

## ARTIGO ORIGINAL

## Redução do Marcador Inflamatório TNF- $\alpha$ após Consumo de Semente de Linhaça por Coelhos Hipercolesterolêmicos

### *Decrease in the Inflammatory Marker TNF- $\alpha$ after Consumption of Flaxseed by Hypercholesterolemic Rabbits*

Maynara Leonardi Schuh Martins,<sup>1</sup> Anieli Bacelar Rocco de Lima,<sup>1</sup> Ana Flavia Champoski,<sup>1</sup> Pamela Cristiani Pereira,<sup>1</sup> Fernando Martins,<sup>2</sup> Carlos Tanizawa,<sup>1</sup> Leonardo Prêcoma,<sup>1</sup> Patrícia Campelo,<sup>1</sup> Luiz César Guarita-Souza,<sup>1</sup> Dalton Bertolim Prêcoma<sup>1</sup>

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR),<sup>1</sup> Paraná, PR; Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),<sup>2</sup> Mato Grosso do Sul, MS – Brasil

### Resumo

**Fundamentos:** Alimentos funcionais, como a linhaça, têm sido consumidos com frequência para prevenção da aterosclerose.

**Objetivos:** Avaliar os efeitos da linhaça sobre a aterogênese em coelhos submetidos a uma dieta rica em colesterol.

**Métodos:** Trinta coelhos albinos machos foram randomizados em três grupos com base em um tratamento dietético por 12 semanas: grupo controle (G1), dieta padrão; dieta rica em colesterol (G2), dieta padrão mais 0,25% de colesterol proveniente de ovos liofilizados; e dieta rica em colesterol mais linhaça (G3), dieta semelhante à do G2 adicionada de linhaça. Análise bioquímica (colesterol total [CT], lipoproteína de alta densidade [HDL-colesterol], lipoproteína de baixa densidade [LDL-colesterol] e triglicérides) e imunohistoquímica (molécula de adesão intercelular 1 [ICAM-1] e fator de necrose tumoral alfa [TNF- $\alpha$ ]) foram realizadas em todos os grupos. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística.

**Resultados:** Às 12 semanas, os níveis séricos de CT aumentaram significativamente nos grupos G2 e G3 em comparação com o G1. Os níveis séricos de LDL-colesterol foram mais altos no grupo G2, e o aumento no grupo G3 foi cerca de seis vezes menor do que no G2. Os níveis de HDL-colesterol aumentaram em todos os grupos, com o maior aumento observado no G2. Os níveis de triglicérides no G3 reduziram em ~70% e diferiram significativamente entre o G1 e G3 ( $p = 0,034$ ) e G2 e G3 ( $p = 0,015$ ). Níveis de ICAM-1 aumentaram apenas no segmento aórtico 4 no G3. Os níveis de TNF- $\alpha$  no grupo G3 foram semelhantes aos do grupo controle, enquanto os níveis no G2 foram maiores do que o dobro em relação aos do grupo controle ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** O grupo alimentado com uma dieta funcional (linhaça) mostrou redução no desenvolvimento de aterosclerose, níveis séricos mais baixos de triglicérides e níveis mais baixos de TNF- $\alpha$  à imunohistoquímica. (Int J Cardiovasc Sci. 2018;31(2):114-122)

**Palavras-chave:** Coelhos, Linho / sementes, Aterosclerose / prevenção e controle, Dieta Aterogênica, Colesterol na Dieta, Obesidade, Estilo de Vida Sedentário.

### Abstract

**Background:** Functional foods such as flaxseed have been commonly consumed to prevent atherosclerosis.

**Objectives:** To assess the effects of flaxseed in atherogenesis in rabbits consuming a high-cholesterol diet.

**Methods:** Thirty male albino rabbits were randomized to three groups based on a 12-week dietary treatment: control group (G1), standard diet; high-cholesterol diet (G2), standard diet plus 0.25% cholesterol from lyophilized eggs; and high-cholesterol plus flaxseed (G3), similar diet as G2 plus flaxseed. Biochemical (total cholesterol [TC], high-density lipoprotein [HDL-C], low-density lipoprotein cholesterol [LDL-C], and triglycerides) and immunohistochemical (intercellular adhesion molecule 1 [ICAM-1] and tumor necrosis factor alpha [TNF- $\alpha$ ]) analyses were performed in all groups.  $P$  values  $< 0.05$  indicated statistical significance.

**Results:** At 12 weeks, serum TC levels increased significantly in G2 and G3 compared with G1. Serum LDL-C levels were higher in group G2, and the increase in group G3 was approximately six times lower than that in G2. HDL-C levels increased in all groups, with the highest increase observed in G2. Triglycerides levels in G3 decreased by ~70% and differed significantly in G1 and G3 ( $p = 0.034$ ) and G2 and G3 ( $p = 0.015$ ). ICAM-1 levels increased only in aortic segment 4 in G3. TNF- $\alpha$  levels in G3 were similar to those in the control group, while the levels in G2 were greater than twice as those in the control group ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** The group fed with a functional diet (flaxseed) showed decreased development of atherosclerosis, reduced serum triglycerides levels, and lower TNF- $\alpha$  levels on immunohistochemistry. (Int J Cardiovasc Sci. 2018;31(2):114-122)

**Keywords:** Rabbits; Flax / seeds; Atherosclerosis / prevention & control; Diet, Atherogenic; Cholesterol, Diet; Obesity, Sedentary Lifestyle.

Full texts in English - <http://www.onlineijcs.org>

**Autor Correspondente:** Maynara Leonardi Schuh Martins

Rua Prof. Sebastião Paraná 762. Vila Izabel. Curitiba. CEP 80320-070, Novo Mundo, Curitiba, Paraná, PR – Brasil.

E-mail: may.schuh@hotmail.com; fernando.ecoatividade@hotmail.com

## Introdução

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica marcada por disfunção endotelial que afeta a camada íntima das artérias de médio e grande calibre.<sup>1</sup> Este processo ocorre lentamente ao longo de décadas e tem o potencial de evoluir para lesões mais avançadas que podem romper e desencadear a formação de trombo, potencialmente levando ao infarto agudo do miocárdio e morte.<sup>2</sup>

Vários fatores estão implicados na etiologia da aterosclerose, incluindo elevação persistente de lipoproteínas séricas aterogênicas (como a lipoproteína de baixa densidade [LDL-C]), que estão associadas com fatores de estilo de vida como hábitos alimentares inadequados, sedentarismo e obesidade, além de deposição dessas lipoproteínas na túnica média.<sup>2,3</sup>

Muitos produtos alimentares com propriedades funcionais/nutracêuticas têm sido estudados com o objetivo de impedir o desenvolvimento de placas ateroscleróticas e promover efeitos cardiovasculares positivos. Esses produtos contêm fibras alimentares, fitoesteróis, ácidos graxos ômega 3, antioxidantes e polifenóis,<sup>4</sup> o que pode diminuir significativamente o efeito de fatores ateroscleróticos. Um destes produtos é a linhaça (*Linum usitatissimum L.*).

A composição nutricional da linhaça compreende gorduras (41%), fibras alimentares (28%), proteínas (21%), umidade (7,7%), cinzas (3,5%) e açúcares solúveis (1–2%)<sup>5,6</sup> e seu conteúdo lipídico inclui 51–55% de ácido alfa-linoleico.<sup>7</sup> Além disto, a linhaça é a fonte mais rica da lignana secoisolariciresinol-diglicosídeo (SDG), que tem propriedades antioxidantes e antiaterogênicas potentes.

Com base nestas considerações, o estudo das propriedades funcionais da linhaça torna-se essencial para a comunidade científica e a população em geral. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos potenciais da linhaça na aterogênese em coelhos submetidos a uma dieta rica em colesterol (contendo 0,25% de colesterol) com uso de ovos liofilizados. Para este fim, foi realizada análise do perfil lipídico e análise imunohistoquímica de marcadores inflamatórios em segmentos aórticos de coelhos.

## Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da PUC-PR sob o protocolo de número 720/2012 e foi conduzido no Laboratório de Cirurgia Experimental do Hospital Angelina

Caron (HAC), no Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR e no Biotério da PUC-PR.

## Animais

Trinta coelhos New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) machos, brancos, com peso aproximado de 3 kg e idade média de 4 meses foram selecionados para o experimento. O cálculo do tamanho da amostra foi baseado no estudo de Prim et al.<sup>8</sup> Os coelhos foram mantidos no biotério da PUC-PR em um macroambiente com ciclos luz/escuro de 12/12 horas, mudanças de ar fresco e temperatura controlada entre 19°C e 23°C. Os animais foram identificados individualmente e mantidos em gaiolas individuais limpas diariamente.

## Período experimental e distribuição de grupos

O estudo foi realizado ao longo de 12 semanas (84 dias). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e randomizados em três grupos de acordo com o tratamento dietético. O grupo controle (G1, n = 10) recebeu uma dieta padrão para coelhos (Nuvital® Nutrientes S.A., Colombo, PR, Brasil). O grupo randomizado para uma dieta rica em colesterol (G2, n = 10) recebeu uma dieta padrão para coelhos (Nuvital®) mais 0,25% de colesterol a partir de ovos liofilizados. O grupo randomizado para uma dieta rica em colesterol mais linhaça (G3, n = 9) recebeu uma dieta padrão para coelhos (Nuvital®), 0,25% de colesterol a partir de ovos liofilizados e 8 g de linhaça moída por kg de peso corporal.

## Preparação da alimentação complementar

A dieta rica em colesterol oferecida aos grupos G2 e G3 durante todo o período experimental continha 0,25% de colesterol, que foi adicionado com o objetivo de induzir lesões ateroscleróticas na aorta. Para este efeito, 5 kg de ração padrão (Nuvital®), pesada e moída para cada grupo de animais foi adicionada a 1.800 g de ovo em pó diluído em 2.000 mL de água.

A concentração de linhaça foi de 8 g por kg de peso corporal. As sementes foram moídas em um processador de alimentos e armazenadas sob refrigeração antes de serem adicionadas aos alimentos.

A alimentação para os grupos G2 e G3 foi complementada com ovos liofilizados. Esta mistura foi processada com utilização de um triturador de carne industrial (Poli®, modelo PCP-22LR-N, boca #10, Siemens, Brusque, SC, Brasil). Para o grupo G3, a mistura foi

complementada com a linhaça moída. Após a mistura ter sido triturada, foi transformada em pelotas, que foram aquecidas em um forno elétrico por 10 minutos a uma temperatura de 180°C.

O preparado alimentar foi armazenado sob refrigeração até o uso.

### Preparação dos animais e coleta da amostra

Os animais foram anestesiados e sangue foi coletado de acordo com o método descrito por Précoma et al.<sup>9</sup> e Alessi et al.<sup>10</sup> Xilazina (Coopazine®; Schering-Plough-Coopers, Cotia, SP, Brasil) a 5 mg/kg misturada com cetamina (Vetanarcol®, König, Mairinque, SP, Brasil) a 30 mg/kg foi administrada por via intramuscular na região da coxa dos coelhos. Análises bioquímicas realizadas nos dias 1 e 84 incluíram colesterol total (CT), LDL-C, lipoproteína de alta densidade (HDL-C) e triglicérides (TG), que foram avaliados com equipamento automatizado (ADVIA 1200, Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Newark, EUA) e kits comerciais.

### Análise histológica

A aorta torácica foi removida ao nível da bifurcação aortoiliaca após toracotomia e laparotomia mediana. Seções transversais com 2 a 3 mm de espessura foram cortadas a partir de diferentes segmentos aórticos. Cada segmento foi identificado, montado em um micrótomo (Leica® RM2145, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Alemanha) para processamento durante a noite e desidratado com etanol em concentrações seriadas (70%, 80% e 90%). As amostras de tecido foram posteriormente diafanizadas por 12 horas em xilol contendo concentrações seriadas de parafina. Blocos de parafina foram obtidos através da incorporação das amostras em parafina quente com utilização de um inclusor (Leica® EG1160, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Alemanha), de acordo com o procedimento padrão.

Os blocos de parafina foram cortados em seções de 5  $\mu$ m com utilização do micrótomo (Leica® RM 2145). Cada seção foi corada com hematoxilina e eosina (HE) e orceína (coloração para tecido elástico) de acordo com técnicas convencionais e montada em lâminas permanentes.

Blocos com quatro segmentos de aorta foram preparados por meio de seleção de um segmento proximal perto do arco aórtico (ponto 1), um segmento localizado na aorta torácica (ponto 2), um segmento

proximal na aorta abdominal (ponto 3) e um segmento distal da aorta abdominal (ponto 4). Estes segmentos foram selecionados de acordo com os achados histológicos na coloração com HE.

### Análise imunohistoquímica

A técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*; TMA) foi utilizada para a análise imunohistoquímica. As amostras foram incubadas com anticorpos monoclonais contra a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) a uma diluição de 1:50 e misturadas com anticorpo monoclonal contra o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) por 1 hora. Os anticorpos foram detectados por incubação das lâminas com o substrato 3,3-diaminobenzidina (DAB; DakoCytomation A/S, Glostrup, Dinamarca). Contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer, seguida por desidratação da amostra com diferentes concentrações de etanol a 100% e desparafinizadas com xilol. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá. O protocolo descrito acima foi padronizado em nosso departamento. Controles positivos e negativos foram utilizados para cada reação.

Os cortes histológicos foram digitalizados com um scanner (Axio Scan Z1, Zeiss, Jena, Alemanha) e as imagens foram analisadas com o programa Image-Pro Plus®, versão 4.5. O método de morfometria de cores foi aplicado, colorindo em rosa as áreas com imagens positivas de anticorpos e em marrom aquelas com imagens negativas. Os dados foram transferidos para uma planilha do Excel e submetidos à análise estatística.

### Análise estatística

Os resultados estão expressos como média, mediana, valor mínimo e máximo e desvio padrão. A suposição de normalidade das variáveis foi avaliada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis que não satisfizeram a suposição de normalidade foram analisadas com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os valores de p abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Os dados foram analisados com o programa estatístico IBM SPSS, versão 20.0.

### Resultados

Ocorreu um óbito no grupo G3 na semana experimental 12, resultando em um total de 29 coelhos na amostra final do estudo.

## Perfil lipídico

### Colesterol total

Os níveis séricos de CT foram significativamente mais altos nos grupos G2 e G3 em comparação com o G1. Este resultado demonstra que a dieta foi eficaz em aumentar os níveis de colesterol nos coelhos (Tabela 1).

### LDL-colesterol e HDL-colesterol

Não houve diferenças significativas nos níveis de LDL-colesterol e HDL-colesterol entre os grupos (Tabelas 2 e 3). No entanto, os níveis séricos de LDL-colesterol na análise bioquímica foram mais altos no grupo G2 ao final do experimento. O aumento no LDL-colesterol no grupo G3 foi cerca de seis vezes inferior ao do G2. Os níveis de HDL-colesterol aumentaram nos grupos G1 (12,93 mg/dL), G2 (82,26 mg/dL) e G3 (12,03 mg/dL), com o maior aumento observado no G2.

### Triglicérides

A dieta não aumentou os níveis de TG nos grupos do estudo. Além disso, os níveis de TG no G3 reduziram cerca de 70% (Tabela 4). Ao final do estudo, os resultados indicaram diferenças significativas nos níveis de TG entre G1 e G3 ( $p = 0,034$ ) e entre G2 e G3 ( $p = 0,015$ ).

### Análise imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi utilizada para investigar a presença da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e TNF- $\alpha$  nos quatro segmentos da aorta.

Os resultados indicaram que os níveis de ICAM-1 só aumentaram no segmento aórtico 4 no grupo G3, porém não houve diferença significativa em relação aos níveis medianos (Figura 1).

Um resultado semelhante foi encontrado para o TNF- $\alpha$ , ou seja, o nível desse marcador foi significativamente mais elevado no segmento aórtico 4 (Figura 2). Os níveis de TNF- $\alpha$  no grupo G3 foram semelhantes aos do grupo controle, enquanto que os níveis no grupo G2 foram maiores do que o dobro em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

## Discussão

A aterosclerose é uma doença cardiovascular importante e a compreensão do seu desenvolvimento é necessária para a sua prevenção e tratamento. Este conhecimento pode ser adquirido através de modelos experimentais. Neste contexto, vários estudos em animais têm demonstrado que uma dieta rica em gorduras conduz à obesidade, hipercolesterolemia e outras complicações como lesões endoteliais.<sup>11</sup> O protocolo experimental do presente estudo foi um modelo precoce de aterosclerose e envolveu a adição de 0,25% de colesterol a partir de ovos liofilizados à dieta de coelhos com o objetivo de causar lesões ateroscleróticas.<sup>12</sup> A utilização de coelhos como modelo experimental atende os objetivos do presente estudo porque esses animais desenvolvem lesões aórticas rapidamente.

Este estudo avaliou as alterações bioquímicas e imunológicas causadas por uma dieta rica em colesterol com e sem linhaça, considerada um alimento funcional.

**Tabela 1 – Média, mediana, valor mínimo e máximo, desvio padrão e valores de p para o colesterol total nos três grupos**

| Variável                                    | Grupo           | n  | Média  | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão | Valor de p* |
|---|-----------------|----|--------|---------|--------|--------|---------------|-------------|
| Colesterol total (basal)                    | Controle (G1)   | 10 | 35,60  | 34,00   | 14,00  | 69,00  | 15,13         |             |
|   | Colesterol (G2) | 10 | 24,60  | 24,50   | 12,00  | 43,00  | 9,51          |             |
|   | Linhaça (G3)    | 9  | 28,33  | 24,00   | 15,00  | 54,00  | 13,51         | 0,174       |
| Colesterol total (final do estudo)          | Controle (G1)   | 10 | 23,64  | 21,50   | 8,90   | 57,00  | 15,72         |             |
|   | Colesterol (G2) | 10 | 62,09  | 24,54   | 12,90  | 336,00 | 100,23        |             |
|   | Linhaça (G3)    | 8  | 36,21  | 34,20   | 16,40  | 72,00  | 17,32         | 0,204       |
| Diferença (final do estudo - linha de base) | Controle (G1)   | 10 | -11,96 | -13,50  | -31,00 | 6,00   | 12,50         |             |
|   | Colesterol (G2) | 10 | 37,49  | 2,55    | -28,00 | 305,00 | 97,79         |             |
|   | Linhaça (G3)    | 9  | 3,86   | 3,00    | -19,00 | 18,00  | 10,83         | 0,029       |

\*Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ .

**Tabela 2 – Média, mediana, valor mínimo e máximo, desvio padrão e valores de p para o LDL-colesterol nos três grupos**

| Variável                                    | Grupo           | n  | Média | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão | Valor de p* |
|---|-----------------|----|-------|---------|--------|--------|---------------|-------------|
| LDL-colesterol (basal)                      | Controle (G1)   | 10 | 8,64  | 8,45    | 2,90   | 18,10  | 5,61          |             |
|   | Colesterol (G2) | 10 | 7,83  | 6,30    | 1,20   | 27,10  | 7,60          |             |
|   | Linhaça (G3)    | 9  | 11,92 | 7,40    | 4,50   | 27,30  | 7,94          | 0,305       |
| LDL-colesterol (final do estudo)            | Controle (G1)   | 10 | 21,57 | 16,45   | 3,90   | 81,00  | 21,49         |             |
|   | Colesterol (G2) | 10 | 90,09 | 32,00   | 7,50   | 348,00 | 123,47        |             |
|   | Linhaça (G3)    | 8  | 26,95 | 22,00   | 2,40   | 93,00  | 29,82         | 0,145       |
| Diferença (final do estudo - linha de base) | Controle (G1)   | 10 | 12,93 | 11,65   | -5,70  | 63,50  | 19,71         |             |
|   | Colesterol (G2) | 10 | 82,26 | 21,95   | 4,90   | 341,80 | 124,45        |             |
|   | Linhaça (G3)    | 9  | 12,03 | 0,50    | -27,30 | 79,40  | 30,61         | 0,085       |

\* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ .

**Tabela 3 – Média, mediana, valor mínimo e máximo, desvio padrão e valores de p para o HDL-colesterol nos três grupos**

| Variável                                    | Grupo           | n  | Média | Mediana | Mínimo | Máximo | Desvio padrão | Valor de p* |
|---|-----------------|----|-------|---------|--------|--------|---------------|-------------|
| HDL-colesterol (basal)                      | Controle (G1)   | 10 | 19,29 | 16,45   | 10,30  | 37,30  | 8,60          |             |
|   | Colesterol (G2) | 10 | 17,15 | 17,70   | 9,80   | 25,40  | 5,78          |             |
|   | Linhaça (G3)    | 9  | 15,79 | 13,40   | 7,70   | 33,50  | 8,35          | 0,475       |
| HDL-colesterol (final do estudo)            | Controle (G1)   | 10 | 21,55 | 22,50   | 1,00   | 41,90  | 12,80         |             |
|   | Colesterol (G2) | 10 | 48,76 | 25,65   | 4,30   | 290,70 | 85,99         |             |
|   | Linhaça (G3)    | 8  | 28,16 | 26,25   | 4,20   | 60,00  | 17,71         | 0,780       |
| Diferença (final do estudo - linha de base) | Controle (G1)   | 10 | 2,26  | -2,15   | -13,30 | 14,90  | 10,39         |             |
|   | Colesterol (G2) | 10 | 31,61 | 9,00    | -15,30 | 278,70 | 87,50         |             |
|   | Linhaça (G3)    | 9  | 9,24  | 8,00    | -16,50 | 46,60  | 17,48         | 0,570       |

\* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ .

O aumento no CT encontrado à análise bioquímica dos grupos G2 e G3 não era esperado no tratamento com linhaça. Um resultado semelhante foi obtido por Dupasquier et al.,<sup>13</sup> que não observaram alterações de CT em animais que receberam uma dieta com 10% de linhaça. Este resultado inesperado pode ser explicado por vários fatores, incluindo a concentração de linhaça utilizada, a forma de administração da linhaça (sementes moídas), aquecimento do alimento para incorporação de componentes e a duração do consumo das sementes. Resultados anteriores indicaram que os ácidos alfa-linoleico

e linoleico são sensíveis à luz, aquecimento e oxigênio, e sofrem oxidação quando exposto a temperaturas entre 120°C e 270°C.<sup>14</sup> Por conseguinte, o processo de produção de alimentos contendo linhaça no presente estudo podem ter provocado uma redução do nível destes ácidos, comprometendo sua função nutracêutica.

Os níveis de LDL-colesterol aumentaram nos grupos tratados com a dieta rica em colesterol; no entanto, os níveis permaneceram semelhantes entre esses grupos. Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo em seres humanos envolvendo o consumo de linhaça,

Tabela 4 – Média, mediana, valor mínimo e máximo, desvio padrão e valores de p para os triglicérides nos três grupos

| Variável                                    | Grupo           | n  | Média  | Mediana | Mínimo  | Máximo | Desvio padrão | Valor de p* |
|---|-----------------|----|--------|---------|---------|--------|---------------|-------------|
| Triglicérides (basal)                       | Controle (G1)   | 10 | 65,30  | 50,00   | 36,00   | 206,00 | 50,87         |             |
|   | Colesterol (G2) | 10 | 59,50  | 56,50   | 25,00   | 146,00 | 32,74         |             |
|   | Linhaça (G3)    | 9  | 79,44  | 78,00   | 32,00   | 149,00 | 38,20         | 0,308       |
| Triglicérides - (final do estudo)           | Controle (G1)   | 10 | 67,50  | 65,00   | 7,00    | 228,00 | 63,27         |             |
|   | Colesterol (G2) | 10 | 64,60  | 44,50   | 20,00   | 204,00 | 53,31         |             |
|   | Linhaça (G3)    | 8  | 22,50  | 14,00   | 11,00   | 53,00  | 15,26         | 0,042       |
| Diferença (final do estudo - linha de base) | Controle (G1)   | 10 | 2,20   | 13,50   | -56,00  | 47,00  | 33,98         |             |
|   | Colesterol (G2) | 10 | 5,10   | -17,50  | -98,00  | 148,00 | 66,92         |             |
|   | Linhaça (G3)    | 9  | -59,44 | -63,00  | -149,00 | 16,00  | 48,12         | 0,022       |

\* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ .

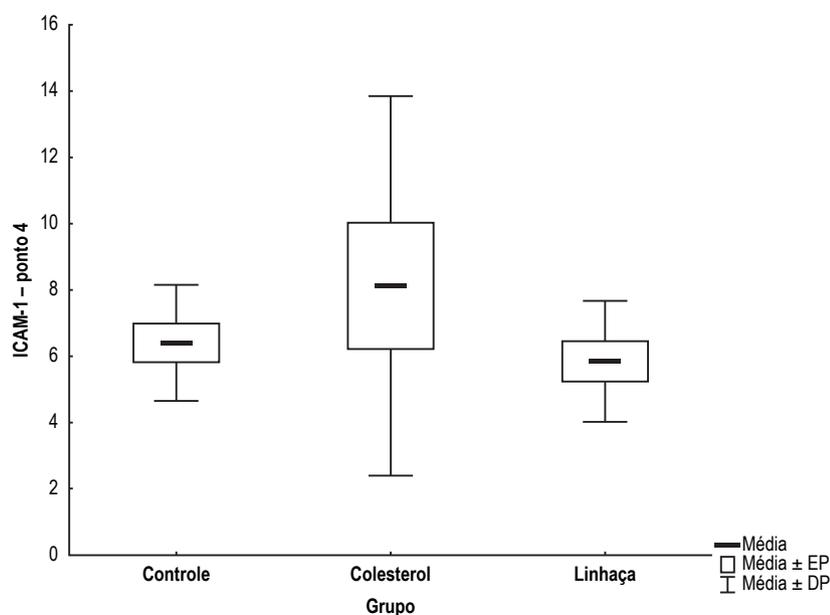
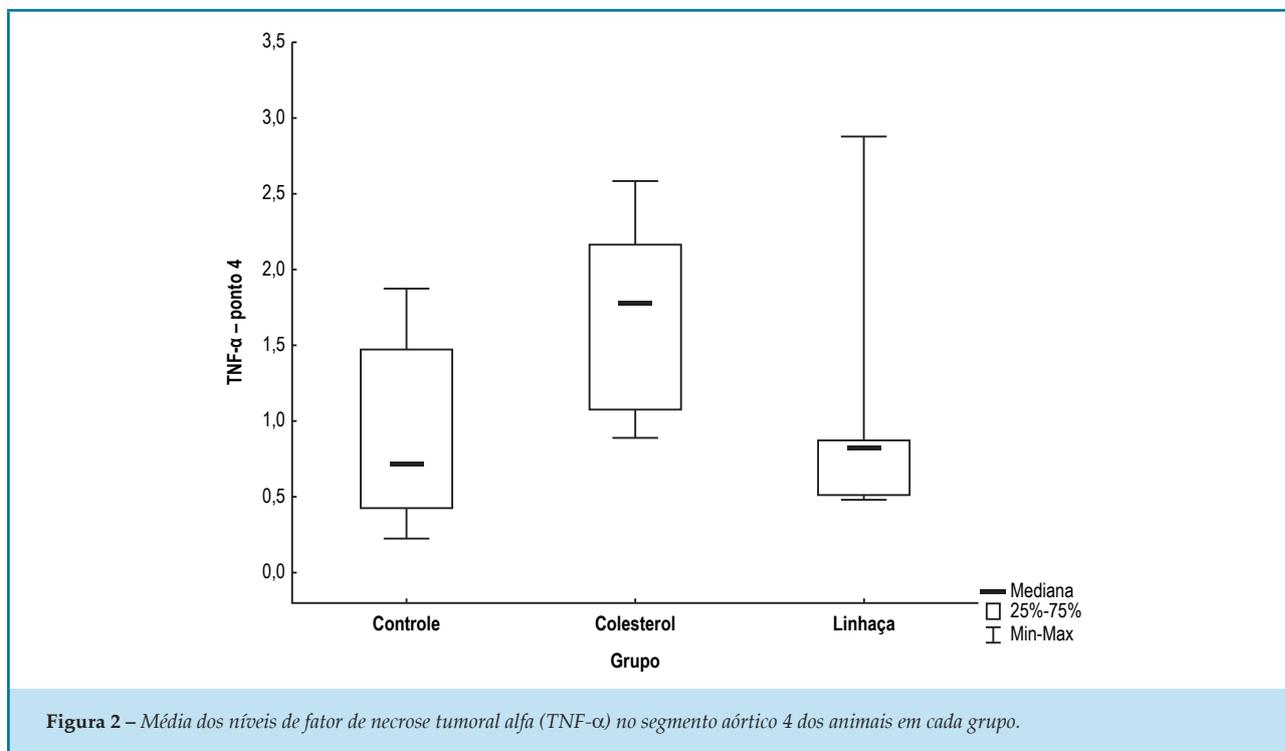


Figura 1 – Média dos níveis da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) no segmento aórtico 4 dos animais em cada grupo.

no qual os níveis de CT e LDL-colesterol permaneceram inalterados,<sup>15</sup> embora o período experimental de 4 semanas pode não ter sido suficiente para causar esta redução. Zheng et al.<sup>16</sup> realizaram um ensaio clínico randomizado em indivíduos com diagnóstico de hipercolesterolemia e utilizaram extrato de lignana de linhaça durante um período de 8 semanas. Os níveis de LDL-colesterol no grupo que recebeu 600 mg do extrato reduziram entre

as semanas 6 e 8. Os autores concluíram que o extrato de lignana diminuiu a concentração de colesterol de maneira dose-dependente. Um estudo investigou o efeito da ingestão de fitoesterol e indicou que os níveis de colesterol no sangue reduziram após 4 semanas.<sup>17</sup> Além disso, os níveis de colesterol permaneceram inalterados entre as semanas 8 e 12,<sup>18,19</sup> o que sugere que fatores sazonais podem ter afetado os resultados.



No presente estudo, o CT aumentou em todos os grupos testados. Estudos têm mostrado que lignanas presentes na linhaça reduzem o colesterol sérico. Este efeito está provavelmente relacionado às suas propriedades antioxidantes, fornecidas pela lignana secoisolariciresinol-diglicosídeo (SDG), enterolactona e enterodiol, que inibem a peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados *in vitro* e favorecem a diminuição dos níveis de colesterol.<sup>20</sup> Uma hipótese para explicar a discrepância entre os resultados do presente estudo e outros na literatura é a alta concentração de colesterol ingerida. Outra hipótese é a duração da dieta funcional (8 semanas), o que pode ter sido demasiadamente curta para induzir uma redução significativa do LDL-colesterol e CT.

No presente estudo não houve diferença nos níveis de HDL-colesterol observados entre os três grupos. Níveis mais elevados de HDL-colesterol aumentam a proteção contra a formação de placas ateroscleróticas no coração. Estudos demonstraram que o consumo de linhaça a 15% esteve fortemente associado à proteção contra inflamação, estrógenos e genotoxicidade.<sup>21</sup>

Os resultados que consideramos mais fascinantes foram os relacionados aos níveis de TG. Houve uma diminuição significativa (aproximadamente 70%) neste parâmetro bioquímico no grupo G3, o que demonstra que a administração de alimentos contendo linhaça (um

alimento funcional que contém principalmente ácidos graxos ômega 3, fibras e lignana) foi eficaz na redução dos níveis de TG. Este resultado está alinhado com os de estudos anteriores e sugere que a suplementação com ômega 3 através do consumo de linhaça ajuda a reduzir os níveis de TG, possivelmente através da redução de partículas de quilomícrons remanescentes e inibição da síntese e secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-colesterol) pelo fígado.<sup>22</sup>

Cintra et al.,<sup>23</sup> testaram o efeito do consumo de uma dieta rica em gordura e baseada em linhaça em ratos Wistar e observaram uma redução nos níveis de CT e TG, maior excreção fecal de lipídios e menor deposição de colesterol no fígado. Esse resultado foi semelhante ao obtido por Bhatena et al.<sup>23</sup>

A imunohistoquímica foi utilizada para investigar a presença de dois marcadores envolvidos com inflamação, uma molécula de adesão celular (ICAM-1) e uma citocina pró-inflamatória (TNF- $\alpha$ ). Vários estudos têm utilizado o ICAM-1 como um marcador de inflamação. Em um estudo com 60 coelhos (10 em um grupo controle e 50 em um grupo com aterosclerose), os animais alimentados com uma dieta rica em gordura apresentaram níveis mais elevados de ICAM-1 na aorta comparados com os do grupo controle ( $p < 0,01$ ), o que indica um papel para a ICAM-1 como preditora de doença cardiovascular.<sup>25</sup>

A importância do presente estudo reside na análise do ICAM-1 em quatro segmentos da aorta. Os resultados indicaram um aumento nos níveis de ICAM-1 em todos os grupos de animais e todas as seções de tecido; no entanto, os resultados não foram estatisticamente significantes. Um resultado semelhante foi obtido em um estudo animal realizado por Prim et al.,<sup>8</sup> em 2012 e em estudos em humanos, que também mostraram reduções não significativas nos níveis dos marcadores ICAM-1 e VCAM-1.<sup>26</sup>

Devemos salientar que nenhuma atividade anti-inflamatória foi observada no grupo que recebeu a linhaça (G3), sugerindo que os resultados do efeito anti-inflamatório dos ácidos graxos ômega 3 são contraditórios. Além disso, os resultados da ICAM-1 sugerem que esta atividade é dependente da duração do consumo de ácidos graxos ômega 3.

Os resultados da análise do TNF- $\alpha$  indicaram uma diferença significativa entre os grupos. Os níveis de TNF- $\alpha$  estiveram mais elevados no grupo G1 do que no G3. Este resultado demonstrou um efeito da linhaça, mas não foi estatisticamente significativo. Além disso, os níveis de TNF- $\alpha$  aumentaram no G2, o que indica que este marcador está associado com estresse e inflamação. Um resultado semelhante foi observado em um estudo anterior,<sup>27</sup> no qual os níveis elevados de TNF- $\alpha$  estiveram associados com eventos coronarianos recorrentes após infarto do miocárdio.

Níveis do marcador inflamatório TNF- $\alpha$  reduziram significativamente no grupo G3 (grupo da linhaça), o que favorece a hipótese de que os componentes da linhaça possam reduzir a atividade anti-inflamatória e antiaterogênica. Um estudo anterior observou uma diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  após o consumo de ácidos graxos ômega 3 pela maioria dos pacientes.<sup>28</sup>

## Conclusão

Os resultados do presente estudo estão alinhados com a literatura e mostraram uma redução no desenvolvimento de aterosclerose no grupo alimentado com uma dieta funcional.

Os resultados obtidos no grupo da linhaça mostraram alterações significativas nos níveis séricos de TG e diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  na análise imunohistoquímica. Esses achados corroboram as observações de estudos anteriores que demonstraram a linhaça como tendo uma forte tendência para agir efetivamente na redução dos níveis de TNF- $\alpha$ , evitando assim lesão e desenvolvimento de placas ateroscleróticas na íntima das artérias coronárias.

No entanto, várias diferenças podem surgir quando alterações são feitas no experimento ou protocolo de estudo. Por isso, sugerimos que mais estudos sejam conduzidos comparando diretamente estas sementes funcionais.

## Agradecimentos

Agradecimentos à Jasmine Alimentos Ltda. (Curitiba, PR, Brasil) pela doação da linhaça utilizada no estudo. Estamos também gratos aos estudantes de medicina (Pontifícia Universidade Católica do Paraná) Carlos Humberto Guilman Tanizawa, Bruno Carnevalli, Alexandre da Silva Phaco Jr. e Eduardo Hubbe Buss pela ajuda na alimentação dos animais.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Martins MLS, Lima ABR, Champoski AF, Précoma L, Précoma DB. Obtenção de dados: Martins MLS, Lima ABR, Tanizawa C. Análise e interpretação dos dados: Martins MLS, Champoski AF, Pereira PC, Martins F, Précoma DB. Análise estatística: Martins MLS, Campelo P. Obtenção de financiamento: Martins MLS, Lima ABR, Pereira PC. Redação do manuscrito: Martins MLS, Martins F. Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Martins MLS, Lima ABR, Martins F, Campelo P, Souza LCG. Supervisão / como investigador principal: Précoma DB.

## Potencial Conflito de Interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

## Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Maynara Leonardi Schuh Martins pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

## Aprovação Ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Paraná sob o número de protocolo 720-2012. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes incluídos no estudo.

## Referências

- Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al; Sociedade Brasileira de Cardiologia. [V Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis]. *Arq Bras Cardiol.* 2013;101(4 Suppl 1):1-20. doi: 105935/abc20135010.
- Castro PS, Oliveira FL. Prevention of atherosclerosis and drug treatment of high-risk lipid abnormalities in children and adolescents. *J Pediatr (Rio J).* 2009;85(1):6-14. doi:10.2223/JPED.1852.
- Schoenhagen P, Tuzcu EM. Atherosclerosis imaging in progression/regression trials: surrogate marker or direct window into the atherosclerotic disease process? *Arq Bras Cardiol.* 2008;91(6):385-98. PMID: 19142366.
- Bloedon LT, Szapary PO. Flaxseed and cardiovascular risk. *Nutr Rev.* 2004;62(1):18-27. PMID: 14995053.
- Kasote DM. Flaxseed phenolics as natural antioxidants. *Int Food Res J.* 2013;20(1):27-34.
- Prasad K. Flaxseed and cardiovascular health. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009;54(5):369-77. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181af04e5.
- Padilha PC, Pinheiro RL. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. *Rev Bras Cancerol.* 2004;50(3):251-60.
- Prim CR, Baroncini LA, Prêcoma LB, Caron PH, Winter G, Poletti MO, et al. Effects of linseed consumption for a short period of time on lipid profile and atherosclerotic lesions in rabbits fed a hypercholesterolaemic diet. *Br J Nutr.* 2012;107(5):660-4. doi: 10.1017/S0007114511003539.
- Prêcoma DB, Noronha L, Moura AV, Yamada AS, Knopfholz J, Dusilek CL, et al. Vascular radiolesion as a deleterious effect of high-dose-rate intraarterial brachytherapy with samarium-153 in hypercholesterolemic rabbits. *Arq Bras Cardiol.* 2006;87(4):512-9. PMID: 17128322.
- Alessi A, França Neto OR, Brofman PR, Camila Prim C, Noronha L, Kuenzer RF, et al. Use of rosiglitazone before and after vascular injury in hypercholesterolemic rabbits: assessment of neointimal formation. *Thromb J.* 2008;6:12. doi: 10.1186/1477-9560-6-12.
- Martins F, Campos SH, Pagan UL, Martinez PF, Okoshi K, Okoshi MP, et al. High-fat diet promotes cardiac remodeling in an experimental model of obesity. *Arq Bras Cardiol.* 2015;105(5):479-86. doi: 10.5935/abc.20150095.
- Bocan TM, Mueller SB, Mazur MJ, Uhlendorf PD, Brown EQ, Kieft KA. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis.* 1993;102(1):9-22. PMID: 8257456.
- Dupasquier CH, Weber AM, Ander BP, Rampersad PP, Steigerwald S, Wigle JT, et al. Effects of dietary flaxseed on vascular contractile function and atherosclerosis during prolonged hypercholesterolemia in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(6):H2987-96. doi: 10.1152/ajpheart.01179.2005.
- Marques AC, Hautrive TP, Moura GB, Callegaro MG, Hecktheuer LH. Effect of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) prepared by different methods on the biological response of rats. *Rev Nutr.* 2011;24(1):131-41.
- Stuglin C, Prasad K. Effect of flaxseed consumption on blood pressure, serum lipids, hemopoietic system and liver and kidney enzymes in healthy humans. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2005;10(1):23-7. doi: 10.1177/107424840501000103.
- Zheng Y, Weisenborn DP, Tostenson K, Kangas N. Energy analysis in the screw pressing of whole and dehulled flaxseed. *Journal of Food Engineering.* 2005;66(2):193-202. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2004.03.005.
- Kris-Etherton PM, Dietschy J. Design criteria for studies examining individual fatty acid effects on cardiovascular disease risk factors: human and animal studies. *Am J Clin Nutr.* 1997;65(5 Suppl):1590S-6S. PMID: 9129499.
- Nguyen TT, Dale LC, Von Bergmann K, Croghan IT. Cholesterol-lowering effect of stanol ester in a US population of mildly hypercholesterolemic men and women: a randomized controlled trial. *Mayo Clin Proc.* 1999;74(12):1198-206. doi: 10.4065/74.12.1198.
- Blair SN, Capuzzi DM, Gottlieb SO, Nguyen T, Morgan JM, Cater NB. Incremental reduction of serum total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol with the addition of plant stanol ester-containing spread to statin therapy. *Am J Cardiol.* 2000;86(1):46-52. PMID: 10867091.
- Prasad K. Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. *Atherosclerosis.* 2005;179(1):269-75. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.11.012.
- Dikshit MA, Gomes Filho E, Eilati S, McGee C, Small C, Gao T. Flaxseed reduces the pro-carcinogenic micro-environment in the ovaries of normal hens by altering the PG and oestrogen pathways in a dose dependent manner. *Br J Nutr.* 2015;113(9):1384-95. doi: 10.1017/S000711451500029X.
- Adkins Y, Kelley DS. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem.* 2010;21(9):781-92. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.12.004.
- Cintra DE, Costa AV, Penuzio Mdo C, Matta SL, Silva MT, Costa, NM. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout or chicken skin. *Nutrition.* 2006;22(2):197-205. doi: 10.1016/j.nut.2005.09.003.
- Bhathena SJ, Ali AA, Haudenschild C, Latham P, Ranich T, Mohamed AI, et al. Dietary flaxseed meal is more protective than soy protein concentrate against hypertriglyceridemia and steatosis of the liver in an animal model of obesity. *J Am Coll Nutr.* 2003;22(2):157-64. PMID: 12672712.
- Li M, Wang X, Yang L, Gao C, Ma Y. Psychological stress increases expression of aortic plaque intercellular adhesion molecule-1 and serum inflammatory cytokines in atherosclerotic rabbit model. *J Geriatr Cardiol.* 2008;5(4):235-42.
- Abe Y, El-Masri B, Kimball KT, Pownall H, Reilly CF, Osmundsen K, et al. Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(5):723-31. PMID: 9598830.
- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation.* 2000;101(18):2149-53. PMID: 10801754.
- Grunfeld C, Kotler DP, Shigenaga JK, Doerler W, Tierney A, Wang J, et al. Circulating interferon-alpha levels and hypertriglyceridaemia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med.* 1991;90(2):154-62. PMID: 1996584.

