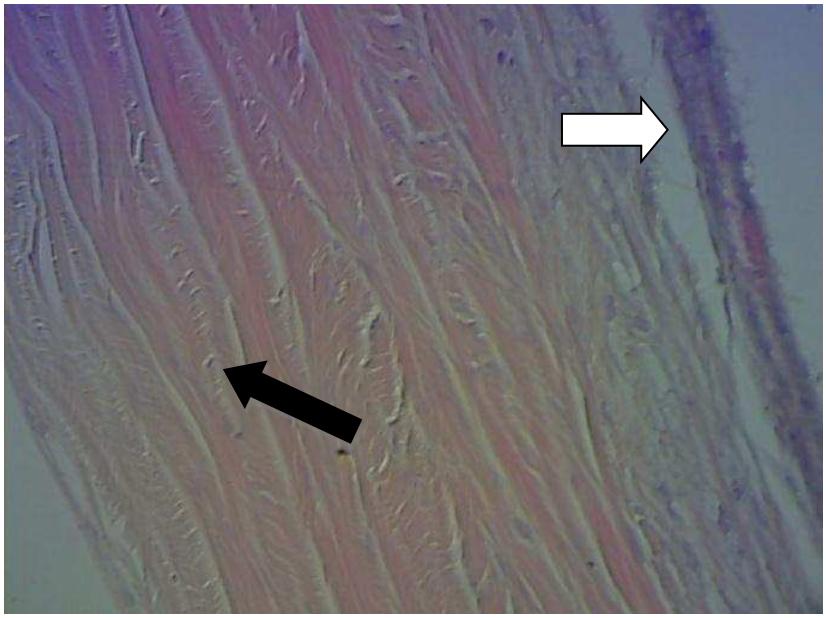
Fonte: o Autor, 2011.

Figura 8 - Fotomicrografia de coelho hipercolesterolêmico tratado com linhaça que demonstra a coróide (seta branca) e esclera (seta preta) corados com Hematoxilina-eosina (HE). A dupla seta vermelha demonstra os histiócitos espumosos na esclera, os quais são menos numerosos que aqueles dos coelhos tratados com este nutracêutico.



Fonte: o Autor, 2011.

Figura 9 - Fotomicrografia de coelho não hipercolesterolêmico que demonstra a coróide (seta branca) e esclera (seta preta) corados com Hematoxilina-eosina (HE).Observe que não há histiócitos espumosos na esclera.



Fonte: o Autor, 2011.

5.3.2 Análise morfométrica da esclera e da coróide

Uma vez que as lesões subjetivamente observadas na histopatologia convencional com lâminas coradas ao HE estavam situadas basicamente na esclera subcoroideana com o acúmulo de histiócitos espumosos e, uma vez que este acúmulo poderia aumentar a espessura destas camadas, procedemos à análise morofométrica da espessura da esclera e da coroide para determinar, de modo mais objetivo, possíveis diferenças entre os grupos do estudo.

Para cada uma das variáveis coróide e esclera, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais nos três grupos, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um dos grupos tem média diferente dos demais.

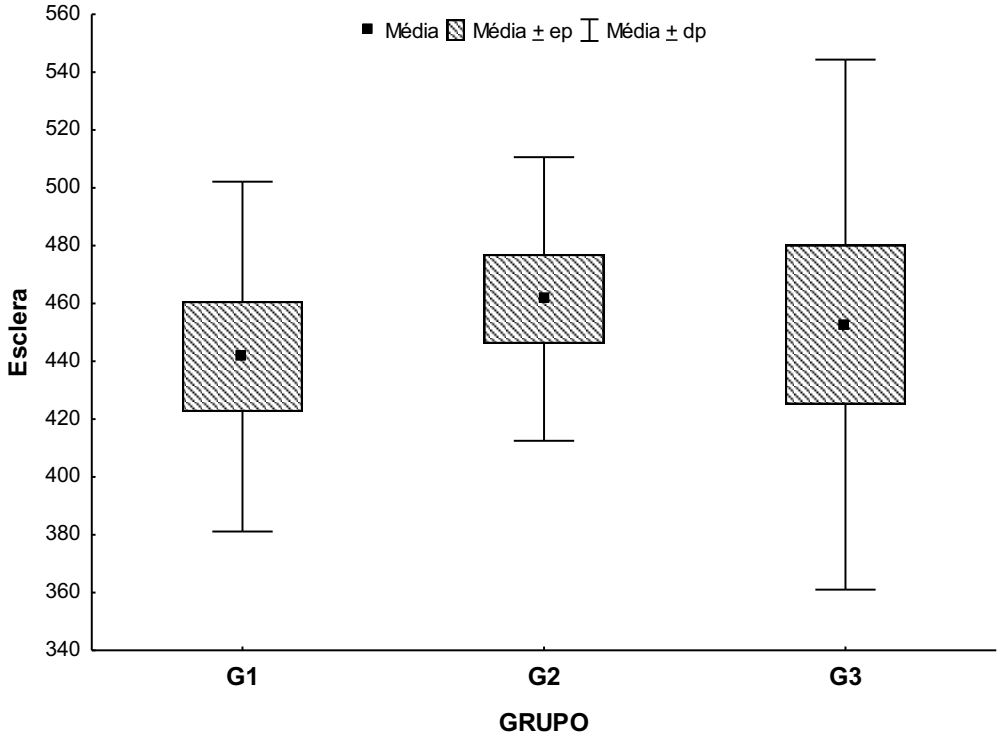
Na TABELA 15 são apresentados análises estatísticas descritivas das variáveis de acordo com os grupos e os valores de *p* dos testes estatísticos que demonstra não haver diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, também observadas nos GRÁFICOS 6 e no GRÁFICO 7.

Tabela 15 Médias da espessura em micrômetros nas variáveis Esclera e Coróide entre os grupos.

Variavel	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de *p**
Esclera	G1	11	441,6	448,5	305,1	533,8	60,5	
	G2	10	461,5	452,0	399,9	542,2	49,1	
	G3	11	452,7	419,3	381,4	703,5	91,7	0,819
Coróide	G1	11	32,5	31,9	13,5	48,7	8,9	
	G2	10	30,7	30,4	21,3	45,4	6,5	
	G3	11	33,2	33,4	22,7	48,0	7,9	0,754

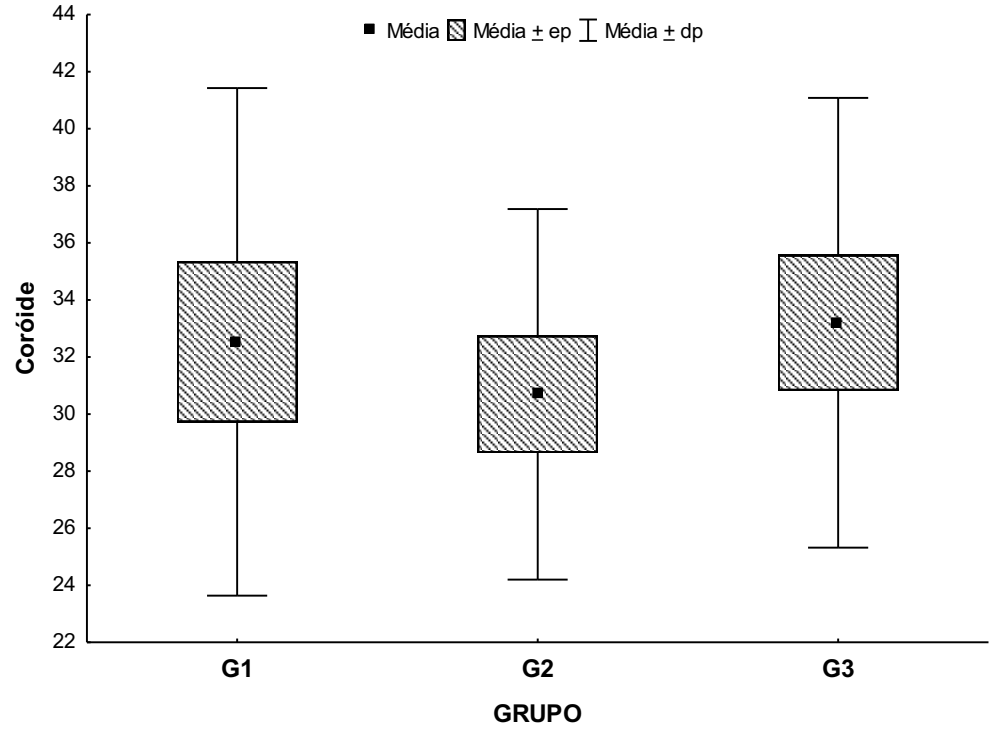
*ANOVA com um fator, p<0,05

Gráfico 6 Médias da espessura em micrômetros da Esclera entre os grupos.



Fonte: o Autor, 2011.

Gráfico 7 Médas da espessura em micrômetros da Coróide entre os grupos.



Fonte: o Autor, 2011.

5.3.3 Variável Área Imunocorada com utilização do anticorpo anti- Óxido Nítrico Sintetase (NOS)

Uma vez observadas as lesões anatomopatológicas na retina pela histopatologia convencional com lâminas coradas ao HE, analisou-se a expressão da NOS, proteína envolvida no processo inflamatório, através da área imunocorada com o anticorpo anti-NOS, na retina e coróide dos coelhos submetidos ao experimento.

Na avaliação imunohistoquímica houve diferenças estatisticamente significativas na medida das áreas entre os grupos, o que fica ainda mais evidente quando observada a diferença entre os grupos G1 e G3, conforme demonstração na TABELA 16.

Tabela 16 Médias em micrômetros quadrados da imunohistoquímica nos grupos com a utilização do marcador Óxido Nítrico Sintetase (NOS).

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de *p*
Área NOS	G1	11	12029	12505	5741	18856	3932	
	G2	10	11934	10101	4236	24797	6239	
	G3	11	6867	5943	3155	11248	2555	0,022

Fonte: o autor, 2011.

Na análise comparativa dos grupos dois a dois, também observou-se diferenças significativas entre os grupos G1 e G3 e entre os grupos G2 e G3.

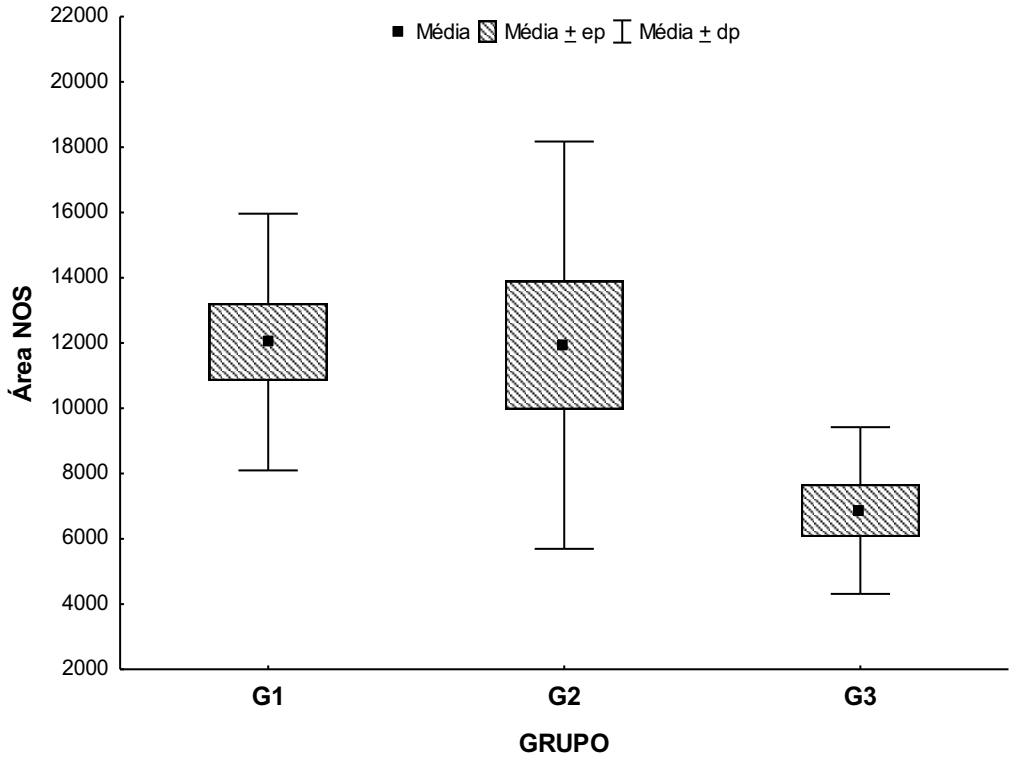
Tabela 17 Variável NOS: análise comparativa entre os grupos dois a dois.

Grupos Comparados	Valor de *p*
G1 x G2	0,961
G1 x G3	0,018
G2 x G3	0,014

Fonte: o autor, 2011.

No GRÁFICO 7constata-se diminuição da área do NOS entre os grupos, o que fica mais evidente no grupo 3 que recebeu linhaça desde o início do experimento.

Gráfico 7 Médias das áreas em micrômetros quadrados coradas pelo NOS nos grupos.



Fonte: o Autor, 2011.

6. DISCUSSÃO

6.1 DIETAS HIPERCOLESTEROLÊMICAS E MODELOS EXPERIMENTAIS

Devido à elevada prevalência das doenças retinianas e dos seus possíveis fatores de risco, é importante a reprodução de lesões coriorretinianas em modelos animais. Assim, é possível compreender a etiologia, bem como a minimização dos danos fisiológicos e tratamento dessa doença.

Alguns modelos baseados na hipercolesterolemia induzida por via alimentar são os mais práticos e difundidos para o estudo da aterosclerose experimental. No que se refere à lesão provocada por padrões alimentares, observa-se que há diversas formas de induzir nos animais alterações no perfil lipídico semelhantes às encontradas em seres humanos.[69]

No caso deste estudo, procurou-se reproduzir as alterações degenerativas coriorretinianas, tomando como modelo o estudo da aterosclerose experimental induzida pela hipercolesterolemia.[69]

O padrão ouro utilizado internacionalmente para o estudo de lesões ateroscleróticas, consiste na adição de colesterol em pó Sigma Aldrich® na ração administrada aos coelhos por um determinado período de tempo. Essa metodologia é muito empregada em estudos nacionais e internacionais.[80-2] Porém, limitações como alto custo do produto e dificuldade na aquisição, limitam a utilização do colesterol em pó Sigma Aldrich®.

Há vários estudos experimentais que utilizam como processo metodológico para induzir a aterogênese, a adição à ração suplementar de alimentos ricos em gorduras saturadas como manteiga, banha de porco e óleo de coco e rico em colesterol como gema de ovo.[83-6]

O primeiro estudo documentado utilizando gema de ovo para indução de lesões ateroscleróticas foi realizado por Ignatowski entre os anos de 1908 e 1909. Em estudo experimental, o autor acreditou que um metabólito tóxico da proteína animal levaria à aterosclerose. Assim, coelhos adultos foram alimentados com carne enquanto coelhos recém desmamados com leite e gema de ovo.[84]

Os resultados conclusivos demonstraram a formação de aterosclerose em ambos os grupos. Em outro estudo realizado entre 1910 e 1911, observou-se que a gema de ovo era aterogênica e, em 1912, concluiu-se que havia um componente não protéico na gema que funcionava como agente aterogênico.[84]

Recentemente, em um estudo experimental em coelhos cujo objetivo era o desenvolvimento do processo aterosclerótico, os autores evidenciaram que a adição de 0,5% de colesterol proveniente do ovo liofilizado, foi capaz de induzir formação de aterosclerose leve.[85]

Estudorealizado na PUCPR e publicado em 2011, preconizou-se a utilização de adição de 1% de colesterol, proveniente do ovo liofilizado, como protocolo experimental, para indução de lesão aterosclerótica em seu experimento.[86]

A realização de pesquisas que utilizam principalmente modelos animais de pequeno porte, como os coelhos, apresenta diversas vantagens. Afinal, esses animais são de fácil acesso, de baixo custo, apresentando a caracterização genética bastante definida, além do que todos os passos envolvidos na pesquisa experimental podem ser devidamente controlados.[87]

Com base nestes estudos, conclui-se que o acréscimo de 0,5% de colesterol através da utilização de ovo liofilizado na dieta de coelhos, favorece não só o surgimento da lesão aterosclerótica, bem como pelo mesmo mecanismo fisiopatogênico alteração similar no processo degenerativo coriorretiniano, que tornou-se base para o estudo nos coelhos deste experimento.

6.2 EFEITO DA SEMENTE DE LINHAÇA NAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS ANALIZADAS

Muito se discute e se estuda na literatura científica sobre os potenciais efeitos benéficos da semente de linhaça. Entre esses estudos encontra-se o sobre a redução nos níveis séricos de colesterol total e na sua fração de LDL-C. A maioria dos estudos sugerem que a ingestão diária de 15 a 50 gramas/dia de semente de linhaça seria responsável pela redução do LDL-C em 8 a 15%.[88,89]

Pode-se observar no presente trabalho, por meio de análise comparativa dos níveis séricos de colesterol total entre os grupos de animais estudados, que houve aumento de colesterol total e de LDL-C nos grupos. Porém, o grupo que recebeu o acréscimo de semente de linhaça apresentou concentração plasmática final de

colesterol total e de LDL-C em níveis inferiores e com relevância estatística (p<0,05). Afinal, o grupo G1 (controle) apresentou níveis médios de colesterol total e LDL-C inferiores aos grupos estudo G2 e G3. Esse potencial efeito redutor da semente de linhaça é muito positivo para minimizar alterações coriorretinianas degenerativas.

Afinal, sabe-se que hipercolesterolemia é um dos fatores de risco para o desenvolvimento de degenerações coriorretinianas.Resultados semelhantes a esse respeito já foram reportados em estudos prévios.[23,26,27]

Num estudo realizado em 2005,analisou-se o efeito do complexo isolado de lignana (secoisolariciresinol) em coelhos por 8 semanas. Para tanto, os animais foram randomizados em quatro grupos, conforme o tratamento dietético (GI = ração padrão; GII = dieta padrão enriquecida com lignana; GIII = dieta hipercolesterolêmica a 0,5% e GIV = dieta hipercolesterolêmica acrescida de lignana). Ao final do estudo, observaram-se em todos os grupos estudados níveis aumentados de colesterol total e LDL-C, fato atribuído à dieta hipercolesterolêmica. Porém, o aumento na concentração de colesterol total e LDL-C foi reduzido no grupo IV comparado com os outros grupos em 20% e 14%, respectivamente.[89]

Em 2007, demonstrou-se num estudo que a oferta de 15% de semente de linhaça em ratos hipercolesterolêmicos, previniu a progressão da hipercolesterolemia e produziu reduções significativas na concentração sérica de colesterol total (13,76%) e LDL-C (44%).[90]

Posicionamentos controversos, ainda que em pequena escala, são citados na literatura com relação a tais resultados. Em estudo de 2006,avaliou-se o efeito da suplementação de óleo da semente de linhaça no perfil lipídico em 56 pacientes alocados em dois grupos. Os resultados demonstraram que não houve diferenças nas concentrações de LDL-C e HDL-C.[64] Nenhum efeito nos níveis séricos de colesterol total foi encontrado noutro estudo de 2008, no qual os seus autores analisaram a influência da semente de linhaça (40 g/dia) em 199 mulheres que foram acompanhadas durante 12 meses.[91]

Também em estudo realizado em 2005, avaliou-se o potencial efeito hipolipídico da semente de linhaça em coelhos hipercolesterolêmicos, e percebeu-se que não houve diferenças na concentração sérica de colesterol total entre os grupos analisados.[92]

Essas divergências podem ser atribuídas à quantidade de colesterol adicionado à dieta, à forma e à quantidade de consumo da semente de linhaça.

Num estudo de 2003, ressaltou-se que as melhores formas de se consumir a semente de linhaça, de maneira a aproveitar as propriedades dos seus constituintes funcionais é a assada, a cozida ou a triturada.[93] Também em 2003, num outro estudo, salientou-se que a utilização do grão inteiro de semente de linhaça dificulta a digestão e o aproveitamento das suas propriedades funcionais.[72]

Ainda não se conhece com a devida exatidão os mecanismos pelos quais a semente de linhaça atua na prevenção das doenças coriorretinianas degenerativas. Há relatos de que os efeitos hipocolesterolêmicos da semente de linhaça podem ser atribuídos aos constituintes funcionais presentes em sua composição, como a lignana, a fibra solúvel e o ácido linolênico.[91,94-7]

Pesquisas recentes reportam que as lignanas atuam positivamente na contentração de lipídeos plasmáticos, pela capacidade de modulação das enzimas envolvidas no metabolismo do colesterol, por reduzirem o estresse oxidativo e pelas propriedades antagonistas da agregação plaquetária.[96] Em acréscimo, num estudo de 2004, evidenciou-se que as lignanas apresentam capacidades de modular enzimas chaves envolvidas no metabolismo do colesterol como a 7-α hidroxilase e a acil-Coenzima colesterol transferase (ACAT).[97]

Essas ações fisiológicas ocorrem em virtude dos compostos presentes nas lignanas. Afinal, as lignanas contêm aproximadamente 34 a 38% de lignana Secoisolariciresinol (SDG), 15 a 20% de ácido glicosídico e 9,6 a 11% de Ácido hidroximetilglutárico (HMGA). O SDG e o ácido glicosídico apresentam propriedades antioxidantes, enquanto que o HMGA demonstra atividade hipolipídica.[98,99]

As fibras solúveis são potencialmente eficazes na regulação dos níveis plasmáticos de colesterol total e LDL-C. Em diversos estudos, tanto em humanos quanto em animais, tem sido relatada a ação hipolipemiante das fibras solúveis.[100,101]

A NECP "*Third Report of the National Cholesterol Education Program"* evidencia que o consumo regular de fibras (20 a 30g/dia), sendo 5 a 10 gramas de fração solúvel, reduz a absorção de gorduras saturadas e colesterol em até 7%.[102]

Existem várias teorias que procuram explicar como a fibra solúvel pode reduzir o colesterol sérico: a viscosidade natural da fibra que diminui a absorção do colesterol pelo intestino; o aumento na excreção dos ácidos biliares nas fezes, e como mecanismo compensatório, o fígado produz mais ácidos biliares a partir da degradação do colesterol.

E, por fim, sabe-se que os propinatos produzidos na fermentação da fibra solúvel pelas bactérias colônicas são absorvidos e convertidos em succenil-coenzima A no fígado, podendo inibir a síntese de colesterol.[103]

Em 2008, ao ofertar 40 gramas/dia de semente de linhaça a mulheres demonstrou, após análise de composição nutricional, que a quantidade de fibras na semente de linhaça era de 3,6 gramas. Os autores concluíram que essa adição ínfima de fibras contribuiu contribui para o aumento da excreção de ácidos biliares associados e, por conseguinte, a uma redução na absorção intestinal de colesterol. Esses fatores agregados induzem significativa recaptação do LDL-C circulante pelos seus receptores.[104]

Achados semelhantes foram relatados em estudo realizado em 1998, os quais investigaram a influência da fibra chicória (solúvel) nos lipídios séricos e hepáticos e excreção fecal em ratos. Os animais alimentados com extrato de chicória tiveram aumento significativo do HDL-C, diminuição do LDL-C e maior excreção fecal de lipídeos e de sais biliares quando comparados com o grupo controle.[105]

No que se refere à propriedade funcional do Ômega-3 (ω-3) presente na semente de linhaça, vários estudos demonstram a associação inversa entre o consumo de ω-3 e os níveis séricos de colesterol total e LDL-C.[106] Os mecanismos propostos incluem desde modificações favoráveis nos níveis de lipídeos plasmáticos, principalmente triglicerídeos, alterações hepáticas do metabolismo do colesterol, até redução da captação do colesterol pelo fígado.[107]

Ao estudar coelhos hipercolesterolêmicos em 1995, verificou-se que o grupo de animais tratados com ácidos graxos ω-3 apresentou elevação significativa do LDL-C.[108] Na mesma linha de pesquisa desse protocolo experimental, também foi observada em coelhos hipercolesterolêmicos, redução do colesterol total e na LDL-C.[109]

No presente estudo, ao analisar a concentração plasmática de LDL-C após o período experimental, percebeu-se que os grupos estudados apresentaram diferenças significativas entre os grupos G1 e G3 e entre os grupos G2 e G3.

Alguns estudos demonstraram que, na presença de semente de linhaça, a concentração sérica de HDL-C pode aumentar ou reduzir.[94,110]

Em 2004, constatou-se que os níveis de HDL-C não sofreram nenhuma alteração significativa em ambos os grupos estudados (com ou sem semente de linhaça).[97] Por outro lado, em 2005 observou-se que o complexo lignânico ofertado

aos coelhos foi responsável pelo aumento no HDL-C em 24%. Essas diferenças podem estar associadas com a concentração de colesterol incorporado á dieta associada ou não ao tempo de duração da oferta da dieta hipercolesterolêmica.[89]

No presente estudo pode-se observar que a oferta da dieta hipercolesterolêmica a 0,5%, proveniente do ovo liofilizado, não foram observados alterações significativas entres os grupos G1 e G2, mas, houve uma diminuição estatisticamente significativa do HDL-C entres os grupos G1 e G3 e entre os grupos G2 e G3.

No que diz respeito às concentrações plasmáticas de triglicerídeos, observa-se que não houve diferenças estatísticas significativas nos grupos analisados. A oferta de semente de linhaça utilizada nesse protocolo experimental não foi efetiva para promover a redução de triglicerídeos nos grupos G2 e G3.

Num estudo realizado em 2004 corrobora com esses resultados. Nesse estudo realizado com *hamsters* ficou evidente que os animais que receberam o isolado de linhaça apresentaram níveis elevados de triglicerídeos similares aos grupos que não receberam.[97]

No mesmo sentido, em 1995 constatou-se que a ingestão de 50 g/dia de linhaça, durante 4 semanas, não promoveu alterações nos triglicerídeos plasmáticos.[46] Porém, há pesquisadores que evidenciam o efeito positivo do uso da semente de linhaça no decréscimo dos níveis de triglicerídeos.[111]

Esses resultados inconstantes podem ser devido à diferentes dosagens, ao tipo e à quantidade de semente de linhaça, assim como, também, pelo modelo animal utilizado.[62,65,72,112,113]

No entanto, até o presente momento, não há na literatura científica explicações plausíveis para a elevação dos níveis de triglicerídeos, sendo assim, fazem-se necessárias maiores investigações para esclarecer esse mecanismo.[114]

6.3 EFEITO DA SEMENTE DE LINHAÇA NA PREVENÇÃO DE LESÃO ATEROSCLERÓTICA E, POR SIMILARIDADE, NA PREVENÇAO DAS LESÕES EM VASOS DA CORIOCAPILAR, NOS OLHOS COM DMRI

Na lesão aterosclerótica e na degeneração coriorretiniana, mais especificamente no nível dos vasos da corio-capilar subrretiniana, conforme já estudado, observamos inicialmente lesões na parede endotelial. O endotélio parece ter um importante papel na resposta pró e anti-inflamatória. Entre sua principal atuação encontra-se a liberação de substâncias como o Óxido Nítrico (NO).

Diversos autores apontam que o NO exerce várias funções associadas à integridade da saúde vascular, das quais fazem parte: a vasodilatação, a inibição da adesão e agregação plaquetária, limitação do recrutamento vascular leucocitário, impedimento na proliferação da musculatura lisa vascular e, por fim, a inibição da produção do fator tecidual.[115,116]

Na presença de fatores inflamatórios e de fatores de risco cardiovascular, como as dietas hipercolesterolêmicas, ocorre também a perda da ação protetora do endotélio com a diminuição da síntese do NO pela NOS, originando aumento da propensão à vasoconstrição, trombose, inflamação e proliferação celular na parede vascular, como a que ocorre na doença aterosclerótica que tomamos como modelo para o experimento.

Ao observar a cascata de eventos envolvidos â doença coriorretiniana degenerativa, como, por exemplo, DMRI, verifica-se que a inclusão da semente de linhaça possa ser uma medida terapêutica ou preventiva dessa morbidade.

Diversos achados clínicos conferem a eficácia da utilização da secoisolariciresinol (SDG), lignana isolada da semente de linhaça, na redução da aterogenicidade. Em estudo realizado em 2005, já comentado anteriormente, com coelhos submetidos a diferentes tratamentos dietéticos, observou-se que a administração de 40 mg/kg de peso corporal ao dia de SDG, reduziu em 34% a formação das placas ateroscleróticas.[89]

Em outro estudo, o mesmo autor evidenciou que o SGD é capaz de reduzir a formação de lesão aterosclerótica em 75%.[95]

Em estudo experimental, observou-se que os hamsters que foram suplementados diariamente com SDG, tiveram lesões ateroscleróticas menores quando comparadas com as do grupo controle.[97]

Estes estudos demonstraram a diminuição do processo aterosclerótico em si, pelo uso do composto isolado da semente de linhaça, o secoisolariciresinol(SDG), mas, deve-se levar em consideração em relação ao processo degenerativo coriorretiniano, não somente devido à similaridade existente entre esses dois processos, bem como também pelo efeito global que certamente a hipercolesterolemia causa no aparelho vascular de todo o corpo, incluindo tanto os vasos da corio-capilar subrretinianos como os vasos coronarianos.

Num estudo de 2006 apontou-se que a composição nutricional da semente de linhaça é composta por 45% de lipídeos, dos quais o ácido α-linoléico (ômega-3) representa 55%, denotando, assim, a grande quantidade desse ácido graxo poliinsaturado nessa semente.[117]

O ômega-3 atua na prevenção da aterosclerose, em parte pela redução da trigliceridemia. Porém, evidências apontam que a sua atuação é mais significativa na redução da agregabilidade plaquetária, nos mecanismos pró–inflamatórios e no relaxamento da parede vascular.[118] Por conseguinte, contribuindo como efeito protetor nos vasos da coriocapilar.

Um clássico estudo clínico, randomizado e controlado sobre questão do ômega-3, foi o *Diet and Reinfarction Trial (DART).* O estudo demonstrou uma redução de 29% na mortalidade total, em homens que se encontravam em período pós infarto agudo do miocárdio, que receberam diariamente, durante dois anos, doses de 500 a 800 mg/dia de ácido graxo ômega-3.[119]

Em estudo de 1995 constatou-se que o consumo de 40 gramas de semente de linhaça por 23 dias, reduziu a agregação plaquetária e aumentou da vasodilatação,[120] certamente também contribuindo para o bom funcionameno da corio-capilar na prevenção das doenças degenerativas coriorretinianas.

Os resultados deste demonstraram lesão esclerocoroidal ao exame histopatológico convencional, lesão esta representada pela presença de acúmulos de histiócitos espumosos na região subcoroidal da esclera. Estes depósitos eram mais acentuados nos coelhos não tratados com linhaça quando subjetivamente comparados aos coelhos tratados com este nutracêuticos, demonstrando uma capacidade subjetiva de redução da lesão observada relacionada ao uso da mesma. No entanto, as nossas tentativas de demonstrar objetivamente esta redução através da morfometria não tiveram sucesso, uma vez que não foram observadas diferenças

estatisiticamente significativas na espessura da coróide e da esclera entre os três grupos do estudo.

Este estudo também esteve interessado em analisar a retina destes coelhos, que, muito embora não tenha tido lesões detectáveis pela histopatologia convencional, poderia apresentar alterações imunohistoquímicas. Escolhemos, para a nossa análise imunohistoquímica, o anticorpo monoclonal anti-NOS, tendo em vista o papel da NOS na fisiopatogenia da DMRI. Os resultados demonstram uma diferença na expressão imunohistoquímica da NOS nos três grupos, sendo que os grupos tratados mostram menor expressão da mesma. Este efeito de diminuição da expressão imunohistoquímica da NOS em coelhos tratados com linhaça pode representar uma diminuição geral de secreção de proteínas anti e pro-inflamatórias após a diminuição dos níveis séricos de colesterol, contribuindo para a minimização da progressão das lesões associadas a hipercolesterolemia, dentre elas a DMRI.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho a semente de linhaça apresentou ação hipolipemiante, reduzindo os níveis séricos do colesterol total e frações. E por meio da análise imunohistoquímica houve no estudo diminuição da atividade da Óxido Nítrico Sintetase (NOS) estatisticamente significativa secundária a ação hipolipemiante da semente de linhaça através da diminuição do processo inflamatório. Sendo este fato uma evidência dopapel da semente de linhaça na prevenção e diminuição da progressão do processo degenerativo coriorretiniano que ocorre na DMRI.

REFERÊNCIAS

1. Friedman DS, O'Colmain BJ, Muñoz B, Tomany SC, McCarty C,de Jong PTVM, et al.Eye diseases prevalence research group. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States.Arch Ophthalmol. 2004; 122(4):564-72.

2. Ozawa Y, Ishida S, Tsubota K. Age-related macular degeneration (AMD); From pathogenesis and approved therapies to proposed treatments for prevention. Anti-aging Medicine. 2008; 9(5):87

3. Olea, José Luis. Patients with neovascular age-related macular degeneration in Spain display a highcardiovascularrisk. EurJ Ophthalmol. 8 Jul. 2011.

4. Kawa MP, Marlicz W, Machalinski B. Complement system activation and endothelial dysfunction in patients with age-related macular degeneration (AMD): possible relationship between AMD and atherosclerosis.Acta Ophthalmol. 8 Nov. 2011.

5. Bhutto IA, Baba T, Merges C, McLeod DS, Lutty GA. Low nitric oxide synthases (NOSs) in eye with age-related macular degeneration (AMD). Exp Eye Res. V. 90, Jan 2010; 1:155-67.

6. Bierenbaum ML, Reichstein R, Watkins TR. Reducing atherogenic in hyperlipemic humans with flaxseed supplementation: a preliminary report. J Am Coll Nutr. 1993; 12:501-4.

7. Chan JK, Mcdonald BE, Gerrard JM. et al. Effect of dietary alfa – linolenic acid and its ratio to linolenic acid on platet and plasma fatty acid and trombogenisis. Lipids. 1993; 28:811-7.

8. Kris-Entherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. Circulation. 2002; 2:2747-57.

9. Magalhães ME, Brandão AA, Freitas EV. et al. Novas perspectivas no tratamento das dislipidemias.Revista da SOCERJ. 2004; 17(2):105-11.

10. Dodin S, Lemay H, Jacques F, et al. The effects of flaxseed dietary supplement on lipid profile, bone mineral density, and symptoms in menopausal women: a randomized, double-blind, wheat germ placebo-controlled clinical trial. J Clin Endocrinol Metab. 2006; 90(3):1390-97.

11. Torres RJA, Précoma DB, Maia M, Kaiber F, Prim C, Luchini A, Matos RS, Farah ME. Conceitos atuais e perspectivas na prevenção da degeneração macular à idade. Rev Bras Oftalmol. 2008; 67 (3): 142-55

12. Van Leeuwen R, Klaver CC, Vingerling JR, Hofman A, De Jong PTVM. The risk and natural course of age-related maculopathy: follow-up at 6 1/2 years in the Rotterdam study. Arch Ophthalmol. 2003; 121:519-26.

13. Hofman A, Grobbee DE,de Jong PTVM,van den Ouweland FA. Determinants of disease and disability in the elderly. The Rotterdam elderly study. Eur J Epidemiol. 1991; 7:403–22.

14. Thornton J, Edwards R, Mitchell P, Harrison RA, Buchan I, Kelly SP. Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. Eye. 2005; 19:935-44.

15. Neuner B, Wellmann J, Dasch B, Behrens T, Claes B, Dietzel M, et al. Modeling smoking history: a comparison of different approaches in the Mars study on age-related maculopathy. Ann Epidemiol. 2007; 17:615–21.

16. Seddon JM, Ajani UA, Mitchell BD. Familial aggregation of age-related maculopathy. Am J Ophthalmol. 1997; 123:199-206.

17. Klaver CC, Wolfs RC, Assink JJ et al. Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study. Arch Ophthalmol. 2008; 116:1646-5.

18. TomanySC, Cruickshanks KJ, Kein BE, Knudtson MD. Sunlight nd the 10-Year Incidence of Age-Related Maculopathy: The Beaver Dam Eye Study. Arch Ophthalmol. May 2004: 122(5):750-7.

19. Klein R, Klein BEK, TomanySC, Cruickshanks KJ: The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy, The Beaver Dam Eye Study. Ophthalmology. 2003; 110:636-43.

20. Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Spiegelman D, Stampfer M, Willett WC. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow upstudy in the United States. BMJ. 1996; 313:84-90.

21. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Dietary fat intake and the risk of coronary Herat disease in women. N Engl J Med. 1997; 337:491-9.

22. Klein R. Epidemiology. In: Berger JW, Fine SL, Maguire MG, eds. Age-Related Macular Degeneration. St Louis: Mosby, Inc. 1999; 31-55.

23. Mares-Perlman JA, Brady WE, Kelin R, VandenLangenberg GM, Klein BE, Palta M. Dietary fat and age-related maculopathy. Arch Ophthalmol. 1995; 113:743-8.

24. Milam AH, Curcio CA, Cideciyan AV, Saxena S, John SK, Kruth HS, et al. Dominat late-onset retinal degeneration with regional variation of sub-retinal

pigment epithelium deposits, retinal function, and photoreceptor degeneration. Ophthalmology. 2000; 107:2256-66.

25. CurcioCA, Millican CL. Basal linear deposits and large drusen are specific for early age-related maculopathy. Arch Ophthalmol. 1999; 117:.329-39.

26. CurcioCA, Millican CL, Bailey T, Kruth HS. Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001; 42:265-74.

27. Seddon JM, Rosner B, Sperduto RD, Yannuzzi L, Haller JA, Blair NP, et al. Dietary fat and risk for advanced age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol. 2001; 119:1191-9.

28. Goldberg J, Flowerdew G, Smith E, Brody JA, Tso MO. Factors associated with age-related macular degeneration. An analysis of data from the first National Health and Nutrition Examination Survey. Am J Epidemiol. 1998; 128:700-10.

29. Hyman LG, Lilienfeld AM, Ferris FLD, Fine SL. Senile macular degeneration: A case-control study. Am J Epidemiol. 1983; 118:213-27.

30. Vidaurri JS, Pe'er J, Halfon ST, Halperin G, Zauberman H. Association between drusen and some of risk factors for coronary artery disease. Ophthalmologica. 1984; 188:243-7.

31. Vingerling JR, Dielemans I, Bots ML, Hofman A, Grobbee DE, de Jong PT. Age-related macular degeneration is associated with atherosclerosis. The Rotterdam study. Am J Epidemiol. 1995; 142:404-9.

32. Group TEDC-CS. Risk factors for neovascular age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol. 1992; 110:1701-8.

33. Klein R, Klein BE, JensenSC. The relationship of cardiovascular disease and its risk factors to age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. Ophthalmology. 1993; 100:406-14.

34. Miceli MV, Newsome DA, Tate DJ Jr, Sarphie TG. Pathologic changes in the retinal epithelium and Bruch's membrane of fat-fed atherogenic mice. Curr Eye Res. 2000; 20:8-16.

35. Paingen B, Marrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. Atherosclerosis. 1987; 68:231-40.

36. Ong JM, Zorapapel NC, Rich KA, Wagstaff RE, Lambert RW, Rosenberg SE, et al. Effects of cholesterol and apolipoprotein E on retinal abnormalities in ApoE-deficient mice. Invest Ophthalmol Vis Scin. 2001; 42:1891-900.

37. Yücel I, Akar Y, Yücel G, Çiftçioglu MA, Keles N, Aslan M. Effect of hypercholesterolemia on inducible nitric oxide synthase expression in a rat model of elevated intraocular pressure. Vision Research. 2005; 45:1107-14.

38. Triviño A, Ramirez AL, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Padilla E, et al.A colesterol-enriched diet induces ultrastructural changes in retinal and macroglial rabbit cells. Exp Eye Res. 2006; 83:357-66.

39. Braga ADA, Barleta VCN. Alimento Funcional: Uma nova abordagem terapêutica das dislipidemias como prevenção da doença aterosclerótica. Cadernos UniFOA. 2007; 2(3):1-28, 2007.

40. Stabelini NA, Bozza R, Ulbrich AZ et al. Fatores de risco para aterosclerose associados à aptidão cardiorrespiratória e ao IMC em adolescentes. Arq Bras Endocrinol Metab. 2008; 52(6):1024-30.

41. Schoenhagen P, Tuzcu EM. Métodos por imagem da aterosclerose em estudos de progressão/regressão: marcador substituto ou janela direta para o processo patológico da aterosclerose? Arq Bras Cardiol. 2008; 91(6):418-31.

42. Castro PSG, Oliveira FLC. Prevenção da aterosclerose e tratamento medicamentoso de anormalidades lipídicas de alto risco em crianças e adolescentes. J Pediatr (Rio J). 2009; 85(1):6-14.

43. HsuehWA, Jackson S, Law RE. Control of vascular cell proliferation and migration by PPAR-γ.Diabetes Care. 2001; 24(2):392-97.

44. Póvoa LC, Bahia L, Kraemer LG. Dislipidemias e aterogênese-considerações terapêuticas. Revista de Angiologia e Cirurgia Vascular. 2001; 10(1):27-31.

45. Torres RJA, Maia M, Noronha L, Farah ME, Luchini A, Brik D, Muccioli C, Précoma DP. Avaliações das alterações precoces na coróide e esclera ocorridas em coelhos hipercolesrerolêmicos. Estudo histológico e histomorfométrico. Arq. Bras. Oftalmol. São Paulo Jan/Fev 2009; 1(72).

46. Cunanne SC, Hamadeh MJ, Liede AC, et al. Nutritional attributes of traditional flaxseed in healthy young adults. Am J Clin Nutr. 1995 61(1):62-68.

47. Bloedon LT, Szapary PO.Flaxseed and cardiovascular risk.Nutr Rev. 2004; 62(1):18-27.

48. Milder IEJ, Feskens EJM, Arts ICW, et al. Intakes of 4 dietary lignans and all-cause mortality in the Zutphen Elderly Study. Am J Clin Nutr. 2006; 84(2):400-5.

49. ADA Reports. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. Am J Diet Assoc. 2004; 814-26.

50. Kris-Entherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. Circulation. 2002; 106:2747-57.

51. Fang IM, Yang CH, Yang CM, Chen MS. Comparative effects of fatty acids on proinflammatory gene cyclooxygenase 2 and inducible nitricoxidesynthase expression in retinal pigment epithelial cells. Mol Nutr Food Res. Jun 2002; 6(53):739-50.

52. Eye Disease Prevalence Research Group. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. Arch Ophthalmol. 2004; 122:564-72.

53. Gass JDM. Pathogenesis of disciform detachment of the neuroepithelium. III. Senile disciform macular degeneration. Am J Ophthalmol. 1967; 63:617-44.

54. Green WR. Histopathology of age-related macular degeneration. Mol Vis. 1999; 5:27.

55. Sheraidah G, Steinmetz R, Maguire J, Pauleikhoff D, Marshall J, Bird AC. Correlation between lipids extracted from bruch's membrane and age. Ophthalmology. 1993;100:47-51.

56. Delcourt C, Michel F, Colvez A, Lacroux A, Delage M, Vernet MH. Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the POLA study. Ophthalmic Epidemiol. 2001; 8237-49.

57. Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Spiegelman D, Stampfer M, Willett WC. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow upstudy in the United States. BMJ. 1996; 313:84-90.

58. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Dietary fat intake and the risk of coronary Herat disease in women. N Engl J Med. 1997; 337:1491-9.

59. Klein R. Epidemiology. In: Berger JW, Fine SL, Maguire MG, eds. Age-Related Macular Degeneration. St Louis: Mosby, Inc. 1999; 31-55.

60. Milam AH, Curcio CA, Cideciyan AV, Saxena S, John SK, Kruth HS, et al. Dominat late-onset retinal degeneration with regional variation of sub-retinal pigment epithelium deposits, retinal function, and photoreceptor degeneration. Ophthalmology. 2000;107;2256-66.

61. CurcioCA, Millican CL. Basal linear deposits and large drusen are specific for early age-related maculopathy. Arch Ophthalmol. 1999. 117:329-39.

62. Babu US, Mitchel GV, Wiesenfeld P, et al. Nutritional and hematological impact of dietary flaxseed and defatted flaxseed meal in rats. Int J Food Sci Nutr. 2000; 51(2):109-117.

63. Delmas D, Jannin B, Latruffe N. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. Mol Nutr Food Res. 2005; 49(5):377-395.

64. Haper CR, Edwards MJ, DeFillips AP, et al. Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardiprotective (n-3) fatty acids in humans. J Nutr. 2006; 136(1):83-87.

65. Ratnayake WMN, Behrens W, Fischer P. Chemical and nutritional studies of flaxseed (variety Linott) in rats. J Nutr Biochem. 1992; 3(5):232-40.

66. Prasad K, Mantha SV, Munir AD. et al. Reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by CDC – flaxseed with very low alpha – lonolenic acid. Atherosclerosis. 1998; 136:367-75.

67. Prasad K. Effects of flaxseed oil on serum lipids and atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2003; 8(3):227-35.

68. Arjmandi BF, Khan DA, Juma S. et al. Whole flaxseed consumption lowers serum LDL – cholesterol, lipoprotein (a) concentration in postmenopausal women. Nutr Res. 1998; 18(7):1203-14.

69. Van der Schouw YT, Pijpe A, Lebrun CE, et al. Higher usual dietary intake of phytoestrogens is associated with lower aortic stiffness in postmenopausal women.Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002; 22(8):1316-22.

70. Rallidis LS, Paschos G, Liakos GK. et al. Dietary alpha – linolenic acid decreases C – reactive protein, serum amyloid A and interleukin – 6 in dislipidaemic patients. Atherosclerosis. 2003 167(2):237-42.

71. Précoma DB, Noronha L, Moura AV, et al. Radiolesão vascular como efeito deletério da braquiterapia intra-arterial com dose elevada de samário-153 em coelhos hipercolesterolêmicos. Arq Bras Cardiol. 2006; 87(4):512-19.

72. Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. Am J Clin Nutr. 2002; 76(6):1191-201.

73. Neto ORF, Alessi A, Précoma DB et al. Effects of rosiglitazone on contralateral iliac artery after vascular injury in hypercholesterolemic rabbits. Thromb J. 2008; 6:4.

74. Alessi A, Neto ORF, Précoma DB, et. al. Use of rosiglitazone before and after vascular injury in hypercholesterolemic rabbits: Assessment of neointimal formation. Thromb J. 2008; 6:12.

75. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório – criação e experimentação. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz. 2002.

76. Brasil. Procedimento e métodos de eutanásia em animais. Resolução número 714 de 20 de Junho de 2002. Conselho Ferderal de Medicina Veterinária – CFMV – 23 de Outubro de 1968. Disponível em: http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_714.pdf. Data de acesso: 25/11/2010.

77. Ramos Morales EL. La aterosclerosis: algunas consideraciones acerca de su studio experimental: revisión bibliográfica. Rev Cuba Med. 1987; 26:965-70.

78. Boger RH, Bode – Boger SM, Brandes RP. et al. Dietary L – arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol – fed rabbits: comparasion with lovastatin. Circulation. 1997; 96(4):1982-90.

79. Sano J, Shirakura, S, Oda S. et al. Foam cells generated by a combination of hyperglycemia and hyperlipemia in rats. Pathol Int. 2004; 54(12):904-13.

80. Précoma DB, Noronha L, Moura AV et al. Radiolesão vascular como efeito deletério da braquiterapia intra-arterial com dose elevada de samário-153 em coelhos hipercolesterolêmicos. Arq Bras Cardiol. 2006; 87(4):512-519.

81. Zulet MA, Barber A, Garcin, H. et al. Alterations in carbohydrate and lipid metabolism induced by a diet rich in coconut oil and cholesterol in a rat model. J Am Coll Nutr. 1999; 18(1):36-42.

82. Bayindir O, Ozmen D, Mutaf I. et al. Comparasion of the effects of dietary saturated, mono and n-6 polyunsaturated fatty acids on blood lipi profile, oxidant stress, prostanoid synthesis and aortic histology in rabbits. Ann Nutr Metab. 2002; 46:222-8.

83. Bronsgeest – schoute DC, Hermus RJJ, Dallinga – thie GM. et al. Dependence of the effects of dietary cholesterol and experimental conditions on serum lipids in men. Am J Clin Nutr. 1979; 32:2193-97.

84. Kritchevsky D. Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis: a review of the early history. J Nutr. 1995; 125:589S-93S.

85. Jaldin RG, Filho HAF, Sequeira JL. et al. O processo aterosclerótico em artérias de coelhos submetidos a dieta suplementada com gema de ovo: modelo experimental de baixo custo. J Vasc Bras. 2006; 5(4):247-56.

86. Prim, CR, Baroncini LAV,Caron PHL, Winter G, Poletti MOD, Précoma DB. Effects of linseed consumption for a short period of time on lipid profile and atherosclerotic lesions in rabbits fed a hypercholesterolaemic diet. Br J Nutr. May, 2011. Disponível em:<http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FBJN%2FS0007114511003539a.pdf&code=30a41e796b5976fa535dff80e4f96db5>. Acesso em: 30 nov. 2011.

87. Post M, Borts C, Kurts RE. The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after ballon angioplasty. A study in the normal rabbit and hypercholeserolemic Yucatam micropig. Circulation. 1996; 89:2816-2821.

88. Kolodgie PD, Petrov A, Virmani R. et al. Targenting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V: a technique with potential for noninvasise imaging of vulnerable plaque. Circulation. 2003; 108:3134-9.

89. Prasad K. Hypochelesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lihnan complex isolated from flaxseed. Atherosclerosis. 2005; 179:269-275.

90. Shakir KAF, Madhusudhan B. Hypocholesterolemic and hepatoprotective effects of flaxseed chutney: Evidence from animal studies. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2007; 22(1):117-21.

91. Dodin S, CunnaneSC, Mâsse B. et al. Flaxseed on cardiovascular disease marker in healthy menopausal women: a randomized, double – blind, placebo – controlled trial. Nutrition. 2008; 24:23-30.

92. Dupasquier CH, Weber AM, Ander BP. et al. Effects of dietary flaxseed on vascular contractile function and atherosclerosis during prolonged hypercholesterolemia in rabbits. Am J Physiolol Heart Circ Physiolol. 2006; 291:H2987-H2996.

93. Feng D, Shen Y, Chavez ER. Effectiveness of different processing methods in reducing hydrogen cyanide cotent of flaxseed. J Sci Food And Agricult. 2003; 83(8):836-841.

94. Prasad K. Reduction of serum cholesterol and hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed. Circulation. 1999; 99:1355-62.

95. Prasad K. Dietary flaxseed in prevention of hypercholesterolemic atherosclerosis. Atherosclerosis. 1997; 132:69-76.

96. Tarpila S, Aro A, Salminen I. et al. The effect of flaxseed supplementation in processed foods on serum fatty acids on enterolactone. European Journal of Clinical Nutrition. 2002; 56:157-65.

97. Lucas EA, Lightfoot SA, Hammond LJ. et al. Flaxseed redeuces plasma cholesterol and atherosclerotic lesion formation in ovariectomized Golden Syrian Hamsters. Atherosclerosis. 2004.173:223-229.

98. Kitts DD, Yuan YV, Wijewickreme AN. et al. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignans metabolites enterodiol and enterolactone. Mol Cell Biochem. 1999; 202:91-100.

99. Foti M, Piatelli M, Baratta MT. Flavonoids, coumatism, and cianamic acids as antioxidants in micellar system: structure activity relationship. J Agric Food Chem. 1996; 44:497-501.

100. Ruberfroid M. Dietary fiber, inulin and oligofrutose: a revewcomparing their phisiological efects. Crit Rev Food Sci Nutr. 1993; 33(6):1303-48.

101. Sawashita N, Naemura A, Shimizu M. et al. Effect of dietary vegetable and animal proteins on atherothrombosis in mice. Nutrition. 2006; 22:661-7.

102. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation. 2002; 106:3143-421.

103. López G, Ros G, Rincón F. et al. Propriedades funcionales de la fibra dietética: mecanismos de acción en el tracto gastrointestinal. Arch Lat Am Nutr. 1997; 47(3):203-6.

104. Dodin S, CunnaneSC, Mâsse B. et al. Flaxseed on cardiovascular disease marker in healthy menopausal women: a randomized, double – blind, placebo – controlled trial. Nutrition. 2008; 24:23-30.

105. Kim M, Shin HK. The water – soluble extract of chicory influences serum and liver lipid concentration and fecal lipid excretion in rats. J Nutr. 1998; 128(1):1731-6.

106. Zagarra IGE, Schwarz EE. Impact of dietary patterns and intervensions on cardiovascular health. Circulation. 2006; 114:961-73.

107. Caterina R, Liao JK, Libby P. Fatty acid modulation of endothelia activation. Am J Clin Nutr. Suppl 7 2000; 213S-23S.

108. Achtani C, Awtabe A, Vasisht S. et al. Effect of max EPA (fish oil) on lipoprotein and its receptors in hypercholesterolemic rabbits. Mol Biol Int. 1995; 37:489-98.

109. Yano T, Mizuguchi K, Takasugi, K. et al. Effects of ethyl all – cis, 5,8,11,14,17 – ecosapentaenoate on low density lipoprotein in rabbits. Yakugaku Zasshi 1995; 115(10):843-51.

110. Lee P, Prasad K. Effects of flaxseed oil on serum lipids and atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2003; 8(3):227-35.

111. Prasad K. Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside – derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol, and enterolactone. Int Angiol. 2000; 9:220-5.

112. VelasquezMT, Bathena SJ. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. Am J Clin Nutr. 2002; 76:1191-201.

113. Prasad K, Mantha SV, Munir AD. et al. Reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by CDC – flaxseed with very low alpha – lonolenic acid. Atherosclerosis. 1998; 136:367-75.

114. Prasad K. Antihypertensive activity of secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed: role of guanylate cyclase. Int J Angiol. 2004; 13:7-14.

115. Gimborne MA. Vascular endoothelium: an integrator of pathophysiologic stimulti in atherosclerosis. Am J Cardiol. 1995; 75:67B-70B.

116. Yang Y, Loscalzo J. Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. Circulation. 2000; 101:2144-148.

117. GebauerSK, Psota TL, Harris WS. et al. n-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. Am J Clin Nutr. 2006; 83:1526S-1535S.

118. Brown AA, Hu FB. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascukar disease. Am J Clin Nutr. 2001; 73:673-86.

119. Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF. et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). Lancet. 1989; 2:757-61.

120. Allman MA, Pena MM, Pang D. Supplementation with flaxseed oil versus sunfloweseed oil in healthy young men consuming a low fat diet: effects on platelet composition and fuction. Eur J Clin Nutr. 1995; 49:169-78.

ANEXO A– PARECER DE PROTOCOLO E PESQUISA DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA PUC-PR.

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais
PUCPR

Curitiba, 08 de dezembro de 2011.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 681 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Efeitos da linhaça na Coreóide e retina de coelhos submetidos a dieta hipercolesterolêmica

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dalton Bertolim Précoma

EQUIPE DE PESQUISA:

Dalton Bertolim Précoma, Alessandro Soares Both

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CENTRO / CURSO:

CCBS / Medicina

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Coelhos				

OBS: As peças anatômicas (globos oculares) utilizadas neste Projeto foram coletadas e conservadas durante o Projeto de Parecer nº 449 submetido e aprovado por este Comitê.

O colegiado do CEUA em reunião no dia 08/12/2011, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO.**

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA
PUCPR

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

Profª Gracinda Maria D´Almeida e Oliveira
Coordenadora Adjunta
Comitê de Ética no Uso de Animais