

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
CENTRO BIOLÓGICO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**CAMILA RODRIGUES PRIM**

**A SEMENTE DE LINHAÇA NA ATEROGÊNESE EM COELHOS SUBMETIDOS À DIETA  
HIPERCOLESTEROLÊMICA – ANÁLISE ANATOMOHISTOLÓGICA E  
IMUNOHISTOQUÍMICA**

CURITIBA  
2008

**CAMILA RODRIGUES PRIM**

**A SEMENTE DE LINHAÇA NA ATEROGÊNESE EM COELHOS SUBMETIDOS À DIETA  
HIPERCOLESTEROLÊMICA – ANÁLISE ANATOMOHISTOLÓGICA E  
IMUNOHISTOQUÍMICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Dalton Bertolim  
Précoma

CURITIBA  
2008

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Rodrigues Prim

A semente de linhaça na aterogênese em coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica – Análise anatomohistológica e imunohistoquímica.

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

Banca examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Curitiba, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008.

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus queridos pais, Maurino e Eliane, que sempre me confortaram com  
palavras doces e sábias;  
Ao meu querido irmão, Lucas, que alegria e abrilhanta, com seu jeito criança de ser,  
os dias de minha vida;  
Ao meu amado, Maxwell, pela cumplicidade e incentivo nas minhas buscas pessoais  
e profissionais.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado pertinência, determinação, a dádiva da pesquisa e por iluminar os momentos mais frágeis de minha vida, fazendo com que eu não desistisse da caminhada;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Dalton Bertolim Précoma, pelas suas palavras amigas, ajuda, incentivo, determinação e confiabilidade;

Aos meus pais, Maurino e Eliane, pelo senso de compaixão, crença no meu potencial acadêmico e humano e, principalmente, pela otimização nas minhas convicções pessoais e profissionais;

Ao meu irmão, Lucas, pelo afeto e suavemente – na sua puerilidade – pelo jeito carinhoso da seguinte máxima: “Maninha,” falta pouco. Esse acalento me deu força para não desistir;

Ao meu noivo, Maxwell, mesmo na distância, acreditou que potencial e determinação são características inerentes a mim. Além, é claro, das palavras de acalento que fizeram – com que mesmo na adversidade – eu me doasse “de corpo e alma” ao meu objetivo maior: o estudo científico desse trabalho;

Ao Dr. Ruy Fernando Kuenzer Caetano da Silva, que com sua competência cirúrgica e dedicação, auxiliou-me na execução de uma parte fundamental do trabalho;

À Prof. Dra. Lúcia de Noronha, responsável pelo laboratório de patologia experimental, pela estimável contribuição no desenho do estudo e nas leituras histológicas;

À Camila, Marina, Ana e Maria Fernanda, funcionárias do laboratório de patologia experimental da PUCPR, pela ajuda incondicional, pela atenção e companheirismo;

Aos acadêmicos: Alexandra Moro Caporal, Cristiane Campos, Leonardo Précoma, Mariane Vargas Basso pelo importante auxílio em diversas etapas do estudo;

À minha amiga Rossane S. Mattos, pela compreensão de minha ausência no ambiente de trabalho, pelas palavras amigas e pela inestimável ajuda na fase experimental do estudo.

## RESUMO

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem a principal causa de mortalidade no mundo. O Brasil acompanha esse fenômeno internacional apresentando estatísticas com valores percentuais em torno de 25%, sendo responsáveis por cerca de 250.000 mortes ao ano. Dentre as mortes por DCV, a doença aterosclerótica coronariana foi a segunda causa, correspondendo a 31% do total. Apesar dos avanços da cardiologia, novas abordagens para prevenir a progressão da aterosclerose e suas conseqüências como o infarto agudo do miocárdio são necessárias. Evidências clínicas enfatizam que a adoção de medidas de prevenção são medidas satisfatórias para minimizar e prevenir os eventos coronarianos. A semente de linhaça contém substâncias biologicamente ativas, como a lignana, as fibras e o ácido graxo linolênico, as quais apresentam efeitos cardioprotetores. O presente estudo teve como objetivo avaliar os potenciais efeitos hipolipêmicos, anti-aterogênicos e antiinflamatórios da semente de linhaça em um modelo experimental com coelhos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica a 1% de colesterol. Para a realização do experimento, que teve duração de 8 semanas foram utilizados 20 coelhos machos da linhagem *New Zeland*. Os animais foram randomizados aleatoriamente em 2 grupos, com 10 animais em cada grupo, conforme o tratamento dietético recebido. O grupo G1 (controle) e o grupo G2 (estudo) receberam durante todo o período de experimentação a dieta padrão Nuvilab® acrescida a 1% de colesterol proveniente do ovo liofilizado. A partir da 5ª até a 8ª semana foi adicionado na dieta hipercolesterolêmica do grupo G2 8g/kg de peso/coelho de semente de linhaça triturada, totalizando em média 30 g/dia. Foram coletadas amostras de sangue no momento inicial e no final para dosagens de colesterol total, LDL – C, HDL – C e triglicérides. Os animais foram levados à eutanásia no quinquagésimo sexto dia para a remoção da aorta descendente e do arco aórtico. Os segmentos aórticos foram encaminhados para a análise histológica quantitativa e qualitativa e para análise imunohistoquímica. O ganho de peso corporal dos coelhos suplementados com semente de linhaça foi significativamente menor ( $p < 0,01$ ). A inclusão da semente promoveu também uma redução significativa nos níveis séricos de colesterol total (1676,70 mg/dl vs 1006,83 mg/dl) e de LDL – C (1596,12 mg/dl vs 1074,32 mg/dl). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os graus de lesões ateroscleróticas entre os grupos. Afinal, a maioria dos animais apresentaram lesões grau III. Não foram encontradas evidências estatísticas para a área da camada íntima e razão íntima/média dos segmentos aórticos em ambos os grupos. A concentração de VCAM – 1 e ICAM – 2 não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Conclusão: A administração da semente de linhaça apresentou ação hipolipemiante, porém não atuou na prevenção da aterogênese.

Palavras-chave: Doenças cardiovasculares. Alimentos funcionais. Semente de linhaça.

## ABSTRACT

Cardiovascular illnesses (CVD) constitute the main cause of mortality in the world. Brazil has the same international phenomenon presenting prevalence of 25%, being responsible for about 250.000 deaths to the year. Amongst the deaths for CVD, the coronary artery disease was the second cause, corresponding 31% of the total. Although the advances in cardiology, new boarding to prevent the progression of atherosclerosis and its consequences as acute myocardial infarction of the myocardium are necessary. Clinical evidences emphasize that the adoption of measures of prevention is measured satisfactory to minimize and to prevent the coronary events. The flaxseed contains active biologic substances as the lignan, the staple fibers and acid the greasy linolenic which present cardio protective effects. This study aimed to evaluate the potential effects hypolipidemic, antiatherogenic and anti-inflammatory effect of the flaxseed in an experimental model with rabbits submitted to a hypercholesterolemic diet to 1% of cholesterol. To carry out the experiment, which lasted from 8 weeks were used 20 rabbits male lineage of New Zealand. The animals were randomized into 2 groups randomly, with 10 animals in each group, as a dietary received. The G1 (control) and G2 (study) received during the whole period of testing the standard diet Nuvilab® increased to 1% of cholesterol from the egg freeze-dried. From the 5th to 8th week was added in hypercholesterolemic diet of G2 8g/kg weight/rabbit of flaxseed ground, totaling on average 30 grams/day. Blood samples were collected at the time the initial and final determinations for total cholesterol, LDL - C, HDL - C and triglycerides. The animals were taken to euthanasia in the sixth fiftieth day for the removal of the descending aortic and the aortic arch. The aortic segments were transported to the histological analysis and quantitative and qualitative analysis to immunohistochemistry. The gain in body weight of rabbits fed with flaxseed was significantly lower ( $p < 0.01$ ). The inclusion of flaxseed also promoted a significant reduction in serum levels of total cholesterol (1676, 70 mg / dl vs 1006.83 mg / dl) and LDL - C (1596.12 mg / dl vs 1074.32 mg / dl). There was no statistically significant differences between the degrees of atherosclerotic lesions between the groups. After all, most animals showed grade III injuries. There were no statistical evidence to the litter close and intimate reason / average of aortic segments in both groups. The concentration of VCAM - 1 and ICAM - 2 showed no statistically significant differences between groups. Conclusion: The administration of seed linseed presented hypolipidemic action, but not acted on prevention of atherogenesis.

Keywords: Cardiovascular illnesses. Functional foods. Flaxseed.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Esquema representativo da oxidação do enterodiol a enterolactona..	21
Figura 02 – Mecanismo de ação das fibras dietéticas.....	25
Figura 03 – Caixa que auxilia no procedimento anestésico dos animais.....	33
Figura 04 – Localização da artéria descendente para remoção.....	34
Figura 05 – Artéria descendente removida do animal.....	35
Figura 06 – Imagem representativa de um quadrante de leitura da artéria descendente do animal analisado.....	38
Figura 07 – Pinças do tipo punch.....	39
Figura 08 – Mapa que orienta a confecção do bloco receptor.....	40
Figura 09 – Mapa em plano cartesiano do TMA controle.....	41
Figura 10 – Peso dos animais do grupo controle e do grupo estudo aferidos.....	45
Figura 11 – Concentração plasmática de colesterol total observada no grupo controle e no grupo estudo.....	46
Figura 12 – Concentração plasmática de LDL – C observada no grupo controle e no grupo estudo.....	47
Figura 13 - Concentração plasmática de HDL – C observada no grupo controle e no grupo estudo.....	48
Figura 14 - Concentração plasmática de TGL observada no grupo controle e no grupo estudo.....	49
Figura 15 – Grau de lesão aterosclerótica na aorta descendente dos coelhos estudados.....	50
Figura 16 – Cortes histológicos da aorta descendente dos animais estudados.....	51
Figura 17 – Área da camada íntima da aorta descendente dos grupos estudados..	52
Figura 18 – Área da camada média da aorta descendente dos grupos estudados..	52
Figura 19 – Razão Íntima / Média da aorta descendente dos grupos estudados.....	53
Figura 20 – Área da camada íntima do arco aórtico dos grupos estudados.....	53
Figura 21 - Razão Íntima / Média do arco aórtico dos grupos estudados.....	54
Figura 22 – Área da camada média do arco aórtico dos grupos estudados.....	54
Figura 23 – Área da camada íntima da aorta descendente positiva para VCAM nos grupos estudados.....	56

Figura 24 – Área da camada íntima do arco aórtico positiva para VCAM nos grupos estudados.....	57
Figura 25 – Área da camada íntima da aorta descendente positiva para ICAM nos grupos estudados.....	57
Figura 26 – Área da camada íntima do arco aórtico positiva para ICAM nos grupos estudados.....	58
Figura 27 – Desenvolvimento do estresse oxidativo da placa aterosclerótica.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Demonstrativo do delineamento experimental.....	29
Tabela 02 – Grau de lesão aterosclerótica de acordo com os critérios classificatórios.....	37
Tabela 03 – Peso médio dos animais em diferentes momentos de aferições.....	44
Tabela 04 – Valores médios, medianos, mínimos e máximos para colesterol total nos grupos estudados.....	46
Tabela 05 – Análise dos valores médios de LDL – C nos grupos estudados.....	47
Tabela 06 – Valores médios, medianos, mínimos e máximos para TG dos grupos estudados.....	49
Tabela 07 – Valores médios, mínimos e máximos das áreas da camada média, da camada íntima e da razão íntima média dos grupos estudados.....	55
Tabela 08 – Valores médios, medianos, mínimos, máximos e desvio padrão da presença de VCAM e ICAM nos segmentos aórticos estudados.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAT	Acil – CoA colesterol aciltransferase
ALA	Ácido alfa linolênico
CT	Colesterol total
DAB	Dakocytomation
DCV	Doença cardiovascular
DHA	Docosaheptaenóico
DART	Diet and Reinfarction Trial
EPA	Eicosapentaenóico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FOSHU	Foods for Specified Health Use
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina – eosina
HMGA	Ácido hidroximetilglutárico
ICAM – 1	Molécula de adesão intercelular
IMC	Índice de massa corporal
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade
LDL – OX	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LNA	Ácido graxo alfa linolênico
MDA	Malondialdeído
MCP 1	Proteína de quimioatração dos monócitos
NECEP	Third Report of the National Cholesterol Education Program
NO	Óxido Nítrico
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
PUFAS	Ácidos graxos poliinsaturados
PVPI	Polivinil pirrolidona iodo
SGD	Secoisolariciresinol
TG	Triglicerídeos
TMA	Tissue Microarray
VCAM – 1	Molécula de adesão celular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBEJTIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
3.1 O PROCESSO ATEROGÊNICO.....	17
3.2 ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	19
3.3 SEMENTE DE LINHAÇA: SEUS NUTRIENTES E COMPONENTES BIOATIVOS.....	20
<b>3.3.1 Lignanas e suas propriedades funcionais</b> .....	21
<b>3.3.2 Fibras e suas propriedades funcionais</b> .....	23
<b>3.3.3 Ácido alfa linolênico e suas propriedades</b> .....	25
<b>4 MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	28
4.1 MATERIAIS.....	28
4.2 METODOLOGIA.....	28
<b>4.2.1 Delineamento experimental</b> .....	28
<b>4.2.2 Desenho do estudo</b> .....	30
<b>4.2.3 Ambiente de Experimentação</b> .....	31
<b>4.2.4 Animais Utilizados</b> .....	31
<b>4.2.5 Preparo da Ração Suplementar</b> .....	31
<b>4.2.6 Aferições</b> .....	32
<b>4.2.7 Normas Adotadas</b> .....	32
4.3 COLETA DE AMOSTRAS.....	32
<b>4.3.1 Sangue</b> .....	32
<b>4.3.2 Remoção das Artérias</b> .....	33
4.4 AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS.....	35
<b>4.4.1 Preparo das amostras</b> .....	35
<b>4.4.2 Análise histológica qualitativa</b> .....	36
<b>4.4.3 Análise Morfométrica quantitativa</b> .....	37
<b>4.4.4 Análise Imunohistoquímica</b> .....	48

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
<b>5 RESULTADOS</b> .....	44
5.1 PESO DOS ANIMAIS.....	44
5.2 VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS.....	45
5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	50
5.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	51
5.5 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	55
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	59
6.1 DIETAS HIPERCOLESTEROLÊMICAS E MODELOS EXPERIMENTAIS.....	59
6.2 CONSUMO ALIMENTAR E GANHO DE PESO PONDERAL.....	61
6.3 EFEITO AS SEMENTE DE LINHAÇA NAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS ANALISADAS.....	63
6.4 EFEITO DA SEMENTE DE LINHAÇA NA PREVENÇÃO DA LESÃO ATEROSCLERÓTICA.....	68
6.5 EFEITO DA SEMENTE DE LINHAÇA NO PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	73
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	77
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	78
<b>ANEXOS</b> .....	89
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA PUCPR.....	90

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem a principal causa de mortalidade no mundo. O Brasil acompanha esse fenômeno internacional apresentando estatísticas com valores percentuais em torno de 25%, sendo responsáveis por cerca de 250.000 mortes ao ano<sup>1</sup>.

Dentre as mortes por DCV, a doença aterosclerótica coronariana foi a segunda causa mais freqüente correspondendo a 31% do total<sup>1</sup>. E, pelo que indicam as tendências epidemiológicas, as morbidades cardiovasculares terão um acréscimo em todos os países preferencialmente nos países em desenvolvimento.

Estudos epidemiológicos evidenciam que há uma correlação positiva entre a exposição aos fatores de risco modificáveis como obesidade, dislipidemia, tabagismo, sedentarismo e resistência insulínica com a etiologia do processo aterosclerótico<sup>2</sup>. Fornés et al (2002)<sup>3</sup> complementam que os hábitos alimentares apresentam-se como marcadores de risco para doenças cardiovasculares, na medida em que o consumo elevado de colesterol, lipídios e ácidos graxos saturados somados ao baixo consumo de fibras, participam na etiologia das dislipidemias.

Uma questão crítica emerge destas considerações: quais passos na cascata de eventos que levam à formação da placa de ateroma deveriam ser abordados para inibir a aterosclerose? Informações de estudos clínicos indicam que a redução do LDL (lipoproteína de baixa densidade) colesterol (LDL - C) tem um impacto maior na redução do acidente vascular cerebral, do infarto do miocárdio e da mortalidade cardiovascular. Ensaios clínicos, com modelos experimentais, demonstraram que a inclusão de alimentos funcionais na dieta promove melhoras nos fatores de riscos vinculados às doenças cardiovasculares como as hipercolesterolêmicas<sup>4,5,6</sup>.

É indiscutível a importância do controle dos fatores de risco cardiovasculares. Mas, também, é uma realidade a existência de dificuldades em manejar pacientes dislipidêmicos, hipertensos, obesos, diabéticos e tabagistas. Diante da escassez de perspectivas futuras para o melhor controle destes fatores de risco, a utilização de substâncias que retardem a progressão da doença aterosclerótica mesmo na presença de fatores de risco pode ser uma ferramenta promissora na prevenção e tratamento das DCV.

Apesar dos avanços da cardiologia, novas abordagens para prevenir a progressão da aterosclerose e suas conseqüências como o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral são necessárias. Evidências clínicas enfatizam que a adoção de medidas de prevenção, através da prescrição e do consumo regular de alimentos funcionais, são medidas satisfatórias para minimizar e prevenir os eventos coronarianos<sup>5</sup>.

A semente de linhaça é considerada um alimento funcional por conter substâncias biologicamente ativas como a lignana, as fibras e o ácido graxo linolênico os quais apresentam efeitos cardioprotetores<sup>7,8,9,10,11</sup>.

Este trabalho tem como objetivo demonstrar os benefícios da utilização da semente de linhaça na prevenção e no tratamento das morbidades cardiovasculares, das quais faz parte o processo aterogênico. Assim como também, pretende-se avaliar a efetividade da inclusão desse alimento funcional em protocolos clínicos preventivos das cardiopatias.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é avaliar os potenciais efeitos na aterogênese da semente de linhaça em um modelo experimental com coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica a 1%.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- \* Verificar o perfil bioquímico dos dois grupos de coelhos que receberam a dieta hipercolesterolêmica acrescida ou não com semente de linhaça.
- \* Avaliar histologicamente e imunohistoquimicamente a placa aterosclerótica dos dois grupos estudados.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O PROCESSO ATEROGÊNICO

A aterosclerose é uma doença multifatorial que se desenvolve ao longo de muitos anos, a qual é resultante de uma cascata de eventos envolvendo a interação entre células circulantes e substâncias na parede vascular. O primeiro passo desta cascata envolve o dano ao endotélio causado pelos fatores de risco cardiovasculares tradicionais como o diabetes, a hipertensão e a dislipidemia, sendo o excesso de LDL - C e de radicais livres, as maiores causas de injúria endotelial<sup>12,13</sup>.

O dano endotelial resulta em uma menor produção de óxido nítrico, o qual, em situações fisiológicas normais, é responsável pela inibição da inflamação, da trombose e do crescimento e proliferação das células musculares lisas. Outra manifestação de agressão ao endotélio é a expressão de moléculas de adesão celular: molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1). O VCAM-1 promove a adesão de monócitos, macrófagos e plaquetas circulantes<sup>14, 15</sup>.

Desta forma, tem início uma reação inflamatória, ao mesmo tempo em que são produzidas citocinas como a proteína de quimioatração dos monócitos-1 (MCP-1), que dirige a migração dos monócitos e macrófagos para a parede vascular. O LDL - C é congregado à íntima, a qual consiste na parte da parede vascular mais próxima da corrente sanguínea, sendo fagocitado pelos macrófagos para formar as células espumosas, as *foam cells*<sup>14, 15</sup>.

A fagocitose é marcadamente aumentada quando o LDL - C é oxidado pelo superóxido, produzido pelos leucócitos. As células espumosas saturadas de lipídeos se rompem na parede vascular para formar as estrias gordurosas, responsáveis pela desconfiguração do vaso. As células musculares lisas migram da média para a íntima, onde proliferam e formam uma neoíntima com aumento da produção da matriz extracelular, levando ao desenvolvimento de uma placa aterosclerótica organizada<sup>14, 15</sup>.

Considera-se que estas mudanças das células musculares lisas constituam um evento tardio no processo aterosclerótico. Entretanto, evidências recentes sugerem que a formação precoce da neointima pode contribuir para o aumento do processo inflamatório e trombótico, levando a aterosclerose na parede vascular <sup>16</sup>.

As lesões ateroscleróticas podem ser classificadas inicialmente como lesões tipo I, II e III. As lesões do tipo I e II representam pequenos depósitos lipídicos na íntima arterial sendo que o tipo II inclui as lesões designadas como estrias gordurosas. O tipo III representa o estágio que liga o tipo II às lesões avançadas. O termo lesão precoce é algumas vezes utilizado para os tipos I e II. As distinções que separam os tipos de lesões são baseadas em características morfológicas consistentes, as quais indicam que cada lesão pode estabilizar temporariamente ou permanentemente e que a progressão para o próximo estágio pode necessitar de um estímulo adicional. As características morfológicas de cada lesão e o tempo no qual cada uma tende a aparecer e predominar no curso da vida humana constitui forte evidência presuntiva de que os tipos I, II e III são estágios sucessivos no desenvolvimento da aterosclerose <sup>17, 18</sup>.

Já as lesões ateroscleróticas avançadas podem ser classificadas em níveis IV, V e VI. Nas lesões do tipo IV, que já pode ser conhecido como ateroma, um denso acúmulo de lipídios extracelulares ocupa uma região extensa, mas bem definida da íntima. O tipo IV é a primeira lesão considerada avançada nesta classificação devido à severa desorganização da íntima causada pelo núcleo lipídico. Quando esta cobertura do núcleo lipídico posteriormente tem um aumento no tecido fibroso (principalmente colágeno), a lesão é então denominada tipo V. É importante salientar que as lesões dos tipos IV e V são indiscriminadamente chamadas placas fibrosas <sup>17, 18</sup>.

### 3.2 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O termo alimentos funcionais foi inicialmente introduzido pelo governo do Japão em meados dos anos 1980, como resultado de esforços para desenvolver alimentos que possibilitassem a redução de gastos na saúde pública, uma vez que a população japonesa envelhecia e apresentavam uma grande expectativa de vida <sup>19</sup>.

O princípio de conceito de alimentos funcionais foi adotado mundialmente. Após períodos de trabalhos, no ano de 1991, essa categoria alimentar foi regulamentada recebendo a denominação de FOSHU "*Foods for Specified Health Use*" <sup>20</sup>. A tradução da expressão para o português é de alimentos funcionais ou nutracêuticos.

Alimento funcional é aquele semelhante em aparência ao alimento convencional, consumido normalmente, capaz de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos desejáveis na manutenção da saúde. Adicionalmente as suas funções nutricionais, como fonte de energia e de substrato para a formação de células e tecidos, possui, em sua composição, uma ou mais substâncias capazes de agir no sentido de modular os processos metabólicos. Estes atuam melhorando as condições de saúde, prevenindo o aparecimento precoce de doenças degenerativas, que levam a uma diminuição da longevidade <sup>21</sup>.

Como um grande número de alimentos funcionais tem sido introduzido no mercado internacional, suas afirmações de serem benéficos para a saúde podem desafiar o limite tradicional entre alimento e medicina. Assim, as regulamentações do conceito de alimentos funcionais têm sido examinadas baseadas em conceitos internacionais. E, é geralmente aceito que estes alimentos devem fornecer benefícios à saúde além de seus valores nutricionais normais dentro do modelo dietético diário <sup>22</sup>.

Em virtude do seu efeito preventivo de doenças crônicas não transmissíveis, os alimentos com propriedades funcionais exercem um grande papel na economia. Os principais mercados para alimentos funcionais hoje são o Japão, os Estados Unidos e a Europa. Estima-se que o mercado mundial de alimentos funcionais movimentou, em 2005, em torno de US\$ 60 bilhões na Europa, Japão e Estados Unidos — só neste último ele representou US\$ 15 bilhões <sup>23</sup>.

É de extrema importância salientar que a legislação brasileira não define alimento funcional. E, sim define alegação funcional de propriedade funcional e alegação de propriedade de saúde e estabelece diretrizes para sua utilização, bem como as condições de registro para os alimentos com alegação de propriedade funcional <sup>24</sup>.

### 3.3 SEMENTE DE LINHAÇA: SEUS NUTRIENTES E COMPONENTES BIOATIVOS

Na classe alimentar encontramos diversos componentes com propriedades funcionais. A semente de linhaça (*Linum usitatissimum*) apresenta um grande enfoque na prática clínica, principalmente na linha de prevenção de doenças cardiovasculares, por conter três constituintes funcionais: fitoestrógenos (lignanas), fibra solúvel e ácido  $\alpha$  - linolênico (ômega-3) <sup>5</sup>, sendo então recomendada como um potente alimento funcional pela *American Heart Association* <sup>9</sup>.

De origem asiática, a semente de linhaça pertence à família das *Lináceas* e é obtida a partir do linho, uma das plantas mais antigas da história. Podem-se encontrar duas variedades básicas de semente: a marrom e a dourada. Porém, não existem diferenças nutricionais na composição dos dois tipos não interferindo assim no seu potencial efeito funcional. A diferença existente é que a semente de linhaça marrom é cultivada em regiões de clima quente e úmido enquanto que a dourada é plantada em regiões frias <sup>25</sup>.

A produção mundial de semente de linhaça se encontra entre 2.300.000 e 2.500.000 toneladas anuais, sendo o Canadá o principal produtor. Na América do Sul, o maior produtor é a Argentina, com cerca de 80 toneladas/ano. O Brasil apresenta uma baixa produção, cerca de 20 toneladas/ano <sup>26</sup>.

Na composição nutricional, a semente de linhaça 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  $\alpha$  -linolênicos, caracterizando-a como oleaginosa com maior concentração desse composto. Em uma colher de sopa de semente de linhaça, encontra-se 8,8 mg de secoisolariciresinol (SGD) <sup>5</sup>.

### 3.3.1 Lignanas e suas propriedades funcionais

A semente de linhaça contém uma elevada concentração fitoestrógenos, denotados pelas lignanas. Os fitoestrógenos são substâncias encontradas nas plantas que apresentam uma estrutura química semelhante ao estradiol endógeno. Dessa forma, eles se ligam aos receptores estrogênicos podendo desempenhar efeitos estrogênicos ou anti – estrogênicos, executando funções fisiológicas semelhantes ao estradiol <sup>27</sup>.

As lignanas vegetais, encontradas na semente, na forma de secoisolariciresinol, são compostos fenólicos, cuja ligação com o carboidrato é removida pelas bactérias intestinais  $\beta$ - glucosidases, resultando em enterodiol e enterolactona (figura 01), compostos lignânicos bioativos em seres humanos. Esses são absorvidos no cólon intestinal e conjugados no fígado. Os compostos conjugados são excretados na urina e na bile, podendo ser reabsorvidos pela circulação enterohepática <sup>5, 27</sup>.

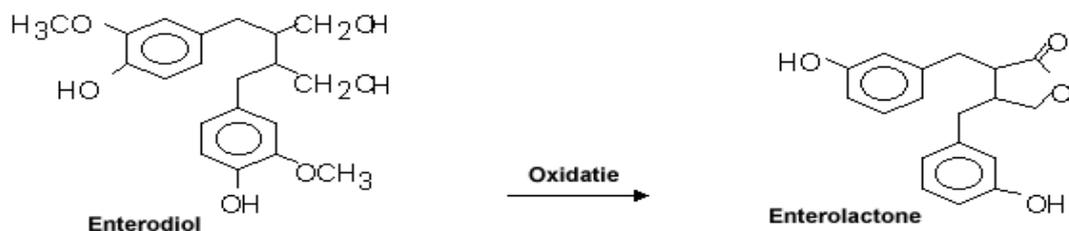


Figura 01 – Esquema representativo da oxidação do enterodiol a enterolactona.  
Fonte: Velasquez & Bathena (2002) <sup>27</sup>.

Os compostos lignânicos, quando ingeridos, são capazes de promover reduções nos níveis séricos de colesterol plasmático, conforme reportado por vários autores. Ratnayake et al (1992) <sup>28</sup>, evidenciaram, em estudo experimental, uma redução nos níveis de colesterol total e LDL – C, em filhotes de ratos alimentados com dieta enriquecida com semente de linhaça por 90 dias quando comparados com o grupo controle. Em estudo randomizado, duplo – cego realizado com 38 mulheres

hipercolesterolêmicas 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%)<sup>29</sup>.

Os mecanismos pelos quais as lignanas são responsáveis pela redução dos níveis séricos de colesterol ainda não estão completamente elucidados na literatura. Há evidências de que os fitoestrógenos são responsáveis pelo aumento da degradação e depuração de colesterol através do aumento da secreção biliar e inibição da síntese de colesterol endógeno. Dessa forma, há um melhor aproveitamento do colesterol dietético<sup>5</sup>.

Por outro lado, há relatos de que as lignanas são capazes de modular enzimas, como acil-CoA colesterol aciltransferase (ACAT) e 7-alfa-hidroxilase ambas envolvidas no metabolismo do colesterol<sup>8</sup>.

Em condições fisiológicas normais, o colesterol ao ser absorvido, sofre nos enterócitos uma reesterificação pela ACAT resultando em ésteres de colesterol, os quais são incorporados ao quilomícron. Esse atinge os vasos linfáticos e posteriormente os vasos sangüíneos. Porém, os fitoesteróis presentes na semente de linhaça, apresentam uma similaridade química com o colesterol. Assim, depois de ingeridos, os fitoestrógenos competem com os receptores intestinais da enzima ACAT impedindo a sua ligação com o colesterol, o que prejudica a sua absorção em nível intestinal<sup>10</sup>.

Outro processo bioquímico envolvido no metabolismo do colesterol é a atuação da enzima 7-alfa-hidroxilase, responsável pela degradação do colesterol em ácidos biliares. Com a presença de lignanas, há um aumento nessa atividade enzimática, aumentando a formação e excreção de bile, e conseqüentemente reduzindo os níveis de colesterol armazenados nos hepatócitos. Como resultado desse processo, há um aumento dos receptores da LDL – C, com conseqüente redução de colesterol sangüíneo<sup>10</sup>.

Há relatos na literatura científica de que o SDG, o enterodiol e a enterolactona, apresentam propriedades antioxidantes, por inibirem a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS), assim como, também apresentam efeitos antagônicos à agregação plaquetária. Ao inibir a peroxidação, ocorre uma redução na oxidação da LDL – C, lipoproteína vinculada com a etiologia da aterogênese<sup>27</sup>.

Prasad (1999)<sup>30</sup>, evidenciou, em estudo experimental realizado em coelhos, que a adição de 15mg/Kg de SDG por 8 semanas na dieta aterôgena dos animais, foi responsável pela redução do colesterol total e LDL – C em 33% e 35%, respectivamente. Ao avaliar a extensão da placa aterôgena nos coelhos, o autor observou que os animais tratados com SDG apresentavam lesões ateroscleróticas menores e um déficit na peroxidação lipídica quando comparados com os grupos não tratados.

Na literatura científica há muitos estudos enfatizando os efeitos cardioprotetores da semente de linhaça. Porém, a quantidade a ser prescrita para desempenhar o seu efeito terapêutico é um dado ainda não padronizado na comunidade científica. Bierenbaum et al (1993)<sup>7</sup> reportaram, em estudo clínico, que a oferta de 50 g/dia de semente de linhaça promoveu alterações no perfil lipídico dos pacientes que receberam o grão durante quatro semanas. No que se refere a concentração de colesterol total houve uma redução de 9% enquanto que para LDL – C foi de 18%. Já Cunnane et al (1995)<sup>4</sup> encontraram uma redução de 8% na concentração de LDL – C nos pacientes que receberam 50 gramas/dia de semente de linhaça. E, Mandasescu et al (2005)<sup>31</sup>, em estudo clínico, evidenciaram que a administração de uma dieta hipolipídica associada a 20 gramas/dia de semente de linhaça promove uma redução significativa no perfil lipídico (colesterol total e LDL – C).

### **3.3.2 Fibras e suas propriedades funcionais**

A porção de fibra dietética presente na semente de linhaça inclui as duas formas de fibras ativas: solúveis e insolúveis. Porém, a concentração de fibras solúveis (mucilagens) é maior, garantindo um efeito cardioprotetor. Evidências clínicas confirmam que as fibras solúveis agem favoravelmente na redução dos níveis de colesterol sanguíneo. As propriedades das fibras solúveis devem-se principalmente à sua viscosidade que provoca redução na absorção de lipídeos e colesterol no intestino delgado <sup>32</sup>.

A capacidade quelante das fibras aos ácidos biliares, responsáveis pelo transporte de colesterol exógeno para as fezes, resulta em uma redução na absorção de ácidos biliares pelo fígado. Esse efeito promove um aumento na conversão de colesterol endógeno em ácidos biliares, reduzindo assim o colesterol hepático e sangüíneo<sup>33, 34</sup>. Outro efeito benéfico produzido pelas fibras solúveis é resultante da sua capacidade de fermentação pelas colônias bacterianas no intestino grosso. Os ácidos graxos de cadeia curta (acético-propiónico-butírico), originados, como produto dessa fermentação, inibem a síntese de colesterol hepático, promovendo a utilização do colesterol exógeno<sup>35, 36</sup>. De forma resumida, pode-se observar os efeitos das fibras no metabolismo do colesterol na figura 02.

Ruberfroid (1993)<sup>38</sup> e Sawashita et al (2006)<sup>39</sup> reportam que as fibras solúveis como mucilagens, goma guar, pectina, psílio, fibras de aveia e betaglicano quando administradas em doses de 3 a 15 g/dia, são eficientes para a redução em torno de 5 a 15% dos níveis séricos de colesterol total. Os autores ressaltaram que o efeito hipocolesterolêmico das fibras é mais acentuado em pessoas com elevado nível de colesterol no sangue.

Um estudo de meta-análise, no qual foram analisados 67 estudos clínicos sobre o efeito da fibra solúvel, constatou que na maioria dos estudos (60 a 70%) foi observada uma redução significativa nos níveis séricos de colesterol total e LDL – C em dietas com altos teores de fibras solúveis<sup>35</sup>. Afinal, os autores evidenciaram que o consumo diário de 3 gramas de fibras solúveis promoveu uma redução de 5 mg/dl no colesterol total e na fração de LDL – C. Bazzano et al (2003)<sup>36</sup>, após a condução de um estudo epidemiológico durante 19 anos, observaram que os indivíduos que consumiram uma dieta contendo 5,9g/dia de fibras solúveis diminuíram em 10% o risco de desenvolver doenças cardiovasculares em comparação aos que consumiram somente 0,9g/dia.

No mesmo sentido, Yusuf et al (2004)<sup>40</sup> realizaram um importante estudo epidemiológico de caso – controle (INTERHEART) cujo objetivo era avaliar os potenciais fatores de risco para o infarto agudo do miocárdio. Os autores evidenciaram que o consumo regular de frutas e verduras é responsável por uma redução de 17% dos eventos cardíacos.

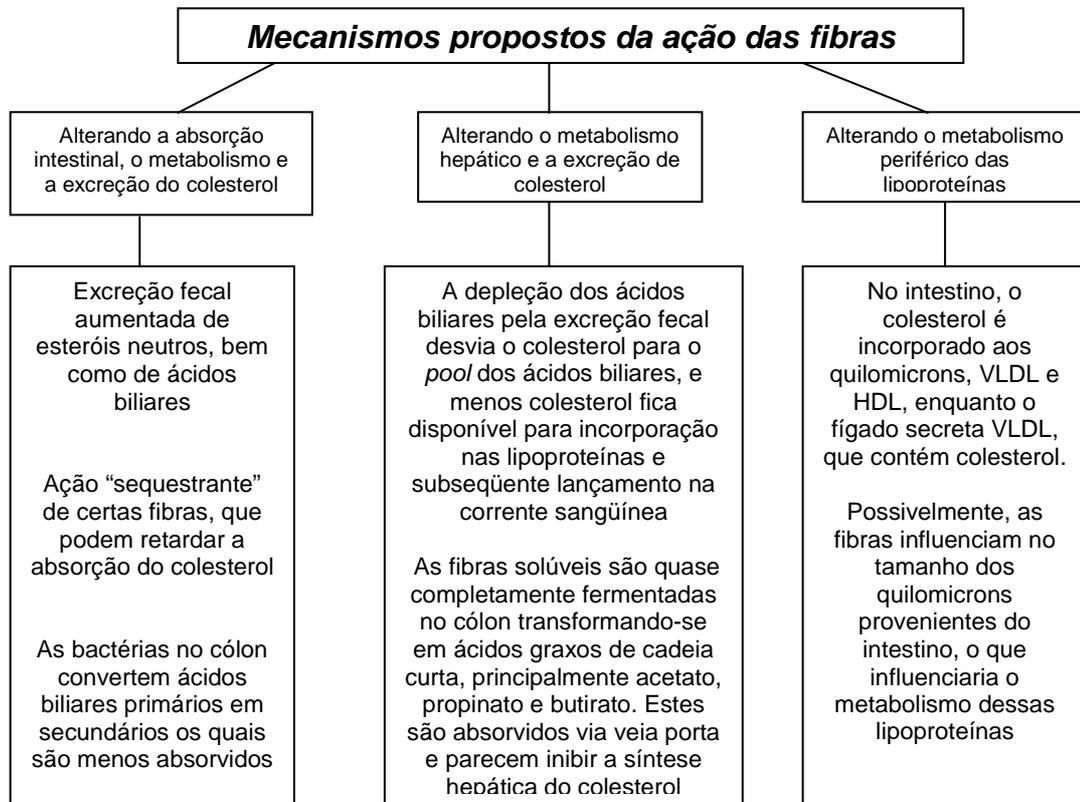


Figura 02 – Mecanismos de ação das fibras dietéticas.  
Fonte: Neves, MN. (1997)<sup>37</sup>.

### 3.3.3 Ácido alfa - linolênico e suas propriedades funcionais

O interesse da utilização dos ácidos graxos poliinsaturados como o ômega 3 na prevenção dos eventos coronarianos surgiu com as evidências na população de esquimós da Groelândia. Por meio de estudos, evidenciou-se que os esquimós apresentavam baixos índices de problemas cardíacos. Essa constatação foi atribuída e relacionada ao elevado consumo de peixes e produtos do mar, os quais são ricos em ácidos graxos poliinsaturados das famílias ômega - 3<sup>43</sup>.

O ácido  $\alpha$  - linolênico apresenta diversos efeitos fisiológicos nos quais incluem o efeito hipolipidêmico, com redução dos níveis sanguíneos de triglicerídeos, de colesterol e LDL-C, o efeito antitrombótico, através da diminuição da tendência de

agregação de plaqueta e a atividade anti-hipertensiva, antitrombótica e antiinflamatória <sup>42,43</sup>.

A partir da ingestão de ômega - 3, há a biossíntese no organismo dos ácidos graxos EPA (eicosapentaenóico - C20:5) e DHA (docosahexaenóico - C22:6), os quais, embora tenham uma estrutura semelhante, desempenham funções fisiológicas e metabólicas muito diferentes. O EPA está relacionado, principalmente, com a proteção da saúde cardiovascular no adulto, e o DHA é considerado fundamental para o desenvolvimento do cérebro e do sistema visual <sup>42,43</sup>.

O ácido araquidônico (ômega-6 C20:4, AA) e o EPA dão origem aos eicosanóides, os quais são: os tromboxanos, as prostaglandinas e os leucotrienos. A presença de diferentes tipos de eicosanóides na corrente sanguínea irá gerar respostas vasoconstritoras ou vasodilatadoras, um estímulo da agregação plaquetária ou uma inibição desta e efeitos pró ou antiinflamatórios <sup>43</sup>.

Os marcadores inflamatórios como proteína – C – reativa, fator de necrose tumoral, interleucinas e fibrinogênios são potenciais efeitos associados ao risco etiológico das doenças cardiovasculares <sup>44</sup>. Evidências preliminares sugerem que o consumo do óleo de linhaça reduz a resposta inflamatória. Caughey et al (1996) <sup>45</sup> demonstraram, em estudo *in vitro*, que a administração de 14 gramas de ácido alfa linolênico (ALA), proveniente do óleo de semente de linhaça, reduziu a síntese de proteínas inflamatórias como fator de necrose tumoral e interleucinas.

Rallids et al (2003) <sup>46</sup>, ao realizarem estudo com 76 homens portadores de dislipidemias os quais foram submetidos a uma dieta enriquecida com ácido  $\alpha$ -linolênico durante três meses, analisaram uma redução na inflamação sistêmica, mensurada pela proteína – C – reativa quando comparados com o grupo controle. Ao administrar por seis semanas uma dieta rica em ácidos  $\alpha$ -linolênico, (2,3% de óleo de canola) com 20 homens saudáveis, foi observado uma redução da agregação plaquetária, *in vitro* <sup>47</sup>. Resultados similares foram observados em 6000 participantes do estudo multi – étnico de aterosclerose. Ao final da pesquisa, notou-se níveis inversamente proporcionais de proteína – C – reativa, interleucina 6 e fibrinogênio, em sujeitos brancos que consumiam regularmente o ômega 3 <sup>48</sup>.

Muitos estudos têm demonstrado a associação inversa entre o ômega 3 e níveis séricos de colesterol total, LDL – C e triglicerídeos. A redução nos níveis

plasmáticos de colesterol total e LDL – C varia de 5 a 15%, conforme a quantidade de ômega - 3 consumida <sup>49, 50</sup>.

Em importante *Trial* clínico, o *GISSI Prevenzione* <sup>51</sup>, realizado com 11.324 pacientes, por três anos e meio, constatou que a ingestão diária de 1 grama por dia de ômega – 3, proveniente do óleo de peixe, reduziram a mortalidade dos pacientes em 20% e em 30%, a mortalidade por desfecho cardiovascular. No mesmo sentido, o estudo JELIS<sup>52</sup> analisou 18.645 hipercolesterolêmicos durante quatro anos e meio. Os pacientes foram randomizados em dois grupos que receberam o tratamento farmacológico (estatina) associado com 1,8 g de EPA / dia ou a estatina isolada. Ao final do estudo, observou-se nos pacientes que receberam a estatina associada ao ômega - 3, uma redução no colesterol total de 26% enquanto que no grupo que recebeu somente a estatina a redução foi somente de 19%. Os dados conclusivos desses dois importantes *trials* clínicos evidenciam que o ômega - 3 potencializa os efeitos redutores na concentração sérica de colesterol total.

Harper et al (2006) <sup>53</sup> reportam que muitas vezes o consumo de peixes de águas frias, fontes de ômega – 3, regularmente, são escassos na população em geral. Uma alternativa viável para aumentar o consumo de ácido linolênico seria por meio do incentivo ao consumo de semente de linhaça, óleo de linhaça castanhas e nozes. A FDA (*Food and Drug Administration*) preconiza uma ingestão diária de ácido linolênico de 3 gramas/dia.

Diante das evidências apresentadas é fato que a da semente de linhaça exerce efeitos na modulação do perfil lipídico, através da redução do LDL – C. Porém, há necessidade de mais trabalhos experimentais para esclarecer e constatar os efeitos anatomohistológicos da semente de linhaça na aterogênese e no processo inflamatório.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Os materiais permanentes e parte do material de consumo descrito abaixo foram disponibilizados pelo Laboratório de Cirurgia Experimental do Hospital Angelina Caron, pelo Laboratório de Patologia Experimental e pelo Biotério Central, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). O material de consumo restante foi adquirido pelos pesquisadores (coelhos, ovo liofilizado, reagentes e materiais para dosagens bioquímicas).

**MATERIAL PERMANENTE:** Kit cirúrgico para cirurgia em animal de pequeno porte, balança eletrônica marca Ohaus® Precision Standard modelo TS-2KS, gaiolas de metal, pranchetas cirúrgicas, campânulas fechadas para anestesia e microscópio de polarização Olympus® BX40.

**MATERIAL DE CONSUMO:** 20 coelhos machos albinos (*Oryctolagus cunicullus*) da linhagem *New Zeland*; 120 kg (6 sacos) de ração Nuvital®; 40kg (2 sacos) de ovo liofilizado; 10 kg de semente de linhaça; 20 Bisturis nº11; 20 unidades de fio de náilon 4-0; 03 frascos de PVPI (polivinil pirrolidona iodo); 20 pacotes de gazes; 02 caixas de luvas de procedimentos; 03 frascos de formalina a 10%; 01 frasco de álcool a 95%; 20 frascos com tampa (para conservar peças cirúrgicas); corante Hematoxilina-eosina; 20 lâminas e lamínulas; 02 frascos de quetamina (1ml/50mg); 02 frascos de xilazina (1ml/20mg); reagentes e material para dosagens do perfil lipídico.

### 4.2 METODOLOGIA

#### 4.2.1 Delineamento Experimental

Para a realização deste estudo, o protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, local de realização do estudo (Anexo 01).

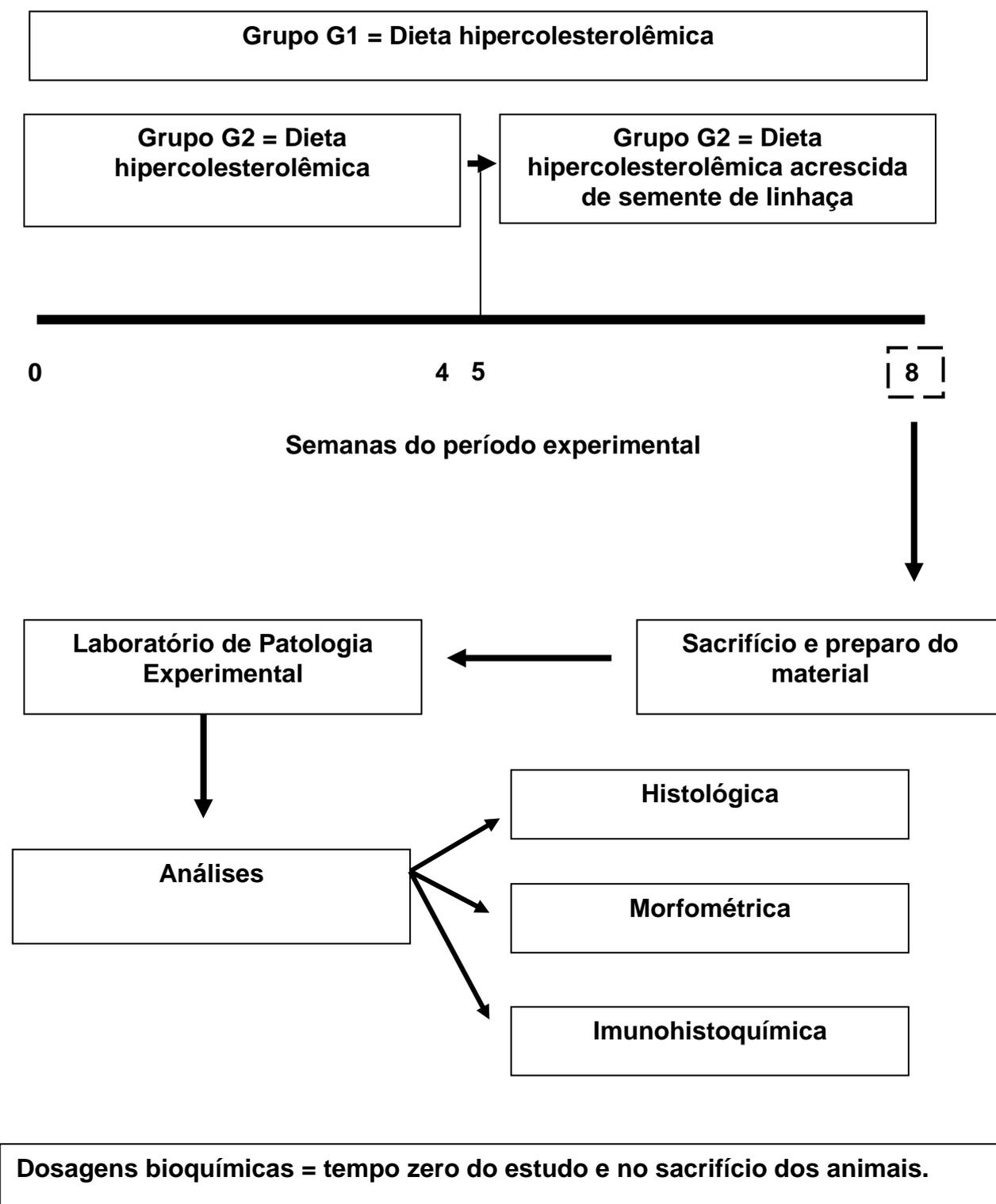
O período experimental foi de oito semanas, totalizando 56 dias. Os animais foram randomizados aleatoriamente em dois grupos, com 10 animais em cada grupo, conforme o tratamento dietético recebido. O grupo G1 (controle) recebeu durante todo experimento a ração hipercolesterolêmica. Essa foi preparada com o acréscimo à alimentação padrão dos coelhos (Nuvilab®) de 1% de colesterol proveniente do ovo liofilizado. A adição de 1% de colesterol na alimentação dos coelhos tem sido utilizada nos protocolos experimentais para a indução e formação das lesões ateroscleróticas<sup>54</sup>. Outros autores complementam que a extensão e o tipo de lesão aterosclerótica são diretamente proporcionais à concentração de colesterol plasmático, o qual aumenta de acordo com a porcentagem de colesterol na dieta<sup>30, 56</sup>.

Já o grupo G2 (estudo) recebeu somente nas primeiras 4 semanas de experimentação a dieta hipercolesterolêmica. A partir da quinta até a oitava semana foi adicionada à dieta hipercolesterolêmica no grupo G2 8g/kg de peso/coelho de semente de linhaça triturada, totalizando em média 30 gramas de linhaça por dia (tabela 01).

Tabela 01 - Demonstrativo do Delineamento Experimental

<b>Grupos</b>	<b>Procedimentos</b>
Grupo G1 (Controle) Dieta hipercolesterolêmica	Ração padrão Nuvilab® acrescida a 1% de colesterol proveniente do ovo liofilizado. Tempo de administração: 8 semanas.
Grupo G2 (Estudo) Dieta hipercolesterolêmica com adição de semente de linhaça	Ração acrescida de ovo em pó a 1% de colesterol por 4 semanas para indução de lesão aterosclerótica em aortas dos coelhos. A partir da quinta semana foi adicionada à dieta hipercolesterolêmica 30 gramas de semente de linhaça para cada coelho.

## 4.2.2 Desenho do estudo



### 4.2.3 Ambiente de Experimentação

Os procedimentos deste estudo foram realizados nas dependências do laboratório de cirurgia experimental do Hospital Angelina Caron, no laboratório de patologia experimental e no biotério central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Os animais foram mantidos no biotério em macro-ambiente com ciclos de iluminação alternados, 12/12 horas, com trocas de ar e temperatura controlada de 19 a 23°C. Para o micro-ambiente utilizaram-se gaiolas higienizadas diariamente. Os coelhos foram armazenados individualmente e identificados com uma numeração seqüencial na orelha direita, a qual se repetiu na face frontal da gaiola correspondente. Os animais receberam durante o experimento água e ração específica para a espécie (Nuvilab<sup>®</sup>) de forma *ad libitum*.

### 4.2.4 Animais utilizados

Foram utilizados 20 coelhos machos albinos (*Oryctolagus cunicullus*) da linhagem New Zealand, provenientes do biotério da PUCPR. O peso médio dos animais era de 1,5 kg e a idade média de 4 meses. O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com base no estudo de Bathena et al (2003)<sup>57</sup>.

### 4.2.5 Preparo da ração suplementar

Para a alimentação dos coelhos foi preparada uma dieta hipercolesterolêmica, a qual foi ofertada durante todo o experimento. Para tal, foram utilizados 800 gramas de ovo liofilizado adicionado à ração padrão com o objetivo de induzir lesões ateroscleróticas nas aortas dos animais.

A diluição do ovo em pó foi realizada na seguinte proporção: 800 gramas de ovo em pó em 800 ml de água. A ração foi colocada num recipiente plano e largo e

distribuída numa camada fina. Posteriormente, o ovo diluído foi acrescido à ração. O preparo final foi armazenado sob refrigeração. Para o grupo G2 foi adicionada, na quinta semana de experimentação, à dieta hipercolesterolêmica 30 gramas de semente de linhaça triturada. Essa quantidade adicionada justifica-se por um valor médio encontrado em trabalhos prévios na literatura, uma vez que ainda não há padronização da dosagem terapêutica da semente de linhaça <sup>4,5,11,29</sup>.

#### **4.2.6 Aferições**

Para as avaliações deste modelo experimental foram adotadas as aferições histológicas de forma qualitativa e quantitativas (morfométricas). O peso dos animais também foram aferidos e registrados em quatro momentos da pesquisa: inicial, 15 dias, 22 dias e final. Para a coleta de peso utilizou-se uma balança digital disponível no biotério da instituição.

#### **4.2.7 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.

### **4.3 COLETAS DE AMOSTRAS**

#### **4.3.1 Sangue**

Coletaram-se amostras biológicas de sangue de cada coelho para análise bioquímica do colesterol total (CT), LDL – C, HDL – C (lipoproteína de alta densidade) e triglicerídeos (TG). Esta coleta, cuja via de escolha é a punção cardíaca, foi realizada 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 feitas por laboratório terceirizado, de acordo com o método enzimático específico para cada exame. É importante ressaltar que para a coleta de sangue foi realizado o procedimento anestésico do animal.

O animal foi acondicionado em caixas específicas (figura 03) desenvolvidas para auxiliar o procedimento anestésico de coelhos. O processo de punção iniciou com a anestesia dos animais (solução de 1,5ml de quetamina + 1 ml de xilazina: administração de 1ml/kg de peso, via intramuscular), conforme ilustra a figura 03. Após 4 a 5 minutos, colocou-se o animal em decúbito lateral esquerdo para palpação do processo xifóide; segue-se a palpação cardíaca e punção intracardíaca com seringa de 5 ml e agulha 25x7mm.

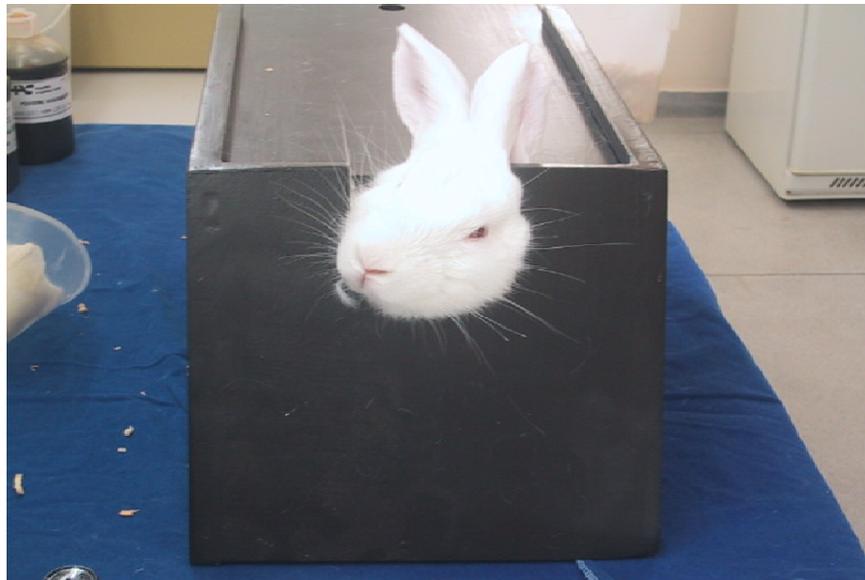


Figura 03 – Caixa que auxilia no procedimento anestésico dos animais

#### 4.3.2 Remoção de artérias

No final do período experimental, 8ª semana, realizou-se o processo cirúrgico para retirada das peças e eutanásia dos coelhos no laboratório de cirurgia experimental do Hospital Angelina Caron. O procedimento teve início com a anestesia dos animais.

Antecedente à realização do procedimento cirúrgico foi ministrada anestesia, de 2,5 ml (para animais de 2,5 kg) da solução composta por 1,5 ml de quetamina (50mg) e 1 ml de xilazina (20mg), aplicada por via intramuscular na região da coxa, conforme protocolo de anestesia do Biotério Central da universidade.

Realizada a tricotomia ampla do abdome, o animal foi colocado na canaleta cirúrgica, sendo seus membros fixados pelas extremidades. Em seguida, fez-se a anti-sepsia local com PPVI degermante e colocou-se campo fenestrado estéril. Em seguida, realizou-se incisão mediana de 4 cm de extensão a partir do processo xifóide. Uma vez com o campo aberto, foi feita a dissecação do arco aórtico e da aorta descendente (figura 04) e a eutanásia de acordo com RDC nº 714 (2002) <sup>58</sup> com dose letal de barbitúrico (thionembutal).

As artérias removidas (figura 05) foram lavadas e fixadas com formaldeído a 10% tamponado com fosfato (pH=7,6), durante 10 minutos. Posteriormente, foram armazenadas em frascos devidamente identificados e encaminhados para o laboratório de patologia experimental da PUCPR, onde se realizou o processamento histológico convencional com parafina.

#### **Aorta Descendente**

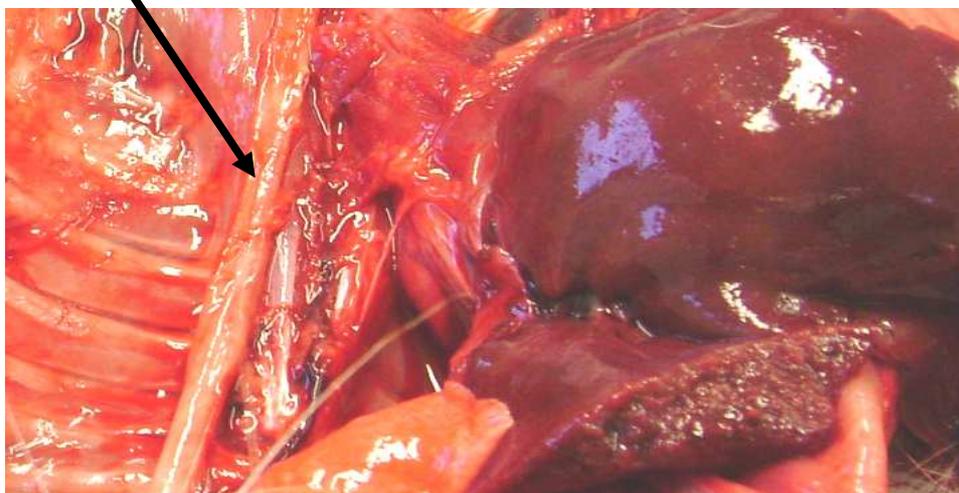


Figura 04 – Localização da aorta descendente para remoção



Figura 05 – Aorta descendente removida do animal

#### 4.4 AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS

##### 4.4.1 Preparo das amostras

Para efeitos de análise histológica e morfométrica, a identificação dos animais por grupos foi substituída por números aleatórios seqüenciais com o propósito de obter uma análise cega. Para isso, foi misturado o grupo controle e o grupo estudo. Após esta nova identificação, fixaram-se os espécimes em formalina por 24 horas, constituídos pelo segmento do arco aórtico e da aorta descendente. Posteriormente essas peças cirúrgicas foram retiradas dos frascos e processadas para a confecção dos cortes histológicos. Para tal procedimento, foram retiradas de 3 a 5 amostras em cortes transversais, com 2 a 3 mm de espessura cada, do arco aórtico e da aorta descendente de todos os animais do estudo, representando assim, as áreas das

porções proximais, médias e distais destas artérias. As amostras foram colocadas em cápsulas histológicas identificadas.

As amostras previamente identificadas foram colocadas no autotécnico (Leica® modelo RM2145), para processamento *overnight*, sendo desidratadas em concentrações diferentes e crescentes de álcool etílico a 70%, 80% e 90%, posteriormente foram diafanizadas em xilol contendo misturas seqüencialmente concentradas de parafina durante 12 horas. Como procedimento padrão para a obtenção dos blocos foi realizado a inclusão em parafina quente (Leica® modelo EG1160).

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Leica® modelo RM 2145), em cortes de 5 µm (micrômetro) cada um, dispostos em lâmina de vidro com 75X25mm. É importante ressaltar que no momento da leitura das lâminas histológicas obtidas nesse experimento, seguiu-se sempre a identificação prévia descrita de cada um dos cortes transversais do arco aórtico e da aorta descendente.

As lâminas foram coradas em hematoxilina-eosina (HE) e elástica (orceína), conforme técnicas convencionais e montadas com bálsamo e lamínula de vidro de 24X50 mm. Para a identificação das lâminas histológicas, utilizou-se o mesmo processo empregado nos blocos histológicos.

#### **4.4.2 Análise histológica qualitativa**

As lâminas na coloração de HE foram analisadas de maneira cega, em microscópio medusa de cinco cabeças Olympus® BX 40. As lesões ateroscleróticas encontradas no estudo macroscópico foram graduadas visivelmente usando uma escala de 0 a VI, segundo os critérios qualitativos propostos por Stary et al (1992)<sup>17</sup>, descritos na tabela 02. Por meio dessa análise diagnosticou-se de maneira cega o grau de lesão aterosclerótica presente nos coelhos de ambos os grupos.

Tabela 02 – Grau de lesão aterosclerótica de acordo com os critérios classificatórios

<b><i>Critério</i></b>	<b><i>Grau da lesão</i></b>
Espessamento intimal	I
Xantomagrófagos isolados	I
Xantomagrófagos agregados ou em camadas	II
Gotículas lipídicas de matriz proteoglicana	II
Lagos de lipídios de matriz proteoglicana	III
Presença de capa fibrosa delicada	IV
Presença de capa fibrosa bem formada	V
Calcificação e Placa Fibrosa	VI

Adaptado: Stary et al (1992)<sup>17</sup>.

Os resultados foram registrados na forma de fotomicrografias retidas em leitura pelo programa Image Pro-plus<sup>®</sup> 4.5, acopladas a um microscópio Olympus<sup>®</sup> BX50 e câmara de vídeo Sony<sup>®</sup>. Todos os fragmentos, bem como todos os níveis de corte foram examinados, aproveitando-se para observar os aspectos pertinentes à lesão aterosclerótica, livre de artefatos técnicos e preparando o material para a análise morfométrica. É importante salientar que com o auxílio da leitura histológica na coloração de HE evidenciou-se a amostra em corte transversal do arco aórtico e da aorta descendente com maior grau de lesão para a utilização na análise morfométrica.

#### **4.4.3 Análise morfométrica quantitativa**

A leitura morfométrica foi realizada com as lâminas coradas em orceína (elástica), a fim de determinar a área íntima e da média do arco aórtico e da aorta descendente dos coelhos do grupo controle e do grupo estudo, assim como também, para determinar a razão íntima / média. Para essa leitura, o corte transversal mais lesado foi selecionado previamente na leitura do HE. Esse segmento foi dividido em

quatro campos nos quais se realizou em cada quadrante dez aferições da espessura da média e da íntima, conforme demonstra a figura 06.

A leitura das lâminas foi realizada através do programa Pro Image-plus® v.4,5 para Windows®, acoplados a microscópio Olympus® BX50 e câmara de vídeo Sony®, utilizando-se o aplicativo chamado morfometria de "linha", calibrado previamente em  $\mu\text{m}$  com a objetiva de 20 vezes. As medidas foram transferidas para o programa Excel for Windows®.

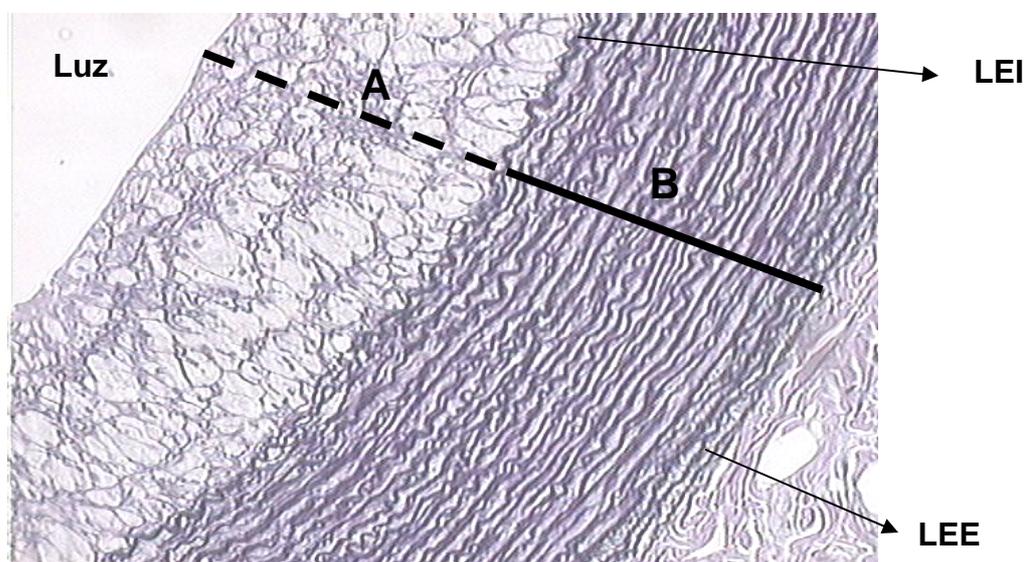


Figura 06 – Imagem representativa de um quadrante de leitura do arco aórtico do animal analisado em que A = espessura da íntima e B = espessura da média.

Legenda: LEE – Lâmina Elástica Externa; LEI – Lâmina elástica interna.

#### 4.4.4 Análise imunohistoquímica

a) Construção do bloco de *Tissue Microarray* (TMA)

Em um primeiro momento, os arcos aórticos e as artérias descendentes foram cortadas em série, na espessura de, aproximadamente 3 a 5 mm, para a confecção dos blocos parafinados comuns. Esses receberam a denominação de blocos doadores. Posteriormente, foram retirados cortes dos blocos doadores, e corados em colorações de rotina (HE e elástica), vide análise morfométrica.

Nas lâminas coradas em HE foram localizadas as amostras arteriais contendo a região de interesse (amostra em corte transversal contendo a área mais lesada) para a construção do TMA. Através do sistema de espelho, a área mais lesada marcada na lâmina foi localizada no bloco-doador, que por sua vez, também recebeu uma marcação.

A pinça do tipo “*Punch de Pele*”, com diâmetro de 5 mm (Figura 07) foi escolhida para a retirada do segmento aórtico mais lesado do bloco doador com intuito de montar o bloco receptor. Para que os arcos aórticos e as artérias descendentes fossem devidamente localizados, conforme sua identificação individual foi confeccionado um mapa que serviu de apoio. O mapa segue o estilo de um plano cartesiano, onde as colunas são identificadas com letras e as linhas com números. Cada fragmento aórtico escolhido recebeu a identificação de uma letra mais um número (Ex A1) (Figura 08).



Figura 07 – Pinças do tipo *Punch* para biópsias de pele com diâmetros de 5, 4 e 3 mm, respectivamente.

Grupo Controle
A1 = Coelho 01
A2 = Coelho 02
A3 = Coelho 03
B1 = Coelho 04
B2 = Coelho 05
B3 = Coelho 06
C1 = Coelho 07
C2 = Coelho 08
C3 = Coelho 09
C4 = Coelho 10
D4 = Marcador

Figura 08 – Mapa que orienta a confecção do bloco receptor. A1 representa o bloco que contém a identificação do coelho 01 e assim por diante.

O bloco-receptor foi confeccionado, através dos seguintes passos: 1) Aquecimento da pinça do tipo Punch para penetração no bloco de parafina; 2) Introdução da pinça quente na área demarcada (segmento aórtico mais lesado) do bloco-doador; 3) Pressão e torção aplicadas na pinça para penetração e corte do fragmento; 4) Retirada da pinça contendo o fragmento mais lesado da íliaca esquerda; 5) Retirada do fragmento contido na pinça.

Depois de retirados os fragmentos de todos os blocos doadores e estes organizados conforme o mapa (figura 09) montaram-se os novos blocos. Ao todo foram montados quatro novos blocos (grupo controle arco aórtico, grupo controle aorta descendente, grupo estudo arco aórtico e grupo estudo aorta descendente), contendo ambos os múltiplos fragmentos de espécimes mais lesados de cada um dos grupos. Assim que pronto o bloco-receptor, foram confeccionadas lâminas histológicas convencionais coradas em HE e lâminas para a análise imunohistoquímica.

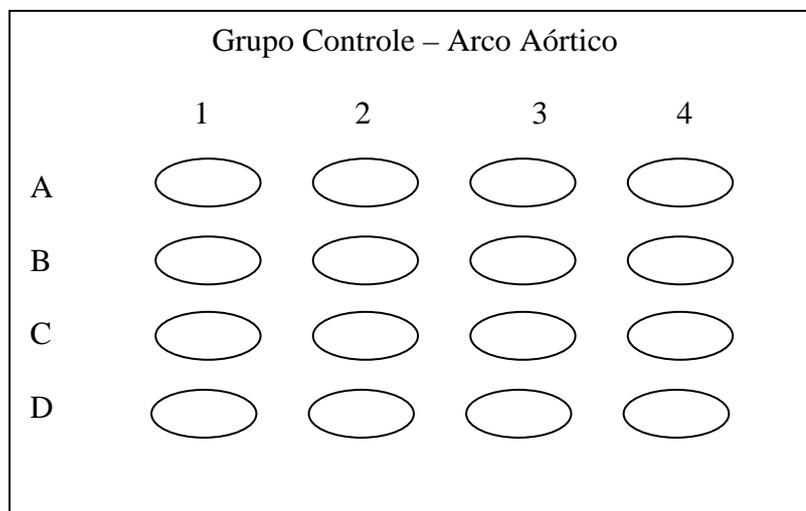


Figura 09 – Mapa em plano cartesiano do TMA controle. O cilindro 01 representa o segmento de arco aórtico identificado do coelho 01 e assim por diante.

#### b) Técnica de imunohistoquímica

Estes cortes histológicos foram fixados em lâminas de vidro silanizadas e inicialmente submetidos à desparafinização com xilol quente (37°C), desidratação com banhos sucessivos de álcool e reidratação com água. Utilizou-se o álcool metílico e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o primeiro bloqueio da peroxidase endógena e a água destilada e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o segundo bloqueio. Procedeu-se a incubação com os anticorpos primários monoclonais ICAM e VCAM nas diluições de 1:100 microlitros e 1:200 microlitros, respectivamente durante 1 hora. Para a revelação, foi adicionado complexo DAB (Dakocytomation), substrato sobre as lâminas e a contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Mayer's, seguida de desidratação com banhos de álcool etílico 100% e da clarificação com xilol. Para a montagem das lâminas foi utilizado o Bálsamo do Canadá. O protocolo desenvolvido e descrito acima já foi

padronizado no serviço. É importante destacar que foram utilizados, controles positivos e negativos para cada reação.

A leitura foi feita em microscópio óptico Olympus BX50®, com objetiva de 20 x, avaliando-se a concentração de células de adesão celular e intercelular na camada íntima nos segmentos arteriais estudados. Para essa análise quantitativa, foram digitalizadas imagens da aorta descendente e do arco aórtico de cada animal, as quais foram divididas em oito campos. As áreas positivas para os anticorpos primários foram marcadas pela coloração castanha enquanto que as negativas pela coloração azul, caracterizando, assim, a utilização do método da morfometria de cores.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos resultados contidos neste projeto foi aplicado o teste T – Student para amostras independentes ou o teste não paramétrico de Mann - Whitney. A condição de simetria das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro – Wilks. Valores de  $p \leq 0,05$  indicaram significância estatística.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PESO DOS ANIMAIS

Os pesos médios dos animais aferidos em diferentes momentos do período experimental estão sumarizados na tabela 03.

Tabela 03 – Peso Médio dos animais em diferentes momentos de aferições

Variável	Grupo	n	Média Kg	Desvio padrão	Valor de p
Peso inicial	G1	10	1,78	0,15	
	G2	10	1,75	0,16	0,659
Peso 15 dias	G1	10	2,36	0,29	
	G2	10	2,08	0,19	0,021
Peso 22 dias	G1	10	2,58	0,33	
	G2	10	2,29	0,19	0,026
Peso final	G1	10	2,98	0,41	
	G2	10	2,72	0,19	0,096

Grupo G1 = Grupo Controle; Grupo G2 = Grupo Estudo.

(\*) Teste t de Student para amostras independentes

A média do peso corporal inicial dos animais do grupo controle foi de 1,75 Kg enquanto que nos animais do grupo estudo foi de 1,78 Kg, não demonstrando diferenças estatísticas. Ao tempo final do estudo, o grupo G1 apresentou uma média de peso corporal de 2,98 Kg e o G2 de 2,72 Kg, apresentando dessa forma, um percentual de variação de 67,49% e 56,37%, respectivamente.

O grupo experimental que recebeu a dieta suplementada com semente de linhaça teve um ganho de peso inferior quando comparado com o grupo controle nos diferentes tempos de pesagens ( $p < 0,01$ ), conforme se observa na figura 10.

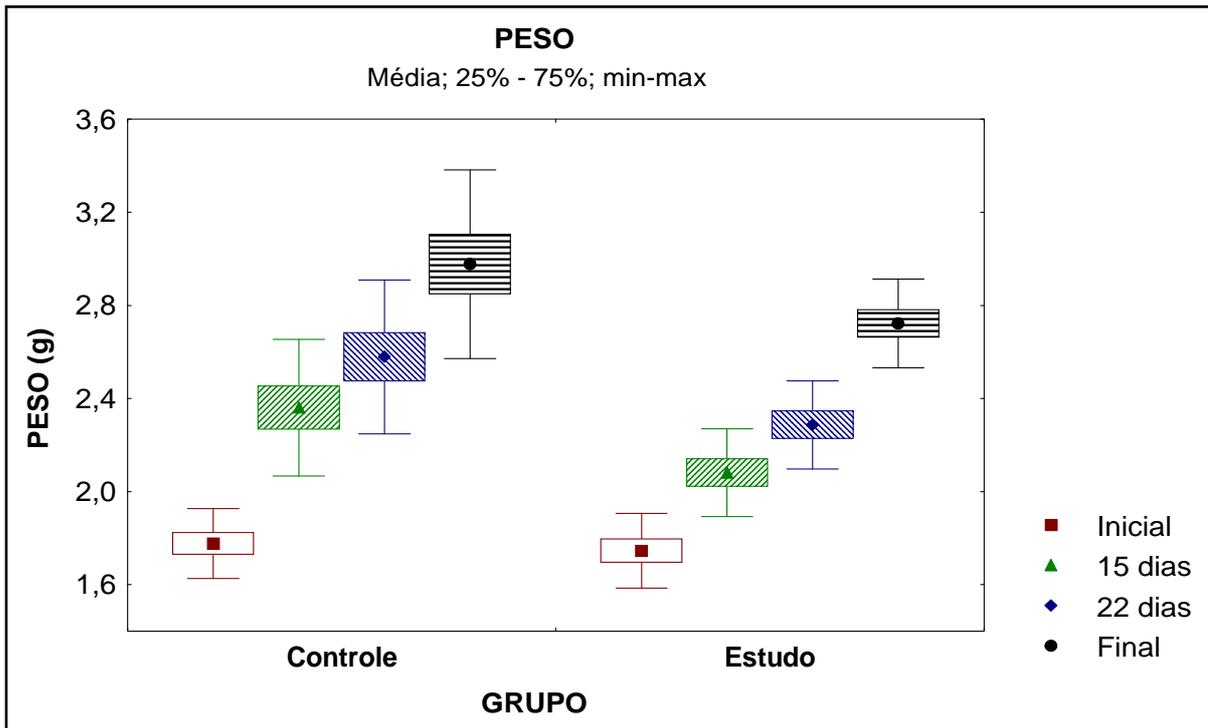


Figura 10 – Peso dos animais do grupo controle e do grupo estudo aferidos no momento inicial, 15 dias, 22 dias e momento final do experimento. Valores de  $p < 0,001$  para grupo controle e grupo estudo na pesagem final.

## 5.2 variáveis bioquímicas

Concentrações basais de colesterol total não apresentaram diferenças estatísticas nos grupos estudados. Afinal, encontraram-se valores médios iniciais de colesterol total de 70,30 mg/dl e 76,80 mg/dl, grupo estudo e controle, respectivamente. Houve um aumento nos níveis séricos de colesterol total em ambos os grupos após o período de experimentação, correspondendo a um percentual de variação de aproximadamente 2379% no grupo controle e de 1249% no grupo caso. Os valores mínimos, máximos, medianos e desvio padrão do colesterol total dos animais estão sumarizados na tabela 04.

Tabela 04 – Valores medianos, mínimos e máximos para colesterol total dos grupos estudados

Variável	Grupo	n	Mediana (mg/dl)	Mínimo (mg/dl)	Máximo (mg/dl)	Desvio padrão	Valor de p
CT inicial	G1	10	66,50	47,00	115,00	21,79	0,420*
	G2	10	81,00	55,00	91,00	12,07	
CT final	G1	10	1934,00	347,00	2885,00	768,67	0,046**
	G2	10	1060,00	1,25	2313,00	638,60	
CT variação %	G1	10	2293,34	608,16	3798,65	1204,08	0,024*
	G2	10	1155,23	-98,49	2441,76	808,62	

G1 = Grupo Controle; G2 = Grupo Estudo.

(\*) Teste t de Student para amostras independentes,  $p < 0,05$ .

(\*\*) Ancova,  $p < 0,05$  (CT inicial como co-variável).

Embora o aumento do colesterol tenha ocorrido nos dois grupos experimentais, percebe-se, na figura 11, que o acréscimo foi estatisticamente maior no grupo que não recebeu a adição da semente de linhaça na dieta ( $p < 0,046$ ).

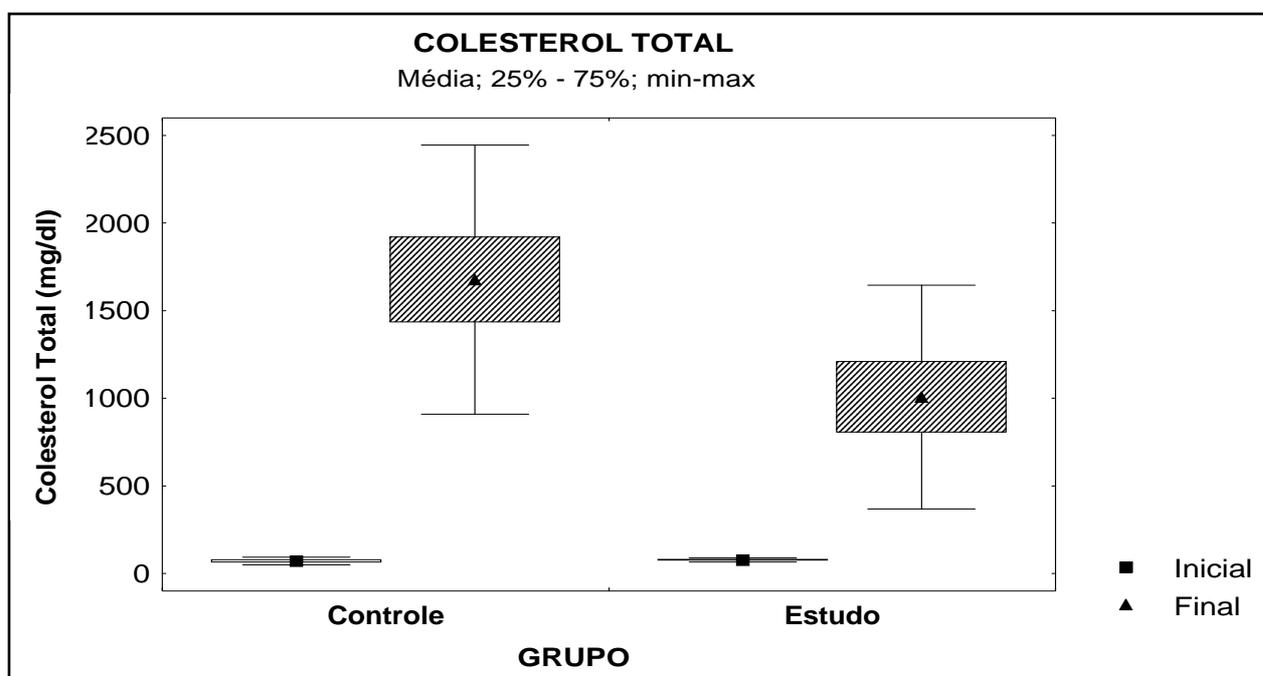


Figura 11 – Concentração plasmática de colesterol total observada no grupo controle e no grupo estudo. Valor de  $p < 0,046$  para comparação de colesterol total final nos grupos estudados.

Resultados semelhantes foram observados para a fração de LDL – C. Afinal, os animais suplementados com semente de linhaça apresentaram no final do experimento valores inferiores de LDL – C quando comparados com o grupo controle, com nível de significância estatística ( $p < 0,05$ ) vide figura 12. Os valores médios encontrados no grupo controle ao término do estudo foram de 1596 mg/dl e no grupo estudo de 1074 mg/dl (tabela 05).

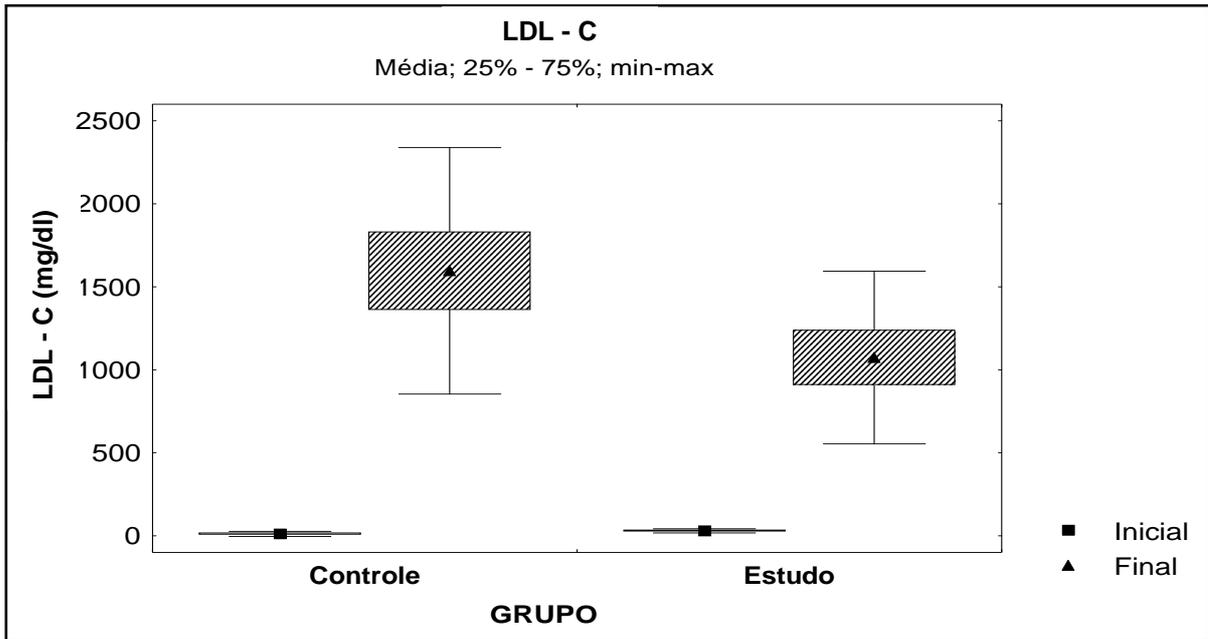


Figura 12 – Concentração plasmática de LDL – C observada no grupo controle e no grupo estudo. Valor de  $p < 0,001$  para concentração de LDL - C final nos grupos estudados.

Tabela 05 – Análise dos valores médios de LDL – C nos grupos estudados

Variável	Grupo	n	Média (mg/dl)	Desvio padrão	Valor de p
LDL inicial	G1	10	11,80	15,17	0,005*
	G2	10	30,10	13,20	
LDL final	G1	10	1596,12	743,03	0,108**
	G2	10	1074,32	520,66	
LDL variação %	G1	10	38306,95	35627,36	0,001*
	G2	10	4093,55	2098,81	

G1 = Grupo Controle; G2 = Grupo Estudo (\*) Teste t de Student para amostras independentes,  $p < 0,05$ ; (\*\*) Ancova,  $p < 0,05$  (LDL - C inicial como co-variável).

No que se refere à análise de HDL - C e níveis séricos de triglicerídeos observa-se que não houve diferença significativa nas concentrações séricas desses parâmetros bioquímicos entre os grupos ao término da experimentação vide figura 13 e 14, respectivamente.

Embora existam diferenças entre os níveis plasmáticos de triglicerídeos dosados no período final do estudo (220,20 mg/dl no grupo controle e 147,20 mg/dl no grupo estudo), essas não foram significativas. Observou-se que os valores séricos de triglicerídeos, mensurados em todo o período de experimentação, não demonstraram diferenças estatísticas entre os animais para  $p < 0,05$ . Os valores médios, medianos, mínimos e máximos estão sumarizados na tabela 06.

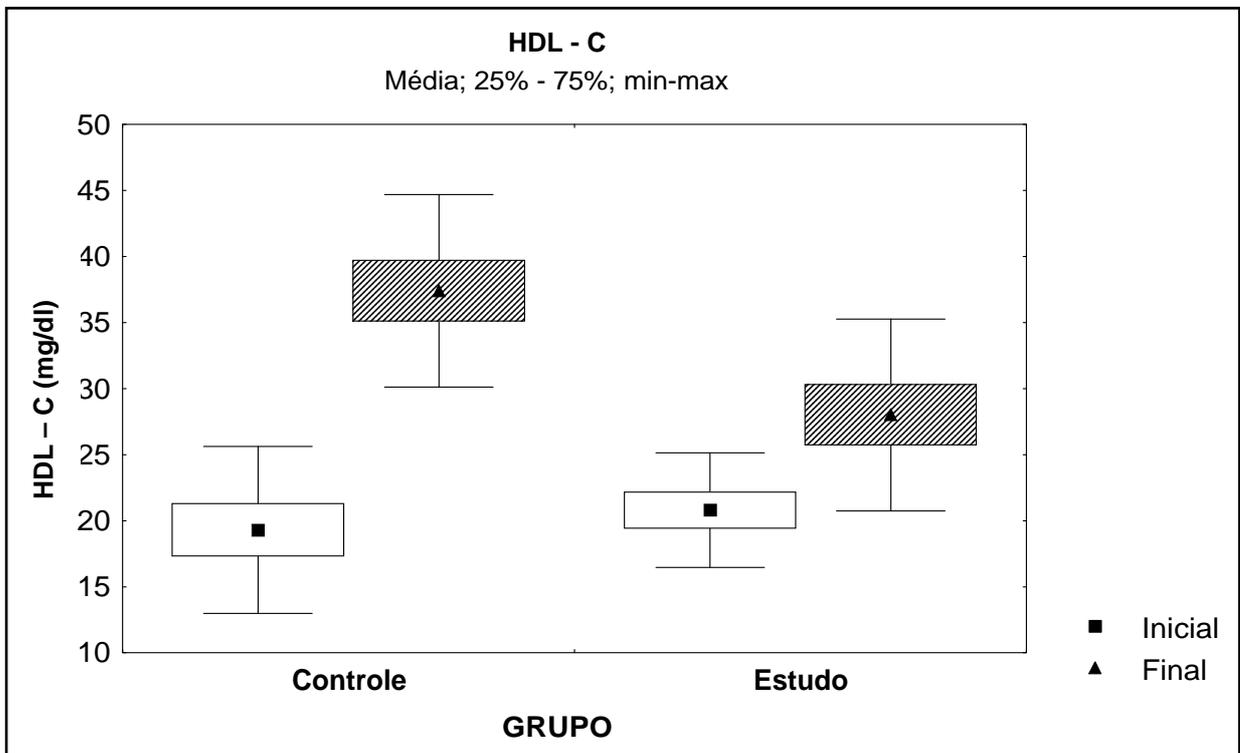


Figura 13 – Concentração plasmática de HDL - C observada no grupo controle e no grupo estudo. Valor de  $p = 0,024$  para concentração de HDL - C final nos grupos estudados.

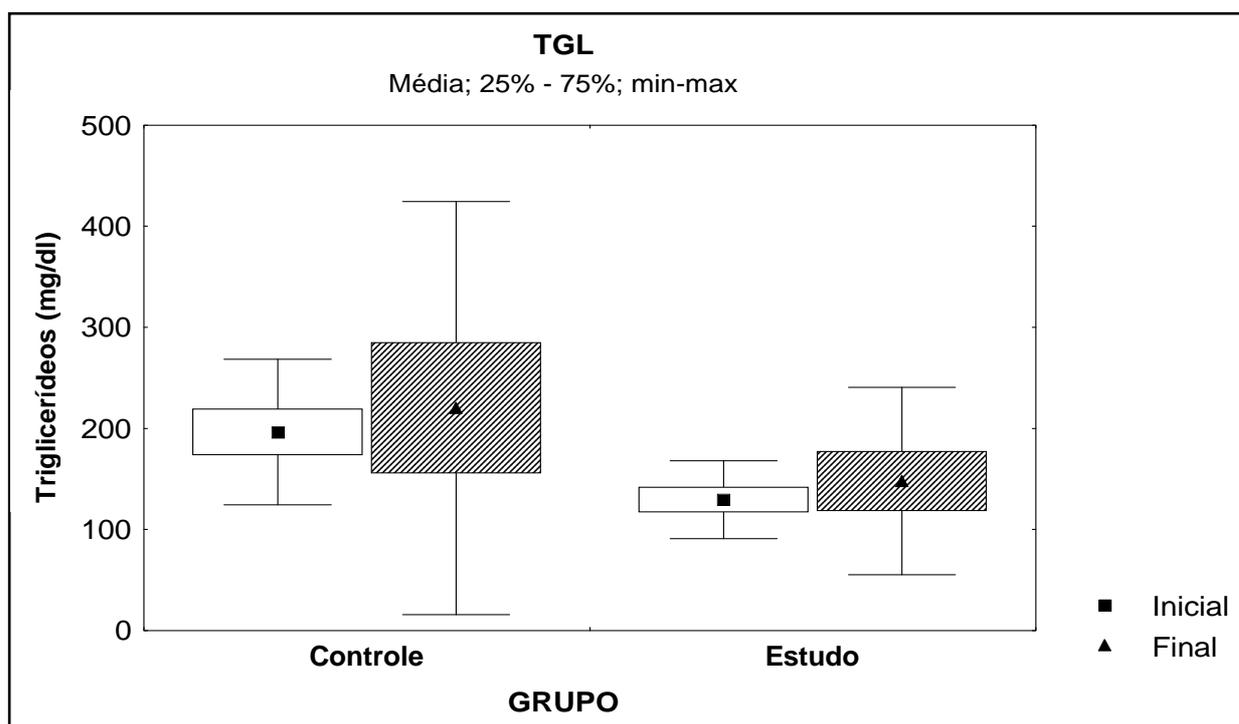


Figura 14 – Concentração plasmática de triglicerídeos observada no grupo controle e no grupo estudo.

Valor de  $p = 0,938$  para concentração de triglicerídeos final nos grupos estudados.

Tabela 06 – Valores médios, medianos, mínimos e máximos para triglicerídeos dos grupos estudados

Variável	Grupo	n	Média (mg/dl)	Mediana (mg/dl)	Mínimo (mg/dl)	Máximo (mg/dl)	Desvio padrão	Valor de p
TGL inicial	G1	10	196,40	193,50	96,00	295,00	71,94	0,018*
	G2	10	129,50	120,00	83,00	206,00	38,65	
TGL final	G1	10	220,20	123,00	60,00	669,00	204,32	0,938**
	G2	10	147,90	143,00	23,00	302,00	92,66	

G1 = Grupo Controle; G2 = Grupo Estudo.

(\*) Teste t de Student para amostras independentes,  $p < 0,05$

(\*\*) Ancova,  $p < 0,05$  (TGL inicial como co-variável)

### 5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Por meio da análise histológica, pode-se avaliar o grau de lesões ateroscleróticas presentes no arco aórtico e na aorta descendente de ambos os grupos. Ao final do período experimental, observou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à probabilidade de ter lesão dos tipos I, II, III, IV e V ou de não ter nenhuma lesão. Quase que totalidade dos animais apresentaram lesões ateroscleróticas grau III na aorta descendente, conforme se observa na figura 15. É de extrema importância salientar que tanto no grupo G1 quanto G2, todos os animais apresentaram lesão grau III no arco aórtico.

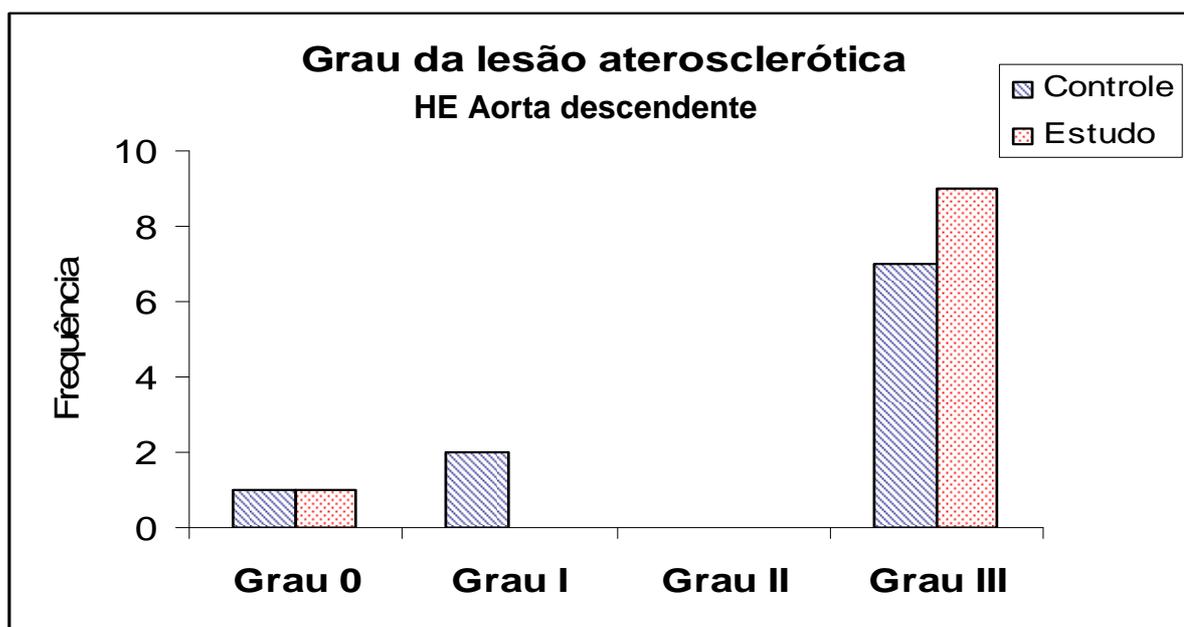


Figura 15 – Grau de lesão aterosclerótica na aorta descendente dos coelhos estudados.

Em adição, corte seccional da aorta descendente demonstra a caracterização da ausência da lesão aterosclerótica e lesões grau I e III encontradas nessa pesquisa (figura 16).

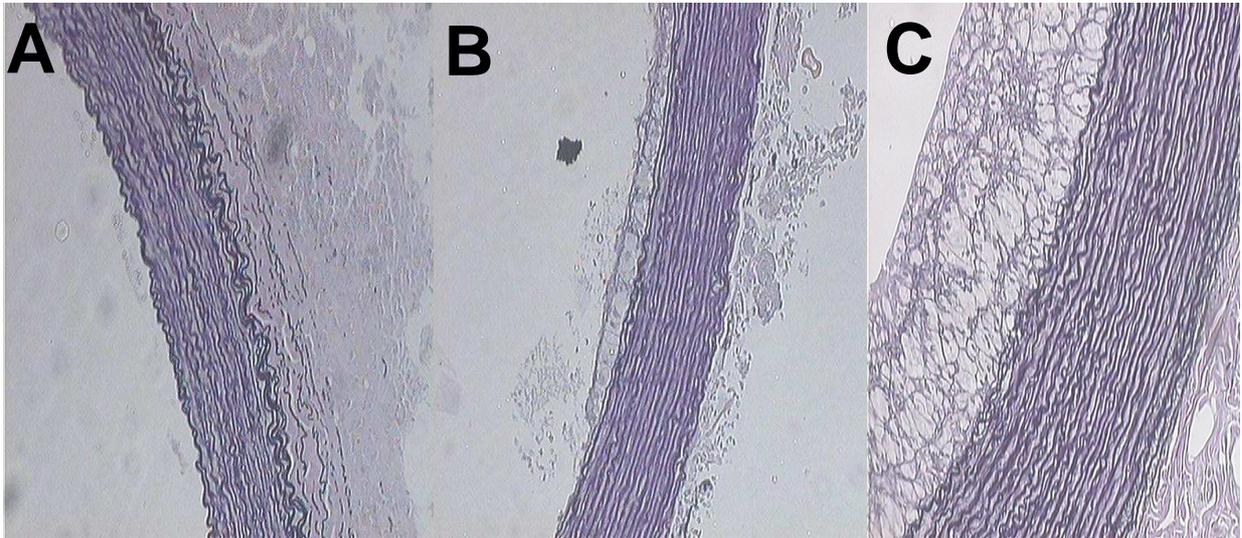


Figura 16 – Cortes histológicos da aorta descendente de animais: A – Secção transversal do arco aórtico do coelho sem lesão aterosclerótica; B – Secção transversal do arco aórtico do coelho com lesão aterosclerótica grau I; C – Secção transversal do arco aórtico do coelho com lesão grau III.

#### 5.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a área da camada íntima e razão íntima – média de ambos os grupos no arco aórtico e na aorta descendente, conforme se observa nas figuras 17, 18, 19, 20, 21. A única diferença estatística encontrada nessa análise foi a área da camada média da aorta, a qual apresentou valores médios inferiores no grupo G2 que no G1 vide figura 22 e tabela 07. É de extrema importância ressaltar que a peça do arco aórtico do coelho 1 do grupo G2 teve que ser descartada para análise, em virtude da grande presença de artefatos cirúrgicos na peça.

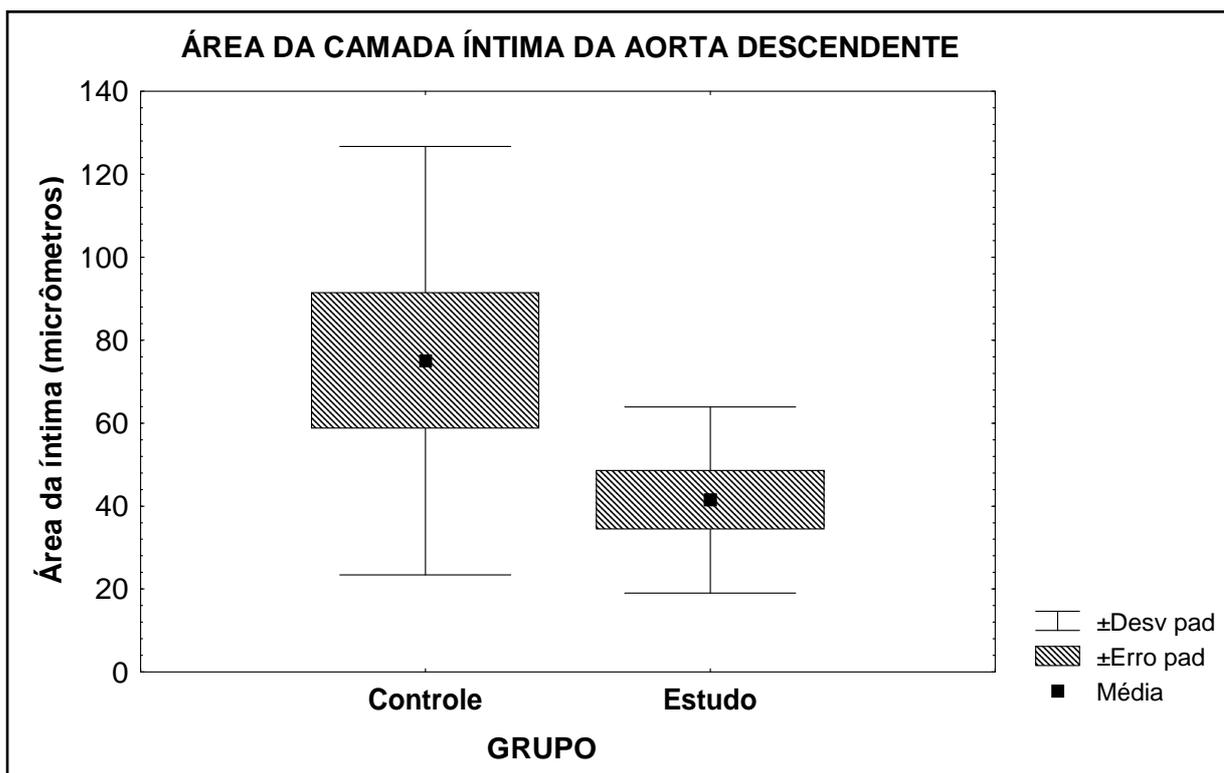


Figura 17 – Área da camada íntima da aorta descendente dos grupos estudados. Valor de  $p = 0,083$  para a área da camada íntima da aorta dos grupos estudados.

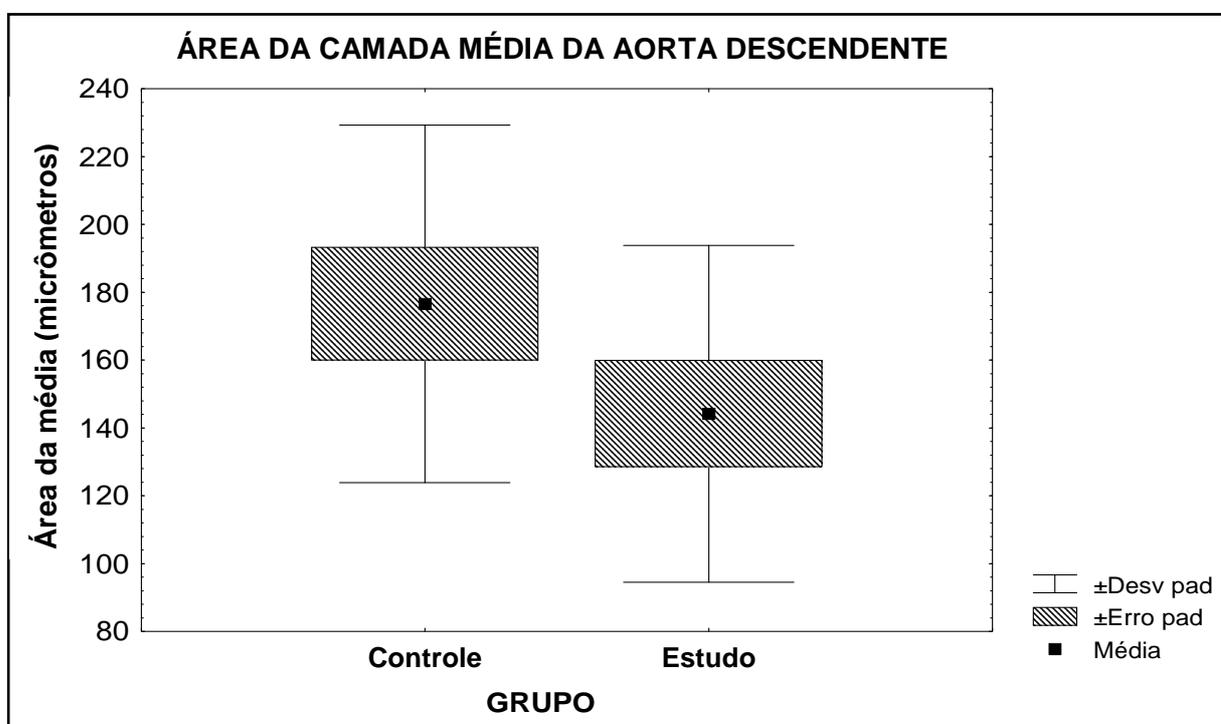
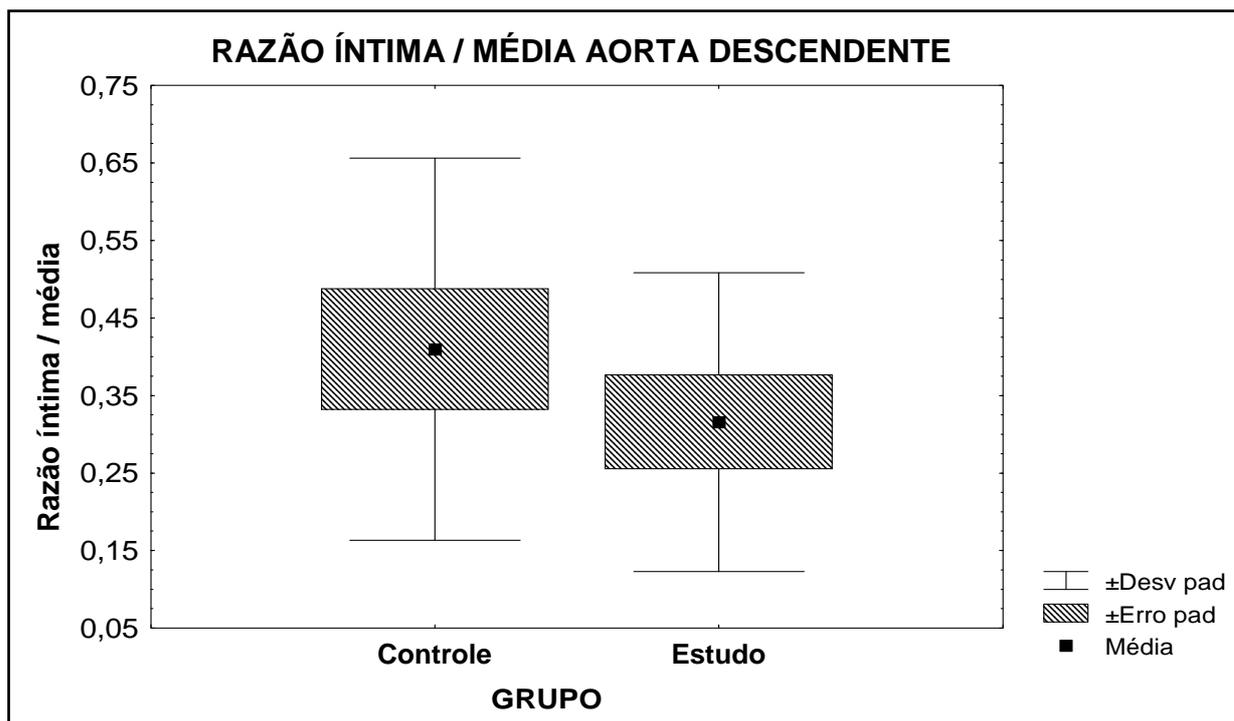


Figura 18 – Área da camada média da aorta descendente dos grupos estudados. Valor de  $p = 0,192$  para a área da camada média da aorta dos grupos estudados.



Valor de  $p = 0,355$  para a razão íntima / média da aorta descendente dos grupos estudados.

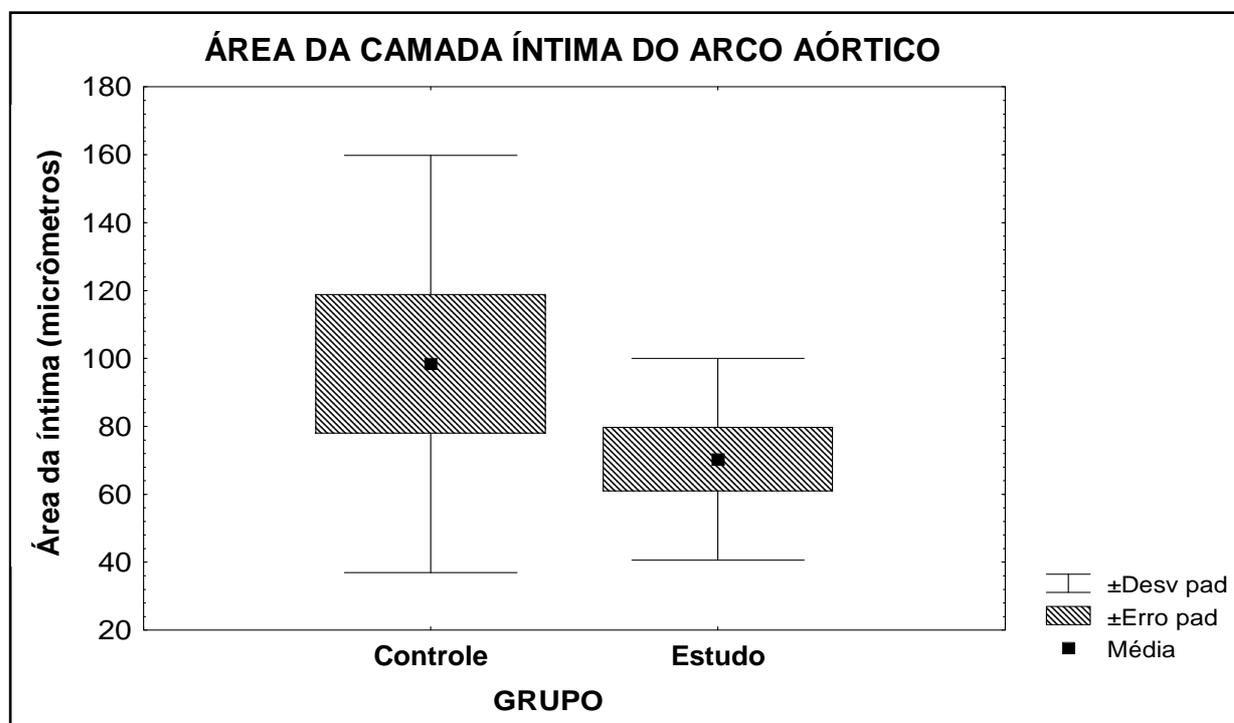


Figura 20 – Área da camada íntima do arco aórtico dos grupos estudados.  
Valor de  $p = 0,238$  para a área da camada íntima do arco aórtico dos grupos estudados.

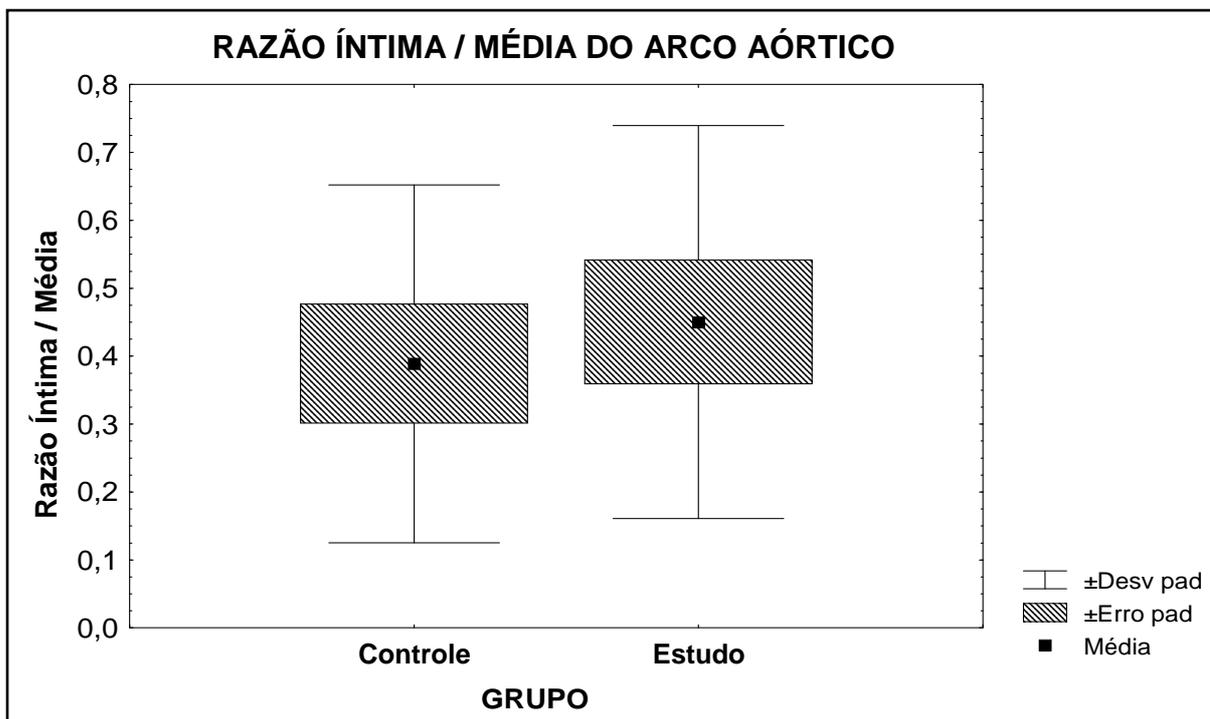


Figura 21 – Razão íntima / média do arco aórtico dos grupos estudados.  
 Valor de  $p = 0,473$  para a razão íntima / média do arco aórtico dos grupos estudados.

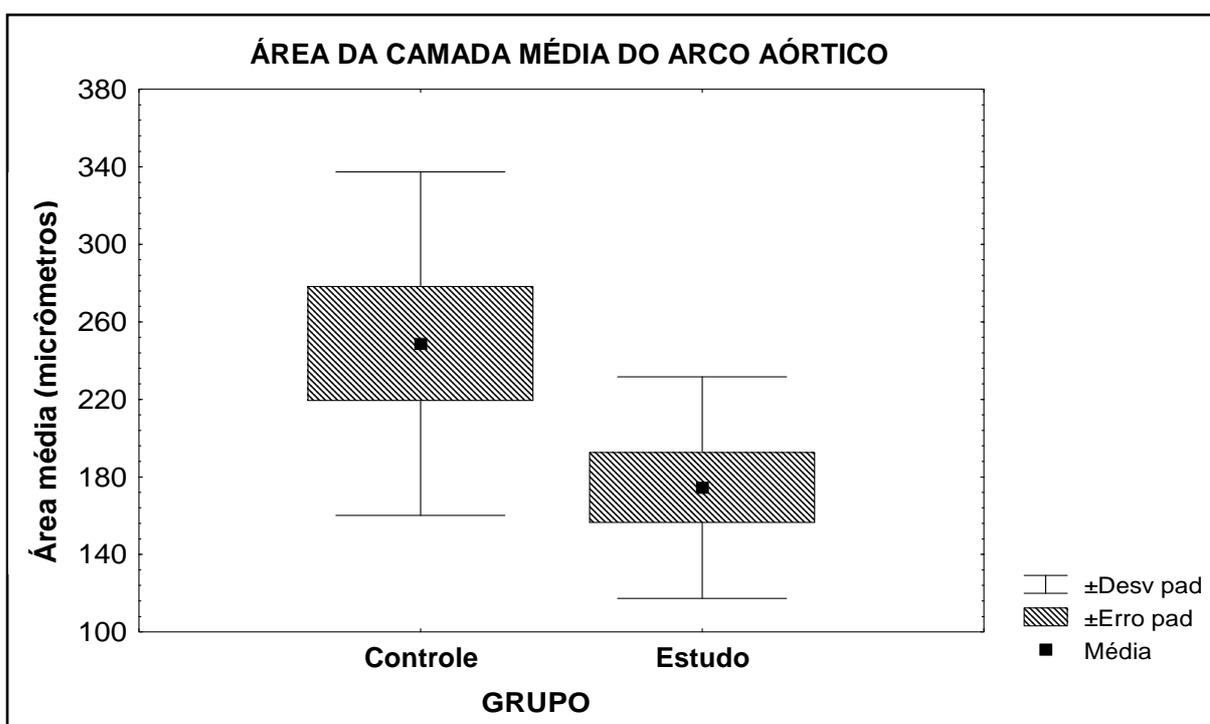


Figura 22 – Área média do arco aórtico dos grupos estudados.  
 Valor de  $p = 0,042$  para a área da camada média do arco aórtico dos grupos estudados.

Tabela 07 – Valores médios, mínimos e máximos das áreas da camada média, da camada íntima e da razão íntima média dos grupos estudados

Variável	Grupo	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Área íntima aort. desc. <sup>a</sup>	G1	10	75,10	10,59	165,57	51,66	0,083
	G2	10	41,50	4,97	80,75	22,43	
Área média aort. desc. <sup>b</sup>	G1	10	176,59	92,69	228,07	52,69	0,192
	G2	10	144,18	100,82	255,67	49,68	
Razão int/média aort. desc. <sup>c</sup>	G1	10	0,41	0,10	0,82	0,25	0,355
	G2	10	0,32	0,02	0,75	0,19	
Área íntima ar. aórtico <sup>d</sup>	G1	9	98,40	9,69	197,50	61,42	0,238
	G2	10	70,32	32,47	119,47	29,73	
Área média ar. aórtico <sup>e</sup>	G1	9	248,76	139,21	428,15	88,53	0,042
	G2	10	174,47	93,33	306,70	57,18	
Razão int/média ar. aórtico <sup>f</sup>	G1	9	0,39	0,07	0,85	0,26	0,473
	G2	10	0,45	0,21	1,15	0,29	

G1 = Grupo Controle; G2 = Grupo Estudo

(\*) Teste t de Student para amostras independentes,  $p < 0,05$

Legenda = A = área íntima aorta descendente; B = área média aorta descendente; C = razão íntima / média aorta descendente; D = área íntima arco aórtico; E = área média arco aórtico; F = razão íntima / média arco aórtico.

## 5.5 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

A análise de áreas positivas para as moléculas de adesão vascular (VCAM -1) e de adesão intercelular (ICAM-1) demonstrou não haver diferenças estatisticamente significativas nos segmentos do arco aórtico e da aorta descendente entre os grupos G1 e G2, conforme se observa na tabela 08 e nas figuras 23, 24, 25 e 26.

Tabela 08 – Valores médios, medianos, mínimos, máximos e desvio padrão da presença de VCAM - 1 e ICAM - 1 nos segmentos aórticos estudados.

(\*) Teste t de Student para amostras independentes,  $p < 0,05$

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
<b>VCAM_Aor_Desc<sup>a</sup></b>	CONTROLE	10	5339	5209.0	803.3	12529.3	3791.471
	ESTUDO	10	7201	5209.0	0	23156	6365.049
<b>VCAM_Ar Aort<sup>b</sup></b>	CONTROLE	9	8694	9884.9	344.7	14291.9	5068.516
	ESTUDO	10	12731	11755	4774	21546	5359,91
<b>ICAM_Aor_Desc<sup>c</sup></b>	CONTROLE	10	4784	3237	0	12075	4394.597
	ESTUDO	10	8500	7093	0	23156	6365,05
<b>ICAM_Ar Aort<sup>d</sup></b>	CONTROLE	9	7645	7368	1377	12652	3715,07
	ESTUDO	10	10178	10713	0	17028	4975,59

Legenda = A = VCAM aorta descendente; B = VCAM arco aórtico; C = ICAM aorta descendente; D = ICAM arco aórtico.

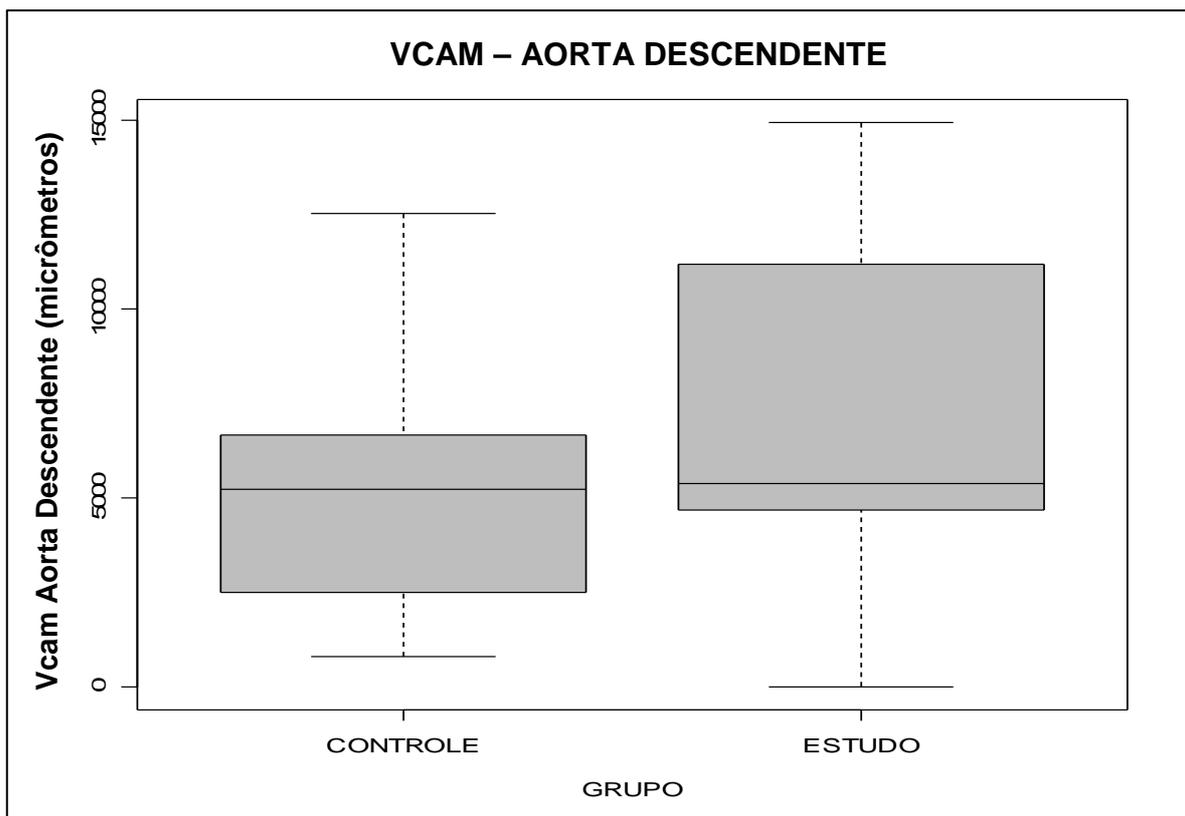


Figura 23 – Área da camada íntima da aorta descendente positiva para VCAM dos grupos estudados. Valor de  $p = 0.3291$  na área da camada íntima da aorta descende positiva para VCAM dos grupos estudados.

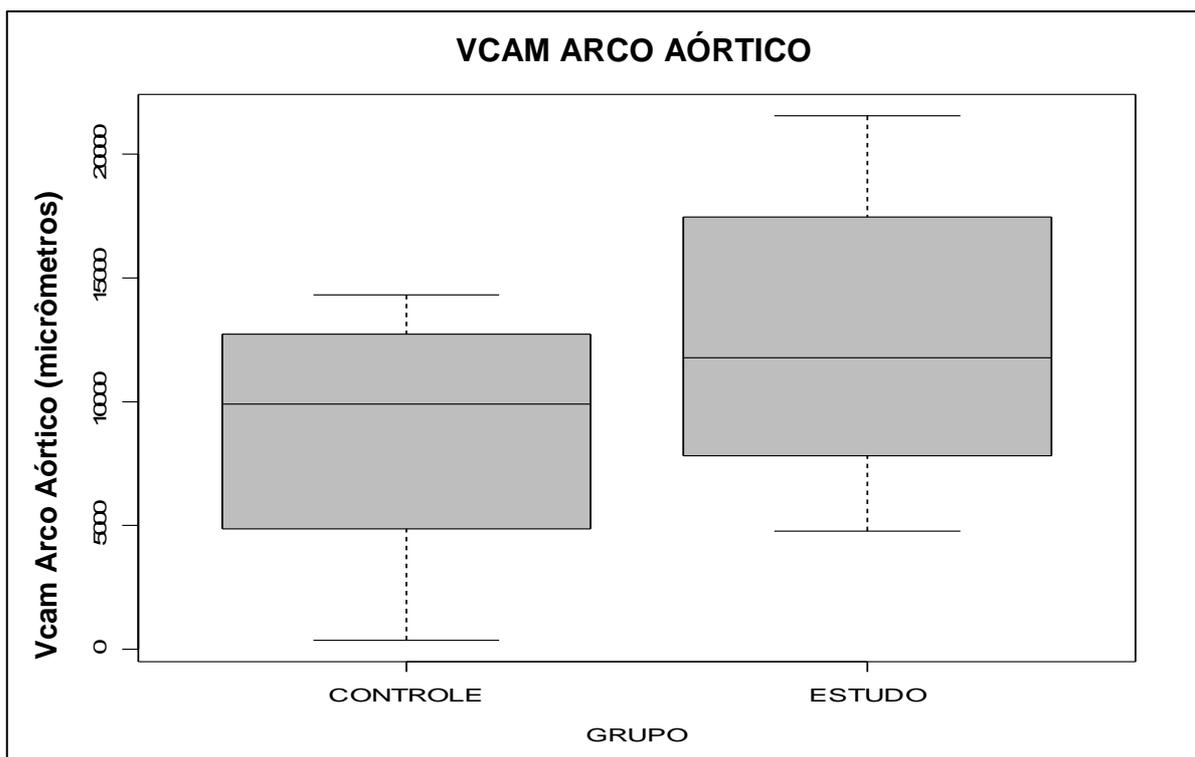


Figura 24 – Área da camada íntima do arco aórtico positiva para VCAM dos grupos estudados. Valor de  $p = 0.1218$  na área da camada íntima do arco aórtico positiva para VCAM dos grupos estudados.

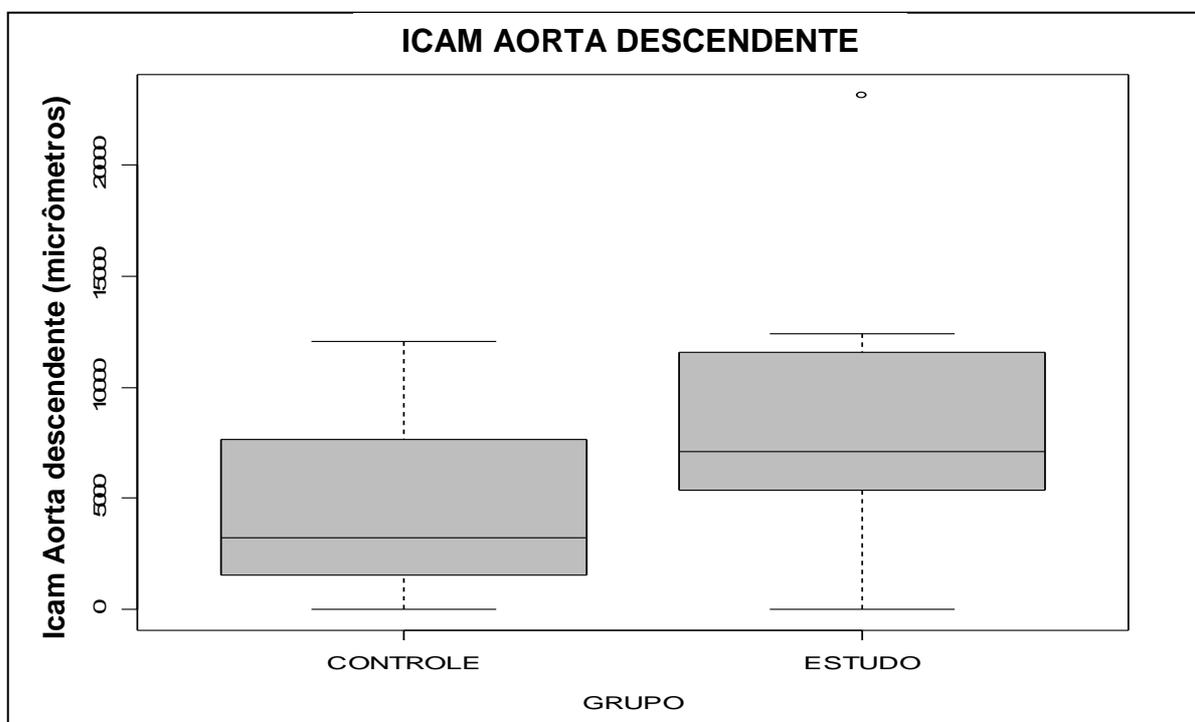


Figura 25 – Área da camada íntima da aorta descendente positiva para ICAM dos grupos estudados. Valor de  $p = 0.1550$  na área da camada íntima do arco aórtico positiva para VCAM dos grupos estudados.

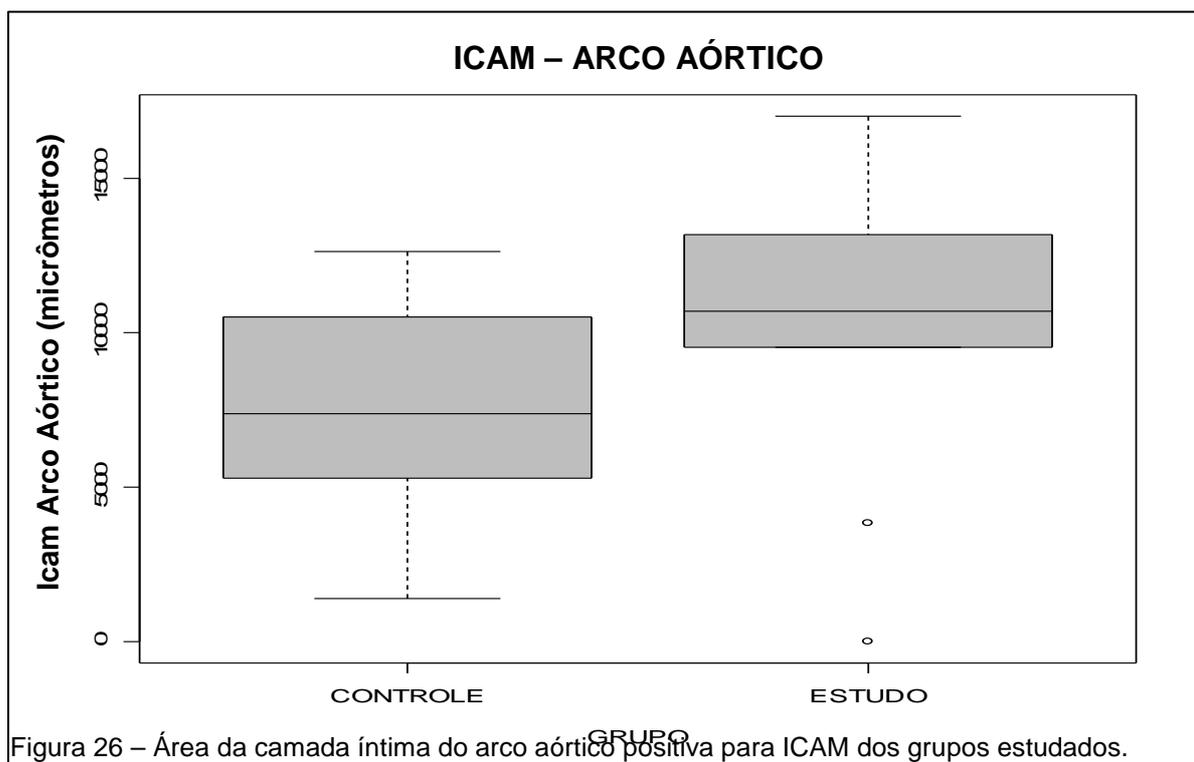


Figura 26 – Área da camada íntima do arco aórtico positiva para ICAM dos grupos estudados. Valor de  $p = 0.2235$  na área da camada íntima do arco aórtico positiva para VCAM dos grupos estudados.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Dietas hipercolesterolêmicas e modelos experimentais

Há muito a comunidade científica, na área da saúde, alerta a população mundial quanto aos malefícios ao sistema cardiovascular sobre o consumo de uma dieta hiperlipídica e rica em colesterol<sup>59, 60, 61</sup>.

A partir dos conhecimentos da elevada prevalência das doenças cardiovasculares e dos seus possíveis fatores de risco, é de vital importância a reprodução de lesões vasculares em modelos animais. Assim, é possível compreender a etiologia, bem como a minimização dos danos fisiológicos e tratamento dessa patologia.

Moghandasian (2002)<sup>61</sup> evidencia que os primeiros estudos experimentais de aterosclerose datam de 1908. Percebe-se que nessa época e nos anos subsequentes, várias formas de lesar as artérias utilizando modelos animais, como coelhos, foram desenvolvidas, empregando forças mecânicas, medicamentosas e alimentares.

Ramos (1987)<sup>62</sup> reporta que os 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 ao encontrado em seres humanos.

O padrão de 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<sup>63, 64, 65</sup>. Porém, limitações como alto custo do produto e dificuldade na aquisição, limitam a utilização do colesterol em pó Sigma Aldrich®.

Na literatura científica há muitos 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<sup>66, 67, 68</sup>.

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. Os resultados conclusivos demonstraram a formação de aterosclerose em ambos os grupos. Stuckey entre 1910 e 1911 observou que a gema de ovo era aterogênica e, em 1912, concluiu que havia um componente não protéico na gema que funcionava como agente aterogênico<sup>69</sup>.

Recentemente, Jaldin et al (2006)<sup>70</sup> realizaram estudo experimental cujo objetivo era desenvolvimento do processo aterosclerótico. Os autores evidenciaram que a adição de 0,5% de colesterol proveniente do ovo liofilizado, foi capaz de induzir a formação de aterosclerose leve. Afinal, foram observadas no exame macroscópico estrias gordurosas e no exame microscópico acúmulos de lipídeos discretos na íntima da aorta.

Com base nessas evidências, preconizou-se utilizar nesse protocolo experimental a adição de 1% de colesterol, proveniente do ovo liofilizado, na ração padrão dos coelhos para indução das lesões ateroscleróticas. Ao levar em consideração que uma gema de ovo apresenta 255 mg de colesterol<sup>71</sup>, os coelhos estudados consumiram diariamente 1555 mg de colesterol. Ao final do período experimental, observou-se que o acréscimo de 1% de colesterol favoreceu, em grande parte dos animais, ao processo etiológico de lesões ateroscleróticas avançadas grau III.

Conforme reportado por Jaldin et al (2006)<sup>70</sup> os coelhos hipercolesterolêmicos desenvolvem lesões ateromatosas, predominantemente, formadas por macrófagos ricos em lipídeos não apresentando, dessa forma, aspectos de lesões fibromusculares, fato usualmente encontrado em lesões ateroscleróticas em humanos. Stary et al (1995)<sup>18</sup> complementam que as lesões ateroscleróticas em humanos, progridem de maneira lenta e gradual, o que faz com que as lesões apresentem características normalmente excêntricas e com calcificações.

A realização de pesquisas que utilizem modelos animais, principalmente os pequenos animais, como os coelhos, apresenta diversas vantagens. Afinal, esses animais são de fácil acesso, baixo custo, apresentam a caracterização genética mais definida, além de que todos os passos envolvidos na pesquisa experimental podem ser devidamente controlados <sup>72</sup>.

## 6.2 CONSUMO ALIMENTAR E GANHO DE PESO PONDERAL

As dietas hiperlipídicas, ofertadas em longo prazo, favorecem ao ganho de peso e ao acúmulo de gordura corporal. Segundo dados da OMS (1998)<sup>73</sup>, o lipídio dietético é estocado como gordura corporal com uma eficiência de 96%. Em animais, os estudos experimentais apontam que a alimentação hiperlipídica é um componente importante na etiologia do ganho de peso, uma vez que dietas ricas em gordura contribuíram para o excesso de gordura corporal em macacos, suínos, cães e ratos <sup>74</sup>.

Muitos estudos demonstram a estreita relação entre o consumo de dietas ricas em fibras com a perda de peso corporal. Afinal, as fibras dietéticas quando consumidas exercem efeitos metabólicos adicionais como a promoção de saciedade precoce, retardo no esvaziamento gástrico e diminuição na absorção de açúcares e gorduras dietéticas. Nota-se que essas ações isoladas ou em conjunto promovem a redução do peso corporal <sup>33, 34, 35, 36</sup>. Essa afirmativa se faz presente nos resultados do estudo. Os coelhos que receberam a adição de semente de linhaça apresentaram um ganho de peso corporal inferior comparado com o grupo que não recebeu. Dados controversos foram evidenciados por Dupasquier et al (2006)<sup>75</sup> em estudo experimental com coelhos. Os animais estudados independente da dieta ser adicionada ou não com a semente de linhaça, apresentaram ganho de peso semelhantes.

O efeito redutor das fibras no peso corporal é extremamente benéfico. Streppel et al (2000)<sup>76</sup> salientam que para cada 10% de aumento no peso corporal, há uma incidência de doenças cardiovasculares em aproximadamente 20% além da elevação do colesterol plasmático em torno de 12 mg/dl. Howarth et al (2001) <sup>77</sup>

observaram em estudo que o consumo de 14 gramas de fibra/dia, por mais que 2 dias, associa-se com uma diminuição no consumo de energia e com uma perda de peso de 1,9 Kg após 3,8 meses. Em humanos, diversos estudos foram realizados para mostrar a influência do consumo de fibras no peso corporal. Em estudo recente, Biretvedt et al (2005) <sup>78</sup> mostraram o potencial efeito da suplementação de fibras na redução do peso. Mulheres consideradas com sobrepeso de acordo com o índice de massa corporal (IMC) que fizeram uso do suplemento enriquecido com fibras apresentaram, após 24 semanas, uma diminuição de 8 kg do peso corporal.

O teor de fibra alimentar presente na semente de linhaça é expressivo. Na sua composição, encontram-se em maior concentração as fibras solúveis (mucilagens) correspondendo a 7% do que fibras insolúveis que correspondem a 3%<sup>5</sup>. Esta classificação apresenta importância em virtude das diferenças entre as ações exercidas. Afinal, os efeitos fisiológicos das fibras solúveis diferem-se dos efeitos das fibras insolúveis <sup>78</sup>.

As fibras solúveis, altamente fermentáveis, são responsáveis pelo aumento da viscosidade e do conteúdo intestinal <sup>79</sup>. De acordo com alguns trabalhos, o aumento da viscosidade atua como uma barreira física capaz de dificultar a ação das enzimas digestivas e sais biliares no bolo alimentar, causando uma redução na digestão e absorção de nutrientes como açúcar e gordura <sup>80</sup>.

Em adição, os mesmos autores complementam que as fibras solúveis também podem interagir com as células do epitélio intestinal modificando a ação dos hormônios fazendo, dessa forma, com que ocorra um aumento na secreção de proteínas endógenas e de sais biliares. Essas ações promovem uma excreção maior dos produtos endógenos, favorecendo a perda de peso corporal.

Em nosso estudo, a análise comparativa do ganho de peso corporal entre os grupos de animais evidenciou uma associação inversa entre o consumo de semente de linhaça e o ganho de peso corporal. Esse ganho diferenciado pode estar vinculado às ações fisiológicas das fibras. Afinal, não se pode atribuir ao efeito da saciedade precoce, promovido pelas fibras, uma vez que ambos os grupos apresentaram consumo médio diário de 150 gramas de ração.

### 6.3 EFEITO DA SEMENTE DE LINHAÇA NAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS ANALISADAS

A inclusão regular da semente de linhaça no consumo alimentar diário caracteriza-se por ser uma estratégia terapêutica profilática para a etiologia das doenças cardiovasculares<sup>05, 11, 53, 55, 81</sup>.

Muito se discute e se estuda na literatura científica sobre os potenciais efeitos benéficos da semente de linhaça. Entre esses se encontram a redução nos níveis séricos de colesterol total e na sua fração de LDL – C. A maioria dos estudos sugere que a ingestão diária de 15 a 50 gramas/dia de semente de linhaça é responsável pela redução do LDL – C em 8 a 15%<sup>53, 81</sup>.

Pode-se observar no nosso trabalho, por meio de análise comparativa dos níveis séricos de colesterol total entre os grupos de animais estudados, que houve um aumento de colesterol total e de LDL – C em ambos os grupos. Porém, o grupo que recebeu o acréscimo de semente de linhaça (30g/dia) apresentou uma 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 (1.676 mg/dl) e LDL – C (1596,12 mg/dl) inferiores ao grupo G2 (estudo) (1006,83 mg/dl e 1074,32 mg/dl), respectivamente. Esse potencial efeito redutor da semente de linhaça é muito positivo para a saúde cardiovascular. Afinal, sabe-se que a redução de 1mg/dl no LDL – C resulta em uma diminuição em cerca de 1 a 2% no risco relativo para as morbidades cardiovasculares<sup>82</sup>.

Resultados semelhantes foram reportados em estudos prévios. Prasad (2005)<sup>56</sup> analisou 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 esse 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.

No mesmo sentido, Cunanne et al (1995)<sup>04</sup> perceberam que a adição de 50 g/dia semente de linhaça em “*muffins*” consumidos por 10 sujeitos da pesquisa, foi responsável pela redução de 8% do LDL – C. Shakir e Madhusudhan (2007)<sup>83</sup> demonstraram que a inclusão de 15% de semente de linhaça, em ratos hipercolesterolêmicos, previne a progressão da hipercolesterolemia e produz reduções significativas na concentração sérica de colesterol total (13,76%) e LDL – C (44%).

Resultados controversos em pequena escala são citados na literatura. Em estudo recente, Harper et al (2006)<sup>53</sup> avaliaram o efeito da suplementação do 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. Nenhum efeito nos níveis séricos de colesterol total foi encontrado por Dodin et al em 2008<sup>84</sup>. Os autores analisaram a influência da semente de linhaça (40 g/dia) em 199 mulheres que foram acompanhadas por 12 meses. Dusparquier et al (2005)<sup>75</sup> ao avaliar o potencial efeito hipolipídico da semente de linhaça em coelhos hipercolesterolêmicos percebeu que não houve diferenças na concentração sérica de colesterol total entre os grupos analisados.

Essas divergências podem ser atribuídas à quantidade de colesterol adicionado à dieta, a forma e a quantidade de consumo da semente de linhaça. Feng et al (2003)<sup>85</sup> ressaltam que as melhores formas de se consumir a semente de linhaça de maneira a aproveitar as propriedades dos seus constituintes funcionais é assada, cozida ou triturada. Bhathena et al (2003)<sup>57</sup> salientam que a utilização do grão inteiro de semente de linhaça dificulta na digestão e no aproveitamento das suas propriedades funcionais.

Os mecanismos pelos quais a semente de linhaça atua na prevenção das doenças cardiovasculares não estão totalmente esclarecidos. 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<sup>30, 56, 84, 86, 87</sup>.

Pesquisas recentes reportam que as lignanas atuam positivamente na contenção 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<sup>88</sup>. Em acréscimo, Lucas et al

(2004)<sup>87</sup> evidenciam que as lignanas apresentam capacidades de modular enzimas chaves envolvidas no metabolismo do colesterol como a 7 –  $\alpha$  hidroxilase e a acil-Coa colesterol transferase (ACAT). Essas ações fisiológicas ocorrem em virtude dos compostos presentes nas lignanas. Afinal, as lignanas contêm aproximadamente 34 a 38% de 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<sup>55, 89</sup>.

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 relatado a ação hipolipemiante das fibras solúveis<sup>38, 39</sup>.

A NECP (*“Third Report of the National Cholesterol Education Program”*)<sup>90</sup> 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%. Pereira et al (2004)<sup>91</sup> complementam que a cada 10 gramas de aumento de fibras no perfil dietético, associa-se com uma redução de 14 a 27% nos eventos cardiovasculares.

Existem inúmeras teorias para 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, os propinatos produzidos na fermentação da fibra solúvel pelas bactérias colônicas são absorvidos e convertidos em succinil-coenzima A no fígado podendo inibir a síntese de colesterol<sup>92</sup>.

Dodin et al (2008)<sup>84</sup> ao ofertarem 40 gramas/dia de semente de linhaça a mulheres demonstraram 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 para a redução dos eventos cardiovasculares, em decorrência no aumento da excreção de ácidos biliares associado a uma redução na absorção intestinal de colesterol. Esses fatores agregados induzem a maior recaptação do LDL – C circulante pelos seus receptores<sup>93</sup>.

Achados semelhantes foram relatados por Kim e Schin (1998)<sup>94</sup>, 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 um aumento significativo do HDL – C, uma diminuição do LDL - C e maior excreção fecal de lipídeos e de sais biliares quando comparados com o grupo controle.

No que se refere à propriedade funcional do ômega - 3 presente na semente de linhaça, muitos estudos demonstram a associação inversa entre o consumo de ômega - 3 e os níveis séricos de colesterol total e LDL – C <sup>44</sup>. 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 <sup>95</sup>.

Ao estudar coelhos hipercolesterolêmicos, Ahtani et al (1995) <sup>96</sup>, verificaram que o grupo de animais tratados com ácidos graxos ômega – 3 apresentou elevação significativa do LDL – C. Na mesma linha de pesquisa desse protocolo experimental, Yano et al (1995)<sup>97</sup> observaram, em coelhos hipercolesterolêmicos redução do colesterol total e na LDL – C, no grupo tratado com 300 mg/kg de peso dos coelhos de EPA por quatro semanas.

Os trabalhos relatados na literatura em animais de experimentação apresentam resultados conflitantes, quando se referem ao efeito dos ácidos graxos ômega – 3 sobre o perfil lipídico. Entretanto, o principal efeito do ácido linolênico sobre as doenças cardiovasculares estaria relacionado à sua atividade anti plaquetária e antiinflamatória <sup>98</sup>.

Ao analisar a concentração plasmática de HDL – C percebe-se que os grupos estudados não apresentaram diferenças significantes. Após o período experimental, evidenciou-se que os níveis de HDL – C sofreu aumento no grupo G1 e no grupo G2.

Alguns estudos demonstram que, na presença de semente de linhaça, a concentração sérica de HDL – C podem aumentar ou reduzir <sup>30, 99</sup>. Lucas et al (2004)<sup>87</sup> relatam em estudo que os níveis de HDL – C não sofreram nenhuma alteração significativa em ambos os grupos estudados (com ou sem semente de linhaça). Por outro lado, Prasad (2005)<sup>56</sup> observou 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 associado ou não ao tempo de duração da oferta da dieta hipercolesterolêmica

No presente estudo, pode-se observar que o consumo da dieta hipercolesterolêmica a 1% proveniente do ovo liofilizado corrobora com as evidências descritas por Prasad (2005)<sup>56</sup>. Esse achado pode ser atribuído à presença do ovo liofilizado como forma de tornar a dieta hipercolesterolêmica. Afinal, Weegemuns et al (2001)<sup>71</sup> realizaram uma meta análise com 17 estudos, na qual se evidenciou em todos os estudos que o elevado consumo de ovo promove um aumento no HDL – C. Dessa forma, os autores concluíram que o aumento na ingestão de ovo, aumenta a concentração sérica de HDL – C, em partículas pequenas e densas, favorecendo, assim, ao risco etiológico para as doenças cardiovasculares.

No que se diz respeito às concentrações plasmáticas de triglicerídeos, observa-se que não houve diferenças estatísticas significantes nos grupos analisados. A dose de semente de linhaça utilizada nesse protocolo experimental não foi efetiva para promover a redução de triglicérides no grupo G2. Estudos prévios em animais reportam efeitos diversos da semente de linhaça na concentração de triglicerídeos.

Lucas et al (2004)<sup>87</sup> corroboram com esses achados. Em estudo realizado com *hamsters* ficou evidente que os animais que receberam o isolado de semente de linhaça apresentaram níveis elevados de triglicerídeos similares aos grupos que não receberam. No mesmo sentido, Cunanne et al (1995)<sup>04</sup> concluíram que a ingestão de 50 g/dia de linhaça, por 4 semanas, não promoveu alterações nos triglicerídeos plasmáticos. Porém, há pesquisadores evidenciam o efeito positivo do uso da semente de linhaça no decréscimo nos níveis de triglicerídeos<sup>100</sup>.

Esses resultados inconstantes podem ser recorrentes às diferentes dosagens, ao tipo e a quantidade de semente de linhaça, assim como também, pelo modelo animal utilizado<sup>27, 28, 57, 81, 101</sup>.

No entanto, até o presente momento, não há na literatura científica explicações plausíveis para a elevação nos níveis de triglicerídeos, sendo assim, necessárias maiores investigações para esclarecer esse mecanismo<sup>102</sup>.

#### 6.4 EFEITO DA SEMENTE DE LINHAÇA NA PREVENÇÃO DA LESÃO ATEROSCLERÓTICA

O processo aterosclerótico, conforme já estudado e documentado na comunidade científica, vincula-se inicialmente às lesões na parede endotelial. Em condições fisiológicas, o endotélio contribui com a homeostase vascular por promover alterações funcionais adaptativas. 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<sup>103, 104</sup>.

Na presença de fatores inflamatórios e de fatores de risco cardiovascular, como as dietas hipercolesterolêmicas, ocorre a perda da ação protetora do endotélio, originando o aumento da propensão à vasconstrição, trombose, inflamação e proliferação celular na parede vascular. Esses fatores agregados contribuem para a etiologia da placa aterosclerótica<sup>103</sup>.

Na presença de dietas aterogênicas, ricas em gordura saturada e colesterol, ocorre uma liberação demasiada de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas apresentam uma reatividade química muito alta com outras biomoléculas podendo desencadear a peroxidação lipídica, levando a alterações na membrana celular, fato esse que facilita a oxidação do LDL – C (figura 28). Dessa forma, conclui-se que as dietas hipercolesterolêmicas são favoráveis à etiologia das lesões ateroscleróticas, podendo ser chamadas de dietas pro – aterogênicas<sup>99, 100, 101, 102</sup>.

Em estudos preliminares alguns autores observaram que a dieta hipercolesterolêmica a 1% é responsável pela promoção na redução da atividade antioxidante endógena, a qual é sinalizada por atuações enzimáticas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase). Em adição, outros autores evidenciaram que ao receber a dieta hipercolesterolêmica, os coelhos, apresentaram níveis séricos elevados de malondialdeído (MDA), responsável pela mensuração da peroxidação lipídica<sup>30, 56, 105</sup>.

Prasad (2007) <sup>105</sup> demonstrou que o desenvolvimento da aterosclerose nos coelhos, associou-se com a hipercolesterolemia e ao aumento sérico de MDA no tecido aórtico. Em adição, o mesmo autor elenca que o aumento sérico no MDA sugere um incremento nos radicais livres, os quais se responsabilizam pela indução ao dano endotelial e modulação nas moléculas de adesão.

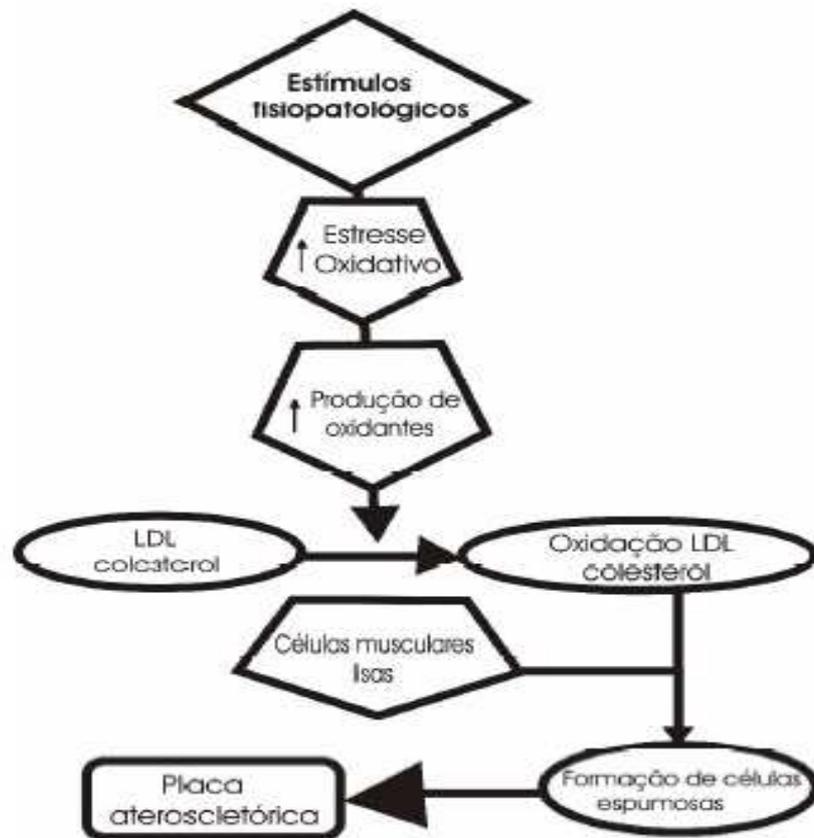


Figura 27 – Desenvolvimento do estresse oxidativo da placa aterosclerótica  
 Fonte: Neves, MN. (1997) <sup>37</sup>.

Nesse estudo experimental, utilizou-se como dieta pro – aterogênica a ração suplementar acrescida de 1% de colesterol, proveniente do ovo integral liofilizado. Lee et al (2003) <sup>106</sup> evidenciam que dietas hipercolesterolêmicas produzem espessamento intimal associado à presença de células espumosas. Essa afirmativa se faz presente no nosso estudo. Afinal, por meio da análise morfométrica, percebe-se que todos os coelhos desenvolveram lesões ateroscleróticas avançadas no arco

aórtico (grau III) e na aorta descendente mostrando dessa forma, que o modelo dietético empregado é extremamente eficaz no processo aterogênico.

Ao observar a cascata de eventos envolvidos na aterogênese, verifica-se que a inclusão da semente de linhaça, possa ser uma medida terapêutica ou preventiva dessa morbidade. Conforme explanado no capítulo introdutório, nessa semente encontram-se diversas propriedades funcionais que exercem efeitos cardioprotetores. As lignanas, composto isolado da semente de linhaça, apresentam atividades antioxidantes enquanto que o ômega – 3 possui ação anti – agregação plaquetária e antiinflamatória.

Lucas et al (2004)<sup>87</sup> reportam que a ingestão da semente de linhaça pode reduzir a formação das lesões ateroscleróticas em 50% enquanto que a lignana, demonstra-se mais eficaz, pois apresenta um efeito redutor de 75%. Prasad et al (1998)<sup>101</sup> em estudo semelhante ao nosso protocolo experimental analisaram a atividade antiaterogênica da semente de linhaça em diferentes grupos de coelhos. Os animais foram submetidos a diferentes tratamentos dietéticos e a hipercolesterolemia foi induzida em alguns grupos com a adição de 1% de colesterol na ração suplementar. Ao final do estudo, os pesquisadores findaram que a oferta diária de semente de linhaça, via oral, na dosagem de 7,5 g/Kg de peso dos animais, por 8 semanas, foi responsável pela redução do desenvolvimento da aterosclerose em 69%.

Diversos achados clínicos apontam a eficácia da utilização do composto isolado da semente de linhaça o secoisolariciresinol (SDG) na redução da aterogenicidade. Prasad (2005)<sup>56</sup>, ao estudar coelhos submetidos a diferentes tratamentos dietéticos, observou que a administração de 40 mg/kg de peso corporal ao dia de SDG, reduziu em 34% a formação das placas ateroscleróticas. Em outro estudo, o mesmo autor evidenciou que o SGD é capaz de reduzir a formação de lesão aterosclerótica em 75%<sup>30</sup>.

Lucas et al (2004)<sup>87</sup> corroboram com essas informações. Em estudo experimental, observou-se que os hamsters que foram suplementados diariamente com SDG tiveram lesões ateroscleróticas menores quando comparado com o grupo controle. Prasad (1999)<sup>30</sup> reporta que esses achados relacionam-se à atividade antioxidante do SGD, à redução do MDA associado com aumento na atividade antioxidante endógeno no tecido do arco aórtico.

Gebauer et al (2008)<sup>107</sup> reportam que a composição nutricional da semente de linhaça é composta por 45% de lipídeos, dos quais o ácido alfa – linoléico (ômega 3) representa 55%, denotando assim, a grande quantidade desse ácido graxo poliinsaturado nessa semente.

O ômega - 3 atua na prevenção da aterosclerose, em partes, pela redução da trigliceridemia. Porém evidências enfatizam que sua atuação é mais significativa na redução da agregabilidade plaquetária, nos mecanismos pró – inflamatórios e no relaxamento da parede vascular <sup>108</sup>. Um estudo prospectivo de Lyon realizado na França com 605 pacientes, acompanhados por 46 meses, relatou uma diminuição na incidência de complicações cardiovasculares, sem alterar os níveis de lipídios plasmáticos. Essa constatação foi possível por meio da incorporação de hábitos alimentares saudáveis como o preconizado pela dieta do Mediterrâneo (pobre em gorduras saturadas, rico em fibras e ômega - 3)<sup>109</sup>. Porém, nessa investigação não foi possível imputar apenas ao ômega 3 esse efeito benéfico.

Um clássico estudo clínico, randomizado e controlado sobre questão do ômega 3, foi o *Diet and Reinfarction Trial (DART)* <sup>110</sup>. 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, por dois anos, doses de 500 a 800 mg/dia de ácido graxo ômega 3. Allman et al (1995) <sup>111</sup> constataram que o consumo de 40 gramas de semente de linhaça por 23 dias reduz a agregação plaquetária.

Na literatura científica tem sido reportada, em estudos prévios, a eficácia da utilização do óleo de peixe na redução da aterosclerose hipercolesterolêmica <sup>112, 113</sup>. No mesmo sentido, diversos estudos têm sido conduzidos para observar a eficácia da utilização da semente de linhaça, como fonte de ácido alfa – linolênico, na prevenção da aterosclerose. Freese et al (1994)<sup>47</sup> randomizaram aleatoriamente dois grupo de pacientes. Enquanto um grupo recebeu a suplementação diária de 5.9 g/dia de óleo de linhaça, o outro recebeu 5.2 g/dia de óleo de peixe. Ao final do estudo, os autores concluíram que ambos os grupos apresentaram reduções significativas na agregação plaquetária.

Alguns questionamentos são realizados quanto à utilização do ômega – 3 nas doenças cardiovasculares, mesmo já sendo elucidado o efeito benéfico que o ácido linolênico exerce para a integridade da saúde cardiovascular. Porém, em situações

de hipercolesterolemia, acredita-se que a presença do ômega 3 possa acentuar a peroxidação lipídica, considerando o maior número de duplas ligações nessas moléculas. Em conseqüência, acentua-se a peroxidação da parede arterial, e por esse mecanismo, somado à elevação do colesterol plasmático, compromete-se a função endotelial, fato que pode induzir ou agravar o processo aterogênico<sup>114, 115</sup>. Dessa forma, acredita-se que a suplementação de ômega 3, ficaria reservada como agente antiplaquetário e antitrombótico e no tratamento das hipertrigliceridemias.

Em nosso estudo, ao analisar de forma comparativa a existência e a extensão das lesões ateroscleróticas dos animais estudados, percebe-se que o consumo da semente de linhaça, não se mostrou eficaz na redução da aterogenicidade. Secções histológicas do arco aórtico e da aorta descendente demonstram similaridades na espessura da íntima e na razão íntima / média, fato esse que não se esperava presente com a atividade anti-aterogênica da semente de linhaça. Esses achados evidenciados no nosso experimento contradizem algumas informações prévias elencadas anteriormente.

Porém, achados semelhantes ao protocolo experimental foram reportados por Duspaquier et al (2006)<sup>75</sup>. Os autores randomizaram coelhos em quatro grupos dietéticos: Grupo I = dieta padrão; G II = Dieta padrão acrescida com 10% de SGD; GIII = Dieta padrão acrescida de 0,5% de colesterol e GIV = dieta padrão acrescida de 0,5% de colesterol juntamente com 10% de SGD. Ao final do período experimental, 8 semanas, observou-se que ambos os grupos G III e G IV apresentavam formação de placas ateroscleróticas.

Existem diversas hipóteses para explicar esse evento contraditório. Rouleau et al (1893)<sup>116</sup> reportam que a gravidade das lesões ateromatosas está diretamente associada com o grau da dieta hipercolesterolêmica. Afinal, conforme já comentado, dietas saturadas em gorduras e colesterol, promovem a desregulação do sistema antioxidante endógeno, além de favorecer a permeabilidade do endotélio para a incorporação do LDL – C. Observa-se que a dieta aterogênica utilizada nesse experimento, desenvolveu lesões extremamente avançadas. E, diante desse fato, torna-se difícil qualquer alimento com propriedade funcional, como a semente de linhaça, na dosagem administrada, apresentar efeitos anti – aterogênicos.

Outra observação importante, é ao fato de que, na literatura encontram-se resultados positivos que relacionam o uso da semente de linhaça na prevenção da

gênese da aterosclerose quando se administra o seu composto isolado (SDG). Porém, em recente estudo com coelhos hipercolesterolêmicos, Prasad (2007)<sup>105</sup> concluiu que o composto isolado da semente de linhaça, administrado por 4 meses, não produz regressão da lesão, mas sim previne a aceleração do processo aterosclerótico. Assim, dessa forma, pode-se inferir que a semente de linhaça exerce uma atuação fundamental na prevenção, mas não no tratamento dos eventos coronarianos. Em adição, Duspaquier et al (2006)<sup>75</sup> concluíram que dietas hipercolesterolêmicas por longos períodos, como 8 semanas, limitam a atividade anti-aterogênica da semente de linhaça.

Em síntese, percebe-se que algumas limitações metodológicas como a intensidade da dieta hipercolesterolêmica, a quantidade e a forma de utilização da semente de linhaça e o tempo de estudo, são fatores vivenciados nesse protocolo experimental que podem ter colaborado para os resultados encontrados.

## 6.5 EFEITO DA SEMENTE DE LINHAÇA NO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Hoje, a comunidade científica, não define a aterosclerose apenas como uma patologia derivada de desordens no metabolismo e da deposição lipídica. Observa-se que a história natural da aterogênese estende-se além da dislipidemia. Afinal, associado à etiologia do processo aterosclerótico, há um envolvimento vascular mediado por processos inflamatórios<sup>60, 117</sup>.

Vários mediadores têm sido utilizados na prática clínica e em estudos associados à patogênese da aterosclerose<sup>118</sup>. Entre esses marcadores, destacam-se os utilizados no nosso protocolo experimental, como as moléculas solúveis de adesão celular: molécula de adesão vascular – 1 (VCAM - 1) e molécula de adesão intercelular – 1 (ICAM - 1).

Trabalhos realizados nos últimos anos demonstram que na fase inicial do processo aterogênico há expressão de várias moléculas de adesão na superfície de células endoteliais. Estas moléculas modulam a interação do endotélio vascular com os leucócitos. E, este recrutamento de leucócitos mononucleares para a camada íntima dos vasos é um evento celular precoce que ocorre no ateroma em formação

60, 119, 120. Dessa forma, após a ativação leucocitária, moléculas endoteliais de adesão, como VCAM – 1 e ICAM – 1, começam a participar do processo de ativação inflamatória.

Os leucócitos mononucleares, após entrarem no ateroma nascente, por meio de adesão as células endoteliais e penetração na camada íntima por diapedese, iniciam a captação de lipídeos modificados. Entre esses, estão, principalmente, o LDL – C oxidado (LDL - OX) pelas espécies reativas de oxigênio (EROS), derivados do estresse oxidativo, originando, assim, as células espumosas (*foam cells*)<sup>117</sup>. Em adição, Kunne et al (1992)<sup>121</sup> reportam que uma das características peculiares do LDL – OX é o aumento acentuado de seu conteúdo de lisofosfatidilcolina. Essas substâncias apresentam propriedade quimiotáxica para monócitos e linfócitos T, inibe o relaxamento do endotélio e induz à expressão das moléculas solúveis de adesão vasculares e intercelulares nas células endoteliais.

Determinantes dietéticos contribuem para a etiologia desse processo. Evidências científicas sugerem que os macronutrientes da dieta promovam o estresse oxidativo, contribuindo, dessa forma, para a gênese do processo inflamatório crônico<sup>122</sup>. Entre os macronutrientes, os lipídeos são os mais estudados quanto ao efeito dos componentes da dieta na inflamação. Sugere-se que a ingestão de uma refeição com alto conteúdo lipídico leve à ativação endotelial, fato esse evidenciado pelas elevadas concentrações de moléculas de adesão celular circulantes<sup>122</sup>.

Essa afirmativa condiz com nossos achados. A administração diária de uma dieta hipercolesterolêmica desencadeou a formação de lesões ateroscleróticas associadas à presença de processo inflamatório. Afinal, ambos os grupos experimentais apresentaram áreas positivas significativas para VCAM – 1 e ICAM – 1 na camada íntima dos segmentos aórticos analisados.

Nappo et al (2002)<sup>122</sup> demonstraram previamente a estreita relação entre dietas hiperlipídicas e a expressão de moléculas de adesão celular. Em estudo clínico, randomizado, simples cego cruzado, realizado com 20 pacientes, observou-se que a expressão de VCAM – 1 e ICAM – 1 foi significativamente mais elevada em pacientes que fizeram a ingestão de dieta hiperlipídica. Seguindo a mesma linha de pesquisa, Cerillo et al (2004)<sup>123</sup> investigaram o efeito da ingestão de 75 gramas de

gordura por 12 semanas. Ao final do estudo, evidenciou-se que a sobrecarga lipídica resultou em um aumento plasmático de VCAM – 1 e ICAM – 1.

Porém, não se esperava, no nosso estudo experimental, a elevada concentração de moléculas solúveis de adesão celular no grupo de animais que foram suplementados diariamente com a semente de linhaça. Conforme já elencado anteriormente, sabe-se que na semente de linhaça encontra-se uma elevada concentração de ômega – 3, fato esse que lhe atribui propriedade antiinflamatória.

A relação entre inflamação e consumo de ácidos graxos poliinsaturados, como o ômega 3, é bem discutida na literatura. Muitos estudos têm demonstrado uma correlação inversa entre o ômega – 3, o processo inflamatório e a disfunção endotelial. Acredita-se que esse ácido graxo poliinsaturado é responsável pela redução na expressão de marcadores inflamatórios entre os quais se encontram as moléculas de adesão vascular 1 e moléculas de adesão intercelular 1<sup>44, 120</sup>.

Em estudo conduzido por Rallidis et al (2004)<sup>124</sup>, observou-se que a suplementação dietética de ácidos graxos poliinsaturados em pacientes dislipidêmicos, por 12 semanas, reduziu a expressão de VCAM – 1. Duspaquier et al (2007)<sup>125</sup> corroboram com esses resultados. Os pesquisadores reportaram que a dieta suplementada com semente de linhaça foi responsável pela redução da infiltração de macrófagos para o espaço subendotelial. Em adição, os mesmos autores observaram que a inclusão dietética de semente de linhaça resultou em uma menor síntese de VCAM – 1 no tecido aórtico dos animais. No estudo de Zhao e at (2004)<sup>126</sup> os pacientes hipercolesterolêmicos receberam por seis semanas, cerca de 17% do total de energia proveniente do óleo de linhaça. Após o período de estudo, demonstrou-se que o manipulação lipídica da dieta resultou na redução nos níveis séricos de marcadores inflamatórios como VCAM – 1, ICAM – 1 e E – selectina.

Em contra partida, Foxall & Schawarey (1990)<sup>127</sup> demonstram que suínos alimentados com dieta hipercolesterolemia à base de colesterol, quando tratados com óleo de peixe, mostraram aumento na adesão de monócitos ao endotélio. Esses achados são semelhantes com os encontrados no nosso protocolo experimental. No mesmo sentido, Abe et al (1998)<sup>128</sup> analisaram a concentração plasmática de moléculas de adesão solúveis em pacientes diabéticos e hipertrigliceridêmicos, por meio da oferta diária de 4 gramas de ômega - 3. Inicialmente, os pacientes possuíam altas concentrações de moléculas de adesão vascular e intercelular, em relação ao

grupo controle. Após seis semanas de estudo, não foi constatado redução significativa nos biomarcadores inflamatórios. A diferença na concentração sérica desses marcadores, só foi possível perceber após 7 meses de estudo, pela redução de 9% na ICAM – 1.

Esses achados conflitantes são indicadores de que dependendo de como a hipercolesterolemia é induzida e se estabelece associada ao tempo e a quantidade administrada, o efeito do ácido graxo ômega – 3 pode até mesmo ser contraditório ao esperado. Shi et al (2005)<sup>119</sup> complementam que a presença de várias insaturações na molécula do ácido graxo poliinsaturado favorece ao processo oxidativo em reações envolvendo a formação de radicais livres, podendo reduzir seu efeito benéfico sobre o desenvolvimento da aterosclerose. Dessa forma, é de extrema importância adotar cuidados especiais na prescrição de dietas hipolipemiantes a base de ômega – 3.

## **7 CONCLUSÃO**

A semente de linhaça apresentou ação hipolipemiante reduzindo os níveis séricos de LDL – C e colesterol. Por meio das análises histológicas, morfométricas e imunohistoquímicas, observou-se não haver diferenças na presença e no grau das lesões ateroscleróticas nos grupos de animais estudados com dieta hipercolesterolêmica a 1%.

## 8 Referências BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministério da Saúde de Brasil/ Funasa /CENEPI/ Sistema de informações de Mortalidade (SIM) e IBGE. Disponível em: <http://www.tabnet.datasus.gov.br>, ano 2001 Data de acesso: 13/06/05.
2. Delmas D, Jannin B, Latruffe, N. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol Food Res* 49:377-95, 2005.
3. Fornés NE, Martins IS, Velásquez - Meléndez G. et al. Escores de consumo alimentar e níveis lipêmicos em população de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 36(1):12-8, 2002.
4. Cunanne SC, Hamadeh MJ, Liede AC. et al. Nutritional attributes of traditional flaxseed in healthy young adults. *Am J Clin Nutr* 61:62-8, 1995.
5. Leanne TB, Philippe O, Szapary MD. Flaxseed and cardiovascular risk. *Nutrition Reviews* 62(1):18-27, 2004.
6. Milder, IEJ, Feskens EJM, Arts CWA. et al. Intakes of 4 dietary lignans and all-cause mortality in the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr* 84:400-5, 2006.
7. Bierenbaum ML, Reichstein R, Watkins TR. Reducing atherogenic in hyperlipemic humans with flaxseed supplementation: a preliminary report. *J am Coll Nutr* 12:501-4, 1993.
8. 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 trombogenesis. *Lipids* 28:811-7, 1993.
9. Kris – Entherton PM, Harris WS, Appel, LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106:2747-2757, 2002.
10. Magalhães ME, Brandão AA, Freitas EV. et al. Novas perspectivas no tratamento das dislipidemias. *Revista da SOCERJ* 17(2): 105-111, 2004.
11. 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* 90(3):1390-1397, 2006.
12. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-9, 1993.
13. Póvoa LC, Bahia L, Kraemer LG. Dislipidemias e aterogênese – considerações terapêuticas. *Revista de Angiologia e Cirurgia Vascular* 10(1): 27-31, 2001.

14. Bayner J, Dominiczak MH. Bioquímica médica. São Paulo: Manole, 2000. 566 p.
15. Libby MP. The risk of atherosclerosis: the role of high density lipoprotein. *Am J Cardiol* 88(12A):3N-8N, 2001.
16. Hsueh WA, Jackson S, Law RE. Control of vascular cell proliferation and migration by PPAR- $\gamma$ . *Diabetes Care* 24:392-397, 2001.
17. Satry HC, Blankenhorn DH, Chandler AB. et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis – prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 85(1):391-405, 1992.
18. Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE. et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 92:1355-74, 1994.
19. Araya H, Lutz MR. Alimentos funcionales y saludables. *Rev Chil Nutr* 30(1):8-14, 2003.
20. Hasler CM. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. *Food Technol* 52(11):63-70, 1998.
21. Hunt JR. Nutritional products for specific health benefits—foods, pharmaceuticals, or something in between? *J Am Dietetic Assoc* 94(2): 151-153, 1994.
22. Kwak N, Junkes DJ. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control* 12(1):99-107, 2001a.
23. Associação brasileira das indústrias de alimentação ABIA. Mercado brasileiro dos alimentos industrializados, 2005. Disponível em: [http://www.aniarioabia.com.br/editorial\\_05.htm](http://www.aniarioabia.com.br/editorial_05.htm) Data de acesso em 01/10/2008.
24. \_\_\_\_\_. Portaria n. 398, de 30 de Abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 03 de maio de 1999. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=107> Data de acesso: 10/09/2007.
25. Oomah BD, Mazza G. Flaxseed products for disease prevention, in functional foods and Processing Aspects. Ed. Mazza. Technomic Publishing, Lancaster, p. 91-138, 1998.

26. Oomah BD. Flaxseed as a functional food source. *J Sci Food Agric* 81:889-894, 2001.
27. Velasquez MT, Bathena SJ. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr* 76:1191 – 1201, 2002.
28. Ratnayake WMN, Behrens W, Fischer P. Chemical and nutritional studies of flaxseed (variety Linott) in rats. *J Nutr Biochem* 3:232-240, 1992.
29. Arjmandi BF, Khan DA, Juma S. et al. Whole flaxseed consumption lowers serum LDL – cholesterol, lipoprotein (a) concentration in postmenopausal women. *Nutr Res* 18:1203-1214, 1998.
30. Prasad K. Reduction of serum cholesterol and hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed. *Circulation* 99:1355-1362, 1999.
31. Mandasescu S, Mocanu V, Dascalita AM. et al. Flaxseed supplementation in hyperlipidemic patients. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 109(3):502-6, 2005.
32. De Angelis RC. Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas. São Paulo: Atheneu, 2001. 295 p.
33. Camire ME, Dougherty MP. Raisen dietary fiber composition an in vitro bile acid binding. *J Agric Food Chem* 51(3):834-837, 2003.
34. Savaiano DA. Cardiovascular Disease and fiber: is insulin resistance the missing link? *Nutrition Reviews* 58(11): 356-358, 2000.
35. Brown L, Rosner B, Willett WW. et al. Cholesterol lowering effects of dietary fiber: a meta – analysis. *Am J Clin Nutr* 69(1):30-42, 1999.
36. Bazzano LA, Ogden L. Dietary fiber intake and reduced risk of coronary heart disease in ES men and wonem. *Archives of International Medicine* 16:1897-1904, 2003.
37. Neves NM. Nutrição e doença cardiovascular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 109 p. 1997.
38. Ruberfroid M. Dietary fiber, inulin and oligofrutose: a reewcomparing their physiological efects. *Critical Review of Food Science Nutrition* 33(6):1303-1348, 1993.
39. Sawashita N, Naemura A, Shimizu M. et al. Effect of dietary vegetable and animal proteins on atherothrombosis in mice. *Nutrition* 22:661-667, 2006.

40. Yussuf S, Hawken S, Ôunpuu S. et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case – control study. *Lancet* 364:937-52, 2004.
41. Dyberg J, Bang HO, Hjorne N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr* 28:958-66, 1975.
42. Salem N, Simopoulos AP, Galli C. et al. Fatty acids and lipids from cell biology to human disease. *Lipids* Champaign 31(suppl), p.S1-S326, 1996.
43. Uauy R, Valenzuela A. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition*, New York 16(7/8) p.680-684, 2000.
44. Zagarra IGE, Schwarz EE. Impact of dietary patterns and interventions on cardiovascular health. *Circulation* 114:961-973, 2006.
45. Caughey GE, Mantziros E, Gibson RA. et al. The effects on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* 63(1):116-22, 1996.
46. Rallidis LS, Paschos G, Liakos GK. et al. Dietary alpha – linolenic acid decreases C – reactive protein, serum amyloid A and interleukin – 6 in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis* 167:237-242, 2003.
47. Freese R, Mutanen M, Valsta LM. et al. Comparison of the effects of two diets rich in monounsaturated fatty acids differing in their linolenic /alpha linolenic acid ratio on platelet aggregation. *Thromb Haemost* 71:73-77, 1994.
48. Jiang R, Jacobs DR, Davis, ME. et al. Nut and seed consumption and inflammatory markers in the multi – ethnic study of atherosclerosis. *Am J Epidemiol* 163:222-231, 2006.
49. Kris – Etherton PM, Yu – Poth S, Sabaté J. et al. Nuts and their bioactive constituents: effects on serum lipids and other factors that affect disease risk. *Am J Clin Nutr* 70(suppl 3):504S-511S, 1999.
50. Jenkis DJA, Kendall CWC, Marchie, A. et al. Dose response of almonds on coronary heart disease risk factors: blood lipids, oxidized low – density lipoproteins, lipoprotein(a), homocysteine, and pulmonary nitric oxide: a randomized, controlled, crossover trial. *Circulation* 106:1327-1332, 2002.
51. Hopper LN, Higgins JP, Moore T. et al. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and Vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet*. 354:447-455, 1999.
52. Yokoyama M. Effects of eicosapentaenoic acid (EPA) on major cardiovascular events in hypercholesterolemic patients: the Japan EPA lipid intervention study (JELIS). *Circulation* 112:2262, 2005.

53. Haper CR, Edwards MJ, DeFillips P. et al. Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty acids in humans. *J Nutr* 136:83-87, 2006.
54. Kolodgie PD, Petrov A, Virmani R. et al. Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V: a technique with potential for noninvasive imaging of vulnerable plaque. *Circulation*. 108:3134-9, 2003.
55. Prasad K. Dietary flaxseed in prevention of hypercholesterolemic atherosclerosis. *Atherosclerosis* 132:69-76, 1997.
56. Prasad K. Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. *Atherosclerosis* 179:269-275, 2005.
57. Bathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr* 76:1191 – 1201, 2003.
58. Brasil. Procedimento e métodos de eutanásia em animais. Resolução número 714 de 20 de Junho de 2002. Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV – 23 de Outubro de 1968. Disponível em: [http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao\\_714.htm](http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_714.htm) Data de acesso: 05/02/2006.
59. Frank B, Manson JE, Willet WC. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: A critical review. *J Am Coll Nutr* 20(1):5-19, 2001.
60. Ross R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-26, 1999.
61. Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci* 70(8):855-65, 2002.
62. Ramos Morales EL. La aterosclerosis: algunas consideraciones acerca de su estudio experimental: revisión bibliográfica. *Rev Cuba Med* 26:965-70, 1987.
63. Boger RH, Bode – Boger SM, Brandes RP. et al. Dietary L – arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol – fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation* 96(4):1982-90, 1997.
64. Sano J, Shirakura S, Oda S. et al. Foam cells generated by a combination of hyperglycemia and hyperlipemia in rats. *Pathol Int* 54(12):904-13, 2004.
65. 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* 87(4):512-519, 2006.

66. 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* 18(1):36-42, 1999.
67. 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* 46:222-228, 2002.
68. 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* 32:2193-2197, 1979
69. Kritchevsky D. Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis: a review of the eraly history. *J Nutr* 125:589S-93S, 1995.
70. 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* 5(4):247-56, 2006.
71. Weegemans RM, Zock PL, Katan MB. Dietary cholesterol from eggs increases the ratio of total cholesterol to hight – density lipoprotein cholsterol in humans: a meta – analysis. *Am J Clin Nutr* 73:885-91, 2001.
72. 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 Yucatan micropig. *Circulation* 89:2816-2821, 1996.
73. Organização Mundial da Saúde, 1998. Obesity and poverty. Disponível em: [http://www.who.int/dsa/cat\\_98/nut8.htm](http://www.who.int/dsa/cat_98/nut8.htm) Data de acesso em 22/09/2008.
74. Pereira LO, Francischi RPP, Lancha AH. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 47(2):111-127, 2003.
75. 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* 291:H2987-H2996, 2006.
76. Streppel MT, Ocké MC, Boshuizen HC. Dietary fiber intake in relation to coronary heart disease and all-cause mortality over 40 y: the Zutphen Study. *Am J Clin Nutr* 88(4):1119-25, 2008.
77. Howarth NC, Saltzman E, Roberts, SB. Dietary fiber and weight regulation. *Nutr Rev* 59:129-139, 2001.

78. Birketvedt GS, Shimshi M, Thom E. et al. Experiences with three different fiber supplements in weight reduction. *Med Sci Monit* 11(1):P15-8, 2005.
79. Mattos LL, Martins IS. Consumo de fibras alimentares em população adulta. *Rev Saúde Pública*, 34(1):50-55, 2000.
80. Guillon F, Champ M. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Res Int* 33(3-4):233-245, 2000.
81. 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* 109-17, 2000.
82. Klag MJ, Ford DE, Mead LA. et al. Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N Engl J Med* 328:313-8, 1993.
83. Shakir KAF, Madhusudhan B. Hypocholesterolemic and hepatoprotective effects of flaxseed chutney: Evidence from animal studies. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 22(1):117-121, 2007.
84. Dodin S, Cunnane SC, Mâsse B. et al. Flaxseed on cardiovascular disease marker in healthy menopausal women: a randomized, double – blind, placebo – controlled trial. *Nutrition* 24:23-30, 2008.
85. Feng D, Shen Y, Chavez ER. Effectiveness of different processing methods in reducing hydrogen cyanide content of flaxseed. *J Sci Food And Agricult* 83(8):836-841, 2003.
86. Tarpila S, Aro A, Salminen I. et al. The effect of flaxseed supplementation in processed foods on serum fatty acids and enterolactone. *European Journal of Clinical Nutrition* 56:157-165, 2002.
87. Lucas EA, Lightfoot SA, Hammond LJ. et al. Flaxseed reduces plasma cholesterol and atherosclerotic lesion formation in ovariectomized Golden Syrian Hamsters. *Atherosclerosis* 173:223-229, 2004.
88. 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* 202:91-100, 1999.
89. Foti M, Piatelli M, Baratta MT. Flavonoids, coumarins, and cyanamic acids as antioxidants in micellar system: structure activity relationship. *J Agric Food Chem* 44:497-501, 1996.
90. 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* 106:3143-421, 2002.

91. Pereira MA, O'Reilly E, Augustsson K. et al. Dietary fiber and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of cohort studies. *Arch Intern Med* 164:370-6, 2004.
92. 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* 47(3):203-6, 1997.
93. Fernandez ML. Soluble fiber and nondigestible carbohydrate effects on plasma lipids and cardiovascular risk. *Current opinion in lipidology* 12:35-40, 2001.
94. Kim M, Shin HK. The water – soluble extract of chicory influences serum and liver lipid concentration and fecal lipid excretion in rats. *J Nutr* 128(1):1731-6, 1998.
95. Caterina R, Liao JK, Libby P. Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 7(suppl):213S-23S, 2000.
96. 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* 37:489-98, 1995.
97. 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* (115:10):843-51, 1995.
98. Jorge PAR, Neyra LC, Ozaki RM. et al. Efeito dos ácidos graxos ômega – 3 sobre o relaxamento – dependente do endotélio em coelhos hipercolesterolêmicos. *Arq Bras Cardiol* 69(1):13-18, 1997.
99. Lee P, Prasad K. Effects of flaxseed oil on serum lipids and atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 8(3):227-35, 2003.
100. Prasad K. Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside – derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol, and enterolactone. *Int Angiol* 9:220-225, 2000.
101. Prasad K, Mantha SV, Munir AD. et al. Reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by CDC – flaxseed with very low alpha – lolenic acid. *Atherosclerosis* 136:367-75, 1998.
102. Prasad K. Antihypertensive activity of secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed: role of guanylate cyclase. *Int J Angiol* 13:7-14, 2004.
103. Gimborne MA. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 75:67B-70B, 1995.

104. Yang Y, Loscalzo J. Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. *Circulation* 101:2144-148, 2000.
105. Prasad K. A study on regression of hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by flax lignan complex. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 12(4):304-13, 2007.
106. Lee P, Prasad K. Suppression of oxidative stress as a mechanism of reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by cyclooxygenase inhibitors. *Int J Angiol* 12:13-23, 2003.
107. Gebauer SK, 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* 83:1526S – 1535S, 2006.
108. Brown AA, Hu FB. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 73:673-86, 2001.
109. Langeril M, Salen P, Martin JL. et al. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 99(6):779-85, 1999.
110. 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* 2:757-761, 1989.
111. Allman MA, Pena MM, Pang D. Supplementation with flaxseed oil versus sunflowerseed oil in healthy young men consuming a low fat diet: effects on platelet composition and function. *Eur J Clin Nutr* 49:169-178, 1995.
112. Weiner BH, Ockene IS, Levine PH. et al. Inhibition of atherosclerosis by cod – liver oil in a hyperlipidemic swine model. *N Engl J Med* 315:841, 1986.
113. Davis HR, Bridenstine RT, Vesselinovitch D. et al. Fish oil inhibits development of atherosclerosis in rhesus monkeys. *Arteriosclerosis* 7:441-1987.
114. Kasim S, Stern B, Khilnami S. et al. Effects of omega – 3 fish oil on lipid metabolism, glycemic control and blood pressure in type II patients. *J Clin Endocrinol Metab* 67:1-5, 1998.
115. Jenkis DJ, Kendall CW, Vidgen E. et al. Health aspects as partially defatted flaxseed, including effects of serum lipids, oxidative measures, and ex vivo androgen and progestin activity: a controlled crossover trial. *Am J Clin Nutr*, 69:395-402, 1999.
116. Rouleau JL, Parmkely WW, Stevens J. et al. Verapamil suppresses atherosclerosis in cholesterol fed rabbits. *J Am Coll Cardiol* 1:1453-1460, 1983.
117. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105:1135-1143, 2002.

118. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW. et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the american heart association. *Circulation* 107:499-511, 2003.
119. Shi Q, Vandeberg, JF, Jett C. et al. Arterial endothelial dysfunction in baboons fed a high – cholesterol, high – fat diet. *Am J Clin Nutr* 82:751-9, 2005.
120. Ferrucci L, Cherubini A, Bandinelli S. et al. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab* 91:439-446, 2006.
121. Kume N, Cybolsky ML, Gimbrone MA. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocytes adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 90:1138-44, 1992.
122. Nappo F, Esposito K, Cioffi M. et al. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *J Am Coll Cardiol* 39:1145-50, 2002.
123. Ceriello A, Quagliaro L, Piconi L. et al. Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. *Diabetes* 53:701-10, 2004.
124. Rallidis LS, Paschos G, Papaioannou ML. et al. The effect of diet enriched with alpha-linolenic acid on soluble cellular adhesion molecules in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis* 174:127-132, 2004.
125. Dupasquier CM, Dibrov E, Kneesh AL. et al. Dietary flaxseed inhibits atherosclerosis in the LDL receptor – deficient mouse in a part through antiproliferative and antiinflammatory actions. *Am J Physiol Heart Cir Physiol* 293(4):H2394-402, 2007.
126. Zhao G, Etherton TD, Martin KR. et al. Dietary alpha – linolenic acid reduce inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. *J Nutr* 134:2991-7, 2004.
127. Foxall TL, Shwaery GT. Effects of dietary fish oil and butterfat on serum lipids and monocyte and platelet interactions with aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 80:171-9, 1990.
128. Abe Y, El-Masri B, Kimball KT. Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 18:723-731, 1998.

## NORMATIVAS ADOTADAS

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Int Med*, 126(1):36-47, 1997.

# ANEXO

## ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA PUCPR.



### PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

NÚCLEO DE BIOÉTICA  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

**Registro do projeto no CEUA:** 278 – 2ª V

**Data do parecer:** 09/05/2008

**Título do Projeto:**

O papel das semente de linhaça na anti-aterogênese e na ação antiinflamatória em coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica-análise anatomo e imunohistológica.

**Pesquisador responsável:**

Dalton Bertolin Précoma

**Equipe da pesquisa:**

Camila Rodrigues Prim

**Instituição:**

PUCPR

**Categoria do Experimento - C**

Espécie de Animal	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Coelho ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	Macho	30 dias; 2,5kg	30

O colegiado do CEUA em reunião no dia 08/05/2008, 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.

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

Curitiba, 09 de Maio de 2008.

Atenciosamente

  
Profa. Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira  
Coordenadora do CEUA  
PUC PR

