

Efeitos do tratamento intramuscular por quinze dias com óleo de linhaça sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratos

Dieli Oliveira Nunes

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Maio de 2014



**Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

Parecer Final da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado

A mestranda **Dieli de Oliveira Nunes**, sob orientação da Profa. Dra. Alessandra Simão Padilha e co-orientação do Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo, encaminhou a dissertação de mestrado intitulada “**Efeitos do tratamento intramuscular por quinze dias com óleo de linhaça sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratos**” à Comissão Julgadora composta pelo examinador externo Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira e o examinador interno Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo. A Dissertação de Mestrado foi cuidadosamente analisada e cada avaliador emitiu um parecer sobre o trabalho executado pela candidata. A candidata, com a concordância de sua orientadora, acatou todas as alterações propostas pelos avaliadores, reapresentando uma nova versão da Dissertação de Mestrado.

Diante do exposto acima, a Comissão Julgadora considera a candidata aprovada e, portanto, fazendo jus à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 02 de Maio de 2014

Prof. Dr. MARCELO PERIM BALDO

Presidente da Comissão Julgadora - Programa
de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Prof^ª. Dr^ª. IVANITA STEFANON

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas

Nunes, Dieli Oliveira 1989

Efeitos do tratamento intramuscular por quinze dias com óleo de linhaça sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratos [Vitória] 2014

106pp, 29,7cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2014)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Simão Padilha

1. Ômega-3 2. Óleo de linhaça 3. Intramuscular 4. Aorta 5. Reatividade vascular
6. Estresse oxidativo

Àqueles que me apoiam e me encorajam sempre.

Meus pais, meu irmão e Fabio.

“Não devemos jamais nos deixar limitar por princípios já testados e consagrados. Mas ao contrário, respeitando-os e partindo deles devemos procurar criar novos caminhos, descobrir novas estradas e ultrapassar os conhecimentos já estabelecidos.”

Ivo Pitanguy

AGRADECIMENTOS

Agradeço, sobretudo a Deus, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos e, por tornar tudo isso possível.

Aos meus pais, por todas as abdições em função de minhas necessidades. Pai e mãe, obrigada pela confiança e apoio incondicional sempre.

Ao meu irmão, sempre disponível para me amparar com seu carinho e atenção indescritível. Irmão, obrigada pelos conselhos e conversas enriquecedoras.

Ao meu amor, Fabio, por abraçar meus planos como os seus, pela paciência, compreensão, incentivo e disponibilidade sempre. Amor, obrigada por me acalantar nos momentos difícil e me apoiar com seu jeito incomparável. Você foi fundamental para a conquista de mais uma etapa.

À Penha Caus, que sempre me acolheu com tanto carinho. Minha sogra querida, obrigada pela atenção e preocupação ao longo de toda esta caminhada.

À Prof^a. Dr^a. Alessandra, idealizadora deste projeto, por ter aberto as portas e me aceitado como sua aluna. Alê, agradeço pela oportunidade, acolhimento, orientação, paciência e confiança.

Ao Prof. Dr. Dalton, pela atenção e disponibilidade. Chefe, obrigada pelas valiosas dicas, alegria contagiante, co-orientação e conhecimento compartilhado, fundamentais para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Ivanita e ao Prof. Dr. Leonardo, pelos momentos de aprendizado e convívio no decorrer desses dois anos.

Aos meus “irmãos” de laboratório. Marito, meu amigo, obrigada por estar tão presente e por me ouvir sempre. Gilson, obrigada pela atenção e dedicação sempre que precisei. E Camila, não tenho palavras para descrever o quanto foi importante ao longo desses dois anos, obrigada pela paciência, preocupação e por compartilhar seu conhecimento adquirido comigo. Grande parte dessa

conquista foi graças a sua atenção e dedicação gratuita, que jamais hesitou em me ajudar. Meus sinceros agradecimentos.

A grande família LEMC: Aliny, Bruna Marchezini, Carolina, Cindy, Daniele, David, Emilia, Emilly, Fabiana Simões, Fabiana Siman, Fernanda Calazans, Gérsica, João Vitor, Lorena, Mirian, Paula, Rodrigo, Rogério, Samya, Tatiani, Teresa, Thiago, Vinícius e Keli. Cada um, ao seu modo, deixou sua marca pelo meu caminho trilhado dentro do laboratório.

Aos colegas de outros laboratórios, que juntos compartilhamos muitos momentos de preocupação e alegria no decorrer das disciplinas e nos esbarrões pelos corredores.

À Priscila, pelo apoio e incentivo fundamentais para o meu ingresso na pós-graduação.

À Jonaina, Bruna e Edna, por todo o carinho, caronas e conversas. Jô, obrigada por me ensinar e me ajudar com o experimento do DHE, com toda sua paciência impecável.

À Thaís, por toda atenção, carinho e preocupação. Thá, obrigada, principalmente, pela disponibilidade para os dados bioquímicos.

À Maylla, pela paciência e tempo concedido para me ensinar o protocolo de MDA.

À Karolini, minha amiga, por todos os momentos que juntas passamos, sempre disposta a ajudar, com esse seu jeito “energizante” de ser. Você é demais!

Ao Prof. Dr. Fausto e Prof. Dr. Marcelo, por aceitarem fazer parte da banca avaliadora.

Ao Fernando, pela boa vontade para realizar as análises de proteína C-reativa.

Aos funcionários e professores do Programa, pela prontidão e ensinamentos compartilhados.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
1.1 LINHAÇA	26
1.1.1 Ácidos Graxos Poliinsaturados	26
1.1.2 Biossíntese dos Ácidos Graxos Poliinsaturados	29
1.1.3 Efeito do Óleo de Linhaça nos Processos Inflamatórios	32
1.1.4 Efeito da Linhaça no Sistema Cardiovascular	33
2 JUSTIFICATIVA	37
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	39
4.1.1 Modelo Experimental	39
4.2 METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA	40
4.2.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)	41
4.2.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio	42
4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	43
4.3.1 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina	43
4.3.2 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina	43
4.3.3 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a resposta de relaxamento dependente do endotélio	43
4.3.4 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a resposta de relaxamento independente do endotélio	44

4.3.5 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos na exposição por quinze dias com óleo de linhaça sobre a resposta à fenilefrina na aorta.....	44
4.3.5.1 Influência do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a via do óxido nítrico.....	45
4.3.5.2 Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre resposta contrátil à fenilefrina após tratamento com óleo de linhaça por quinze dias	45
4.3.5.3 Envolvimentos dos radicais livres sobre resposta contrátil à fenilefrina após tratamento com óleo de linhaça por quinze dias	45
4.4 ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTÉICA.....	46
4.4.1 Western Blot para detecção da isoforma da COX-2	46
4.4.2 Preparação do tecido e quantificação das proteínas	46
4.4.3 Eletroforese e transferência das amostras	46
4.4.4 Incubação com Anticorpos	47
4.4.5 Detecção das Proteínas	48
4.5 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO <i>IN SITU</i> ...	48
4.5.1 Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetideo (DHE)	48
4.6 MEDIDA DE PRODUÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NO PLASMA ...	49
4.7 MEDIDA DE PROTEÍNA C-REATIVA.....	49
4.8 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
4.9 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS	51
5 RESULTADOS.....	53
5.1 VALORES DE MASSA CORPORAL.....	53
5.2 EFEITO DO TRATAMENTO POR QUINZE DIAS COM O ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS	53
5.3 EFEITO DO TRATAMENTO POR QUINZE DIAS COM O ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	54

5.4 EFEITO DO TRATAMENTO POR QUINZE DIAS COM O ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	55
5.5 MODULAÇÃO ENDOTELIAL NO TRATAMENTO POR QUINZE DIAS COM O ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS	56
5.6 EFEITO DOS FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO TRATAMENTO POR QUINZE DIAS COM O ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	59
5.6.1 Participação da via do óxido nítrico no tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica	59
5.6.2 Participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxygenase (COX) no tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica	61
5.6.2.1 Expressão proteica da isoforma constitutiva da ciclooxygenase-2 (COX-2)	65
5.6.3 Participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) no tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica	66
5.6.3.1 Quantificação da produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) <i>in situ</i> através da fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio (DHE).....	69
5.7 EFEITO DO TRATAMENTO COM ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE O STRESSE	70
OXIDATIVO PLASMÁTICOS E PARÂMETRO INFLAMATÓRIO	70
6 DISCUSSÃO	71
6.1 EFEITO DO ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA.....	71
6.2 EFEITO DO TRATAMENTO DO ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE A MODULAÇÃO ENDOTELIAL.....	73

6.3 FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA.....	77
6.3.1 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a via do Óxido Nítrico	77
6.3.2 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a via dos prostanóides derivados da ciclooxigenase.....	79
6.3.3 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a via dos radicais livres.....	83
6.3.4 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre o estresse oxidativo plasmático e parâmetro inflamatório	85
6.4 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS.....	88
7 CONCLUSÃO	89
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e Sensibilidade (pD_2) das curvas de concentrao-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta dos grupos Controle e Óleo de Linhaa.....54
- Tabela 2:** Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas de relaxamento induzidos pela acetilcolina em aorta de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaa55
- Tabela 3:** Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas de relaxamento induzidos pelo nitroprussiato de sódio em aorta de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaa.....56
- Tabela 4:** Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentrao-resposta à fenilefrina em anéis com e sem endotélio (E-) dos grupos Controle e Óleo de Linhaa.....58
- Tabela 5:** Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentrao-resposta à fenilefrina na presena ou no de L-NAME em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Óleo de Linhaa60
- Tabela 6:** Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentrao-resposta à fenilefrina na presena ou no de Indometacina em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Óleo de Linhaa.....63
- Tabela 7:** Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentrao-resposta à fenilefrina na presena ou no de NS 398; Furegrelato; SQ 29,548 e Dexametasona em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Óleo de Linhaa63

Tabela 8: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de Apocinina; Tiron e Catalase em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura dos PUFA n-3 e n-6.27
- Figura 2:** Representação esquemática da via de biossíntese dos ácidos graxos poliinsaturados.30
- Figura 3:** (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (Angeli, 2009).40
- Figura 4:** Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular in vitro.41
- Figura 5:** Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1.3g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina (Fe) 10^{-6} M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical (modificado de Dias, 2007).42
- Figura 6:** Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10^{-10} a 3×10^{-4} M) (Angeli, 2009).44

Figura 7: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça, após quinze dias de tratamento. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM. Teste t- t-Student não pareado, * $p < 0.05$ vs Controle.54

Figura 8: Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça, após quinze dias de tratamento. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM. Teste t-S Student não pareado, $p > 0.05$55

Figura 9: Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça, após quinze dias de tratamento. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EP EPM. Teste t-Student não pareado, $p > 0.05$. .56

Figura 10: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos: (A) Controle e após a retirada do endotélio (E-); (B) Óleo de Linhaça e após a retirada do endotélio (E-); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo entre os grupos. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não pareado. * $p < 0.05$ para pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$57

Figura 11: Curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle na ausência do endotélio (E-) e Óleo de Linhaça na ausência do endotélio (E-). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não pareado. $p > 0.05$ para pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$58

Figura 12: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de L-NAME em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Óleo de Linhaça (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não de L-NAME (C). O número de animais está demonstrado entre

parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não pareado. * $p < 0.05$ para pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$60

Figura 13: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de Indometacina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Óleo de Linhaça (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não de Indometacina (C). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não pareado. * $p < 0.05$ vs pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$ para Controle, # $p < 0.05$ vs pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$ para Óleo de Linhaça.....62

Figura 14: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de NS 398 (A e B); Furegrelato (C e D); SQ 29, 548 (E e F) e Dexametasona (G e H) em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não pareado. * $p < 0.05$ vs pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$ para Óleo de Linhaça.....64

Figura 15: Resultados da expressão proteica da isoforma da COX-2, por meio da técnica de Western Blot, em arcos aórticos dos grupos Controle (n= 6) e Óleo de Linhaça (n= 6). Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica, correspondendo a isoforma da COX-2 e a beta-actina. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, entre a densidade das bandas da COX-2 e da β -actina. Teste t-Student não pareado, * $p < 0,05$65

Figura 16: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de Apocinina (A e B); Tiron (C e D) e Catalase (E e F) em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não pareado. * $p < 0.05$ vs pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$ para Óleo de Linhaça.....67

Figura 17: Imagens de micrografia representam a fluorescência emitida por dihidroetídio em.....69

Figura 18: Medida da produção de MDA plasmática e proteína C-reativa de ratos do grupo Controle e Óleo de Linhaça. Dados estão expressos em média \pm EPM; Teste t-Student não pareado. $p > 0.05$70

Figura 19: Disfunção endotelial: alteração considerada precursora das doenças cardiovasculares. As flechas pontilhadas indicam diminuição da secreção, enquanto as flechas espessas indicam aumento da secreção (Rattmman, 2009).73

Figura 20: Fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio vascular. São três as principais vias endoteliais que geram a vasodilatação: a via da prostaciclina (PGI_2), a via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS, e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Dependendo do tipo de vaso, todas estas vias podem ser ativadas após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de sinalização ocorra o aumento da concentração intracelular do Ca^{2+} . Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Após a liberação pelas células endoteliais, estes mediadores exercem suas ações nas células musculares lisas, através da produção dos segundo mensageiros AMPc ou GMPc, ou ainda através da hiperpolarização (Rattmman, 2009).74

Figura 21: Sumarização esquemática dos resultados obtidos no presente estudo. O tratamento i.m. com óleo de linhaça foi capaz de aumentar a atividade da enzima PLA_2 culminando no aumento de prostanóides vasoconstritores derivados da COX-2, especialmente o TXA_2 (Davidge, 2001). Além disso, o tratamento provocou aumento da participação da NADPH oxidase, o que contribuiu para o aumento de $O_2^{\bullet-}$ (Weseler and Bast, 2010). Uma vez que a COX-2 está ativa, seus derivados podem modular a biodisponibilidade de $O_2^{\bullet-}$ por afetar a NADPH oxidase e vice-versa (Martínez-Revelles et al., 2013), acarretando em estresse oxidativo. Todos estes efeitos em conjunto influenciam no aumento da reatividade vascular.88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

%dAUC: Porcentagem da diferença da AUC

•OH: Radical hidroxila

AA: Ácido araquidônico

ACh: Acetilcolina

ALA: Ácido α -linolênico

ATP: 5'-trifosfato de adenosina

AUC: Áreas abaixo da curva

BH₄: Tetrahydrobiopterina

BK: Bradicinina

COX: Ciclooxigenase

COX: Enzima ciclooxigenase

DAG: Diacilglicerol

dAUC: Diferenças das áreas abaixo das curvas

DCV: Doenças cardiovasculares

DHA: Ácido Docosaheptaenóico

E-: Endotélio removido mecanicamente

E+: Endotélio íntegro

EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDRFs: Fatores relaxantes derivados do endotélio

eNOS: Isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico

EPA: Ácido eicosapentaenóico

EPM: Erro padrão da média

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

ET-1: Endotelina-1

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

Fe: Fenilefrina

FMN: Flavina mononucleotídeo

GCs: Guanilato ciclase solúvel

GMPc: 3,5 – monofosfato cíclico de guanosina

GPx: Glutadiona peroxidase

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HDL: Lipoproteína de alta densidade

i.m.: Intramuscular

i.p.: Intraperitoneal

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

iNOS: Isoforma induzível da sintase de óxido nítrico

IP3: 1,4,5 – inositol trifosfato

KCl: Cloreto de potássio

LA: Ácido linoléico

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

L-NAME: NG-nitro-L-arginina metil éster

LOX: Enzima lipoxigenase

LTB₄: Leucotrienos B₄

LTB₅: Leucotrienos B₅

MDA: Malondialdeído

MLV: Músculo liso vascular

n-3: Ômega-3

n-6: Ômega-6

NADPH: Adenina dinucleotídeo fosfato

nNOS: Isoforma neuronal da sintase de óxido nítrico

NO: Óxido nítrico

NPS: Nitroprussiato de sódio

$O_2^{\cdot-}$: Ânion superóxido

$ONOO^-$: Peróxido de nitrito

PA: Pressão arterial

pD_2 : Sensibilidade

PGE_2 : Prostaglandina E_2

$PGF_{2\alpha}$: Prostaglandina $F_{2\alpha}$

PGH_2 : Prostaglandina H_2

PGI_2 : Prostaciclina 2

PGI_3 : Prostaciclina 3

PIP_2 : Fosfatidilinositol bifostato

PKG: Proteína quinase G

PLA_2 : Enzima fosfolipase A_2

PLC: Fosfolipase C

PUFA: Ácido graxo poliinsaturado

Receptor TP: Receptor de Tromboxano

$R_{m\acute{a}x}$: Resposta máxima

SOD: Superóxido dismutase

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TXA_2 : Tromboxano A_2

TXA_3 : Tromboxano A_3

VCAM-1: Molécula de adesão celular vascular-1

RESUMO

Alguns óleos vegetais são fontes alternativas de ácido graxo poliinsaturado ômega-3, com destaque para o óleo de linhaça por apresentar maior concentração de ácido graxo ômega-3 na forma de ácido α -linolênico dentre as sementes vegetais. Intervenção nutricional, com o aumento da ingestão de ácidos graxos ômega-3, tem sido considerado como uma estratégia eficaz para prevenir ou reduzir os fatores de risco das doenças cardiovasculares. Embora o óleo de linhaça possa exercer efeitos cardiovasculares benéficos, o mecanismo de ação vascular ainda não é bem conhecido. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do tratamento intramuscular por quinze dias com óleo de linhaça sobre a função vascular em anéis isolados de aorta de ratos. Os animais foram tratados diariamente (0.1mL, i.m.) com óleo de linhaça ou óleo mineral (grupo controle) durante quinze dias. Ao final do tratamento, os ratos foram anestesiados e, amostras de plasma e de soro foram coletadas e armazenadas a -80°C até serem utilizadas para avaliar malondialdeído e proteína C-reativa, respectivamente. A aorta torácica foi utilizada para se avaliar a expressão proteica da isoforma endotelial da ciclooxigenase-2, produção *in situ* de ânion superóxido e também, para os experimentos de reatividade vascular. Tratamento (i.m.) com óleo de linhaça aumentou a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta sem alterar a resposta vasodilatadora dependente ou independente do endotélio. A remoção do endotélio ou a incubação com L-NAME aumentaram a resposta à fenilefrina tanto no grupo tratado quando no controle, porém esse efeito foi similar em ambos os grupos. A incubação com indometacina ($10\ \mu\text{M}$), inibidor não específico da ciclooxigenase; NS 398 ($1\ \mu\text{M}$), inibidor específico da ciclooxigenase-2 (COX-2); SQ 29,548 ($1\ \mu\text{M}$), antagonista do receptor TP - receptor do tromboxano A_2 ; furegrelato ($1\ \mu\text{M}$) inibidor da síntese do tromboxano A_2 ; e dexametasona ($1\ \mu\text{M}$) inibidor da fosfolipase A_2 , apocinina ($10\ \mu\text{M}$), um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase; tiron ($1\ \text{mM}$), um “varredor” não-enzimático de ânion superóxido, reverteu parcialmente os efeitos induzidos pelo óleo de linhaça sobre a reatividade à fenilefrina. Além disso, este tratamento aumentou a produção basal de ânion superóxido e a expressão proteica da COX-2 no grupo tratado com óleo de linhaça comparado ao controle. No entanto, não

foi observado alterações nos níveis plasmáticos de malondialdeído e proteína C-reativa no soro. Estes achados sugerem que as alterações na resposta contrátil à fenilefrina observadas nos animais expostos ao óleo de linhaça estão associadas a maior liberação de prostanóides vasoconstritores derivados da COX-2, especialmente o tromboxano A₂, e ao aumento das espécies reativas de oxigênio, com destaque para os ânion superóxidos via NADPH oxidase, culminando em estresse oxidativo. Dessa forma, este estudo fornece uma nova visão sobre os efeitos do tratamento (i.m.) com óleo de linhaça sobre a função vascular.

Palavras-chave: Ômega-3, óleo de linhaça, intramuscular, aorta, reatividade vascular, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Some vegetable oils are alternative sources of polyunsaturated fatty acid omega-3, especially flaxseed oil, which have the highest concentration of omega-3 α -linolenic acid among vegetable seeds. Nutritional intervention, such as the increased ingestion of omega-3 fatty acids, has been considered as an effective strategy to prevent or reduce the risk factors of cardiovascular disease. Although flaxseed oil might have beneficial cardiovascular effects, the mechanism of vascular function is unclear. Therefore, we proposed to evaluate the effects of intramuscular treatment with flaxseed oil on vascular function in isolated rat aortic rings. Wistar rats were treated daily with flaxseed oil (0.1 mL, i.m.) or a control (0.1 mL mineral oil i.m.), for fifteen days. At the end of treatment, the rats were anesthetized and the plasma and serum samples were collected and stored at -80 °C until malondialdehyde and C-reactive protein analysis, respectively. Isolated aortic segments were used to evaluate the protein expression of cyclooxygenase-2, superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) levels and vascular reactivity experiments. Flaxseed oil treatment (i.m.) increased the vasoconstrictor response to phenylephrine without changing acetylcholine or sodium nitroprusside vasodilators responses in aortic rings. Endothelium removal or incubation with L-NAME increased the response to phenylephrine in isolated aortic rings of controls and treated-rats, but these effects were similar in both groups. Incubation with indomethacin (10 mM), a non-selective cyclooxygenase inhibitor; NS 398 (1 mM), a cyclooxygenase-2 inhibitor; SQ 29.548 (1 mM), a TP receptor antagonist; furegrelate (1 mM), a thromboxane A_2 synthase inhibitor; dexamethasone (1 mM), an inhibitor phospholipase A_2 ; tiron (1 mM), a superoxide anion scavenger; and apocynin (10 mM), an NADPH oxidase inhibitor, partially reversed the flaxseed oil-induced increased reactivity to phenylephrine. In addition, this treatment increased the basal superoxide anion production and protein expression of cyclooxygenase-2 in the flaxseed oil group as compared to the control. However, no significant differences in plasma levels of malondialdehyde and C-reactive protein in serum. These findings suggest that changes in the contractile response to phenylephrine observed in animals exposed to flaxseed oil are associated with increased release of vasoconstrictor prostanoids derived from COX-2, especially TXA_2 , and increased reactive oxygen species, especially the superoxide anion via NADPH oxidase, resulting in oxidative

stress. Thus, this study provides new insight into the effects of treatment (i.m.) with flaxseed oil on vascular function.

Keywords: Omega-3, flaxseed oil, intramuscular, aorta, vascular reactivity, oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

1.1 LINHAÇA

De origem asiática, a semente de linhaça é obtida a partir do linho (*Linum usitatissimum* L.), uma das plantas mais antigas da história da humanidade (Oomah, 2001). Atualmente, o maior produtor mundial é o Canadá, sendo que no Brasil o cultivo de linhaça se concentra no Rio Grande do Sul (Rubilar et al., 2010; Soares et al., 2009). A planta da linhaça é aproveitada pela indústria em quase sua totalidade, seu caule é utilizado para a produção de linho, tecido utilizado para a produção de roupas e da sua semente se extrai o óleo (Soares et al., 2009).

Existem duas variedades de semente de linhaça, dourada e marrom, que se assemelham em sua composição de nutrientes, sendo a pigmentação influenciada pelas técnicas de plantio e o clima da região de reprodução (Morris, 2003). O grão contém em torno de 41% de gordura, 28% de fibra dietética, 21% de proteína, além de minerais, vitaminas, carboidratos, e fitoestrógeno, denominado lignana (Morris, 2003). No entanto, o óleo de linhaça difere do grão integral, por ser destituído, por exemplo, de fibras e lignanas (Bloedon et al., 2008), e por ser rico em ácido graxo poliinsaturado (PUFA), com 73% de ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6), sendo 57% de ácido α -linolênico (ALA) e 16% de ácido linoléico (LA), respectivamente; 18% de ácido graxo monoinsaturado e 9% de ácido graxo saturado (Ganorkar and Jain, 2013; Morris, 2001). Entre os principais óleos extraídos de sementes, o óleo de linhaça se destaca pela maior concentração de PUFA n-3 na forma de ácido α -linolênico (Devarshi et al., 2013; Simopoulos, 2000).

1.1.1 Ácidos Graxos Poliinsaturados

Os PUFA, assim chamados por conterem duas ou mais insaturações, são considerados essenciais para o organismo humano, sendo sua presença

obrigatória na dieta. São representados por duas classes que se diferenciam na posição da primeira dupla ligação, ocorrendo no terceiro ou no sexto átomo de carbono a partir do carbono metílico terminal: n-3 e n-6, respectivamente (Adkins & Kelley, 2010; Alexander, 1998). A essencialidade dos PUFA se dá uma vez que o organismo animal não é capaz de sintetizá-los, pois necessita de dessaturases que agem inserindo insaturações entre os carbonos 3-4 e 6-7 da porção metil terminal da cadeia carbônica de ácido graxo. Além disso, são necessários ao bom funcionamento de diversos órgãos e sistemas, como sua conversão em eicosanóides, participação na integridade dérmica e neurológica (Curi et al., 2002).

Os PUFA das famílias n-3 e n-6 são representados pelos ácidos graxos ALA (18:3 n-3) e LA (18:2 n-6), respectivamente. Após serem obtidos a partir da dieta, os ácidos graxos LA e ALA são utilizados pelo organismo para síntese posterior de outros ácidos graxos, como o ácido araquidônico (AA, 20:4 n-6) e os ácidos eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n-3) e docosahexaenóico (DHA, 22:6 n-3) (Simopoulos, 2000) (Figura 1).

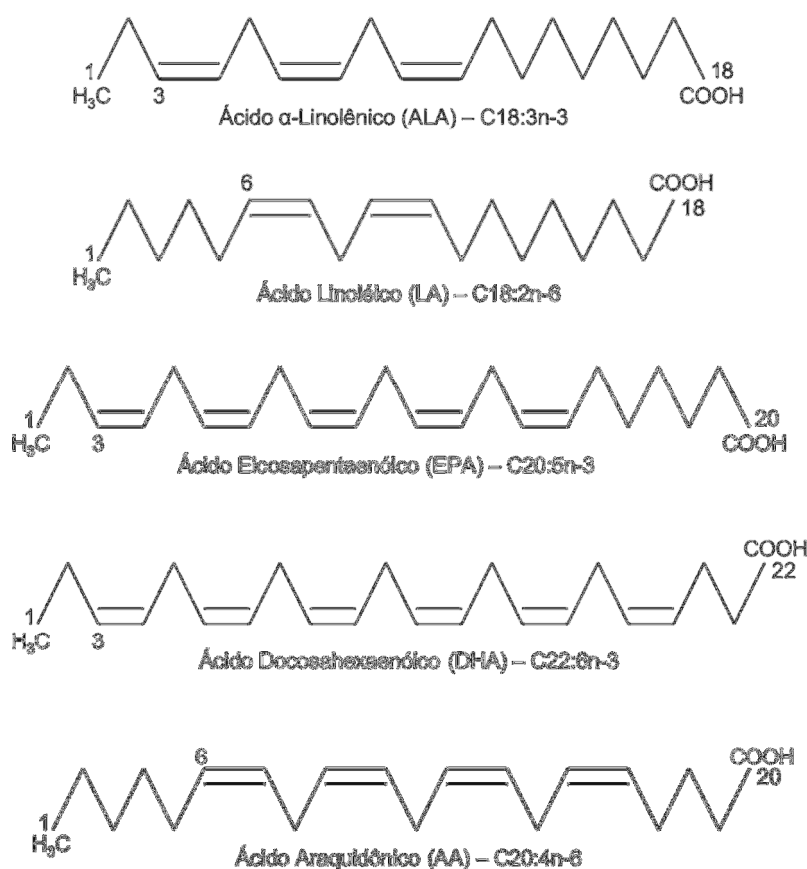


Figura 1: Estrutura dos PUFA n-3 e n-6.

As principais origens dietéticas de PUFA n-6 são os óleos de origem vegetal, tais como o óleo de soja, óleo de milho, óleo de canola e óleo de girassol (Youdim et al., 2000). Já os PUFA n-3 são encontrados, principalmente, em óleo de peixe e em peixes de águas frias e profundas, como salmão, arenque, atum e sardinhas. Este acúmulo em peixes ocorre devido à expressiva quantidade desses PUFA n-3 no fitoplâncton, os quais sintetizam EPA e DHA, que provê a sua distribuição ao longo da cadeia alimentar marinha (Connor, 2000). Em relação aos óleos vegetais, as principais origens dietéticas ricas em ALA são os óleos de linhaça (533 mg/g), de canola (93 mg/g), soja (68 mg/g), milho (11,6 mg/g) e azeite de oliva (7,6 mg/g) (Martin et al., 2006).

Um balanço adequado na proporção de n-6/n-3 na dieta é essencial ao metabolismo do organismo humano, uma vez que desempenham papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares e aterosclerose (Ayala et al., 2009), manutenção da integridade das células endoteliais (Toborek et al., 2002), na inibição da vasoconstrição e agregação plaquetária (Ayala et al., 2009), no crescimento fetal e desenvolvimento neural (Kim, 2007), na ação anti-inflamatória e antitrombótica (Chapkin et al., 2009), na prevenção do câncer (Calviello et al., 2007), além de participar das funções imunomoduladoras (Andrade & Carmo, 2006).

A importância da relação n-6/n-3 fundamenta-se na competição existente entre o ALA e LA pela ação da enzima Δ -6-dessaturase, que converte ambos em diferentes subespécies (Santos et al., 2013). Embora não se tenha um consenso entre os países (Chardigny et al., 2001; Committee, 1990; Nordic Council of Ministers., 1996; Simopoulos et al., 1999), a referência dietética de ingestão (DRI) preconizada pelo Instituto de Medicina (IOM) (2002) recomenda uma dieta baseada na razão n-6/n-3 entre 5:1 e 10:1, uma vez que a enzima Δ -6-dessaturase apresenta maior afinidade pelos PUFA n-3 em detrimento aos n-6 (Harris, 2006).

A dieta consumida atualmente pela população ocidental é rica em PUFA n-6, o que implica no aumento da relação n-6:n-3, atingindo proporções equivalentes a 15:1 (Fürst, 2002). Este aumento pode comprometer o estado fisiológico, uma vez que o n-6 é precursor dos eicosanóides que estão envolvidos em diversos processos, em especial na resposta inflamatória (Mozaffarian & Wu, 2011).

1.1.2 Biossíntese dos Ácidos Graxos Poliinsaturados

A partir de seus precursores, os AA, EPA e DHA são sintetizados no retículo endoplasmático das células hepáticas após reações de dessaturação (oxidação com formação de duplas ligações) e alongação (aumento da cadeia carbônica com átomos de carbono) (Calder & Grimble, 2002).

Os PUFA são incorporados à membrana plasmática das células desempenhando funções indispensáveis à fisiologia celular (Alexander, 1998), como a homeostase da membrana plasmática e sua fluidez, assim como os processos de sinalização e a expressão gênica (Das, 2006). O perfil e a quantidade de PUFA incorporados à membrana são determinados, principalmente, pela composição dos lipídeos da dieta, sendo estes substratos determinantes dos mediadores lipídicos biologicamente ativos sintetizados (Alexander, 1998).

O AA e o EPA presentes nas membranas celulares são utilizados como substratos para a formação de eicosanóides (Yaquob & Calder, 2007), o qual abrange as prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, prostaciclina e derivados dos ácidos graxos hidroxilados. Estes PUFA encontram-se na forma esterificada nos fosfolipídeos de membrana, sendo hidrolizados e liberados através da ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) associada à proteína G, que podem ser ativadas por estímulos mecânicos, químicos ou físicos (Robbins & Cotran, 2005). Estando o substrato disponível, seja AA ou EPA, é então metabolizado pelas enzimas ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX) (Mantzioris et al., 1995), levando a formação dos mediadores lipídicos que compreende a família dos eicosanóides.

Os eicosanóides participam de diversas atividades biológica, atuando em funções homeostáticas, principalmente por regular a atividade plaquetária, manutenção do tônus vascular, proliferação de células do músculo liso vascular, e como mediadores da resposta inflamatória e agentes quimiotáticos (Kawabe et al., 2010; Kinsella et al., 1990; Oates et al., 1988; Parker, 1987).

O AA quando metabolizado pela via da COX e LOX origina prostanóides da série 2 e leucotrienos da série 4, respectivamente, enquanto que, o EPA fornece prostanóides da série 3 e leucotrienos da série 5 (Schmitz & Ecker, 2008) (Figura

2). Os produtos finais estão divididos em “séries” com base nas características estruturais, sendo o número a representação da quantidade de ligações duplas no composto (Bagga et al., 2003; Robbins & Cotran, 2005) Cabe ressaltar que o DHA não é utilizado como um substrato para as enzimas COX e LOX, no entanto este PUFA inibe a síntese de eicosanóides da família n-6 por atuar inibindo a liberação de AA da membrana plasmática (Kelley, 2001).

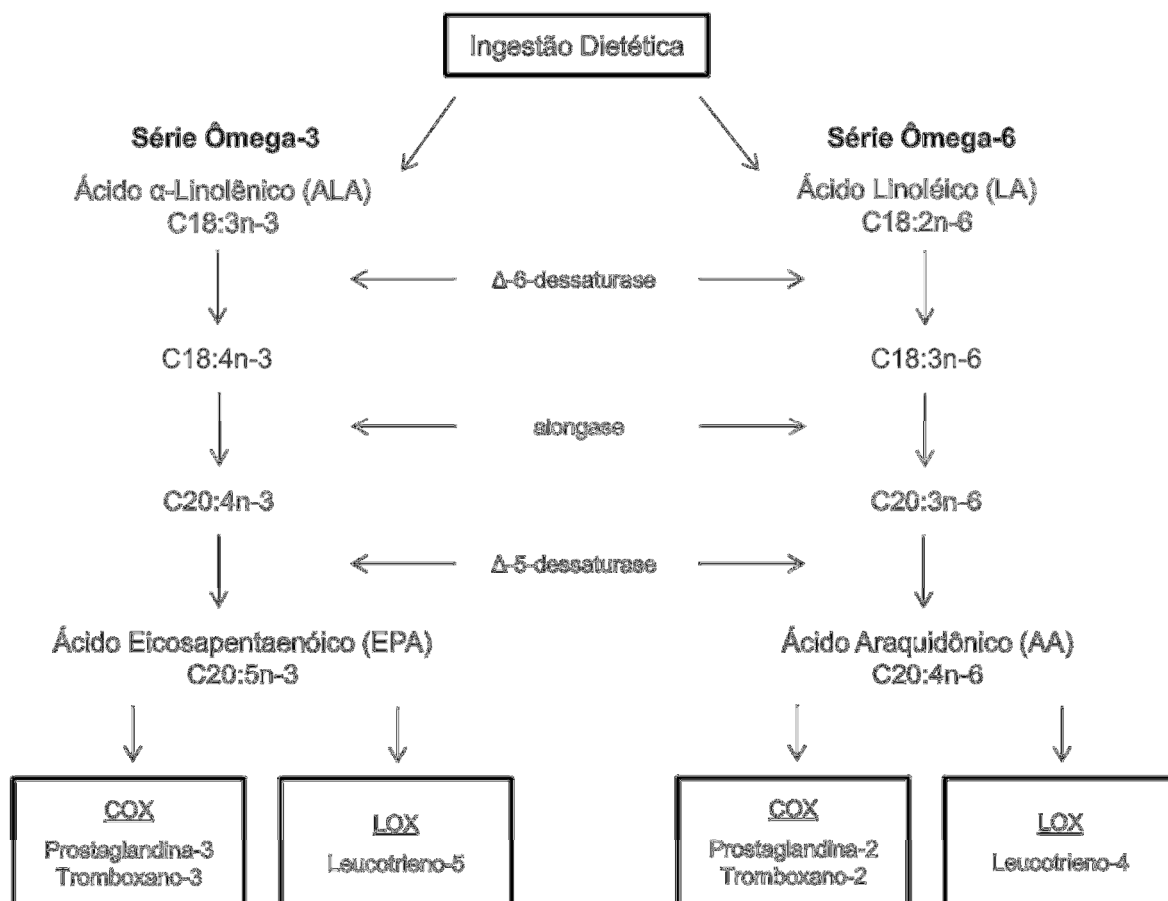


Figura 2: Representação esquemática da via de biossíntese dos ácidos graxos poliinsaturados.

Os eicosanóides provenientes do AA são biologicamente ativos em pequenas quantidades. Porém, quando formados em elevadas quantidades contribuem para o surgimento de trombos e ateromas, e diversas desordens inflamatórias, além de estimular a proliferação celular (Narumiya et al., 1999). Essas alterações estão particularmente mais relacionadas à formação de tromboxano A₂ (TXA₂) e sua ação de agregador plaquetário, vasoconstritor e

potente estimulador da proliferação celular (Narumiya et al., 1999). Estudo tem mostrado que o TXA₂ contribui para a iniciação e progressão da aterosclerose, regulando a ativação de plaquetas e interações celulares leucócito-endotelial (Kobayashi et al., 2004). Com isso, aumentam os riscos de desenvolver hipercolesterolemia, infarto do miocárdio e doenças ateroscleróticas (Hirafuji et al., 2003; Patrono et al., 1990).

No entanto, a maior disponibilidade de EPA, além de reduzir os níveis de TXA₂, diminui a síntese de prostaglandinas E₂ (PGE₂) e leucotrienos B₄ (LTB₄) vasoconstritores, aumentando a concentração de leucotrienos B₅ (LTB₅), sendo este último um fraco indutor inflamatório e agente quimiotáxico; aumenta as concentrações de TXA₃, com baixa potência sobre a agregação plaquetária e vasoconstrição; aumenta as concentrações de prostaciclina 3 (PGI₃), sem, no entanto, reduzir a liberação prostaciclina 2 (PGI₂) derivada do AA (tanto a PGI₂ quanto a PGI₃ são vasodilatadoras e anti-agregadoras plaquetárias) (Kinsella et al., 1990; Weber et al., 1986)

Baseado nessas ações, diversos estudos têm demonstrado que os óleos vegetais ricos em PUFA são considerados benéficos para a saúde cardiovascular, e este efeito parece ser atribuído à presença ALA (Baylin et al., 2003; Hu et al., 2001; Psota et al., 2006).

Além dos efeitos decorrentes da metabolização dos PUFA n-3 apresentados, outras substâncias com potencial anti-inflamatório são resultantes da metabolização deste composto (Hong et al., 2003), descobertas recentemente. Serhan e colaboradores (2005) identificaram e caracterizaram uma nova família de mediadores lipídicos endógenos derivados do EPA e DHA. Estes incluem as resolvinas da série E, derivada do EPA, bem como as resolvinas da série D, as protectinas e maresinas, derivada do DHA (Arita et al., 2005; Spite et al., 2009). De maneira geral, estes mediadores lipídicos apresentam potentes ações anti-inflamatórias, imunorregulatórias e função de pró-resolução de inflamação, com efeitos importantes na minimização dos processos inflamatórios (Serhan and Petasis, 2011).

1.1.3 Efeito do Óleo de Linhaça nos Processos Inflamatórios

Como mencionado anteriormente, muitos dos efeitos proporcionados pelos PUFA estão diretamente ligados ao sistema imune e à resposta inflamatória, sendo que os eicosanóides derivados da família n-3 têm características anti-inflamatórias e, os derivados da família n-6 têm características pró-inflamatórias, quando em excesso no organismo.

Estudos têm mostrado que os ácidos graxos modulam a resposta inflamatória por muitos mecanismos, inclusive atuando na diminuição da transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Ferrucci e colaboradores (2006), em estudo experimental realizado em modelos animais, demonstraram que os ácidos graxos n-3 inibiram a produção de interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), duas citocinas pró-inflamatórias. No entanto, Kew e colaboradores (2003) avaliando adultos moderadamente hiperlipidêmicos sob ingestão controlada de ALA (9,5 g/d) por seis meses, não observaram alteração na atividade funcional de neutrófilos, monócitos e linfócitos.

Devarshi e colaboradores (2013) observaram efeito positivo da suplementação do óleo de linhaça e o óleo de peixe sobre o metabolismo lipídico de ratos diabéticos, além de reduzir a expressão de citocinas inflamatórias, nos hepatócitos, como TNF- α e interleucina 6 (IL-6), que podem contribuir para a patogênese da resistência a insulina. Ainda, em estudo realizado com voluntários saudáveis submetidos a uma dieta tendo como base o óleo de linhaça no preparo dos alimentos por quatro semanas, foi observada redução da síntese de TNF- α e IL-1 em cerca de 30% (Caughey et al., 1996). Além disso, a intervenção alimentar com a suplementação de óleo de linhaça em ratos obesos, por oito semanas, reduziu a hipertrofia dos adipócitos e também, os níveis dos marcadores inflamatórios MCP-1, TNF- α e células T no tecido adiposo (Baranowski et al., 2012).

O efeito da linhaça também tem sido relacionado com a função renal em estudos experimentais e clínicos investigando o lúpus eritematoso sistêmico, doença autoimune inflamatória que pode culminar em insuficiência renal (Cooper et al., 1998). A suplementação da semente de linhaça em ração oferecida a modelos de camundongos espontaneamente com lúpus, por quatorze dias, foi

observado redução da inflamação e melhora da função renal (Hall et al., 1993). Ainda, em ratos submetidos à nefrectomia de 5/6, modelo no qual ocorre à retirada de 5/6 da massa renal do animal, e alimentados com dieta suplementada com óleo de linhaça ou linhaça após vinte semanas, obtiveram melhora na filtração glomerular assim como a presença de prostaglandinas derivadas do EPA na urina (Ingram et al., 1995). O consumo de 15g, 30g e 45g de semente de linhaça por dias sequenciais com intervalos de quatro semanas, por pacientes acometidos por lúpus nefrite, resultou em melhora na função renal e na inflamação (Clark et al., 1995). No entanto, os estudos que apresentaram efeito positivo com o uso da semente de linhaça podem ter sofrido a influência de outros componentes, como a lignana, um fitoestrógeno com potente efeito antioxidante (Prasad, 2000).

Os processos inflamatórios estão fortemente relacionados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), como a aterosclerose (Stocker & Keaney, 2004). Os PUFA, com destaque ao n-3, podem auxiliar em processos patológicos vasculares e inflamatórios uma vez que modulam a produção de citocinas e eicosanóides (Alexander, 1998).

1.1.4 Efeito da Linhaça no Sistema Cardiovascular

As DCV são responsáveis por uma alta taxa de morbidade e mortalidade, na maioria dos países, tendo sido alvo de vários estudos experimentais e clínicos. A aterosclerose é um importante contribuinte para o desenvolvimento das DCV, podendo ser agrada por patologias subjacente as doenças vasculares. O estresse oxidativo, lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada, hipercolesterolemia e inflamação vascular crônica são alguns dos fatores que desempenham um papel na etiologia da aterosclerose (Stocker & Keaney, 2004). No entanto, é importante ressaltar que a prevalência de aterosclerose pode ser controlada através de estratégias simples nos hábitos de vida, tais como intervenções nutricionais, interrupção do tabagismo e exercício físico regular (Rector et al., 2006; Ruiz-Canela & Martínez-González, 2014; Wenger, 2014).

Intervenção nutricional, com o aumento da ingestão de ácidos graxos PUFA n-3, tem sido considerado como uma estratégia eficaz para prevenir ou reduzir os fatores de risco das DCV (Barrett, 2013; de Lorgeril et al., 1999). Como mencionado anteriormente, a principal fonte de PUFA n-3 está presente em fontes marinhas. Diversos estudos na literatura relacionam fortemente os efeitos do consumo de peixe e/ou óleo de peixe com efeitos benéficos cardiovasculares (de Lorgeril et al., 1999; Kris-Etherton et al., 2002; Simopoulos et al., 1991), sendo que estes foram os precursores para o interesse de se estudar os ácidos graxos poliinsaturados. Os primeiros relatos sobre o metabolismo dos PUFA n-3 surgiram na década de 70, a partir de um estudo de doença coronariana (Lee et al., 1986). Estudos revelaram uma baixa prevalência de aterosclerose e doença coronariana entre os esquimós da Groelândia e em algumas comunidades japonesas, onde as dietas eram ricas em gorduras PUFA n-3 derivada de peixes e animais marinhos (Lee et al., 1986).

Embora estas fontes marinhas se destaquem pelo alto conteúdo de PUFA n-3, preocupações têm sido levantadas sobre contaminantes ambientais que se acumulam em peixes, especialmente o metilmercúrio, bifenilos policlorados e dioxinas, que podem levar a efeitos deletérios à saúde (Rissanen et al., 2000). Assim, mesmo que o óleo de peixe seja a principal fonte de PUFA n-3 EPA e DHA, ele também é uma fonte importante de metilmercúrio, que tem sido associada a um risco aumentado de doenças cardiovasculares (Fernandes Azevedo et al., 2012).

Outra fonte alternativa de n-3 são os óleos vegetais. Dentre eles, o óleo de linhaça, como já mencionado, destaca-se por alta concentração de n-3. De fato, estudos têm relacionado à linhaça ao efeito anti-aterogênico. A aterosclerose foi significativamente prevenida em aortas de coelhos hipercolesterolêmicos após suplementação com semente de linhaça na dieta por dezesseis semanas (Dupasquier et al., 2006) e, em aortas de camundongos *knockout* para o receptor LDL (Dupasquier et al., 2007). Ainda, neste último estudo, a expressão dos marcadores inflamatórios, IL-6, mac-3 (marcador de macrófago, utilizado como indicador de reações inflamatórias associada a aterosclerose) e VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular-1), foram significativamente reduzidos em tecido aórtico aterosclerótico. No entanto, Kelley e colaboradores (1993) demonstraram que a suplementação com óleo de linhaça por 126 dias não alterou

significativamente os níveis de triglicerídeos, colesterol, LDL, lipoproteína de alta densidade (HDL) em homens saudáveis. O efeito anti-aterogênico atribuído à semente de linhaça, utilizada pelos estudos citados, pode ser atribuído a lignana, uma vez que esta tem sido associada à prevenção da progressão da aterosclerose (Prasad, 2008, 2007).

Além dos efeitos anti-ateroscleróticos dos PUFA n-3, outros estudos evidenciaram também, implicações sobre a pressão arterial. Rodriguez-Leyva e colaboradores (2013) após estudarem o efeito da suplementação dietética com semente de linhaça por seis meses em pacientes hipertensos, observaram redução significativa na pressão arterial, com redução de 15 mmHg na pressão arterial sistólica e 7 mmHg na pressão arterial diastólica, e aumento de n-3 plasmático. Segundo os autores do estudo, a ação anti-inflamatória do ALA poderia explicar o efeito anti-hipertensivo no grupo tratado com linhaça. No entanto, em um estudo realizado com pessoas obesas não foi observado efeito na pressão arterial com a ingestão diária de alimento fortificado com óleo de linhaça, embora tenha obtido aumento acentuado na complacência arterial, o que reflete melhora funcional na circulação arterial sistêmica (Nestel et al., 1997). Mesmo os autores atribuindo o efeito hipotensor ao n-3, não se pode descartar o efeito da lignana. Prasad (2013) ao administrar diglicosídeo secoisolaricresinol, lignana presente na linhaça, pela via intraperitoneal em ratos, observou redução na pressão arterial pela inibição dos efeitos da enzima conversora de angiotensina.

Os PUFA podem ainda interferir na susceptibilidade de um organismo a danos oxidativos. Esses danos são gerados pela instalação do estresse oxidativo. O estresse oxidativo surge quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a defesa antioxidante do organismo (Xu et al., 2012). No endotélio vascular, os radicais livres podem causar diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico, apoptose, aumento da adesão de monócitos e angiogênese (Taniyama & Griendling, 2003). Enquanto no músculo liso vascular (MLV), os radicais livres podem promover crescimento celular, migração de mediadores inflamatórios, desorganização da matriz extracelular e aumento do tônus muscular (Taniyama & Griendling, 2003).

O endotélio associado ao músculo liso são um dos principais fatores ligados ao controle da resistência vascular periférica (Triggle et al., 2003). O endotélio através da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras regula o

tônus vascular e o crescimento do músculo liso. Embora seja constituído por uma camada única de célula, o endotélio vascular é importante para que exista homeostasia vascular pelas variadas substâncias por ele produzido, as quais influenciam na coagulação, inflamação, proliferação e reatividade vascular (Félétou & Vanhoutte, 2009). A disfunção endotelial ocorre quando a função endotelial é alterada, provocada pelo desequilíbrio na produção das substâncias por ele produzidas, o que contribuir para o aumento de resistência vascular, favorecendo, por exemplo, o processo hipertensivo (Triggle et al., 2003). Neste contexto, é importante destacar que um dos principais determinantes da disfunção endotelial é o aumento do estresse oxidativo, o qual geralmente está associado as DCV (Griendling & FitzGerald, 2003)

Sendo assim, os mecanismos protetores antioxidantes do organismo são indispensáveis para a manutenção da integridade vascular, cujo os principais representantes são superóxido dismutase (SOD), catalase e glutadiona peroxidase (GPx) (Griendling et al., 2000). De acordo com o estudo realizado por Kaasgaard e colaboradores (1992), em experimentos *in vitro* e *in vivo*, foi observado que o óleo de linhaça não afeta a atividade da catalase ou superóxido dismutase em fígados de macacos. No entanto, após suplementação com óleo de linhaça, por quatorze dias, na dieta de ratos induzidos a dano renal, Rizwan e colaboradores (2014) observaram redução no estresse oxidativo apenas no grupo tratado. Em outro estudo, Ramaprasad e colaboradores (2005) observaram que a suplementação com óleo de linhaça aumentou a atividade das enzimas catalase e glutadiona transferase em ratos. Portanto, os efeitos do óleo de linhaça sobre o estresse oxidativo são contraditórios.

2 JUSTIFICATIVA

De acordo com a revisão literária descrita anteriormente, fontes ricas em PUFA n-3 têm apresentado importantes implicações sobre a pressão arterial e efeito anti-aterogênico (de Lorgeril et al., 1999; Kris-Etherton et al., 2002; Simopoulos et al., 1991). O consumo de linhaça e seus componentes têm sido associados à prevenção ou redução na incidência de doenças cardiovasculares, principalmente pelo conteúdo de PUFA n-3 e n-6, fibras e lignana (Morris, 2003; Prasad, 2009). Estudos demonstraram previamente os efeitos vasculares da linhaça (Dupasquier et al., 2006; Talom et al., 1999), no entanto, não está claro se os efeitos cardiovasculares podem ser atribuídos aos PUFA ou as fibras e lignana.

O óleo de linhaça embora possa exercer efeitos cardiovasculares benéficos pelo conteúdo de ALA (PUFA n-3), as evidências sobre os efeitos vasculares e mecanismo de ação ainda não é bem conhecido. ALA, na via da ciclooxigenase-2, está associado à redução do TXA₂ e aumento de PGI₃ por vasos como aorta (DeCaterina et al., 1990; Rupp et al., 1996) que, por sua vez, pode aumentar a vasodilatação endotélio-dependente. Por outro lado, a LA (PUFA n-6) está relacionada com o aumento de prostaglandinas da série 2 e tromboxano que pode aumentar o tônus vascular (Narumiya et al., 1999).

Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do tratamento intramuscular por quinze dias com óleo de linhaça na modulação endotelial das respostas vasculares induzidas pela ativação α -adrenérgica em anéis isolados de aorta, sabendo que este último é um dos principais vasos afetados pelo estresse oxidativo, podendo induzir a aterosclerose.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração pela via intramuscular (i.m.) por quinze dias com óleo de linhaça sobre a reatividade vascular em aorta torácica de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar se o tratamento pela via i.m. com óleo de linhaça promove alteração na reatividade vascular à fenilefrina em aorta torácica de ratos.

Investigar se o efeito do óleo de linhaça altera a participação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina.

Verificar a influência do óleo de linhaça sobre o relaxamento dependente e independente do endotélio.

Estudar a participação do óxido nítrico, dos prostanóides derivados da ciclooxigenase e das espécies reativas de oxigênio na reatividade vascular à fenilefrina.

Analisar se a administração pela via i.m. por quinze dias com óleo de linhaça modifica a expressão proteica da isoforma endotelial da ciclooxigenase-2.

Investigar se o tratamento pela via i.m. com óleo de linhaça altera a produção de ânion superóxido em segmentos aórticos.

Avaliar os níveis de malondialdeído plasmático, um marcador de estresse oxidativo.

Analisar os níveis de proteína C-reativa no soro, proteína de fase aguda marcador de inflamação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com aproximadamente três meses de idade, pesando entre 250 e 300 g, cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Os animais foram mantidos em gaiolas, sob condições controladas de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e à ração.

O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES - CEUA 038/2012).

4.1.1 Modelo Experimental

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em dois grupos experimentais: Controle e Óleo de Linhaça. Os animais do grupo Óleo de Linhaça receberam diariamente injeções intramusculares (i.m.), durante quinze dias, contendo 0,1 mL de óleo de linhaça na face interna das patas traseiras, sendo estas alternadas a cada dia de tratamento. Os animais do grupo Controle receberam óleo mineral na mesma quantidade e período de tempo.

É importante ressaltar que a escolha pela via i.m. como forma de administração do óleo de linhaça ocorreu para garantir que todos os ratos recebessem de forma controlada a mesma dose diariamente, assim como, evitar qualquer influência do processamento e metabolismo pelo trato gastrointestinal. Dessa forma, tornaria possível avaliar o efeito direto do óleo de linhaça.

4.2 METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA

Ao final do tratamento, os ratos foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i.p.) e, em seguida, eutanaziados. A aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-modificada, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; KH_2PO_4 1,17; NaHCO_3 24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO_2 e 95% de O_2 . Esta solução foi mantida com pH 7,4.

Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em seis segmentos cilíndricos de aproximadamente 3 a 4 mm de comprimento (Figura 3).

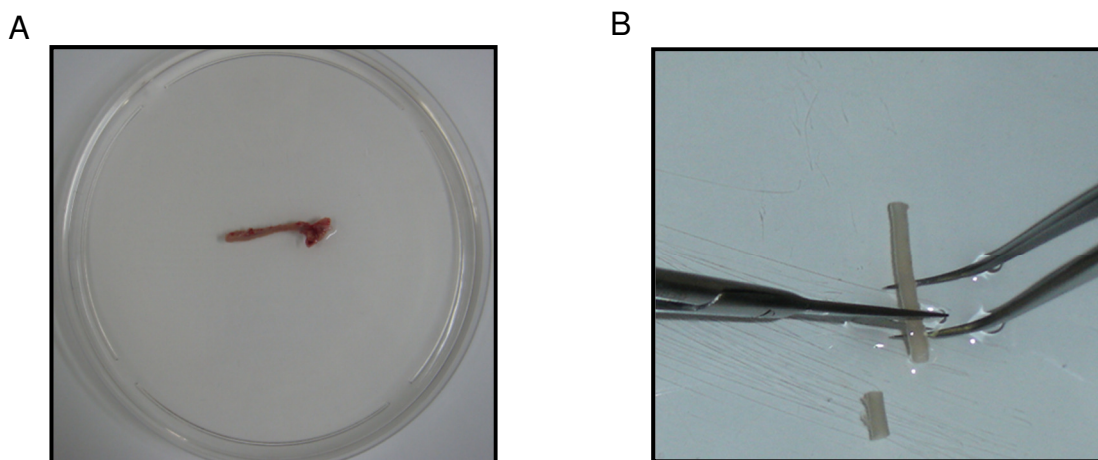


Figura 3: (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (Angeli, 2009).

Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a $36 \pm 0,5^\circ \text{C}$, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que fiquem paralelos na luz do vaso. Um fio foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim,

qualquer alteração do diâmetro do vaso era captada pelo transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA - USA) e este a um computador (Figura 4).

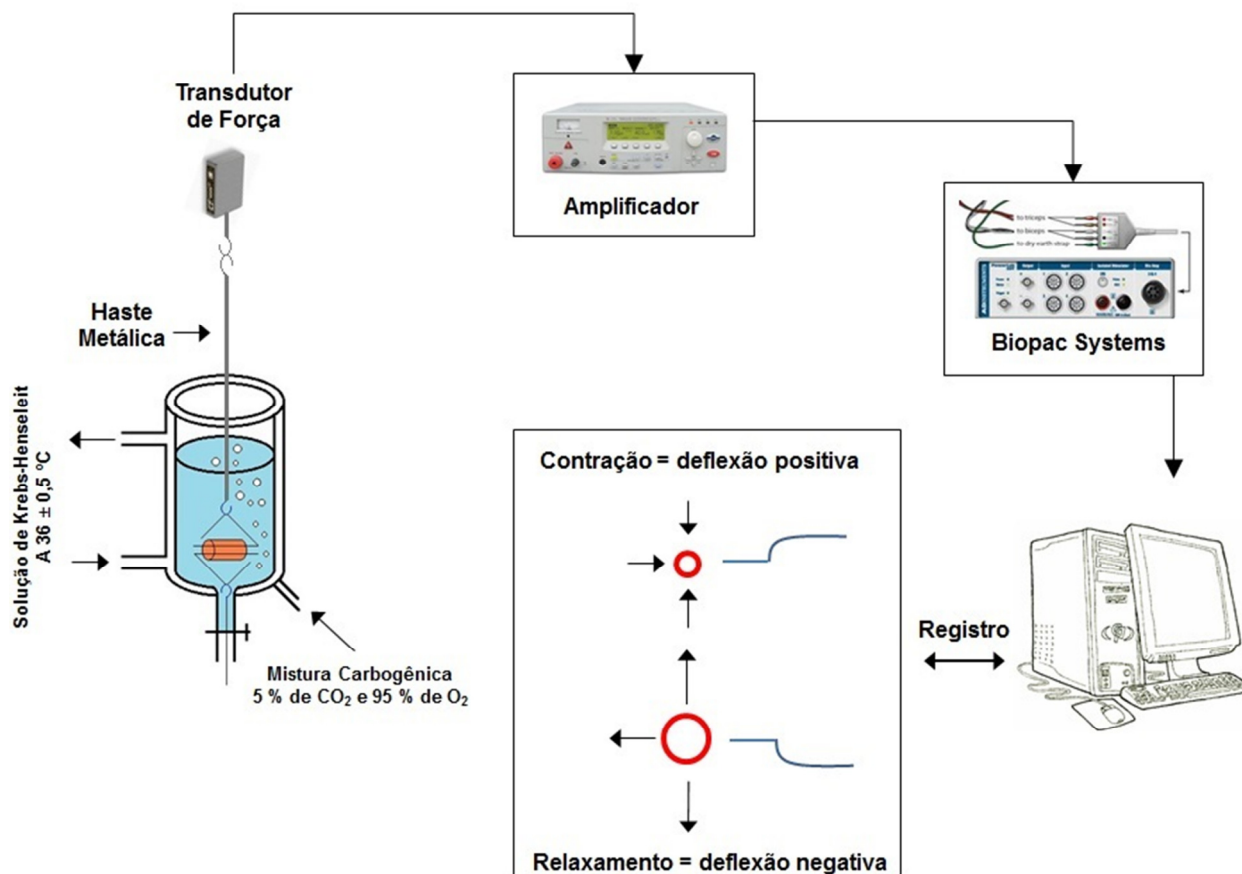


Figura 4: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular in vitro.

Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,9 a 1,2 g, reajustada, quando necessário, durante 45 minutos de estabilização (Figura 5 A).

4.2.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)

Após o período de 45 minutos de estabilização, foi administrado ao banho KCl 75 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Após atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados com solução de Krebs-Henseleit até

retornar a tensão de repouso (Figura 5 B, C). Assim, os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização (Figura 5 D), uma nova dose de KCl (75 mM) era adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida após 30 minutos da adição, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura 5 E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para atingir o valor basal (1,0 grama) e, após 30 minutos (Figura 5 G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

4.2.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico, acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraindidos com fenilefrina (Fe) 10^{-6} M. Uma vez atingido o platô, uma dose única de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M foi aplicada (Figura 5 I, J, L). A integridade endotelial era determinada por um relaxamento maior ou igual a 80%.

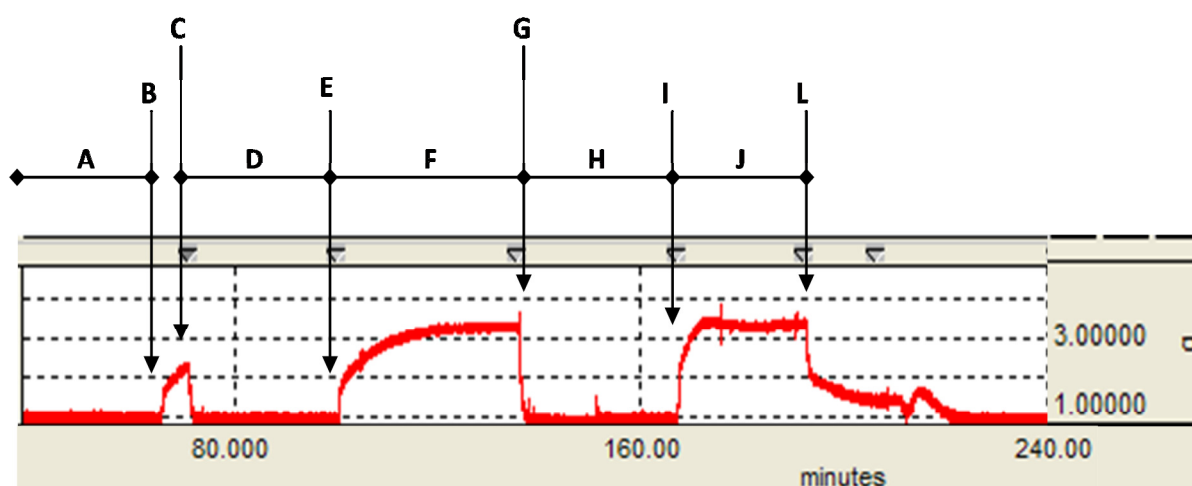


Figura 5: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0,9 a 1,3g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina (Fe) 10^{-6} M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical (modificado de Dias, 2007).

4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, a solução nutritiva do banho foi trocada três vezes para que a tensão basal fosse estabelecida. Após 30 minutos de estabilização, era realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) de maneira cumulativa nos dois grupos estudados.

4.3.2 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e sem endotélio (E-). As células endoteliais foram removidas mecanicamente através do uso de fios metálicos. Estes foram inseridos na luz do vaso e friccionados à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina 10^{-5} M de induzir o relaxamento, após a pré-contracção com fenilefrina (10^{-7} M). A preparação foi lavada e, após 30 minutos de retorno à tensão basal, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M).

4.3.3 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a resposta de relaxamento dependente do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta com endotélio foram pré-contráidos com fenilefrina 10^{-6} M. Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas à acetilcolina (10^{-11} a 3×10^{-5} M).

4.3.4 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a resposta de relaxamento independente do endotélio

A avaliação da vasodilatação não mediada pelo endotélio foi analisada através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS). Assim como para acetilcolina, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-6} M e, a seguir, foram realizadas curvas concentração-resposta a esse agonista em concentrações de 10^{-11} a 3×10^{-5} M.

4.3.5 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos na exposição por quinze dias com óleo de linhaça sobre a resposta à fenilefrina na aorta

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da seguinte forma: após o teste do endotélio e dos 30 minutos de estabilização da preparação, o fármaco a ser estudado era incubado por trinta minutos (L-NAME, indometacina, NS 398, furegrelato, SQ 29,548, apocinina, tiron, catalase e dexametasona) e, logo após, realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) (Figura 6).

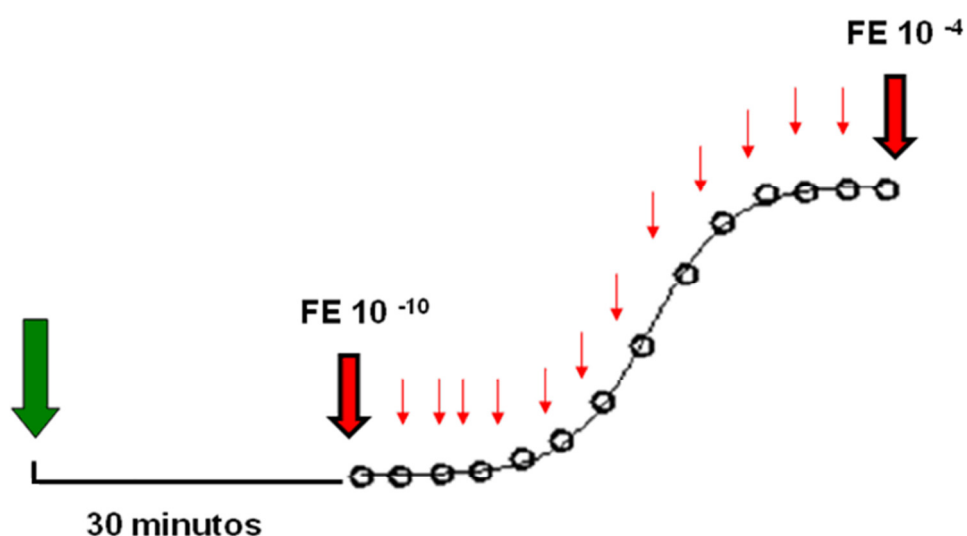


Figura 6: Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10^{-10} a 3×10^{-4} M) (Angeli, 2009).

4.3.5.1 Influência do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a via do óxido nítrico

Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M).

4.3.5.2 Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre resposta contrátil à fenilefrina após tratamento com óleo de linhaça por quinze dias

Para verificar o envolvimento dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis foram incubados com indometacina (10 μ M), inibidor não específico da ciclooxigenase; NS 398 (1 μ M), inibidor específico da COX-2; SQ 29,548 (1 μ M), antagonista do receptor TP - receptor do TXA₂; furegrelato (1 μ M) inibidor da síntese do TXA₂; e dexametasona (1 μ M) inibidor da PLA₂.

4.3.5.3 Envolvimentos dos radicais livres sobre resposta contrátil à fenilefrina após tratamento com óleo de linhaça por quinze dias

A fim de investigar a participação das espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) a resposta contrátil à fenilefrina foram realizadas curvas concentração-resposta a fenilefrina na presença de apocinina (10 μ M), um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase; tiron (1 mM), um “varredor” não-enzimático de ânion superóxido (O₂⁻); e a catalase (1000 U.mL⁻¹), um “varredor” enzimático de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

4.4 ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTÉICA

4.4.1 Western Blot para detecção da isoforma da COX-2

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência da exposição por quinze dias ao óleo de linhaça sobre a expressão proteica da isoforma da COX-2 em segmentos aórticos de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça. Para tal, os segmentos aórticos foram dissecados em solução nutritiva de Krebs-Henseleit e armazenados a -80°C até a homogeneização das amostras.

4.4.2 Preparação do tecido e quantificação das proteínas

A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização dos segmentos aórticos por trituração em solução de Tris HCl 50 mM, NaCl 0,9 M, pH: 7,4, em banho de gelo. Depois de homogeneizadas as amostras eram centrifugadas (Eppendorf-Neitheier- Hinz GmbH 22331, Alemanha) durante 10 minutos, 6.000 rpm a 4°C e, em seguida, o sobrenadante era retirado e feita então a quantificação protéica (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil) pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Posteriormente, foi calculado o volume necessário para uma carga de 50 μg de proteína, sendo este volume de amostra misturada, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizados foram diluídas em solução de Laemmli 2X (0,5 mM de uréia, 0,17 mM de SDS, 39 μM de ditiodiol, 0,01 M de Tris e azul de bromofenol 0,5%).

4.4.3 Eletroforese e transferência das amostras

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 10% para 1,5 M Tris HCl pH: 8,8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed,

previamente imersos em um tampão para eletroforese (25 mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e submetidas a uma corrente constante de 80V por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura) a 4° C. Após o término da eletroforese, foi feita a transferência elétrica das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (Amersham, UK) previamente ativada por água durante 20 segundos. Para a transferência, foi realizado o método de transferência líquida na qual o gel, a membrana e o papel Whatman foram montados em um sistema de sanduíche em suporte Holder Cassete e acoplados a uma cuba (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, USA) contendo uma solução tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% e Metanol 20%) à 8° C com uma corrente de 60 V por 2 horas.

4.4.4 Incubação com Anticorpos

Ao final da transferência, as membranas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução bloqueadora (leite desnatado 5%, Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) para evitar a união não-específica com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas eram incubadas durante toda a noite à 4° C, sob agitação, em solução à 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) adicionados aos anticorpos primários para COX-2 (1:1000, Sigma, Aldrich, Germany), ou β -actina (1:5000, Sigma Chemical, CO, St Louis USA).

Ao final da incubação dos anticorpos primários, as membranas eram lavadas, sob agitação, com solução TBS-T durante 15 minutos para remoção do excesso do anticorpo primário, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 5 minutos. Posteriormente as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário, Imunoglobulina IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase (1:5000, StressGen, Victoria, Canada).

4.4.5 Detecção das Proteínas

As proteínas correspondentes a COX-2 e β -actina foram detectadas por uma reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 minutos, a um sistema de detecção (ELC Plus, AmershamTM GE Healthcare, UK). Em seguida, as membranas eram colocadas em contato com filme fotográfico (Hyperfilm, Amersham TM, UK), sendo as bandas impregnadas e posteriormente reveladas.

A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas das proteínas e, para isto, os filmes com as bandas protéicas impregnadas foram escaneadas e analisados pelo software ImageJ.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO *IN SITU*

4.5.1 Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo (DHE)

Para verificar a influência da exposição por quinze dias ao óleo de linhaça sobre a produção de $O_2^{\cdot-}$ foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do DHE. O DHE é um derivado do etídio que entra em contato com $O_2^{\cdot-}$, oxida-se e posteriormente se liga ao DNA das células emitindo fluorescência vermelha. Este método permite analisar a produção “in situ” nos segmentos arteriais.

Os segmentos de aorta foram retirados dos animais, em seguida, limpos e mantidos por 1 hora em solução Krebs-Henseleit com sacarose 30%. Posteriormente, estes segmentos foram congelados em meio adequado (meio de congelamento). Assim, as amostras foram mantidas a -80° C até o dia do experimento.

Os segmentos de aorta foram cortados no criostato em anéis com 10 μ m de espessura. Posteriormente estes anéis foram adicionados em lâminas gelatinadas e secos em estufa a 37° C durante 30 minutos. Após este procedimento, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e posteriormente incubadas com Krebs HEPES (Para 100 ml de Krebs: 29,4 mg de $CaCl_2$, 759 mg de NaCl, 41,7 mg de

KCl, 4,9 mg de MgCl₂, 197,8 mg de HEPES e 198,2 de glicose) por 30 minutos em uma câmara úmida à 37° C. Decorridos os 30 minutos, o Krebs foi escorrido e o excesso seco. Em seguida, foi realizada incubação com DHE 2µM por duas horas na estufa com câmara fechada a 37° C. A luminescência emitida foi visualizada com microscópio fluorescência invertido (Leica DM 2500) e câmara fotográfica (Leica DFC 310 FX) com filtro 568 nm. As imagens foram quantificadas pelo software ImageJ.

4.6 MEDIDA DE PRODUÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NO PLASMA

As amostras de plasma dos animais foram coletadas e armazenadas a -80° C até o dia da análise. As concentrações plasmáticas de MDA foram mensuradas por ensaio modificado de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Wiggers et al., 2008). Os radicais livres reagem com os PUFA da membrana celular e lipoproteínas, transformando-os em ácidos graxos peroxidados os quais sofrem redução de sua cadeia lateral liberando MDA, de maneira que sua concentração sérica é proporcional à quantidade de ácidos graxos poliinsaturados oxidados e, portanto um indicador de peroxidação lipídica.

Após centrifugação do sangue, o plasma foi coletado e misturado ao ácido tricloroacético a 20% em 0,6 M HCl (1:1 vol/vol) e mantidos em gelo por 20 minutos para precipitar seus componentes e evitar possíveis interferências. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 1500 x g antes de adicionar o TBA (120 mM em Tris 260 mM, pH 7) ao sobrenadante numa proporção de 1:5 (v/v). Após, a mistura foi aquecida a 97° C por 30 minutos. A medida foi realizada através da absorbância usando Absorbance Microplate Reader (ELx808TM).

4.7 MEDIDA DE PROTEÍNA C-REATIVA

Para a quantificação de proteína C-reativa o soro dos animais foi coletado e armazenado a -80°C até o dia da análise.

As concentrações de proteína C-reativa foram realizadas por turbidimetria simples (Integra 4000), após a imunoprecipitação com RCPLX (Roche/Hitachi cobas c) no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes.

4.8 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores de n significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental.

As respostas contráteis ao KCl foram expressas como tensão desenvolvida pelo anel de aorta, em gramas de contração. Os resultados de reatividade vascular das curvas concentração-resposta à fenilefrina foram normalizados em função da resposta máxima de contração ao KCl (75 mM) e estão expressas em porcentagem. As respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio, induzidas pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio, respectivamente, foram expressas em porcentagem de relaxamento em relação à pré-contração obtida pela fenilefrina (10^{-6} M).

Para a determinação dos valores de resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e pD_2 ($-\log \text{EC}_{50}$, que corresponde ao valor da concentração de fenilefrina que produz 50% da resposta máxima), em resposta aos diferentes agonistas utilizados, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA).

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina dos grupos estudados, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC) de concentração-resposta à fenilefrina. A dAUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (%dAUC) da curva controle correspondente.

Os resultados da expressão proteica da COX-2 estão expressos como relação entre a densidade óptica para estas proteínas em relação à β -actina.

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste t de Student não-pareado. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

4.9 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Merck)
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma)
- Ácido tricloroacético (Merck)
- Albumina bovina (Sigma)
- Anticorpo produzido em camundongo para β -actina (Sigma)
- Anticorpo produzido em camundongo para COX-2 (Sigma, Aldrich, Germany)
- Apocinina (Acetovanilona) (Sigma)
- Azul de bromofenol (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Vetec)
- Catalase (Sigma)
- Cloreto de cálcio dihidratado (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Dexametasona (Alquimia)
- Dihidroetídeo (Sigma)
- Dodecil-sulfato de sódio (SDS) (Sigma)
- Fosfato de potássio monobásico (Merck)
- Glicerol (Sigma)
- Glicose (Merck)
- Hidróxido de sódio (Sigma)
- Indometacina (Sigma)
- Leite desnatado (Nestlé)

- L-Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- N,N, N',N'- Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- N,N'- Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma)
- N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- Nitroprussiato de sódio, dihidratado (Fluka)
- NS 398(N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil) metanosulfonamida) (Sigma)
- Óleo de Linhaça (Cacalia Comercial Ltda)
- Persulfato de amônio (APS) (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL Plus) (Amersham)
- Sacarose (Merck)
- Superóxido dismutase de eritrócito bovino (SOD) (Sigma)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merk)
- SQ 19,548 (Ácido [1S-[1 alfa,2 beta (5Z),3 beta,4 alpha]-7-[3-[[2-
[(fenilamino) carbonil]hidrazin]metil]-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-il]-5-heptenoico)
(Sigma)
- Tiopental sódico (Amental[®])
- Tiron (Sigma)
- Tris HCl (Sigma)

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e mantidas no congelador a -20° C. Exceto Indometacina (preparada em solução TRIS/bicarbonato de sódio) e SQ (preparado em – etanol absoluto).

5 RESULTADOS

5.1 VALORES DE MASSA CORPORAL

Os animais do grupo Controle e Óleo de Linhaça apresentaram peso semelhante no início (Controle = $250 \pm 2,6$ g, n= 21; Óleo de Linhaça = $254 \pm 2,47$ g, n=17; $p > 0,05$) e ao final do tratamento (Controle = $314 \pm 2,83$ g, n= 21; Óleo de Linhaça = $318 \pm 2,16$ g, n=17; $p > 0,05$), sugerindo que a exposição ao óleo de linhaça por quinze dias não teve influência no ganho de peso corporal.

5.2 EFEITO DO TRATAMENTO POR QUINZE DIAS COM O ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS

A fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico) promoveu resposta vasoconstritora concentração-dependente nos anéis de aorta de ambos os grupos (Figura 7). No entanto, a resposta máxima no grupo óleo de linhaça foi maior comparada à resposta de segmentos arteriais de animais do grupo controle (Tabela 1).

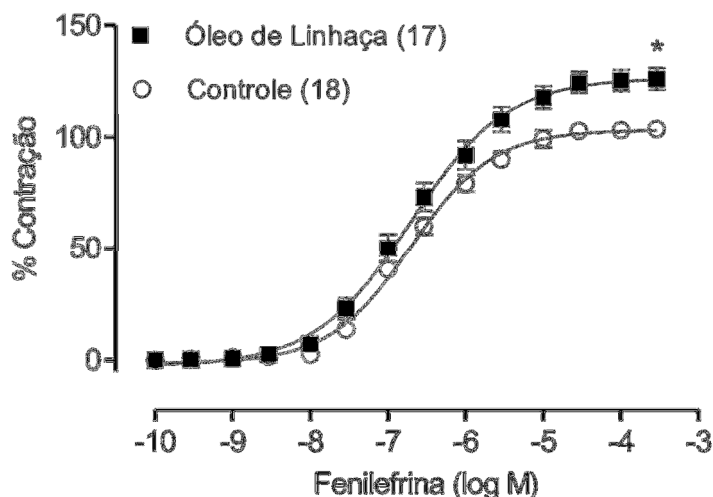


Figura 7: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça, após quinze dias de tratamento. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM. Teste t-Student não pareado, * $p < 0,05$ vs Controle.

Tabela 1: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e Sensibilidade (pD_2) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta dos grupos Controle e Óleo de Linhaça

	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
Controle	$103 \pm 3,17$	$6,69 \pm 0,06$
Óleo de Linhaça	$129 \pm 5,11^*$	$6,68 \pm 0,10$

Os valores estão expressos em média e EPM. Teste t-Student não pareado, * $p < 0,05$ vs Controle.

5.3 EFEITO DO TRATAMENTO POR QUINZE DIAS COM O ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA

O relaxamento mediado pelo endotélio foi avaliado através da curva concentração-resposta à ACh. Como mostra na Figura 8, nenhuma diferença estatística significativa foi observada nos valores de $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 entre os grupos estudados (Tabela 2).

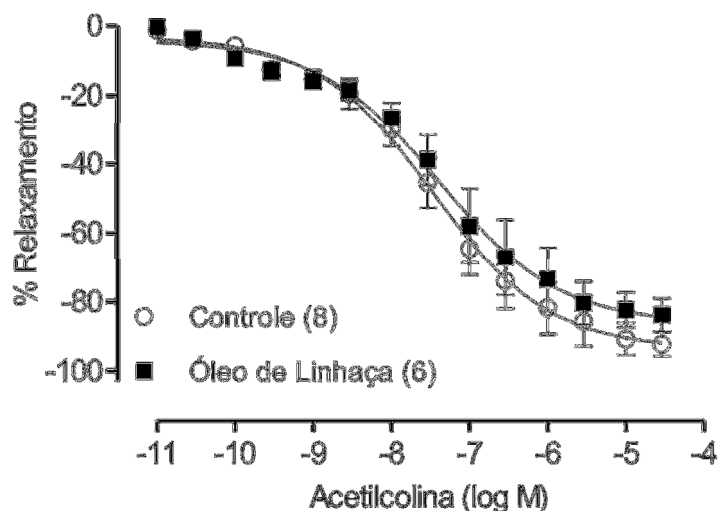


Figura 8: Curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça, após quinze dias de tratamento. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM. Teste t-Student não pareado, $p > 0,05$.

Tabela 2: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas de relaxamento induzidos pela acetilcolina em aorta de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça

	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
Controle	$84,76 \pm 5,76$	$6,69 \pm 0,06$
Óleo de Linhaça	$83,86 \pm 4,81$	$6,68 \pm 0,10$

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste T-Student não pareado, $p > 0,05$.

5.4 EFEITO DO TRATAMENTO POR QUINZE DIAS COM O ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA

O relaxamento mediado pelo endotélio foi avaliado através da curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS). A resposta ao relaxamento induzida pelo NPS não foi diferente nos grupos estudados (Figura 9), tanto para pD_2 quanto para $R_{m\acute{a}x}$ (Tabela 3).

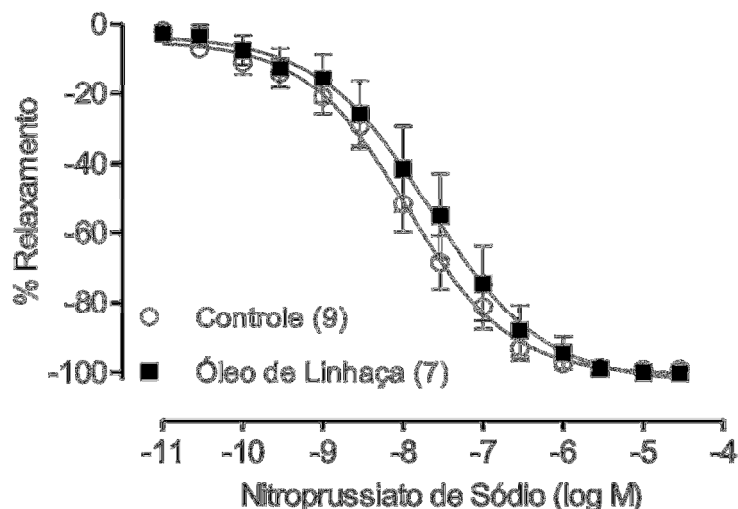


Figura 9: Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça, após quinze dias de tratamento. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM. Teste t-Student não pareado, $p > 0,05$.

Tabela 3: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas de relaxamento induzidos pelo nitroprussiato de sódio em aorta de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça

	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
Controle	$99,11 \pm 0,88$	$8,11 \pm 0,31$
Óleo de Linhaça	$100 \pm 0,11$	$7,72 \pm 0,32$

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste T-Student não pareado, $p > 0,05$.

5.5 MODULAÇÃO ENDOTELIAL NO TRATAMENTO POR QUINZE DIAS COM O ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS

A remoção mecânica do endotélio aumentou a resposta contrátil nos grupos Controle (Figura 10 A) e Óleo de Linhaça (Figura 10 B), aumentando a resposta máxima apenas no grupo controle. Já a sensibilidade foi aumentada em ambos os grupos após remoção do endotélio (Tabela 4).

A análise da %dAUC mostrou que a modulação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina em ratos tratados por quinze dias com óleo de linhaça é significativamente menor quando comparados ao grupo Controle (%dAUC

Controle = $73,46 \pm 13,41$ vs. Óleo de Linhaça = $21,44 \pm 12,47$, $p < 0,05$) (Figura 10 C).

E ainda, na Figura 11 quando as curvas Controle E- e Óleo de Linhaça E- são comparadas, observa-se sobreposição das curvas, confirmando que as alterações provocadas pelo tratamento com óleo de linhaça ocorrem somente em nível endotelial.

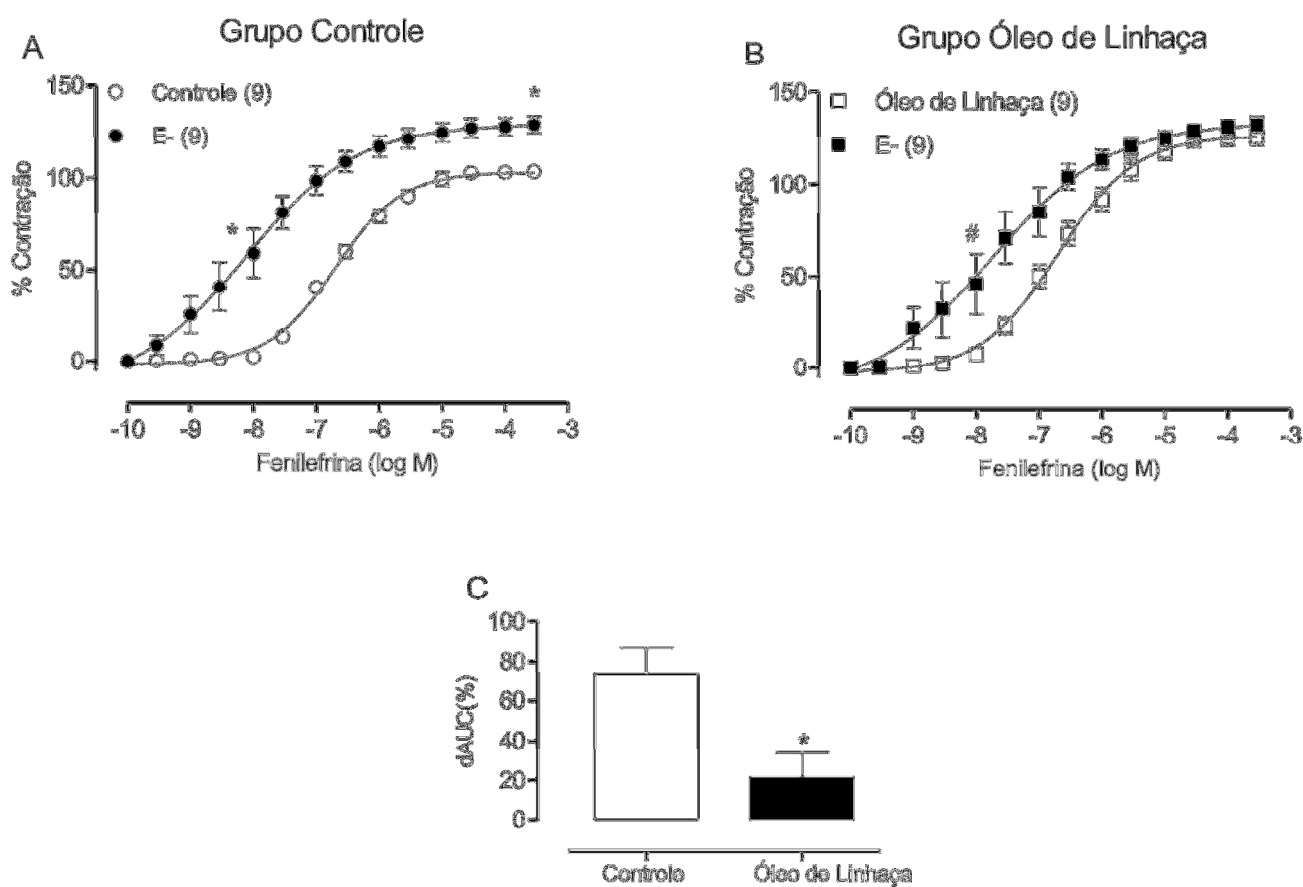


Figura 10: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos: (A) Controle e após a retirada do endotélio (E-); (B) Óleo de Linhaça e após a retirada do endotélio (E-); (C) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo entre os grupos. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não pareado. * $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Controle, # $p < 0,05$ vs pD_2 de Óleo de Linhaça.

Tabela 4: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis com e sem endotélio (E-) dos grupos Controle e Óleo de Linhaça

	R _{máx} (%)	pD ₂
Controle	103 ± 3,17	6,69 ± 0,06
Controle E-	129 ± 4,63*	10,09 ± 1,67*
Óleo de Linhaça	129 ± 5,11	6,68 ± 0,1
Óleo de Linhaça E-	133 ± 4,42	7,84 ± 0,36 [#]

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste T-Student não pareado, *p<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Controle, [#]p<0,05 vs pD₂ de Óleo de Linhaça.

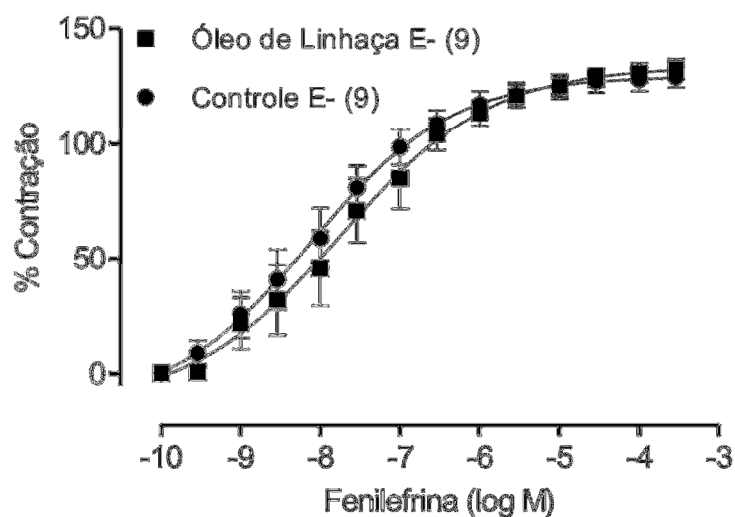


Figura 11: Curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle na ausência do endotélio (E-) e Óleo de Linhaça na ausência do endotélio (E-). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; Teste t-Student não pareado. p>0,05 para pD₂ e R_{máx}.

5.6 EFEITO DOS FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO TRATAMENTO POR QUINZE DIAS COM O ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA

Os resultados apresentados anteriormente mostraram que o tratamento com óleo de linhaça induz um aumento da resposta máxima à fenilefrina. A remoção do endotélio aumentou a reatividade em ambos os grupos, mas esse aumento ocorreu em menor magnitude no grupo Óleo de Linhaça, indicando que o tratamento com óleo de linhaça leva à redução da modulação endotelial em resposta à fenilefrina. Para verificar a influência dos fatores endoteliais na resposta à fenilefrina, investigamos algumas vias de agentes vasoativos derivados do endotélio.

5.6.1 Participação da via do óxido nítrico no tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

Para entender se o tratamento com óleo de linhaça alterou a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina, utilizou-se L-NAME (100 μ M), um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase. O L-NAME provocou aumento da $R_{m\acute{a}x}$ e da pD_2 artérias de ambos os grupos (Figuras 12 A e B) – (Tabela 5). No entanto, ao calcular a %dAUC foi possível observar que o aumento da reatividade à fenilefrina provocado pelo L-NAME ocorreu de forma similar entre os grupos Controle e Óleo de Linhaça (%dAUC Controle = $88,95 \pm 33,48$ vs. Óleo de Linhaça = $98,39 \pm 49,21$, $p > 0.05$) (Figura 12 C). Estes resultados sugerem que a participação do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina não foi afetada pelo tratamento com óleo de linhaça.

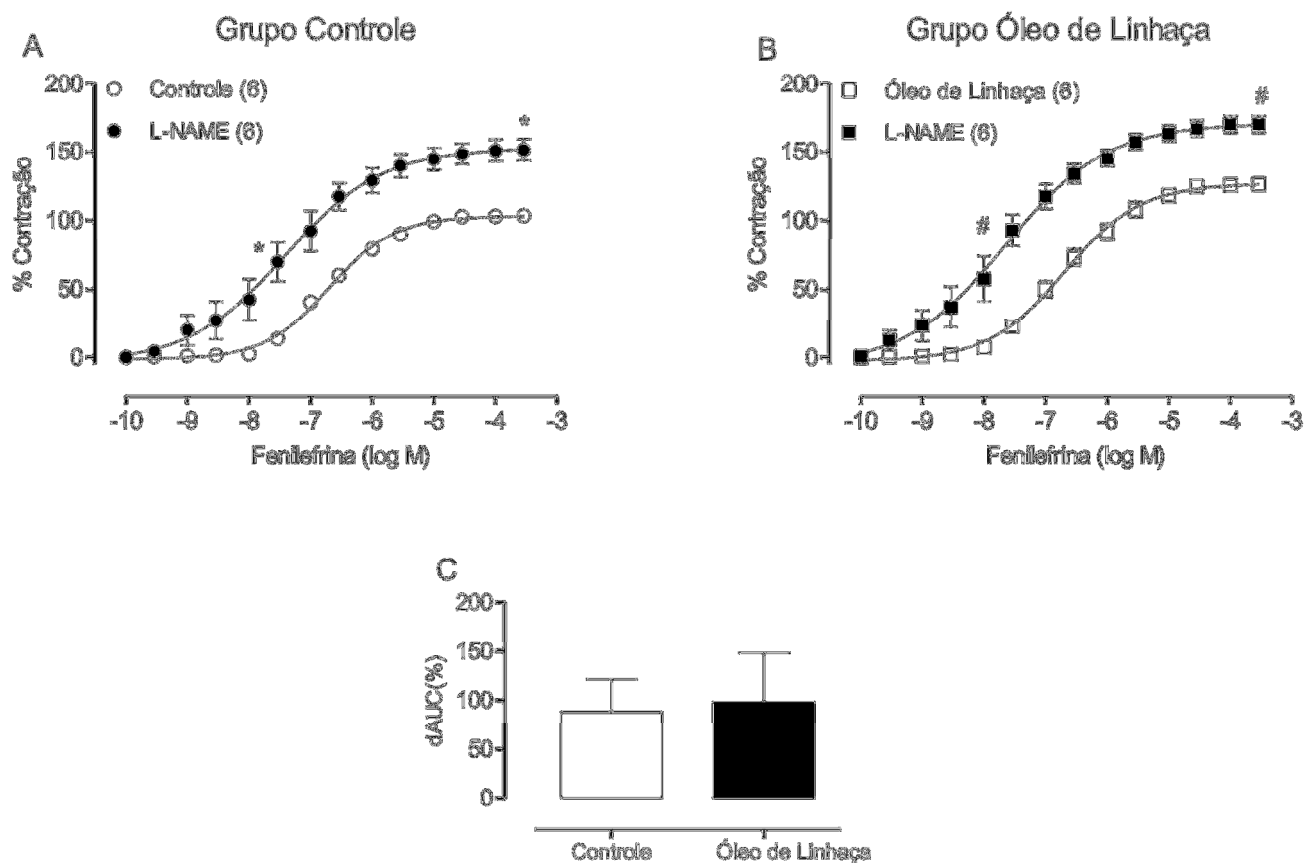


Figura 12: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de L-NAME em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Óleo de Linhaça (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não de L-NAME (C). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não pareado. * $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Controle, # $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Óleo de Linhaça.

Tabela 5: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de L-NAME em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça

	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
Controle	$103 \pm 3,17$	$6,69 \pm 0,06$
L-NAME	$151 \pm 7,96^*$	$8,28 \pm 0,74^*$
Controle Óleo de Linhaça	$129 \pm 5,11$	$6,68 \pm 0,10$
Óleo de Linhaça L-NAME	$170 \pm 6,25^\#$	$8,11 \pm 0,43^\#$

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste T-Student não pareado, * $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Controle, # $p < 0,05$ vs $R_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de Óleo de Linhaça.

5.6.2 Participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase (COX) no tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

Para estudar a influência dos prostanóides derivados da via da COX sobre a resposta contrátil à fenilefrina em segmentos de aorta torácica de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça, foi realizada uma sequência de experimentos de reatividade vascular após incubação dos anéis aórticos com indometacina (inibidor não seletivo da COX); NS 398 (inibidor seletivo da COX-2); SQ 29,548 (antagonista do receptor TP) e furegrelato (inibidor da síntese do TXA₂).

O inibidor não seletivo da COX, indometacina (10 µM) reduziu a R_{máx} e pD₂ à fenilefrina nos segmentos aórticos de ratos dos grupos Controle (Figura 13 A) e Óleo de Linhaça (Figura 13 B) – (Tabela 6). No entanto, quando comparados os efeitos da inibição da COX, através da área abaixo da curva (%dAUC Controle = 25,18 ± 8,86 e Óleo de Linhaça = 55,96 ± 7,52, p < 0,05) entre os dois grupos estudados, observa-se efeito de maior magnitude nos animais do grupo Óleo de Linhaça (Figura 13 C). Estes resultados sugerem que os prostanóides vasoconstritores derivados da COX estão envolvidos no aumento da resposta à fenilefrina.

Sabendo que o tratamento com óleo de linhaça aumenta a participação dos prostanóides contráteis derivados da COX na resposta vascular à fenilefrina verificamos se, estes prostanóides, são derivados da COX-2. Sendo assim, o inibidor específico da COX-2, o NS 398 (1 µM) foi incubado aos anéis de aorta. Este fármaco promoveu redução da R_{máx} à fenilefrina somente no grupo Óleo de Linhaça (Figura 14 A e B) – (Tabela 7).

Diante das evidências de maior participação dos prostanóides derivados da COX-2 na resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta dos ratos tratados com óleo de linhaça, foi investigado se o tratamento com óleo de linhaça promove aumento da participação do TXA₂ na resposta contrátil à fenilefrina. Foi então, adicionado aos segmentos aórticos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça o inibidor da sintase do TXA₂, furegrelato (1 µM). Este reduziu a resposta contrátil à fenilefrina somente nos anéis de aorta de ratos tratados com óleo de linhaça, apresentando diferença estatística à R_{máx} e pD₂ (Figura 14 C e D) – (Tabela 7).

Para estudar se estes prostanóides agem através da ativação dos receptores TP, foram realizados experimentos de reatividade vascular a fenilefrina em anéis de aorta pré-incubados com o antagonista do receptor TP, SQ 29,548 (1 μ M). Este fármaco reduziu a resposta máxima à fenilefrina somente nos segmentos arteriais de ratos do grupo Óleo de Linhaça (Figura 14 E e F) – (Tabela 7).

Por fim, um inibidor da PLA₂, dexametasona (1 μ M), foi utilizado para investigar a participação da enzima PLA₂ sobre a resposta contrátil à fenilefrina. Foi observado redução da reatividade à fenilefrina apenas no grupo Óleo de Linhaça (Figura 14 G e H), sem alterar a sensibilidade (Tabela 7).

A análise desses resultados sugere que o tratamento com óleo de linhaça promove maior participação dos prostanóides derivados da COX-2, em especial do TXA₂, sendo que este último parece agir principalmente por meio da ativação dos receptores TP.

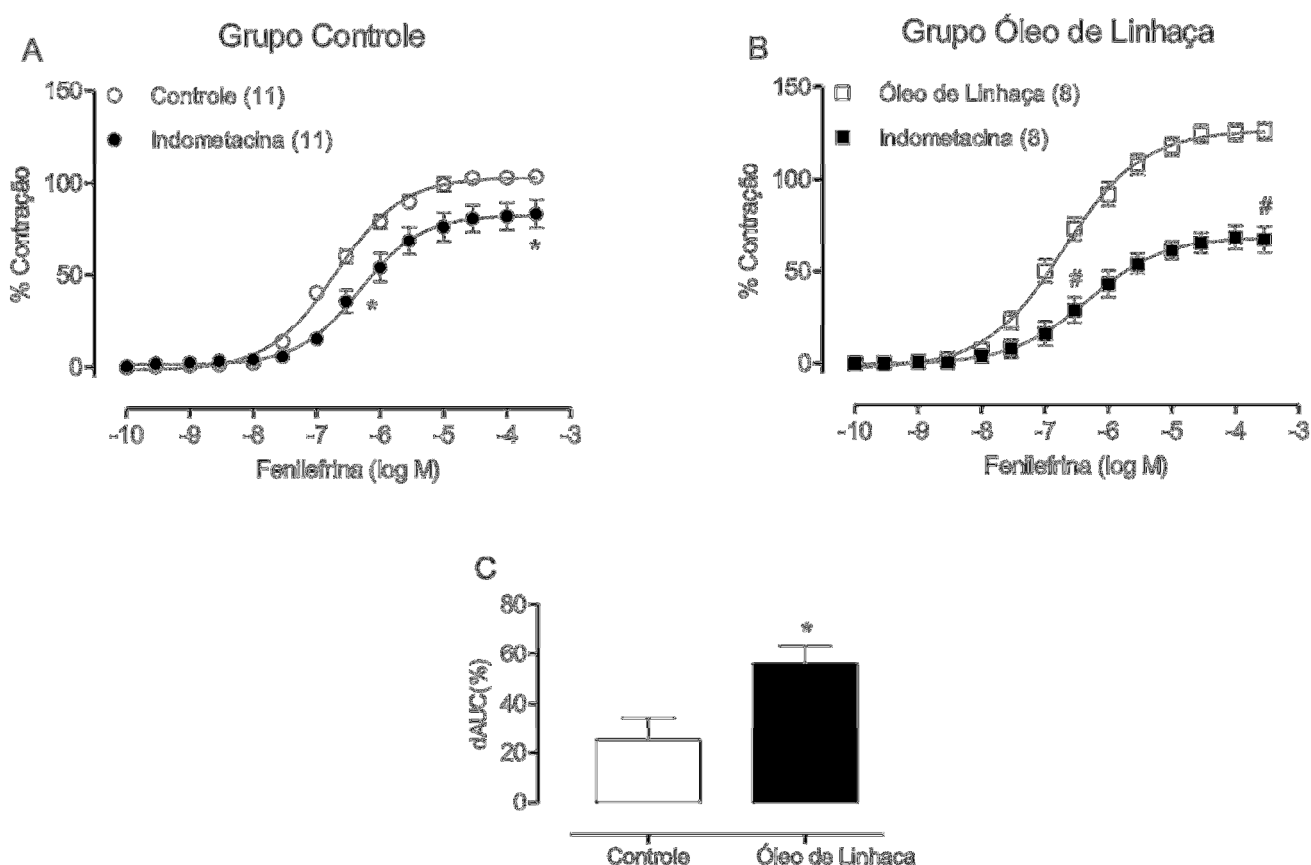


Figura 13: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de Indometacina em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle (A) e Óleo de Linhaça (B). Diferença percentual da área abaixo da curva de anéis de aorta na presença ou não de Indometacina (C). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não pareado. * $p < 0,05$ vs pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$ para Controle, # $p < 0,05$ vs pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$ para Óleo de Linhaça.

Tabela 6: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de Indometacina em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça

	R _{máx} (%)	pD ₂
Controle	103 ± 3,17	6,69 ± 0,06
Controle Indometacina	83,37 ± 7,62*	6,21 ± 0,12*
Óleo de Linhaça	129 ± 5,11	6,68 ± 0,10
Óleo de Linhaça Indometacina	64,48 ± 7,77 [#]	6,22 ± 0,17 [#]

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste T-Student não pareado, *p<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Controle, [#]p<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Óleo de Linhaça.

Tabela 7: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de NS 398; Furegrelato; SQ 29,548 e Dexametasona em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça

	R _{máx} (%)	pD ₂
NS 398		
Controle	103 ± 3,17	6,69 ± 0,06
Controle NS 398	108 ± 7,40	6,58 ± 0,08
Óleo de Linhaça	129 ± 5,11	6,68 ± 0,10
Óleo de Linhaça NS 398	89,83 ± 6,86*	6,46 ± 0,17
Furegrelato		
Controle	103 ± 3,17	6,69 ± 0,06
Controle Furegrelato	102 ± 9,74	6,62 ± 0,10
Óleo de Linhaça	129 ± 5,11	6,68 ± 0,10
Óleo de Linhaça Furegrelato	95,67 ± 7,64*	5,98 ± 0,20*
SQ 29,548		
Controle	103 ± 3,17	6,69 ± 0,06
Controle SQ 29,548	96,56 ± 9,74	6,80 ± 0,08
Óleo de Linhaça	129 ± 5,11	6,68 ± 0,10
Óleo de Linhaça SQ 29,548	93,44 ± 8,54*	6,62 ± 0,12
Dexametasona		
Controle	103 ± 3,17	6,69 ± 0,06
Controle Dexametasona	97,43 ± 6,69	6,52 ± 0,04
Óleo de Linhaça	129 ± 5,11	6,68 ± 0,10
Óleo de Linhaça Dexametasona	101 ± 5,99*	6,62 ± 0,11

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste T-Student não pareado, *p<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Óleo de Linhaça.

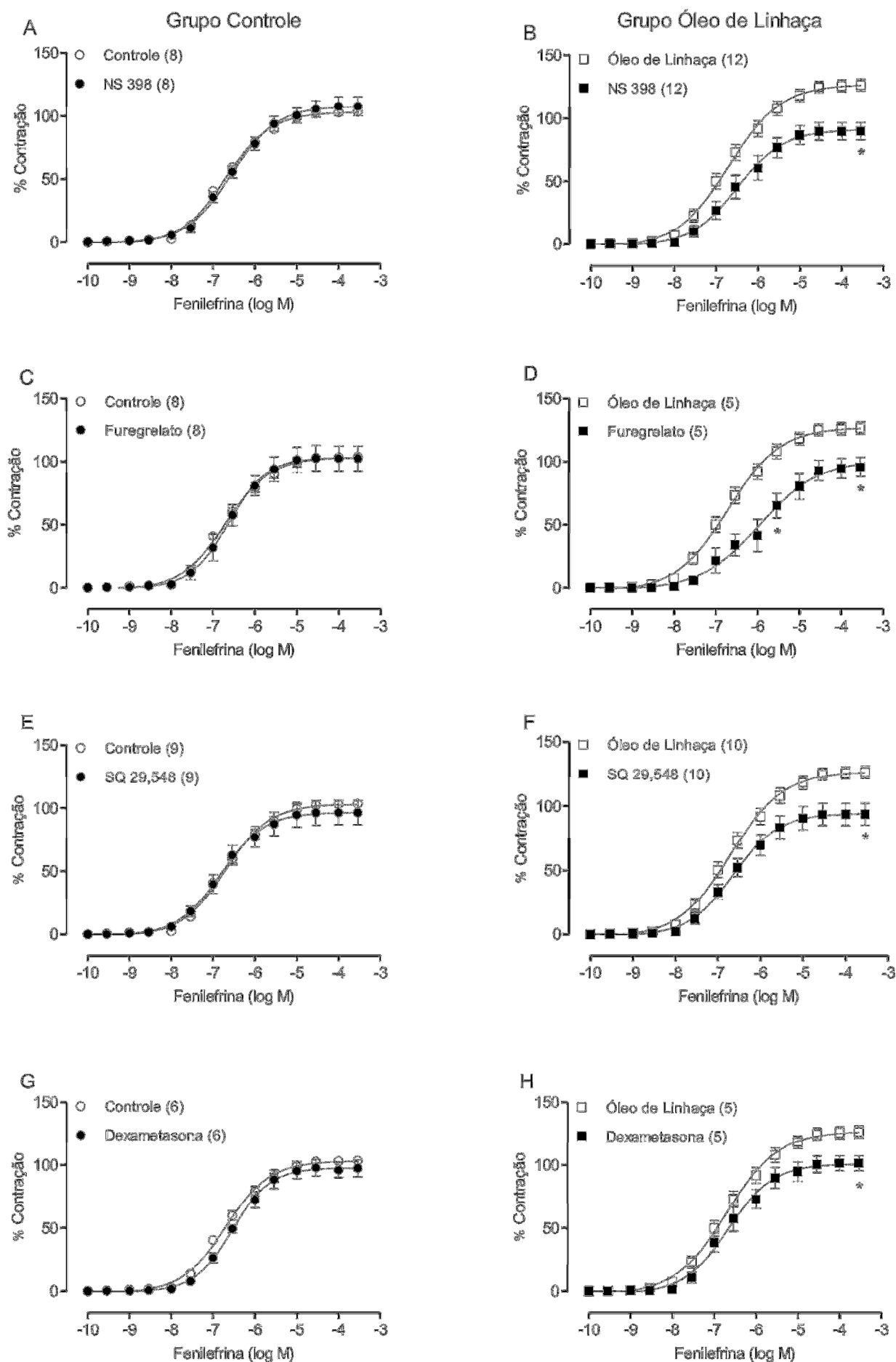


Figura 14: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de NS 398 (A e B); Furegrelato (C e D); SQ 29, 548 (E e F) e Dexametasona (G e H) em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não pareado. * $p < 0.05$ vs pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$ para Óleo de Linhaça.

5.6.2.1 Expressão proteica da isoforma constitutiva da ciclooxygenase-2 (COX-2)

Com base nos resultados funcionais encontrados a expressão protéica da isoforma da COX-2 foi quantificada através da técnica de Western Blot em segmentos aórticos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça. Foi observado maior expressão dessa subunidade nos segmentos aórticos de ratos tratados com óleo de linhaça (Controle = $0,92 \pm 0,13$, $n=6$; Óleo de Linhaça = $1,64 \pm 0,24$, $n=6$; $p < 0,05$) (Figura 15).

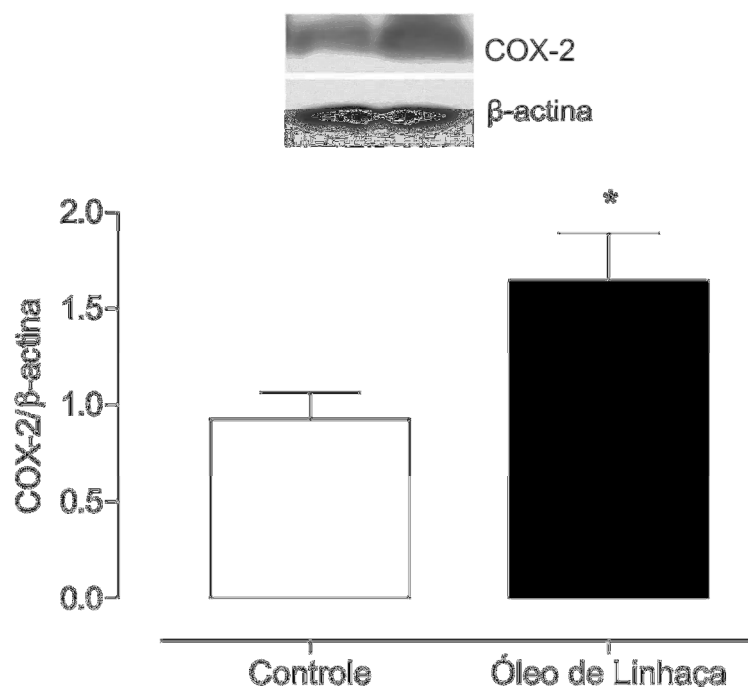


Figura 15: Resultados da expressão proteica da isoforma da COX-2, por meio da técnica de Western Blot, em arcos aórticos dos grupos Controle ($n= 6$) e Óleo de Linhaça ($n= 6$). Na parte superior da figura estão representadas as bandas obtidas pela técnica, correspondendo a isoforma da COX-2 e a β -actina. Os resultados estão expressos como média \pm EPM, entre a densidade das bandas da COX-2 e da β -actina. Teste t-Student não pareado, $*p<0,05$.

5.6.3 Participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) no tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

Alguns autores sugerem que os derivados da COX-2 modulam a disponibilidade de O_2^- por afetar a NADPH oxidase (Martínez-Revelles et al., 2013), culminando em ação vasoconstritora. Com isso, a participação das EROs na resposta contrátil à fenilefrina foi avaliada utilizando-se um inibidor da NADPH oxidase, apocinina (10 μ M); um “varredor” de ânion superóxido, tiron (1 mM); e um “varredor” de peróxido de hidrogênio, catalase (1000 U·mL⁻¹). A exposição dos anéis de aorta a apocinina e tiron reduziram a resposta à fenilefrina apenas em anéis do grupo Óleo de Linhaça (Figura 16 A, B, C e D) - (Tabela 8). Na presença de catalase nenhuma diferença foi observada em ambos os grupos tratados (Figura 16 E e F) - (Tabela 8), sugerindo que não há a participação de peróxido de hidrogênio.

Juntos, esses resultados sugerem que o tratamento com óleo de linhaça por quinze dias promove maior produção de prostanóides vasoconstritores através da COX-2, o que pode contribuir para o aumento dos radicais livres, como previamente descrito (Martínez-Revelles et al., 2013).

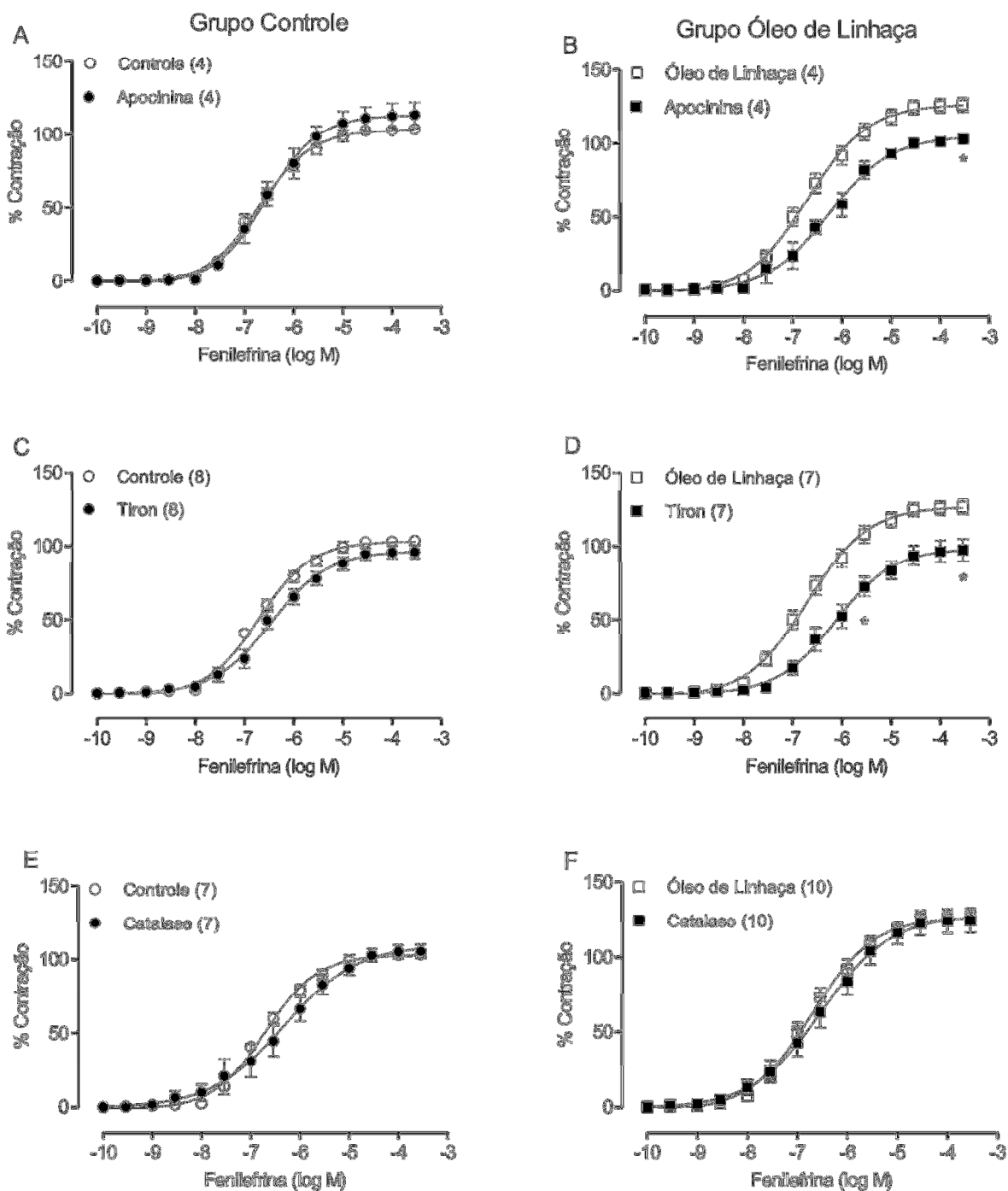


Figura 16: Curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de Apocinina (A e B); Tiron (C e D) e Catalase (E e F) em anéis isolados de aorta de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça. Os símbolos representam média \pm EPM; Teste t-Student não pareado. * $p < 0,05$ vs pD_2 e $R_{m\acute{a}x}$ para Óleo de Linhaça.

Tabela 8: Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença ou não de Apocinina; Tiron e Catalase em anéis aórticos obtidos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça

	R _{máx} (%)	pD ₂
Apocinia		
Controle	103 ± 3,17	6,69 ± 0,06
Controle Apocinia	113 ± 8,80	6,53 ± 0,11
Óleo de Linhaça	129 ± 5,11	6,68 ± 0,10
Óleo de Linhaça Apocinia	103 ± 2,12*	6,29 ± 0,21
Tiron		
Controle	108 ± 3,17	6,69 ± 0,06
Controle Tiron	96,05 ± 4,39	6,45 ± 0,13
Óleo de Linhaça	129 ± 5,11	6,68 ± 0,10
Óleo de Linhaça Tiron	97,09 ± 7,60*	6,12 ± 0,17*
Catalase		
Controle	103 ± 3,17	6,69 ± 0,06
Controle Catalase	106 ± 4,58	6,48 ± 0,31
Óleo de Linhaça	129 ± 5,11	6,68 ± 0,10
Óleo de Linhaça Catalase	124 ± 8,09	6,68 ± 0,10

Os valores estão expressos como média e EPM. Teste T-Student não pareado, *p<0,05 vs R_{máx} e pD₂ de Óleo de Linhaça.

5.6.3.1 Quantificação da produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) *in situ* através da fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio (DHE)

Para verificar a influência do tratamento com óleo de linhaça por quinze dias sobre a produção de $O_2^{\cdot-}$ *in situ* foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do DHE.

Corroborando com os resultados funcionais encontrados, a produção de $O_2^{\cdot-}$ foi significativamente maior nos anéis de aorta dos animais tratados com óleo de linhaça quando comparado aos animais controle (Controle = $49,81 \pm 3,52$, $n=6$; Óleo de Linhaça = $70,27 \pm 6,4$, $n=5$; $p < 0,05$) (Figura 17).

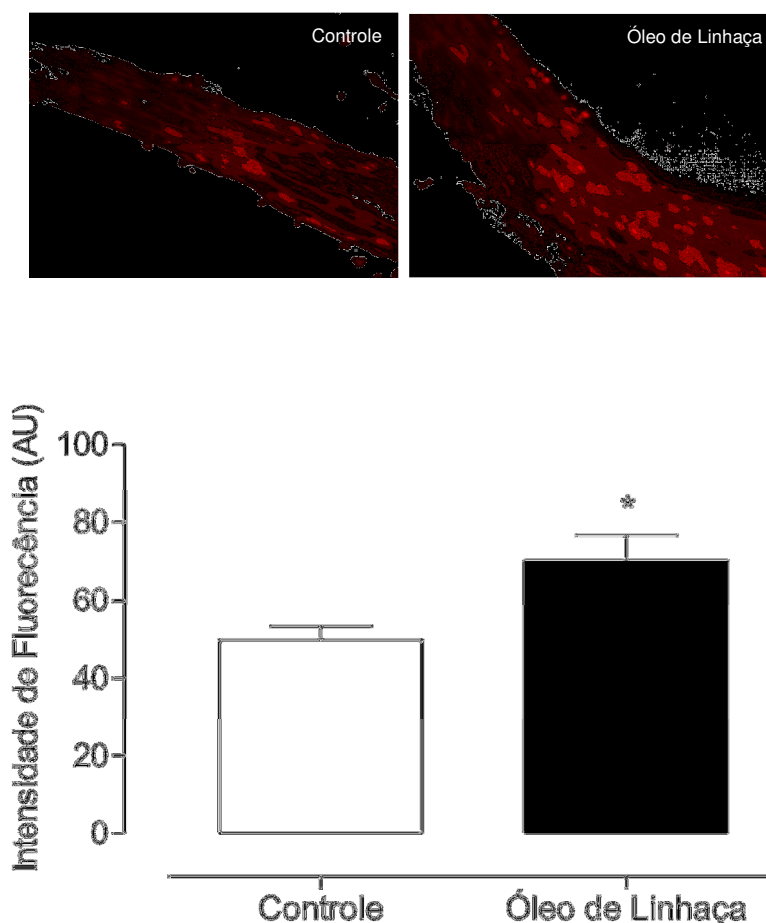


Figura 17: Imagens de micrografia representam a fluorescência emitida por dihidroetídio em segmentos de ratos dos grupos Controle e Óleo de Linhaça. Gráfico com valores médios da fluorescência emitida por dihidroetídio. Teste T-Student não pareado, $p < 0,05$. Aumento de 40x para fotografar.

5.7 EFEITO DO TRATAMENTO COM ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE O STRESSE OXIDATIVO PLASMÁTICOS E PARÂMETRO INFLAMATÓRIO

Com o intuito de verificar se o estado oxidante (estresse oxidativo) e parâmetros inflamatórios são alterados pelo tratamento com óleo de linhaça, foram realizadas medidas da produção de malondialdeído no plasma e proteína C-reativa no soro, respectivamente.

Como observado na Figura 18, os níveis plasmáticos de malondialdeído (Controle = $0,46 \pm 0,02$, n= 6; Óleo de Linhaça = $0,47 \pm 0,04$, n=6; $p > 0,05$) e concentrações de proteína C-reativa (Controle = $0,9 \pm 0,08$, n=6; Óleo de Linhaça = $0,88 \pm 0,23$, n=6; $p > 0,05$) não foram alterados após tratamento com óleo de linhaça durante quinze dias.

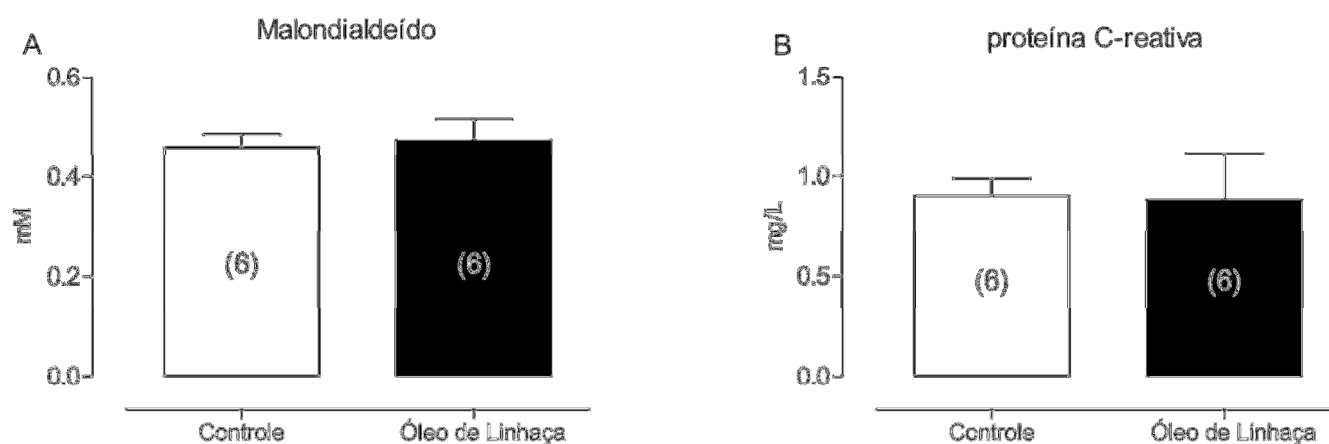


Figura 18: Medida da produção de MDA plasmática e proteína C-reativa de ratos do grupo Controle e Óleo de Linhaça. Dados estão expressos em média \pm EPM; Teste t-Student não pareado. $p > 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo apontam, pela primeira vez, os efeitos do tratamento i.m. com óleo de linhaça durante quinze dias sobre a reatividade vascular de aorta em ratos. A exposição ao óleo de linhaça foi capaz de alterar o funcionamento dessa importante artéria de condutância, promovendo maior reatividade à fenilefrina. Esta resposta é endotélio-dependente e, decorrente da ação dos prostanóides derivados da COX-2, em especial do TXA₂, e da produção de ânion superóxido. Reforçando esses dados, também foi observado maior expressão proteica de COX-2 e maior produção *in situ* de ânion superóxido.

Embora tenha sido observado maior liberação de prostanóides derivados da COX-2 em nível vascular, não houve alteração na medida de proteína C-reativa no soro. Além disso, não foram observadas alterações na peroxidação lipídica avaliada através das concentrações plasmáticas de malondialdeído, embora o tratamento com óleo de linhaça tenha aumentado o estresse oxidativo. No entanto, o fato de não encontrarmos alterações nesses parâmetros, não podemos excluir um possível efeito do tratamento. Embora tenhamos analisado esses parâmetros, malondialdeído e proteína C-reativa, outras avaliações são importantes, como as medidas de 6-isoprostano e da α_1 -glicoproteína ácida ou α_2 -macroglobulina.

Com intuito de esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos na resposta promovida pelo óleo de linhaça sobre a reatividade vascular em anéis isolados de aorta, os resultados encontrados neste trabalho serão discutidos adiante.

6.1 EFEITO DO ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA

As células do músculo liso vascular, assim como as demais células musculares, dependem diretamente de um aumento na concentração de cálcio citoplasmático para deflagrar sua contração, como na presença de agentes vasoconstritores que se ligam a receptores específicos (agonistas α_1 adrenérgico: fenilefrina e noradrenalina) (Horowitz et al., 1996), assim como a despolarização

da membrana induzida, por exemplo, pelo aumento da concentração de potássio extracelular (Ganitkevich & Isenberg, 1991).

Concentrações aumentadas de K^+ no meio extracelular promovem despolarização da membrana plasmática e abertura de canais para cálcio dependentes de voltagem (Berridge et al., 2003). O aumento da concentração de cálcio intracelular resulta na ativação da quinase da cadeia leve da miosina e fosforilação da miosina. Uma vez fosforilada, a miosina interage com os filamentos de actina, produzindo a contração (Somlyo & Somlyo, 2000). Sendo assim, o KCl atua como um agente despolarizante promovendo influxo de cálcio, resultando no aumento intracelular deste íons, o que permite maior sensibilidade as proteínas contráteis culminando na contração do músculo liso (Ratz et al., 2005).

Já os agonistas, ligam-se a receptores específicos da membrana da célula muscular lisa que são acoplados à proteína G, que por sua vez, ativa a fosfolipase C (PLC) que hidrolisa a fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2), resultando em 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 estimula a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, enquanto que o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) resultando em maior mobilização de cálcio através de canais da membrana, o que aumenta a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio e fosforilação da cadeia leve da miosina. Todos esses mecanismos aumentam a concentração intracelular de cálcio (Blaustein & Hamlyn, 2010).

No presente estudo, observamos que o tratamento i.m. com óleo de linhaça por quinze dias induziu aumento da resposta contrátil à fenilefrina em anéis isolados de aorta, sem alteração da resposta ao KCl. Dupasquier e colaboradores (2006) não observaram diferenças nas respostas contráteis à norepinefrina ou ao KCl em aorta de coelhos expostos por 6, 8 e 16 semanas, a dieta regular ou dieta enriquecida com 10% de semente de linhaça moída suplementada na ração dos animais. O mesmo foi observado por Talom e colaboradores (1999) em ratos Wistar, após 11 semanas de tratamento com dieta enriquecida com alta quantidade de linhaça, ou seja, não observaram diferença na reatividade à fenilefrina entre os grupos controle e tratado.

Os resultados conflitantes provavelmente devem-se a forma de exposição da linhaça aos animais e também ao tempo de tratamento. Os referenciados utilizaram a semente de linhaça no tratamento dos animais, diferente também do

presente estudo que fez uso do óleo de linhaça. É importante ressaltar que os trabalhos que utilizam a semente de linhaça podem sofrer influência de outros compostos que enriquecem este grão, como a lignana, um fitoestrógeno (Morris, 2003). O tratamento e a via de exposição do presente estudo foram escolhidos como forma de controlar a dose recebida por cada animal diariamente, além de avaliar o efeito direto de uma fonte rica em ALA na função vascular, uma vez que este óleo é destituído de qualquer outro composto de influência, concentrando-se em PUFA (Ganorkar & Jain, 2013; Morris, 2001).

Sabendo que o endotélio é capaz de modular o tônus vascular por meio da liberação de substâncias vasoconstritoras ou vasodilatadoras (Carvalho et al., 2001), a ação deste tecido pode estar envolvida no aumento da reatividade à fenilefrina de anéis de aorta de ratos tratados com óleo de linhaça. Sendo assim, foram realizados protocolos experimentais em seguimentos de artérias onde o endotélio foi removido mecanicamente, excluindo a ação deste sobre o tônus vascular.

6.2 EFEITO DO TRATAMENTO DO ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE A MODULAÇÃO ENDOTELIAL

A remoção do endotélio promoveu aumento similar na resposta contrátil à fenilefrina nos dois grupos, sugerindo que o tratamento i.m. com óleo de linhaça afeta a função endotelial. Confirmando este achado, quando comparada a %dAUC, a magnitude da resposta à fenilefrina foi menor nos anéis do grupo Óleo de Linhaça. Estes resultados sugerem que a habilidade do endotélio em modular negativamente a resposta contrátil induzida à fenilefrina pode estar prejudicada nos anéis de aorta dos ratos tratados com óleo de linhaça. E ainda, este achado, associado ao aumento da reatividade à fenilefrina sugere que o tratamento por quinze dias com óleo de linhaça reduz a liberação de um fator vasodilatador, e/ou aumenta a liberação de um vasoconstrictor dependente do endotélio.

O conhecimento sobre a função da célula endotelial vascular mudou muito nas últimas décadas, quando Furchgott e Zawadzki (1980), demonstraram que a célula endotelial modula o tônus vascular. Além de manter a conexão de toda a

rede endotelial, as células endoteliais são capazes de controlar ativamente o tônus vascular, a homeostase, a coagulação, o remodelamento vascular e as respostas inflamatória e imune (Félétou & Vanhoutte, 2009). O endotélio sintetiza e libera substâncias vasoativas que modulam o tônus, o calibre do vaso e o fluxo sanguíneo, sendo estas denominadas fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs) (Furchgott & Zawadzki, 1980).

Dentre as substâncias vasodilatadoras liberadas pelo endotélio podemos citar, o NO, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Furchgott & Zawadzki, 1980) e a prostaciclina (Moncada et al., 1977). Dentre os fatores contráteis temos, a angiotensina II (Skeegs, 1954), a endotelina-1 (ET-1) (Yanagisawa et al., 1988), o ânion superóxido (Rubanyi & Vanhoutte, 1986) e os derivados da via do ácido araquidônico, o TXA_2 e as prostaglandinas H_2 e $\text{F}_{2\alpha}$ (PGH_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$) (Frölich & Förstermann, 1989). O desequilíbrio da biodisponibilidade destes agentes vasoativos, como o aumento da produção e/ou biodisponibilidade de substâncias vasoconstritoras ou o aumento de substâncias vasodilatadoras, pode afetar o tônus resultando em prejuízo na homeostasia vascular (Rattmman, 2009) (Figura 19).

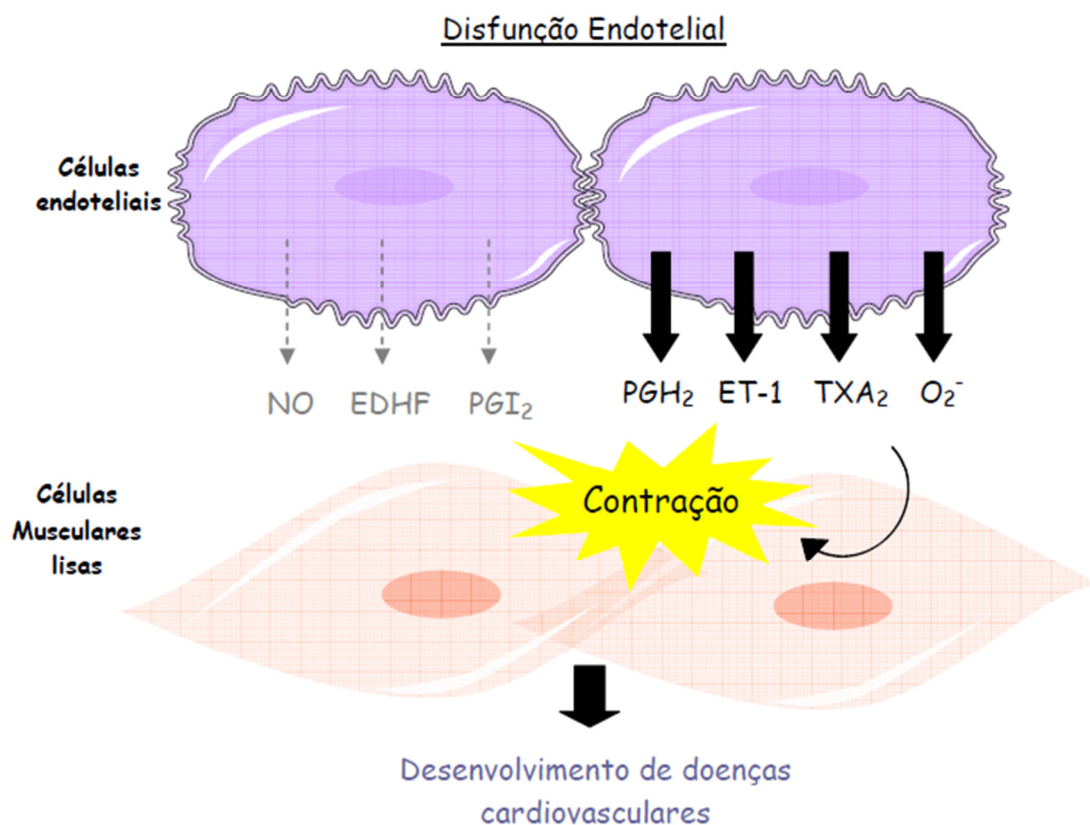


Figura 19: Disfunção endotelial: alteração considerada precursora das doenças cardiovasculares. As flechas pontilhadas indicam diminuição da secreção, enquanto as flechas espessas indicam aumento da secreção (Rattmman, 2009).

Sabendo que o tratamento i.m. com óleo de linhaça por quinze dias acarreta em prejuízo da função endotelial, foi investigada a resposta vasodilatadora dependente do endotélio por meio de curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis pré-contraídos com fenilefrina. A acetilcolina liga-se ao receptor muscarínico (M2) levando ao aumento da concentração intracelular de cálcio, o qual ativa a formação e liberação de NO pela ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). O NO se difunde para o músculo liso vascular, ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) promovendo o aumento da concentração intracelular de GMPc. O GMPc ativa a proteína quinase G (PKG) que fosforila diversas proteínas, reduzindo a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, culminando com o relaxamento do vaso por hiperpolarização do músculo liso vascular (Rattmann, 2009) (Figura 20).

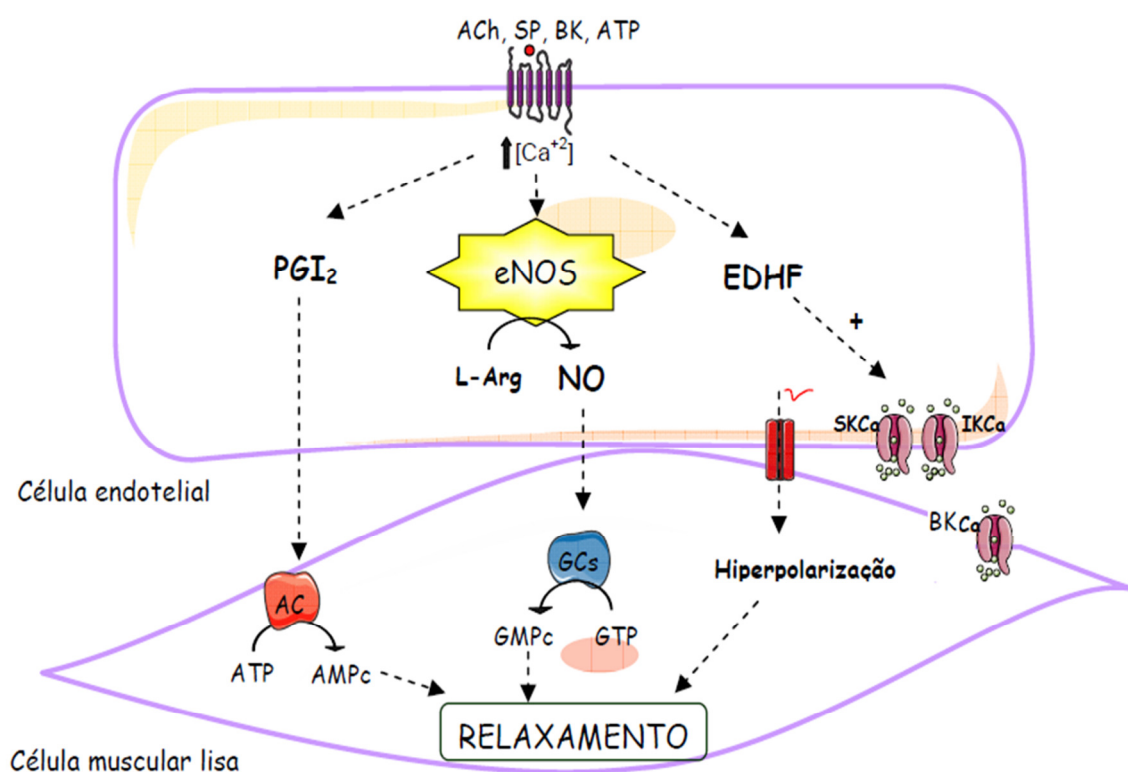


Figura 20: Fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio vascular. São três as principais vias endoteliais que geram a vasodilatação: a via da prostaciclina (PGI₂), a via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS, e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Dependendo do tipo de vaso, todas estas vias podem ser ativadas após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de sinalização ocorre o aumento da concentração intracelular do Ca^{2+} . Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Após a liberação pelas células endoteliais, estes mediadores exercem suas ações nas células musculares lisas, através da produção dos segundo mensageiros AMPc ou GMPc, ou ainda através da hiperpolarização (Rattmann, 2009).

Em contrapartida, o nitroprussiato de sódio foi utilizado para avaliar se o tratamento com óleo de linhaça prejudica o relaxamento do músculo liso vascular induzido pela doação direta de NO. Este último age estimulando a GCs que, por diversos mecanismos leva a hiperpolarização das células musculares lisas e por fim, ao vasorelaxamento (Gewaltig & Kojda, 2002).

No presente estudo foi observado que tanto a resposta vascular à acetilcolina quanto ao nitroprussiato de sódio foram semelhantes em ambos os grupos experimentais. Estes resultados sugerem que o tratamento i.m. com óleo de linhaça não alterou a produção de NO estimulada pela ACh, tão pouco modificou a capacidade de relaxamento do músculo liso vascular.

Semelhante ao obtido no presente estudo, Ogawa e colaboradores (2009) demonstraram que ratos espontaneamente hipertensos alimentados com dieta contendo 10% de óleo de linhaça por quatro semanas, não alterou a resposta vasodilatadora endotélio-dependente em aortas, embora a pressão arterial sistólica tenha reduzido significativamente. Assim como no tratamento com dieta enriquecida com linhaça não foi observado alteração no relaxamento induzido pela acetilcolina ou nitroprussiato de sódio em estudos realizados com coelhos mantidos em dieta durante 6, 8 e 16 semanas (Dupasquier et al., 2006). No entanto, Talom e colaboradores (1999), utilizaram ratos Wistar durante 11 semanas de tratamento com dieta enriquecida com alta quantidade de linhaça, observaram melhora na resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina ou nitroprussiato de sódio.

A linhaça é uma rica fonte de diglicosídeo secoisolariciresinol (SDG), uma lignana vegetal com potente efeito antioxidante (Prasad, 2000). Em um estudo realizado por Penumathsa e colaboradores (2008), em modelo de rato hipercolesterolêmico com infarto do miocárdio tratados com SDG, observaram expressão aumentada para o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), óxido nítrico sintase, heme oxigenase 1 como melhora da função cardíaca, resultado da neovascularização do miocárdio isquêmico dos ratos. Além disso, a lignana presente na linhaça tem sido associada à prevenção da progressão da aterosclerose (Prasad, 2008, 2007). Portanto, a melhora na vasodilatação, como descrito anteriormente, pode estar tendo influência da ação da lignana, sendo este último não encontrado no óleo de linhaça (Bloedon et al., 2008).

Embora o tratamento com óleo de linhaça não tenha promovido alterações nas respostas vasodilatadoras, como mencionado anteriormente, foi observado um incremento da reatividade vascular à fenilefrina. Os mecanismos pelo qual o óleo de linhaça altera a reatividade vascular à fenilefrina ainda não foram elucidados. Neste sentido, o estudo propôs investigar algumas vias que poderiam esclarecer a ação vascular desse óleo em anéis de aorta de ratos.

6.3 FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO ÓLEO DE LINHAÇA SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA

6.3.1 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a via do Óxido Nítrico

Tendo em vista os resultados apresentados anteriormente, onde o tratamento i.m. com óleo de linhaça por quinze dias aumentou a resposta vasoconstritora à fenilefrina, o passo seguinte foi investigar se a biodisponibilidade de NO está prejudicada frente à modulação endotelial diminuída do grupo óleo de linhaça.

Dentre os componentes vasoativos do endotélio, o NO se destaca pelo seu potente efeito vasodilatador e, ações que culminam em manutenção do tônus vascular, inibição da adesão e agregação plaquetária e, regulação do crescimento vascular (Cannon, 1998; Moncada et al., 1991). Sua síntese é estimulada por vários fatores, como receptores endoteliais, e pelas forças de cisalhamento produzidas pelo fluxo sanguíneo no vaso (*shear stress*) (Palmer et al., 1987).

A produção de NO ocorre a partir da metabolização do aminoácido L-arginina em NO e L-citrulina, por meio da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), na presença de oxigênio, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), tetrahydrobiopterina (BH₄), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) (Angus & Cocks, 1989; Michel & Vanhoutte, 2010). Existem três diferentes isoformas que podem sintetizar o NO: NOS endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) que são constitutivas nas células endoteliais e neuronais respectivamente, e dependentes de cálcio para ativação (Xie & Nathan,

1994). Já a forma induzível (iNOS), é expressa em grande quantidade sob condições inflamatórias, e sua ativação é independente do aumento da concentração de cálcio intracelular (Andrew & Mayer, 1999).

Uma vez liberado, o NO se difunde rapidamente para o músculo liso vascular e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel que converte trifosfato de guanidina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (Carvajal et al., 2000). O aumento da concentração de GMPc leva a ativação da proteína quinase G (PKG), que atua por diversos mecanismos, promovendo relaxamento do músculo liso vascular, sendo estes: ativação dos canais para K^+ dependentes de Ca^{2+} , inibindo a entrada de cálcio do conteúdo extracelular pelos canais de cálcio dependentes de voltagem, hiperpolarizando a membrana; atua no retículo sarcoplasmático estimulando a recaptação do Ca^{2+} fosforilando a cadeia leve da miosina, tornando-a menos sensível aos íons Ca^{2+} e aumentando a saída de Ca^{2+} pelo trocador Na^+/Ca^{2+} (Lincoln et al., 2001). E, ainda, o NO promove ativação direta de canais de K^+ e da bomba de Na^+ (Triggle et al., 2003).

Para avaliar a participação do NO foi utilizado um inibidor não-seletivo da NOS, L-NAME, em anéis de aorta de ratos controle e tratados com óleo de linhaça. A incubação com L-NAME em ambos os grupos experimentais provocou aumento similar da reatividade à fenilefrina, o que pode ser confirmado com %dAUC. Este achado sugere que não há envolvimento de NO no aumento da reatividade à fenilefrina e, que o tratamento com óleo de linhaça não interfere na sua biodisponibilidade.

Existem ainda dados muito limitados e controversos sobre os efeitos do óleo de linhaça na via do óxido nítrico. Sekine e colaboradores (2007) demonstraram que o tratamento com óleo de linhaça (1 mL administrada por via oral) durante 5 dias, reduziu a pressão arterial sistólica e aumento de prostaglandina I_2 (PGI_2) e liberação de NO em ratos espontaneamente hipertensos. Por outro lado, Karaca & Eraslan (2013) mostraram que 0,1 ml de óleo de linhaça por gavagem durante 30 dias, não alterou os níveis de óxido nítrico no coração, cérebro e fígado de ratos.

O óleo de linhaça é uma fonte de origem vegetal rica em PUFA da família n-3 e n-6, encontrados, respectivamente, na forma de ALA e LA, sendo este último em menor quantidade (Devarshi et al., 2013; Harper et al., 2006). Embora o óleo de linhaça não apresente o mesmo conteúdo de n-3 encontrado em fontes

marinhas e óleo de peixe, ALA atua como molécula precursora para a síntese endógena de EPA e DHA (Barceló-Coblijn & Murphy, 2009). Além disso, o LA que está presente em pequenas quantidades no óleo de linhaça é precursor da síntese de AA (Barceló-Coblijn & Murphy, 2009).

Os produtos de ALA e LA podem ser sintetizados por uma série de reações de alongamento e dessaturação da cadeia, para posterior incorporação aos fosfolípídeos da membrana celular (Barceló-Coblijn & Murphy, 2009). EPA, DHA e AA atuam como substrato alternativo para as enzimas COX e LOX. O metabolismo do EPA e AA pela COX leva a formação de prostaglandinas e tromboxanos da série 3 e 2, respectivamente. Já a ação da LOX quando atua sobre o EPA e AA, desencadeia a produção de leucotrienos da série 5 e 4, respectivamente (Abeywardena & Head, 2001).

Uma vez sintetizada, as prostaglandinas e tromboxanos da série 2 podem aumentar o tônus vascular. Baseado no aumento da reatividade vascular à fenilefrina, sem alteração da biodisponibilidade de NO apresentado neste estudo após o tratamento i.m. com óleo de linhaça por quinze dias, foi investigado se, as alterações vasculares encontradas, estão associadas aos prostanóides derivados da via da COX.

6.3.2 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a via dos prostanóides derivados da ciclooxigenase

Outras substâncias liberadas pelo endotélio com poder vasomotor, os prostanóides derivados da via da ciclooxigenase desempenham importante função na regulação do tônus vascular e participam das respostas à agressão vascular (Alvarez et al., 2007, 2005). Para avaliar se os prostanóides vasoconstritores estão envolvidos no aumento da reatividade vascular à fenilefrina induzido pelo tratamento i.m. com óleo de linhaça, foi utilizada indometacina, um inibidor não seletivo das ciclooxigenases. Este fármaco reduziu a resposta à fenilefrina em segmentos aórticos em ambos os grupos, sendo esta redução maior nos anéis de aorta dos animais tratados com óleo de linhaça. Este achado

sugere aumento da participação da via da COX nos anéis de aorta de ratos tratados com o óleo de linhaça.

Os prostanóides são derivados do ácido araquidônico que é liberado dos fosfolípídeos de membrana pela ativação da PLA₂. A enzima chave na síntese de prostanóides é a prostaglandina H sintase, ou também conhecida como ciclooxigenase. Esta enzima possui duas isoformas, a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é encontrada em muitas células como enzima constitutiva, já a COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios e hormonais. A COX transforma o AA em PGH₂ que é o precursor dos demais prostanóides. Dependendo da ação de sintases específicas, a PGH₂ é convertida em prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina I₂ (PGI₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), prostaglandina D₂ (PGD₂) ou tromboxano A₂ (TXA₂) com atividade direta no músculo liso vascular (Davidge, 2001; Mardini & FitzGerald, 2001).

Cada prostanóide exerce sua função vasoconstritora ou vasodilatadora quando acoplado a um receptor específico ligado à proteína G que, quando ativado, estimula a adenilato ciclase aumentando o AMPc (receptores IP para PGI₂; EP₂ para PGE₂; DP para PGE₂ e EP₄ para PGE₂) promovendo o relaxamento do músculo liso vascular. Enquanto que os receptores EP₃ para PGE₂; FP para PGF_{2α} e TP para TXA₂, quando ativados promovem a contração do músculo liso vascular por distintos mecanismos. Os receptores FP e TP promovem vasoconstrição pelo aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular, enquanto os receptores EP₃ inibem a adenilato ciclase, reduzem os níveis de AMPc e promovem a vasoconstrição (Funk, 2001; Wright et al., 2001).

Para investigar a participação dos prostanóides derivados da COX-2 na resposta vascular à fenilefrina, os anéis do grupo controle e óleo de linhaça foram incubados com inibidor específico da COX-2, NS 398. Observou-se que na presença do NS 398 ocorreu redução da resposta contrátil à fenilefrina somente em segmentos de aorta dos animais tratados com óleo de linhaça, indicando que os prostanóides contráteis que participam da resposta à fenilefrina nos animais do grupo óleo de linhaça são derivados da via da COX-2. Corroborando estes resultados, a expressão proteica da COX-2 foi maior no grupo óleo de linhaça comparado ao controle.

As PGF_{2α} e TXA₂ são os produtos vasoconstritores derivados da ciclooxigenase, sendo que o TXA₂ se destaca pelo seu maior efeito constritor

(Davidge, 2001). Sendo assim, inibidores específicos foram utilizados para investigar a participação do TXA₂ e de seu receptor. Utilizou-se então furegrelato, inibidor da sintase de TXA₂, e SQ 29,548, antagonista do receptor TP. Os resultados obtidos destes últimos bloqueios foram semelhantes aos encontrados com o NS 398, sugerindo que os prostanóides vasoconstritores, especialmente o TXA₂, têm participação no aumento da reatividade à fenilefrina induzido pelo tratamento com óleo de linhaça.

Tou e colaboradores (2011) demonstraram que ratas fêmeas alimentadas com dieta suplementada com óleo de linhaça por 8 semanas tiveram níveis reduzidos de AA no fígado e, não apresentaram diferença significativa nos eicosanóides da série 2, como os metabólitos da PGE₂ e TXB₂. No entanto, Lee e colaboradores (1988) mostraram que a produção de PGI₂ na aorta e concentrações séricas de TXA₂ foram significativamente menores em ratos alimentados com dieta contendo óleo de linhaça por 4 semanas. Por outro lado, Rupp e colaboradores (1996), observaram aumento na geração de 6-keto-PGF_{1α}, produto da PGI₂, em ratos alimentados com óleo de linhaça, embora o conteúdo de AA apresentava-se reduzido. Resultados similares foram encontrados por Sekine e colaboradores (2007), o qual encontraram níveis plasmáticos de 6-keto-PGF_{1α} significativamente maior no grupo alimentado com óleo de linhaça.

PGI₂ é sintetizada em resposta a liberação de AA dos fosfolípidios de membrana do PUFA n-6 (Abeywardena & Head, 2001). No entanto, além do aumento na PGI₂, outros prostanóides da série 2 derivados do n-6 (LA) como o TXA₂ podem também estar aumentados (Abeywardena & Head, 2001). Além disso, estudos anteriores demonstraram que a PGI₂, em níveis aumentados, pode induzir a uma resposta vasoconstritora pela ativação do receptor TP (Xavier et al., 2009). Diante disso, o presente estudo sugere que o aumento do TXA₂ induzido pelo tratamento i.m. com óleo de linhaça em respostas contráteis a fenilefrina pode estar sendo provocada pelo derivado do LA, n-6, também presente no óleo de linhaça.

Alterações no perfil dos eicosanóides podem ter efeitos importantes sobre a inflamação (Pischon et al., 2003). Os n-3 e n-6 PUFA competem pelas enzimas COX e LOX. Além disso, os eicosanóides da série 2 e 4 derivados do n-6 PUFA são biologicamente mais ativos do que os eicosanóides da série 3 e 5 derivados da série n-3 PUFA (Ander et al., 2003), mesmo quando presentes em pequenas

quantidades (Simopoulos, 2000). Além disso, os eicosanóides da série 2 e 4 podem induzir um estado pró-inflamatório e pró-agregatório, que pode alterar a reatividade vascular (DeFilippis & Sperling, 2006).

Sabendo que a participação PLA₂ é importante para que haja substrato para a síntese do eicosanóides, foi investigado se esta enzima possui função mediadora sobre os efeitos induzidos pelo tratamento com óleo de linhaça na reatividade vascular. Dexametasona, um bloqueador da PLA₂, foi utilizado. Este glicocorticóide aboliu os efeitos do óleo de linhaça na resposta contrátil à fenilefrina, sugerindo que o tratamento i.m. com óleo de linhaça por quinze dias pode aumentar a atividade da PLA₂, que por sua vez, pode exacerbar a produção de eicosanóides, levando ao aumento da atividade dos eicosanóides da série 2 e 4.

Os glicocorticóides têm papel importante no controle do tônus do músculo liso vascular por modificar as respostas vasoconstritoras aos diferentes agentes vasoativos e por alterar os prostanóides vasculares e/ou a produção de óxido nítrico (Ullian, 1999; Yang & Zhang, 2004). Portanto, dexametasona poderia interromper a disponibilidade de substrato para a COX-2 em anéis da aorta isolados de ratos tratados com óleo de linhaça, normalizando a reatividade vascular ao nível do grupo de controle.

Estudos prévios demonstram que os produtos derivados da COX-2 podem modular a produção de EROs (Martínez-Revelles et al., 2013). Sendo assim, o aumento dos produtos da via da COX-2 induzidos pelo tratamento com óleo de linhaça em anéis isolados de aorta, podem aumentar a produção de EROs. Um aumento na produção de EROs, eventualmente, acarreta em estresse oxidativo que pode culminar em aumento da reatividade vascular e disfunção endotelial (Caramori & Zago, 2000). Diante disso, investigou-se a contribuição das EROs no aumento da resposta à fenilefrina frente ao tratamento i.m. com óleo de linhaça.

6.3.3 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre a via dos radicais livres

As EROs são moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio formadas por elétrons livres ou não pareados, o que as conferem grande capacidade reativa. A fim de captar um elétron para sua estabilização, as EROs são capazes de reagir com qualquer composto próximo, seja este uma molécula, célula, ou tecido, sendo então denominadas substâncias oxidantes (Harrison & Gongora, 2009). As principais EROs são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}), o peroxinitrito ($OONO^{\cdot}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Koh et al., 2009).

O $O_2^{\cdot-}$ é formado pela adição de um elétron a molécula de oxigênio e é produzido pela cadeia respiratória mitocondrial, pelas xantinas-oxidases, ciclooxigenase, lipoxigenase, pela NOS na falta de substrato ou cofatores e principalmente pela NADPH oxidase (Bedard & Krause, 2007). O $O_2^{\cdot-}$ reage com o NO, originando peróxido de nitrito ($ONOO^{\cdot}$) e, por ação da SOD o $O_2^{\cdot-}$ é dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podendo este formar oxigênio e água por hidrólise da glutathiona peroxidase (GPx) ou da (Griendling & FitzGerald, 2003; Griendling et al., 2000).

Para avaliar a participação do $O_2^{\cdot-}$ no aumento da reatividade à fenilefrina induzido pelo tratamento com óleo de linhaça, foi utilizado tiron, um “varredor” não-enzimático de ânion superóxido. Após a incubação do tiron, observou-se maior redução na resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis isolados de aorta dos animais tratados. No entanto, a catalase não alterou a reatividade vascular quando adicionada aos anéis de ambos os grupos experimentais.

Estudo prévio demonstrou que o tratamento com óleo de linhaça induz aumento da peroxidação lipídica, com aumento do estresse oxidativo em tecidos com elevada quantidade de ácidos graxos n-3 acompanhado pela atividade reduzida da SOD (L'Abbé et al., 1991). Ainda, em outros experimentos *in vitro* e *in vivo* foi observado que o óleo de linhaça não afeta a atividade da catalase ou superóxido dismutase em fígados de macacos (Kaasgaard et al., 1992). No entanto, Ramaprasad e colaboradores (2005) observaram que a suplementação com óleo de linhaça aumentou a atividade das enzimas catalase e GPx em ratos. Portanto, os efeitos do óleo de linhaça sobre o sistema oxidante e anti-oxidante

são controversos. No presente estudo, embora não tenha sido realizada a medida da atividade da SOD, foi demonstrado funcionalmente que o tratamento com óleo de linhaça induz estresse oxidativo por aumentar as EROs, principalmente $O_2^{\bullet-}$, sem alterar a liberação de peróxido de hidrogênio.

A NADPH oxidase é, dentre as enzimas oxidante, a mais importante fonte geradora de $O_2^{\bullet-}$ (Weseler & Bast, 2010). Esta enzima é formada por duas subunidades transmembrana, denominadas gp91phox e p22phox, que compõe a região conhecida como citocromo b558. Além destas, há também as subunidades citosólicas regulatórias p67phox, p40phox, p47phox e da proteína de baixo peso molecular rac-1 (Hamilton et al., 2002). A subunidade p22phox é descrita como um componente crítico para a geração vascular de ânions superóxido (McIntyre et al., 1999). Subunidades homólogas da gp91phox foram descritas, originando a família Nox da NADPH oxidase, composta pela Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2. Estas enzimas têm a capacidade de transportar elétrons através da membrana plasmática e gerar ânions superóxidos, sendo a Nox4 mais expressa em células endoteliais (Koh et al., 2009).

A ativação da NADPH oxidase ocorre por fatores de crescimento, citocinas, forças mecânicas e hormônios (Cai & Harrison, 2000). Além disso, derivados da COX-2 podem modular a biodisponibilidade de $O_2^{\bullet-}$ por afetar a NADPH oxidase (Martínez-Revelles et al., 2013). Sendo assim, investigou-se o possível papel da NADPH oxidase nos efeitos do óleo de linhaça sobre a reatividade vascular. Apocinina, um inibidor específico da NADPH oxidase, aboliu o efeito vasoconstritor observado em anéis de aorta de ratos tratados com óleo de linhaça. Estes achados sugerem que o $O_2^{\bullet-}$ derivado da NADPH oxidase desempenha papel importante na reatividade vascular induzida pelo tratamento.

Adicionalmente, os resultados obtidos pela técnica de fluorescência emitida por dihidroetídio apresentou aumento na produção local de $O_2^{\bullet-}$ nos anéis de animais expostos ao óleo de linhaça quando comparados aos animais controle, confirmando os resultados funcionais do presente estudo.

Como já se sabe, os $O_2^{\bullet-}$ tem a capacidade de reagir rapidamente com o NO disponível produzindo $ONOO^-$, reduzindo assim sua biodisponibilidade (Förstermann, 2008). No entanto, o presente estudo mostra que a participação do NO não foi afetada no grupo tratado com Óleo de Linhaça, embora os dados tenham apresentado aumento de $O_2^{\bullet-}$. Sendo assim, sugere-se um possível

aumento na atividade das enzimas antioxidantes, como a SOD, agindo de forma favorável à biodisponibilidade de NO encontrada neste estudo.

Diante dos resultados apresentados, sugere-se que o tratamento por quinze dias com óleo de linhaça provoca liberação de prostanóides vasoconstritores derivados da COX-2 e EROs, os quais afetam as respostas contráteis à fenilefrina.

6.3.4 Efeito do tratamento por quinze dias com óleo de linhaça sobre o estresse oxidativo plasmático e parâmetro inflamatório

O processo de peroxidação lipídica consiste em uma cascata de reações resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares e lipoproteínas, transformando-os em ácidos graxos peroxidados os quais sofrem redução de sua cadeia lateral liberando malondialdeído (MDA), de maneira que sua concentração sérica é proporcional à quantidade de ácidos graxos poliinsaturados oxidados. Este processo acarreta em destruição de sua estrutura, falências dos mecanismos de troca de metabólitos e, em condição extrema, morte celular (Benzie, 1996).

Sabendo que a peroxidação lipídica é frequentemente associada ao aumento das EROs, o presente estudo avaliou o efeito do tratamento com óleo de linhaça sobre os níveis de MDA no plasma. Os resultados encontrados, após tratamento durante quinze dias com óleo de linhaça, foram níveis inalterados de MDA no plasma. Estudo anterior registrou que o óleo de linhaça foi incapaz de reduzir MDA no soro ou em aorta de coelhos hipercolesterolêmicos após dois meses de suplementação (Lee & Prasad, 2003). E ainda, níveis de MDA no soro e em aorta tenderam a serem maiores no grupo que recebeu dieta rica em colesterol acrescido de óleo de linhaça quando comparado ao grupo suplementado apenas com colesterol. Os autores sugerem que, o óleo de linhaça, sendo uma rica fonte de PUFA, pode ser oxidado e produzir MDA. Schimke e colaboradores (1997) observaram que animais SHR que receberam dieta enriquecida com óleo de linhaça apresentaram maior peroxidação lipídica no plasma e no miocárdio. Embora não se tenha encontrado alterações no MDA, em

ratos, existem outras análises importantes para se avaliar a peroxidação lipídica, como a medida de 6-isoprostano.

É importante destacar que o aumento das EROs e derivados da COX-2, os quais estão envolvidos em duas diferentes vias inflamatórias, podem atuar juntos uma vez que são ativados e levam a prejuízo vascular e disfunção endotelial (Martínez-Revelles et al., 2013). Portanto, para investigar se o tratamento com óleo de linhaça pode induzir um estado inflamatório, avaliamos os níveis de proteína C-reativa no sangue (Yudkin et al., 2000). A síntese deste marcador inflamatório ocorre nos hepatócitos sob estímulo, principalmente, da IL-6 (Koenig & Khuseyinova, 2007). Uma vez os leucócitos ativados, seja por lesão tecidual ou algum agente infeccioso, iniciam a produção de diferentes citocinas, como interleucinas (IL), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN γ) (Libby, 1995). Especialmente, IL-6 estimula a transcrição gênica em hepatócitos para produção de proteínas de fase aguda, como fibrinogênio, proteína C-reativa, amilóide sérico A (Yudkin et al., 2000).

O presente estudo demonstrou que o tratamento com óleo de linhaça não modificou este marcador inflamatório. No entanto, não podemos excluir um possível efeito do tratamento e a necessidade de outras investigações para se avaliar o estado inflamatório em ratos, como a α_1 -glicoproteína ácida ou α_2 -macroglobulina.

O óleo de linhaça parece ter efeitos variáveis sobre os mediadores inflamatórios, o que parece ser dependente da dose e tempo de tratamento, como mostram alguns estudos. Utilizando-se óleo de linhaça no preparo dos alimentos por quatro semanas, voluntários saudáveis participantes do estudo realizado por Caughey e colaboradores (1996) apresentaram redução nos níveis de citocinas. E ainda, após quatro meses de suplementação com óleo de linhaça em pacientes com insuficiência renal crônica obtiveram redução significativa nos níveis de proteína C-reativa (Lemos et al., 2012). Por outro lado, em um estudo realizado por Nelson e colaboradores (2007) em adultos obesos com ausência de patologias associadas, observaram que a suplementação com ALA por oito semanas não encontraram alterações nos mediadores inflamatórios, com a proteína C-reativa.

Portanto, embora o tratamento com óleo de linhaça por quinze dias altere as funções vasculares culminando em disfunção endotelial, o processo de

peroxidação lipídica e marcadores que caracterizam um estado inflamatório parecem não ser influenciados pelo tratamento realizado neste estudo.

Embora nossos resultados não sejam suficientes para permitir uma explicação concisa frente ao efeito negativo apresentado pelo grupo tratado com óleo de linhaça, tão pouco estudos que pudessem corroborar com os achados, nós sugerimos que este efeito possa ter um possível envolvimento dos mediadores lipídicos da série 2 e 4 derivado do substrato AA, mesmo o PUFA n-6 presente em menor quantidade no óleo de linhaça, porém, biologicamente ativo em pequena quantidade.

6.4 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS

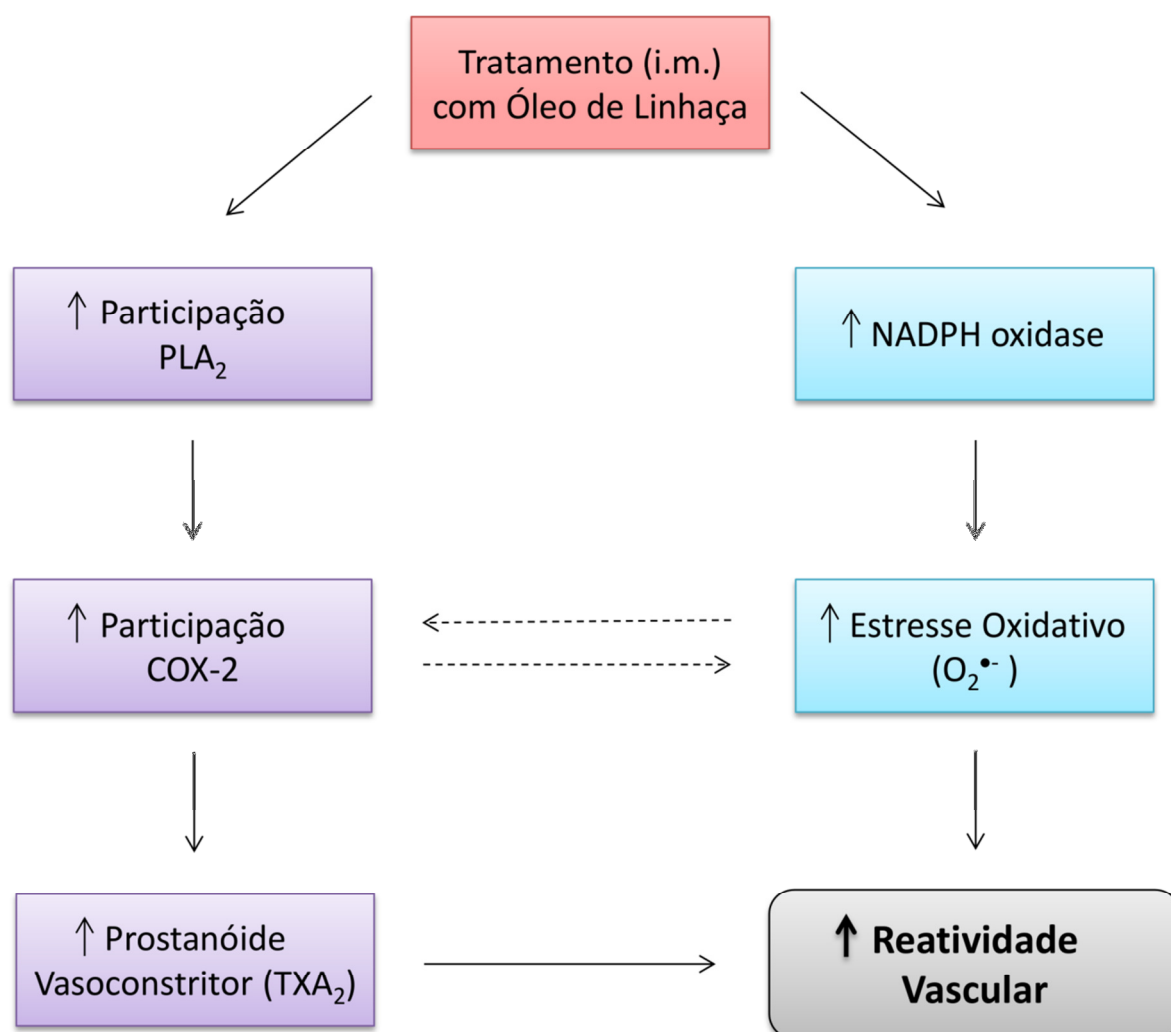


Figura 19: Sumarização esquemática dos resultados obtidos no presente estudo. O tratamento i.m. com óleo de linhaça foi capaz de aumentar a atividade da enzima PLA₂ culminando no aumento de prostanóides vasoconstritores derivados da COX-2, especialmente o TXA₂ (Davidge, 2001). Além disso, o tratamento provocou aumento da participação da NADPH oxidase, o que contribuiu para o aumento de O₂^{•-} (Weseler and Bast, 2010). Uma vez que a COX-2 está ativa, seus derivados podem modular a biodisponibilidade de O₂^{•-} por afetar a NADPH oxidase e vice-versa (Martínez-Revelles et al., 2013), acarretando em estresse oxidativo. Todos estes efeitos em conjunto influenciam no aumento da reatividade vascular.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos após quinze dias de tratamento i.m. com óleo de linhaça demonstraram aumento na reatividade vascular e disfunção endotelial em anéis de aorta de ratos.

O tratamento com óleo de linhaça não parece ter influenciado a biodisponibilidade do NO e o relaxamento dependente e independente do endotélio. Entretanto, as alterações na resposta contrátil à fenilefrina observadas nos animais expostos ao óleo de linhaça, estão associadas a maior liberação de prostanóides vasoconstritores derivados da COX-2, especialmente o TXA₂, o que pode ser confirmado pelos resultados obtidos da expressão proteica da mesma. Além disso, a participação da enzima PLA₂ está aumentada, influenciando diretamente a produção dos prostanóides inflamatórios derivados da COX-2. O tratamento com óleo de linhaça, ainda, contribuiu para o aumento das EROs, com destaque para os O₂^{•-} via NADPH oxidase, culminando em estresse oxidativo.

Em suma, os resultados do presente estudo sugerem que a exposição (i.m) ao óleo de linhaça promove alterações vasculares que podem contribuir para inflamação, injúria vascular, implicando em risco aumentado de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Assim, os dados apresentados fornecem uma nova visão sobre os efeitos do tratamento com óleo de linhaça (i.m.) sobre a função vascular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeywardena, M.Y., Head, R.J., 2001. Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. *Cardiovasc Res.* 52, 361–371.

Adkins, Y., Kelley, D.S., 2010. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem.* 21, 781–792.

Alexander, J.W., 1998. Immunonutrition: the role of omega-3 fatty acids. *Nutrition* 14, 627–633.

Alvarez, Y., Briones, A.M., Balfagón, G., Alonso, M.J., Salaices, M., 2005. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens.* 23, 767–777.

Alvarez, Y., Pérez-Girón, J. V, Hernanz, R., Briones, A.M., García-Redondo, A., Beltrán, A., Alonso, M.J., Salaices, M., 2007. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 321, 381–388.

Ander, B.P., Dupasquier, C.M., Prociuk, M. a, Pierce, G.N., 2003. Polyunsaturated fatty acids and their effects on cardiovascular disease. *Exp Clin Cardiol.* 8, 164–172.

Andrade, P.M.M., Carmo, M.G.T., 2006. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. *Rev Mn-Metabólica* 8, 135–143.

Andrew, P.J., Mayer, B., 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.* 43, 521–531.

Angeli, J.K., 2009. Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em aorta de ratos. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo.

Angus, J.A., Cocks, T.M., 1989. Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol Ther.* 41, 303–52.

- Arita, M., Yoshida, M., Hong, S., Tjonahen, E., Glickman, J.N., Petasis, N.A., Blumberg, R.S., Serhan, C.N., 2005. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 7671–7676.
- Ayala, J., Lopez, C., Hong, A., Oberto, C., Pavia, A., M., L., 2009. Effects of polyunsaturated fatty acids (Omega-3) on the platelet aggregation. *Rev Latinoamer Hipertens.* 4, 71–78.
- Bagga, D., Wang, L., Farias-Eisner, R., Glaspy, J.A., Reddy, S.T., 2003. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 1751–1756.
- Baranowski, M., Enns, J., Blewett, H., Yakandawala, U., Zahradka, P., Taylor, C.G., 2012. Dietary flaxseed oil reduces adipocyte size, adipose monocyte chemoattractant protein-1 levels and T-cell infiltration in obese, insulin-resistant rats. *Cytokine.* 59, 382–391.
- Barceló-Coblijn, G., Murphy, E.J., 2009. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res.* 48, 355–374.
- Barrett, S.J., 2013. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in cardiovascular health. *Altern Ther Health Med.* 19 Suppl 1, 26–30.
- Baylin, A., Kabagambe, E.K., Ascherio, A., Spiegelman, D., Campos, H., 2003. Adipose tissue alpha-linolenic acid and nonfatal acute myocardial infarction in Costa Rica. *Circulation.* 107, 1586–1591.
- Bedard, K., Krause, K.-H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87, 245–313.
- Benzie, I.F., 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr.* 47, 233–261.

Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 517–529.

Blaustein, M.P., Hamlyn, J.M., 2010. Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: endogenous ouabain, the Na(+) pump, the Na(+)/Ca(2+) exchanger and TRPC proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1802, 1219–1229.

Bloedon, L.T., Balikai, S., Chittams, J., Cunnane, S.C., Berlin, J.A., Rader, D.J., Szapary, P.O., 2008. Flaxseed and cardiovascular risk factors: results from a double blind, randomized, controlled clinical trial. *J Am Coll Nutr.* 27, 65–74.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248–254.

Cai, H., Harrison, D.G., 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87, 840–8444.

Calder, P.C., Grimble, R.F., 2002. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr.* 56, S14–S19.

Calviello, G., Serini, S., Piccioni, E., 2007. n-3 polyunsaturated fatty acids and the prevention of colorectal cancer: molecular mechanisms involved. *Curr Med Chem.* 14, 3059–3069.

Cannon, R.O., 1998. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem.* 44, 1809–1819.

Caramori, P.R.A., Zago, A.J., 2000. Disfunção endotelial e doença arterial coronariana. *Arq. Bras. Cardiol.* 75, 163–172.

Carvajal, J.A., Germain, A.M., Huidobro-Toro, J.P., Weiner, C.P., 2000. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.* 184, 409–420.

Carvalho, M.H.C., Nigro, D., Lemos, V.S., Tostes, R. de C.A., Fortes, Z.B., 2001. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev. Bras. Hipertens.* 8, 76–88.

Caughey, G.E., Mantzioris, E., Gibson, R. a, Cleland, L.G., James, M.J., 1996. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr.* 63, 116–122.

Chapkin, R.S., Kim, W., Lupton, J.R., McMurray, D.N., 2009. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 81, 187–191.

Chardigny, J.M., Bretilon, L., Sébédio, J.-L., 2001. New insights in health effects of trans α -linolenic acid isomers in humans. *Eur J Lipid Sci Technol.* 103, 478–482.

Clark, W.F., Parbtani, A., Huff, M.W., Spanner, E., de Salis, H., Chin-Yee, I., Philbrick, D.J., Holub, B.J., 1995. Flaxseed: a potential treatment for lupus nephritis. *Kidney Int.* 48, 475–480.

Committee, S.R., 1990. Nutrition recommendations. Ottawa: Canadian Government Publishing Centre, Supply and Services Canada.

Connor, W.E., 2000. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr.* 71, 171S–5S.

Cooper, G.S., Dooley, M.A., Treadwell, E.L., St Clair, E.W., Parks, C.G., Gilkeson, G.S., 1998. Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 41, 1714–1724.

Curi, R., Pompéia, C., Miyasaka, C.K., Procópio, J., 2002. Entendendo as gorduras: os ácidos graxos., 2^a ed. São Paulo.

Das, U.N., 2006. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol J.* 1, 420–39.

Davidge, S.T., 2001. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res.* 89, 650–860.

De Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J.-L., Monjaud, I., Delaye, J., Mamelle, N., 1999. Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications After Myocardial Infarction: Final Report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation.* 99, 779–785.

DeCaterina, R., Giannessi, D., Mazzone, A., Bernini, W., Lazzarini, G., Maffei, S., Cerri, M., Salvatore, L., Weksler, B., 1990. Vascular prostacyclin is increased in patients ingesting omega-3 polyunsaturated fatty acids before coronary artery bypass graft surgery. *Circulation.* 82, 428–438.

DeFilippis, A.P., Sperling, L.S., 2006. Understanding omega-3's. *Am Heart J.* 151, 564–570.

Devarshi, P.P., Jangale, N.M., Ghule, A.E., Bodhankar, S.L., Harsulkar, A.M., 2013. Beneficial effects of flaxseed oil and fish oil diet are through modulation of different hepatic genes involved in lipid metabolism in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Genes Nutr.* 8, 329–342.

Dias, F.M. V., 2007. Participação da Na⁺K⁺-ATPase e dos canais para K⁺ nas diferenças de reatividade de anéis isolados de aorta de ratos infartados com e sem sinais de insuficiência cardíaca. Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo.

Dupasquier, C.M.C., Dibrov, E., Kneesh, A.L., Cheung, P.K.M., Lee, K.G.Y., Alexander, H.K., Yeganeh, B.K., Moghadasian, M.H., Pierce, G.N., 2007. Dietary flaxseed inhibits atherosclerosis in the LDL receptor-deficient mouse in part through antiproliferative and anti-inflammatory actions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293, H2394–2402.

Dupasquier, C.M.C., Weber, A.-M., Ander, B.P., Rampersad, P.P., Steigerwald, S., Wigle, J.T., Mitchell, R.W., Kroeger, E. a, Gilchrist, J.S.C., Moghadasian, M.M., Lukas, A., Pierce, G.N., 2006. Effects of dietary flaxseed on vascular contractile

function and atherosclerosis during prolonged hypercholesterolemia in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291, H2987–2996.

Féletou, M., Vanhoutte, P.M., 2009. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond).* 117, 139–155.

Fernandes Azevedo, B., Barros Furieri, L., Peçanha, F.M., Wiggers, G.A., Frizera Vassallo, P., Ronacher Simões, M., Fiorim, J., Rossi de Batista, P., Fiorese, M., Rossoni, L., Stefanon, I., Alonso, M.J., Salaices, M., Valentim Vassallo, D., 2012. Toxic effects of mercury on the cardiovascular and central nervous systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012, 949048.

Ferrucci, L., Cherubini, A., Bandinelli, S., Bartali, B., Corsi, A., Lauretani, F., Martin, A., Andres-Lacueva, C., Senin, U., Guralnik, J.M., 2006. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab.* 91, 439–446.

Förstermann, U., 2008. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 5, 338–349.

Frölich, J.C., Förstermann, U., 1989. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 19, 211–215.

Funk, C.D., 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 294, 1871–1875.

Furchgott, R.F., Zawadzki, J. V, 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288, 373–376.

Fürst, P., 2002. The striking diet of the island of Crete: lipid nutrition from the palaeolithic to the affluent modern society. *Clinical Nutr.* 21, 9–14.

Ganitkevich, V.Y., Isenberg, G., 1991. Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. *J Physiol.* 435, 187–205.

Ganorkar, P.M., Jain, R.K., 2013. Flaxseed – a nutritional punch. *Int Food Res J.* 20, 519–525.

Gewaltig, M.T., Kojda, G., 2002. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res.* 55, 250–260.

Griendling, K.K., FitzGerald, G.A., 2003. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation.* 108, 1912–1916.

Griendling, K.K., Sorescu, D., Ushio-Fukai, M., 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 86, 494–501.

Hall, A. V, Parbtani, A., Clark, W.F., Spanner, E., Keeney, M., Chin-Yee, I., Philbrick, D.J., Holub, B.J., 1993. Abrogation of MRL/lpr lupus nephritis by dietary flaxseed. *Am J Kidney Dis.* 22, 326–332.

Hamilton, C.A., Brosnan, M.J., Al-Benna, S., Berg, G., Dominiczak, A.F., 2002. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension.* 40, 755–762.

Harper, C.R., Edwards, M.J., DeFilippis, A.P., DeFilippis, A.P., Jacobson, T.A., 2006. Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty acids in humans. *J Nutr.* 136, 83–87.

Harris, W.S., 2006. The omega-6/omega-3 ratio and cardiovascular disease risk: uses and abuses. *Curr Atheroscler Rep.* 8, 453–459.

Harrison, D.G., Gongora, M.C., 2009. Oxidative stress and hypertension. *Med Clin North Am.* 93, 621–635.

Hirafuji, M., Machida, T., Hamaue, N., Minami, M., 2003. Cardiovascular protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids with special emphasis on docosahexaenoic acid. *J Pharmacol Sci.* 92, 308–3016.

Hong, S., Gronert, K., Devchand, P.R., Moussignac, R.-L., Serhan, C.N., 2003. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in

murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem.* 278, 14677–14687.

Horowitz, A., Menice, C.B., Laporte, R., Morgan, K.G., 1996. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev.* 76, 967–1003.

Hu, F.B., Manson, J.E., Willett, W.C., 2001. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *J Am Coll Nutr.* 20, 5–19.

Ingram, A.J., Parbtani, A., Clark, W.F., Spanner, E., Huff, M.W., Philbrick, D.J., Holub, B.J., 1995. Effects of flaxseed and flax oil diets in a rat-5/6 renal ablation model. *Am J Kidney Dis.* 25, 320–329.

Kaasgaard, S.G., Hølmer, G., Høy, C.E., Behrens, W.A., Beare-Rogers, J.L., 1992. Effects of dietary linseed oil and marine oil on lipid peroxidation in monkey liver in vivo and in vitro. *Lipids.* 27, 740–745.

Karaca, S., Eraslan, G., 2013. The effects of flaxseed oil on cadmium-induced oxidative stress in rats. *Biol Trace Elem Res.* 155, 423–430.

Kawabe, J., Ushikubi, F., Hasebe, N., 2010. Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives -. *Circ J.* 74, 836–843.

Kelley, D.S., 2001. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition.* 17, 669–673.

Kelley, D.S., Nelson, G.J., Love, J.E., Branch, L.B., Taylor, P.C., Schmidt, P.C., Mackey, B.E., Iacono, J.M., 1993. Dietary alpha-linolenic acid alters tissue fatty acid composition, but not blood lipids, lipoproteins or coagulation status in humans. *Lipids.* 28, 533–7.

Kew, S., Banerjee, T., Minihane, A.M., Finnegan, Y.E., Muggli, R., Albers, R., Williams, C.M., Calder, P.C., 2003. Lack of effect of foods enriched with plant- or marine-derived n-3 fatty acids on human immune function. *Am J Clin Nutr.* 77, 1287–95.

Kim, H.-Y., 2007. Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells. *J Biol Chem.* 282, 18661–18665.

Kinsella, J., Lokesh, B., Stone, R., 1990. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 52, 1–28.

Kobayashi, T., Tahara, Y., Matsumoto, M., Iguchi, M., Sano, H., Murayama, T., Arai, H., Oida, H., Yurugi-Kobayashi, T., Yamashita, J.K., Katagiri, H., Majima, M., Yokode, M., Kita, T., Narumiya, S., 2004. Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest.* 114, 784–794.

Koenig, W., Khuseyinova, N., 2007. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27, 15–26.

Koh, K.K., Oh, P.C., Quon, M.J., 2009. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? *Cardiovasc Res.* 81, 649–659.

Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Appel, L.J., 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation.* 106, 2747–2757.

L'Abbé, M.R., Trick, K.D., Beare-Rogers, J.L., 1991. Dietary (n-3) fatty acids affect rat heart, liver and aorta protective enzyme activities and lipid peroxidation. *J Nutr.* 121, 1331–1340.

Lee, A.G., East, J.M., Froud, R.J., 1986. Are essential fatty acids essential for membrane function? *Prog Lipid Res.* 25, 41–46.

Lee, J.H., Sugano, M., Ide, T., 1988. Effects of various combinations of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fats with saturated fat on serum lipid levels and eicosanoid production in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 34, 117–129.

Lee, P., Prasad, K., 2003. Effects of flaxseed oil on serum lipids and atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 8, 227–235.

Lemos, J.R.N., Alencastro, M.G. De, Konrath, A.V., Cargnin, M., Manfro, R.C., 2012. Flaxseed oil supplementation decreases C-reactive protein levels in chronic hemodialysis patients. *Nutr Res.* 32, 921–927.

Libby, P., 1995. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 91, 2844–2850.

Lincoln, T.M., Dey, N., Sellak, H., 2001. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol.* 91, 1421–1430.

Mantzioris, E., James, M.J., Gibson, R.A., Cleland, L.G., 1995. Differences exist in the relationships between dietary linoleic and alpha-linolenic acids and their respective long-chain metabolites. *Am J Clin Nutr.* 61, 320–4.

Mardini, I.A., FitzGerald, G.A., 2001. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a growing class of anti-inflammatory drugs. *Mol Interv.* 1, 30–38.

Martin, C., Almeida, V., Ruiz, M., Visentainer, A., Matshushita, M., Souza, N., Visentainer, J., 2006. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. *Rev Nutr.* 19, 761–770.

Martínez-Revelles, S., Avendaño, M.S., García-Redondo, A.B., Alvarez, Y., Aguado, A., Pérez-Girón, J. V, García-Redondo, L., Esteban, V., Redondo, J.M., Alonso, M.J., Briones, A.M., Salices, M., 2013. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 18, 51–65.

McIntyre, M., Bohr, D.F., Dominiczak, A.F., 1999. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension.* 34, 539–545.

Medicine, I. of, 2002. Dietary Reference Intakes (DRIs) for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Part 1. Washington (DC): National Academy Press.

Michel, T., Vanhoutte, P.M., 2010. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch.* 459, 807–816.

Moncada, S., Herman, A.G., Higgs, E.A., Vane, J.R., 1977. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res.* 11, 323–344.

Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43, 109–42.

Morris, D., 2001. Essential nutrients and other functional compounds in flaxseed. *Nutrition Today* 36, 159–162.

Morris, D.H., 2003. Flax: A health and nutrition primer. Winnipeg: Flax Council of Canada 3, 1–106.

Mozaffarian, D., Wu, J.H.Y., 2011. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol.* 58, 2047–67.

Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 79, 1193–1226.

Nelson, T.L., Stevens, J.R., Hickey, M.S., 2007. Inflammatory markers are not altered by an eight week dietary alpha-linolenic acid intervention in healthy abdominally obese adult males and females. *Cytokine.* 38, 101–106.

Nestel, P.J., Pomeroy, S.E., Sasahara, T., Yamashita, T., Liang, Y.L., Dart, A.M., Jennings, G.L., Abbey, M., Cameron, J.D., 1997. Arterial compliance in obese subjects is improved with dietary plant n-3 fatty acid from flaxseed oil despite increased LDL oxidizability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17, 1163–1170.

Nordic Council of Ministers., 1996. Nordic nutrition recommendations. *Scand J Nutr.* 40, 161–165.

Oates, J.A., FitzGerald, G.A., Branch, R.A., Jackson, E.K., Knapp, H.R., Roberts, L.J., 1988. Clinical implications of prostaglandin and thromboxane A₂ formation (1). *N Engl J Med.* 319, 689–698.

- Ogawa, A., Suzuki, Y., Aoyama, T., Takeuchi, H., 2009. Effect of dietary alpha-linolenic acid on vascular reactivity in aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Oleo Sci.* 58, 221–225.
- Oomah, B., 2001. Flaxseed as a functional food source. *J Sci Food Agric.* 81, 889–894.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327, 524–526.
- Parker, C.W., 1987. Lipid mediators produced through the lipoxygenase pathway. *Annu Rev Immunol.* 5, 65–84.
- Patrino, C., Ciabattini, G., Davi, G., 1990. Thromboxane biosynthesis in cardiovascular diseases. *Stroke.* 21, IV130–133.
- Penumathsa, S.V., Koneru, S., Zhan, L., John, S., Menon, V.P., Prasad, K., Maulik, N., 2008. Secoisolariciresinol diglucoside induces neovascularization-mediated cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in hypercholesterolemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 44, 170–179.
- Pischon, T., Hankinson, S.E., Hotamisligil, G.S., Rifai, N., Willett, W.C., Rimm, E.B., 2003. Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women. *Circulation.* 108, 155–1560.
- Prasad, K., 2000. Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol, and enterolactone. *Int J Angiology.* 9, 220–225.
- Prasad, K., 2007. A study on regression of hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by flax lignan complex. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 12, 304–313.
- Prasad, K., 2008. Regression of hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed. *Atherosclerosis.* 197, 34–42.

Prasad, K., 2009. Flaxseed and cardiovascular health. *J Cardiovasc Pharmacol.* 54, 369–377.

Prasad, K., 2013. Secoisolariciresinol Diglucoside (SDG) Isolated from Flaxseed, an Alternative to ACE Inhibitors in the Treatment of Hypertension. *Int J Angiol.* 22, 235–238.

Psota, T.L., Gebauer, S.K., Kris-Etherton, P., 2006. Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *Am J Cardiol.* 98, 3i–18i.

Ramaprasad, T.R., Baskaran, V., Krishnakantha, T.P., Lokesh, B.R., 2005. Modulation of antioxidant enzyme activities, platelet aggregation and serum prostaglandins in rats fed spray-dried milk containing n-3 fatty acid. *Mol Cell Biochem.* 277, 19–26.

Rattmman, Y.D., 2009. Mecanismos Endoteliais Envolvidos nos Efeitos Vasculares da *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) Hook. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná.

Ratz, P.H., Berg, K.M., Urban, N.H., Miner, A.S., 2005. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288, C769–83.

Rector, R.S., Turk, J.R., Sun, G.Y., Guilford, B.L., Toedebusch, B.W., McClanahan, M.W., Thomas, T.R., 2006. Short-term lifestyle modification alters circulating biomarkers of endothelial health in sedentary, overweight adults. *Appl Physiol Nutr Metab.* 31, 512–517.

Rissanen, T., Voutilainen, S., Nyssönen, K., Lakka, T. a., Salonen, J.T., 2000. Fish oil-derived fatty acids, docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, and the risk of acute coronary events: the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *Circulation.* 102, 2677–2679.

Rizwan, S., Naqshbandi, A., Farooqui, Z., Khan, A.A., Khan, F., 2014. Protective effect of dietary flaxseed oil on arsenic-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Food Chem Toxicol.* S0278-6915, 140–149.

Robbins, S.L., Cotran, R.S., 2005. *Patologia: bases patológicas das doenças*, 7th ed. Elsevier Editora Ltda.; 8 edition, Rio de Janeiro.

Rodriguez-Leyva, D., Weighell, W., Edel, A.L., LaVallee, R., Dibrov, E., Pinneker, R., Maddaford, T.G., Ramjiawan, B., Aliani, M., Guzman, R., Pierce, G.N., 2013. Potent antihypertensive action of dietary flaxseed in hypertensive patients. *Hypertension*. 62, 1081–1089.

Rubanyi, G.M., Vanhoutte, P.M., 1986. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol*. 250, H815–21.

Rubilar, M., Gutiérrez, C., Verdugo, M., Shene, C., Sineiro, J., 2010. Flaxseed As a Source of Functional Ingredients. *J Soil Sci Plant Nutr* 10, 373–377.

Ruiz-Canela, M., Martínez-González, M.A., 2014. Lifestyle and dietary risk factors for peripheral artery disease. *Circ J*. 78, 553–559.

Rupp, H., Turcani, M., Ohkubo, T., Maisch, B., Brilla, C.G., 1996. Dietary linolenic acid-mediated increase in vascular prostacyclin formation. *Mol Cell Biochem*. 162, 59–64.

Santos, R.D., Gagliardi, A.C.M., Xavier, H.T., Magnoni, C.D., Cassani, R., Lottenberg, A.M., Al, E., 2013. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol*. 100, 1–40.

Schimke, I., Haberland, A., Wirth, M., Papies, B., Moritz, V., Baumann, G., 1997. Influence of long-term supplementation with alpha-linolenic acid on myocardial lipid peroxidation and antioxidative capacity in spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 57, 545–550.

Schmitz, G., Ecker, J., 2008. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res*. 47, 147–155.

Sekine, S., Sasanuki, S., Aoyama, T., Takeuchi, H., 2007. Lowering systolic blood pressure and increases in vasodilator levels in SHR with oral alpha-linolenic acid administration. *J Oleo Sci*. 56, 341–345.

Serhan, C.N., Petasis, N.A., 2011. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev.* 111, 5922–5943.

Serhan, C.N., Savill, J., 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 6, 1191–1197.

Simopoulos, A.P., 2000. Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. *Poult Sci.* 79, 961–970.

Simopoulos, A.P., Kifer, R.R., Martin, R.E., Barlow, S.M., 1991. Health effects of ω 3 polyunsaturated fatty acids in seafoods. *World Rev Nutr Diet.* 66, 1–592.

Simopoulos, A.P., Leaf, A., Salem, N., 1999. Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann Nutr Metab.* 43, 127–130.

Skeegs, L.T., 1954. The existence of two forms of hyperensin. *J Exp Med.* 100, 363.

Soares, L.L., Pacheco, J.T., Brito, C.M. de, Troina, A. de A., Boaventura, G.T., 2009. Evaluation of the effects of flaxseed when used as a protein source for the growth and maintenance phases of rats. *Revista de Nutricao* 22, 483–491.

Somlyo, A.P., Somlyo, A. V, 2000. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* 522 Pt 2, 177–185.

Spite, M., Norling, L. V, Summers, L., Yang, R., Cooper, D., Petasis, N.A., Flower, R.J., Perretti, M., Serhan, C.N., 2009. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature* 461, 1287–1291.

Stocker, R., Keaney, J.F., 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 84, 1381–1478.

Talom, R.T., Judd, S.A., McIntosh, D.D., McNeill, J.R., 1999. High flaxseed (linseed) diet restores endothelial function in the mesenteric arterial bed of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 64, 1415–1425.

Taniyama, Y., Griending, K.K., 2003. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 42, 1075–1081.

Toborek, M., Lee, Y.W., Garrido, R., Kaiser, S., Hennig, B., 2002. Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. *Am J Clin Nutr*. 75, 119–25.

Tou, J.C., Altman, S.N., Gigliotti, J.C., Benedito, V.A., Cordonier, E.L., 2011. Different sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids affects apparent digestibility, tissue deposition, and tissue oxidative stability in growing female rats. *Lipids Health Dis*. 10, 179.

Triggle, C.R., Hollenberg, M., Anderson, T.J., Ding, H., Jiang, Y., Ceroni, L., Wiehler, W.B., Ng, E.S.M., Ellis, A., Andrews, K., McGuire, J.J., Pannirselvam, M., 2003. The endothelium in health and disease--a target for therapeutic intervention. *J Smooth Muscle Res*. 39, 249–267.

Ullian, M.E., 1999. The role of corticosteroids in the regulation of vascular tone. *Cardiovasc Res*. 41, 55–64.

Weber, P.C., Fischer, S., von Schacky, C., Lorenz, R., Strasser, T., 1986. The conversion of dietary eicosapentaenoic acid to prostanoids and leukotrienes in man. *Prog Lipid Res*. 25, 273–276.

Wenger, N.K., 2014. Prevention of Cardiovascular Disease: Highlights for the Clinician of the 2013 American College of Cardiology/American Heart Association Guidelines. *Clin Cardiol*. 37, 239–251.

Weseler, A.R., Bast, A., 2010. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. *Curr Hypertens Rep*. 12, 154–161.

Wiggers, G. a, Peçanha, F.M., Briones, a M., Pérez-Girón, J. V, Miguel, M., Vassallo, D. V, Cachofeiro, V., Alonso, M.J., Salaices, M., 2008. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 295, H1033–H1043.

Wright, D.H., Abran, D., Bhattacharya, M., Hou, X., Bernier, S.G., Bouayad, A., Fouron, J.C., Vazquez-Tello, A., Beauchamp, M.H., Clyman, R.I., Peri, K., Varma, D.R., Chemtob, S., 2001. Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281, R1343–60.

Xavier, F.E., Blanco-Rivero, J., Ferrer, M., Balfagón, G., 2009. Endothelium modulates vasoconstrictor response to prostaglandin I₂ in rat mesenteric resistance arteries: interaction between EP1 and TP receptors. *Br J Pharmacol.* 158, 1787–1795.

Xie, Q., Nathan, C., 1994. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol.* 56, 576–582.

Xu, J., Yang, W., Deng, Q., Huang, Q., Yang, J., Huang, F., 2012. Flaxseed oil and α -lipoic acid combination reduces atherosclerosis risk factors in rats fed a high-fat diet. *Lipids Health Dis.* 11, 148.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Masaki, T., 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 332, 411–415.

Yang, S., Zhang, L., 2004. Glucocorticoids and vascular reactivity. *Curr Vasc Pharmacol.* 2, 1–12.

Yaqoob, P., Calder, P.C., 2007. Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms. *Br J Nutr.* 98 Suppl 1, S41–5.

Youdim, K.A., Martin, A., Joseph, J.A., 2000. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci.* 18, 383–399.

Yudkin, J.S., Kumari, M., Humphries, S.E., Mohamed-Ali, V., 2000. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis.* 148, 209–214.