



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Aline Andrade Troina


**Consumo materno de dois compostos bioativos da semente da  
linhaça sobre parâmetros bioquímicos e hormonais das mães e  
proles durante a lactação**

Rio de Janeiro

2011

Aline Andrade Troina

**Consumo materno de dois compostos bioativos da semente da linhaça sobre parâmetros bioquímicos e hormonais das mães e proles durante a lactação**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Magna Cottini da Fonseca Passos

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

T845 Troina, Aline Andrade.  
Consumo materno de dois componentes bioativos da semente da linhaça sobre parâmetros bioquímicos e hormonais das mães e proles durante a lactação / Aline Andrade Troina. - 2011.  
54 f.

Orientador : Egberto Gaspar de Moura.  
Coorientadora : Magna Cottini da Fonseca Passos.  
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Lactação - Teses. 2. Linho (Planta) - Teses. 3. Composição corporal - Teses. I. Moura, Egberto Gaspar de. II. Passos, Magna Cottini da Fonseca. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 613.221

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Aline Andrade Troina

**Consumo materno de dois compostos bioativos da semente da linhaça sobre parâmetros bioquímicos e hormonais das mães e proles durante a lactação**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de março de 2011.

Orientadores:

---

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura (Orientador)  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Magna Cottini da Fonseca Passos (Coorientadora)  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Elaine de Oliveira  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Andrea Claudia Freitas Ferreira  
Instituto de Biofísica - UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Isis Hara Trevenzoli  
Instituto de Biofísica - UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Karen de Jesus Oliveira  
Instituto Biomédico - UFF

Rio de Janeiro

2011

## DEDICATÓRIA

À Deus que me permitiu a realização deste trabalho.  
Aos meus pais Raul (*in memoriam*) e Sirley e à minha irmã Carina, pelo amor,  
paciência e estímulo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Egberto Gaspar de Moura pela dedicação, confiança e orientação, fundamental para conclusão deste trabalho. Um referencial como chefe, pesquisador e professor.

À Professora Magna Cottini Fonseca Passos pela confiança e incentivo constante e pela revisão do presente trabalho.

À Professora Patricia Cristina Lisboa pela confiança e incentivo constante durante a realização deste trabalho.

À Coordenação de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica, mestrandos e doutorandas do Laboratório de Fisiologia Endócrina da UERJ pela convivência amigável e apoio.

À secretária da Pós-Graduação Amélia pela atenção e pronta colaboração sempre demonstrada.

Aos funcionários do Laboratório de Fisiologia Endócrina Monica, Wilices e Carlos pelos trabalhos prestados em momentos importantes.

## RESUMO

TROINA, Aline Andrade. *Consumo materno de dois compostos bioativos da semente da linhaça sobre parâmetros bioquímicos e hormonais das mães e proles na lactação*. 2011. 54 f. Tese (Doutorado em Ciências - Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Avaliamos o efeito do consumo materno de SDG (Diglicosídeo Secoisolariciresinol) e de óleo de Linhaça+SDG sobre parâmetros bioquímicos e hormonais das ratas e das proles machos e fêmeas na lactação. As ratas lactantes foram separadas em: controle (C), ração controle cuja proteína foi caseína; (SDG): ração C com 400mg de SDG/Kg de ração; OLSDG: ração C com 400mg de SDG/Kg de ração e 7% de óleo de linhaça. No 14<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dias de lactação as ratas foram ordenhadas e no 21<sup>o</sup> dia foram sacrificadas por punção cardíaca. Leite e soro foram coletados para avaliação bioquímica e hormonal. Hormônios foram quantificados por radioimunoensaio. As proles machos e fêmeas foram sacrificadas aos 14 e 21 dias de idade. Os animais foram eviscerados para análise da composição corporal. Monitoramos a ingestão alimentar e a massa corporal (MC) durante o período experimental. As ratas SDG apresentaram maior gordura corporal (GC; +39%), enquanto as OLSDG menor conteúdo mineral (-20%) e trigliceridemia (TG) (-39%). As ratas SDG e OLSDG apresentaram hiperprolactinemia (+389% e 153%, respectivamente) sem alteração na concentração de estradiol. No 14<sup>o</sup> dia de lactação, o leite das ratas OLSDG apresentou menores teores de lactose(-17%) e de proteínas (-20%) e o das ratas SDG apenas menor teor de proteína (-21%). A partir do 13<sup>o</sup> dia de lactação tanto os machos quanto as fêmeas OLSDG apresentaram menor MC (-14%, -16%, respectivamente). No 14<sup>o</sup> dia de lactação os machos SDG e OLSDG apresentaram menor gordura corporal (-24%, -55%, respectivamente) e a prole SDG maior massa de gordura visceral (+39%). Os machos SDG apresentaram maiores concentrações de TG (+105%) e hipoprolactinemia (-41%). Os machos OLSDG também apresentaram hipoprolactinemia (-41%). As fêmeas SDG e OLSDG apresentaram maior estradiol aos 14 dias (+86% e +176%) que se normalizou aos 21 dias, maior colesterolemia (+16%) e as SDG apresentaram maior trigliceridemia (+74%). Aos 21 dias os machos e as fêmeas SDG e OLSDG apresentaram menor trigliceridemia (-48%, -54%, 42% e -59%, respectivamente). Os dois componentes principais da semente de linhaça produzem alterações bioquímicas e hormonais tanto nas mães, quanto nas proles, independente do sexo. Entretanto, as alterações observadas diferem entre mães e prole e de acordo com o gênero. Entre as alterações mais importantes ressaltamos a hiperprolactinemia materna que pode ser um dos motivos para a hipoprolactinemia da prole e a hipertrigliceridemia causada pela ingestão de SDG pelas mães.

Palavras-chave: Lactação. Diglicosídeo secoisolariciresinol. ALA. Composição corporal.

## ABSTRACT

We evaluated the mother's intake of SDG (Diglicoside secoisolariciresinol) and flaxseed oil + SDG upon biochemical and hormonal parameters of lactating female rats and the male and female offspring during lactation. The female lactating rats were divided into: Control (C): feeding a diet with casein; (SDG): feeding diet C added 400mg of SDG/Kg diet; (OLSDG): diet C added 400mg of SDG/Kg diet and 7% of flaxseed oil. Milk samples were obtained on the 14<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> days of lactation and the mothers were sacrificed and blood collected by cardiac puncture on the 21<sup>st</sup> day. Milk and serum were collected for biochemical and hormonal analysis. The male and female offsprings were sacrificed on the 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day. The hormonal dosages were measured by radioimmunassay. The animals were completely eviscerated to analyze body composition. Body mass (BM) and food intake were monitored during all experimental period. The SDG rats showed higher fat mass (+39%) while the OLSDG rats showed lower mineral content (-20%) and triglycerides (TG) serum levels (-39%). The SDG and OLSDG rats showed higher prolactin levels (+339% and +153% respectively) without changes in serum estradiol. On the 14<sup>th</sup> day of lactation we observed lower lactose (-17%) and protein (-20%) content in the OLSDG rat's milk while in the SDG only lower protein (-21%). From the 13<sup>th</sup> day of lactation both the males and females OLSDG showed lower BM (-14%, -16%, respectively). On the 14<sup>th</sup> day the male SDG and OLSDG showed lower fat mass (-24%, -55%, respectively), and the SDG offspring showed higher visceral fat mass (+39%). The SDG male also showed higher TG levels (+105%) and lower prolactin levels (-41%). The OLSDG males also showed lower prolactin serum levels (-41%). The OLSDG female showed higher serum estradiol at 14 days (+86% e +176%), which normalized at 21 days and higher cholesterolemia (+16%) and the SDG female presented higher TG levels (+74%). On day 21<sup>th</sup> day the male and female SDG and OLSDG showed lower TG levels (-48%, -54%, -42% and 59% respectively). Thus, the two main component of flaxseed showed biochemical and hormonal changes in the mothers and offspring, independent of gender. However, the changes observed in mothers differ from the offspring, and differ accordingly with the sex of offspring. The most impressive changes were the maternal hyperprolactinemia that can be one of the cause for the observed hypoprolactinemia in the offspring and the other main finding was the hypertriglyceridemia in the SDG group.

Keywords: Lactation. Diglicoside secoisolariciresinol. ALA. Body composition.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Composição das rações utilizadas no ensaio biológico.	27
Figura 1	Ingestão de ração e massa corporal das ratas lactantes dos grupos Controle, SDG e OLSDG.....	32
Figura 2	Evolução da massa corporal de machos e fêmeas dos grupos Controle, SDG e OLSDG.....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição corporal, massa de gordura visceral, massa relativa de ovário de ratas lactantes ao final da lactação.....	33
Tabela 2	Consumo de ácido graxo alfa-linolênico, concentrações séricas de colesterol total, triglicerídeos, glicose, insulina, Índice de Resistência à Insulina e prolactina.....	34
Tabela 3	Composição bioquímica do leite de ratas C, SDG e OLSDG no 14 <sup>o</sup> e 20 <sup>o</sup> dia de lactação.....	35
Tabela 4	Composição corporal, massa de gordura visceral, massa relativa de testículo no 14 <sup>o</sup> dia e ao final da lactação.....	38
Tabela 5	Composição corporal, massa de gordura visceral, massa relativa de ovário no 14 <sup>o</sup> dia e ao final da lactação.....	39
Tabela 6	Concentrações de colesterol, triglicerídeos, glicemia, insulina, Índice de Resistência à Insulina e prolactinemia dos machos no 14 <sup>o</sup> dia e ao final da lactação.....	40
Tabela 7	Concentrações de colesterol, triglicerídeos, glicemia, insulina, Índice de Resistência à Insulina e prolactinemia das fêmeas no 14 <sup>o</sup> dia e ao final da lactação.....	41
Tabela 8	Resumo dos resultados.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA Ácido Alfa-linolênico

AL Ácido linolênico

ArKO Camundongo knockout para aromatase

BSA Albumina bovina sérica

CTC Carbonato de cálcio, tartarato de sódio/potássio e sulfato de cobre

DPA Ácido Docosapentaenóico

DHA Ácido docosahexaenóico

DOC ácido deoxicólico

EPA Ácido Eicosapentaenoico

E2 17beta-estradiol

GH Hôrmônio do crescimento

KOH Hidróxido de potássio

LPL Lipoproteína lipase

LDL-Colesterol Colesterol de baixa densidade

NaOH Hidróxido de sódio

PPARs Receptores ativados por proliferador de peroximos

RE Receptor estrogênico

$\alpha$ ERKO Camundongo knockout para o receptor estrogênico alfa

SDG Diglicosídeo secoisolariciresinol

SDS Lauril sulfato de sódio

SECO Secoisolariciresinol

TCA Ácido tricloroacético

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	23
1.2	<b>Objetivo específico</b> .....	23
1.2.1	<b>Nas ratas lactantes</b> .....	23
1.2.2	<b>Nos machos e fêmeas das proles</b> .....	23
2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
2.1	<b>Desenho experimental</b> .....	24
2.2	<b>Rações experimentais</b> .....	25
2.3	<b>Avaliação do estado nutricional</b> .....	26
2.3.1	<b>Ingestão de ração</b> .....	26
2.3.2	<b>Massa corporal (MC)</b> .....	27
2.3.3	<b>Composição corporal</b> .....	27
2.3.4	<b>Estimativa do consumo de ácido graxo alfa-linolênico</b> .....	28
2.4	<b>Extração do leite</b> .....	28
2.5	<b>Composição bioquímica do leite</b> .....	28
2.6	<b>Determinações hormonais</b> .....	29
2.7	<b>Avaliação da resistência insulínica</b> .....	30
2.8	<b>Determinações bioquímicas</b> .....	30
2.9	<b>Análise estatística</b> .....	30
3	<b>RESULTADOS</b> .....	31
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	41
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	47
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48

## INTRODUÇÃO

### **Doenças crônicas e consumo de alimentos vegetais**

A prevalência global de todas as doenças crônicas está aumentando, embora os países desenvolvidos ainda apresentem as maiores taxas (Rana et al., 2007). O número de pessoas com diabetes mellitus tipo 2 foi estimado em 171 milhões, e estima-se que em 2030 já serão 366 milhões de pessoas (6,5% da população mundial) (Wild et al., 2004). A prevalência de obesidade está aumentando virtualmente em todas as populações (Caterson & Gill, 2002; Formiguera & Canton; 2004). Esta é uma tendência global que afeta não só as sociedades desenvolvidas, mas também as economias em transição como China, países da América Latina e México (Caterson & Gill, 2002). Nos países em desenvolvimento, freqüentemente, a obesidade e a desnutrição coexistem, com importantes conseqüências sociais, que afetam praticamente todas as idades e grupos socioeconômicos. A obesidade predispõe a um número de co-morbidades e aumento das taxas de mortalidade (Frenk et al., 1989). As causas desta pandemia de doenças crônicas são complexas e incluem fatores políticos, demográficos e hábitos relacionados ao estilo de vida (Rana et al., 2007).

O consumo regular de alimentos vegetais está associado à menor risco de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas (Heber, 2004). Devido ao seu alto teor de lignanas, ácido graxo alfa-linolênico e fibras, o consumo da linhaça apresenta efeitos benéficos sobre o desenvolvimento destas doenças (Morris, 2007).

A linhaça (*Linum usitatissimum*) é uma semente oleaginosa com uma história de uso na Europa e Ásia. Nos Estados Unidos, desde 1990, a semente da linhaça vem sendo incorporada em cereais, pães e outros produtos de panificação (Carter, 1993). A produção mundial se encontra entre 2.300.000 e 2.500.000 toneladas anuais, sendo o Canadá o principal produtor. Na América do Sul, o maior produtor é a Argentina, com cerca de 80 toneladas/ano. O Brasil apresenta uma produção de cerca de 21 toneladas/ano (Aceites & Grasas, 2000).

Análises da linhaça marrom canadense exibiram valores de 20% de proteína, 41% de gordura, 28% de fibra total, 7,7% de umidade, 3,4% de cinzas e minerais (Morris, 2007). As linhaças marrom e dourada são praticamente idênticas quanto à composição nutricional. As diferenças entre ambas são muito pequenas e resultam das diferentes condições de plantio (Morris, 2007).

O ácido alfa-linolênico (ALA), pertencente à família ômega-3, constitui 57% do total de ácidos graxos na semente da linhaça, tornando esta semente a fonte vegetal mais rica deste ácido graxo. Já o ácido graxo linolênico (AL), da família ômega-6, constitui 16% do total de ácidos graxos. O óleo da linhaça apresenta baixos teores de ácidos graxos saturados e o teor de ácidos graxos monoinsaturados é modesto (Morris, 2007).

O perfil de aminoácidos da proteína da linhaça é similar ao da proteína da soja com níveis relativamente altos de ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina e arginina (Oomah & Mazza, 1993).

A semente da linhaça é pobre em carboidratos (açúcares e amidos), fornecendo somente 1 grama (g) em 100 g. Em relação às fibras alimentares, as principais frações na linhaça são: a celulose que é a principal matéria estrutural das paredes celulares dos vegetais e as mucilagens (gommas), tipo de polissacarídeo que se torna viscoso ao mistura-se à água e outros fluidos. A linhaça contém pelo menos três tipos de fitoquímicos: ácidos fenólicos, flavonóides e lignanas (Morris, 2007).

As lignanas apresentam efeitos anti-câncer e antiviral (Martin et al., 2007), reduzem o risco de câncer de mama (Touillaud et al., 2007) e de próstata (Hedelin et al., 2006) e protegem contra osteoporose (Benassayag et al., 2002).

### **Fitoestrogênios e efeitos na lactação**

Tou et al. (1998) mostraram que o consumo materno de linhaça e do SDG na gestação e lactação reduziu a massa corporal ao nascimento e produziu efeitos hormonais nas proles de ratas. Ao final da lactação foi observado aumento do peso de útero e ovários de ratas que receberam ração com 10% de linhaça. As fêmeas das proles de ratas que consumiram dieta com 10% de linhaça apresentaram menor distância ano-genital, maior peso de útero e ovário, menor idade e massa corporal ao início da puberdade, com alongamento do ciclo estral e estro persistente. Na idade adulta (132 dias), estas fêmeas apresentaram maior peso ovariano, sugerindo efeitos estrogênicos. Os machos das proles, cujas mães receberam suplementação com linhaça, apresentaram menor ganho de peso pós-natal e na idade adulta (132 dias) maior massa das glândulas sexuais acessórias e maior massa relativa da próstata. Neste estudo foi demonstrada a transferência de lignanas (<sup>3</sup>H-SDG) pelo leite materno.

Em outro experimento, Tou et al. (1999) avaliaram se o consumo de linhaça (5% e 10%) em diferentes estágios de desenvolvimento afetaria os índices reprodutivos e concentrações hormonais das proles. As ratas receberam as dietas (controle, 5% ou 10%) da gestação até a idade adulta (132 dias) ou somente a partir do desmame. O consumo de linhaça (5 ou 10%) a partir do desmame não produziu efeitos sobre os índices reprodutivos, mas o consumo desde a gestação até a idade adulta resultou em modificações que diferiram dependendo da concentração utilizada. Nas fêmeas, o consumo de 5% de linhaça resultou em atraso no início da puberdade. Já o consumo de 10% de linhaça levou a início precoce da puberdade, maior peso ovariano, maiores concentrações séricas de  $17\beta$ -estradiol e alongamento do ciclo estral. Nos machos não foram observadas alterações nas concentrações de testosterona no desmame e na puberdade. Já o consumo de 10% de linhaça resultou em aumento significativo da testosterona na idade adulta. Também não foram observadas alterações do peso relativo dos órgãos sexuais ao desmame e aos 50 dias de idade nos machos na puberdade. No entanto, na idade adulta (132 dias), os ratos que receberam 10% de linhaça apresentaram maior massa relativa de glândulas sexuais acessórias, vesícula seminal, próstata e testículo. Ao contrário, o consumo de 5% de linhaça resultou em menor massa da próstata. Os dados sugerem um efeito bifásico dose-dependente e que existe uma “janela crítica” durante a gestação e lactação quando os animais estão mais susceptíveis a alterações reprodutivas.

Baseados nestes estudos onde o consumo materno de 10% da linhaça na gestação e lactação resultou em efeitos estrogênicos sobre os índices reprodutivos das proles fêmeas e machos e que ocorre a transferência de lignanas através do leite materno para a prole, Ward et al. (2001) avaliaram o consumo materno da linhaça (10%) ou da lignana (SDG) somente na lactação ou na lactação e continuamente até a idade adulta. Não foram observados efeitos sobre os índices reprodutivos em nenhum dos grupos que receberam a linhaça ou SDG, sugerindo que o período fetal é o período de desenvolvimento mais sensível a alterações hormonais. Devido ao fato de não terem sido observados efeitos sobre os índices reprodutivos com a concentração utilizada, este parece ser o nível de efeito não observável (NOEL – *non-observable effect level*).

Recentemente, Ruhlen et al. (2008) demonstraram que o consumo de fitoestrogênio da soja na gestação e lactação elevou o estradiol endógeno, que foi

associado com efeitos adversos sobre o estado nutricional e sistema reprodutor da prole. Tanto os machos quanto as fêmeas, ao nascimento, apresentaram menor massa corporal. Aos 26 dias apresentaram maior leptinemia e massa corporal, acompanhado de início precoce da puberdade e maior resposta uterina ao estrogênio. Na idade adulta, tornaram-se obesas e hiperleptinêmicas, não apresentando prejuízos na homeostase glicêmica, enquanto os machos apresentaram homeostase glicêmica prejudicada.

Em nosso laboratório, Figueiredo et al (2009) avaliaram os efeitos endócrinos e metabólicos do consumo materno de linhaça 25% durante a lactação sobre os machos das proles na idade adulta. Foi observado que eles apresentaram maior massa corporal desde o desmame até a idade adulta. Ao desmame (21 dias) apresentaram menor massa de gordura total e subcutânea, maior leptinemia, menor colesterol total, menor triglicérido e menores concentrações de insulina sérica. Aos 180 dias, estes animais apresentaram menor glicemia, maior insulinemia e menor adiponectinemia, sem alteração da composição corporal.

Avaliamaos também (Troina et al., 2010) os efeitos do consumo materno de linhaça (25%) sobre a composição do leite, composição corporal e função sexual das fêmeas das proles na idade adulta. Ao desmame, as ratas lactantes apresentaram maiores concentrações de estradiol e leptina sérica. O leite da ratas que consumiram linhaça apresentou menor conteúdo de colesterol e aumento das concentrações de estrogênio e leptina. As fêmeas das proles apresentaram, ainda, menor massa corporal, gordura visceral, colesterol total e triglicédeos, e maiores concentrações de leptina e estradiol ao desmame. Estas fêmeas apresentaram atraso no início da puberdade e, aos 150 dias, apresentaram maior conteúdo de gordura corporal, gordura visceral, menor massa relativa de útero, e maior colesterol total, triglicédeos, estrogênio séricos e menor concentração sérica de progesterona.

Estes trabalhos de nosso grupo mostravam um efeito importante da suplementação de linhaça na dieta materna durante a lactação sobre a fisiologia das suas proles. Entretanto, sua principal limitação é saber que componentes da linhaça exercem os principais efeitos encontrados.



## **Componentes da linhaça e efeitos sobre lipídeos séricos**

Na última década, a linhaça e os seus compostos bioativos isolados vêm despertando interesse entre os consumidores e os profissionais de saúde devido aos seus potenciais benefícios à saúde (Bhathena et al. 2003). De fato, vários estudos de intervenção nutricional em seres humanos e animais já foram conduzidos, mostrando efeitos positivos do consumo destes compostos bioativos sobre fatores de risco para doenças crônicas, dentre eles os lipídios séricos.

Harper et al. (2006) comparam os efeitos do consumo de 3g de ALA, o principal componente do óleo de linhaça, com o óleo de oliva sobre as concentrações plasmáticas de ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3, em um estudo duplo-cego com 56 participantes, por 26 semanas. A maioria dos participantes deste estudo apresentava doenças crônicas, por exemplo, 55% dos participantes eram hipertensos, 12% tinham diabetes tipo 2 e apresentavam sobrepeso ou obesidade. O consumo de 3g ALA aumentou o conteúdo de ácido eicosapentaenóico - EPA (60%) e de ácido docosapentaenóico - DPA (25%), após 12 semanas de suplementação, enquanto o conteúdo de ácido docosaexaenóico (DHA) não sofreu modificações. Assim, este estudo demonstrou a conversão do ALA em EPA e DPA numa população de indivíduos portadores de doenças crônicas, sugerindo que o ALA presente no óleo da linhaça possa ser uma alternativa ao óleo de peixe, na redução dos fatores de risco cardiovascular.

Felmlee et al (2009) realizam um estudo comparando os efeitos da lignana purificada diglicosídeo secoisolariciresinol (SDG) e de seu metabólito aglicona (SECO) em ratos hiperlipidêmicos. Para a indução da hipercolesterolemia, fêmeas Wistar receberam dieta padrão ou contendo 1% de colesterol, e administração oral de 0, 3 ou 6 mg SDG/Kg ou 0, 1.6 e 3.2mg SECO/Kg peso corporal uma vez ao dia durante 4 semanas. A hipertrigliceridemia foi induzida em ratos Sprague-Dawley, através da suplementação com 10% de frutose na água. Estes ratos receberam oralmente 0, 3 ou 6 mg SDG /Kg peso corporal uma vez ao dia durante 2 semanas. Amostras de sangue em jejum foram coletadas antes do tratamento e após, para determinação das análises dos lipídeos séricos. Os ratos foram sacrificados e os fígados rapidamente removidos e seccionadas para análises dos lipídeos, mRNA e análises histológicas. A administração crônica do SDG e do SECO causou uma redução dose-dependente sobre o ganho de peso corporal e nas concentrações de

colesterol total e LDL-colesterol e acumulação de lipídeos hepáticos. O SDG e SECO não produziram alterações na expressão gênica de reguladores comumente relatados como alvos da homeostase lipídica. O SDG não apresentou efeito sobre as concentrações séricas de triglicerídeos, fosfolipídeos e razão de ganho de peso corporal com a suplementação de 10% de frutose.

Fukumitsu et al (2010) investigaram os efeitos da ingestão de SDG sobre a hipercolesterolemia e fatores de risco para doença hepática em homens com hipercolesterolemia moderada. Foi realizado um estudo duplo-cego, randomizado e controlado utilizando placebo, onde foi investigada a hipótese de que a administração de 20 ou 100 mg de SDG poderia reduzir o colesterol sanguíneo e os fatores de risco relacionados a doença hepática induzidos pela hipercolesterolemia. Trinta indivíduos com concentrações de colesterol entre 180-240mg/dL foram randomicamente divididos em três grupos, 2 grupos recebendo o SDG em cápsulas (20 e 100 mg/dia) e outro recebendo placebo durante 12 semanas. Comparados ao placebo, os que receberam 100 mg de SDG exibiram uma redução significativa da razão lipoproteína de baixa densidade/ lipoproteína de alta densidade. Além disso, os indivíduos tratados com SDG também apresentaram um percentual significativo de redução nas concentrações da transaminase glutâmica-pirúvica e gama glutamil transpeptidase em relação ao período inicial do tratamento. Estes autores sugerem que a administração diária de 100mg de SDG pode efetivamente reduzir as concentrações de colesterol sanguíneo e risco de doença hepática em homens com hipercolesterolemia moderada.

Prasad (2010) fez uma revisão sobre os potenciais benefícios de diversos produtos naturais sobre o desenvolvimento da aterosclerose, dentre eles, o SDG, que se mostrou efetivo na progressão da aterosclerose e parcialmente efetivo na aterosclerose hipercolesterolêmica, e estes efeitos foram associados à redução no estresse oxidativo.

Begg e colaboradores (2010) conduziram um estudo em que avaliaram diferentes fontes de ácidos graxos poliinsaturados (óleo de canola ou óleo de linhaça) na prevenção da hipertensão e outros sintomas metabólicos induzidos por uma dieta deficiente em ômega-3. As ratas foram divididas em três grupos antes do acasalamento. As dietas eram deficientes (10% de óleo de canola) ou suficientes (7% de óleo de canola + 3% de óleo de linhaça) em ácidos graxos ômega – 3. Os filhotes machos continuaram com as dietas maternas do desmame até a duração do

experimento. Os animais deficientes se tornaram hipertensos na 24ª semana, comparados com os animais que receberam dietas suficientes em ômega-3. Estes resultados sugerem que diferentes fontes de ácidos graxos foram efetivas na prevenção da hipertensão relacionada à deficiência de ômega-3. No entanto, não houve diferenças entre os fenótipos dos animais, em particular os animais que receberam óleo de canola, incluindo massa corporal, adiposidade, leptinemia e ingestão alimentar. Os animais que receberam dieta com óleo de linhaça também apresentaram redução da adiposidade e leptinemia, mas menos do que os animais com dietas deficientes em ômega-3. As diferenças observadas entre os fenótipos dos animais dos diferentes grupos indicam que a gordura corporal e a leptina podem estar envolvidas na hipertensão relacionada à deficiência de ácidos graxos ômega-3.

### **Componentes da linhaça e efeitos sobre homeostase glicêmica**

Dentre os compostos presentes na linhaça que parecem apresentar efeitos benéficos sobre a homeostase glicêmica destacam-se as lignanas (SDG) e o ALA (Morris, 2007). Desta forma, alguns estudos avaliaram os efeitos tanto da linhaça como destes compostos isolados sobre a glicemia e/ou insulinemia em diferentes modelos (humanos ou animais; indivíduos saudáveis ou diabéticos).

Prasad (2001) avaliou a eficiência do SDG isolado da linhaça (40mg/Kg p.c.) sobre o desenvolvimento de diabetes em ratas Zucker (ZDF), modelo de diabetes tipo 2. A incidência de diabetes foi de 100% no grupo não tratado e de 20% no grupo tratado com SDG por volta dos 72 dias de idade. O desenvolvimento de diabetes foi associado a um aumento de estresse oxidativo, com aumento do malondialdeído. Estas ratas tratadas com SDG não apresentaram aumento de estresse oxidativo, colesterol total e hemoglobina glicosilada. Das ratas tratadas com SDG, 10% não desenvolveram diabetes durante todo o período de estudo (101 dias), e o restante desenvolveu diabetes tardiamente (72 -99 dias), sugerindo que o SDG retardou o desenvolvimento do diabetes.

Recentemente, Barre et al. (2008) avaliaram os efeitos da suplementação com óleo de linhaça (60mg ALA/Kg p.c./dia) por 3 meses sobre a glicemia, insulinemia e hemoglobina glicosilada de pacientes jovens com diabetes mellitus tipo 2. Não foram observadas modificações séricas de glicose, insulina e hemoglobina glicada, indicando que o ALA presente na linhaça não interferiu no controle glicêmico em pacientes diabéticos.

Zhang et al. (2008) demonstraram os efeitos do consumo do extrato de lignanas da linhaça sobre a glicemia de indivíduos hipercolesterolêmicos. O grupo placebo recebeu 4

tabletes não contendo SDG, enquanto os grupos tratados receberam 4 tabletes contendo 300mg ou 600mg de SDG diariamente, e foram aconselhados a consumir 02 tabletes no café da manhã e os outros 02 no jantar, por 8 semanas. Foram observadas reduções significativas ( $\approx 25\%$ ) das concentrações séricas de glicose nas 6ª e 8ª semanas de tratamento para o grupo que recebeu 600mg de SDG. O grupo que recebeu 300mg de SDG não mostrou alteração na glicemia, sugerindo que o extrato de lignanas produziu efeitos hipoglicemiantes de forma dose-dependente.

Taylor et al (2010) conduziram um estudo clínico randomizado controlado com 34 participantes. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do óleo de linhaça sobre o controle glicêmico, o estado de ácidos graxos ômega-3 e adipocitocinas em diabéticos tipo 2. Os participantes consumiram produtos de panificação selecionados que não continham nenhuma linhaça (grupo controle) e com óleo de linhaça (13 g/dia) diariamente durante 12 semanas. O grupo óleo de linhaça apresentou aumento das concentrações dos ácidos graxos ômega-3 (ALA, eicosapentaenóico (EPA), decosapentaenóico (DPA), mas não do ácido docosahexaenóico. Todos os grupos apresentaram ingestão calórica similar, no entanto, o grupo controle apresentou um ganho de peso de 4% comparado ao período basal do estudo ( $p < 0.05$ ), enquanto o grupo com óleo de linhaça apresentou peso constante durante o período do estudo. Todos os outros parâmetros não foram alterados pela dieta. Assim, concluíram que o óleo de linhaça não afetou o controle glicêmico de adultos com diabetes tipo 2 em um estudo controlado.

### **Estrogênio e Adiposidade**

Uma gama de hormônios e fatores de crescimento modula o desenvolvimento e atividade dos adipócitos, entre eles o hormônio do crescimento (GH), hormônios tireóideos, glicocorticóides, catecolaminas, glucagon, insulina e fator de crescimento semelhante à insulina, além de fatores de transcrição, tais como os PPARs. Há muito tempo foi reconhecida a importância do estrogênio no desenvolvimento e deposição de gordura em mulheres e homens. E, recentemente, foi demonstrada sua importância na determinação do número de adipócitos, indicando que ele regula eventos-chaves da adipogênese, inclusive os PPARs (Cooke & Naaz, 2004).

A distribuição do tecido adiposo em humanos é dimórfica, com diferenças relacionadas ao gênero (Butte et al., 2000; Taylor et al., 2002). As mulheres apresentam maior conteúdo de gordura subcutânea, assim como maior conteúdo de gordura corporal total, em comparação aos homens (Bjorntorp, 1996). Esta maior deposição de gordura subcutânea nas mulheres se desenvolve na puberdade, indicando que o estrogênio parece promover, preferencialmente, a deposição deste tipo de tecido adiposo. Esse aumento de tecido

adiposo nas mulheres resulta do aumento do número e tamanho dos adipócitos (Chumlea, 1981). No entanto, diferenças relacionadas ao gênero de outros hormônios que também modulam a deposição de tecido adiposo indicam que o dimorfismo sexual no número de adipócitos e distribuição de gordura não refletem somente os efeitos do estrogênio em homens versus mulheres (Cooke & Naaz, 2004).

Em ratos, não é observada diferença sexual entre a distribuição de gordura visceral e subcutânea relacionada ao estrogênio, embora os roedores apresentem diferenças sexuais em termos de resposta do tecido adiposo a restrição calórica e exercício (Cortright et al., 1997; Porter et al., 2004).

Outro fator importante no entendimento do papel do estrogênio sobre o tecido adiposo é que a expressão do receptor de estrogênio (RE) é variável nos diferentes depósitos de gordura e em diferentes estados fisiológicos (Pedersen et al., 1991). O adipócito de seres humanos e roedores expressa tanto o RE $\alpha$  como o RE $\beta$ , em ambos os sexos (Pedersen et al., 2001; Naaz et al., 2002). Além de serem expressos nos pré-adipócitos, tanto o RE $\alpha$  como o RE $\beta$  são expressos em outros tipos celulares do tecido adiposo, como células endoteliais e macrófagos (Gulshan et al., 1990; Venkov et al., 1996).

Os estrogênios também são capazes de produzir efeitos no tecido adiposo através da ação indireta sobre outros tecidos que regulam o apetite, gasto energético e metabolismo. Os RE são amplamente distribuídos no hipotálamo, local primário de regulação do balanço energético (Cooke & Naaz, 2004).

Sabe-se que o estrogênio é um importante regulador da deposição da gordura do sexo feminino em humanos, roedores e outras espécies (Wade et al., 1985). Tanto a ooforectomia em animais experimentais como a menopausa em mulheres resulta em aumento de tecido adiposo (Wade et al., 1985). Um modelo de camundongo knockout para o RE $\alpha$  ( $\alpha$ ERKO) apresentou maior massa de tecido adiposo (Heine et al., 2000). Assim, as mudanças na adiposidade observadas nas mulheres, nos roedores e em outras espécies causadas pela falta do estrogênio podem ser revertidas com a reposição do mesmo (Mohamed et al., 2000).

O estrogênio inibe diretamente a deposição de gordura através da redução da lipogênese. Esta ação ocorre principalmente através da redução da atividade da lipoproteína lipase (LPL), uma enzima que regula a captação de lipídios pelos adipócitos. A ooforectomia aumenta a atividade da LPL e deposição de lipídios nos adipócitos e a administração E2 reverte esta deposição (Hamosh & Hamosh, 1975).

O estrogênio pode afetar indiretamente a lipólise através da indução da enzima lipase hormônio sensível (Palin et al., 2003) ou através do aumento dos efeitos lipolíticos da adrenalina (Ackerman et al., 1981). A  $\beta$ -oxidação também parece estar aumentada, o que

pode contribuir para a menor deposição de gordura induzida pelo estrogênio (Misso et al., 2003). Contrariamente, a todos os seus efeitos antilipogênicos e lipolíticos, o estrogênio atenua os efeitos dos receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos nas células do tecido adiposo subcutâneo de humanos e diminui a lipólise, este efeito pode parcialmente contribuir para a maior deposição de tecido subcutâneo em mulheres em comparação aos homens (Pedersen et al., 2004).

O estrogênio exerce efeito negativo sobre o comportamento alimentar através de ações no hipotálamo (Wade et al., 1985). Quando ratas ooforectomizadas receberam ração pareada com ratas controle (pair-feed), estas apresentaram maior ganho de peso, mesmo na ausência de hiperfagia (Wade et al., 1979), indicando que, embora o estrogênio apresente algum efeito sobre o consumo alimentar, seus efeitos centrais relacionados à redução de deposição de tecido adiposo parecem não ser através da redução da ingestão calórica. Esta outra face das ações centrais do estrogênio parece envolver efeitos na atividade voluntária assim como no gasto energético independente de exercício voluntário, ambos sendo aumentados pelo estrogênio (Wade et al., 1985). O camundongo  $\alpha$ ERKO apresenta uma redução no gasto energético, sugerindo que as ações no metabolismo energético são através dos  $RE\alpha$  (Heine et al., 2000).

Além do seu efeito direto no hipotálamo, o estrogênio parece regular a produção ou a resposta de hormônios do tecido adiposo como a leptina, afetando, através deste mecanismo, o consumo alimentar e o metabolismo energético. De fato, alguns estudos demonstraram que o estrogênio aumenta a leptina no adipócito (Casabiell et al., 1998; Tanaka et al., 2001).

Com relação ao desenvolvimento e diferenciação de adipócitos, os estudos realizados desde os anos 70 mostram que o E2 estimula a proliferação de pré-adipócitos em humanos (Roncari et al., 1978) e posteriormente resultados similares foram observados em uma variedade de espécies (Lea-Currie et al., 1999; Dieudonne et al., 2000; Anderson et al., 2001). Os pré-adipócitos podem permanecer indiferenciados ou podem diferenciar-se posteriormente em adipócitos, este processo é crítico para o estabelecimento do número final de adipócitos. Os trabalhos realizados atualmente indicam que o E2 pode afetar a diferenciação dos adipócitos, embora os resultados não sejam totalmente consistentes. Estudos com pré-adipócitos de ratos indicam que o E2 estimula a diferenciação destas células em adipócitos (Dieudonne et al., 2000). Contrariamente, outros resultados indicam que o E2 inibe a diferenciação dos adipócitos em linhagens de células 3T3 (Lea-Currie et al., 1999). Os efeitos inibitórios do estrogênio sobre a diferenciação dos adipócitos, deste último trabalho, são consistentes com outros trabalhos (Heim et al. 2004; Okazaki et al., 2002;

Dang et al., 2002), onde o estrogênio inibiu a adipogênese em culturas de células do estroma de medula óssea.

Estudos com camundongos  $\alpha$ ERKO e knockout para aromatase (ArKO) indicaram claramente que o E2 normalmente tem efeito inibitório sobre o número total de adipócitos. Heine et al. (2000) demonstraram que machos e fêmeas  $\alpha$ ERKO apresentam maior conteúdo de tecido adiposo. Houve uma modesta hipertrofia do tecido adiposo nestes animais, mas o mais surpreendente foi a hiperplasia. Assim, a ausência de sinalização do estrogênio nestes animais knockout aumentou o número de adipócitos, indicando que o estrogênio normalmente exibe um papel inibitório durante a adipogênese limitando o número de adipócitos.

Os xenoestrogênios são compostos naturais ou artificiais que mimetizam o E2 através da ligação aos RE $\alpha$  e RE $\beta$  (Cooke & Naaz, 2004). Indivíduos que consomem soja e seus derivados estão expostos a grandes quantidades de fitoestrogênios (genisteína e daidzeína).

O consumo de genisteína por camundongos elevou as concentrações séricas desta substância comparável aquelas encontradas em humanos e, esta apresentou efeito antilipogênico na deposição de tecido adiposo, este efeito foi produzido através da redução da expressão da LPL, que é similar ao efeito do E2 (Naaz et al. 2003). Esse efeito antilipogênico da genisteína também pode ser observado quando camundongos receberam um mix de isoflavonas de soja (6 mg/dia) em uma dieta hipercolesterolêmica (Wu et al., 2004). Neste estudo, o consumo das isoflavonas associado à exercícios (corrida em esteira) aboliu totalmente o aumento da gordura corporal induzido pela ooforectomia. Tais dados são consistentes com estudos *in vitro* anteriores que demonstraram que a genisteína reduziu a lipogênese induzida pela insulina, através da medição da captação de glicose nos adipócitos em culturas primárias de adipócitos (Szkudelska et al., 2000) e em linhagens de células 3T3 (Harmon et al., 2001). A genisteína também aumentou a lipólise nos adipócitos de ratos induzida pela adrenalina (Nogowski et al. 1998).

Estudos *in vitro* demonstraram que a genisteína afeta a adipogênese, com efeitos inibitórios em baixas concentrações (Dang et al., 2003; Heim et al., 2004) e estimulatórios em altas concentrações (Dang et al., 2003). Estes resultados indicam que a genisteína parece ter a capacidade de alterar o número de adipócitos para mais ou para menos em várias concentrações, reforçando o efeito bifásico e dose-dependente dos fitoestrógenos.

Os efeitos dos xenoestrogênios no tecido adiposo parecem depender das concentrações do estrogênio endógeno, eficiência de ligação aos RE e a concentração da exposição (Sato et al., 1996). Parece que moduladores seletivos dos RE que possuem

efeitos antiestrogênicos no tecido mamário podem exercer efeitos estrogênicos benéficos no tecido adiposo (Cooke & Naaz, 2004).

Baseado nos dados apresentados acima, que demonstram um papel importante dos fitoestrógenos e mais especificamente dos componentes da linhaça sobre o perfil lipídico, a adipogênese e a homeostase glicêmica, que são gênero-dependentes e devido à carência de estudos durante o período crítico de lactação, resolvemos avaliar o efeito do SDG e do óleo de linhaça + SDG como suplementos alimentares para a mãe durante o período de lactação e seus efeitos sobre machos e fêmeas de suas proles, especificamente durante a lactação.



## **1 OBJETIVOS**

### **1.1 Objetivo geral**

Avaliar se o consumo de SDG ou SDG mais óleo de linhaça por ratas durante a lactação alteram o estado nutricional, parâmetros bioquímicos e hormonais das ratas lactantes e dos machos e fêmeas da prole aos 14 e 21 dias de lactação

### **1.2 Objetivo específico**

#### **1.2.1 Nas ratas lactantes**

- a) O consumo de ração, a massa corporal e a composição corporal;
- b) As concentrações bioquímicas do leite (lactose, proteínas, colesterol total, triglicerídeos) no 14<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dias de lactação;
- c) As concentrações bioquímicas circulantes de glicose, colesterol total e triglicerídeos.
- d) As concentrações séricas de prolactina, 17 $\beta$ -estradiol e insulina.

#### **1.2.2 Nos machos e fêmeas das proles**

- a) A massa corporal e a composição corporal;
- b) As concentrações séricas de glicose, colesterol total e triglicerídeos;
- c) As concentrações séricas de prolactina, 17 $\beta$ -estradiol e insulina;
- d) O peso relativo de ovários e testículos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Desenho experimental

Ratas Wistar fêmeas, nulíparas, de 3 meses de idade, foram mantidas em biotério com temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro (7:00/19:00 h) controlados. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética número 230/2008.

Estes animais foram acasalados na proporção de 3 fêmeas para 1 macho e receberam ração comercial (23 % de proteína) e água ad libitum.

Ao nascimento das proles, as mães foram divididas em três grupos:

- Controle (C): ração a base de caseína;
- Diglicosídeo Secoisolariciresinol (SDG): a mesma ração de C contendo 400mg de SDG/Kg de ração (corresponde à quantidade de SDG presente em 20% de semente de linhaça, LinumLife<sup>®</sup> Extra);
- Grupo OL + SDG: a mesma ração de C contendo 400mg de SDG/Kg de ração e 7% de óleo de linhaça (Bioriginal<sup>®</sup>).

O n total de ratas lactantes foi de 07 para cada grupo. No dia do nascimento dos filhotes, definido como dia 0 (d0), a ninhada foi ajustada em 08 filhotes de cada mãe, 04 machos e 04 fêmeas, perfazendo um total de 56 filhotes por grupo experimental. Este total de filhotes foi dividido aleatoriamente nos 2 períodos estudados (14 e 21 dias de idade), ficando 14 machos e 14 fêmeas por grupo/período estudado.

No 14<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dias de lactação as ratas lactantes foram ordenhadas para a obtenção de leite. No 21<sup>o</sup> dia, após jejum de 12 horas, as ratas lactantes foram anestesiadas com Thiopentax a 5% (0,10 ml/100g p.c., i.p.) e em seguida foram coletadas amostras de sangue por punção cardíaca. Soro e leite foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriores dosagens bioquímicas e hormonais. As ratas lactantes foram completamente evisceradas para obtenção da carcaça e posterior análise da composição corporal.

O sacrifício das proles se deu aos 14 e 21 dias de idade, quando os animais oram mantidos em jejum curto por 2 horas e anestesiados com Thiopentax a 5% (0,10 ml/100g M.C., i.p.) e, em seguida, foi coletado sangue por punção cardíaca, sendo o soro armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriores dosagens bioquímicas e hormonais. A glicemia foi avaliada no momento do sacrifício. Os animais foram

completamente eviscerados para obtenção da carcaça e análise da composição corporal. O sacrifício das mães se deu aos 21 dias sob os mesmos procedimentos.

Os ovários e testículos foram coletados e pesados em balança analítica. Essas massas foram utilizadas para se calcular a massa relativa. O cálculo final das massas relativas do testículo e ovário para cada rato foi realizado dividindo-se a massa de cada órgão (em gramas) pela massa corporal de cada animal no dia da coleta, e multiplicando-se o resultado por 100. O resultado foi então expresso em gramas/100 gramas de massa corporal (g/100g M.C.).

## 2.2 Rações experimentais

As rações à base de caseína foram preparadas manualmente no LFE adicionadas das misturas de minerais e vitaminas, baseadas nas recomendações do COMMITTEE ON LABORATORY ANIMAL DIETS (1979) modificadas segundo as recomendações da AIN-93 (Reeves et al., 1993). Os ingredientes das rações (Quadro 1) foram pesados e homogeneizados em batedeira industrial Hobart, com água fervente. A massa obtida foi transformada em *pellets* e seca em estufa ventilada a 50°C por 24 h, e após a identificação, armazenada sob refrigeração até seu uso.

Quadro 1. Composição das rações utilizadas no ensaio biológico

<b>Ingredientes %</b>	<b>Controle</b>	<b>SDG</b>	<b>OL+SDG</b>
<b>Caseína</b>	20.00	20.00	20.00
<b>Extrato do SDG</b>	-	0.20	0.20
<b>Amido de milho</b>	52.95	52.75	52.75
<b>Açúcar</b>	10.00	10.00	10.00
<b>Mistura de minerais</b>	3.50	3.50	3.50
<b>Mistura de vitaminas</b>	1.00	1.00	1.00
<b>Óleo de soja</b>	7.00	7.00	-
<b>Óleo de linhaça</b>	-	-	7.00
<b>Celulose</b>	5.00	5.00	5.00
<b>B-Colina</b>	0.25	0.25	0.25
<b>L-Cistina</b>	0.30	0.30	0.30

### 2.3 Avaliação do estado nutricional

Os parâmetros utilizados para avaliação do estado nutricional das ratas lactantes e das proles lactentes e pós-desmame, foram:

#### 2.3.1 Ingestão de ração

O consumo materno foi monitorado diariamente na lactação. A quantidade de ração ingerida foi igual à diferença entre o peso da ração que restou na gaiola ( $R_f$ ) e a quantidade total colocada no dia anterior ( $R_i$ ).

### 2.3.2 Massa corporal (MC)

A massa corporal (mães e filhotes) foi monitorada diariamente na lactação, obedecendo sempre o mesmo horário de pesagem para todos os dias analisados.

### 2.3.3 Composição corporal

As carcaças foram amolecidas em autoclave por 1h, com posterior homogeneização em água destilada na proporção 1:1.

Conteúdo lipídico total: cerca de 3g do homogeneizado foram utilizados para determinação do conteúdo de gordura por método gravimétrico (Stansbie et al., 1976; Toste et al., 2006a; Fagundes et al., 2007). As alíquotas foram hidrolisadas em banho-maria a 70°C por 2h em presença de KOH 30% e etanol absoluto. Após acidificação com ácido sulfúrico 6M, os ácidos graxos totais e o colesterol livre foram extraídos mediante 3 lavagens sucessivas com éter de petróleo. O material foi transferido para um recipiente previamente pesado, e levado à capela de exaustão até ficar bem seco, quando se procedeu à pesagem diária até seu valor tornar-se constante. As pesagens foram corrigidas pelas diluições feitas nas etapas anteriores. Os resultados foram expressos em gramas de gordura por 100 gramas de carcaça.

Conteúdo protéico total: Alíquotas com cerca de 1g do homogeneizado, foram aquecidas a 37°C por 1h em KOH 0,6N, sob agitação. Após centrifugação de 1.000 g por 10 minutos (Tostes et al., 2006a; Fagundes et al., 2007), a concentração de proteínas totais foi determinada colorimetricamente no sobrenadante (Lowry et al., 1951), utilizando BSA (Sigma, MO, USA) para construção da curva padrão. Os resultados foram expressos em gramas de proteína por 100 gramas de carcaça.

Água corporal total: Foi colocado cerca de 1g do homogeneizado de carcaça em estufa à temperatura de 90°C, mantendo esta temperatura até que o peso da amostra desidratada ficasse estável (Pace et al., 1945), o que levou 6 dias, sendo realizadas as pesagens de 2 em 2 dias. Os resultados foram expressos em gramas de água corporal total.

Minerais totais: Cerca de 1g do homogeneizado de carcaça foi colocada em mufla (Fornitec Temp 1200) à temperatura de 600°C, mantendo esta temperatura até que o peso da amostra se mantivesse constante (Pace et al., 1945). Os resultados foram expressos em gramas de cinzas por 100 gramas de carcaça.

Massa de gordura visceral (MGV): pesamos as gorduras retroperitoneal, mesentérica e ao redor de útero e ovários, a fim de avaliar a adiposidade central.

#### **2.3.4 Estimativa do consumo de ácido graxo alfa-linolênico**

A ingestão materna de ácidos graxos foi determinada pela estimativa o consumo de lipídeos presentes nas rações. Estimamos a ingestão de ácido graxo alfa-linolênico (ALA) (ômega-3). Os teores dos ácidos graxos presentes no óleo de soja foram calculados com base na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006). Os ácidos graxos presentes no óleo de linhaça foram calculados com base em publicações internacionais (USDA, 2008; Morris, 2007).

#### **2.4 Extração de leite**

No 4º e 20º dia, as ratas foram separadas de seus filhotes, e após 120 minutos receberam injeção de 1 ml de ocitocina (Eurofarma, SP, BR) na dose de 5 UI, sc (Fellows & Rasmussen, 1984; Pine et al, 1994b; Passos et al, 2000). O leite foi extraído manualmente, 15 minutos após a administração da ocitocina, das 12 glândulas mamárias (inguinais e peitorais), estando as lactantes anestesiadas com Thiopentax a 5% (0,06 ml/100g p.c., i.p.). As amostras de leite foram armazenadas no freezer a – 20º C para determinação da composição bioquímica e hormonal.

#### **2.5 Composição bioquímica do leite**

Determinação da quantidade de proteína total: foi utilizado o método de Peterson (1977) para dosagem da quantidade de proteína no leite das ratas aos 4 e 20 dias de lactação (Passos et al, 2000).

As amostras de leite foram diluídas (1:10) em água destilada. Uma alíquota de 100 µl foi acondicionada em tubo de ensaio com o mesmo volume de DOC 0,15% (Sigma, MO, USA) e de TCA 72% (Sigma, MO, USA), agitados em vórtex, mantidos em repouso por 10 minutos e centrifugados (3000xg/40 minutos). Esta fase de precipitação é necessária para a remoção de substâncias interferentes. O precipitado foi ressuspenso em 1 ml de água destilada sob agitação. Foi adicionado 1 ml do reativo A (CTC / SDS 10% / NaOH 3,2% / água destilada na proporção 1:1:1:1), agitado e mantido a temperatura ambiente por 10 minutos. Foi acrescentado 0,5 ml de reativo B (reativo de Folin diluído em água destilada na relação de 1:5), imediatamente agitado em vórtex e mantido em repouso por 30

minutos a temperatura ambiente. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 750 nm. O BSA foi utilizado como padrão em alíquotas equivalentes a 10 e 100 mg de proteína. As concentrações de proteína no leite foram calculadas a partir da equação de Stauffer (1975), e os resultados expressos em mg/mL.

Determinação da quantidade de lactose: A lactose foi determinada através de método colorimétrico descrito por Erb et al (1977), utilizando ácido pícrico (Passos et al. 2000).

Adicionamos 200 µl de água destilada a 50 µl das amostras de leite, e em seguida 4,75 ml de ácido pícrico saturado. Após centrifugação (3000 xg/30 minutos), retiramos 1 ml do sobrenadante, ao qual adicionamos 500 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25%. Em seguida os tubos foram aquecidos a 100°C por 20 minutos, resfriados e adicionados 8,5 ml de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 520 nm. Uma solução de lactose comercial (Sigma, MO, EUA) foi utilizada como padrão e os resultados expressos em mg/mL.

Determinação da quantidade de colesterol total e triglicerídeo: o colesterol total foi determinado através de método enzimático colorimétrico, utilizando kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil). Os resultados foram expressos em mg/dL.

Os triglicerídeos foram determinados por teste enzimático colorimétrico modificado, através de kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), as amostras foram diluídas (1:25) e os resultados foram expressos em mg/dL (Fernando-Warnakulasuriy, 1981).

## **2.6 Determinações hormonais**

O sangue foi centrifugado (4°C/20 min/1500 g) para a obtenção do soro.

A prolactina foi determinada por RIE de duplo anticorpo utilizando reagentes para murinos fornecidos pelo National Institute of Health (NIH-NIDDKD, Bethesda, EUA). A variação intra-ensaio foi de 8%. O limite de sensibilidade foi de 0,3 ng/mL.

O 17β-estradiol foi determinado por RIE comercial (ImmuChemTM<sup>125</sup>I, Coated tube, MP Biomedicals, E.U.A), adaptado para determinação de hormônio estrogênio em ratos. O coeficiente de variação intra-ensaio foi 5,5%. Os resultados foram expressos em pg/mL. O limite de sensibilidade foi de 10 pg/mL.

A insulinemia foi dosada por RIE comercial (ImmuChemTM<sup>125</sup>I, Coated tube, MP Biomedicals, E.U.A). O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 3,2%. Os

resultados foram expressos em  $\mu\text{UI/mL}$ . O limite de sensibilidade do teste foi de 5,5  $\mu\text{UI/mL}$ .

Não foi necessário se estabelecer o coeficiente de variação inter-ensaio, pois todas as determinações foram feitas em um único ensaio, para cada hormônio analisado.

### **2.7 Avaliação da resistência insulínica**

A resistência à insulina foi avaliada através do Índice de Resistência Insulínica (IRI), calculado pela fórmula:  $\text{insulinemia } (\mu\text{UI/ml}) \times \text{glicemia } (\text{mmol/l})$ .

### **2.8 Determinações bioquímicas**

A glicemia foi medida no momento do sacrifício com auxílio de um medidor automático (ACCU CHECK-Active, Roche®), baseado na reação glicose-oxidase.

As dosagens do colesterol total e triglicerídeos séricos foram realizadas através de teste enzimático colorimétrico comercial (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil). Os resultados foram expressos em mg/dL.

### **2.9 Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para comparação entre os grupos utilizamos a análise de variância univariada, associada ao teste de comparação múltipla entre as médias, teste de Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0.05$ .

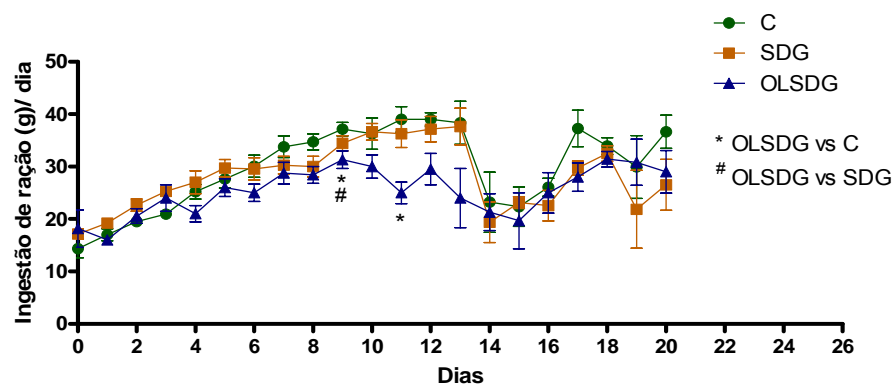


### 3 RESULTADOS

#### Avaliação nutricional das ratas lactantes que receberam ração adicionada de SDG ou de Óleo de Linhaça + SDG (OLSDG)

As ratas lactantes que receberam ração adicionada de SDG ou do óleo de linhaça + SDG não apresentaram alterações importantes na ingestão alimentar (figura 1A), nem na massa corporal (figura 1B).

(A)



(B)

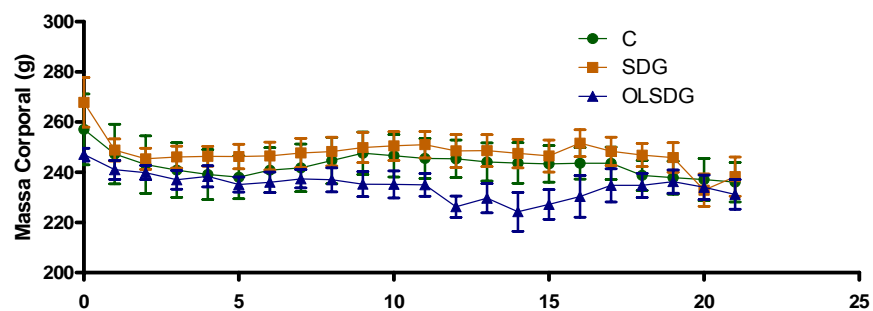


Figura 1- Ingestão de ração (A) e massa corporal (B) das ratas lactantes dos grupos Controle, SDG e OLSDG. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 7 animais por grupo.

As ratas lactantes SDG apresentaram maior massa de gordura corporal comparadas às ratas C (+39%;  $P < 0.005$ ) e às ratas OLSDG (+24%;  $P < 0.005$ ) (Tabela 1). Coerentemente, o grupo SDG teve uma menor proporção de água corporal. As ratas do grupo OLSDG apresentaram menor conteúdo mineral comparado às ratas C e SDG (-20% e -41%,  $p < 0.05$ ), respectivamente. Não houve diferenças em relação à massa de gordura visceral (MGV) e a massa relativa do ovário entre os grupos.

Tabela 1. Composição corporal, massa de gordura visceral, massa relativa do ovário de ratas lactantes ao final da lactação

	Controle	SDG	OLSDG
<b>Composição corporal (g/100g carcaça)</b>			
Gordura corporal total	10.20 ± 0.71	14.13 ± 0.87**	11.30 ± 0.46 <sup>#</sup>
Proteína corporal	17.13 ± 1.24	19.00 ± 1.41	16.10 ± 2.71
Água corporal	63.67 ± 1.25	56.69 ± 0.82**	62.50 ± 1.58
Mineral corporal	4.64 ± 0.43	5.18 ± 0.46	3.07 ± 0.45 <sup>*,#</sup>
Massa de gordura visceral (g/100g M.C.)	3.59 ± 0.57	5.08 ± 0.39	4.10 ± 0.34
Massa relativa do ovário (mg/M.C.)	22.3 ± 1	20.1 ± 2	16.7 ± 1

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média de 7 animais por grupo. \*OLSDG vs C; \*\*SDG vs C, <sup>#</sup>OLSDG vs SDG;  $p < 0.005$

Na tabela 2, mostramos o consumo de ácidos graxos alfa-linolênico, as concentrações séricas de colesterol total, triglicerídeos, glicemia, insulinemia, índice de resistência à insulina e a prolactinemia das ratas lactantes. As ratas do grupo OLSDG apresentaram maior consumo do ácido graxo alfa-linolênico (+668%;  $p < 0.0001$ ) em comparação às ratas C e SDG, menores concentrações séricas do colesterol total (-41%,  $p < 0.05$ ) e triglicerídeos (-45%;  $p < 0.05$ ) em comparação às ratas do grupo SDG, e também de triglicerídeos em relação ao grupo C. As ratas do grupo SDG apresentaram hiperprolactinemia (+389%;  $p < 0.05$ ) em relação às ratas C, sendo que o aumento no grupo OLSDG foi de menor proporção (+153%,  $p < 0,05$ ). Nenhuma alteração significativa foi observada nas concentrações de  $17\beta$ -estradiol.

As dietas com SDG e OL+SDG não modificaram a homeostase glicêmica das ratas lactantes.

Tabela 2. Consumo de ácido graxo alfa-linolênico, concentrações séricas de colesterol total, triglicerídeos, glicose, insulina, índice de resistência a insulina e prolactina das ratas lactantes.

	<b>Controle</b>	<b>SDG</b>	<b>OLSDG</b>
Ácido graxo alfa-linolênico (g)	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.94 ± 0.06 <sup>*,#</sup>
Colesterol total (mg/dL)	79.9 ± 8.5	102.3 ± 11.6	60.4 ± 7.5 <sup>#</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	67.4 ± 5.3	74.7 ± 7.1	41.4 ± 6.5 <sup>*,#</sup>
Glicemia (mg/dL)	71.0 ± 2.5	69.3 ± 3.5	68.6 ± 5.1
Insulina (µUI/mL)	36.5 ± 2.9	39.9 ± 2.8	37.4 ± 3.5
IRI	121.4 ± 14.4	152.8 ± 15.6	108.3 ± 15.7
Prolactina (ng/mL)	3.95 ± 1.5	19.33 ± 4.7 <sup>**</sup>	10.33 ± 3.2 <sup>*</sup>
E2 (pg/mL)	318.1 ± 70.58	206.5 ± 39.79	187.7 ± 16.62

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média de 7 animais por grupo. <sup>\*</sup>OLSDG vs C; <sup>\*\*</sup>SDG vs C, <sup>#</sup>OLSDG vs SDG; p<0.05.

### **Composição do leite**

As concentrações de lactose, proteína, colesterol total e triglicerídeo no leite no 14<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dias de lactação são mostrados na tabela 3. O teor de lactose no leite das ratas OLSDG encontra-se menor (-17%, p<0.005) no 14<sup>o</sup> dia, em comparação às ratas do grupo C, estando normalizadas ao final da lactação.

O leite das ratas do grupo SDG (-21%) e OLSDG (-20%) possui menor teor de no 14<sup>o</sup> dia de lactação, estando normalizados ao final da lactação.

Não observamos diferenças significativas no conteúdo de colesterol total e triglicerídeos em nenhum dos grupos.

Tabela 3. Composição bioquímica do leite de ratas dos grupos C, SDG e OLSDG no 14º e no 20º dia de lactação

	<b>Controle</b>	<b>SDG</b>	<b>OLSDG</b>
<b>14º dia de lactação (7)</b>			
Lactose (mg/mL)	39.6 ± 1.13	35.5 ± 1.67	33.2 ± 1.82*
Proteína (mg/mL)	91.96 ± 4.55	73.50 ± 3.78**	73.68 ± 5.67*
Colesterol (mg/dL)	520.9 ± 23.03	536.6 ± 25.15	498 ± 53.85
Triglicerídeos (mg/dL)	23.440 ± 5204	17.410 ± 1943	20.940 ± 2399
<b>20º dia de lactação (7)</b>			
Lactose (mg/mL)	13.89 ± 3.19	15.21 ± 2.59	17.74 ± 0.69
Proteína (mg/mL)	78.10 ± 3.73	80.70 ± 3.59	74.60 ± 8.46
Colesterol (mg/dL)	589.5 ± 30.00	501.7 ± 36.74	498.1 ± 42.98
Triglicerídeos (mg/dL)	28.390 ± 1009	25.420 ± 3353	26.120 ± 7106

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média de 7 animais por grupo. \*OL+SDG vs C, \*\*SDG vs C; p<0.05.

#### **Avaliação nutricional de machos e fêmeas das proles de ratas lactantes que receberam ração adicionada de SDG e do Óleo de Linhaça+SDG**

A figura 2 mostra a evolução da massa corporal dos machos (A) e fêmeas (B) das proles de mães C, SDG e OLSDG. Durante o período inicial da lactação não observamos diferenças significativas entre as massas corporais dos grupos estudados, no entanto, a partir do 13º dia da lactação, tanto os machos (-15%, p<0.05) quanto as fêmeas (-16%, p<0.05) do grupo OLSDG apresentaram menor massa corporal, avaliada pela área sob a curva, até o final da lactação. As proles dos grupos SDG não apresentaram diferenças com relação à massa corporal durante todo o período da lactação.

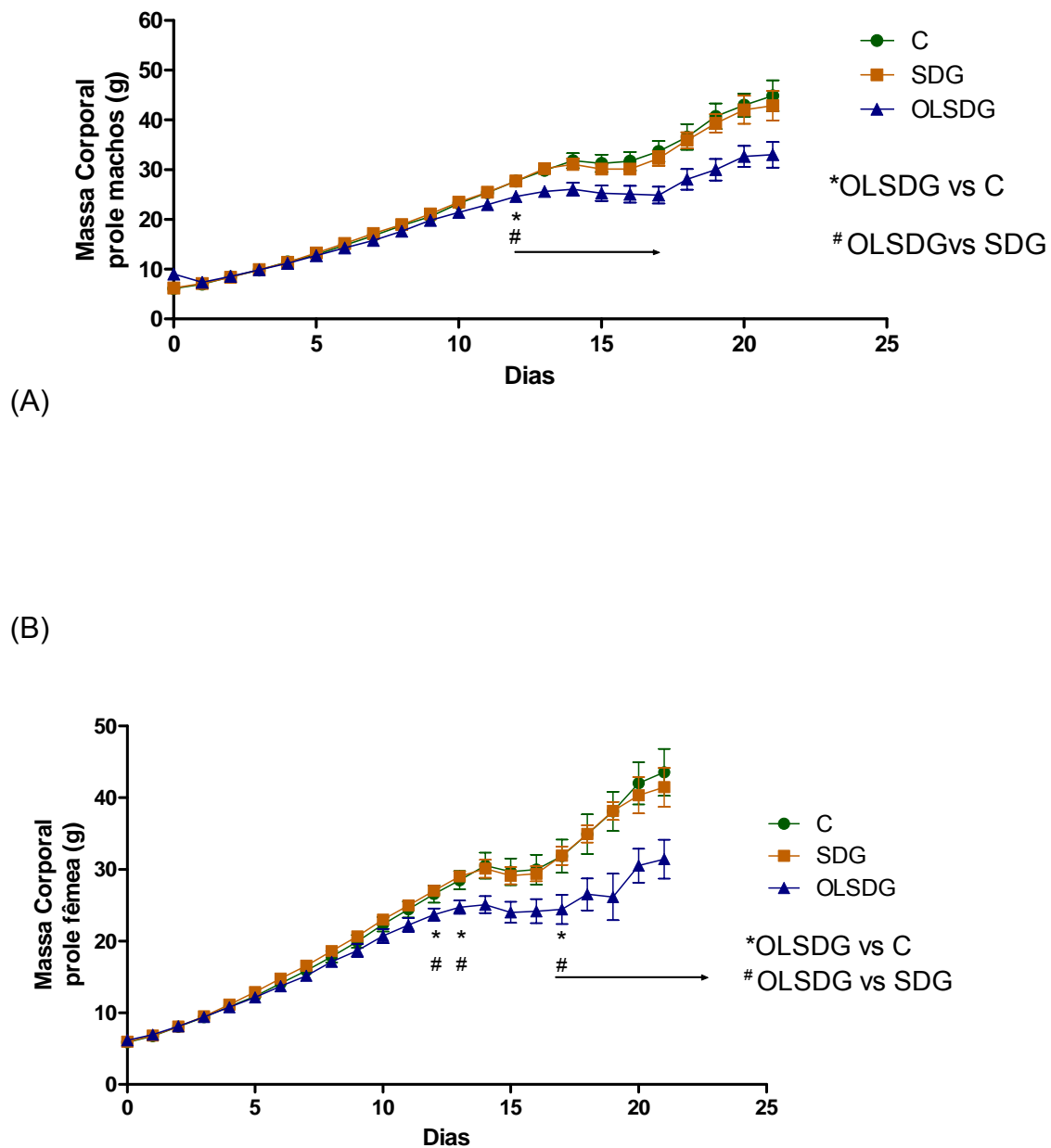


Figura 2 - Evolução da massa corporal de machos (A) e fêmeas (B) do grupos C, SDG e OLSDG. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 14 animais por grupo.

Na tabela 4 mostramos a composição corporal, massa de gordura visceral e massa relativa de testículo dos machos. Os animais do grupo SDG apresentaram menor massa de gordura corporal (-24%,  $p < 0.01$ ) em comparação ao grupo C, aos 14 dias, que se normalizou aos 21 dias de lactação. A prole OLSDG também apresentou menor massa de gordura corporal (-55%,  $p < 0.001$ ) em relação à prole C. No entanto, aos 21 dias a prole OLSDG ainda apresenta o conteúdo de massa de

gordura total menor (-41%,  $p < 0.0001$ ) em relação a prole C e em relação à prole SDG (-38%,  $p < 0.0001$ ).

Nenhuma alteração foi observada no conteúdo de proteína corporal aos 14 dias, no entanto, aos 21 dias os machos do grupo OLSDG apresentam um aumento significativo (+23%,  $p < 0.01$ ) em relação ao grupo C e em relação ao SDG (+29%,  $p < 0.01$ ). A prole SDG apresenta maior massa de gordura visceral aos 14 dias (+39%,  $p < 0.01$ ) em relação à prole C, mas aos 21 dias nenhuma alteração é observada neste parâmetro. Também não é observada nenhuma alteração na massa relativa de testículo nos dois períodos do estudo.

Tabela 4 – Composição corporal, massa de gordura visceral, massa relativa de testículo no 14º e ao final da lactação

	Controle	SDG	OLSDG
<b>14 dias de idade (14)</b>			
<b>(g/100g carcaça)</b>			
Gordura corporal total	8.92 ± 0.65	6.82 ± 0.42**	4.03 ± 0.42*
Proteína corporal	10.42 ± 1.81	12.54 ± 1.39	9.90 ± 1.39
Massa de gordura visceral (g/100g p.c.)	0.5253 ± 0.04	0.7325 ± 0.04**	0.6202 ± 0.05
Massa relativa de testículo (mg/p.c.)	134.2 ± 6	119.3 ± 6	146.0 ± 11
<b>21 dias de idade (14)</b>			
<b>(g/100g carcaça)</b>			
Gordura corporal total	13.18 ± 0.56	12.56 ± 0.46	7.74 ± 0.61*
Proteína corporal	8.43 ± 0.27	8.04 ± 0.64	10.34 ± 0.58*.#
Massa de gordura visceral (g/100g p.c.)	1.095 ± 0.13	1.039 ± 0.10	0.9744 ± 0.05
Massa relativa de testículo (mg/p.c.)	257.2 ± 10	267.9 ± 25	271.4 ± 9

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média de 14 animais por grupo. \*OL+SDG vs C; \*\*SDG vs C, #OLSDG vs SDG;  $p < 0.01$ .

Aos 14 dias (Tabela 5), as fêmeas da prole OLSDG apresentaram menor massa de gordura corporal (-39%,  $p < 0.005$ ) comparada às proles C e SDG (-43%,  $p < 0.005$ ). Aos 21 dias de lactação elas continuaram apresentando menor massa de gordura corporal em relação às proles C (-45%,  $p < 0.0001$ ) e SDG (-48%,  $p < 0.0001$ ).

As fêmeas da prole OLSDG apresentaram maior proteína corporal comparadas ao grupo C (+45%,  $p < 0.05$ ) aos 14 dias, a qual foi normalizada aos 21 dias de idade. Nenhuma alteração foi observada na massa de gordura visceral ou na massa relativa de ovários aos 14 e aos 21 dias da lactação (Tabela 5).

Tabela 5. Composição corporal, massa de gordura visceral, massa relativa de ovário no 14º dia e ao final da lactação

	Controle	SDG	OLSDG
<b>14 dias de idade (14)</b>			
<b>(g/100g carcaça)</b>			
Gordura corporal total	13.41 ± 0.73	14.00 ± 1.76	8.02 ± 0.57 <sup>*,#</sup>
Proteína corporal	10.23 ± 1.35	13.23 ± 0.84	14.98 ± 1.56 <sup>*</sup>
Massa de gordura visceral (g/100g p.c.)	0.5256 ± 0.04	0.5600 ± 0.03	0.4863 ± 0.04
Massa relativa de ovário (g/100g p.c.)	19.55 ± 2	21.59 ± 2	20.63 ± 2
<b>21 dias de idade</b>			
<b>(g/100g carcaça)</b>			
Gordura corporal total	12.42 ± 0.58	13.15 ± 0.71	6.82 ± 0.40 <sup>*,#</sup>
Proteína corporal	13.82 ± 0.49	14.69 ± 0.53	14.51 ± 0.53
Massa de gordura visceral (g/100g p.c.)	1.256 ± 0.13	1.240 ± 0.13	0.8149 ± 0.08
Massa relativa de ovário (g/100g p.c.)	30.32 ± 3	35.73 ± 2	29.48 ± 2

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média de 14 animais por grupo. \*OLSDG vs C; \*\*SDG vs C, #OLSDG vs SDG;  $p < 0.005$ .

Na tabela 6 mostramos as concentrações séricas de colesterol, triglicerídeos, prolactina, glicose, insulina, e IRI dos machos. A prole SDG apresentou maiores concentrações séricas de triglicerídeos aos 14 dias comparados ao grupo C (+105%,  $p < 0.05$ ) e ao grupo OLSDG (+62%,  $p < 0.05$ ), mas, aos 21 dias eles apresentaram menor concentração de triglicerídeos (-48%,  $p < 0.0001$ ). A prole OLSDG também apresentou menor concentração de triglicerídeos aos 21 dias de idade (-54%,  $p < 0.0001$ ) comparada ao controle. As proles SDG e OLSDG também apresentaram hipoprolactinemia (-41%,  $p < 0.01$ ) aos 14 dias de idade, no entanto, a prolactinemia foi normalizada aos 21 dias de idade. Nenhuma alteração foi observada nas concentrações de colesterol, glicose, insulina ou no IRI nos dois períodos do estudo.

Tabela 6. Concentrações séricas de colesterol, triglicerídeos, prolactina insulina, glicose e índice de resistência à insulina nos machos aos 14 dias e ao final da lactação

	Controle	SDG	OLSDG
<b>14 dias de idade (14)</b>			
Colesterol (mg/dL)	164.6 ± 1.88	176.4 ± 5.70	170.6 ± 7.32
Triglicerídeos (mg/dL)	59.79 ± 9.96	122.6 ± 20.65**	75.59 ± 13.18
Glicemia (mg/dL)	104.3 ± 1.98	111.8 ± 4.08	107.4 ± 4.28
Insulina (µUI/mL)	33.01 ± 2.94	33.35 ± 3.41	30.06 ± 1.61
IRI	211.8 ± 30.16	188.3 ± 25.23	178.8 ± 11.53
Prolactina (ng/mL)	1.48 ± 0.21	0.87 ± 0.06*	0.87 ± 0.06*
<b>21 dias de idade (14)</b>			
Colesterol (mg/dL)	92.84 ± 5.11	99.16 ± 4.32	106.5 ± 8.31
Triglicerídeos (mg/dL)	171.9 ± 20.80	88.35 ± 11.14**	78.73 ± 5.59*
Glicemia (mg/dL)	84.33 ± 5.04	76.08 ± 3.47	74.63 ± 2.88
Insulina (µUI/mL)	29.03 ± 1.18	35.82 ± 3.38	33.39 ± 2.14
IRI	158.6 ± 17.51	139.5 ± 16.92	114.6 ± 19.58
Prolactina (ng/mL)	1.38 ± 0.15	1.18 ± 0.18	1.31 ± 0.16

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média de 14 animais por grupo. \*OL+SDG vs C; \*\*SDG vs C, #OLSDG vs SDG;  $p < 0.05$ .



As fêmeas das proles OLSDG apresentaram maior concentração de colesterol total aos 14 dias comparado a prole C (+16%,  $p < 0.05$ ), mas aos 21 dias este parâmetro estava normalizado (Tabela 7). As concentrações de triglicérides das proles SDG (-42%,  $p < 0.05$ ) e OLSDG (-59%,  $p < 0.05$ ) também foram menores aos 21 dias, apesar de aos 14 dias a trigliceridemia ter sido maior no grupo SDG (+74%,  $p < 0.05$ ). Nenhuma alteração foi observada nas concentrações de glicose, insulina ou no IRI e prolactina nos dois períodos do estudo. Aos 14 dias, as concentrações de  $17\beta$ -estradiol encontram-se aumentadas (+86%,  $p < 0.0002$ ) nas fêmeas SDG e nas fêmeas OLSDG (+176%,  $p < 0.0002$ ) em comparação as proles C e em comparação as fêmeas SDG (49%,  $p < 0.0002$ ). Nenhuma alteração foi observada aos 21 dias de idade

Tabela 7. Concentrações séricas de colesterol, triglicerídeos, glicemia, insulina, índice de resistência à insulina, prolactina e 17 $\beta$ -estradiol (E2) das fêmeas aos 14 e 21 dias de idade.

	Controle	SDG	OLSDG
<b>14 dias de idade (14)</b>			
Colesterol (mg/dL)	161.6 $\pm$ 3.52	163.3 $\pm$ 5.33	188.6 $\pm$ 10.31*
Triglicerídeos (mg/dL)	72.76 $\pm$ 6.65	127.3 $\pm$ 19.82**	76.73 $\pm$ 6.47
Glicemia (mg/dL)	104.3 $\pm$ 1.98	111.8 $\pm$ 4.08	107.4 $\pm$ 4.28
Insulina ( $\mu$ UI/mL)	33.36 $\pm$ 2.65	36.12 $\pm$ 2.09	38.26 $\pm$ 2.22
IRI	200.9 $\pm$ 14.85	252.2 $\pm$ 24.11	221.2 $\pm$ 13.85
Prolactina (ng/mL)	1.17 $\pm$ 0.09	1.19 $\pm$ 0.10	0.95 $\pm$ 0.06
E2 (pg/mL)	224.0 $\pm$ 29.47	415.6 $\pm$ 54.17**	618.0 $\pm$ 65.44*.#
<b>21 dias de idade (14)</b>			
Colesterol (mg/dL)	114.7 $\pm$ 8.08	108.9 $\pm$ 11.52	124.1 $\pm$ 13.08
Triglicerídeos (mg/dL)	162.6 $\pm$ 28.21	93.89 $\pm$ 9.93**	66.83 $\pm$ 9.12*
Glicemia (mg/dL)	77.67 $\pm$ 5.01	76.18 $\pm$ 2.57	79.88 $\pm$ 4.15
Insulina ( $\mu$ UI/mL)	28.13 $\pm$ 3.06	25.97 $\pm$ 1.66	25.67 $\pm$ 2.52
IRI	124.6 $\pm$ 18.01	118.7 $\pm$ 10.78	113.2 $\pm$ 13.59
Prolactina (ng/mL)	1.36 $\pm$ 0.21	1.40 $\pm$ 0.18	1.01 $\pm$ 0.09
E2 (pg/mL)	698.0 $\pm$ 197.7	442.7 $\pm$ 123.2	356.8 $\pm$ 63.42

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 14 animais por grupo. \*OL+SDG vs C; \*\*SDG vs C, #OLSDG vs SDG; p<0.0002.

## 4 DISCUSSÃO

No presente estudo estamos mostrando os dados sobre o consumo materno do diglicosídeo secoisolaricerisinol (SDG) isolado da semente da linhaça e em combinação com o óleo extraído da semente de linhaça (OLSDG) durante a lactação e as repercussões sobre a composição bioquímica do leite materno e o estado nutricional das ratas lactantes e de suas proles durante a lactação, avaliando possíveis diferenças relacionadas ao sexo.

A ingestão do SDG e do óleo de linhaça não alterou a ingestão alimentar nem a massa corporal das ratas lactantes, corroborando estudos prévios realizados em nosso laboratório utilizando 25% de semente de linhaça (Figueiredo et al, 2009; Troina et al, 2010), bem como outros estudos realizados por outros pesquisadores (Tou et al 1998, Collins et al 2003). Embora as ratas lactantes não tenham apresentado alterações na massa corporal, a avaliação da composição corporal nos revela um aumento significativo da gordura corporal nas ratas lactantes que receberam ração suplementada com SDG. Isto é inesperado, pois em ratas o estrogênio ou os fitoestrógenos têm um efeito lipolítico. A combinação com o óleo de linhaça (grupo OLSDG) atenuou o efeito lipogênico da SDG. Nosso trabalho é o primeiro a descrever a composição corporal de ratas que consumiram componentes da semente da linhaça durante a lactação.

Em nosso trabalho, as ratas lactantes do grupo SDG apresentaram um aumento significativo das concentrações de prolactina. Já foi demonstrado que fitoestrógenos podem apresentar efeitos estrogênicos sobre a secreção de prolactina. Rachón et al (2007) avaliaram os efeitos do equol, um metabólito da daidzeína, sobre a secreção de prolactina e hormônio luteinizante (LH), bem como a expressão dos Receptores Estrogênicos (RE $\alpha$  e RE $\beta$ ) na hipófise de ratas ovariectomizadas. Foram utilizadas duas doses de equol (50 e 400mg/Kg de ração) e os resultados foram comparados aos efeitos do benzoato de estradiol, também administrado em duas doses (4,3 e 17,3mg/Kg de ração) por 3 meses. A maior dose de equol produziu aumentos significativos das concentrações de prolactina e LH, o que não aconteceu com o grupo que recebeu a maior dose do benzoato de estradiol. O tratamento com equol não afetou a expressão gênica dos RE. Os autores concluíram que altas doses de equol utilizadas em ratas ovariectomizadas exercem efeitos estrogênicos nos lactotrofos e antiestrogênicos nos gonadotrofos. Da mesma forma, que com a gordura corporal, a combinação com o óleo de linhaça atenuou os efeitos do SDG sobre a prolactina sérica, apesar desse grupo apresentar valores significativamente maiores que os controles.

Não observamos diferenças significativas nas concentrações de 17 $\beta$ - estradiol entre as mães dos grupos estudados. Este resultado é contrário ao observado em outro estudo realizado em nosso laboratório, onde Troina et al (2010) observamos hiperestrogenismo

materno ao desmame, após o consumo de 25% de semente de linhaça. É possível que a concentração de SDG em 25% de semente de linhaça seja maior que a utilizada neste estudo (400 mg/Kg de ração). Outra possibilidade, é que algum outro componente da semente de linhaça ajude na absorção ou no metabolismo do fitoestrógeno presente na semente de linhaça.

A glicemia e a insulinemia não foram modificadas com o consumo do SDG ou do óleo da linhaça, corroborando em parte os resultados observados em trabalho anterior após o consumo de 25% de semente de linhaça (Troina, 2010), no entanto, as ratas lactantes que ingeriram a semente de linhaça apresentaram uma menor insulinemia. Os efeitos da semente de linhaça e de seus componentes isolados sobre o metabolismo glicídico têm sido bastante investigados. Recentemente, foi observado que as fibras alimentares e lignanas isoladas da semente de linhaça reduzem a glicemia e/ou a insulinemia em animais (Prasad, 2000; Prasad, 2001; Fukumitsu et al; 2008) e seres humanos (Pan et al, 2008; Zhang et al, 2008). Entretanto, os modelos animais e os estudos em seres humanos relatados aqui, utilizaram grupos com disfunção metabólica (obesos ou diabéticos) e que não estavam na fase de lactação. Em resumo, sugerimos que o SDG e o óleo de linhaça não são capazes de afetar a homeostase glicêmica das mães durante a lactação, mas algum outro componente da semente de linhaça pode ter um efeito de reduzir a insulinemia.

As ratas lactantes não apresentaram alterações no peso relativo do ovário, este resultado corrobora estudo anterior no qual o consumo de 10% de semente de linhaça na lactação não modificou o peso relativo de útero e ovário de ratas lactantes (Tou et al, 1999). Também corroborando os resultados de nosso trabalho anterior, onde não observamos modificações do peso relativo do ovário ao final da lactação com a ingestão de 25% de semente de linhaça (Troina et al, 2010)

A análise bioquímica do leite das ratas mostra uma redução significativa do conteúdo de lactose e proteína no grupo que recebeu ração adicionada de OLSDG no 14º dia de lactação, os quais são normalizados ao final da lactação. O leite das ratas SDG apresentou uma redução significativa do conteúdo de proteína no 14º dia o qual também se encontra normalizado ao final da lactação. Em nosso laboratório, (Troina et al., 2010) analisamos o leite de ratas que receberam a semente de linhaça na lactação e observamos uma redução significativa da lactose ao final da lactação, além disso, o conteúdo de colesterol do leite também estava reduzido. As diferenças observadas entre os dois estudos pode ser justificada pela presença das fibras alimentares presentes na semente da linhaça, que contribuem para a redução do colesterol e carboidratos. No trabalho atual, a fonte de fibra utilizada é a celulose, fibra insolúvel que não apresenta propriedades de atenuação do colesterol e outros parâmetros bioquímicos. No estudo atual, a alteração na proteína do leite pode ser devido a maior presença do fitoestrógeno. Não podemos fazer qualquer

associação com a prolactinemia, uma vez que não foi analisada a concentração sérica deste hormônio aos 14 dias.

Observamos uma menor massa corporal das proles de machos e fêmeas das ratas OLSDG a partir do 13º dia de lactação que permanece até o final da lactação. Estes achados corroboram outros estudos que utilizaram a semente de linhaça na gestação e/ou lactação (Tou et al, 1998; Collins et al, 2003) e observaram menor massa corporal ao nascimento e menor ganho de massa corporal da prole ao fim da lactação. Em nosso laboratório, (Troina et al. 2010) observamos também menor massa corporal na prole fêmea de ratas que receberam semente de linhaça durante a lactação, no entanto, Figueiredo et al. (2009) mostrou um aumento significativo de massa corporal na prole de machos de ratas que consumiram semente de linhaça no mesmo período. Estas diferenças podem ser explicadas pela combinação de componentes no uso de semente de linhaça.

No presente estudo, associado à menor massa corporal, observamos também menor conteúdo de gordura total no 14º dia de lactação que permanece até o desmame (21º dia). O principal compartimento responsável pela menor massa corporal das proles OLSDG ao desmame parece ser o conteúdo de gordura corporal. Os machos SDG apresentaram maior massa de gordura visceral no 14º dia, que se encontra normalizada ao desmame. Figueiredo et al 2009 observaram uma redução significativa da massa de gordura total e subcutânea ao desmame, sem alteração da massa de gordura visceral.

As concentrações de prolactina encontram-se menores nos machos da prole de ratas SDG e OLSDG no 14º dia de lactação encontrando-se normalizada ao desmame. As fêmeas não apresentaram alteração na prolactinemia em nenhum dos períodos estudados. Este trabalho é o primeiro a avaliar as concentrações de prolactina após o consumo de componentes isolados da linhaça. Como as mães apresentaram maior prolactinemia nos grupos SDG e OLSDG é possível que esta alteração possa estar regulando a produção endógena de prolactina somente nos machos. Sabe-se que a prolactina pode exercer um feed-back de alça curta, inibindo sua própria produção e secreção, através do estímulo a produção de dopamina (Grattan & Kokay, 2008). Entre outros efeitos sobre o neurônio dopaminérgico ela estimula a atividade da tirosina hidroxilase, estando aumentada na hiperprolactinemia. Desta forma, a passagem de prolactina através do leite para a prole pode levar a um maior tônus dopaminérgico na prole inibindo a sua prolactina (Arbosgat & Voogt, 1991).

A prolactina parece ter um efeito adipogênico, pois camundongos deletados para o receptor de prolactina apresentam menor formação de tecido adiposo subcutâneo (Flint et al, 2006). De fato, nos machos em que a prolactinemia está menor (grupos SDG e OLSDG), a massa total de gordura está significativamente diminuída. Por outro lado, as fêmeas SDG que não apresentaram alteração de prolactina, também não apresentaram alteração na

massa de tecido adiposo. Embora, as fêmeas OLSDG tenham apresentado menor massa corporal e neste caso o efeito pode ser devido ao óleo de linhaça.

Observamos hiperestrogenismo nas fêmeas aos 14 dias de idade, que é revertido aos 21 dias de idade, mostrando um mesmo perfil que as mães ao desmame. Em estudo anterior, Troina et al (2010) observamos hiperestrogenismo aos 21 dias de idade nas fêmeas das proles de mães linhaça. Como não dosamos o estrogênio das mães aos 14 dias, não sabemos como o SDG aumentaria a passagem de estradiol pelo leite ou estimularia diretamente a produção de estradiol na prole.

Não observamos alterações na glicemia em nenhum dos períodos estudados. Figueiredo et al. 2009 também não observou redução da glicemia na prole de machos de ratas que receberam linhaça na lactação, no entanto, Troina et al. (2010) mostrou uma redução significativa da glicemia em fêmeas, cujas mães receberam suplementação de semente de linhaça, ao desmame. É provável que outros componentes da linhaça tenham exercido a ação hipoglicemiante observada no estudo anterior, visto que a semente de linhaça é rica em fibras solúveis, que apresentam ação direta sobre o controle glicêmico (Morris, 2007).

Apesar de termos como hipótese um efeito estrogênico do SDG alterando a morfologia ovariana ou testicular, não observamos alterações no peso relativo de ovário nem de testículos das proles de ratas que receberam SDG ou OLSDG durante a lactação. Provavelmente, isto seja devido ao tempo de duração do tratamento, visto que a dose utilizada é relativamente alta. Por outro lado, não avaliamos quanto do administrado na mãe, de fato passa para a prole. Nossos resultados corroboram estudo anterior, onde também não observamos alterações no peso relativo de ovário em nenhum dos períodos do estudo (Troina et al., 2010). Tou et al (1998) também não observaram alterações da massa relativa de testículo durante a idade adulta.

No presente estudo, as ratas lactantes OLSDG apresentaram menores concentrações séricas de colesterol total e triglicerídeos comparadas às ratas do grupo SDG, e as concentrações de triglicerídeos foram menores também em relação aos controles. Em nosso laboratório, (Troina et al 2010) também não observamos diferenças no colesterol e observamos menor trigliceridemia nas ratas que receberam semente de linhaça, corroborando os resultados desse estudo. Parece que os altos níveis de ALA observados no grupo OLSDG estão relacionados à diminuição das concentrações de triglicerídeos (Cunnane et al., 1993; Craig, 1999).

Aos 14 dias de lactação os machos das proles SDG apresentaram maiores concentrações de triglicerídeos, que foram menores ao desmame, sem alterações nas concentrações de colesterol total. Já os machos das proles OLSDG apresentaram menor

trigliceridemia somente ao desmame, sem alterações do colesterol total. Figueiredo et al 2009 mostrou que os machos das proles linhaça apresentaram uma redução significativa do colesterol e triglicerídeos ao desmame. Desta forma, outros componentes da linhaça podem atuar na diminuição do colesterol.

No 14º dia de lactação, as fêmeas das proles SDG não apresentaram alterações do colesterol total sérico e os triglicerídeos encontraram-se aumentados. Ao desmame não observamos nenhuma alteração do colesterol sérico e os triglicerídeos encontram-se reduzidos. Já as fêmeas OLSDG apresentaram maior colesterolemia no 14º dia, sem alteração dos triglicerídeos séricos e ao desmame o colesterol está normalizado e os triglicerídeos reduzidos. Troina et al 2010 mostrou que as fêmeas das proles linhaça apresentaram colesterol e triglicerídeos reduzidos ao desmame. É provável que algum componente da linhaça que apresenta efeitos sobre os triglicerídeos estejam sendo transferidos pelo leite. Não sabemos o que pode elevar os triglicerídeos no grupo SDG aos 14 dias, tanto nos machos quanto nas fêmeas.

Tabela 8 - Resumo dos resultados

Variável	Mães	Machos	Fêmeas	Mães	Machos	Fêmeas
	SDG	SDG	SDG	OLSDG	OLSDG	OLSDG
<b>14 dias</b>						
Massa corporal	-	N	N	-	↓	↓
Gordura corporal	-	↓	N	-	↓	↓
Proteína corporal	-	N	N	-	N	↑
Massa de gordura visceral	-	↑	N	-	N	N
Triglicerídeo sérico	-	↑	N	-	N	↑
Colesterol total sérico	-	N	N	-	N	↑
Prolactina sérica	-	↓	N	-	↓	N
17β-Estradiol	-	-	↑	-	-	↑
Lactose (leite)	N	-	-	↓	-	-
Proteína (leite)	↓	-	-	↓	-	-
<b>21 dias</b>						
Massa corporal	N	N	N	N	↓	↓
Gordura corporal	↑	N	N	N	↓	↓
Proteína corporal	N	N	N	N	↑	N
Água corporal	↓	N	N	N	N	N
Mineral corporal	N	N	N	↓	N	N
Massa de gordura visceral	N	N	N	N	N	N
Consumo de ALA	N	N	N	↑	N	N
Triglicerídeos séricos	N	↓	N	↓	↓	N
Colesterol total sérico	N	N	N	N	N	N
Prolactina sérica	↑	N	N	↑	N	N
17β-Estradiol	N	-	N	N	-	N

N= normal. Resultados vs C



## 5 CONCLUSÕES

O uso de dois componentes importantes da semente de linhaça pelas mães durante a lactação produziu alterações no metabolismo materno que são mais evidentes para o grupo OLSDG e que apresentam em comum a hiperprolactinemia. Os efeitos sobre a prole são mais evidentes no grupo OLSDG e mais acentuados nos machos que nas fêmeas. Ocorre uma diminuição de massa e gordura corporal tanto nos machos quanto nas fêmeas, assim como dos triglicérides séricos ao desmame e da prolactinemia aos 14 dias somente nos machos.

Desta forma, caracterizamos que a linhaça apresenta compostos bioativos que podem modificar funções importantes no período de lactação, acentuadamente nos machos. Porém deve se atentar para o inexplicável aumento do colesterol e triglicéridos nas fêmeas e de triglicérides, nos machos aos 14 dias de idade.

## REFERÊNCIAS

- ACEITES & GRASAS. Lino, una oleaginosa con historia. *Aceites & Grasas*, v. 38, p. 59-72, 2000.
- ACKERMAN, G. E. et al. Potentiation of epinephrine-induced lipolysis by catechol estrogens and their methoxy derivatives. *Endocrinology*, v. 109, p. 2084–2088, 1981.
- ANDERSON, L. A. et al. The effects of androgens and estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: influence of gender and site. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, v. 86, p. 5045–5051, 2001.
- ARBOGAST, L. A.; VOOGT, J. L. Hyperprolactinemia increases and hypoprolactinemia decreases tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nuclei, but not the substantia nigra or zona incerta. *Endocrinology*, v.128, p. 997–1005, 1991.
- BARRE D. E. et al. High dose flaxseed oil supplementation may affect fasting blood serum glucose management in human type 2 diabetics. *Journal of Oleo Science*, v. 57, n. 5, p. 269-273, 2008.
- BEGG, D.P. et al. Hypertension induced by omega-3 polyunsaturated fatty acid deficiency is alleviated by alpha-linolenic acid regardless of dietary source. *Hypertension Research*. v.,33, n. 8, p. 808-13, 2010.
- BENASSAYAG, C.; PERROT-APPLANT, M.; FERRE, F. Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. *Journal of Chromatograph B*, v. 777, p. 233-248, 2002.
- BHATHENA, S. J. et al. Dietary flaxseed meal is more protective than soy protein concentrate against hypertriglyceridemia and steatosis of the liver in an animal model of obesity. *Journal of American College of Nutrition*, v. 22, p. 157–164, 2003.
- BJORNTORP, P. The regulation of adipose tissue distribution in humans. *International Journal of Obesity and Related Metabolism Disorders*, v. 20, p. 291–302, 1996.
- BUTTE, N. F. et al. Body composition during the first 2 years of life: an updated reference. *Pediatric Research*, v. 47, p. 578–585, 2000.
- CASABIELL, X. et al. Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 83, p. 2149–2155, 1998.
- CATERSON I.; GILL T. Obesity: epidemiology and possible prevention. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology Metabolism*, v. 16, n.4, p. 595-610, 2002.

CARTER, J. F. Potential effects of flaxseed and flaxseed oil in baked goods and other products in human nutrition. *Cereal Foods World*, v. 38, n. 10, p. 753 – 759, 1993.

CHUMLEA, W. C. et al. Size and number of adipocytes and measures of body fat in boys and girls 10 to 18 years of age. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 34, p. 1791–1797, 1981.

COOKE, P. S.; NAAZ, A. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Experimental and Biological Medicine*, v. 229, p. 1127–1135, 2004.

CORTRIGHT, R. N. et al. Daily exercise reduces fat, protein and body mass in male but not female rats. *Physiological Behavior*, v. 62, p. 105–111, 1997.

CRAIG, W. J. Health-promoting properties of common herbs. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 70 (suppl.), p. 491S–499S, 1999.

CUNNANE, S. C. et al. High alpha-linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. *British Journal of Nutrition*, v. 69, p. 443–453, 1993.

DANG, Z. C. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 962–967, 2003.

DANG, Z. C. et al. Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis. *Journal of Bone Minerals Research*, v. 17, p. 394–405, 2002.

DIEUDONNE, M. N. et al. Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *Endocrinology*, v. 141, p. 649–656, 2000.

ERB, R.; SITARZ, N.; MALVEN, P. Blood plasma and milk prolactin, and effects of sampling technique on composition of milk from suckled ewes. *Journal of Dairy Science*, v. 60, p. 157-203, 1977.

FAGUNDES, A. T. S. et al. Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *British Journal of Nutrition*, 2007.

FELMLEE, M. A. et al. Effects of the flaxseed lignans secoisolariciresinol diglucoside and its aglycone on serum and hepatic lipids in hyperlipidaemic rats. *British Journal of Nutrition*, n. 102, v. 03, p. 361-9, 2009.

FERNANDO-WARMAKULASURIYA, G. J. P. et al. Studies on fat digestion, absorption, and transport in the suckling rat. 1. Fatty acid composition and content ratios of major lipid components. *Journal of Lipids Research*, v. 22, p. 668-674, 1981.

- FIGUEIREDO, M. S. et al. Flaxseed supplementation of rats during lactation changes the adiposity and glucose homeostasis of their offspring. *Life Sciences* 85, p. 365–371, 2009.
- FLINT, D. J. et al. Developmental aspects of adipose tissue in GH receptor and prolactin receptor gene disrupted mice: site-specific effects upon proliferation, differentiation and hormone sensitivity. *Journal of Endocrinology*, v. 191, p. 101–111, 2006.
- FORMIGUERA, X.; CANTÓN, A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, v. 18, n.6, p. 1125-1146, 2004.
- FRENK, J. et al. Health transition in middle-income countries: new challenges for health care. *Health Policy Plann*, v. 4, p. 29–39 1989.
- FUKUMITSU, S. et al. Flaxseed lignan lowers blood cholesterol and decreases liver disease risk factors in moderately hypercholesterolemic men. *Nutr Res*. n.30, v. 7, p. 441-446, 2010.
- GRATTAN, D. R.; KOKAY, I. C. Prolactin: A Pleiotropic Neuroendocrine Hormone. *Journal of Neuroendocrinology*,v.20, p.752-763, 2008.
- GULSHAN, S.; McCRUDEN, A. B.; STIMSON, W. H. Oestrogen receptors in macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 31, p. 691–697, 1990.
- HAMOSH, M.; HAMOSH, P. The effect of estrogen on the lipoprotein lipase activity of rat adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, v. 55, p. 1132–1135, 1975.
- HARPER, C. R. et al. Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty acids in Humans. *Journal of Nutrition*, v. 136, p. 83–87, 2006.
- HARMON, A. W.; HARP, J. B. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*, v. 280, p. C807–C813, 2001.
- HEBER, D. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. *Journal of Postgraduate Medicine*, v.50, p. 145-149, 2004.
- HEDELIN, M. et al. Dietary phytoestrogen, serum enterolactone and risk of prostate cancer: the Cancer Prostate Sweden Study (Sweden). *Cancer Causes Control*, v. 17, p. 169-180, 2006.
- HEIM, M. et al. The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology*, v. 145, p. 848–859, 2004.
- HEINE, P. A. et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, v. 97, p. 12729–12734, 2000.

- LEA-CURRIE, Y. R.; MONROE, D.; McINTOSH, M. K. Dehydroepiandrosterone and related steroids alter 3T3-L1 preadipocyte proliferation and differentiation. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, v. 123, p. 17–25, 1999.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n.1, p. 265 - 75, 1951.
- MARTIN, J. H. J. et al. Does an apple a day keep the doctor away because a phytoestrogen a day keeps the virus at bay? A review of the anti-viral properties of phytoestrogens. *Phytochemistry*, v. 68, p. 266-274, 2007.
- MISSO, M. L. et al. Cellular and molecular characterization of the adipose phenotype of the aromatase-deficient mouse. *Endocrinology*, v. 144, p. 1474–1480, 2003.
- MOHAMED, M. K.; ABDEL- RAHMAN, A. A. Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *European Journal of Endocrinology*, v. 142, p. 307–314, 2000.
- MORRIS, D. H. Flax – A health and nutrition primer. 4<sup>a</sup> ed, 2007. Disponível em:< <http://www.flaxcouncil.ca/english/index.jsp?p=primer&mp=nutrition>>. Acesso: 20 jan 2010.
- NAAZ, A. et al. The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinol*, v. 144, p. 3315–3320, 2003.
- NAAZ, A. et al. Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ERalpha): a potential role for estrogen receptor beta (ERbeta). *Hormone Metabolism Research*, v. 34, p. 758–763, 2002.
- NOGOWSKI, L. et al. Genistein-induced changes in lipid metabolism of ovariectomized rats. *Ann Nutr Metab*, v. 42, p. 360–366, 1998.
- OOMAH, B. D., MAZZA, G. Flaxseed proteins—a review. *Food Chemistry*, v. 48, n. 2, p. 109 – 114, 1993.
- OKAZAKI, R. et al. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology*, v. 143, p. 2349–2356, 2002.
- PALIN, S. L. et al. 17Beta-estradiol and anti-estrogen ICI: compound 182,780 regulate expression of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in isolated subcutaneous abdominal adipocytes. *Metabolism*, v. 52, p. 383–388, 2003.
- PAN, A. et al. Effects of a flaxseed-derived lignan supplement in type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, cross-over trial. *Plos One*, v. 2, n.11, p.1148-1154, 2008.
- PASSOS, M. C. F.; RAMOS, C. F.; MOURA, E. G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutrition Research*, v. 20, n. 11, p. 1603-1612, 2000.

PEDERSEN, S. B. et al. Nuclear estradiol binding in rat adipocytes. Regional variations and regulatory influences of hormones. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1093, p. 80–86, 1991.

PERDERSEN, S. B. et al. Demonstration of estrogen receptor subtypes alpha and beta in human adipose tissue: influences of adipose cell differentiation and fat depot localization. *Molecular Cell Endocrinology*, v. 182, p. 27–37, 2001.

PEDERSEN, S. B. et al. Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha<sub>2</sub>adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution. *Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism*, v. 89, p. 1869–1878, 2004.

PORTER, M. H. et al. Sexual dimorphism in the response of adipose mass and cellularity to graded caloric restriction. *Obesity Research*, v. 12, p. 131–140, 2004.

PRASAD, K. Natural products in regression and slowing of progression of atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. V. 11, n. 8, p. 794-800, 2010.

PRASAD, K. Secoisolariciresinol from flaxseed delays the development of type 2 diabetes in Zucker rats. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 138, p. 32-39, 2001.

RACHÓN, D. et al. Effects of dietary equol on the pituitary of the ovariectomized rats. *Hormone Metabolism Res.*, v. 39, n.4, p.256-261, 2007.

RANA, J. S. et al. Cardiovascular metabolic syndrome – an interplay of, obesity, inflammation, diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Obesity and Metabolism*, v. 9, p. 218–232, 2007.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *Journal of Nutrition*, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

RUHLEN, R. et al. Low phytoestrogen levels in feed increase fetal serum estradiol resulting in the “fetal estrogenization syndrome” and obesity in cd-1 mice. *Environmental Health Perspective*, v. 116, n. 3, p. 2008.

RONCARI, D. A; VAN, R. L. Promotion of human adipocyte precursor replication by 17beta-estradiol in culture. *Journal of Clinical Investigation*, v. 62, p. 503–508, 1978.

Sato, M., Rippey, M. K., Bryant, H. U. Raloxifene, tamoxifen, nafoxidine, or estrogen effects on reproductive and nonreproductive tissues in ovariectomized rats. *FASEB J*, v. 10, p. 905–912, 1996.

STANBIE, D. et al. Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of acids synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxylase and pyruvate

dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. *Biochemical Journal*, v. 160, p. 413-6, 1997.

STAUFFER, C. E. A linear standard curve for the Folin Lowry determination of protein. *Analytical Biochemistry*, v.69, p.646-648, 1975.

SZKUDELSKA, K.; NOGOWSKI, L.; SZUDELSKI, T. Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 75, p. 265–271, 2000.

TANAKA, M. et al. Effects of estrogen on serum leptin levels and leptin mRNA expression in adipose tissue in rats. *Hormone Research*, v. 56, p. 98–104, 2001.

TAYLOR, C. G. et al. Dietary milled flaxseed and flaxseed oil improve N-3 fatty acid status and do not affect glycemic control in individuals with well-controlled type 2 diabetes. *Journal of American College of Nutrition*, v. 29, n. 1, p. 72-80, 2010.

TAYLOR, R. W. et al. Body fat percentages measured by dual-energy X-ray absorptiometry corresponding to recently recommended body mass index cutoffs for overweight and obesity in children and adolescents aged 3–18 y. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 76, p. 1416–1421, 2002.

TOSTE, F. P. et al. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *British Journal of Nutrition*, v. 95, p. 830-837, 2006.

TOU, J. C. L.; CHEN, J.; THOMPSON, L. U. Flaxseed and its lignan precursor, secoisolariciresinol diglycoside, affect pregnancy outcome and reproductive development in rats. *Journal of Nutrition*, v. 128, p. 1861-1868, 1998.

TOU, J. C. L.; CHEN, J.; THOMPSON, L. U. Dose, timing, and duration of flaxseed exposure affect reproductive indices and sex hormones levels in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 56, p. 555 – 570, 1999.

TOUILLAUD, M. S. et al. Dietary lignan intake and postmenopausal breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 99, p. 475-486, 2007.

TROINA, A. A. et al. Maternal flaxseed diet during lactation alters milk composition and programs the offspring body composition, lipid profile and sexual function. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 697–703, 2010.

VENKOV, C. D.; RANKIN, A. B.; VAUGHAN, D. E. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation*, v. 94, p. 727–733, 1996.

WADE, G. N.; GRAY, J. M. Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiol Behav*, v. 22, p. 583–593, 1979.

WADE, G. N.; GRAY, J. M.; BARTNESS, T. J. Gonadal influences on adiposity. *International Journal of Obesity*, v. 9 (Suppl 1), p. 83–92, 1985.

WARD, W. E.; CHEN, J.; THOMPSON, L. U. Exposure to flaxseed or its purified lignan during suckling only or continuously does not alter reproductive indices in male and female offspring. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 64, p. 567 – 577, 2001.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, p. v. 27, p. 1047–1053, 2004.

WU, J. et al. Combined intervention of soy isoflavone and moderate exercise prevents body fat elevation and bone loss in ovariectomized mice. *Metabolism*, v. 53, p. 942–948, 2004.

ZHANG, W. et al. Dietary flaxseed lignan extract lowers plasma cholesterol and glucose concentrations in hypercholesterolaemic subjects. *British Journal of Nutrition*, v. 99, p. 1301–1309, 2008.