



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA METABÓLICA



Maria Laura da Cruz Castro

**AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DO ÓLEO DE LINHAÇA NA MODULAÇÃO DO
BALANÇO REDOX E DO PERFIL METABÓLICO EM RATOS SUBMETIDOS À
DIETA HIPERLIPÍDICA**

Ouro Preto

2018

Maria Laura da Cruz Castro

**AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DO ÓLEO DE LINHAÇA NA MODULAÇÃO DO
BALANÇO REDOX E DO PERFIL METABÓLICO EM RATOS SUBMETIDOS À
DIETA HIPERLIPÍDICA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Ouro Preto como
requisito obrigatório para a obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Daniela Caldeira Costa

Co-orientadora: Bruna Vidal Dias

Ouro Preto

2018

C346a Castro, Maria Laura da Cruz.
Avaliação da ingestão do óleo de linhaça na modulação do balanço redox e do perfil metabólico em ratos submetidos à dieta hiperlipídica [manuscrito] / Maria Laura da Cruz Castro. - 2018.

52f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Caldeira Costa.
Coorientadora: Prof^a. MSc^a. Bruna Vidal Dias.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Síndrome metabólica. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Óleo de linhaça. 4. Ácidos graxos- Ômega 3. I. Costa, Daniela Caldeira. II. Dias, Bruna Vidal. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 577.1

Catálogo: ficha.sisbin@ufop.edu.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

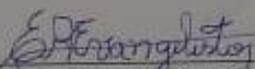
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

TERMO DE APROVAÇÃO

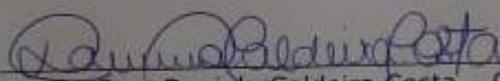
Avaliação da ingestão do óleo de linhaça na modulação do balanço redox e do perfil metabólico em ratos submetidos à dieta hiperlipídica

Trabalho de Conclusão de Curso defendido por **Maria Laura da Cruz Castro** e aprovado com nota 10, em 29 de Novembro de 2018, pela comissão examinadora:


Prof. Dr. Elísio Alberto Evangelista
(DECBI-ICEB-UFOP)


Dra. Fernanda Caetano Camini
(PPG CEBIOL-ICEB-UFOP)


Doutoranda Bruna Vidal Dias - Coorientadora
(PPG CEBIOL-ICEB-UFOP)


Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa - Orientadora
(DECBI-ICEB-UFOP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha vida, família e amigos.

Agradeço à minha mãe e ao meu pai por sempre me apoiarem e não medirem esforços para me ajudarem em qualquer coisa que eu precisasse.

Aos meus irmãos Danilo e Guilherme pelo apoio e pela amizade.

À minha vó Laura que sempre foi incentivadora dos meus estudos e de todos da família e que ia ficar muito feliz por essa conquista.

Às minhas amigas Marília, Renata, e Ana Luíza. Obrigada pela amizade e companheirismo e por os todos os momentos vividos nesses anos em Ouro Preto.

Às minhas amigas de apartamento Izadora, Cecília, Karina, Ana Luiza e Ana Carolina. Obrigada pelo apoio e amizade.

À minha orientadora Daniela pela oportunidade, pelo apoio, paciência, conhecimentos passados e dedicação comigo e com todos os seus alunos.

À minha co-orientadora Bruna, obrigada pela amizade e por toda ajuda, paciência, empenho e dedicação durante todo o projeto e aos conhecimentos passados a mim.

À todos os membros do Laboratório de Bioquímica Metabólica, pelo apoio e companheirismo.

Aos professores do curso de farmácia pelos conhecimentos, orientação e suporte durante esses anos de curso.

RESUMO

Ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos que apresentam uma grande cadeia carbônica e desempenham funções importantes no nosso organismo. Só que quando consumidos em excesso e associados ao sedentarismo podem levar à obesidade e ao desenvolvimento de outras doenças crônicas, além da síndrome metabólica (SM). A SM é um conjunto de distúrbios metabólicos que possui como fator desencadeante central a resistência insulínica (RI). Sabe-se que o óleo de linhaça (OL) é uma das maiores fontes de ácido alfa-linolênico (ômega 3), um precursor de AG poli-insaturado. Este tipo de AG está relacionado à melhora das concentrações séricas de triglicérides, colesterol total e apresenta potencial efeito antioxidante, podendo favorecer o status redox. Então, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do OL na modulação do balanço redox e do perfil metabólico em ratos submetidos à dieta hiperlipídica. Para isso, foram utilizados 39 ratos machos da linhagem Fisher divididos em grupo controle (GC) (n=13) que recebeu ração padrão e grupo síndrome metabólica (GSM) (n=26) que recebeu ração hiperlipídica por 18 semanas. Após 18 semanas foram eutanasiados 7 animais do GC e 6 animais do GSM para a confirmação da SM. Dos 26 animais restantes, 8 animais do GC e 18 animais do GSM foram redistribuídos de forma que 8 animais do GC receberam 1 mL de água diariamente por gavagem oro-gástrica, 10 animais do GSM sem tratamento recebeu 1 mL de água diariamente por gavagem e 8 animais do GSM tratado recebeu 1 mL de óleo de linhaça diariamente por gavagem durante 15 dias. Para diagnóstico da SM foram avaliados: peso, percentual de gordura, glicemia, triacilglicerol, colesterol, pressão, resposta insulínica e tolerância oral à glicose e para avaliar o efeito do tratamento foi avaliado glicemia, o perfil lipídico, peso da gordura no fígado, a atividade superóxido dismutase, catalase, concentração de TBARS, análise histopatológica dos tecidos adiposo e cardíaco e peso relativo do coração. A SM foi confirmada pelo aumento da glicemia, pressão arterial sistólica e por valores aumentados de glicose tanto no teste de resposta insulínica quanto no teste de tolerância oral à glicose. O tratamento com OL não afetou a glicemia, o perfil lipídico, peso da gordura no fígado e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) assim como não influenciou na relação SOD/CAT dos animais com SM em nenhum dos órgãos avaliados. Esse resultado pode ser explicado devido ao tempo de tratamento ou pela dose do OL visto que trabalhos semelhantes a esse, com tempo de tratamento maior e doses diferentes, obtiveram resultados satisfatórios. Apesar de não obtermos diferenças estatísticas significativas observamos uma tendência à hipotrofia do tecido adiposo dos animais tratados com o óleo de linhaça. Em relação ao coração, observamos um aumento do peso relativo deste órgão nos animais do grupo SM e uma redução nos animais do grupo OL. Além disto, observamos um aumento de células inflamatórias no grupo SM, mas não houve diferença estatística em relação ao tratamento com o OL. O tratamento com OL aumentou a sobrevivência dos animais submetidos à dieta hiperlipídica, entretanto os mecanismos responsáveis por esta proteção não foram elucidados com os resultados obtidos neste estudo. Sendo assim, mais resultados serão necessários para tentar elucidar o efeito da suplementação com óleo de linhaça em ratos submetidos à ingestão de uma dieta hiperlipídica.

PALAVRAS CHAVE: síndrome metabólica, dieta hiperlipídica, óleo de linhaça, ômega 3, status redox.

ABSTRACT

Fatty acids (FA) are carboxylic acids that have a large carbon chain and play important roles in our body. However, when consumed in excess and associated with the sedentary lifestyle can lead to obesity and the development of other chronic diseases, in addition to the metabolic syndrome (MS). MS is a set of metabolic disorders that has insulin resistance (IR) as the central triggering factor. It is known that linseed oil (LO) is one of the major sources of alpha-linolenic acid (omega 3), a precursor of polyunsaturated FA. This type of FA is related to the improvement of serum triglyceride concentrations, total cholesterol and has a potential antioxidant effect, which may favor redox status. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of LO on modulation of redox balance and metabolic profile in rats submitted to the hyperlipidic diet. For this purpose, 39 male rats of the Fisher strain divided into the control group (CG) (n = 13), who received standard ration and metabolic syndrome group (MSG) (n = 26), received hyperlipidic ration for 18 weeks. After 18 weeks, 7 CG animals and 6 MSG animals were euthanized for confirmation of MS. Of the remaining 26 animals, 8 CG animals and 18 MSG animals were redistributed so that 8 CG animals received 1 mL of water daily by oro-gastric gavage, 10 untreated MSG animals received 1 mL of water daily by gavage and 8 treated MSG animals received 1 mL of flaxseed oil daily by gavage for 15 days. For the diagnosis of MS, weight, percentage of fat, glycemia, triglycerides, cholesterol, pressure, insulin response and oral glucose tolerance were evaluated. To evaluate the effect of treatment, blood glucose, lipid profile, liver fat weight, superoxide dismutase activity, catalase, TBARS concentration, histopathological analysis of adipose and cardiac tissues, and relative heart weight. MS was confirmed by increased blood glucose, systolic blood pressure, and increased glucose in both the insulin response test and the oral glucose tolerance test. LO treatment did not affect glycemia, lipid profile, liver fat weight and antioxidant enzymes activity, nor did it influence the SOD / CAT ratio of animals with MS in any of the evaluated organs. This result can be explained due to the time of treatment or dose of the LO, since similar work, with a longer treatment time and different doses, obtained satisfactory results. Although we did not obtain statistically significant differences we observed a tendency to hypertrophy of adipose tissue of the animals treated with linseed oil. Regarding the heart, we observed an increase in the relative weight of this organ in animals of the MS group and a reduction in the animals of the LO group. In addition, we observed an increase in inflammatory cells in the MS group, but there was no statistical difference regarding the treatment with LO. The treatment with LO increased the survival of the animals submitted to the hyperlipid diet, however the mechanisms responsible for this protection were not elucidated with the results obtained in this study. Therefore, more results will be needed to try to elucidate the effect of linseed oil supplementation in rats submitted to the ingestion of a hyperlipidic diet.

KEY WORDS: metabolic syndrome, hyperlipid diet, linseed oil, omega 3, redox status.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Grupos experimentais utilizados para avaliação da eficácia da dieta hiperlipídica na indução da Síndrome Metabólica.....	31
FIGURA 2 - Média da ingestão de ração dos grupos experimentais durante 18 semanas e média da ingestão após 18 semanas.....	32
FIGURA 3-Parâmetros avaliados que confirmaram o estabelecimento da Síndrome Metabólica.....	33
FIGURA 4- Níveis séricos de glicose dos grupos experimentais.....	34
FIGURA 5- Efeito do tratamento com óleo de linhaça no perfil lipídico.....	35
FIGURA 6- Efeito do tratamento com óleo de linhaça sobre os níveis séricos de insulina.....	36
FIGURA 7- Efeito do tratamento com óleo de linhaça na atividade das enzimas antioxidantes no fígado.....	37
FIGURA 8- Efeito do tratamento com óleo de linhaça sobre o biomarcador de dano oxidativo TBARS no fígado.....	38
FIGURA 9 - Efeito do tratamento com óleo de linhaça sobre o peso de gordura no fígado....	39
FIGURA 10- Taxa de sobrevivência dos grupos experimentais.....	40
FIGURA 11- Análise histológica do Tecido Adiposo dos grupos experimentais.....	41
FIGURA 12- Análise da área dos adipócitos dos grupos experimentais.....	41
FIGURA 13 - Efeito do tratamento com óleo de linhaça na atividade das enzimas antioxidantes no coração.....	42
FIGURA 14- Efeito do tratamento com óleo de linhaça sobre o biomarcador de dano oxidativo TBARS no coração.....	43
FIGURA 15 - Efeito do tratamento com óleo de linhaça sobre as células inflamatórias no coração.....	44
FIGURA 16 - Peso relativo do coração (Peso do coração/Peso do animal).....	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição nutricional da dieta hiperlipídica.....	25
TABELA 2 – Distribuição de macronutrientes da dieta hiperlipídica.....	25
TABELA 3 – Níveis de garantia por quilograma de produto da ração padrão.....	25
TABELA 4 – Parâmetros avaliados nos grupos experimentais para avaliação do estabelecimento da SM.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AG – Ácidos graxos

ALA - Ácido α -linolênico

ATP - Adenosina trifosfato

CAT – Catalase

CETP - Proteína de transferência de colesterol esterificado

ChREBP - Proteína de ligação do elemento regulador de carboidratos

COX – Ciclooxygenase

DHA – Ácido Docosahexaenoico

DH – Dieta Hiperlipídica

DP – Dieta Padrão

EPA – Ácido Eicosapentaenoico

GC - Grupo controle

GSM - Grupo síndrome metabólica

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IDF - International Diabetes Federation

IKK - I Kappa B quinase

IRS1 - Receptor de insulín

JNK - Quinase c-Jun N-terminal

LDL – Lipoproteína de baixa Densidade

NCEP-ATP III - National Cholesterol Education Program's Adults Treatment Panel III

NF- κ B – Fator de Transcrição Fator Nuclear Kappa B

NO - Óxido nítrico

OL – Óleo de linhaça

OMS - Organização Mundial da Saúde

PGD₂ - Prostaglandina-D₂

PGD3 - Prostaglandina-D3

PPAR - Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas

RI – Resistência insulínica

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SM – Síndrome Metabólica

SOD – Superóxido dismutase

SREBPs - Proteínas de ligação ao elemento de resposta a esterol

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

VLDL - Lipoproteína de Densidade muito Baixa

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	12
2 - OBJETIVOS	14
2.1 - Objetivo geral	14
2.2 - Objetivos específicos	14
3 - REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1- Mudança do perfil alimentar	15
3.2 - Síndrome Metabólica	15
3.3- Ácidos graxos	17
3.3.1- Ácidos graxos ω -3.....	20
4 -METODOLOGIA	25
4.1 – Animais	25
4.2 - Delineamento experimental.....	25
4.3 – Dieta	25
4.4 – Pletismografia	27
4.5 - Teste de resposta insulínica	27
4.6 - Teste de tolerância oral a glicose	27
4.7 - Análise dos parâmetros bioquímicos do soro e plasma	27
4.8 - Extração e dosagem de lipídeos hepáticos.....	27
4.9 - Dosagem de insulina.....	28
4.10 - Atividade da superóxido dismutase (SOD)	28
4.11 - Atividade da catalase (CAT)	29
4.12 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	29
4.13 - Dosagem de proteínas totais	30
4.14 - Análise histopatológica	30
4.15 - Peso relativo do tecido adiposo e coração	30
4.16 - Análise estatística	31
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
7 - CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

1 - INTRODUÇÃO

Ácidos graxos são ácidos orgânicos que contêm um grupo carboxila único e uma cauda hidrocarbonada apolar podendo ser saturada ou insaturada tendo uma ou mais duplas ligações, variadas de 4 a 30 átomos de carbono. Eles desempenham funções muito importantes no nosso organismo, indo desde os fosfolipídeos que são os principais constituintes das membranas celulares até o diacilglicerol que atua em processos metabólicos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2016).

A ingestão excessiva de ácidos graxos associado ao sedentarismo pode ser fator de risco para a obesidade e todas as outras doenças relacionadas a ela como a hipertensão arterial, o diabetes mellitus, as hiperlipidemias e as doenças cardiovasculares (LIMA et al., 2007). Com a mudança do perfil alimentar da sociedade, sendo um dos fatores a globalização, houve um aumento do consumo de alimentos que possuem alta densidade energética, ricos em gorduras e em açúcar refinado simples e uma diminuição no consumo de carboidratos complexos que é uma importante fonte de fibras alimentares, o que contribui para o aumento da obesidade e suas comorbidades, além do desenvolvimento de síndrome metabólica (DIEZ GARCIA, 2003).

Porém, nem todos os tipos de gorduras vão ter efeitos prejudiciais no nosso organismo. Vários estudos mostram que os ácidos graxos poli-insaturados da família ômega 3 podem proporcionar vários benefícios à nossa saúde como a capacidade de ajudar na melhora do perfil lipídico e glicêmico e inibir processos inflamatórios, além de apresentar potencial efeito antioxidante, podendo favorecer o status redox, favorecendo assim o perfil metabólico (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2016).

Os ácidos graxos da família ômega 3 são obtidos essencialmente da dieta, sendo que o ácido alfa-linolênico encontra-se em elevadas concentrações no óleo de linhaça (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2016). Portanto, sabendo que o óleo de linhaça é uma das maiores fontes de ácido alfa-linolênico (ômega 3) e sabendo-se do papel regulatório dos ácidos graxos da família ômega 3 no metabolismo, torna-se relevante um estudo para avaliar a eficácia desses ácidos graxos na modulação de parâmetros associados aos processos redox, resposta glicêmica e perfil lipídico em ratos submetidos à dieta hiperlipídica. Sendo assim, investigando os efeitos desses ácidos graxos no nosso organismo podemos priorizar dietas que possam alterar o estado inflamatório e redox e, conseqüentemente, melhorar o perfil metabólico.

Baseado no exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do óleo de linhaça na modulação do balanço redox e do perfil metabólico em ratos submetidos à dieta hiperlipídica.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Avaliar o efeito do óleo de linhaça na modulação do balanço redox e no perfil metabólico em ratos submetidos à dieta hiperlipídica.

2.2 - Objetivos específicos

- 1) Avaliar o ganho de peso e ingestão dos animais;
- 2) Avaliar os parâmetros que determinam a síndrome metabólica (Pressão arterial, Teste de resposta insulínica, Teste de tolerância oral a glicose, peso, colesterol total, percentual de gordura, triacilgliceróis , glicemia);
- 3) Avaliar o peso relativo do tecido adiposo branco (retroperitoneal, epididimal e mesentérico) e do coração;
- 4) Avaliar níveis séricos de glicose e insulina;
- 5) Avaliar os níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol total e suas frações;
- 6) Quantificar a gordura hepática;
- 7) Avaliar o marcador de dano oxidativo TBARS no fígado e no coração;
- 8) Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) e catalase no fígado e no coração;
- 9) Realizar a análise histopatológica do tecido adiposo branco e tecido cardíaco.

3 - REVISÃO DA LITERATURA

3.1- Mudança do perfil alimentar

A alimentação é essencial para o ser humano e é com ela que nós obtemos proteínas, vitaminas, minerais e nutrientes que são essenciais para um adequado funcionamento do nosso corpo (MORATOYA et al., 2013). Ao longo do tempo, devido a diversos fatores, a alimentação do homem vem mudando. Com a globalização e o novo modo de vida urbano em que não se tem muito tempo para preparar as refeições, as indústrias começaram a investir em produtos alimentícios que são rápidos, fáceis e práticos de preparar, além de saborosos, como pães, biscoitos, embutidos, refrigerantes e refeições prontas. Entretanto, o aumento do consumo de produtos industrializados fez com que a dieta fosse caracterizada por um excesso de alimentos com grande densidade energética, ricos em gordura de má qualidade, como gordura trans e hidrogenada e carboidratos simples, como o açúcar refinado, e por uma diminuição no consumo de carboidratos complexos, como os alimentos na sua forma integral, que são uma importante fonte de fibras alimentares (DIEZ GARCIA, 2003).

O consumo excessivo de produtos industrializados pode causar problemas para a saúde humana já que dietas ricas em gorduras podem levar à obesidade e ao desenvolvimento de outras doenças crônicas como, hipertensão arterial, doença coronariana, dislipidemias, diabetes mellitus tipo 2 (LIMA *et al.*, 2007), além do desenvolvimento de síndrome metabólica. Segundo a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (2005), a síndrome metabólica consiste em um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovasculares, relacionado principalmente à resistência à insulina.

3.2 - Síndrome Metabólica (SM)

A síndrome metabólica está associada a altos índices de morbi-mortalidade cardiovascular e vem gerando altos custos sociais e econômicos no mundo. Com índices preocupantes, atualmente, ela tem sido vista como uma epidemia mundial (ZUJKO, 2018). Em 1975, Haller e Hanefeld determinaram o termo síndrome metabólica que teve como característica a combinação de alguns fatores de risco que, quando ocorrem ao mesmo tempo, resultam em efeitos não desejáveis como diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares. Os fatores de risco importantes para que haja o desenvolvimento da síndrome metabólica é a

falta de atividade física, dieta rica em carboidratos simples e gorduras que contribuem para duas características que são centrais para essa síndrome, como a obesidade central e a resistência à insulina. Os componentes que juntos definem a síndrome metabólica são hipertrigliceridemia circulante (dislipidemia), hiperglicemia, resistência à insulina, obesidade e hipertensão (ONEILL; ODRISCOLL, 2014).

Existem várias definições para a síndrome metabólica, e as três mais utilizadas são da Organização Mundial da Saúde (OMS), National Cholesterol Education Program's Adults Treatment Panel III (NCEP-ATP III) e da International Diabetes Federation (IDF). A definição da OMS indica primeiro a avaliação da resistência à insulina ou do distúrbio do metabolismo da glicose e também inclui a medida da albuminúria, sendo assim é mais complexa de ser avaliada. A definição do NCEP-ATP III inclui todos os fatores citados, exceto a comprovação de resistência à insulina já que foi desenvolvida para uso clínico. Por essa razão essa avaliação é muito mais simples e prática e por isso essa é a definição que a Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica recomenda. Outra definição foi apresentada durante a convenção sobre síndrome metabólica e pré-diabetes realizada em Berlim em 2005. Nela a adiposidade central foi colocada como componente principal e os pontos de corte de circunferência da cintura foram mais baixos que na definição do NCEP e houve valores específicos para os diferentes grupos étnicos (RODRIGUES et al., 2010).

As diferenças entre essas definições dificultam a determinação da verdadeira prevalência da síndrome metabólica em todo o mundo, bem como em países, gêneros e etnias específicos (ONEILL; ODRISCOLL, 2014). A síndrome metabólica tem uma prevalência estimada na população geral entre 20 a 25%, com forte tendência ao crescimento nas décadas seguintes. Quando presentes em homens e mulheres mais velhos essa prevalência aumenta e pode chegar a 42% em pessoas com idade superior a 60 anos. Esses números na população são alarmantes já que portadores dessa síndrome têm mais chances de desenvolver diabetes e doenças cardiovasculares que são doenças que tem alta taxa de mortalidade na população mundial (RIBEIRO FILHO et al., 2006).

Sabe-se que o fator central desencadeante da resistência insulínica, principal responsável pela síndrome, é um aumento da produção de fatores pró-inflamatórios. A presença de citocinas inflamatórias desencadeia uma cascata, onde há ativação de quinases como a IKK e JNK que prejudicarão a fosforilação em tirosina do receptor de insulina (IRS1), fazendo com que ocorra a fosforilação em serina, acarretando uma disfunção do mesmo, o que prejudica a captação de glicose e consequente liberação de insulina. Além disso, a

ativação das quinases desencadeia a migração do fator de transcrição NFkB para núcleo da célula, aumentando a produção de citocinas inflamatórias. Dessa forma, uma dieta ocidental favorece uma produção excessiva de citocinas inflamatórias, sendo de suma importância a ingestão de alimentos de boa qualidade ricos em antioxidantes para cessar esse ciclo. (CINTRA, 2011).

3.3- Ácidos graxos

As gorduras que são encontradas nos diversos alimentos industrializados englobam duas categorias de substâncias: a do glicerol e a dos chamados ácidos graxos (MARTINS, et al., 2008). Sabe-se que os componentes das gorduras, especialmente os ácidos graxos desempenham funções importantes na estrutura das membranas das células e em processos metabólicos, mas o consumo excessivo de gorduras pode acarretar em problemas para a saúde (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2016). O que difere entre os vários tipos de gordura é a sua composição, o tipo de ligação entre os átomos de carbono e se passaram ou não por algum processamento, o que afeta diretamente a qualidade dessas e sua ação no organismo.

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos e os predominantes possuem uma longa cadeia carbônica, geralmente com um número par de átomos de carbono, sem ramificações, podendo ser classificados pelo comprimento da cadeia de carbono, pelo número de duplas ligações na cadeia de carbono e pela configuração das duplas ligações. Sendo assim, podem ser divididos em saturados e insaturados (SANTOS et al., 2013).

Os ácidos graxos saturados são aqueles que não possuem duplas ligações e podem ser divididos em ácidos graxos de cadeia média que tem entre 8 e 12 átomos de carbono e cadeia longa que tem acima de 14 átomos de carbono.

Os principais ácidos graxos saturados de cadeia longa são o mirístico, palmítico e o esteárico. Sendo que o mirístico está presente em altas concentrações no leite e seus derivados, o palmítico na gordura animal e no óleo de palma e o esteárico na gordura do cacau (SANTOS et al., 2013). O ácido palmítico é o mais presente na alimentação humana, e por isso é associado a um efeito deletério elevado já que é o mais consumido (LOTTENBERG et al., 2012).

Quando os ácidos graxos saturados são absorvidos eles têm diferentes caminhos, sendo que os de cadeia média vão ser transferidos para a circulação sanguínea e transportados ligados à albumina, pela veia porta, diretamente para o fígado, onde vão ser metabolizados, e, portanto, não ocasionam aumento do colesterol sérico. Já os ácidos graxos saturados de cadeia

longa vão ser esterificados nos enterócitos e vão formar os triacilgliceróis. Os triacilgliceróis então vão ser transportados pelos quilomícrons no sistema linfático e depois para a corrente sanguínea. Após isso, serão hidrolisados pela lipase lipoproteica, o que leva a liberação dos ácidos graxos para os tecidos. Estes ácidos graxos poderão ser re-esterificados para a síntese de novas moléculas de triacilgliceróis que serão armazenados no organismo (SANTOS et al., 2013). Por influenciar nos níveis de triacilgliceróis plasmáticos, colesterol total e colesterol LDL, alguns ácidos graxos saturados têm sido associados a efeitos deletérios no organismo, apesar de possuírem importantes mecanismos fisiológicos (LOTTENBERG et al., 2012).

Em relação aos ácidos graxos insaturados, eles apresentam duplas ligações e são classificados pela quantidade dessas em sua estrutura. Ou seja, ácidos graxos monoinsaturados vão apresentar apenas uma ligação dupla em sua cadeia carbônica e os poli-insaturados vão apresentar mais de uma dupla ligação em sua cadeia carbônica (SANTOS et al., 2013).

Quando apresentarem mais de uma dupla ligação, elas sempre vão estar separadas por três carbonos no mínimo e, normalmente, vão ocorrer em uma posição não conjugada, podendo também acontecer em uma posição conjugada que é quando as ligações duplas são alternadas por uma ligação simples (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2010). Outra classificação dos ácidos graxos poli-insaturados é a classificação ômega que consiste em observar a localização da primeira dupla ligação da cadeia carbônica a partir do grupo metila. Essa classificação identifica a série do ácido graxo, por meio da letra ômega (ω), sendo os principais ω -3, ω -6 e ω -9 (SANTOS et al., 2013). Sendo que os ácidos graxos ω -3 vão apresentar sua primeira insaturação entre os carbonos 3 e 4, enquanto que os ω -6 apresentam a primeira insaturação entre os carbonos 6 e 7, a partir do último grupo metílico da molécula, já os ω -9 vão apresentar sua insaturação entre os carbonos 9 e 10. (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2010).

Os ácidos graxos ômega 3 como o ácido alfa-linolênico (C18:3), ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5) e ácido docosaexanoico (DHA, 22:6) e 6 como o ácido linoleico (C18:6) são muito importantes para o nosso organismo já que eles são necessários para manter sob condições normais as membranas das células, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Esses ácidos graxos também vão participar da síntese da hemoglobina e da divisão celular, e eles são denominados essenciais por que o nosso organismo não consegue sintetizá-los (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2016).

Apesar dos benefícios do consumo desses ácidos graxos, ao longo dos anos, devido ao agronegócio e a agricultura moderna houve um aumento da ingestão da razão ácidos

graxos ômega-6 / ômega-3. Entretanto, essa dieta não é favorável à saúde já que os ácidos graxos ômega 6 são metabolizados em ácido araquidônico que é substrato para a produção de eicosanoides que geram metabólitos como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, ácidos graxos hidroxila e lipoxinas que, quando prevalentes possuem ação pró inflamatória, pois formam-se em quantidade maior do que os que são formados a partir dos ácidos graxos ômega-3 e vão contribuir para a formação de ateromas e trombos, distúrbios inflamatórios e a proliferação celular. Sendo assim, o aumento da relação ômega-6 / ômega-3 na dieta é altamente pró-trombótica e pró-inflamatória, pró-agregativo, podendo provocar o aumento da viscosidade sanguínea, vasoespasmo, vasoconstrição e proliferação celular, favorecendo então o desenvolvimento de doenças como aterosclerose, obesidade e diabetes (SIMOPOULOS, 2016).

Existem também os ácidos graxos trans que são formados a partir da fermentação de bactérias em ruminantes, sendo encontrados então em pequenas quantidades na carne e no leite. Eles são isômeros geométricos dos ácidos graxos insaturados, ou seja, exibem a mesma fórmula molecular, porém com estrutura diferente. Ácidos graxos trans também podem ser sintetizados a partir de um processo catalítico que é muito utilizado em alimentos industrializados. A fonte mais relevante dos ácidos graxos trans é a gordura hidrogenada (ácido elaídico) (LOTTENBERG et al.,2012). Sendo assim, vários produtos industrializados como biscoitos, sorvetes cremosos, tortas, produtos de panificação como pão francês, folhados e pão de queijo empregam esse tipo de gordura na sua fabricação (SANTOS et al., 2013).

Os ácidos graxos trans podem aumentar a concentração plasmática de LDL-c e diminuir a de HDL-c (classificadas em subpartículas de acordo com sua densidade e tamanho, das quais as mais importantes são o HDL-3, partícula pequena e densa e o HDL-2, partícula grande e menos densa) e por isso estão associados ao risco de doenças cardiovasculares. O mecanismo associado ao aumento de LDL-c se dá por mecanismos semelhantes aos dos ácidos graxos saturados. Os ácidos graxos trans diminuem a expressão gênica dos receptores do fígado (receptor B-E) que são encarregados pela captação das partículas de LDL, e também se inserem nas LDL-c e isso possibilita mais espaço nessa partícula para o transporte de colesterol. Já a diminuição da concentração plasmática de HDL-c pode ser esclarecida pela ocorrência de os ácidos graxos trans levarem ao aumento da atividade da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) que é uma proteína que está implicada em uma fase importante do transporte reverso de colesterol. Essa proteína é encarregada pelo deslocamento de éster de colesterol das HDL para VLDL e LDL. Os ácidos graxos trans

também podem aumentar o catabolismo da proteína Apo A1, que está presente principalmente nas HDL e é responsável por retirar parte do colesterol presente nos macrófagos das placas de aterosclerose, além de diminuir o catabolismo da apolipoproteína B-100. Além disso, os ácidos graxos trans também diminuem as moléculas de HDL-2, que pode ser captada pelo fígado e ter seu conteúdo de colesterol extraído no interior dos hepatócitos para então retornarem à circulação como HDL-3 refazendo o processo de transporte reverso do colesterol. Sendo assim, a dieta com alto teor de ácidos graxos trans conduz a um perfil lipídico pró-aterogênico, o que resulta em um maior risco cardiovascular (SANTOS et al., 2013).

3.3.1- Ácidos graxos ω -3

Os ácidos graxos ω -3 têm como o seu precursor o ácido alfa-linolênico. E quando ocorrem as bio reações de alongamento da cadeia de carbono e desidrogenação vão ser gerados os ácidos EPA (eicosapentaenóico) e DHA (docosahexaenóico). Como o nosso metabolismo não permite sintetizar os ácidos graxos insaturados das famílias ω -3, estes devem ser ingeridos na dieta alimentar (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2010).

Os ácidos graxos poli-insaturados são encontrados em plantas inferiores que se desenvolvem em ambientes aquáticos marinhos. Sendo que o ácido alfa-linolênico é encontrado em maior quantidade nas hortaliças em espécies com folhas de coloração verde-escura, e está presente também em alguns cereais e leguminosas, porém sua concentração depende muito da espécie e de fatores sazonais. Esse ácido graxo também está presente em alimentos de origem animal como peixes e aves, e a concentração depende da dieta em que esses animais forem submetidos (FOOD INGREDIENTS BRASILE, 2016). Em relação aos óleos vegetais, o ácido alfa-linolênico está em maior concentração no óleo de linhaça, mas os óleos de canola e de soja também apresentam concentrações importantes.

A linhaça (*Linum usitatissimum L.*) é uma planta originária da Ásia e pertence à família das *Linaceas* (MARQUES, 2008). Existem duas variedades de linhaça que podem ser da cor marrom ou dourada, e essa cor depende da quantidade de pigmentos presentes no revestimento externo da semente. Elas apresentam composição química parecida e, portanto atividade biológica semelhante (BARROSO et al., 2014). A composição química da linhaça é variada apresentando lipídios, proteínas, fibra alimentar, mucilagem, água e cinzas que são compostas de potássio, fósforo, magnésio, cálcio, enxofre, entre outros. Sendo que o lipídeo alfa-linolênico, as fibras solúveis e lignanas possuem atividade farmacológica importante (MARQUES, 2008).

Várias pesquisas mostram que esses ácidos graxos ômega 3 podem proporcionar vários benefícios à saúde como a capacidade de auxiliar no controle da lipídemia e minimizar reações inflamatórias. Portanto, eles podem atuar como coadjuvantes no tratamento de muitas doenças como as cardiovasculares, artrite, psoríase, dentre outras. Além disso, estudos recentes vêm demonstrando a relação do uso do DHA para a melhora de sintomas de depressão, Alzheimer e distúrbios de comportamento, como a hiperatividade e déficit de atenção (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2016).

Essas pesquisas revelam também que os ácidos graxos ômega 3 podem ser essenciais para que o coração e o cérebro funcionem corretamente. Em relação ao coração, o consumo de ômega 3 pode diminuir a taxa de triacilgliceróis e colesterol total no sangue, reduzir a pressão arterial em indivíduos que apresentam hipertensão leve e podem ainda alterar a estrutura das membranas das células sanguíneas e assim tornar o sangue mais fluido. Além disso, ele pode evitar a fixação e oxidação de LDL na parede das artérias evitando assim a ocorrência de ataques cardíacos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2016).

Ácidos graxos ômega 3 se ligam a receptores nucleares como a família de receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPAR), essa ligação pode contribuir para a oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias e então reduzir a síntese de triacilgliceróis no fígado (GUO et al., 2017). Além disso, os ácidos graxos ômega 3 podem inibir a expressão das proteínas de ligação ao elemento de resposta a esterol (SREBPs) que são fatores de transcrição ligados a membranas que estão envolvidos na lipogênese, diminuindo assim a síntese de ácidos graxos. Sabe-se que esses ácidos graxos exercem maior inibição na expressão de SREBP-1a e SREBP-1c. Ainda podem suprimir a proteína responsável pela formação de triacilgliceróis a partir da glicose, a ChREBP (proteína de ligação do elemento regulador de carboidratos) (LOTTENBERG et al., 2012).

Uma vez que os ácidos graxos ômega 3 estão circulando em grande quantidade há uma melhora da fluidez da membrana celular o que favorece a sinalização celular. Essa melhora da fluidez pode beneficiar o funcionamento dos receptores de superfície e sua sinalização celular e assim melhorar a sensibilidade à insulina e a promoção do deslocamento do transportador de glicose-4 (Glut-4) para transportar glicose do citoplasma para o interior das células, favorecendo a homeostase da glicose (GUO et al., 2017).

Conforme são incorporados na membrana celular o EPA e o DHA influenciam na organização, fluidez e permeabilidade e também na atividade das proteínas transmembrana, como os receptores, enzimas e canais iônicos. Eles podem modular as atividades dos canais de potássio, sódio e cálcio nas células do miocárdio, podendo assim regular a excitabilidade

elétrica e a contratilidade do miócito. Além disso, quando incorporado à membrana dos cardiomiócitos o DHA pode influenciar o sistema beta-adrenérgico, podendo ser um importante mecanismo envolvido na ação hipotensora e antiarrítmica do DHA, e pode também estimular a liberação de ATP do endotélio, e assim aumentar a vasodilatação pela estimulação da liberação de óxido nítrico (NO), o que pode explicar o efeito redutor da pressão arterial do DHA (DESSÌ et al., 2013).

O cérebro é um órgão que contém uma quantidade significativa de gorduras, mais de 20%, e elas vão desempenhar funções muito importantes. Então, um cérebro saudável vai depender da quantidade de gordura ingerida, mas também vai depender do tipo dessa gordura. O ácido graxo ômega 3 faz parte da massa cinzenta do cérebro que vai promover a comunicação entre as células nervosas e vai ajudar a construir as bainhas de mielina que vão estar ao redor das fibras nervosas e vão permitir assim uma neurotransmissão química mais eficiente com uma troca mais rápida de mensagens entre os neurônios, sendo importante para auxiliar na monitoração do humor e da memória (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2016). Além disso, os ácidos graxos ômega 3 também funcionam como ligantes endógenos dos fatores transcricionais receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR- γ e α) que tem como uma importante função anti-inflamatória em doenças como o Alzheimer, esclerose múltipla e doença de Parkinson, isso por que eles diminuem a síntese de óxido nítrico e prostaglandina E2, e atua em vários pontos da ativação microglial, mielinização, resposta à proteína de choque térmico (HSP), morte celular e inibição da proteína ativadora 1 (AP-1) e NF- κ B (FREITAS et al., 2017).

O consumo de ômega 3 também é importante na maternidade já que durante a gestação ocorre a elevação das concentrações de triacilgliceróis e VLDL para tentar suprir a demanda de energia da mãe, para o fornecimento de colesterol e ácidos graxos essenciais ao feto e como precursor de hormônios para a placenta. Então, mulheres grávidas devem ser aconselhadas a consumir ômega 3 (FALUDI et al., 2017). Além disso, esses ácidos graxos podem também reduzir o risco de depressão pós-parto, reduzir as mudanças de humor e melhorar a saúde durante e depois da gravidez. (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2016).

Além de todos os benefícios citados acima, a ingestão de ômega 3 também é importante para a manutenção do adequado status redox (POUDYAL et al., 2011). O desequilíbrio redox pode ser definido como um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes que existe na célula e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) o que pode causar dano oxidativo das estruturas celulares como as membranas, proteínas, lipídios e DNA, levando à cessação das vias de sinalização celular e inativação de enzimas metabólicas. Sendo

assim, o desequilíbrio redox vem sendo associado ao desenvolvimento de várias doenças como as neurodegenerativas, autoimunes, câncer, doenças inflamatórias como a periodontite, diabetes, artrite reumatóide, acidente vascular cerebral e doenças pulmonares inflamatórias, (FARÍAS et al., 2017) além de ser um evento importante no agravamento da síndrome metabólica e doenças cardiovasculares.

A defesa antioxidante que tem o papel de controlar a formação dos radicais livres é feita por sistemas enzimáticos e não enzimáticos. Entre os enzimáticos estão as enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT). A SOD realiza esse efeito através da dismutação do H_2O_2 em O_2 e a CAT pela redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 (BARBOSA et al., 2010).

Entretanto, o papel dos ácidos graxos ômega 3 na redução do dano oxidativo e na restauração da homeostase de radicais livres não é completamente compreendido (POUDYAL et al., 2011). Alguns estudos sugerem que os ácidos graxos ômega 3 podem funcionar como antioxidantes e assim, evitar a peroxidação lipídica de membranas, já que as moléculas desses lipídeos contêm várias duplas ligações sendo mais susceptíveis a perda do hidrogênio para as espécies reativas do oxigênio, já que as ligações π são mais fracas e sua energia é menor que a das ligações σ . Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 como eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) possuem em sua estrutura cinco e seis ligações duplas respectivamente, sendo assim eles vão fornecer mais substrato para que haja o ataque dos radicais livres, e assim diminuir ou impedir que os radicais livres ataquem os sistemas biológicos importantes para a homeostase do nosso organismo (CAMPOS et al., 2011). Outros estudos revelam também que os efeitos benéficos em relação ao desequilíbrio redox pelos ácidos graxos ômega 3 está associado a inserção desses ácidos na membrana celular e a modulação de vias de sinalização redox. Ou seja, o consumo de ômega 3 aumenta a expressão e atividade das enzimas antioxidantes e diminui as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são produtos da peroxidação lipídica (FARÍAS et al., 2017).

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 também auxiliam no controle da inflamação. O sinal para a migração de neutrófilos pelas células endoteliais é fornecido quando o ácido araquidônico é metabolizado na prostaglandina-D2 (PGD2) dos eicosanóides pelas enzimas ciclo-oxigenase (COX). Quando o EPA é utilizado como substrato para as enzimas COX, leva-se a geração de prostaglandina-D3 (PGD3) que inibem a migração de neutrófilos através das células endoteliais competindo pelo receptor PGD2. Outros mecanismos do controle sobre a inflamação é que os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 competem pela síntese de prostaglandinas e leucotrienos com os ácidos graxos ômega 6 em

relação às enzimas ciclo-oxigenase e lipoxigenase e também eles podem levar a uma diminuição na produção de peróxido de hidrogênio, que é um ativador do fator nuclear κ B (NF κ B), por que podem se ligar as espécies reativas de oxigênio devido a sua grande quantidade de ligações duplas. O fator nuclear κ B controla a expressão coordenada de moléculas de adesão e de quimiotáticos específicos de leucócitos após a estimulação de citocinas (DESSI et al., 2013).

Sendo assim, como os ácidos graxos ômega 3 e seus subprodutos (EPA/ DHA) possuem propriedades antioxidantes e por isso apresentam potencial efeito na melhora da resposta glicêmica e perfil lipídico, hipotetizamos que esses seriam eficazes no tratamento da Síndrome Metabólica já pré-estabelecida, visto que esta está diretamente relacionada à resistência insulínica. Então, como o óleo de linhaça é uma das maiores fontes de ácido alfa-linolênico (ômega 3) investigou-se o efeito desse óleo na modulação do status redox e dos parâmetros metabólicos em ratos com síndrome metabólica já estabelecida.

4 -METODOLOGIA

4.1 – Animais

Para realização deste estudo foram utilizados 39 ratos machos da linhagem Fisher com 4 semanas de idade, alocados no biotério da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) em gaiolas metabólicas. Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob o numero de protocolo 2017/13.

4.2 - Delineamento experimental

No início os ratos foram distribuídos em dois grupos, sendo que o grupo dieta padrão que continha 13 animais recebeu a ração comercial para ratos e o grupo dieta hiperlipídica que continha 26 animais recebeu a dieta hiperlipídica durante 18 semanas. Após as 18 semanas foram eutanasiados 7 animais do grupo controle e 6 animais do grupo experimental para coleta de material biológico necessário para a confirmação da síndrome metabólica. O sangue foi coletado para obtenção de soro e plasma para dosagem de glicose, triacilgliceróis, colesterol total e frações. Foram coletados também os tecidos adiposos brancos, retroperitoneal, epididimal e mesentérico para análise histológica e foram aferidos medida do peso e comprimento nasoanal para cálculo do índice de Lee. Os 26 animais restantes, 8 animais do grupo controle e 18 animais do grupo dieta, foram redistribuídos de forma que os 8 animais do grupo controle receberam 1 mL de água diariamente por gavagem oro-gástrica, 10 animais do grupo síndrome metabólica sem tratamento recebeu 1 mL de água diariamente por gavagem e 8 animais do grupo síndrome metabólica tratado recebeu 1g/Kg (ORTIZ-AVILA et al., 2015) de óleo de linhaça dourada diariamente por gavagem oro-gástrica. O tratamento com o óleo de linhaça foi realizado durante 15 dias. Após o tratamento, mediante anestesia, os animais foram eutanasiados para coleta do material biológico que foi armazenado em freezer -80°C para as análises posteriores.

4.3 – Dieta

Os animais que fizeram parte do grupo controle receberam uma ração padrão balanceada à vontade, já os animais do grupo síndrome metabólica receberam uma dieta hiperlipídica à vontade. A composição nutricional e distribuição de macronutrientes das duas dietas está descrita abaixo:

Tabela 1: Composição nutricional da dieta hiperlipídica

	Dieta Hiperlipídica (g/Kg)
Caseína	224
Sacarose	434
Óleo de soja	40
Celulose	74,1
Mistura de minerais	47,95
Mistura de vitaminas	13,75
Metionina	3,87
Bitartarato de colina	2,6
Gordura hidrogenada	160

Tabela 2: Distribuição de macronutrientes em 1 Kg da dieta hiperlipídica

	Macronutrientes (g)	Macronutrientes (%)	Densidade calórica (kcal)	Densidade calórica (%)
Carboidratos	434	50,35	1736	39,03
Proteínas	227,87	26,43	911,36	20,49
Lipídios	200	23,20	1800	40,47

Composição nutricional da ração NUVILAB:

Milho integral moído, Farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio (sal comum), vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT.

Tabela 3: Níveis de garantia por quilograma de produto:

	g/kg
Umidade (max)	125
Proteína bruta (min)	220
Extrato etéreo (min)	40
Matéria mineral (max)	90
Fibra bruta (max)	70

4.4 – Pletismografia

Para aferir a pressão sistólica dos animais foi realizada a pletismografia na veia caudal. Os animais foram ambientados ao túnel de contenção por três dias anteriores à análise. No dia da análise, para a aferição os animais foram colocados no túnel de contenção de forma que ficassem estáticos e com a cauda expostas do lado de fora. Para a dilatação da veia foi colocado uma fonte de luz sobre as caudas por 10 minutos e posteriormente foi colocado e afixado o transdutor (esfingomanômetro) na cauda próximo ao reto do animal. Os dados de pressão foram obtidos pelo programa Windoq Lite Data Acq DI-199 após estabilização da pressão.

4.5 - Teste de resposta insulínica

Para avaliar a resposta à insulina foi aplicado aos animais, após 8 horas de jejum, por via subcutânea 0,5 UI/kg e posteriormente foi aferida a glicemia capilar em 4 tempos (0', 30', 60', 90').

4.6 - Teste de tolerância oral a glicose

Para avaliar a tolerância oral a glicose foi aplicado aos animais, após 8 horas de jejum, por gavagem uma solução de 1 mL contendo 2,5g de glicose/kg do animal e posteriormente foi aferida a glicemia capilar em 5 tempos (0', 30', 60', 90', 120').

4.7 - Análise dos parâmetros bioquímicos do soro e plasma

Plasma foi utilizado para a dosagem de glicose, já o soro foi utilizado para as dosagens do perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL e triacilgliceróis). Foram utilizados kits comerciais do laboratório LABTEST® (Lagoa Santa, MG, Brasil) para a realização das dosagens.

4.8 - Extração e dosagem de lipídeos hepáticos

Extraiu-se os lipídeos totais de acordo com o método desenvolvido por Folch et al. (1957). Homogeneizou-se 200mg de tecido hepático em 4mL de solução clorofórmio-metanol (2:1 vol/ vol). Após isso adicionou-se 400 µL de metanol ao homogenato que foi agitado no vórtex por 3 minutos. Em seguida centrifugou-se o homegenato a 3.000 ×g, por 10 minutos.

Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo que foi previamente pesado, e adicionou-se a 800 µL de clorofórmio e 320 µL de solução de NaCl 0,73%. Em seguida, centrifugou-se mais uma vez a 3.000 × g, por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante o precipitado foi lavado 3× com 150µL de solução de Folch (48% metanol + 47% água + 3% de clorofórmio + 2% de NaCl 0,2%). Em uma estufa semiaberta a 50°C os extratos lipídicos foram secos até que houvesse a total evaporação do solvente.

Quando todo o solvente foi evaporado, transferiram-se os tubos para o dessecador que foram pesados novamente. A determinação da quantidade de lipídeos na amostra foi feita pela diferença entre o peso do tubo (Pt) final e o peso do tubo inicial, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Quantidade de lipídeos na amostra (g)} = (\text{Pt final} - \text{Pt inicial}) \times 100$$

Após a determinação do peso, solubilizou-se em 200 µL de isopropanol os lipídeos que foram extraídos do fígado. Posteriormente, a concentração de triglicerídeos foi determinada utilizando kits comerciais do laboratório LABTEST® (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

4.9 - Dosagem de insulina

Foi utilizado o kit comercial “Ultra-Sensitive Rat Insulin Elisa Kit” (Crystal Chem, Downers Grove, IL, USA) para a determinação da concentração de insulina sérica. Quando se utiliza o método de “ELISA sanduiche” (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) esse kit é sensível para determinação de insulina em ratos. Para a determinação da concentração de insulina foi feita interpolação usando a curva padrão gerada pela plotagem da absorbância versus a concentração correspondente do padrão de insulina de rato.

4.10 - Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Nesse método será formado o radical superóxido, pela auto-oxidação do pirogalol, responsável pela redução do MTT a cristais de formazana, e a enzima SOD irá competir com esse radical. Então, a avaliação direta da atividade ou concentração da SOD não é possível

nesse ensaio, sendo assim utiliza-se a quantificação em unidades relativas (MARKLUND et al., 1974).

Homogeneizou-se 100 mg de tecido hepático e 100 mg de tecido cardíaco em 1 mL de tampão fosfato 0,1M pH 7,2. Em seguida centrifugou-se os homogenatos a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e coletou-se os sobrenadantes que foram usados na dosagem. A dosagem foi efetuada em placa de 96 poços, onde se usou 30 µL da amostra (diluída 20 vezes). Posteriormente, acrescentou-se 99 µL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, 6 µL de MTT, 15 µL de pirogalol aos poços que continham as amostras. Utilizou-se 144 µL e 129 µL de tampão fosfato 0,1M, para branco e padrão, respectivamente, e em seguida 6 µL de MTT e 15 µL de pirogalol foram adicionados nesses poços.

Incubou-se a placa por 5 minutos a 37°C, e após esse tempo de incubação foi adicionado 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a reação foi finalizada. As absorbâncias foram lidas em leitor de ELISA a 570 nm.

A atividade da SOD é representada em U/ mL de amostra, sendo que uma unidade de SOD é determinada como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do MTT.

4.11 - Atividade da catalase (CAT)

Foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 0,1M, pH de 7,2, fragmentos de 100 mg de tecido hepático e 100 mg de tecido cardíaco que foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos à 4°C. Como amostra biológica utilizou-se o sobrenadante. Diluiu-se a amostra 50 vezes em tubo de propileno e transferiu-se 10 µL dessa amostra diluída para um novo tubo, e, quando foi adicionado 990 µL de H₂O₂ iniciou-se a reação. Durante dois minutos, a cada trinta segundos, foram determinadas as absorbâncias em um comprimento de onda de 240 nm. Como branco utilizou-se tampão fosfato 0,1M pH 7,2. O delta obtido das duas absorbâncias lidas (absorbância final – absorbância inicial/2) foi a absorbância utilizada para o cálculo. A atividade desta enzima é representada em unidade (U)/ mL de amostra sendo que Uma unidade de catalase corresponde a hidrólise de 1 mmol de H₂O₂ por minuto (Aebi, 1984).

4.12 - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Em 1 mL de tampão Tris ácido clorídrico (HCL) a 20 mM, pH 7,4, 100 mg de tecido hepático e 100 mg de tecido cardíaco foram homogeneizados e centrifugados durante 10

minutos a 4°C a 10.000 rpm. Adicionou-se 250 µL de ácido tricloroacético (TCA), 250 µL de TBA, 125 µL de hidroxitolueno butilado (BHT) a 5 mM no sobrenadante coletado. Após isso as amostras foram incubadas por 15 minutos a 95°C e em seguida centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante coletado foi pipetado nos poços da microplaca para leitura em um comprimento de onda de 535 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808). Para o cálculo do valor de TBARS multiplica-se a absorbância da amostra pelo valor do coeficiente de extinção molar e divide-se este resultado pelo valor de proteínas totais na amostra.

4.13 - Dosagem de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas totais foi baseada no método de Lowry (Lowry et al., 1951). De acordo com este método há a redução do reagente Folin Ciocalteu ao reagir com aminoácidos aromáticos, essa reação é catalisada por íons cobre, em meio alcalino, quando ela acontece forma-se uma coloração azul.

4.14 - Análise histopatológica

O tecido adiposo abdominal e o coração foram removidos e fixados em formol tamponado a 4%. Em seguida esses tecidos foram fixados e processados em uma série decrescente de álcoois e depois embebidos em parafina. Foram obtidas em micrótomo secções parafinadas de aproximadamente 4 µm e, para a visualização da histoarquitetura do tecido, as lâminas foram coradas pela técnica de Hematoxilina & Eosina (HE). As fotomicrografias foram obtidas por meio de um microscópio óptico Leica acoplado a câmera digital DM5000, utilizando o software de análises Leica Application Suite. Para quantificação das áreas dos vacúolos realizou-se a análise morfométrica com o auxílio do software ImageJ, versão 1.32j. e para a quantificação de células inflamatórias no tecido cardíaco foi utilizado o software Leica Qwin v3.5.1.

4.15 - Peso relativo do tecido adiposo e coração

Para cálculo do peso relativo do tecido adiposo e do coração foi considerado o peso do órgão/peso do animal x 100.

4.16 - Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov onde todos os dados foram analisados. Os dados obtidos foram expressos em média \pm erro padrão da média (dados paramétricos) ou mediana [valor mín./valor máx.] (dados não paramétricos). Após a análise de normalidade, utilizou-se o teste estatístico one-way ANOVA e teste t pareado com $p < 0,05$ como valor de significância. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism versão 6.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síndrome metabólica é um distúrbio complexo com interações nos níveis celular e tecidual. Suas principais consequências são doença cardiovascular e resistência à insulina, e os seus principais fatores de risco são a intolerância a glicose, dislipidemia, hipertensão, obesidade abdominal e esteatose hepática. A alimentação baseada nas gorduras dietéticas tem um papel importante na etiologia da síndrome metabólica, sendo assim é importante avaliar o papel dos diferentes tipos de gorduras da alimentação na saúde e doença. (POUDYAL et al., 2013)

Para suprir as necessidades de macro e micronutrientes dos animais foi manipulada uma dieta hiperlipídica a partir da ração AIN-93 (Dieta Padrão) e para avaliar a eficácia dessa dieta na indução da Síndrome Metabólica, foram utilizados 13 ratos da linhagem Fischer, separados em 2 grupos, conforme demonstrado na figura a seguir:

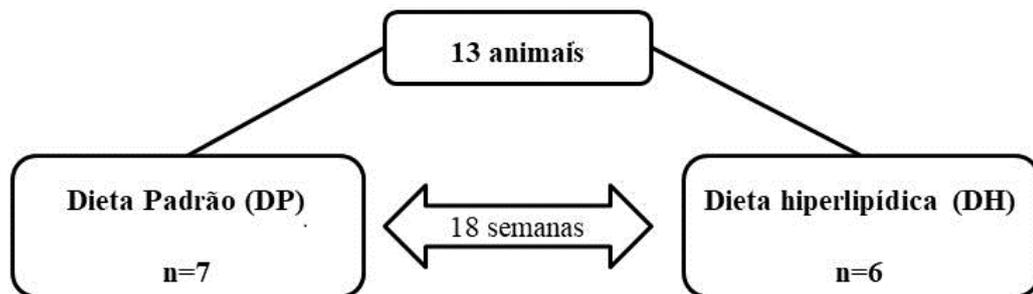


Figura 1: Grupos experimentais utilizados para avaliação da eficácia da dieta hiperlipídica na indução da Síndrome Metabólica (SM).

Após 18 semanas de ingestão das dietas, os animais foram eutanasiados e posteriormente foram avaliados os seguintes parâmetros para verificação do estabelecimento da Síndrome Metabólica: peso, percentual de gordura, pressão arterial, concentrações séricas de: glicose, colesterol total e triacilgliceróis e foram feitas análise da resposta insulínica e teste de tolerância oral à glicose. De acordo com a tabela 4 podemos observar que o grupo que recebeu a dieta hiperlipídica apresentou menor massa corpórea em relação ao grupo que recebeu a dieta padrão, além disso não foi observado alteração significativa no percentual de gordura e nas concentrações séricas de colesterol total e triglicérides entre os dois grupos.

	Dieta Padrão	Dieta Hiperlipídica	p valor
Peso	334,4±29,21	258,2±36,60	0,021
Colesterol total	113,0±20,49	69,75±20,27	0,107
Percentual de gordura	1,23±0,35	1,58±0,71	0,749
Triacilgliceróis	45,45±17,89	31,17±11,08	0,060

Tabela 4: Parâmetros avaliados nos grupos experimentais para avaliação do estabelecimento da SM. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

Uma hipótese para o maior peso apresentado pelos ratos que consumiram dieta padrão se deve ao fato que eles consumiram uma quantidade maior de ração por semana quando comparado com os ratos que receberam a dieta hiperlipídica como mostrado na figura abaixo:

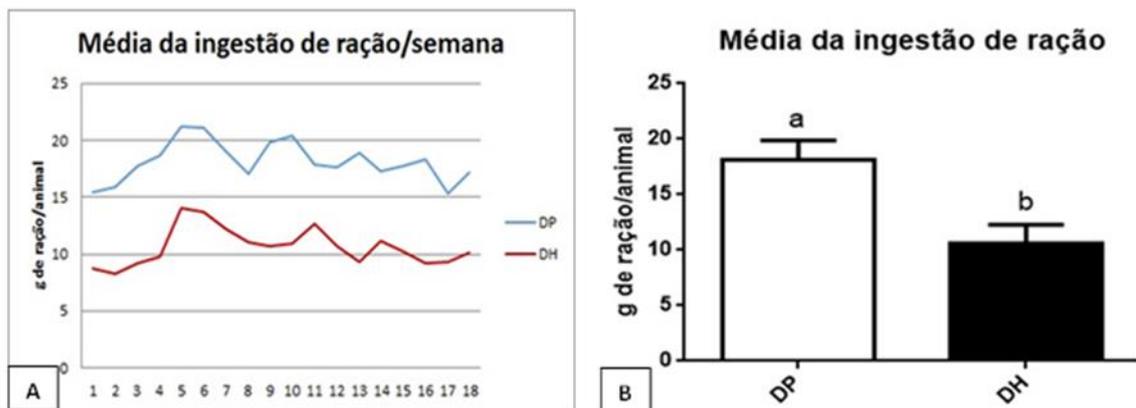


Figura 2: Média da ingestão de ração dos grupos experimentais durante 18 semanas (A) e média da ingestão após 18 semanas (B). Os dados foram expressos em média ± desvio padrão da média e foram analisados por One Way ANOVA (A) seguidos pelo pós teste de Bonferroni e Teste T (C). Letras diferentes indicam diferença significativa quando $p < 0,05$.

Esse resultado condiz com outros encontrados na literatura como o de Gonçalves et al. (2018) que não observou diferença no ganho de peso corporal entre os grupos alimentados com ração controle e com dieta hiperlipídica, porém, mesmo assim, a dieta hiperlipídica induziu o início de fenótipos típicos da síndrome metabólica.

Entretanto, os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram um aumento na pressão arterial (Figura 3.A) e na glicemia (Figura 3.B). Também foi observado uma alteração na resposta metabólica dos animais que receberam a dieta hiperlipídica quando analisado os resultados obtidos no Teste de Tolerância oral à Glicose no tempo 90' (Figura 3.C) e no Teste de resposta insulínica no tempo 60' (Figura 3.D) conforme mostrado na figura a seguir:

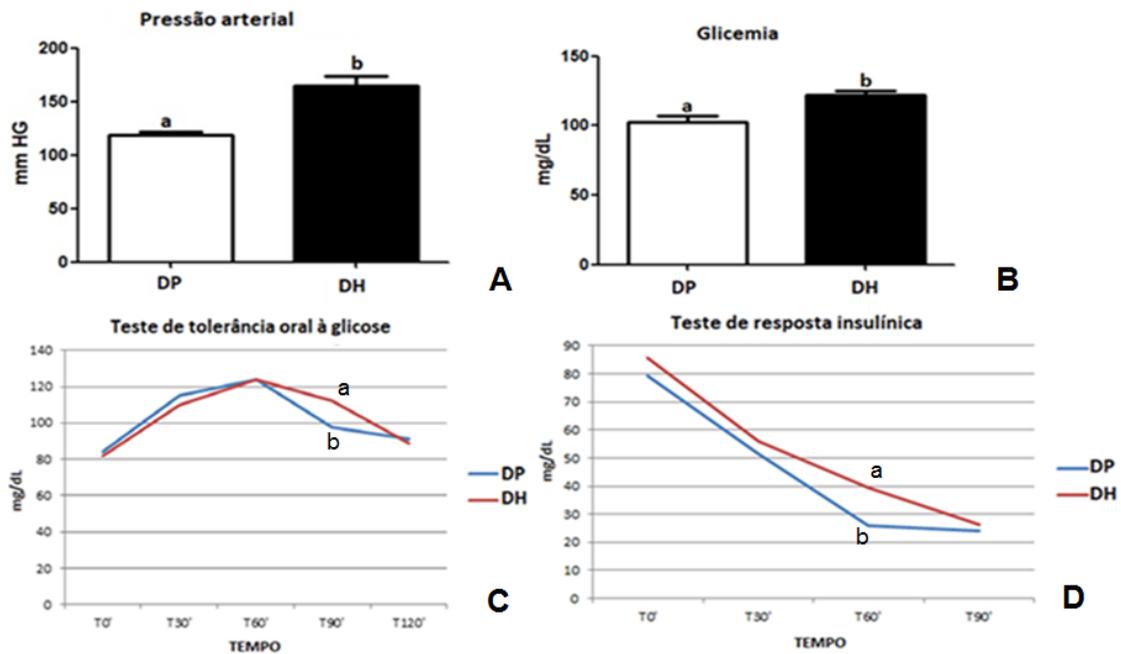


Figura 3: Parâmetros avaliados que confirmaram o estabelecimento da SM. A: Pressão Arterial; B: Glicose sérica; C: Teste oral de tolerância à glicose; D: Teste de resposta insulínica. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão da média e foram analisados pelo Teste T (A, B) e One Way ANOVA (C, D) seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Letras diferentes indicam diferença significativa quando $p < 0,05$.

Após estabelecido as alterações metabólicas decorrentes da ingestão de uma dieta hiperlipídica, nosso próximo passo foi verificar o efeito da suplementação com óleo de linhaça em animais submetidos à dieta hiperlipídica. De acordo com os resultados apresentados no gráfico abaixo o tratamento com Óleo de Linhaça (OL) não afetou a glicemia dos animais com síndrome metabólica (SM) (Figura 4).

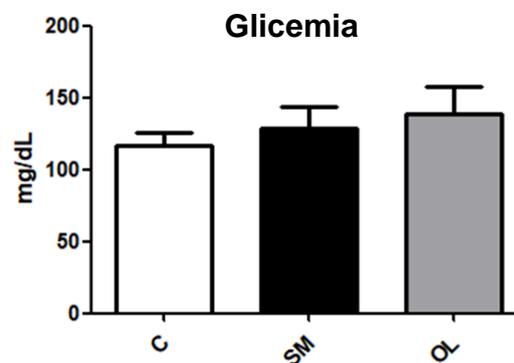


Figura 4: Níveis séricos de glicose dos grupos experimentais: Controle (C), Síndrome Metabólica (SM) e Óleo de linhaça (OL). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

Supõe-se que esses resultados encontrados podem ter sido devido ao tempo de tratamento com o óleo de linhaça, que foi de apenas 15 dias ou então devido à dose de óleo de linhaça que não conseguiu atingir os resultados esperados. Pilar et al (2017), ao avaliar o efeito do tratamento da síndrome metabólica com óleo de linhaça durante 30 dias também não obteve redução da glicemia com o tratamento, sugerindo que para melhora desse parâmetro seria preciso maior dose ou maior tempo de tratamento.

Em relação ao perfil lipídico o tratamento com OL não alterou as concentrações séricas de colesterol total (Figura 5.A), colesterol HDL (Figura 5.B) e da fração não HDL (Figura 5.C) assim como não afetou a concentração de triglicérides (Figura 5.D) conforme mostrado nos gráficos a seguir:

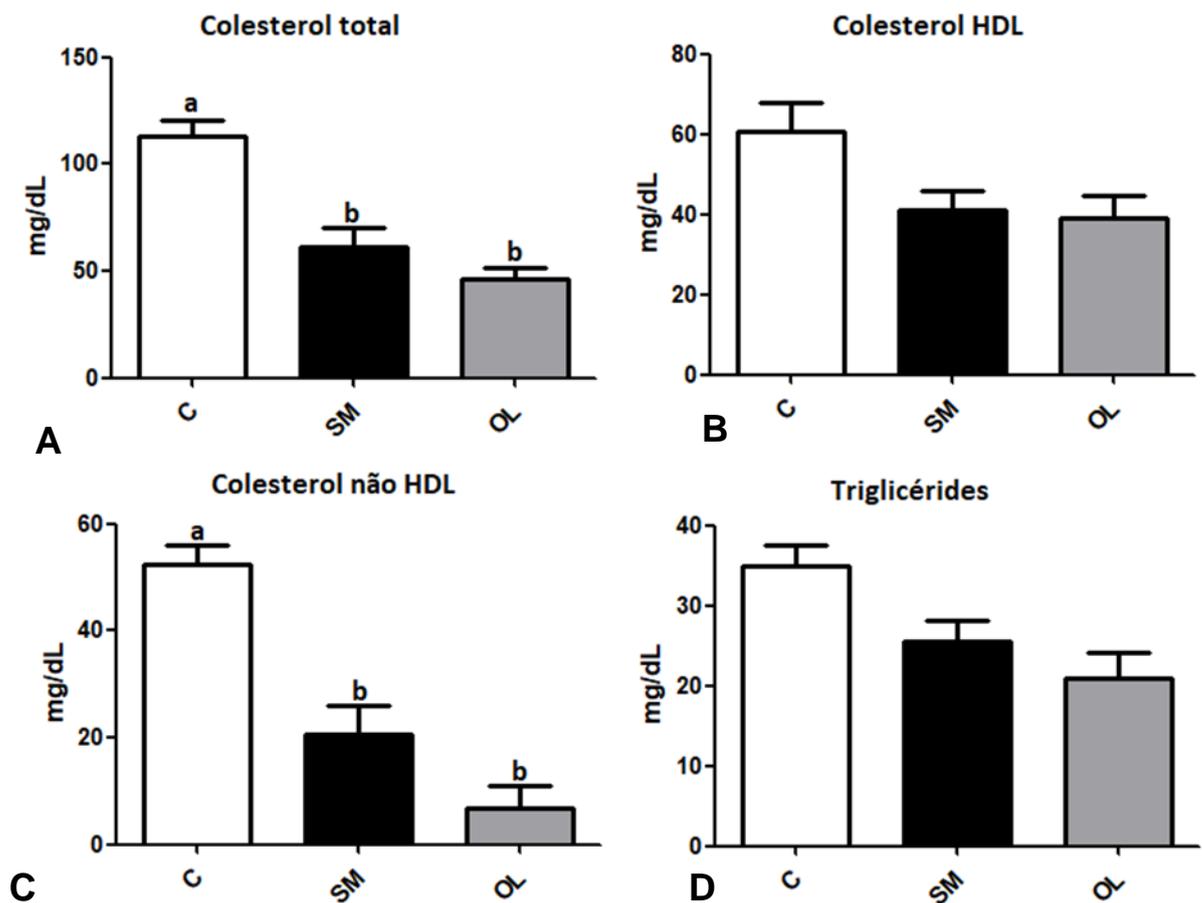


Figura 5: Efeito do tratamento com óleo de linhaça no perfil lipídico. A: Colesterol total; B: Colesterol HDL; C: Colesterol não HDL; D: Triglicérides . C= grupo Controle, SM= grupo Síndrome Metabólica e OL= grupo Óleo de linhaça. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

Vários estudos em animais e humanos demonstram que o ácido alfa-linolênico, que está em altas concentrações no óleo de linhaça, pode reduzir os níveis de colesterol, níveis de glicemia e aumentar os níveis das enzimas antioxidantes. Sendo assim, eles poderiam atuar como coadjuvantes no tratamento de muitas doenças e da síndrome metabólica. Vijaimohan et al. (2006) realizou um estudo onde foi administrado 1mg/kg de óleo de linhaça a ratos albinos machos adultos da raça Wistar alimentados com dieta rica em gordura durante 60 dias. No estudo citado, o tratamento com óleo de linhaça diminuiu consistentemente o colesterol total plasmático na presença de dieta hiperlipídica, assim como acarretou na redução de triacilgliceróis, fosfolipídios e ácidos graxos livres em animais que estavam consumindo dieta rica em gordura associada ao óleo de linhaça. Entretanto, nenhuma mudança significativa nesses componentes lipídicos foi observada entre animais que consumiram apenas óleo de linhaça. No estudo desenvolvido neste trabalho, o tratamento com o óleo de linhaça não alterou os níveis de glicemia, assim como não afetou a concentração de triacilgliceróis dos ratos com síndrome metabólica, o que pode também ser justificado pelo tempo de tratamento, visto que, outros estudos como o de Kaithwas e Majumdar (2012) que investigaram o potencial anti-hiperglicêmico e anti-hiperlipidêmico do óleo de linhaça sobre o diabetes induzido por estreptozotocina em ratos albinos utilizando as doses de óleo (1, 2, 3 mL / kg) por 21 dias de tratamento observou-se uma diminuição na concentração de glicose, de colesterol total, triglicérides e LDL no sangue e um aumento da concentração de HDL sérico.

O tratamento com o óleo de linhaça também não alterou os níveis séricos de insulina nos ratos tratados como mostrado na figura abaixo:

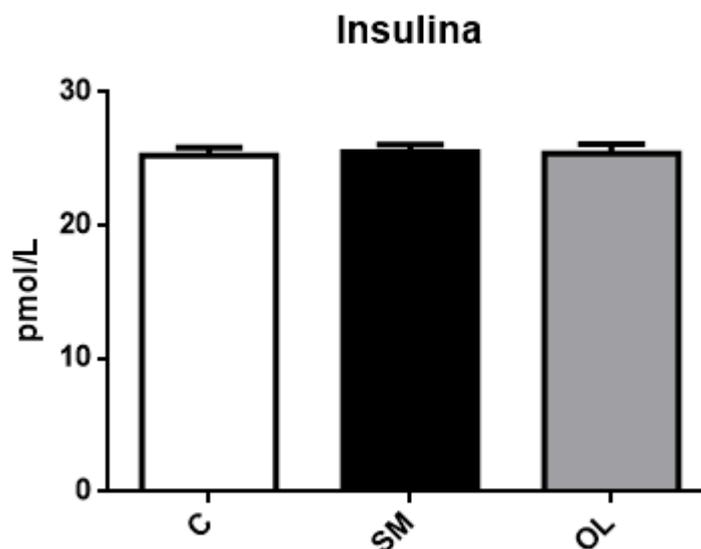


Figura 6: Efeito do tratamento com óleo de linhaça sobre os níveis séricos de insulina. C= grupo Controle, SM= grupo Síndrome Metabólica e OL= grupo Óleo de linhaça. Os dados

foram expressos em média \pm desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

Apesar do modelo animal e vias de tratamento diferentes Gonçalves et al (2018) quando realizaram um estudo em que por 8 semanas camundongos foram divididos em grupo H (grupo dieta hiperlipídica) e HA (grupo dieta hiperlipídica + ômega-3 / ALA) que foram alimentados com uma dieta rica em gordura (60%), enquanto os animais nos grupos C (controle) e CA (controle+ômega-3 / ALA) receberam ração regular onde as dietas dos grupos CA e HA que foram suplementadas com 10% de ácido α -linolênico (ALA) liofilizado obtido de extrato de linhaça, também não encontrou diferenças significativas nos níveis séricos de insulina.

O tratamento com OL não alterou a atividade das enzimas antioxidantes avaliadas: Superóxido dismutase (Figura 7.A) e Catalase (Figura 7.B) assim como não influenciou na relação SOD/CAT (Figura 7.C), conforme mostrado no painel abaixo:

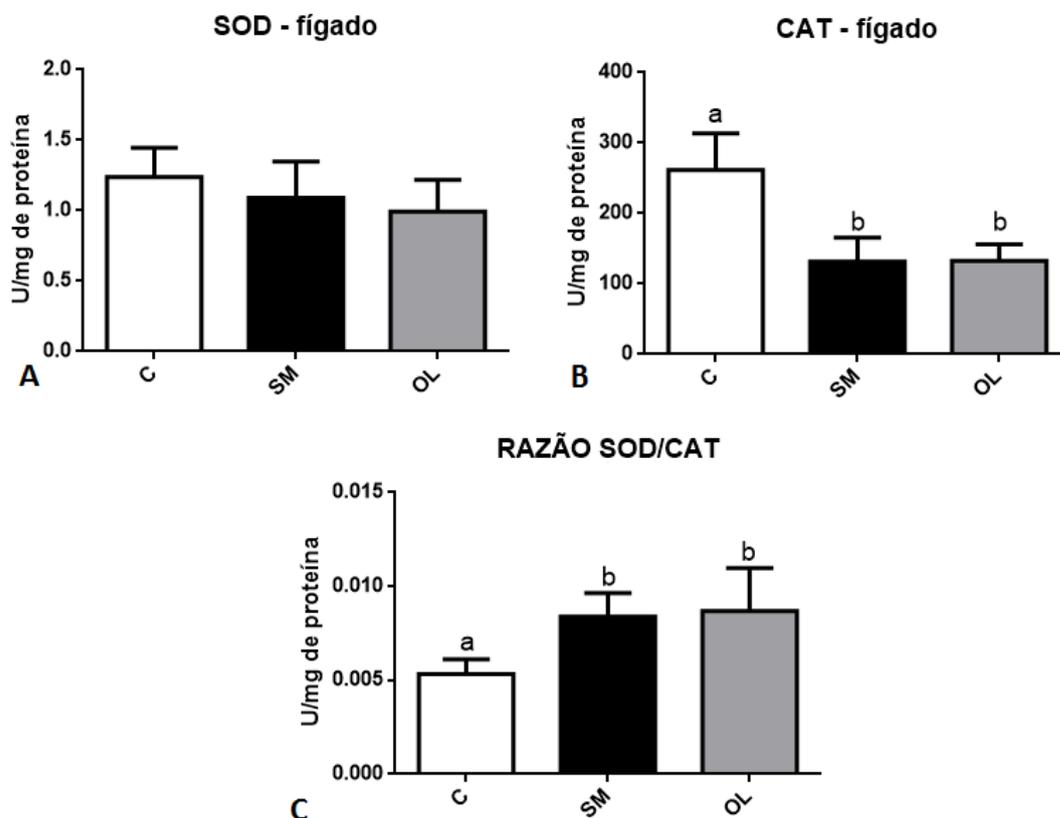


Figura 7: Efeito do tratamento com óleo de linhaça na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) (A), Catalase (CAT) (B) e na razão entre elas (C). C= grupo Controle, SM= grupo Síndrome Metabólica e OL= grupo Óleo de linhaça. Os dados foram

expressos em média \pm desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

Uma vez que Pilar et al (2017) ao avaliar o efeito do tratamento da síndrome metabólica com óleo de linhaça durante 30 dias observou uma melhora da defesa antioxidante no grupo tratado com óleo de linhaça, sugere-se mais uma vez que o tempo de tratamento e/ou a dose utilizada pode ser um fator importante para a obtenção de efeitos positivos no que diz respeito aos parâmetros bioquímicos e enzimas antioxidantes.

O tratamento com OL também não afetou os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Figura 8) , conforme mostrado no gráfico abaixo:

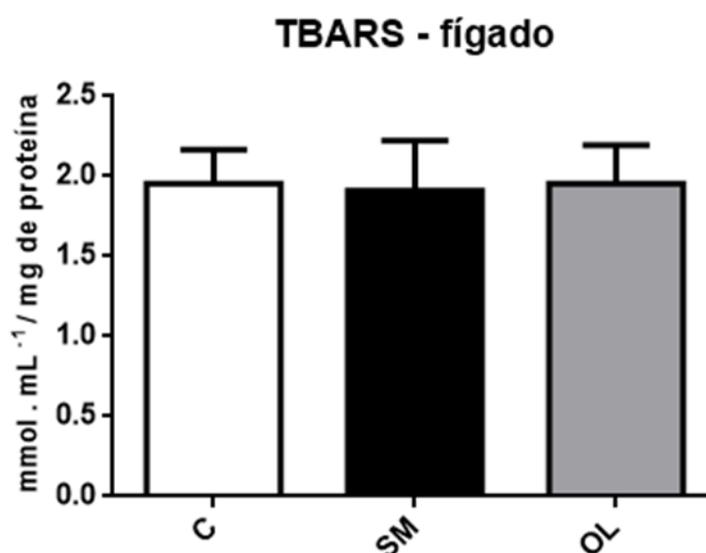


Figura 8: Efeito do tratamento com óleo de linhaça sobre o biomarcador de dano oxidativo TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). C= grupo Controle, SM= grupo Síndrome Metabólica e OL= grupo Óleo de linhaça. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

Apesar do nosso estudo não ter alterado os níveis de TBARS, Pilar et al (2017) ao avaliar o efeito do tratamento da síndrome metabólica com óleo de linhaça durante 30 dias observou que os níveis de TBARS foram significativamente maiores no grupo síndrome metabólica quando comparado ao grupo controle e o grupo síndrome metabólica tratado com óleo de linhaça apresentou valores significativamente menores do que o grupo síndrome metabólica, mostrando que a síndrome metabólica está associada a danos oxidativos em lipídios e que o tratamento com o óleo de linhaça pode ajudar a reduzir esses níveis.

Quando foi avaliado o peso da gordura no fígado (Figura 9) também não se observou diferença significativa entre o grupo síndrome metabólica e o grupo tratado com óleo de linhaça como mostrado na figura abaixo:

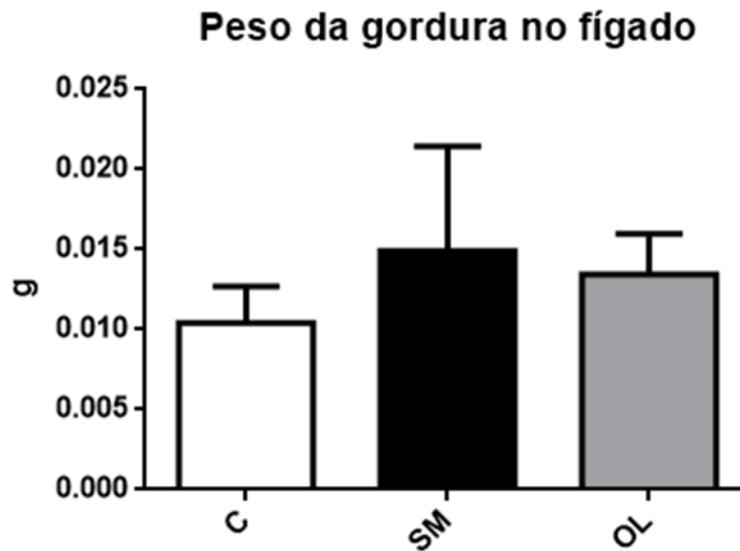


Figura 9: Efeito do tratamento com óleo de linhaça sobre o peso de gordura no fígado. C= grupo Controle, SM= grupo Síndrome Metabólica e OL= grupo Óleo de linhaça. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

Contudo, Gonçalves et al (2018) ao avaliar a suplementação dietética de ácido α -linolênico ($\hat{\Omega}$ 3) durante 8 semanas em camundongos observou que os animais tratados com ácido α -linolênico (ALA) obtido de extrato de linhaça exibiram menor quantidade de gordura total no fígado em comparação os animais sem suplementação de ALA.

O tratamento com óleo de linhaça influenciou a mortalidade dos animais com Síndrome metabólica visto que no grupo tratado, a taxa de sobrevivência foi de 87,5% e no grupo sem tratamento foi de 50% conforme mostrado na figura 10:

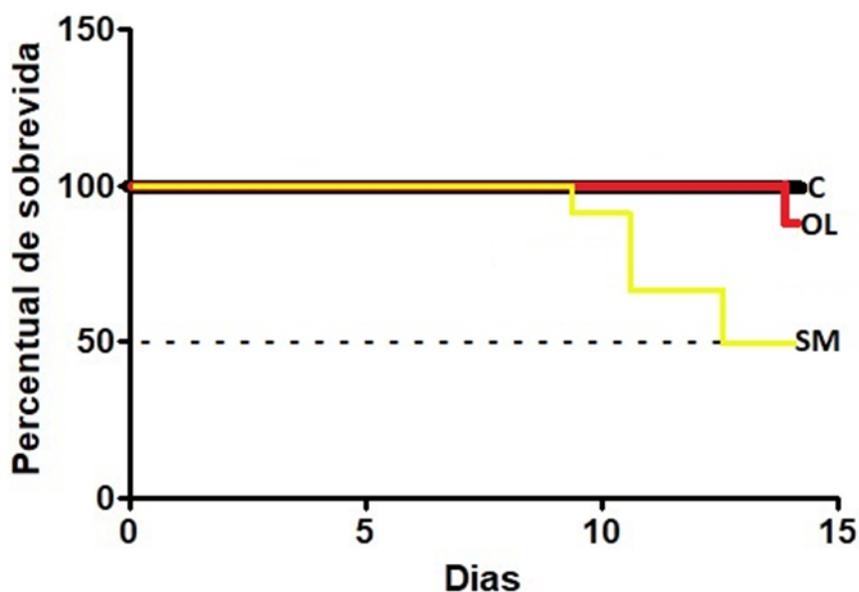


Figura 10: Taxa de sobrevivência dos grupos experimentais. C: controle; OL: óleo de linhaça e SM: Síndrome metabólica.

Este dado sugere então que apesar do tratamento não ter afetado os parâmetros bioquímicos e o status redox, por algum mecanismo até o momento não esclarecido o tratamento com óleo de linhaça exerceu efeito protetor na sobrevivência dos ratos. Este resultado foi um fator determinante no tempo do tratamento (apenas 15 dias), visto que com a morte de 50% do grupo SM, ficou inviável continuar o tratamento aceitando o risco de não obtermos grupo controle sem tratamento pareado ao final de 30 dias.

Na tentativa de buscarmos respostas para entendermos os motivos que levaram a maior sobrevivência dos ratos tratados com o óleo de linhaça, nosso próximo passo foi realizar a análise histológica do tecido adiposo. De acordo com a análise qualitativa da histologia do tecido adiposo (Figura 11), o grupo SM apresentou uma hipertrofia dos adipócitos em relação às células do grupo controle e o tratamento com óleo de linhaça acarretou em hipotrofia desses adipócitos. Em relação a análise quantitativa (Figura 12) não foi observado diferenças significativas em relação a área dos adipócitos, conforme mostrado nas figuras a seguir:

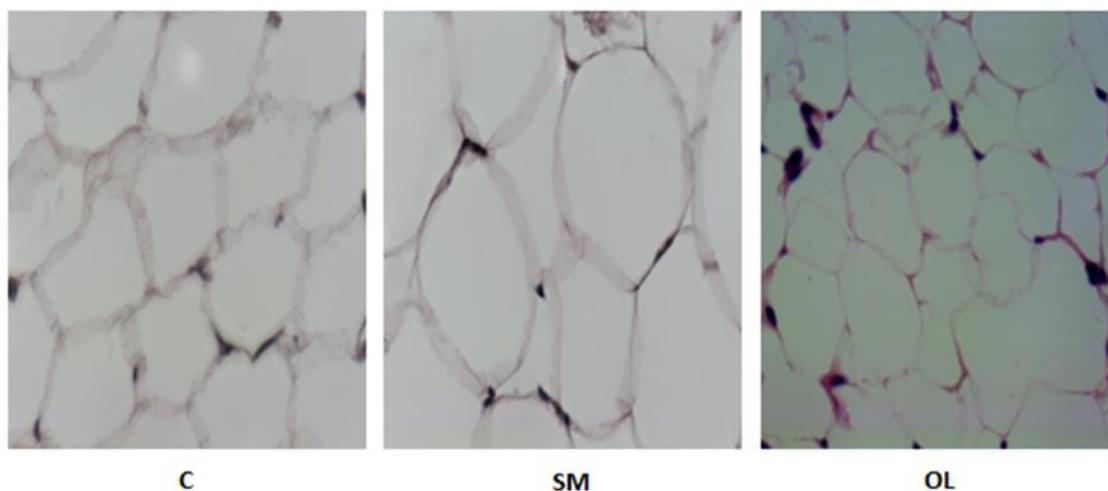


Figura 11; Análise histológica do Tecido Adiposo dos grupos experimentais. C: controle; SM: Síndrome metabólica e OL: Óleo de linhaça.

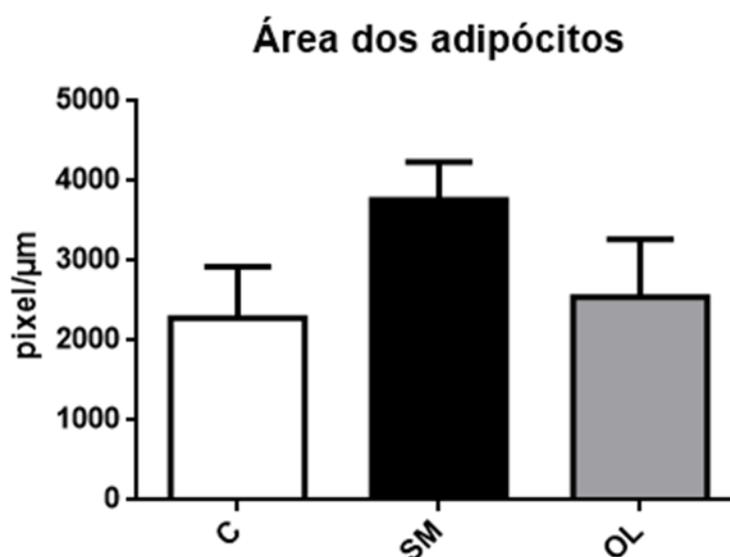


Figura 12: Análise da área dos adipócitos dos grupos experimentais. C: controle; SM: Síndrome metabólica e OL: Óleo de linhaça. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

Lottenberg et al (2012) mostraram que dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados são favoráveis à redução do tamanho de adipócitos pois estimulam a expressão de PPAR γ levando ao aumento da produção de adiponectina, redução das concentrações de resistina, e ainda inibe a transcrição do NF κ B, o que leva à melhora do perfil inflamatório. Já uma dieta rica em gordura trans, como a dieta utilizada neste estudo para indução da síndrome metabólica, estimula vias contrárias aos ácidos graxos poli-insaturados, fazendo com que a

expressão do PPAR γ e concentrações de adiponectina sejam reduzidas e a concentração de resistina aumente, assim como também estimula vias inflamatórias pela translocação do NF κ B, resultando em maior armazenamento de gordura e um tecido adiposo hipertrofiado, como demonstrado também no grupo SM do nosso estudo.

Buscando estudar o mecanismo protetor do tratamento com o óleo de linhaça, foi realizado também a dosagem das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (Figura 13.A) e Catalase (Figura 13.B) e a razão entre elas (Figura 5.C) no coração, conforme mostrado no figura abaixo:

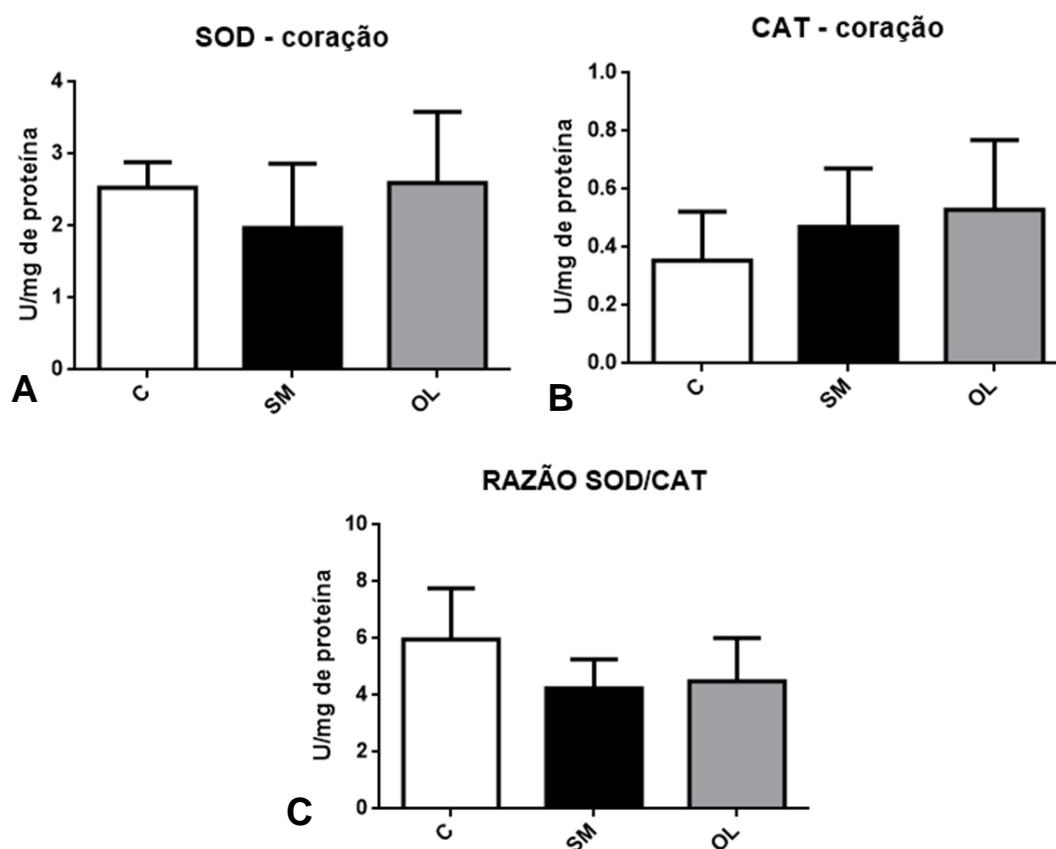


Figura 13: Efeito do tratamento com óleo de linhaça na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD)(A), Catalase (CAT)(B) e na razão entre elas(C) no coração. C= grupo Controle, SM= grupo Síndrome Metabólica e OL= grupo Óleo de linhaça. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

As espécies reativas de oxigênio são produzidas na maioria das nossas células, só que quando em excesso podem causar danos nas estruturas celulares, levando a cessação das vias de sinalização celular, inativação de enzimas metabólicas e disfunção tecidual, sendo assim, podendo favorecer o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A detecção direta

dessas espécies reativas de oxigênio é difícil, já que elas são inespecíficas e possuem alta reatividade, sendo assim, uma alternativa para avaliar o status redox é medida das enzimas antioxidantes (GRIENGLING et al., 2016). Estudos demonstram que ácidos graxos poli-insaturados da família ômega 3 podem aumentar a atividade das enzimas antioxidantes que protegem a célula contra o dano que as espécies reativas de oxigênio podem causar. Entretanto, em nosso estudo, o tratamento com o óleo de linhaça que é fonte de ácidos graxos ômega 3 não aumentou significativamente a atividade dessas enzimas no coração dos ratos tratados e não foram encontrados trabalhos com modelos semelhantes onde foram avaliadas as enzimas antioxidantes no coração para a comparação de resultados.

O tratamento com óleo de linhaça não afetou os níveis do biomarcador de dano oxidativo TBARS, como mostrado na figura 14:

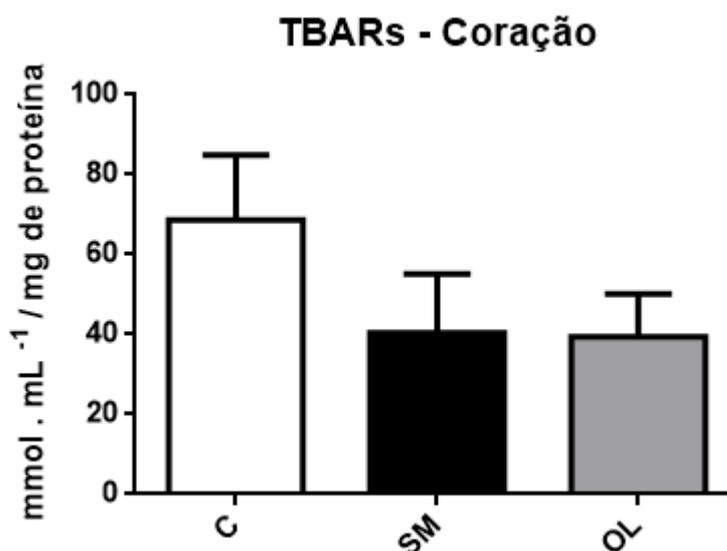


Figura 14: Efeito do tratamento com óleo de linhaça sobre o biomarcador de dano oxidativo TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) no coração. C= grupo Controle, SM= grupo Síndrome Metabólica e OL= grupo Óleo de linhaça. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

Mayyaset al (2017) ao avaliar o efeito da ingestão de uma dieta rica em gordura por 10 semanas observou que os níveis de TBARS no coração dos animais que foram alimentados com a dieta rica em gordura estavam menores quando comparados com os animais alimentados com dieta controle. Eles hipotetizaram que esse resultado poderia ser explicado pelo aumento na atividade da catalase cardíaca que foi observada nos animais que consumiram dieta rica em gordura, indicando que o organismo possui mecanismos compensatórios para proteção de danos oxidativos. Em nosso estudo apesar não termos obtido diferenças estatísticas, se observou uma tendência a redução tanto dos níveis de TBARS

quanto no aumento da atividade da catalase nos animais que consumiram dieta hiperlipídica comparado aos animais que receberam ração padrão. Estudos demonstram que ácidos graxos do tipo ômega 3 que está presente em altas concentrações no óleo de linhaça é capaz de reduzir os níveis de TBARS, no entanto em nosso trabalho o tratamento com o óleo de linhaça não foi capaz de reduzir esses níveis.

Quando avaliado o efeito do tratamento com o óleo de linhaça sobre as células inflamatórias no coração, também não se observou diferenças significativas como mostrado na figura abaixo:

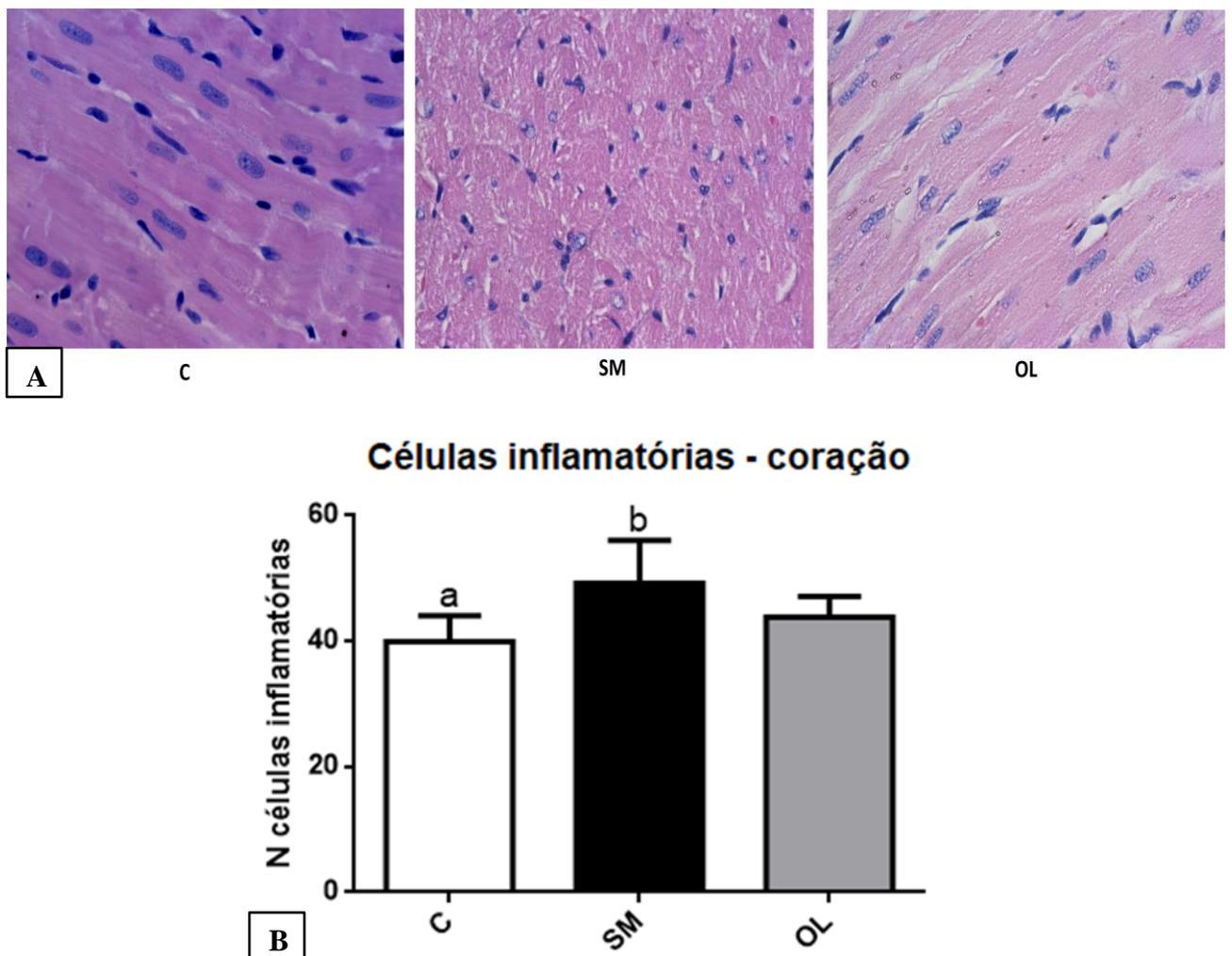


Figura 15: Efeito do tratamento com óleo de linhaça sobre as células inflamatórias no coração. A: Fotomicroscopia das células cardíacas; B: Morfometria de células inflamatória no tecido cardíaco. C= grupo Controle, SM= grupo Síndrome Metabólica e OL= grupo Óleo de linhaça. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

Estudos demonstram que dietas ricas em ácidos graxos trans como a dieta consumida pelos animais do grupo síndrome metabólica pode aumentar a inflamação sistêmica, sendo

fator de risco então para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MOZAFFARIAN et al., 2004). Sabe-se também que ácidos graxos ômega 3 como o ácido graxo alfa linolênico que foi usado para o tratamento do grupo OL possui mecanismos cardioprotetores através da sua ação anti-inflamatória através de mediadores lipídicos como as resolvinas, maresinas e protectinas, que diminuem a resposta inflamatória acarretando na homeostase tecidual prevenindo a transição da inflamação aguda para a crônica (BÄCK, 2017). No nosso estudo, a dieta hiperlipídica consumida pelos animais fez com que houvesse um aumento de células inflamatórias no coração dos animais como observado na figura 15 pela fotomicroscopia (Figura 15.A) e morfometria (Figura 15.B) no tecido cardíaco em relação ao grupo controle, entretanto, o tratamento com o óleo de linhaça não foi capaz de reduzir a quantidade dessas células no coração.

Avaliamos também o peso relativo do coração e obtivemos um aumento do peso no grupo síndrome em relação ao controle e os animais tratados com OL apresentaram menor peso deste órgão como mostrado na figura abaixo:

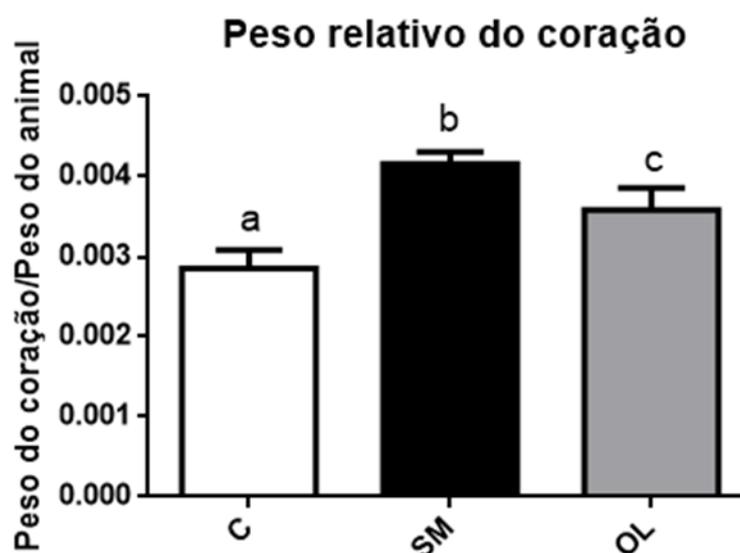


Figura 16: Peso relativo do coração (Peso do coração/Peso do animal). C: controle; SM: Síndrome metabólica e OL: Óleo de linhaça. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

Não foram encontrados outros estudos com modelos semelhantes onde foi avaliado o peso relativo do coração. Entretanto, mais análises serão feitas para compreender esse resultado.

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos estudos demonstram que quando são consumidos em excesso e associado ao sedentarismo, os ácidos graxos podem causar prejuízos ao nosso organismo como a obesidade e desenvolvimento de doenças crônicas e síndrome metabólica. Entretanto, nem toda gordura dietética é prejudicial, visto que ácidos graxos ômega 3 estão relacionados à melhora das concentrações séricas de triacilgliceróis, colesterol total e consequente redução dos riscos de doenças cardiovasculares. Esses ácidos graxos são obtidos essencialmente da dieta, sendo que o ácido alfa-linolênico encontra-se em elevadas concentrações no óleo de linhaça.

Sendo assim, neste trabalho foi avaliado o efeito da ingestão do óleo de linhaça na modulação do balanço redox e do perfil metabólico em ratos com síndrome metabólica.

A síndrome metabólica foi confirmada pelo aumento da glicemia, pressão arterial sistólica e por valores aumentados de glicose tanto no teste de resposta insulínica quanto no teste de tolerância oral à glicose.

O tratamento com o óleo de linhaça não alterou os níveis de glicemia, as concentrações séricas de colesterol total, colesterol HDL e da fração não HDL assim como não afetou a concentração de triacilgliceróis dos ratos com síndrome metabólica. Quando foi avaliado o peso da gordura no fígado também não se observou diferença significativa entre o grupo síndrome metabólica e o grupo tratado com óleo de linhaça. O tratamento também não alterou níveis sobre o biomarcador de dano oxidativo TBARS, e a atividade das enzimas antioxidantes avaliadas: Superóxido dismutase e Catalase, assim como não influenciou na relação SOD/CAT tanto no tecido hepático quanto no cardíaco. Entretanto, o tratamento com óleo de linhaça influenciou a mortalidade dos animais com Síndrome metabólica já que no grupo tratado, a taxa de sobrevivida foi de 87,5% e no grupo sem tratamento foi de 50%, sugerindo que o óleo de linhaça apresentou um fator protetor sobre a mortalidade. Apesar de não obtermos diferenças significativas observou-se uma tendência à hipotrofia do tecido adiposo dos animais tratados com o óleo de linhaça. Assim como obtivemos um aumento de células inflamatórias no grupo SM, mas não houve diferenças significativas com o tratamento com o OL. Sobre o coração observamos também um aumento do peso relativo desse órgão nos animais do grupo SM e uma redução nos animais do grupo OL.

7 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, até o momento, sugerem que o óleo de linhaça não exerce efeito na melhora do perfil metabólico e do status redox em fígado e coração de ratos submetidos à dieta hiperlipídica, apesar do aumento na sobrevida dos animais tratados com óleo de linhaça. Mais estudos serão necessários para tentar elucidar o efeito protetor do óleo de linhaça.

REFERÊNCIAS

ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA LONGA NA SAÚDE E NUTRIÇÃO. Aditivos & Ingredientes. São Paulo, n.68, p. 40-48, abr. 2010. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4088640/mod_resource/content/1/acidograxoscadeialonga.pdf>. Acesso em: novembro, 2017.

BÄCK, Magnus. Omega-3 fatty acids in atherosclerosis and coronary artery disease. Future Science Oa, [s.l.], v. 3, n. 4, p.1-7, nov. 2017. Future Science, LTD. <http://dx.doi.org/10.4155/fsoa-2017-0067>.

BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Revista de Nutrição, [s.l.], v. 23, n. 4, p.629-643, ago. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52732010000400013>.

BARROSO, Ana Karina Mauro et al . Linhaça marrom e dourada: propriedades químicas e funcionais das sementes e dos óleos prensados a frio. **Cienc. Rural**, Santa Maria , v. 44, n. 1, p. 181-187, Jan. 2014 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000100029&lng=en&nrm=iso>. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782014000100029>. Acesso em: 28/07/2018

CAMPOS, S. C. et al. Influência da Suplementação com Ácidos Graxos n-3 no Desenvolvimento do Estresse Oxidativo em Camundongos. UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde. São Paulo, v.13, n.4, p. 251-256, 14 de setembro de 2011. Disponível em: <<http://pgsskroton.com.br/seer/index.php/JHealthSci/article/view/1126/1084>>. Acesso em: Novembro, 2017.

Cintra, Dennys Esper. Obesidade e diabetes: fisiopatologia e sinalização celular. São Paulo; Editora SARVIER, 2011.

DESSÌ, Mariarita et al. Atherosclerosis, Dyslipidemia, and Inflammation: The Significant Role of Polyunsaturated Fatty Acids. **Isrn Inflammation**, [s.l.], v. 2013, p.1-13, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/191823>. Acesso em: 25/07/2018

DIEZ GARCIA, Rosa Wanda. Reflexos da globalização na cultura alimentar: considerações sobre as mudanças na alimentação urbana. Rev. Nutr., Campinas , v. 16, n. 4, p. 483-492, Dez. 2003 . Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732003000400011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 14 Nov. 2017.

FALUDI, André Arpad et al . Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. Arq. Bras. Cardiol., São Paulo , v. 109, n. 2, supl. 1, p. 1-76, Ago. 2017 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2017001100001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 14 Nov. 2017.

FARÍAS, Jorge et al. Antioxidant Therapeutic Strategies for Cardiovascular Conditions Associated with Oxidative Stress. *Nutrients*, [s.l.], v. 9, n. 9, p.966-989, 1 set. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu9090966>. Acesso em: 01/08/2018

FRANCO, Larissa Dantas Pereira. DIETA HIPERLIPÍDICA E EXERCÍCIO FÍSICO: CONSEQÜÊNCIAS SOBRE O METABOLISMO E A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA - Estudo Em Modelo Animal. 2007. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007. Disponível em: <http://www2.fcfar.unesp.br/Home/Pos-graduacao/AlimentoseNutricao/larissa_dantas-completo.pdf>. Acesso em: 06 out. 2017.

GONÇALVES, Nb et al. α -Linolenic acid prevents hepatic steatosis and improves glucose tolerance in mice fed a high-fat diet. *Clinics*, [s.l.], v. 73, p.1-9, 1 nov. 2018. Fundacao Faculdade de Medicina. <http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2018/e150>

GUO, Xiao-fei et al. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Metabolic Syndrome Risk: A Meta-Analysis. *Nutrients*, [s.l.], v. 9, n. 7, p.703-717, 6 jul. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu9070703> Acesso em : 29/07/2018

GRIENGLING, Kathy K. et al. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, [s.l.], v. 119, n. 5, p.1-76, 19 ago. 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/res.0000000000000110>.

HOEFEL, Ana Lúcia. Efeitos de dieta hiperlipídica com gordura saturada e monoinsaturada em parâmetros bioquímicos de ratos wistar. 2011.Dissertação (Mestrado em bioquímica)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/29006/000774773.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 06 out. 2017.

KAITHWAS, Gaurav; MAJUMDAR, Dipak K.. In vitro antioxidant and in vivo antidiabetic, antihyperlipidemic activity of linseed oil against streptozotocin-induced toxicity in albino rats. *European Journal Of Lipid Science And Technology*, [s.l.], v. 114, n. 11, p.1237-1245, 21 ago. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201100263>. Acesso em: 26/06/2018

LIMA, Laydiane Pereira de; SAMPAIO, Helena Alves de Carvalho. Caracterização socioeconômica, antropométrica e alimentar de obesos graves. *Ciênc. saúde coletiva*, Rio de Janeiro, v. 12, n. 4, p. 1011-1020, Ago. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232007000400022&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 22 Out. 2017.

LOTTENBERG, A.M et al. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *Journal of Nutrition Biochemistry* 23 (2012). DOI: 10.1016/j.jnutbio.2012.03.00

MARQUES, Anne y Castro. **Propriedades funcionais da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) em diferentes condições de preparo e de uso em alimentos.** 2008. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008. Acesso em: 24/07/2018

MARTINS, M. B. et al. Propriedades dos ácidos graxos poliinsaturados – Omega 3 obtidos de óleo de peixe e óleo de linhaça. *Rev Inst Ciênc Saúde*. v. 26, n. 2, p. 153-156, 2008. Disponível em: <https://www.unip.br/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2008/02_abr_jun/V26_N2_2008_p153-156.pdf>. Acesso em: Novembro, 2017.

MAYYAS, Fadia; ALZOUBI, Karem H.; AL-TALEB, Zahraa. Impact of high fat/high salt diet on myocardial oxidative stress. *Clinical And Experimental Hypertension*, [s.l.], v. 39, n. 2, p.126-132, 17 fev. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10641963.2016.1226894>.

MORATOYA, E. E.; CARVALHAES, G. C.; WANDER, A. E.; ALMEIDA, L. M. de M. C. Mudanças no padrão de consumo alimentar no Brasil e no mundo. *Revista de Política Agrícola*, Brasília, DF, v. 22, n. 1, p. 72-84, jan./fev./mar. 2013. Disponível em: <<https://seer.sede.embrapa.br/index.php/RPA/article/view/283>>. Acesso em: 22 Out. 2017.

MOZAFFARIAN, Dariush et al. Trans Fatty acids and systemic inflammation in heart failure. *The American Journal Of Clinical Nutrition*, [s.l.], v. 80, n. 6, p.1521-1525, 1 dez. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1521>.

OLIVEIRA, Thárcia K.B. de et al . Análise do extrato aquoso de *Arachis hipoagea* L. no combate à dislipidemia e ao ganho ponderal de ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica1. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro , v. 36, n. 11, p. 1121-1126, Nov. 2016 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2016001101121&lng=en&nrm=iso>. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2016001100011>. Acesso em: 30/09/2017

O'NEILL, S.; O'DRISCOLL, L.. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. **Obesity Reviews**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-12, 18 nov. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/obr.12229>. Acesso em: 29/07/2018

OS BENEFÍCIOS À SAÚDE DOS ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS. *Food ingredients Brasil*. São Paulo, v.18, n. 39, p. 48-56, 2016. Disponível em <<http://www.revista-fi.com/edicoes/39-2016/mobile/index.html> >. Acesso em: 24 de Outubro de 2017.

ORTIZ-AVILA, Omar et al. Avocado Oil Improves Mitochondrial Function and Decreases Oxidative Stress in Brain of Diabetic Rats. *Journal Of Diabetes Research*, [s.l.], v. 2015, p.1-9, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/485759>.

PILAR, Bruna et al. Protective Role of Flaxseed Oil and Flaxseed Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside Against Oxidative Stress in Rats with Metabolic Syndrome. *Journal Of Food Science*, [s.l.], v. 82, n. 12, p.3029-3036, 30 out. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.13964>. Acesso em: 26/06/2018

POUDYAL, Hemant et al. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. *Progress In Lipid Research*, [s.l.], v. 50, n. 4, p.372-387, out. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21762726>>. Acesso em 01 Nov. 2017.

POUDYAL, Hemant et al. Responses to oleic, linoleic and α -linolenic acids in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *The Journal Of Nutritional Biochemistry*, [s.l.], v. 24, n. 7, p.1381-1392, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.11.006>. Acesso em: 26/06/2018

RIBEIRO FILHO, Fernando F. et al . Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo , v. 50, n. 2, p. 230-

238, Apr. 2006 . Available from
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302006000200009&lng=en&nrm=iso>. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302006000200009>. Acesso em: 30/07/2018

RODRIGUES, Ticiana C.; CANANI, Luis Henrique; GROSS, Jorge L.. Síndrome metabólica, resistência à ação da insulina e doença cardiovascular no diabetes melito tipo 1. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo , v. 94, n. 1, p. 134-139, Jan. 2010 . Available from
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2010000100020&lng=en&nrm=iso>. <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2010000100020>. Acesso em: 29/07/2018

SANTOS, R.D. et al . I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo , v. 100, n. 1, supl. 3, p. 1-40, Jan. 2013 . Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2013000900001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 13 Nov. 2017.

SIMOPOULOS, Artemis. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. **Nutrients**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.128-145, 2 mar. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu8030128>. Acesso em: 30/07/2018

VIJAIMOHAN, K. et al. Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. *Life Sciences*, [s.l.], v. 79, n. 5, p.448-454, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2006.01.025>. Acesso em: 26/06/2018

ZUJKO, Małgorzata Elżbieta et al. Dietary Total Antioxidant Capacity and Dietary Polyphenol Intake and Prevalence of Metabolic Syndrome in Polish Adults: A Nationwide Study. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2018, p.1-10, 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/7487816>.

I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo , v. 84, supl. 1, p. 3-28, Abr. 2005 . Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2005000700001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 14 Nov. 2017.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

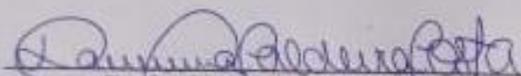
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

CERTIFICADO DE CORREÇÃO

Certifico que a discente **Maria Laura da Cruz Castro**, número de matrícula 14.2.2242, defendeu a Monografia intitulada "**Avaliação da ingestão do óleo de linhaça na modulação do balanço redox e do perfil metabólico em ratos submetidos à dieta hiperlipídica**", em 29 de Novembro de 2018 e **REALIZOU TODAS AS CORREÇÕES REQUERIDAS PELA COMISSÃO AVALIADORA.**

Ouro Preto, 13/12/2018



Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa
Orientadora
(DECBI-ICEB-UFOP)