

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Elaine Mendes Gonçalves

**EFEITO DAS SEMENTES DE *Linum usitatissimum* L. var. *humile*
(Mill.) Pers. (LINHAÇA MARROM) NO APARELHO
REPRODUTOR DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

São Luís
2014

ELAINE MENDES GONÇALVES

**EFEITO DAS SEMENTES DE *Linum usitatissimum* L. var. *humile* (Mill.) Pers.
(LINHAÇA MARROM) NO APARELHO REPRODUTOR DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilene Oliveira da Rocha Borges.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Selma do Nascimento Silva.

São Luís
2014

Gonçalves, Elaine Mendes

Efeito das sementes de *Linum usitatissimum* L. var. *humile* (Mill.) Pers. (linhaça marrom) no aparelho reprodutor de ratas ovariectomizadas / Elaine Mendes Gonçalves. – 2014.

79 f.

Impresso por computador (Fotocópia).

Orientadora: Marilene Oliveira da Rocha Borges.

Co-orientador: Selma do Nascimento Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

1. *Linum usitatissimum* – Terapia alternativa 2. Linhaça 3. Ratas 4. Ovariectomia 5. Fitoestrógenos I. Título.

CDU: 615.256.5

ELAINE MENDES GONÇALVES

**EFEITO DAS SEMENTES DE *Linum usitatissimum* L. var. *humile* (Mill.) Pers.
(LINHAÇA MARROM) NO APARELHO REPRODUTOR DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Marilene Oliveira da Rocha Borges (Orientadora)
Doutora em Farmacologia
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo
Doutor em Patologia
Universidade Estadual do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Bernardete Jorge Leal Salgado
Doutora em Ciências da Saúde
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Rachel Melo Ribeiro
Doutora em Biotecnologia
Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, por sempre me dar força e coragem e, mesmo nos momentos de dificuldades, me mostrar o lado bom e o verdadeiro sentido das suas decisões.

À minha família, principalmente meus pais, Francisca e José, por me dar todo o apoio que precisei e por sempre acreditar no meu potencial.

À minha orientadora, Prof^a. Marilene Borges, pelo apoio, orientação, dedicação, amizade e confiança.

À minha co-orientadora, Prof^a. Selma Silva, por tudo que me ajudou e por todos os ensinamentos passados a mim, que foram de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal do Maranhão, principalmente ao Mestrado em Ciências da Saúde e à Prof^a. Flávia Nascimento, pela oportunidade.

Ao Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia, onde foi desenvolvido este trabalho, em especial a todos os professores que o compõe, pelo auxílio constante.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Maranhão-FAPEMA, pelo apoio financeiro.

À Universidade Estadual do Maranhão, por ceder os animais utilizados neste estudo.

À Caroline Castro, pela sua fundamental ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelo companheirismo e acima de tudo, pela grande amizade.

Aos amigos, Renata Ohana, Layne Moreira, Renato Gaspar, Ahirlan Castro e Rosa Helena, pela grande ajuda prestada em todos os momentos.

Às funcionárias do Laboratório de Farmacologia, Rosina, Rosa, Nilde, Rita e Joana, pela ajuda, amizade e carinho.

Aos Técnicos em Histologia, Tiago e Flávio, pela confecção e fotografia das lâminas.

Aos colegas de turma do mestrado, pela amizade e apoio.

RESUMO

A terapia de reposição hormonal é forma mais eficaz para o tratamento de sinais e sintomas da pós-menopausa, entretanto está relacionada à presença de efeitos indesejáveis. Por esse motivo, tem-se buscado alternativas mais seguras para o controle destes sintomas, como o uso de fitoestrógenos. As sementes de *Linum usitatissimum* L. (linhaça) são ricas em um precursor de lignana, que é convertido no intestino em substâncias que se assemelham estruturalmente ao estrogênio. Este trabalho objetivou avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* no aparelho reprodutor de ratas Wistar ovariectomizadas. As sementes foram turbolizadas e remaceradas três vezes em etanol 70% na proporção 1:3 (v/v), por 24 horas, para a obtenção do extrato. Foram utilizadas ratas adultas (80 dias) da espécie *Rattus norvegicus*, distribuídos em 6 grupos (n=5-6): grupo falso operado (FO) e grupo ovariectomizado (OVR), administrados com água destilada/cremofor a 3% (0,1 mL/ 100g, v.o.); grupo benzoato de estradiol (BE), ovariectomizado tratado com estradiol na dose de 10 µg /kg (s.c.) e outros três grupos ovariectomizados tratados, por via oral, com o extrato de *L. usitatissimum* nas doses de 100 mg/kg (LIN100), 250 mg/kg (LIN250) ou 500 mg/kg (LIN500). As ratas foram ovariectomizadas e, após 21 dias da cirurgia, receberam diariamente os tratamentos, por 2 meses, período que foi avaliado ciclo estral, peso corporal e consumo alimentar. Ao final do tratamento, o sangue foi coletado para análises bioquímica e hormonal, além da pesagem de órgãos, reatividade uterina e histologia do útero, vagina e mamas. Na análise do ciclo estral, o grupo OVR permaneceu com maior frequência na fase diestro durante os 2 meses. O grupo LIN100 apresentou-se 100% em diestro e o LIN250, 94,5% (1º mês) e 93,5% (2º mês). Na maior dose testada (grupo LIN500), a linhaça mostrou, no 2º mês, 14,3% de pró-estro e 61,9% de diestro. O grupo BE atingiu 100% de estro no fim do tratamento. A ovariectomia induziu aumento de peso corporal no grupo OVR (19,6%), que foi prevenido nos grupos LIN e BE. Além disso, os grupos tratados com o extrato não alteraram o peso uterino em relação ao OVR, que mostrou uma redução de 83,4% em comparação ao FO. Porém, no BE, houve aumento de 80,5% do peso uterino. A ovariectomia induziu um aumento na gordura intra-abdominal em 47,9% que foi reduzida no grupo LIN500 em 35,5% e no grupo BE em 45,8%. Nas análises bioquímicas não foi observada diferenças entre os grupos. Já na dosagem hormonal, o grupo OVR mostrou redução de 75,3% do estradiol em relação ao FO, enquanto que nos grupos tratados com o extrato não houve diferença em relação ao OVR. Para a progesterona, não houve diferença entre os grupos. A reatividade uterina ao carbacol, prostaglandina F2α e ocitocina foi diminuída com a ovariectomia, porém não foi alterada com o extrato de *L. usitatissimum*. Na análise histomorfométrica do útero, o grupo LIN500 mostrou um discreto aumento do epitélio luminal uterino em 12,8%, quando comparado ao grupo OVR. Para os outros parâmetros não houve diferenças, assim como na histomorfometria das mamas. Portanto, o extrato hidroalcoólico de *L. usitatissimum* apresenta potencial como alternativa à terapêutica na pós-menopausa, pois mostrou efeitos em parâmetros citológicos e tecido adiposo, sem estimular tecidos mamário e endometrial.

Palavras-chave: *Linum usitatissimum* L., Linhaça, Ratas, Ovariectomia, Fitoestrógenos.

ABSTRACT

The hormone replacement therapy is the most effective way for the treatment of conditions related to post-menopause, but is related to the presence of undesirable effects. In this situation, safer alternatives have been investigated for the treatment of menopausal symptoms arising, such as the use of phytoestrogens. Seeds of *Linum usitatissimum* L. (flaxseed) are rich in lignan precursor, which is converted to substances which are structurally similar to estrogen. This study evaluates the effect of the hydro alcoholic extract of the seeds of *L. usitatissimum* on the reproductive tract of ovariectomized female Wistar rats. The seeds were crushed and remacerated and three times in 70% ethanol in the ratio 1:3 (v/v) for 24 hours to obtain the extract. Adult rats (80 days) from *Rattus norvegicus* species, divided into 6 groups (n = 5-6) were used: sham operated (FO) and ovariectomized (OVR) administered distilled water/3% cremophor (0.1 ml/100g, v. o.); estradiol benzoate (BE), ovariectomized treated with estradiol benzoate at a dose of 10 µg/kg (s. c.) and three ovariectomized groups treated with the extract of *L. usitatissimum* at doses of 100 mg/kg (LIN100), 250 mg/kg (LIN250) or 500 mg/kg (LIN500). The rats were ovariectomized and 21 days after surgery, received daily treatments, for two months, when it was rated the estrous cycle, body weight and food consumption. At the end of this period, blood was collection and subsequent biochemical and hormonal analyzes, and organ weighing, uterine reactivity and uterus, vagina and breasts histology. In the analysis of the estrous cycle, the OVR group had a higher frequency in the diestrus stage during the 2 months. The LIN100 group showed up 100% in diestrus and LIN250, 94.5% (1st month) and 93.5% (2nd month). At the highest dose tested (LIN500 group), flaxseed showed in the 2nd month of treatment, 14.3% of pro-estrus and diestrus 61.9%. The BE group reached 100% of estrus in the 2nd month. Ovariectomy induced body weight gain in OVR group (19.6%) which was prevented in the groups LIN and BE. Moreover, the groups treated with the extract did not alter uterus weight in relation to OVR, which showed a decrease of 83.4% compared to the FO. However, in BE, were increased by 80.5% the uterus weight. Ovariectomy induced intra-abdominal fat gain which was reduced to 47.9% in the LIN500 group 35.5% and 45.8% in BE group. In biochemical analyzes no differences between the groups was observed. In hormone dosage, OVR group decreased by 75.3% in estradiol compared to FO, whereas in the groups treated with the extract showed no differences compared to OVR. In relation to progesterone, there was no difference between groups. Uterine responsiveness to carbachol, PGF2α and oxytocin was decreased with ovariectomy and *L. usitatissimum* extract did not alter this effect. Histomorphometric analysis of the uterus, LIN500 group showed a significant increase in the luminal epithelium of the uterus in 12.8%, when compared to the OVR group. The other parameters did not differ, as well as the breasts histomorphometry. Therefore, the hydro alcoholic extract of *L. usitatissimum* has potential as an alternative to therapy in postmenopausal women, as it showed cytological parameters and on adipose tissue effects, without stimulating breast and endometrial tissues.

Keywords: *Linum usitatissimum* L., Flaxseed, Rats, Ovariectomy, Phytoestrogens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sementes de <i>Linum usitatissimum</i> L. (linhaça) da variedade marrom .	17
Figura 2 - Metabolismo do precursor de lignana secoisolariciresinol diglicosídeo (SDG) pela microflora do cólon	18
Figura 3 - Estrutura das lignanas enterodiol (A) e enterolactona (B) e do hormônio estradiol (C)	20
Figura 4 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i> no peso corporal de ratas Wistar.....	39
Figura 5 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i> no peso do útero de ratas Wistar	40
Figura 6 - Imagens representativas dos úteros das ratas Wistar tratadas com diferentes doses de extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i>	40
Figura 7 - Peso relativo da gordura intra-abdominal de ratas Wistar após tratamento com extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i>	42
Figura 8 - Fotomicrografia do endométrio de ratas Wistar ovariectomizadas tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i>	46
Figura 9 - Fotomicrografia do útero de ratas Wistar ovariectomizadas tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i>	47
Figura 10 - Fotomicrografia das mamas de ratas Wistar ovariectomizadas tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i>	49
Figura 11 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i> na força de contração induzida por carbacol no útero de ratas Wistar.....	50
Figura 12 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i> na força de contração induzida por prostaglandina F2 α no útero de ratas Wistar..	51
Figura 13 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i> na força contração induzida por ocitocina no útero de ratas Wistar	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características e duração das quatro fases do ciclo estral de ratas ...	33
Tabela 2 - Resultado da triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i>	37
Tabela 3 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i> no ciclo estral de ratas Wistar	38
Tabela 4 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i> no peso relativo de órgãos de ratas Wistar	41
Tabela 5 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i> nas dosagens bioquímicas séricas em ratas Wistar	43
Tabela 6 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i> nas dosagens hormonais séricas de ratas Wistar	44
Tabela 7 - Histomorfometria do epitélio uterino e vaginal de ratas Wistar após o tratamento com o extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i>	45
Tabela 8 - Histomorfometria das glândulas mamárias de ratas Wistar ovariectomizadas tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de <i>L. usitatissimum</i>	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EtOH – Etanol

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

HERS – Heart and Estrogen Replacement Study

IMC – Índice de Massa Corporal

NaCl – Cloreto de Sódio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PGF2 α – Prostaglandina F2 α

RE α – Receptores de Estrogênio tipo α

RE β – Receptores de Estrogênio tipo β

SDG – Secoisolariciresinol Diglicosídeo

SECO – Secoisolariciresinol

TRH – Terapia de Reposição Hormonal

WHI – Women's Health Initiative

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Menopausa e terapia de reposição hormonal (TRH)	14
2.2 Características e composição da espécie vegetal em estudo	16
2.3 Atividade fitoestrogênica das lignanas	19
2.4 Estudos desenvolvidos em humanos	21
2.5 Estudos desenvolvidos em modelos animais	25
2.6 Estudos sobre reatividade uterina	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Amostra vegetal	30
4.2 Preparo do material vegetal e extrato hidroalcoólico	30
4.3 Determinação de compostos fitoquímicos	30
4.4 Animais	30
4.5 Reagentes, solventes, sais e drogas	31
4.6 Aparelhos e equipamentos	31
4.7 Testes de atividade farmacológica	31
4.7.1 Grupos experimentais	31
4.7.2 Sequência experimental	32
4.7.2.1 Período de adaptação	32
4.7.2.2 Determinação das fases ciclo estral	33
4.7.2.3 Ovariectomia	33
4.7.2.4 Determinação do peso corporal e consumo de ração dos animais	34
4.7.2.5 Coleta de sangue e análises bioquímica e hormonal	34
4.7.2.6 Teste uterotrófico, determinação do peso dos órgãos e gordura intra-abdominal	35
4.7.2.7 Análise histomorfométrica do útero, vagina e mamas	35
4.7.2.8 Reatividade em útero isolado	36
4.8 Análise estatística	36

5 RESULTADOS	37
5.1 Determinação de compostos fitoquímicos	37
5.2 Determinação das fases ciclo estral	37
5.3 Determinação do peso corporal e consumo de ração dos animais	38
5.4 Teste uterotrófico	39
5.5 Peso dos órgãos e da gordura intra-abdominal	41
5.6 Análise bioquímica do sangue	42
5.7 Dosagens hormonais	43
5.8 Histomorfometria do útero, vagina e mamas de ratas Wistar	44
5.9 Reatividade em útero isolado	49
6 DISCUSSÃO	53
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXO	78

1 INTRODUÇÃO

O climatério é caracterizado como um processo de declínio gradual da função dos ovários e consequentemente das concentrações dos estrogênios endógenos. Nesta fase a terapia de reposição de estrogênios, mais conhecida como terapia de reposição hormonal (TRH) é eficaz para o tratamento das condições relacionadas com a pós-menopausa. Essas condições são caracterizadas principalmente por perda de massa óssea, ondas de calor (fogachos), alterações urogenitais, distúrbios cardiovasculares, sintomas vasomotores e distúrbios cognitivos que surgem devido ao hipoestrogenismo (CAVADAS et al., 2010; LUCAS et al., 2002; SACCO et al., 2012; WANG et al., 2013).

Apesar da TRH ser utilizada de forma eficaz para o alívio das alterações provocadas pela redução das concentrações hormonais ovarianas, ela está diretamente relacionada à presença de efeitos indesejáveis, como aumento da incidência de câncer de mama e de endométrio e complicações tromboembólicas e cardiovasculares (BORRELLI, ERNST, 2010; HOPERT et al., 1998; ROSSOUW et al., 2002; SIMON, SNABES, 2007).

Tais situações tem levado à busca de alternativas mais seguras para o tratamento dos sintomas advindos da menopausa, como o uso de agentes não esteroides, que mimetizam a ação do estrogênio endógeno (BEDELL; NACHTIGALL; NAFTOLIN, 2013).

Neste contexto, destacam-se os fitoestrógenos, que é um termo utilizado para definir compostos não esteroides de origem vegetal, pertencentes a três classes químicas principais que são as isoflavonas, lignanas e coumestanos. Estes compostos sofrem conversões enzimáticas pela microflora intestinal onde geram fenóis heterocíclicos que se assemelham estruturalmente ao estrogênio e interagem com os seus receptores, desencadeando efeitos estrogênicos fracos ou inibindo o estrogênio endógeno, dependendo do tecido alvo (BORRELLI, ERNST, 2010; SETCHELL, CASSIDY, 1999).

Em comparação com os estrogênios de origem animal ou sintética, os fitoestrógenos possuem uma ação fracamente estrogênica, mas apesar disso, eles atingem uma concentração no corpo 100 vezes maior que as

concentrações dos estrogênios endógenos tornando possível sua atividade biológica (MURKIES; WILCOX; DAVIS, 1998).

As sementes da espécie vegetal *Linum usitatissimum* L., conhecida como linhaça, são utilizadas pela população para o controle dos sintomas na pós-menopausa (PRUTHI et al., 2007). Estas sementes são uma das maiores fontes de lignanas (MILDER, et al. 2005; SMEDS et al., 2007; THOMPSON et al., 2006). Durante a digestão, o principal precursor de lignana da linhaça, o secoisolariciresinol diglicosídeo (SDG), é convertido por bactérias do cólon para enterodiol e enterolactona, que se assemelham estruturalmente ao estrogênio, e por isso possuem potencial para agir como agonistas e/ou antagonistas em tecidos sensíveis a este hormônio (AYERS, LOIKE, 1990; SACCO et al., 2009). Devido a esta propriedade, a linhaça é indicada para o tratamento da síndrome do climatério, assim como as isoflavonas, que também é uma importante classe de fitoestrógenos, que estão presentes na soja (DESPAIGNE, 2001).

Existem alguns estudos que tem mostrado o uso da linhaça como auxiliar na terapia de reposição hormonal para diminuir os efeitos ocasionados pela redução dos hormônios, sem apresentar os efeitos adversos gerados pela terapia de reposição hormonal convencional. Contudo, os resultados não são conclusivos, seja através de pesquisas desenvolvidas em humanos, seja utilizando modelos de experimentação animal (COLLI et al., 2012; ZANWAR et al., 2010).

Considerando que as sementes de linhaça apresentam grande potencial terapêutico para minimizar os sintomas ocasionados pelo hipoestrogenismo na pós-menopausa e que apesar de existirem poucos estudos que confirmam esses efeitos farmacológicos, é um produto muito utilizado pela população mundial. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do extrato hidroalcoólico das sementes de *Linum usitatissimum* no aparelho reprodutor de ratas ovariectomizadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MENOPAUSA E TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL (TRH)

Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS (1996), o climatério é uma fase biológica da mulher em que ocorre o processo de transição entre o período reprodutivo e não reprodutivo.

O período que antecede a menopausa é chamado de perimenopausa e se caracteriza pela menstruação irregular. A partir do momento que as menstruações cessam, pode-se designar como início da menopausa. Quando ocorre a cessação da menstruação, a produção de estrogênios decai de forma lenta e gradativa com duração em torno de 12 meses (MOYA; CALLEJA, 2005). É um processo natural, fisiológico e geneticamente programado, portanto, não patogênico (GREENDALE; LEE; ARRIOLA, 1999).

Um fator importante para determinar o início da menopausa é o decaimento folicular, que ocorre ao longo da vida até a perimenopausa, onde nesta fase, ocorre de forma mais acelerada até chegar à menopausa propriamente dita. A idade média para o início do climatério é em torno dos 50 anos, mas pode ocorrer de uma forma mais precoce quando influenciada por fatores diversos como histerectomia, falência ovariana, hiperprolactinemia, hipotireoidismo, tumores hipotalâmicos e doenças autoimunes (ALDRIGHI et al., 2005; GREENDALE et al., 1999).

Para que se estabeleça o diagnóstico de menopausa, é necessário que a mulher se encontre em amenorreia, seguido de níveis séricos do hormônio estradiol muito baixos e do hormônio folículo estimulante (FSH) muito elevados (CLAPAUCH et al., 2005; LUBIAN et al., 2006). Segundo Halbe, Fonseca, Bagnoli (2004), a síndrome climatérica compreende um conjunto de sinais e sintomas que aparecem nessa fase, sendo que as queixas mais frequentes são: ondas de calor (fogachos), sudorese, calafrios, cefaleia, tonturas, parestesia, palpitações, depressão, insônia, fadiga, perda de memória, alterações menstruais, secura vaginal, dispaurenia, síndrome uretral, pele seca e com perda de elasticidade e queda de cabelos.

Para amenizar estes sintomas, é empregada a Terapia de Reposição Hormonal (TRH) convencional, que é composta por hormônios estrogênicos,

progestogênicos ou associação de ambos. A TRH controla, principalmente, as manifestações vasomotoras e urogenitais decorrentes do decréscimo de produção de esteroides ovarianos, estradiol e progesterona, onde se mostra como a terapêutica mais eficaz (OPPERMANN-LISBÔA, WANNMACHER, 2001).

Os benefícios da TRH são bem conhecidos, atuam principalmente melhorando ou revertendo os sintomas decorrentes da carência estrogênica a curto, médio e longo prazo, aliviando os sintomas vasomotores, revertendo a atrofia urogenital e preservando a massa óssea (UTIAN et al., 2008).

Apesar da eficiência comprovada da TRH convencional, a publicação de estudos como HERS (*Heart and Estrogen Replacement Study*) e o WHI (*Women's Health Initiative*), aumentaram a discussão sobre os riscos/benefícios desta terapia, modificando a fundamentação para o seu uso na menopausa, especialmente por associar a TRH com o risco aumentado de câncer de mama e complicações cardiovasculares (HULLEY et al., 1998; ROSSOUW et al., 2002). Apesar disso, ainda é questionável se esses resultados podem ser estendidos a outros esquemas terapêuticos hormonais, que variam em doses e vias de administração (MODENA et al., 2005).

A possibilidade da presença destes sérios efeitos adversos, devido ao uso prolongado de TRH, tem levado a busca por terapias alternativas para o tratamento dos sintomas decorrentes da menopausa (BORRELLI; ERNST, 2010). Essa busca se torna ainda mais importante, quando se sabe que a não adesão de mulheres ao tratamento convencional, na maioria das vezes, ocorre por conta dos efeitos colaterais e do medo de desenvolver câncer, em especial o de mama (VIGETA; BRETÂS, 2004). Outros efeitos indesejáveis que também contribuem para essa decisão são os sangramentos uterinos irregulares, edema mamário, mastalgia e aumento do peso corporal (BAKER et al., 2000; GINSBURG, PREVELIC, 2000).

Diante disso, é crescente o interesse pelo desenvolvimento de novos compostos capazes de promover os efeitos favoráveis da TRH, mas que não produza efeitos adversos e riscos de desenvolver doenças, apresentando ação estrogênica no sentido de melhorar o perfil lipídico, metabolismo ósseo e o sistema cardiovascular, mas com ação antiestrogênica no tecido mamário e

uterino, para que assim não haja riscos para desenvolvimento de câncer (NELSON, 2008; RUSSEL et al., 2002).

2.2 CARACTERÍSTICAS E COMPOSIÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL EM ESTUDO

Linum usitatissimum L. é uma espécie vegetal conhecida como linhaça, pertencente à família Linaceae, que tem origem na Ásia e compreende aproximadamente 200 espécies no gênero *Linum*, cujo nome em latim significa “muito útil” (DIEDERICHSEN, RICHARDS, 2003).

As sementes de linhaça são pequenas, com dimensões que variam de 3,0 a 6,4 mm de comprimento, 1,8 a 3,4 mm de largura e 0,5 a 1,6 de espessura, possuindo textura firme, mastigável e um sabor agradável de nozes (CARTER, 1996).

A linhaça é muito rica nutricionalmente, sua composição em média é de 41% de gordura, 28% de fibra alimentar e 20% de proteínas (CONNOR, 2000). Além disso, é pobre em ácidos graxos saturados possuindo apenas 9%, e tendo como característica importante a alta quantidade de ácido graxo essencial α -linolênico (Ômega 3) que é muito útil na prevenção de doenças cardíacas e responsável por 40% a 60% dos ácidos graxos do óleo da linhaça, o que a torna uma das mais ricas fontes desse nutriente (MADHUSUDHAN, 2009). Podem ainda ser encontradas nas sementes pequenas quantidades das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, das vitaminas hidrossolúveis tais como a niacina e o ácido fólico e ainda certos minerais como potássio e fósforo (DAUN et al., 2003; MORRIS, VAISEY-GENSER, 2003).

As sementes de linhaça são reconhecidas pela *American Heart Association* pela sua ação antioxidante, por diminuir a hipercolesterolemia e os níveis de glicemia (KRIS-ETHERTON; HARRIS; APPEL, 2003). Possuem ainda propriedades anti-inflamatórias, de inibição da agregação plaquetária, prevenção da progressão da aterosclerose e redutoras da pressão arterial sanguínea, sendo que estas atividades são atribuídas às lignanas e seus produtos de degradação, às fibras e ao ácido α -linolênico presentes nas sementes (HALIGA et al., 2013).

No que diz respeito à composição de aminoácidos, a linhaça é composta por um teor relativamente elevado de arginina, ácido aspártico e ácido glutâmico (HALL; TULBEK; XU, 2006). Podem ainda conter cerca de 30% de carboidratos totais, entretanto, não é considerado um alimento glicêmico por estar isenta de amidos e ter baixo teor de açúcar (1 a 2%, dependendo da variedade). Os outros carboidratos presentes na linhaça, as fibras dietéticas, não são alteradas pelo processo digestivo e por isso não geram glicose ou energia direta (TRUCOM, 2006).

As sementes da linhaça se apresentam em duas variedades que se diferem pela cor da casca, podendo ser marrom ou dourada. A cor das sementes é determinada pela quantidade de pigmentos e que pode ser alterado por práticas de reprodução da planta, mas possuem quantidades semelhantes de nutrientes, diferindo apenas no teor de fibra total, que é maior na variedade marrom e na quantidade de proteínas que é maior na variedade dourada (BELL, KEITH, 1993; GANORKAR, JAIN, 2013; MORRIS, 2007) (Figura 1).

Figura 1 - Sementes de *Linum usitatissimum* L. (linhaça) da variedade marrom.



Fonte: O autor.

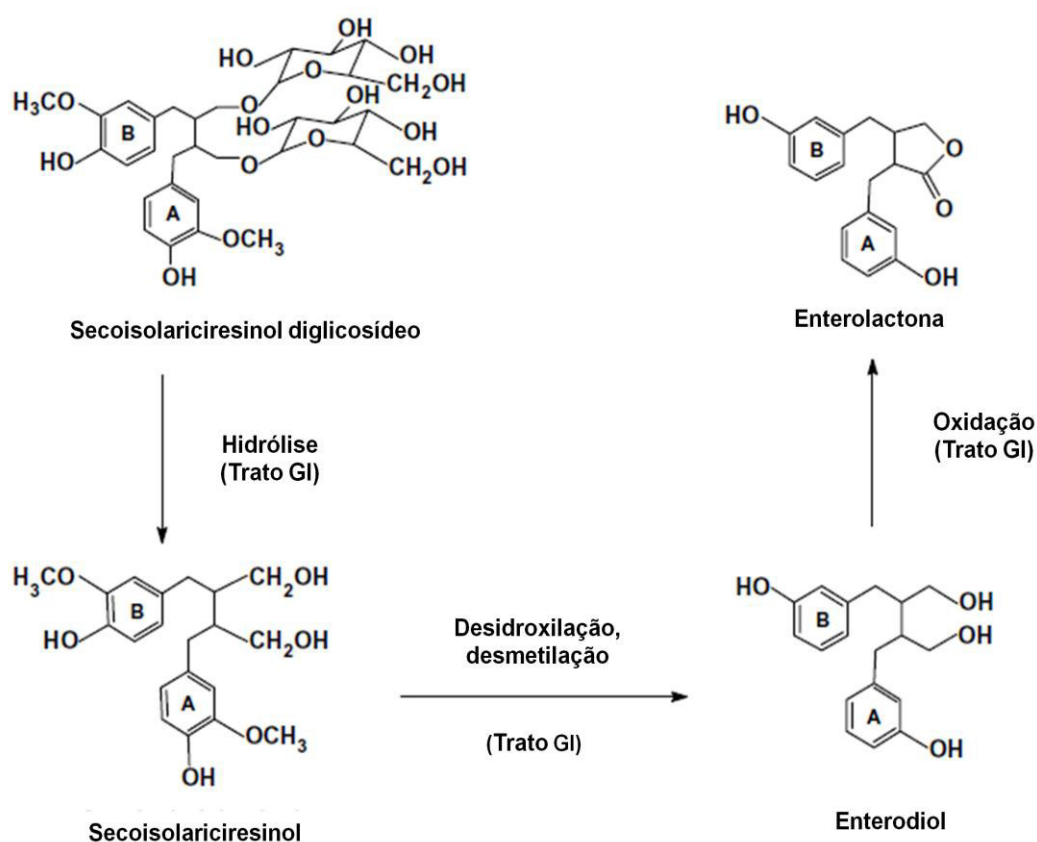
Quanto aos locais de cultivo, a variedade dourada desenvolve-se em climas muito frios, como no Canadá e norte dos Estados Unidos, já a marrom pode se desenvolver em regiões de clima quente e úmido, como o Brasil (FENG et al., 2003; TRUCOM, 2006).

As sementes de *L. usitatissimum* L. são a mais rica fonte alimentar de

lignanas, que se apresenta na forma do precursor secoisolariciresinol diglicosídeo (SDG), seu maior componente, com concentração cerca de 1000 vezes maior que a encontrada em qualquer outra fonte alimentar vegetal como frutas, verduras, legumes e grãos, que tem quantidades significativamente menores desse composto. Além do SDG, podem ainda ser encontradas, em menor quantidade, outras lignanas como o pinoresinol, lariciresinol e metairesinol (MEAGHER, BEECHER, 2000; MILDER et al., 2005).

O SDG é metabolizado por bactérias aeróbias facultativas do cólon de mamíferos. No intestino, ele passa por uma conversão, sofrendo hidrólise e com isso obtendo o secoisolariciresinol (SECO), que é desidroxilado e desmetilado para produzir enterodiol que depois é oxidado a enterolactona (Figura 2). Estes dois compostos passam posteriormente por biotransformação de fase I e II com extensa formação de conjugados glicuronídeos e sulfatados (ADLERCREUTZ et al., 1995; DEAN et al., 2004; HU, YUAN, KITTS, 2007).

Figura 2 - Metabolismo do precursor de lignana secoisolariciresinol diglicosídeo (SDG) pela microflora do cólon.



Fonte: HU, YUAN, KITTS, 2007.

O SDG e maioria das outras lignanas convertidas para enterolignanas são absorvidos pelo intestino para a corrente sanguínea ou diretamente excretados na urina e nas fezes (ADLERCREUTZ et al., 1993).

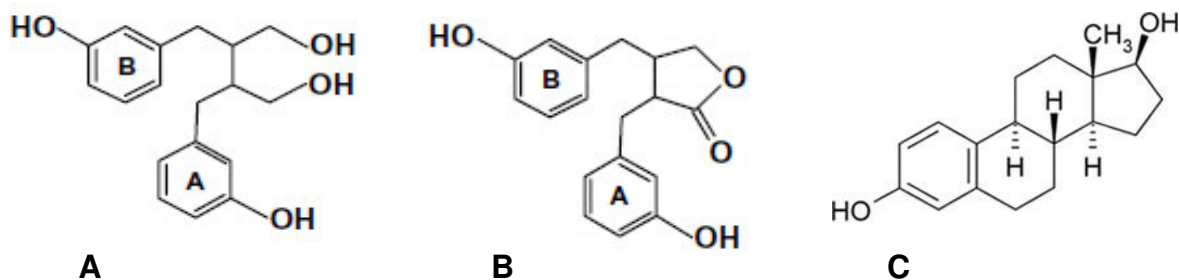
A quantidade de SDG presente em *L. usitatissimum* pode ser determinada através de recursos tecnológicos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que é capaz de extraí-lo das sementes e determinar o seu conteúdo, permitindo assim uma possível associação entre o teor de SDG e os efeitos biológicos gerados pelas lignanas formadas (JOHNSSON et al., 2000).

Devido esses compostos, enterodiol e enterolactona, serem produzidos no intestino de animais e humanos através da metabolização bacteriana, geralmente são denominados como lignanas de mamíferos, em oposição às lignanas de plantas, que se diferenciam através da presença de grupos hidroxifenólicos na posição meta dos anéis aromáticos (WANG, 2002).

2.3 ATIVIDADE FITOESTROGÊNICA DAS LIGNANAS

Sendo as lignanas uma das três classes conhecidas de fitoestrogénos, sua similaridade estrutural com a forma predominante de estrogênio produzido pelo organismo, o estradiol, permitem que elas se liguem aos receptores de estrogênio e exerçam atividades estrogênicas fracas ou atividades antiestrogênicas (CARREAU et al., 2008). Estudos indicam que fontes alimentares de lignanas podem atuar como moduladores da sinalização do receptor de estrogênio *in vivo*, mesmo que as concentrações que elas atinjam na circulação sejam relativamente menores que o estradiol necessita para modular a atividade desse receptor (KILKKINEN et al., 2001; MUELLER et al., 2004; PENTTINEN et al., 2007). Outra questão importante é que a estrutura altamente aromática das lignanas, somada com a semelhança das suas propriedades físico-químicas com as do estrogênio, sugerem que elas possam ter atividade fitoestrogênica especialmente por conter um anel fenil, que é comum a todos os compostos com essa atividade (WANG, 2002) (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura das lignanas enterodiol (A) e enterolactona (B) e do hormônio estradiol (C).



Fonte: HU, YUAN, KITTS, 2007; REIS FILHO, ARAÚJO, VIEIRA, 2006.

Os estrogênios ativam receptores intracelulares que se apresentam de dois tipos: alfa ($RE\alpha$) e beta ($RE\beta$), que possuem diferentes expressões dependendo do tipo de tecido alvo. O receptor alfa é expresso no útero, nas glândulas mamárias, no fígado, nos rins e no sistema cardiovascular, já o receptor beta é expresso nas células da granulosa do folículo ovariano, no tecido ósseo e no sistema nervoso central (BRUNETTE, LECLERC, 2002; KUIPER et al., 1997; SHEARMAN et al., 2003; TAYLOR et al., 2009).

As ações relativas de receptores de estrogênio α e β podem ajudar a explicar as ações seletivas de fitoestrógenos em diferentes tecidos-alvo. Receptores do tipo α parecem desempenhar um papel maior na proliferação de células da mama e níveis maiores desse receptor foram mostrados em células de câncer de mama em comparação com os níveis de receptores β , levando-se a acreditar em um papel protetor do $RE\beta$ na mama normal (CLARKE et al., 2002). Os fitoestrógenos podem competir com o estrogênio por sítios de ligação ao seu receptor (antagonista), resultando na diminuição da regulação das atividades do receptor α , como a proliferação, ou exercer efeitos através do receptor β (SETCHELL, 1998; MUELLER et al., 2004; KUIPER et al., 1998). Ao contrário do estrogênio endógeno, as isoflavonas, que são fitoestrógenos da soja, ligam-se preferencialmente aos $RE\beta$, enquanto que as lignanas se ligam preferencialmente aos $RE\alpha$ (AN et al., 2001; KOSTELAC, RECHKEMMER, BRIVIBA, 2003; MUELLER et al., 2004). Já foi mostrado que a enterolactona isolada é um agonista seletivo tanto para $RE\alpha$ quanto para $RE\beta$, induzindo a transcrição mediada por estes receptores *in vitro* (PENTTINEN et al., 2007).

2.4 ESTUDOS DESENVOLVIDOS EM HUMANOS

As ondas de calor, conhecidas também como fogachos, são pequenas alterações de temperatura acionadas por uma zona de termoneutralidade reduzida, que provoca uma resposta de dissipação de calor e leva a uma vasodilatação periférica e transpiração, principalmente na face, pescoço e região do esterno. É um fator importante que leva a maioria das mulheres a procurar a terapia de reposição hormonal, atingindo uma quantidade significativa de mulheres no período da pós-menopausa e afetando diretamente de forma negativa a sua qualidade de vida (VILLASECA, 2012; FREEDMAN, 2001).

Estudos realizados em mulheres com a finalidade de verificar o efeito de uma dieta rica em lignanas nos fogachos, através da ingestão de barras contendo sementes de *L. usitatissimum* L. (410 mg de lignanas) ou barras placebo, por um período de 6 semanas, mostraram que houve redução de 50% dos fogachos em ambos os grupos sem diferença significativa entre os dois tratamentos (PRUTHI et al., 2012). Outro estudo mostrou resultados semelhantes, quando mulheres na pós-menopausa foram divididas aleatoriamente em grupos que consumiram pão contendo 46 mg de lignanas ou pão contendo uma quantidade menor que 1 mg lignana (controle) por dia, durante 12 semanas. Ambos os grupos tiveram reduções significativas dos fogachos, mas de forma similar, após três meses (SIMBALISTA et al., 2010).

Lewis et al. (2006) relataram em seus estudos, nos quais utilizaram bolinhos contendo 25 g de linhaça, que corresponde a 50 mg de lignanas, uma redução dos fogachos em mulheres na pós-menopausa em comparação com placebo. Este efeito não foi dependente do tempo de estudo, que teve duração de 16 semanas. Resultados similares também foram obtidos por Colli et al. (2012) que observaram redução tanto dos fogachos, quanto do índice de Kupperman, que avalia os sintomas do climatério, comparando com o placebo, em ambos os tipos de preparação com sementes de linhaça, extrato em cápsulas e sementes moídas que continham, respectivamente, 50 mg e 270 mg de SDG, por um período de 6 meses. Nestes mesmos estudos, não houve mudanças quanto ao perfil hormonal, peso corporal, maturação do epitélio

vaginal e espessura do endométrio, que são marcadores importantes para evidenciar estrogenicidade (MARIOTTI et al., 2011).

As lignanas já mostraram efeitos sobre a cognição, uma vez que os distúrbios cognitivos são frequentes na pós-menopausa (MILLER et al., 2002). Um estudo transversal envolvendo mulheres com idades entre 60 e 75 anos, nas quais foi investigada a relação entre a ingestão de isoflavonas e lignanas na memória, velocidade e capacidade de processamento e função executiva, não foi encontrada associação entre a ingestão de isoflavonas na dieta e a função cognitiva, entretanto, uma alta ingestão de lignanas foi associada a um melhor desempenho na capacidade de processamento e velocidade, e função executiva (KREIJKAMP-KASPERS et al., 2007). Estudos realizados por Greendale et al. (2012) também observaram um benefício na memória de mulheres na perimenopausa que receberam dieta rica em lignanas (lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol e mataricesinol), as mesmas encontradas nas sementes de linhaça.

Depois da menopausa, ocorre uma redução da densidade mineral óssea, levando à osteoporose, que é um fator importante na causa de fraturas, uma vez que há uma redução da massa óssea em aproximadamente 2 a 5 % por ano durante esta fase (CHALUPKA, 2011). Acredita-se que o estrogênio tem influência na diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas em osteoclastos, além de participar da regulação de citocinas e de fatores locais envolvidos nos mecanismos de remodelação óssea (TENÓRIO et al., 2005). A terapia de reposição hormonal clássica é a mais utilizada e efetiva para o tratamento da osteoporose pós-menopausa, o que foi comprovado pelo *Women's Health Initiative* - WHI, estudo que observou uma redução do risco de fraturas em mulheres utilizando uma combinação de estrogênio e progesterona (ROSSOUW et al., 2002). Os fitoestrógenos tem despertado interesse como uma alternativa terapêutica na perda óssea, onde estes podem aumentar a atividade das células osteoblásticas através da interação com receptores estrogênicos presentes nas mesmas (CASTELO-BRANCO; HIDALGO, 2011).

As lignanas presentes nas sementes de linhaça possuem atividade antioxidante (HU; YUAN; KITTS, 2007) e por isso podem atuar nos radicais livres gerados no ambiente ósseo, onde estes podem acelerar o processo de

osteoporose por aumentar a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea e, com isso reduzir a alta taxa de perda óssea (ARJMANDI, 2001). Kim e Ilich (2011) concluíram que a suplementação com sementes de linhaça pode melhorar as propriedades ósseas osteoporóticas, mas o efeito protetor pode ser atribuído ao ácido alfa-linolênico e não às lignanas. Já estudos de Lucas et al. (2002) e Dodin et al. (2005) mostraram que não houve efeito sobre biomarcadores do metabolismo ósseo e densidade mineral óssea em três e doze meses de estudo, respectivamente, com mulheres na pós-menopausa com dieta suplementada por sementes de linhaça.

A diminuição da função ovariana na menopausa é fator importante para desenvolvimento de complicações cardiovasculares, sendo que na pós-menopausa, é duplicada a incidência de doenças cardiovasculares, quando comparado com o período pré-menopausa (STEVENSON, 2000). Estes acontecimentos ocorrem devido à diminuição dos estrogênios, que possuem efeitos benéficos sobre o perfil lipídico principalmente na expressão de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), aumentando sua degradação e nas lipoproteínas de alta densidade (HDL), aumentando sua síntese (JONES et al., 2002; MENDELSON, KARAS, 1999; STEVENSON, 2000). Além disso, há uma importante relação entre ganho ponderal e redução dos hormônios ovarianos, pois a mulher após a menopausa tende a ganhar mais gordura corporal e diminuir o metabolismo basal, ocorrendo assim um maior risco para o desenvolvimento de doenças como diabetes tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares entre outros problemas que afetam diretamente sua qualidade de vida (ANDRADE, 2000; FISHER, KOHRT, BROWN, 2000).

Morisset et al. (2009) observaram que mulheres que consumiram sementes de linhaça como fonte de lignanas, obtiveram uma diminuição significativa do índice de massa corporal (IMC), da massa de gordura corporal total e uma tendência para uma menor circunferência abdominal, quando comparado com mulheres que fizeram dieta com menor ingestão dessas lignanas. Neste mesmo estudo, também foi comprovado que mulheres com uma maior ingestão de lignanas apresentaram aumento de enterolactona plasmática e diminuição da glicemia pós-carga de glicose e da insulina em jejum.

Patade et al. (2008) relataram uma redução de colesterol total e LDL - colesterol em mulheres pós-menopausa que receberam alimentos contendo sementes de linhaça (30 g) por um período de três meses. Não foram observadas mudanças no HDL - colesterol e nos níveis hormonais. Dodin et al. (2005) demonstraram em seus estudos uma redução significativa no peso corporal, IMC, colesterol total, LDL - colesterol, HDL - colesterol em mulheres na menopausa que ingeriram 40 g de linhaça, por dia, durante por doze meses.

Quanto à ação da linhaça nos níveis plasmáticos dos hormônios sexuais, existem resultados contraditórios. Hutchins et al. (2001) observaram uma diminuição dos níveis de estradiol sérico em mulheres pós-menopausadas consumindo sementes de linhaça moídas, acrescentadas a sua dieta habitual por 21 semanas. Mas Brooks et al. (2004), em quatro meses de tratamento também com dieta suplementada, não observou mudanças nos níveis de estradiol e nem nos marcadores de metabolismo ósseo.

Existem estudos que relatam também possíveis ações de sementes de linhaça contra câncer de mama. Thompson et al. (2005), através da análise de tecidos do tumor, mostraram que a ingestão diária de 25 g de linhaça pode reduzir significativamente a proliferação celular, aumentar a apoptose e afetar a sinalização celular através da redução da expressão de marcadores em células tumorais de mulheres em pós-menopausa com câncer de mama primário. Há estudos que indicam também que a dieta baseada em uma maior ingestão de lignanas pode estar associada com uma melhora da sobrevida e com uma ação preventiva entre as mulheres na pós-menopausa com câncer de mama (LOWCOCK; COTTERCHIO; BOUCHER, 2013; MCCANN et al., 2010). Resultados semelhantes foram encontrados por Buck et al. (2011), que também observaram melhor sobrevida em mulheres que continham maior nível de enterolactona no sangue, além da tendência a tumores com menor tamanho.

Atividades da linhaça contra o câncer de mama já foram observadas em outros tipos de estudos, como por exemplo, análises *in vitro*, onde se pôde verificar o efeito em linhagens de células tumorais MCF - 7 (receptor estrogênio positivo) e MDA - MB - 231 (receptor estrogênio negativo) cuja proliferação foi reduzida e havendo também um aumento da apoptose celular (LEE; CHO, 2012).

2.5 ESTUDOS DESENVOLVIDOS EM MODELOS ANIMAIS

Apesar de existirem vários modelos experimentais desenvolvidos em computadores e/ou em órgãos isolados capazes de mimetizar situações fisiológicas, os modelos de experimentação animal ainda são amplamente usados por auxiliar no entendimento da etiologia, mecanismos e tratamento de diversas doenças. Por isso, a realização de experimentos em modelos animais busca um componente a mais no processo de estudo de uma determinada doença (MONTEIRO et al., 2009).

Para se avaliar possíveis atividades fitoestrogênicas e/ou como auxiliar no alívio de problemas de saúde relacionados com a pós-menopausa, sementes de *L. usitatissimum* ou seus componentes isolados foram utilizadas para alguns estudos em animais de experimentação.

Estudos desenvolvidos em camundongos ovariectomizados utilizando dieta à base de lignanas da linhaça observaram que houve aumento de peso corporal e alta concentração plasmática de lignanas nesses animais, mas não houve alteração do peso uterino (DAMDIMOPOULOU et al., 2009).

Wang et al. (2013) analisaram a atuação do secoisolariciresinol (SECO) isolado das sementes de linhaça como antidepressivo em camundongos ovariectomizados e observaram que houve uma melhor resposta nesse grupo, em relação ao controle ovariectomizado, nos modelos de depressão analisados, que foi semelhante ao grupo que recebeu o antidepressivo imipramina. O SECO também aumentou os níveis de noradrenalina e dopamina no cérebro (WANG et al., 2013).

Assim como nos estudos em humanos, efeitos benéficos das sementes de linhaça no perfil lipídico e seu efeito protetor em doenças cardiovasculares também foram comprovados em estudos com animais. Lucas et al. (2011) mostraram em hamsters ovariectomizados, que a dieta suplementada com 15% de linhaça preveniu o aumento do colesterol total promovido pela ovariectomia, mas não alterou os níveis de triglicerídeos. Já Campbell et al. (2013), utilizando o mesmo animal ovariectomizado, que foi induzido lesão aterosclerótica e com mesma dieta, observou uma redução da lipoproteína e Apo B, além de uma redução no número de animais com lesões do arco aórtico, mas não observou alterações no colesterol total, triglicerídeos, HDL-colesterol e LDL-colesterol.

O óleo das sementes de linhaça reduziu marcadores do metabolismo ósseo como fosfatase ácida e alcalina e melhorou a microarquitetura óssea em ratas ovariectomizadas (BOULBAROUD et al., 2008). Sacco et al. (2009) obtiveram uma maior densidade mineral óssea na coluna lombar de ratas ovariectomizadas em dieta suplementada com linhaça. Estudos posteriores deste mesmo autor comprovaram que a maior concentração do SDG foi detectada na coluna lombar, quando analisou sua distribuição no tecido esquelético e em alguns órgãos (SACCO et al., 2011).

O teste uterotrófico, no qual é determinado o peso do útero úmido, é um método muito utilizado para se demonstrar atividade estrogênica de uma substância, seja ela química ou proveniente de plantas (MARIOTTI et al., 2011).

Estudos realizados em ratas ovariectomizadas, avaliaram o epitélio do útero frente a uma dieta contendo linhaça ou linhaça combinada com baixas doses de estrogênio. Os resultados mostraram que houve uma baixa proliferação do epitélio luminal uterino em ambos os grupos, mas não significativo, comparando com o controle (SACCO et al., 2012).

Zawar et al. (2010) utilizando extrato etanólico de sementes de linhaça, verificaram que houve estrogenização do epitélio vaginal de ratas imaturas ovariectomizadas através da observação do ciclo estral, nas duas doses testadas, de 500 mg/kg e de 1000 mg/kg. Neste mesmo estudo, utilizando ratas imaturas sexualmente e não ovariectomizadas, houve um aumento do peso uterino nas duas doses testadas comparando com o controle não tratado.

Tou, Chen e Thompson (1999) observaram que uma suplementação dietética de 10% de sementes de linhaça em um período desde o desmame até a maturidade sexual resultou em início precoce dessa maturação e menor peso corporal comparando com a suplementação com 5% em ratas imaturas sexualmente. Com relação ao primeiro ciclo estral, as ratas que receberam 10% de linhaça obtiveram um prolongamento do ciclo estral devido ao estro prolongado. Neste mesmo estudo, foi observado também que os níveis de estradiol foram maiores no grupo que recebeu 10% de linhaça, tanto em ratas maduras quanto imaturas em comparação às ratas que receberam dieta basal. Não foram observadas diferenças no peso uterino em nenhum dos grupos tratados.

Orcheson et al. (1998), utilizando ratas imaturas sexualmente, relataram que houve um ciclo estral irregular ou acíclico em dieta suplementada com níveis crescentes de linhaça ou SDG, por quatro semanas.

Ahmad et al. (2012), também utilizando ratas imaturas sexualmente, testaram o efeito do extrato metanólico das sementes de linhaça na dose de 500mg/kg nos níveis hormonais, peso corporal e peso de alguns órgãos. Como resultado, os valores de peso corporal, uterino e dos ovários foram maiores em comparação ao controle, assim como os níveis de estradiol e progesterona. Os ovários das ratas tratadas, também revelaram a presença de vários folículos de Graaf maduros, juntamente com o corpo lúteo.

Em camundongos imaturos, o extrato metanólico das sementes de linhaça aumentou o peso corporal, uterino e ovariano e acelerou o início da maturidade sexual nas maiores doses testadas, 200 mg/kg e 300 mg/kg, em um tratamento de 25 dias (DILSHAD et al., 2012).

2.6 ESTUDOS SOBRE REATIVIDADE UTERINA

Os estrogênios são responsáveis pela síntese das proteínas contráteis e enzimas reguladoras necessárias para a contratilidade uterina, sendo que somente depois que o estrogênio é secretado e o útero aumenta de tamanho, geralmente na puberdade, é que se desenvolve a capacidade de responder a estimulantes e inibidores das contrações uterinas. O estrogênio aumenta a concentração de receptores tanto para ocitocina quanto para receptores α - adrenérgicos, que modulam os canais de cálcio da membrana promovendo a contração muscular (JACKSON; DUDLEY, 1998).

A produção de prostaglandinas F2 α e E2 também é estimulada pelo estrogênio e estes compostos tem participação importante na contração uterina (FUCHS; FUCHS, 1993).

Vedernikov et al. (2002) mostraram que a ovariectomia em ratas diminui a amplitude contrátil espontânea do útero, entretanto, com a administração de estradiol esta resposta à contração foi aumentada de forma significativa.

Estudos já evidenciaram que o tratamento simultâneo com estradiol e progesterona, aumentam as contrações espontâneas no miométrio uterino em ratas ovariectomizadas, nas quais a expressão de receptores estrogênicos

uterinos do tipo α sofreu uma elevação em comparação ao controle, sugerindo que o efeito desses hormônios na contração uterina é mediado por este tipo de receptores (BULBUL et al., 2007).

Picherit et al. (2000), relataram que depois da ovariectomia em ratas, os RE α estão envolvidos no baixo efeito do fitoestrógeno daidzeína, uma isoflavona da soja, na contração uterina induzida por ocitocina e prostaglandina F 2α (PGF 2α).

Contudo, são escassos os estudos que evidenciam a ação dos fitoestrógenos na contração uterina, que é um fator importante para verificar a ação estrogênica de um determinado composto.

Apesar de existirem estudos sobre a ação das sementes de linhaça (*Linum usitatissimum*) em humanos e animais, estes resultados são contraditórios havendo, portanto, a necessidade de estudos que englobem diversas variáveis presentes em uma investigação sobre a ação fitoestrogênica, como forma de comprovar suas possíveis funções no sistema reprodutor, utilizando um modelo de experimentação animal com hipoestrogenismo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de *Linum usitatissimum* L. (linhaça marrom) no aparelho reprodutor de ratas ovariectomizadas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do extrato das sementes de *L. usitatissimum* no ciclo estral de ratas ovariectomizadas;
- Verificar o efeito de *L. usitatissimum* no peso corporal e consumo de ração das ratas ovariectomizadas;
- Realizar ensaio uterotrófico, determinar o peso dos órgãos e da gordura intra-abdominal de ratas ovariectomizadas e tratadas com *L. usitatissimum*;
- Analisar o perfil bioquímico e hormonal do sangue de ratas ovariectomizadas e tratadas com *L. usitatissimum*;
- Verificar a histomorfometria das mamas, vagina e útero das ratas ovariectomizadas e tratadas com *L. usitatissimum*;
- Avaliar a reatividade uterina induzida por carbacol, prostaglandina e ocitocina em ratas ovariectomizadas tratadas com *L. usitatissimum*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra vegetal

As sementes de *Linum usitatissimum* L. var. *humile* foram adquiridas em farmácia especializada em produtos naturais e manipulação na cidade de São Luís - MA, em fevereiro de 2012, pertencendo ao lote nº 38 do fabricante Germina[®].

4.2 Preparo do material vegetal e extrato hidroalcoólico

As sementes (600 g) foram turbolizadas e maceradas em agitador orbital com EtOH 70% na proporção 1:3 (v/v), ou seja, 1150 mL de pó de sementes/3450 mL de EtOH, por 24 horas, para a preparação do extrato hidroalcoólico. O extrato foi filtrado e o resíduo remacerado na mesma proporção de etanol, por mais duas vezes. O extrato foi concentrado com auxílio de um rotaevaporador, sendo acondicionado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração. A quantidade de resíduo seco obtido do extrato hidroalcoólico foi de 30,5 g com um rendimento de 5,13%.

4.3 Determinação de compostos fitoquímicos

De acordo com a metodologia descrita por Matos (2009), foram realizados os testes para determinação das principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum*. Os metabólitos pesquisados foram: alcaloides, fenóis, taninos, flavonoides, antocianinas, antocianidinas, flavonóis, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, esteroides, triterpenos, saponinas, resinas e cumarinas.

4.4 Animais

Os animais utilizados foram ratas Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Albinus, provenientes do Biotério da Universidade Estadual do Maranhão / UEMA (n = 5 - 6).

Para o desenvolvimento do projeto foram utilizadas ratas adultas (80 dias de idade) com pesos variando entre 200 e 250 gramas, com acesso *ad libitum* à ração e água e mantidas em ciclo claro/escuro de 12h, a uma temperatura entre $22^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{ C}$.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética e Experimentação Animal – CEEA da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) com o protocolo nº 026/2008 (anexo).

4.5 Reagentes, solventes, sais e drogas

Álcool etílico PA (Êxodo Científica); cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina 2% (Syntec); benzoato de estradiol, cloreto de carbamilcolina (carbacol), prostaglandina F2 α e cremofor (Sigma-Aldrich); ocitocina 5 UI/mL (União Química); cloretos de sódio, potássio, magnésio, cálcio, bicarbonato de sódio, fosfato monobásico de sódio anidro, fosfato de sódio dibásico e glicose (D+) anidra PA (Isofar); formol 40% (Rioquímica); kits para dosagens bioquímicas (Bioclin®) e kits para dosagens hormonais (DBC – Diagnostics Biochem Canada Inc.).

4.6 Aparelhos e equipamentos

Balança analítica de precisão (Celtac® FA-2104N), rotaevaporador (Heidolph® Laborota 4000), analisador bioquímico (Bioplus® BIO 2000), fisiógrafo (AD Instruments PowerLab® 4/30), leitora de microplacas de ELISA (Bio-Tek® ELx800), microscópio óptico (Olympus® CX41), agitador mecânico (Nova Ética® 108), centrífuga (Coleman® 90-1) e banho-maria (Thermomix®).

4.7 Testes de atividade farmacológica

4.7.1 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em 6 grupos (n = 5 - 6 ratas) conforme descrição a seguir:

- Falso operado (**FO**): Constituído por ratas submetidas a uma falsa cirurgia, nas quais foi realizada laparotomia de aproximadamente 1 cm na linha mediana, supra-púbica e, posteriormente realizada a sutura, sem retirar os ovários. Após 21 dias da ovariectomia, as ratas receberam, por via oral, água destilada em cremofor (óleo de rícino polioxetilado) a 3%. O volume administrado foi de 0,1 mL/100 g de peso do animal, diariamente, durante dois meses.
- Ovariectomizado (**OVR**): Neste grupo os ovários das ratas foram removidos conforme a técnica de ovariectomia descrita no item 4.7.2.3. Após 21 dias da ovariectomia, as ratas receberam água destilada em cremofor a 3%, por via oral, em volume de 0,1 mL/100 g de peso, diariamente, durante dois meses.
- Ovariectomizado e tratado com Benzoato de Estradiol (**BE**): Após 21 dias da ovariectomia, as ratas receberam por via subcutânea, na região dorsal, benzoato de estradiol, diluído em óleo mineral, na dose de 10 µg/Kg, diariamente, por um período de dois meses.
- Ovariectomizados e tratados com extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* (**LIN100, LIN250 e LIN500**): Após 21 dias da ovariectomia, as ratas foram tratadas diariamente com o extrato nas doses de 100 mg/Kg, 250 mg/kg ou 500 mg/kg por via oral, por um período de dois meses. Os extratos foram solubilizados em água destilada com cremofor a 3%.

4.7.2 Sequência experimental

4.7.2.1 Período de adaptação e seleção dos animais

As ratas passaram por um período de adaptação no biotério setorial do Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Maranhão, onde foram mantidos durante todo o período de desenvolvimento da pesquisa. Antes da composição dos grupos, durante duas semanas, foi determinado o ciclo estral das ratas, sendo que somente os animais que apresentaram ciclo regular, ou seja, passaram por todas as quatro fases do ciclo estral, foram selecionados, de forma randomizada, para a composição dos grupos experimentais deste estudo.

4.7.2.2 Determinação das fases do ciclo estral

A determinação das fases do ciclo estral foi realizada diariamente no período da manhã, entre 8:00 e 10:00 horas, pela análise da citologia vaginal a fresco. A coleta da secreção vaginal foi feita com inserção da ponteira de uma micropipeta contendo 20 µL de solução de NaCl 0,9% estéril, no canal vaginal do animal. O material aspirado foi colocado sobre lâmina de vidro e visualizado em microscópio óptico de luz comum, em aumento de 100 e 400 vezes (MARCONDES, 2002). Foram analisadas as seguintes fases do ciclo estral, que se caracterizam de acordo com os tipos de células: pró-estro, estro, metaestro e diestro. As fases pró-estro e estro indicam atividade estrogênica, também chamada de fase proliferativa, já as fases metaestro e diestro indicam a fase não proliferativa do ciclo. As características de cada ciclo estão descritas na tabela abaixo de acordo com LONG e EVANS (1922).

Tabela 1 – Características e duração das quatro fases do ciclo estral de ratas.

FASES DO CICLO ESTRAL	DURAÇÃO (horas)	CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS
PRÓ-ESTRO	12 - 14	Predominância de células epiteliais nucleadas
ESTRO	25 - 27	Células anucleadas cornificadas
METAESTRO	6 - 8	Proporção semelhante entre células epiteliais nucleadas, cornificadas e leucócitos
DIESTRO	55 - 57	Predominância de leucócitos

Fonte: Long e Evans, 1922.

4.7.2.3 Ovariectomia

Para realizar este procedimento cirúrgico, as ratas foram anestesiadas com a associação dos anestésicos cloridrato de cetamina (75 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal. Foi feita a antisepsia da região ventral dos animais (supra-púbica) para posterior laparotomia de aproximadamente 1 cm na linha mediana e identificação das trompas e ovários. As trompas foram pinçadas e ligadas com fio de sutura e os ovários isolados e retirados após a ligadura. Os tecidos que sofreram

incisão, foram suturados com auxílio de um Catgut cromado cirúrgico nº 4, com fio absorvível estéril. Para o grupo FO, foi realizada somente a localização e exposição dos ovários e depois a sua recolocação para a cavidade abdominal e sutura (KHAJURIA, RAZDAN, MAHAPATRA, 2012).

Após 21 dias do procedimento cirúrgico, todos os animais, tiveram seus esfregaços vaginais analisados por uma semana, para confirmação da redução hormonal endógena causada pela ovariectomia, caracterizada pelo anestro, ou seja, ausência do ciclo regular, que neste caso é evidenciada pela predominância da fase diestro.

4.7.2.4 Determinação do peso corporal e consumo de ração dos animais

Durante todo o período de tratamento foi realizado o controle de peso dos animais, utilizando balança analítica, três vezes por semana. O controle do consumo de ração foi feito por pesagem de uma quantidade fixa de ração, calculada de acordo com a quantidade de animais por gaiola, em média 350 g. Após 24 horas foi pesada a sobra da ração. Este procedimento foi realizado também três vezes por semana, para obtenção de um valor médio semanal. Para obter a quantidade de ração consumida por animal, o valor obtido foi dividido pela quantidade de animais presentes na gaiola.

4.7.2.5 Coleta do sangue e análises bioquímica e hormonal

Ao término do período de tratamento, as ratas foram anestesiadas e submetidas a uma incisão abdominal ventral para punção da artéria aorta abdominal e coleta do sangue, com auxílio de scalp (nº 21G), para posteriormente serem submetidas à eutanásia. O sangue foi recolhido em tubo com gel separador e posteriormente foi realizada a extração do soro por centrifugação (3000 rpm/10 min).

As dosagens bioquímicas quantitativas foram realizadas utilizando o analisador bioquímico semiautomático BIO 2000 Bioplus® para a determinação dos seguintes parâmetros: proteínas totais, albumina, triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol, ureia, creatinina, ácido úrico, glicose, transaminase oxalacética e transaminase pirúvica; utilizando-se a técnica e comprimento de

onda de acordo com o componente dosado e orientação do fabricante dos reagentes (Bioclin®). Para a análise do perfil hormonal ovariano, dosagens de estradiol e progesterona, foi utilizada a técnica de imunoensaio enzimático (ELISA), utilizando-se kits da Diagnostics Biochem Canada Inc.

4.7.2.6 Teste uterotrófico, determinação do peso dos órgãos e gordura intra-abdominal

Ao final do tratamento, a hipófise, as adrenais, os rins, o fígado, o baço e o coração foram identificados, dissecados e retirados para obtenção do peso em balança analítica. O teste uterotrófico, que consiste no peso do útero, foi realizado após a dissecação do útero, retirando-se toda gordura periférica para depois serem pesados. A gordura intra-abdominal também foi removida para posterior pesagem.

Para cada animal, foi calculado o peso relativo do órgão/100 g do peso corporal.

4.7.2.7 Análise histomorfométrica do útero, vagina e mamas

Amostras de tecidos da mama, do útero e da vagina dos animais foram coletadas e conservadas em solução de formalina tamponada a 10%. Posteriormente, passaram pelo processo padrão para obtenção dos cortes histológicos, com espessura de 7 μm , incluídos em parafina e depois corados com hematoxilina-eosina. Os cortes histológicos foram observados em microscópio óptico de luz comum para análise comparativa entre os grupos. Foram medidas no útero a espessura do endométrio (μm), a altura da célula luminal do endométrio (μm), a altura da célula epitelial da glândula uterina (μm), a área das glândulas uterinas (%) e quantidade de glândulas e na vagina, a espessura do epitélio vaginal (μm). Nas mamas, foi analisada a área ocupada pelo parênquima (μm), a área ocupada pelo tecido mamário (%) e o número de ductos e alvéolos. As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio acoplado a uma câmera digital e as análises foram feitas com auxílio do programa de análise de imagem Image J versão 1.44C.

4.7.2.8 Reatividade em útero isolado

Ao final do período de tratamento, o útero das ratas foi retirado para realização dos testes de reatividade ao carbacol, prostaglandina F2 α e ocitocina. Tiras uterinas foram cuidadosamente retiradas e colocadas em uma placa de Petri contendo solução nutritiva De Jalon normal (NaCl 153,5 Mm; KCl 5,6 Mm; NaHCO₃ 5,9 Mm; C₆H₁₂O₆ 5,5 Mm e CaCl₂ 0,5 Mm), tendo-se o cuidado de retirar toda a gordura periférica ao tecido uterino. Os segmentos uterinos, com tamanho aproximado de 0,5 cm, foram suspensos verticalmente em cubas de vidro contendo a solução nutritiva, sendo constantemente aeradas com 95% O₂ / 5% CO₂ e mantidas à temperatura de 37°C em pH 7,4. A preparação foi mantida em repouso por um período de 40 minutos para estabilização, antes do contato com qualquer agente farmacológico, mantendo-se a tensão de 1 g e efetuando-se, neste período, a renovação da solução nutritiva da cuba a cada 10 minutos. Após o período de estabilização, duas curvas concentração-resposta simples e de amplitudes similares para carbacol (10⁻⁵ M), prostaglandina F2 α (10⁻⁵ M) e ocitocina (1 UI/mL) foram obtidas. As variações de tensão das preparações foram medidas com um transdutor de força isométrico, conectado a um amplificador do fisiógrafo PowerLab e ao computador com o software gráfico para registro das contrações.

4.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão das médias. As diferenças entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância One-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman Kuels, para um nível de significância de 5%. Para análise dos dados, foi utilizado o programa GraphPad Prism© versão 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação de compostos fitoquímicos

Os resultados obtidos para o perfil fitoquímico do extrato hidroalcoólico de *L. usitatissimum* mostraram a presença fortemente positiva para esteroides, moderadamente positiva para taninos condensados e fracamente positiva para flavonas, flavonóis e xantonas. Os demais compostos não foram detectados.

Tabela 2 - Resultado da triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico das sementes de *L.usitatissimum*.

COMPOSTOS FITOQUÍMICOS	RESULTADO
ESTEROIDES	+++
TANINOS CONDENSADOS	++
FLAVONAS, FLAVONÓIS E XANTONAS	+

Os resultados estão expressos em grau de intensidade da presença do componente fitoquímico pesquisado, segundo metodologia descrita por Matos (2009). Fortemente positivo (+++), moderadamente positivo (++) e fracamente positivo (+).

5.2 Determinação das fases do ciclo estral

As ratas submetidas à ovariectomia se mantiveram, durante três semanas, predominantemente na fase diestro, caracterizando o anestro, após o qual foi iniciado o tratamento dos animais. A análise do lavado vaginal das ratas revelou que no grupo FO os animais apresentaram ciclo regular, ou seja, passaram por todas as quatro fases do ciclo estral durante todo o período de tratamento. Em contrapartida, os animais do grupo OVR ficaram nas fases não proliferativas, diestro e metaestro, como esperado.

Em relação aos animais ovariectomizados e tratados com o extrato hidroalcoólico de *L. usitatissimum* não houve alteração do ciclo estral das ratas pertencentes ao grupo LIN100, as quais permaneceram 100% na fase diestro, durante todo o tempo de tratamento com o extrato. O grupo LIN250 apresentou-se em maior frequência na fase diestro nos dois meses de tratamento, porém com um pouco mais de 5% de frequência na fase metaestro (Tabela 3 A e B). No grupo LIN500, apesar de ter ocorrido 100% de diestro no

primeiro mês de tratamento, observou-se 14,3% de fase pró-estro e 23,8% de metaestro no esfregaço vaginal das ratas no segundo mês (Tabela 3 B). O grupo BE mostrou um esfregaço vaginal predominante na fase estro (fase proliferativa) com 88,5% no primeiro mês de tratamento e atingindo 100% no segundo mês (Tabela 3 A e B).

Tabela 3 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* no ciclo estral de ratas Wistar.

A

Fases do ciclo estral	Frequência das fases do ciclo estral (%)					
	1º MÊS					
	FO	OVR	BE	LIN100	LIN250	LIN500
PRÓ-ESTRO	37,5	0	7,7	0	0	0
ESTRO	12,5	0	88,5*	0	0	0
METAESTRO	34,4	21,9	0*	0*	5,5*	0*
DIESTRO	15,6	78,1	3,8*	100*	94,5*	100*

B

Fases do ciclo estral	Frequência das fases do ciclo estral (%)					
	2º MÊS					
	FO	OVR	BE	LIN100	LIN250	LIN500
PRÓ-ESTRO	21,9	0	0	0	0	14,3*
ESTRO	34,4	0	100*	0	0	0
METAESTRO	9,3	3,1	0	0	6,5	23,8*
DIESTRO	34,4	96,9	0*	100	93,5	61,9*

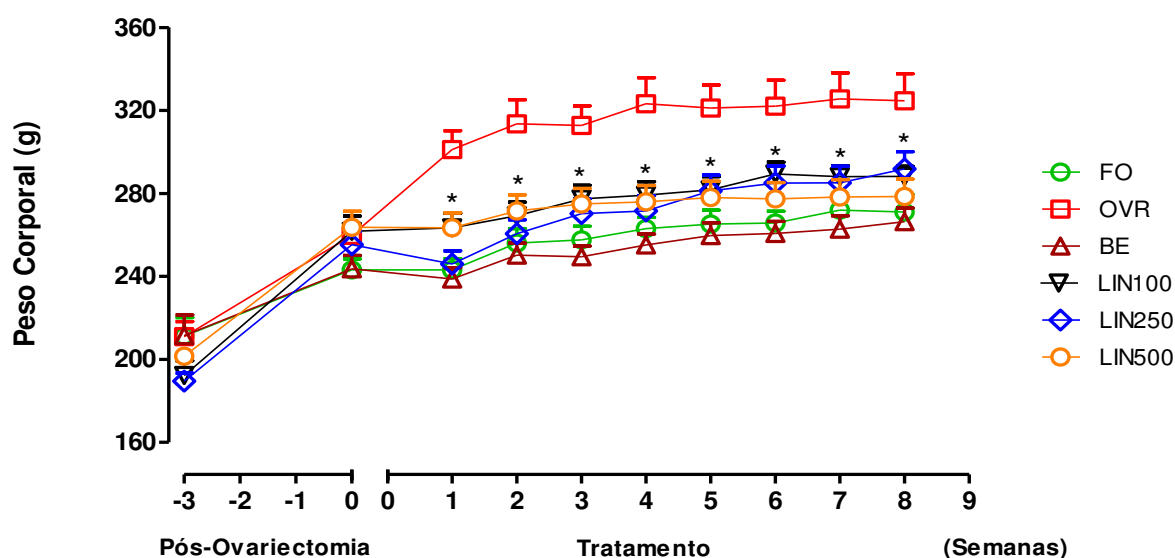
Frequência das fases do ciclo estral de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e de 500 mg/kg (LIN500) no 1º mês (A) e no 2º mês (B) de tratamento. Os valores foram considerados diferentes com * $p < 0,0001$ em relação ao grupo OVR (One-way ANOVA, Newman-Keuls). (n=5-6)

5.3 Determinação do peso corporal e consumo de ração dos animais

O peso corporal dos animais de todos os grupos não mostrou diferenças significativas antes do procedimento cirúrgico de retirada dos ovários. Porém, após o período de 21 dias da ovariectomia, houve aumento do peso corporal de todos os grupos, com média de 25,5%. No período de tratamento, o grupo OVR ($306,1 \pm 12,2$) apresentou aumento do peso corporal que foi maior na 8ª semana, atingindo 19,6%, em relação ao grupo FO ($256,1 \pm 6,3$ g). O extrato

de linhaça preveniu o aumento de peso induzido pela ovariectomia, observando-se nos grupos LIN100 ($269,9 \pm 10,1$ g), LIN250 ($264,6 \pm 10,5$ g) e LIN500 ($266,6 \pm 8,2$ g) um menor valor médio para o peso corporal, correspondendo à redução de 11,8%, 13,5% e 12,9%, respectivamente, quando comparado com o grupo OVR. De forma que os grupos tratados com o extrato apresentaram peso semelhante aos animais do grupo FO. O grupo BE ($250,5 \pm 5,6$ g), apresentou uma redução de 18,2% em relação ao ovariectomizado (Figura 4). Com relação ao consumo de ração, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais, durante as oito semanas de tratamento.

Figura 4 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* no peso corporal de ratas Wistar.



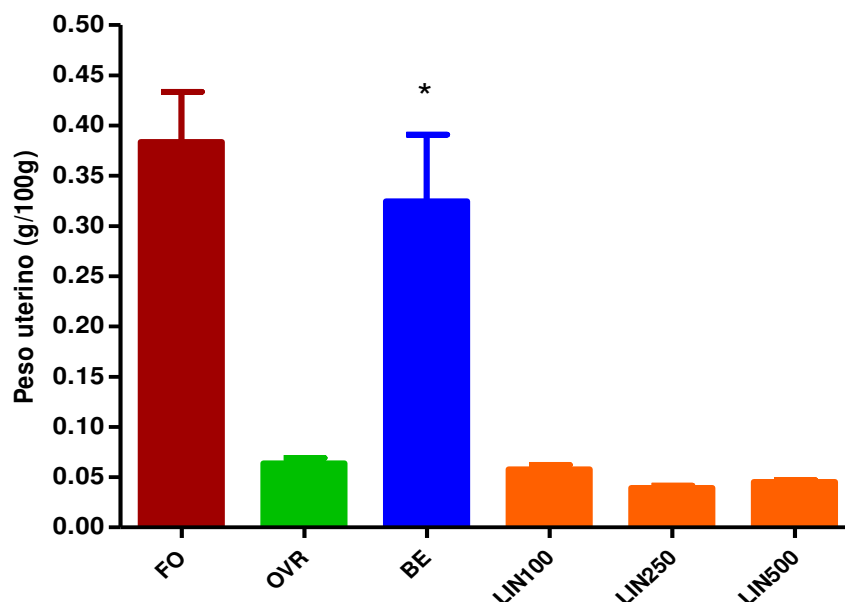
Evolução ponderal de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e de 500 mg/kg (LIN500). Os valores foram considerados diferentes com $*p < 0,001$ em relação ao grupo OVR (One-way ANOVA, Newman-Keuls). (n=5-6)

5.4 Teste uterotrófico

O grupo OVR ($0,06 \pm 0,005$ g), mostrou uma significativa redução de 83,4% no peso uterino em comparação ao grupo FO ($0,38 \pm 0,049$ g), que ocorreu devido à atrofia causada pela retirada dos ovários. A média de peso uterino dos grupos LIN100 ($0,06 \pm 0,004$ g), LIN250 ($0,04 \pm 0,002$ g) e LIN500 ($0,05 \pm 0,002$ g) não foi diferente do grupo OVR (Figuras 5). A administração de

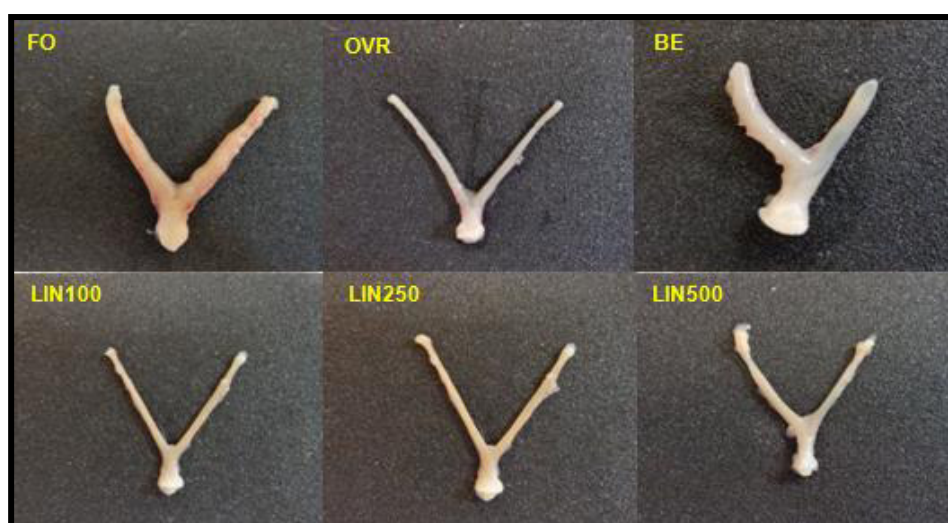
benzoato de estradiol (grupo BE) aumentou significativamente o peso uterino ($0,32 \pm 0,066$ g) em 80,5%, quando comparado ao grupo OVR. A figura 6 mostra o aspecto macroscópico geral dos úteros após ovariectomia, tratados com benzoato de estradiol ou com o extrato de *L. usitatissimum*.

Figura 5 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* no peso do útero de ratas Wistar.



Peso uterino de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e de 500 mg/kg (LIN500). Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão das médias. Os valores foram considerados diferentes com $*p < 0,0001$ em relação ao grupo OVR (One-way ANOVA, Newman-Keuls). (n=5-6)

Figura 6 - Imagens representativas dos úteros das ratas Wistar tratadas com diferentes doses de extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum*.



Aspecto macroscópico do útero de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e de 500 mg/kg (LIN500). (n=5-6)

5.5 Peso dos órgãos e da gordura intra-abdominal

O peso do fígado, baço, rins, adrenais, coração e hipófise não se mostraram diferentes entre os grupos analisados (Tabela 4). Quanto ao peso da gordura intra-abdominal, o grupo OVR ($3,19 \pm 0,169$ g) mostrou um aumento de 47,9% em relação ao grupo FO ($1,67 \pm 0,257$ g). Dentre os grupos tratados com o extrato, somente o grupo que recebeu a maior dose, LIN500 ($2,06 \pm 0,327$ g), apresentou redução do peso da gordura intra-abdominal que foi de 35,5% em comparação ao OVR (Figura 7).

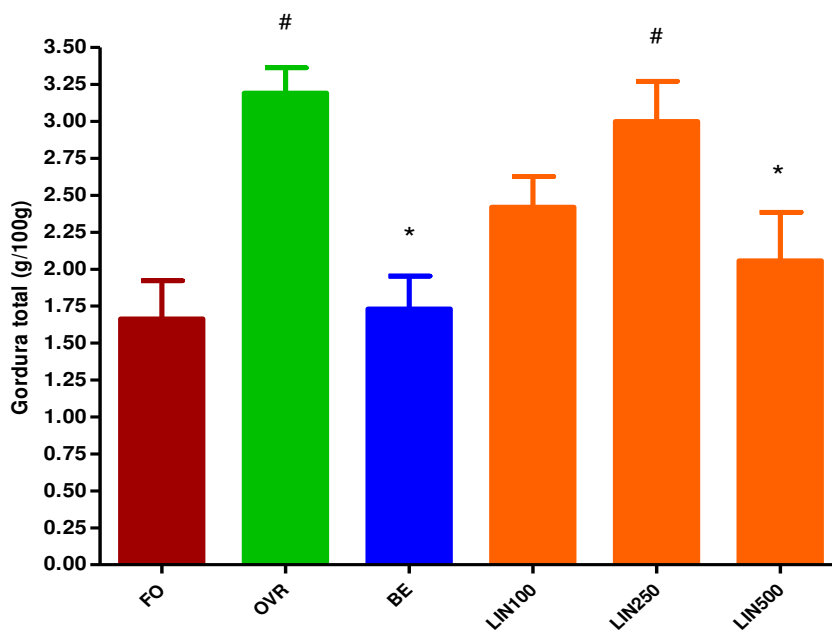
Da mesma forma, no grupo tratado com benzoato de estradiol ($1,73 \pm 0,223$ g), o peso da gordura intra-abdominal se apresentou diminuído em 45,8%. Entre os grupos LIN500 e BE não houve diferença em relação a este parâmetro, que foi semelhante ao grupo FO.

Tabela 4 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* no peso relativo de órgãos de ratas Wistar.

Peso dos órgãos (g/100 g)	FO	OVR	BE	LIN100	LIN250	LIN500
Fígado	2,574±0,18	2,607±0,08	2,666±0,07	2,409±0,13	2,305±0,15	2,418±0,02
Baço	0,219±0,004	0,227±0,01	0,209±0,008	0,228±0,007	0,198±0,01	0,195±0,005
Rins	0,622±0,03	0,567±0,01	0,595±0,04	0,491±0,007	0,554±0,02	0,577±0,01
Adrenais	0,026±0,001	0,026±0,001	0,027±0,001	0,025±0,001	0,025±0,001	0,026±0,0009
Coração	0,366±0,02	0,367±0,02	0,363±0,02	0,322±0,01	0,340±0,01	0,386±0,01
Hipófise	0,035±0,002	0,033±0,006	0,040±0,01	0,035±0,005	0,045±0,001	0,043±0,001

Peso de órgãos de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e de 500 mg/kg (LIN500). Os valores correspondem ao peso de ambos os rins e adrenais (direito e esquerdo). Os dados foram expressos em gramas/100 gramas de peso corporal (g/100 g). Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias (One-way ANOVA, Newman-Keuls). (n=5-6)

Figura 7 - Peso relativo da gordura intra-abdominal de ratas Wistar após tratamento com extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum*.



Peso da gordura intra-abdominal de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e de 500 mg/kg (LIN500). Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão das médias. Os dados foram expressos em gramas/100 gramas de peso corporal (g/100 g). Os valores foram considerados diferentes com * $p < 0,001$ em relação ao grupo OVR e # $p < 0,001$ comparando com o grupo FO (One-way ANOVA, Newman-Keuls). (n=5-6)

5.6 Análise bioquímica do sangue

Quanto às análises bioquímicas, a ovariectomia, por dois meses, não alterou nenhum dos parâmetros avaliados. No grupo tratado com benzoato de estradiol (BE), observou-se uma diminuição das concentrações de glicose e proteínas totais em 20,7% e 15%, respectivamente, em relação ao grupo OVR.

Os grupos tratados com as diferentes doses do extrato de *L. usitatissimum* não apresentaram nenhuma alteração nas dosagens bioquímicas realizadas, durante todo o período de tratamento. Os dados estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* nas dosagens bioquímicas séricas em ratas Wistar.

Parâmetros Bioquímicos	Grupos					
	FO	OVR	BE	LIN100	LIN250	LIN500
GLI (mg/dL)	123,7 ± 9,7	131,4 ± 2,4	104,2 ± 5,1*	129,5 ± 8,4	111,3 ± 3,3	120,7 ± 5,6
CT (mg/dL)	114,6 ± 3,8	123,5 ± 2,0	128,9 ± 1,3	121,8 ± 4,7	124,9 ± 3,8	122,2 ± 2,6
HDL (mg/dL)	42,3 ± 0,8	39,1 ± 1,0	42,5 ± 1,3	43 ± 1,5	40,1 ± 2,0	42,6 ± 4,1
TRI (mg/dL)	70,1 ± 13,4	64,4 ± 1,3	71,0 ± 1,8	70,7 ± 1,8	72,9 ± 1,1	71,9 ± 1,8
UR (mg/dL)	50,0 ± 3,1	51,4 ± 1,8	47,9 ± 2,2	48,1 ± 2,6	42,1 ± 1,0	42,3 ± 2,9
CR (mg/dL)	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,05	0,6 ± 0,03	0,6 ± 0,03	0,6 ± 0,08
PT (g/dL)	5,9 ± 0,08	6,0 ± 0,2	5,1 ± 0,08*	6,0 ± 0,2	6,6 ± 0,1	5,8 ± 0,1
ALB (g/dL)	2,9 ± 0,08	2,8 ± 0,02	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,04	2,5 ± 0,04	2,5 ± 0,1
AU (mg/dL)	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,7 ± 0,2	3,6 ± 0,09	3,6 ± 0,1	3,7 ± 0,1
TGO (U/L)	88,2 ± 4,8	112,0 ± 7,3	87,2 ± 6,6	100,0 ± 8,0	120,5 ± 3,6	120,3 ± 3,5
TGP (U/L)	47,7 ± 4,8	49,6 ± 4,8	40,8 ± 3,5	53,8 ± 6,0	51,6 ± 2,2	44,0 ± 4,0

Dosagens bioquímicas séricas de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e de 500 mg/kg (LIN500). GLI - glicose, CT - colesterol total, HDL - colesterol, TRI - triglicerídeos, UR - ureia, CR - creatinina, PT - proteínas totais, ALB - albumina, AU - ácido úrico, TGO - transaminase oxalacética e TGP - transaminase pirúvica. Os valores foram considerados diferentes com *p<0,05 em relação ao grupo OVR (One-way ANOVA, Newman-Keuls). Os resultados expressam as médias ± erro padrão das médias. (n=5-6)

5.7 Dosagem hormonal

Na Tabela 6 estão descritos os resultados das dosagens dos hormônios estradiol e progesterona no soro das ratas falso operadas e ovariectomizadas tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* ou benzoato de estradiol.

O grupo OVR apresentou uma diminuição de 75,3% na concentração de estradiol (22,7 ± 0,7 pg/mL) quando comparado ao grupo FO (92,0 ± 11,5 pg/mL). Dentre os grupos tratados pelo extrato, nenhuma das doses testadas alterou os níveis sanguíneos de estradiol. No grupo tratado com benzoato de estradiol (91,5 ± 15,6 pg/mL), o aumento no estradiol sérico foi de 75,2% em relação ao grupo OVR.

A concentração de progesterona nas ratas do grupo OVR foi de $3,1 \pm 1,1$ ng/mL, que não foi diferente em comparação ao grupo FO ($4,5 \pm 1,4$ ng/mL). Da mesma forma, não houve diferenças da progesterona entre os grupos tratados com o extrato da linhaça, BE e OVR.

Tabela 6 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* nas dosagens hormonais séricas de ratas Wistar.

Hormônios	Grupos					
	FO	OVR	BE	LIN100	LIN250	LIN500
Estradiol (pg/mL)	$92,0 \pm 11,5$	$22,7 \pm 0,7$	$95,5 \pm 12,6^*$	$27,6 \pm 3,8$	$20,4 \pm 1,1$	$41,6 \pm 1,1$
Progesterona (ng/mL)	$5,6 \pm 1,4$	$2,2 \pm 0,9$	$1,7 \pm 0,4$	$2,8 \pm 1,8$	$1,3 \pm 0,09$	$2,7 \pm 1,0$

Dosagens hormonais séricas de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e de 500 mg/kg (LIN500). Os valores foram considerados diferentes com $*p < 0,0001$ comparado com o grupo OVR (One-way ANOVA, Newman-Keuls). Os resultados expressam as médias $\pm$ erro padrão das médias. (n=5-6)

5.8 Histomorfometria do útero, vagina e mamas de ratas Wistar

A análise histomorfométrica do tecido uterino das ratas, após dois meses de tratamento, que está disposta na Tabela 7, foi realizada utilizando cortes transversais e longitudinais, para a análise de toda a sua extensão incluindo endométrio, epitélio luminal e glândulas uterinas. A espessura do endométrio se mostrou diminuída com a ovariectomia, evidenciando a atrofia do tecido endometrial no grupo OVR ($7,4 \pm 0,5$ μ m), quando comparado ao grupo FO ($24,3 \pm 0,4$ μ m), em 69,5%. Os grupos de animais tratados com as doses do extrato não mostraram diferença na espessura endometrial, quando comparados ao OVR. O tratamento com benzoato de estradiol aumentou de forma significativa, em 47,9%, a espessura do endométrio ($16,9 \pm 0,3$ μ m), em comparação ao grupo OVR (Tabela 7 e Figura 8).

Tabela 7 - Histomorfometria do epitélio uterino e vaginal de ratas Wistar após tratamento com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum*.

Parâmetros	FO	OVR	BE	LIN100	LIN250	LIN500
Espessura do endométrio $\times 10^5$ (μm)	24,3 $\pm$ 0,4	7,4 $\pm$ 0,5#	16,9 $\pm$ 0,3*#	7,2 $\pm$ 0,3#	6,3 $\pm$ 0,2#	6,6 $\pm$ 0,2#
Altura do epitélio luminal (μm)	51,8 $\pm$ 1,6	23,9 $\pm$ 0,5#	56,8 $\pm$ 1,9*#	26,0 $\pm$ 0,3#	24,7 $\pm$ 0,3#	27,4 $\pm$ 0,8*#
Área da glândula $\times 10^5$ (μm^2)	311,2 $\pm$ 42,2	127,9 $\pm$ 10,9#	349,9 $\pm$ 39,4*#	162,6 $\pm$ 10,0#	129,7 $\pm$ 11,1#	115,4 $\pm$ 11,5#
Altura do epitélio da glândula (μm)	46,6 $\pm$ 0,9	29,8 $\pm$ 0,6#	52,9 $\pm$ 0,9*#	29,8 $\pm$ 0,3#	27,1 $\pm$ 0,5#	28,7 $\pm$ 0,7#
Nº de glândulas uterinas	4,6 $\pm$ 0,6	2,8 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,6	4,8 $\pm$ 0,3	3,2 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,4
%Glândulas uterinas	6,4 $\pm$ 1,1	1,6 $\pm$ 0,2#	8,4 $\pm$ 0,9*#	3,5 $\pm$ 0,3#	1,9 $\pm$ 0,2#	3,0 $\pm$ 0,4#
Espessura do epitélio vaginal (μm)	257,2 $\pm$ 11,9	46,6 $\pm$ 2,1#	356,8 $\pm$ 11,1*#	30,7 $\pm$ 0,9#	21,0 $\pm$ 0,4#	35,9 $\pm$ 0,4#

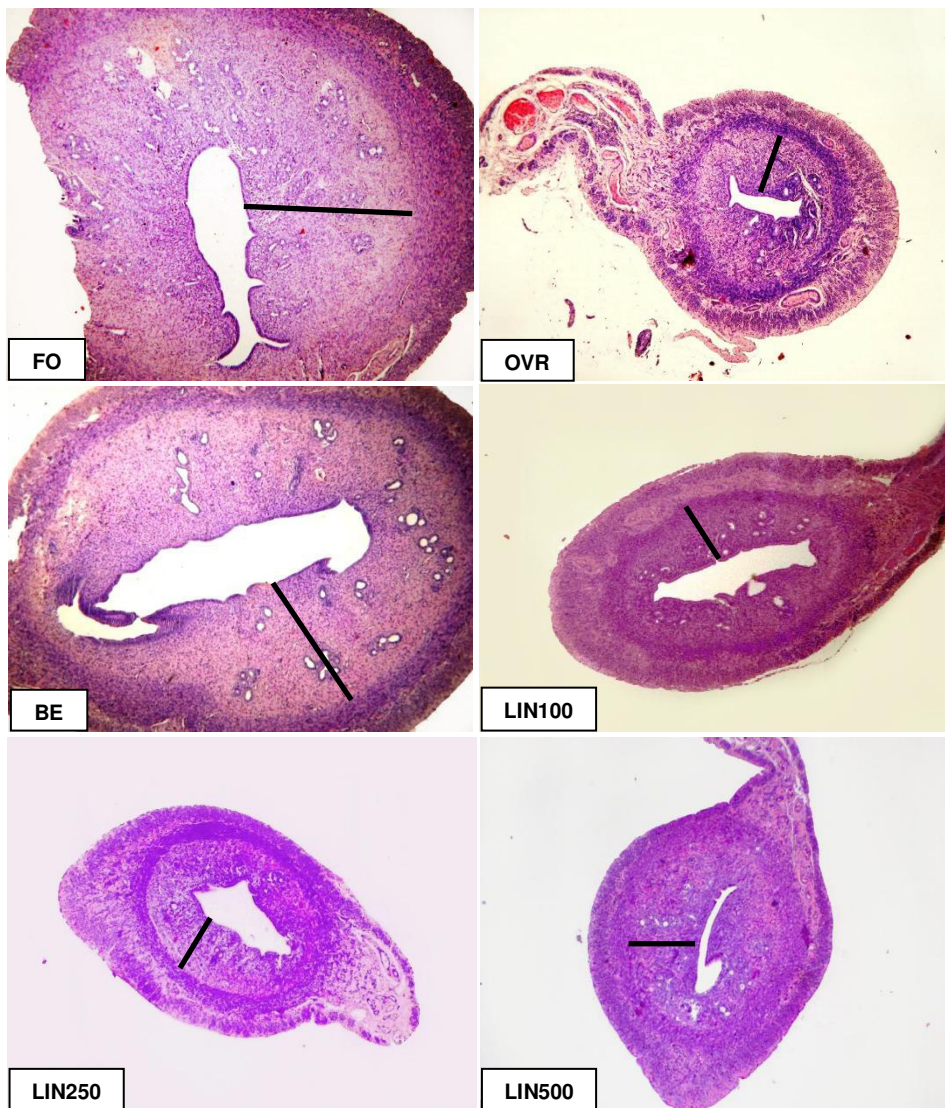
Análise histomorfométrica do útero e epitélio vaginal de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e de 500 mg/kg (LIN500). Os valores foram considerados diferentes com * $p < 0,0001$ comparado com o grupo OVR ou # $p < 0,0001$ comparado com o grupo FO (One-way ANOVA, Newman-Keuls) (n=5-6)

Da mesma forma, no grupo OVR, a altura da camada celular do epitélio luminal (23,9 $\pm$ 0,5 μm) e a altura do epitélio da glândula uterina (29,8 $\pm$ 0,6 μm) foram reduzidas em 53,8% e 35,9% respectivamente, em relação ao grupo FO (51,8 $\pm$ 1,6 μm ; 46,6 $\pm$ 0,9 μm). Quanto aos grupos tratados com o extrato, apenas o grupo LIN500 (27,4 $\pm$ 0,8 μm) mostrou um discreto aumento do epitélio luminal do útero em 12,8% quando comparado ao grupo OVR (Tabela 7 e Figura 9), mas para a altura do epitélio da glândula, não houve diferenças significantes entre os grupos tratados e o OVR. O tratamento com o benzoato de estradiol reverteu a diminuição dos epitélios luminal e da glândula, aumentando a altura desses epitélios em 57,9% e 43,5%, respectivamente, em relação ao grupo OVR. Quanto à área da glândula e percentagem de glândulas uterinas, o grupo OVR mostrou uma diminuição em 58,9% e 75%, respectivamente, em relação ao grupo FO. Os grupos de animais tratados com as doses do extrato não mostraram diferenças nestes parâmetros quando comparados ao grupo OVR, enquanto que o tratamento com benzoato de estradiol no grupo BE reverteu esta diminuição causada pela ovariectomia,

aumentando a área da glândula e percentagem de glândulas uterinas em 63,4% e 81%, respectivamente (Tabela 7).

Com relação ao parâmetro número de glândulas uterinas, não houve diferenças entre os grupos experimentais (Tabela 7).

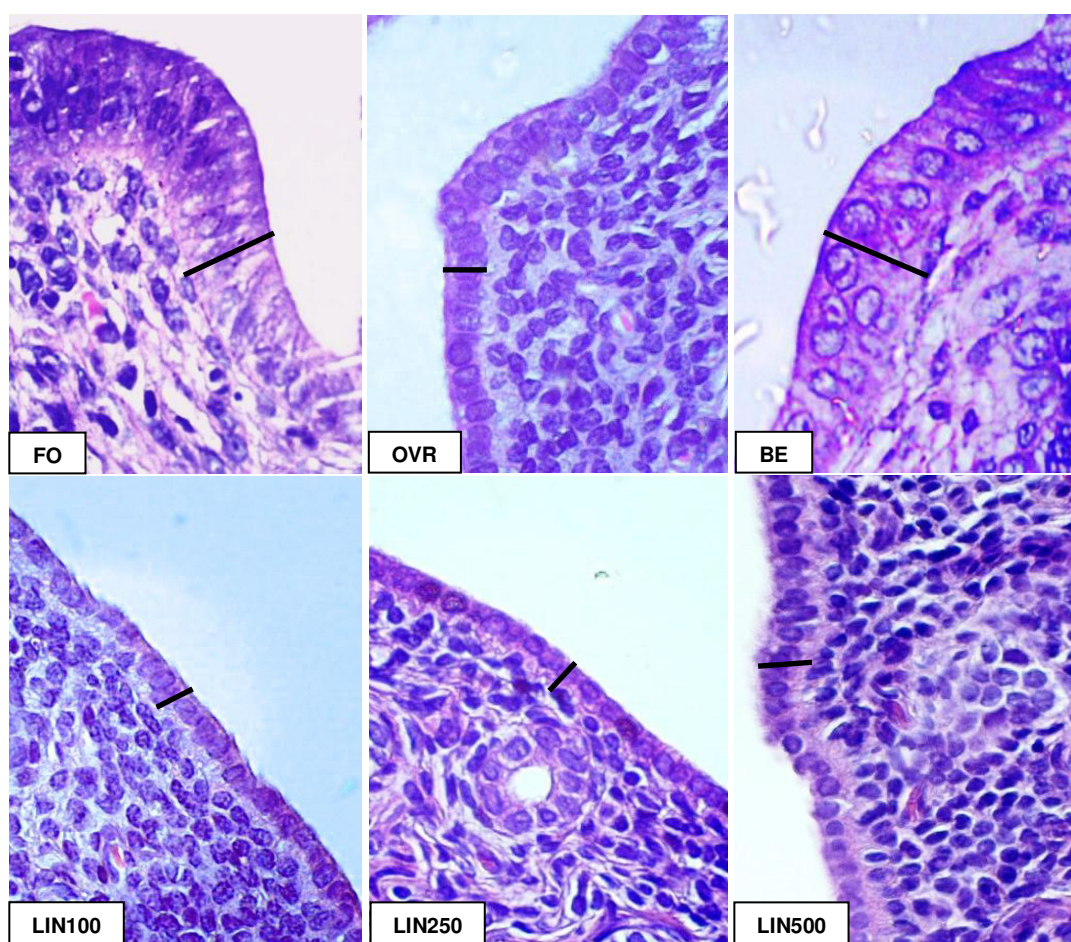
Figura 8 - Fotomicrografia do endométrio de ratas Wistar ovariectomizadas tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum*.



Cortes histológicos evidenciando a espessura endometrial de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e de 500 mg/kg (LIN500). As linhas pretas representam a espessura do endométrio. Hematoxilina - eosina; Aumento de 50x.

A análise do epitélio vaginal revelou que a ovariectomia reduziu em 81,9% ($46,6 \pm 2,1 \mu\text{m}$) sua espessura em comparação ao grupo FO ($257,2 \pm 11,9 \mu\text{m}$). O tratamento de animais ovariectomizados com as três doses de extrato das sementes de *L. usitatissimum* não alterou a espessura do epitélio vaginal, que se manteve atrofiado como no grupo OVR. Porém o benzoato de estradiol (BE = $356,8 \pm 11,1 \mu\text{m}$) induziu o aumento de 86,9% em comparação ao OVR (Tabela 7).

Figura 9 - Fotomicrografia do útero de ratas Wistar ovariectomizadas tratadas com o extrato hidroalcoólico de *L. usitatissimum*.



Cortes histológicos evidenciando a altura do epitélio luminal uterino de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e de 500 mg/kg (LIN500). As linhas pretas representam a espessura do epitélio luminal uterino. Hematoxilina - eosina; Aumento de 400x.

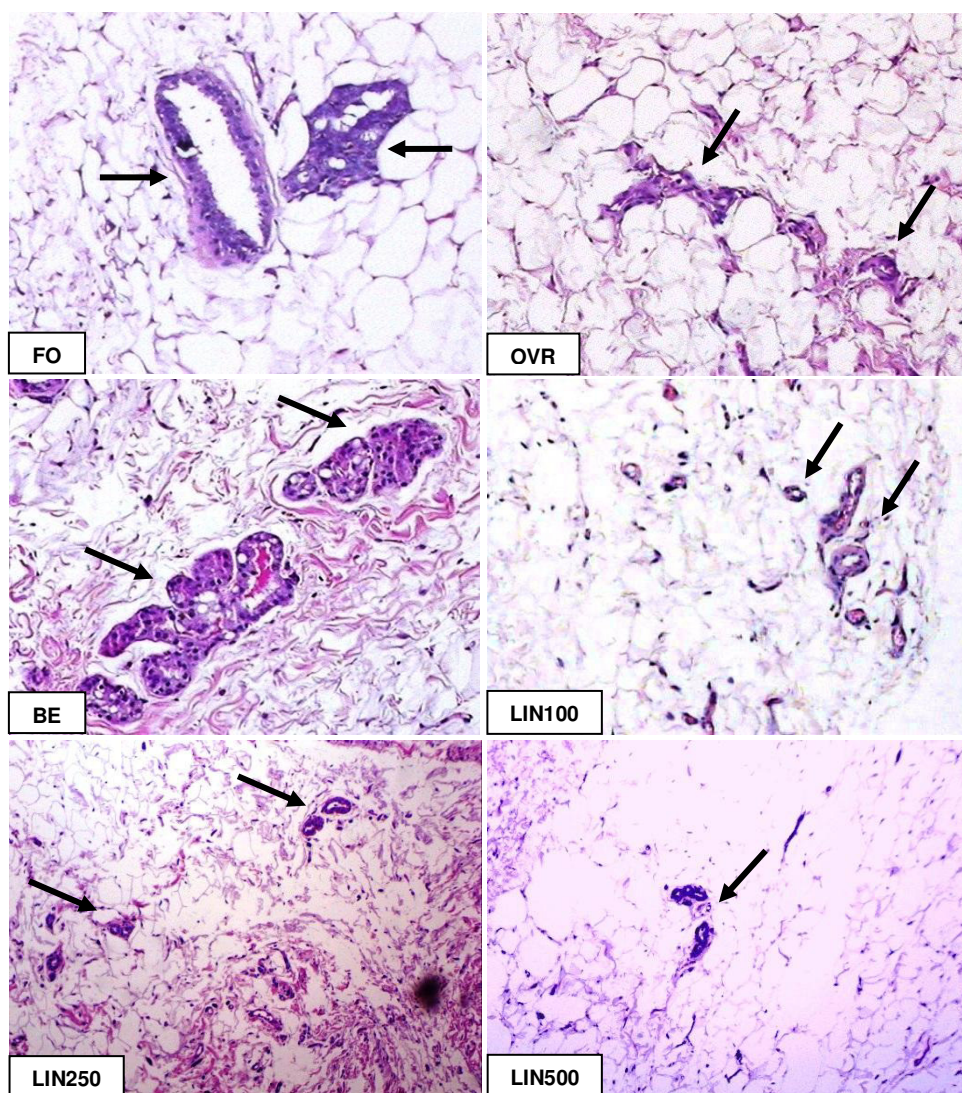
Com relação à análise das mamas, observou-se um padrão caracterizado pela presença de ductos e botões alveolares, onde a área do parênquima foi significativamente reduzida em 49% no grupo OVR ($180,1 \pm 26,6 \mu\text{m}^2$) quando comparado ao grupo FO ($352,9 \pm 64,0 \mu\text{m}^2$). O grupo OVR mostrou uma maior concentração de tecido adiposo e parênquima escasso, com poucos ductos e alvéolos. O mesmo padrão foi observado também em relação ao percentual de parênquima mamário, onde o grupo OVR ($2,8 \pm 0,6\%$) obteve uma diminuição em 54,8% em relação ao grupo FO ($6,2 \pm 1,2\%$). Para os grupos tratados com as diferentes doses do extrato, não houve diferenças significativas entre estes e o grupo OVR em todos os parâmetros avaliados nas mamas. A administração de benzoato de estradiol induziu no grupo BE, a presença de uma área do parênquima bem desenvolvido, que se mostrou aumentado em 66,1% ($531,3 \pm 72,7 \mu\text{m}^2$) em relação ao OVR, assim como na percentagem de parênquima ($10,6 \pm 1,1\%$), que aumentou em 73,6% também comparado ao OVR (Tabela 8 e Figura 10).

Tabela 8 - Histomorfometria das glândulas mamárias de ratas Wistar ovariectomizadas tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum*.

Parâmetros	FO	OVR	BE	LIN100	LIN250	LIN500
Área do parênquima $\times 10^5 (\mu\text{m}^2)$	$352,9 \pm 64,0$	$180,1 \pm 26,6\#$	$531,3 \pm 72,7^{*}\#$	$204,6 \pm 24,1\#$	$127,0 \pm 17,9\#$	$119,7 \pm 12,5\#$
Parênquima mamário(%)	$6,2 \pm 1,2$	$2,8 \pm 0,6\#$	$10,6 \pm 1,1^{*}\#$	$3,6 \pm 0,5\#$	$1,1 \pm 0,2\#$	$1,5 \pm 0,1\#$
Nº de ductos e alvéolos	$3,5 \pm 0,8$	$2,4 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,6$	$4,6 \pm 0,6$	$3,6 \pm 0,3$

Análise histomorfométrica das mamas de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e 500 mg/kg (LIN500). Os valores foram considerados diferentes com $*p < 0,0001$ comparado com o grupo OVR ou $\#p < 0,0001$ comparado com o grupo FO (One-way ANOVA, Newman-Keuls) (n=5-6)

Figura 10 - Fotomicrografia das mamas de ratas Wistar ovariectomizadas tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum*.



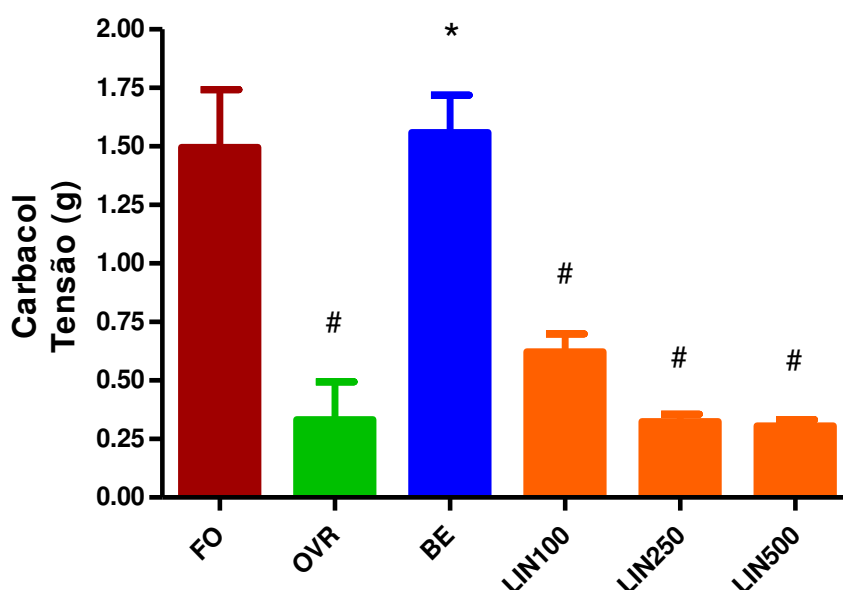
Cortes histológicos evidenciando os ductos e alvéolos mamários de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e de 500 mg/kg (LIN500). As setas pretas indicam os ductos e alvéolos mamários. Hematoxilina - eosina; Aumento de 100x.

5.9 Reatividade em útero isolado

Para testar a reatividade do útero, foram utilizadas tiras uterinas obtidas das ratas de todos os grupos experimentais. A reatividade foi observada com o carbacol (10^{-5} M), prostaglandina F2 α (PGF2 α , 10^{-5} M) e ocitocina (1 UI/mL), ao final de oito semanas de tratamento dos animais. A ovariectomia reduziu significativamente a força de contração induzida pelo carbacol no grupo OVR

($0,33 \pm 0,16$ g/tensão) em 77,8% em comparação ao grupo FO ($1,50 \pm 0,24$ g/tensão). Os grupos LIN100 ($0,62 \pm 0,07$ g/tensão), LIN250 ($0,32 \pm 0,03$ g/tensão) e LIN500 ($0,31 \pm 0,02$ g/tensão) mostraram uma força de contração uterina semelhante à do grupo OVR. No grupo BE, a reposição hormonal preveniu a redução da reatividade uterina ao carbacol ($1,56 \pm 0,15$ g/tensão) (Figura 11).

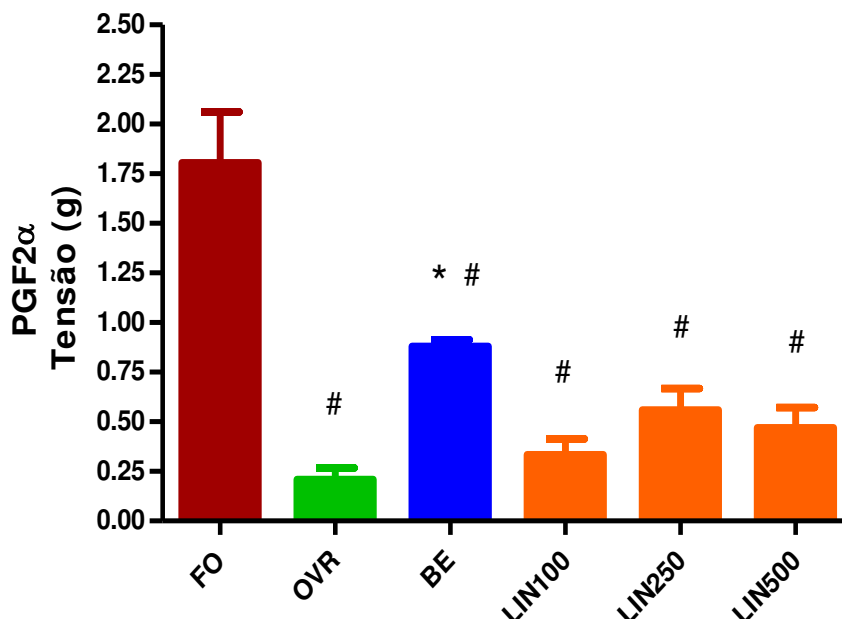
Figura 11 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na força de contração induzida pelo carbacol no útero de ratas Wistar.



Reatividade uterina induzida pelo carbacol de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e de 500 mg/kg (LIN500). As colunas e barras verticais representam a média $\pm$ erro padrão das médias. Os valores foram considerados diferentes com * $p < 0,001$ comparado com o grupo OVR ou # $p < 0,001$ comparado com o grupo FO (One-way ANOVA, Newman-Keuls). (n=5-6)

A força de contração induzida por PGF2 α também sofreu influência da ovariectomia, que foi reduzida no grupo OVR ($0,21 \pm 0,05$ g/tensão) em 88,4% em comparação ao grupo FO ($1,80 \pm 0,25$ g/tensão). Não houve diferença entre os grupos tratados com o extrato de linhaça, LIN100 ($0,33 \pm 0,08$ g/tensão), LIN250 ($0,56 \pm 0,10$ g/tensão) e LIN500 ($0,47 \pm 0,10$ g/tensão) em comparação ao grupo OVR. A administração de benzoato de estradiol provocou um aumento da força de contração do grupo BE ($0,88 \pm 0,03$ g/tensão) em 76,2% quando comparado ao grupo OVR, porém não atingiu a tensão máxima observada no grupo FO (Figura 12).

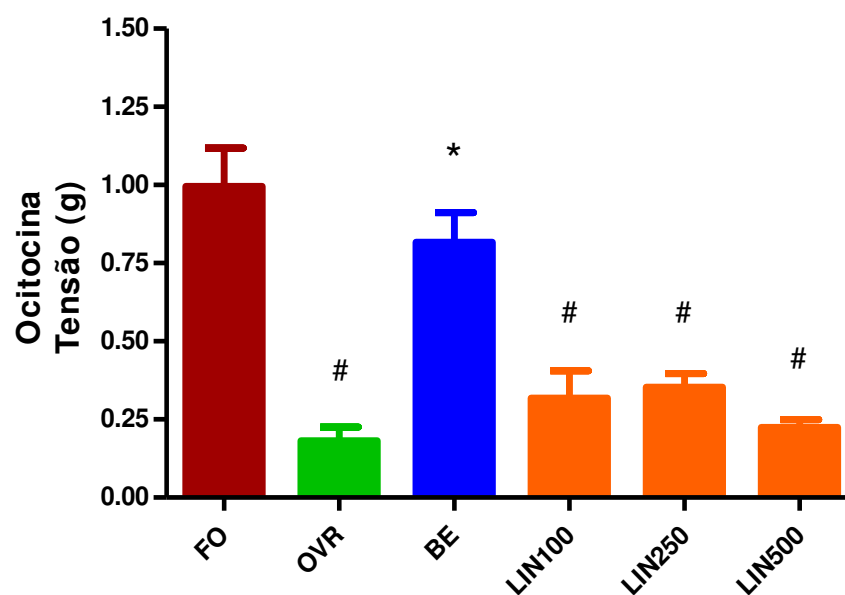
Figura 12 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na força de contração induzida por prostaglandina F2 α no útero de ratas Wistar.



Reatividade uterina induzida por prostaglandina F2 α de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e de 500 mg/kg (LIN500). As colunas e barras verticais representam a média $\pm$ erro padrão das médias. Os valores foram considerados diferentes com * $p < 0,001$ comparado com o grupo OVR ou # $p < 0,0001$ comparado com o grupo FO (One-way ANOVA, Newman-Keuls). (n=5-6)

Quanto à força de contração induzida pela ocitocina, houve, da mesma forma que para as outras drogas testadas, uma redução da reatividade uterina com a ovariectomia (OVR = $0,18 \pm 0,04$ g/tensão) em 81,7% em comparação ao grupo FO ($0,99 \pm 0,12$ g/tensão). Os grupos LIN100 ($0,32 \pm 0,08$ g/tensão), LIN250 ($0,35 \pm 0,04$ g/tensão) e LIN500 ($0,22 \pm 0,02$ g/tensão) não mostraram diferença em relação ao grupo OVR. Os grupos FO e BE ($0,82 \pm 0,09$ g/tensão) não foram diferentes entre si, sendo que a administração do benzoato de estradiol no grupo BE resultou em aumento de 77,8% em relação ao grupo OVR (Figura 13).

Figura 13 - Efeito do extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na força de contração induzida por ocitocina no útero de ratas Wistar.



Reatividade uterina induzida por ocitocina de ratas Wistar falso-operadas (FO), ovariectomizadas (OVR), ovariectomizadas e tratadas com benzoato de estradiol (BE), ovariectomizadas e tratadas com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* na dose de 100 mg/kg (LIN100), de 250 mg/kg (LIN250) e de 500 mg/kg (LIN500). As colunas e barras verticais representam a média $\pm$ erro padrão das médias. Os valores foram considerados diferentes com * $p < 0,0001$ comparado com o grupo OVR ou # $p < 0,0001$ comparado com o grupo FO (One-way ANOVA, Newman-Keuls) ($n=5-6$).

6 DISCUSSÃO

Na análise do perfil fitoquímico do extrato hidroalcoólico a 70% das sementes de *L. usitatissimum* foi detectada a presença de esteroides, taninos condensados e flavonas, flavonóis e xantonas. Zawar et al. (2010), que utilizou o extrato hidroalcoólico de *L. usitatissimum* a 50% detectou a presença de flavonoides e saponinas, enquanto que Anwar e Przybylski (2012) revelaram em seus estudos que o extrato hidroalcoólico a 80% apresentou compostos fenólicos e flavonoides. Com o extrato das sementes de linhaça obtido de outro tipo de solvente, o metanólico a 80%, foram encontrados alcaloides e saponinas como principais metabólitos secundários (AHMAD et al., 2012).

Neste estudo não foi possível verificar a presença das lignanas, fitoestrógeno encontrado nas sementes de linhaça, pois estão na forma de precursor, o SDG, que não é detectado por nenhum dos testes fitoquímicos realizados. Entretanto, podem ter contribuído para alguns resultados encontrados neste estudo e que serão descritos posteriormente, uma vez que é uma classe de compostos que possui semelhança estrutural com o estradiol e por isso se ligam aos receptores de estrogênio, exercendo atividades estrogênicas ou agindo como antagonistas, inibindo o estrogênio endógeno (CARREAU et al., 2008). Além disso, os esteroides e flavonas detectados na análise fitoquímica, também são relatados em estudos como compostos que possuem atividade estrogênica (CHAO, LIN, 2011; MILLIGAN et al., 1999).

Para avaliar a atividade estrogênica de *L. usitatissimum* no aparelho reprodutor, foi empregado o modelo animal ovariectomizado, que reproduz as alterações bioquímicas e fisiológicas que ocorrem em mulheres na menopausa, sendo que neste modelo, as ratas são castradas bilateralmente, levando assim à cessação na produção dos estrogênios ovarianos (HO et al., 2007; RIMOLDI et al., 2007).

Inicialmente foi determinado o ciclo estral das ratas. O ciclo estral é composto por quatro fases: pró-estro, estro, metaestro e diestro. A fase pró-estro consiste na predominância de células epiteliais nucleadas, a fase estro se caracteriza pela presença principal de células cornificadas anucleadas, já a fase metaestro consiste da mesma proporção de leucócitos, células

cornificadas e epiteliais nucleadas e por fim, a fase diestro, é caracterizada pela predominância de leucócitos (LONG; EVANS, 1922). As duas primeiras fases citadas são as proliferativas do ciclo, que apresentam picos de concentração de estradiol e progesterona, enquanto que as duas últimas fases (metaestro e diestro) são as fases não proliferativas do ciclo, nas quais os hormônios estão em níveis basais (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007).

Como resultado da alteração hormonal causada pela ovariectomia, o ciclo estral das ratas permanece em maior frequência em diestro, fase não proliferativa do ciclo, caracterizada por secreção vaginal escassa e presença abundante de leucócitos (MARCONDES et al., 2002). Este processo foi observado em nossos resultados, no qual o grupo OVR se manteve em maior proporção na fase diestro, diferente do grupo FO, que teve seus ovários preservados e por isso apresentou todas as fases do ciclo estral nos dois meses de tratamento.

Durante as fases proliferativas do ciclo estral, como já mencionado, há um aumento dos níveis de estradiol, promovendo a maturação do epitélio vaginal que ocorre principalmente na fase pró-estro e início da fase estro (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007; MARCONDES et al., 2002). Nos resultados encontrados neste estudo com o extrato de linhaça, não houve alteração do estradiol, apesar de ter havido uma maior concentração deste hormônio na dosagem do soro das ratas tratadas com 500 mg/kg de linhaça em comparação ao grupo OVR, aumento este, que pode ser a provável explicação para o aparecimento, no 2º mês de tratamento, de 14,3% de pró-estro na citologia vaginal das ratas. Apesar desta maturação na citologia vaginal, não houve alteração na espessura do epitélio vaginal em nenhum dos grupos tratados com o extrato, sendo semelhante ao grupo OVR, porém diferente do grupo BE, que mostrou um aumento significativo na espessura deste epitélio. Provavelmente, a proliferação celular encontrada na citologia vaginal pode ser resultado da interação com os receptores de estrogênio tipo α , que estão envolvidos com a proliferação, estratificação e cornificação do epitélio vaginal (COUSE et al., 1995). Quanto ao aumento nos níveis de estradiol observados na dosagem hormonal, possivelmente algum dos componentes fitoquímicos presente no extrato como os esteroides ou mesmo as lignanas, devido sua semelhança estrutural com o estrogênio, podem ter

interagido com os anticorpos antiestradiol contidos na técnica imunoenzimática empregada.

Resultados semelhantes aos nossos quanto ao epitélio vaginal, foram observados por Zawar et al. (2010), que utilizaram extrato etanólico de sementes de linhaça nas doses de 500 mg/kg e de 1000 mg/kg. Estes autores observaram maturação do epitélio vaginal utilizando ratas imaturas sexualmente e ovariectomizadas, os resultados obtidos podem estar relacionados com a forte presença de flavonoides encontrados no perfil fitoquímico realizado neste estudo. Porém, não foi realizada a dosagem dos hormônios ovarianos.

Além da investigação de maturação do epitélio vaginal, em nosso estudo foi empregado o teste uterotrófico, no qual é determinado o peso do útero como medida do desenvolvimento uterino, sendo, portanto, um método muito utilizado para mostrar a atividade estrogênica de uma substância, seja ela química ou proveniente de plantas (MARIOTTI et al., 2011). Em nossos resultados, o peso uterino do grupo OVR foi reduzido em 83,4%, comparando às ratas não ovariectomizadas (FO), resultado esperado devido à atrofia uterina causada pela retirada dos ovários. Os animais do grupo BE apresentaram o peso do útero aumentado de forma significativa em 80,5% quando comparado ao OVR. Esta reversão foi ocasionada pela reposição hormonal com benzoato de estradiol administrado diariamente aos animais ovariectomizados, o qual promoveu o efeito trófico esperado e característico do estrógeno no trato reprodutivo (WEISS, 2000). Nos grupos dos animais ovariectomizados que receberam o extrato, não houve alteração do peso uterino quando comparado ao OVR, mostrando que nas doses testadas, o extrato de *L. usitatissimum* não estimulou a proliferação e/ou a secreção uterina em ratas castradas, apesar do discreto aumento na altura do epitélio luminal uterino observado na histomorfometria, que será descrito adiante.

Assim como o resultado obtido em nosso trabalho, o estudo de Sacco et al. (2009), observou que não houve diferença no peso uterino de ratas entre o grupo com dieta suplementada por 10% de linhaça e o grupo controle com dieta basal, ambos ovariectomizados. Ahmad et al. (2012), obtiveram um discreto aumento do peso uterino de 11,3% em relação ao controle, mas que não chegou a ser significativo, utilizando ratas imaturas não ovariectomizadas

tratadas com extrato aquoso metanólico de sementes de linhaça na dose de 500 mg/kg, por 14 dias. Já Zawar et al. (2010) mostraram que as doses de 500 mg/kg e 1000 mg/kg de extrato etanólico de *L. usitatissimum* aumentaram o peso do útero de ratas imaturas não ovariectomizadas em relação ao controle em 48,4% e 51,6%, respectivamente, após 28 dias de tratamento. O aumento de peso uterino ocorrido nestes últimos estudos pode ter sido ocasionado pelo uso das sementes de *L. usitatissimum* em ratas que apresentavam ovários, sugerindo que o efeito estrogênico da linhaça está associado aos níveis normais de hormônios ovarianos, diferente do modelo experimental ovariectomizado empregado em nosso estudo.

Alguns estudos mostram que ratas ovariectomizadas apresentam atrofia do útero e do sistema reprodutor devido à diminuição do estrogênio na circulação, mas com a administração de substâncias estrogênicas há um desencadeamento de efeitos tróficos no útero, cornificação vaginal, aumento do glicogênio e alterações proliferativas no endométrio (ALBERTAZZI, SHARMA, 2005; WILLIAMSON, OKPAKO, EVANS, 1996), como ocorrido no grupo que recebeu o benzoato de estradiol, o fármaco padrão do nosso estudo.

Na avaliação histomorfométrica, a ovariectomia reduziu todos os parâmetros analisados no útero, endométrio e vagina. O extrato de *L. usitatissimum* na dose de 500 mg/kg, mostrou um aumento significativo do epitélio luminal do útero em 12,8% quando comparado ao grupo OVR, indicando ação proliferativa do extrato na camada epitelial que recobre a luz uterina. Apesar deste discreto efeito, no grupo LIN500 não houve alteração da espessura do endométrio e nem das glândulas uterinas, além de que este aumento não foi suficiente para alterar o peso do útero, conforme descrito anteriormente. No grupo BE, os parâmetros do útero e vagina avaliados neste trabalho foram aumentados. Estudos utilizando altas doses de isoflavonas, um conhecido fitoestrógeno da soja, revelaram um aumento na área do endométrio e no número de glândulas endometriais em ratas ovariectomizadas, tratadas por um período de 30 dias, indicando um efeito uterotrófico possivelmente mediado por receptores β -estrogênicos, que são os receptores que as isoflavonas possuem maior afinidade, apesar de estarem menos frequentes no endométrio, quando comparado aos receptores α (CARBONEL et al., 2011, MORITO et al., 2001). Provavelmente, as sementes de linhaça podem estar

atuando em um mecanismo semelhante às isoflavonas, ou seja, interagindo com receptores β , resultando assim, no discreto aumento observado no epitélio luminal uterino.

A mama é outro importante tecido cujo desenvolvimento está relacionado à ação dos hormônios esteroides. Esta interação hormonal é muito complexa, porém os tecidos mamários atingem seu desenvolvimento máximo, além do crescimento ductal na presença destes hormônios (NAIR et al., 2010; CHANG et al., 1995). Em nosso estudo, a análise histomorfométrica das mamas, revelou que a área e percentagem do parênquima foram reduzidas com a ovariectomia e restabelecida com a administração do benzoato de estradiol, no grupo BE, assim como os resultados obtidos por Torres et al. (2011), que utilizaram ratas ovariectomizadas e mostraram uma maior área de parênquima mamário de ratas tratadas com benzoato de estradiol em relação ao grupo controle. O extrato da linhaça não alterou nenhum dos parâmetros analisados na mama, apesar de haver estudos que mostram que a enterolactona isolada, produto final da biotransformação do precursor de lignana nas sementes de linhaça, atua como um agonista seletivo tanto dos receptores α quanto dos receptores β estrogênicos em células mamárias *in vitro* (PENTTINEN et al., 2007). Possivelmente, as doses do extrato de *L. usitatissimum* utilizadas, não foram suficientes para interagir com os receptores estrogênicos e promover alterações no epitélio mamário ou então, houve bloqueio dos receptores, sendo assim uma ação antiestrogênica. Compostos com ação antiestrogênica no tecido mamário e uterino são importantes, pois diminuem os riscos de desenvolvimento de câncer, por não promover a proliferação destes tecidos, indicando assim um efeito protetor (NELSON, 2008; RUSSEL et al., 2002).

Outra forma importante para se verificar a alteração induzida pela diminuição dos hormônios sexuais é a avaliação do peso corporal. Já foram descritos alguns estudos que relacionam o ganho ponderal à ovariectomia (CHU et al., 1999; GEARY, ASARIAN, 1999; HEINE et al., 2000; JONES et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2004). Segundo estes estudos, o ganho ponderal pós-ovariectomia pode estar relacionado com a redução do consumo energético, devido à diminuição dos hormônios ovarianos, já que o estrogênio aumenta o metabolismo energético e, portanto, diminui o peso corporal. Assim,

com a redução dos estrógenos pela ovariectomia, o consumo de energia será menor e os animais terão aumento de peso corporal (CHU et al., 1999; GEARY, ASARIAN, 1999, SHIMOMURA et al., 2002; SZABO et al., 2003). Outros autores consideram que a deficiência de estrogênio possa estar relacionada à diminuição de receptores de leptina no hipotálamo, o que causaria diminuição da saciedade e consequentemente ganho de peso corporal (KIMURA et al., 2002). Foi observado em nossos resultados, que a ovariectomia aumentou o peso corporal de forma significativa em relação aos demais grupos, se mantendo assim durante todo o período de dois meses de tratamento, enquanto que as três doses do extrato inibiram o ganho ponderal causado pela ovariectomia de forma constante até o final do período experimental, não se diferenciando entre si e nem dos grupos FO e BE.

A redução do peso corporal causado pelo extrato, não foi ocasionada pela diminuição do consumo alimentar, pois a quantidade de ração consumida pelas ratas não variou em nenhum dos grupos, durante todo o período de tratamento. Porém em relação ao peso da gordura intra-abdominal, o grupo LIN500 apresentou redução de 35,5% da gordura quando comparado ao OVR, no qual a gordura intra-abdominal apresentou-se aumentada. Alguns estudos já relacionaram o consumo de sementes de linhaça com a diminuição da massa de gordura corporal e a circunferência abdominal em mulheres (MORISSET et al., 2009). Fukumitsu et al. (2008), obtiveram uma redução de gordura total de camundongos com dieta rica em gordura acrescida do precursor de lignana da linhaça (SDG), quando comparados com o grupo que consumiu somente a dieta gordurosa. Possivelmente, a resposta para estas ações da linhaça no tecido adiposo, ocorra pela sua interação com os receptores de estrogênio tipo α , presentes nesse tecido, e que são responsáveis pela modulação da lipogênese. A ligação do estradiol a estes receptores leva à maior utilização dos lipídeos como fonte de energia, devido à maior oxidação dos ácidos graxos (HEINE et al., 2000; PALIN et al., 2003). Isto pôde ser mostrado no grupo BE, no qual se evidenciou menor massa da gordura intra-abdominal através da reposição hormonal com estradiol.

Além da determinação da gordura intra-abdominal, investigou-se a concentração de lipídeos séricos, cujo metabolismo é regulado pelos estrogênios (GENAZZANI, GAMBACCIANI, 2000; SCHNEIDER, 2002). Em

nossos estudos, não houve alteração do perfil lipídico entre os diferentes grupos durante os dois meses de tratamento. Efeitos da linhaça no metabolismo lipídico foram investigados por Lucas et al. (2011) em hamsters ovariectomizados, alimentados com dieta suplementada com 15% de linhaça, por 90 dias. Este estudo mostrou um efeito preventivo no aumento do colesterol total promovido pela ovariectomia, mas não alterou os triglicerídeos. Pellizzon et al. (2007), utilizando camundongos geneticamente hipercolesterolêmicos, mostraram que a linhaça reduziu o colesterol tanto a nível plasmático quanto a nível hepático.

Em nossos estudos também foram realizados testes bioquímicos para avaliar a função hepática (TGO e TGP) e renal (ureia, ácido úrico e creatinina). Estes testes são importantes para avaliar, de forma preliminar, a toxicidade de produtos naturais utilizados como medicinais. Da mesma forma, outros sinais de toxicidade podem se expressar pela alteração da massa relativa dos órgãos e de algumas dosagens bioquímicas sanguíneas (GONZALEZ; SILVA, 2003). Embora os estudos para testar a atividade de plantas medicinais, utilizando animais, possam fornecer informações importantes que não seriam possíveis através de outras formas de estudo, ainda é controverso a sua previsibilidade para o valor de dose equivalente para humanos, pois isto pode levar a uma subestimação da toxicidade e/ou superestimação da quantidade necessária para a terapêutica em seres humanos, sendo mais indicados cálculos que levam em consideração a área da superfície corporal, como uma tentativa de minimizar esses possíveis erros (WOJCIKOWSKI; GOBE, 2014).

Neste estudo, não houve alteração dos parâmetros bioquímicos acima citados, sugerindo-se que o extrato de *L. usitatissimum* não induz a toxicidade hepática, renal ou nos demais órgãos, quando utilizado nas doses de 100 a 500 mg/kg nestes animais. Também não houve alteração no peso dos órgãos dos animais dos grupos OVR e BE. Resultados semelhantes foram obtidos por Sacco et al. (2011), que não observaram diferenças entre o peso dos órgãos de animais ovariectomizados, que receberam dieta suplementada com 10% de linhaça, e os animais controle. Zawar et al. (2011), em estudos de toxicidade oral aguda, não observaram nenhuma alteração no comportamento e perfis autonômicos, assim como não houve mortalidade em nenhum dos grupos tratados com extrato etanólico de linhaça em doses de até 5000 mg/kg.

Considerando que a musculatura lisa uterina sofre influência direta dos esteroides ovarianos e que os estrogênios atuam na síntese de proteínas contráteis, na produção de prostaglandinas e regulação dos receptores de ocitocina (WEISS, 2000), neste trabalho, buscou-se avaliar a resposta do útero das ratas ovariectomizadas submetidas ou não aos tratamentos com o extrato da linhaça ou o benzoato de estradiol, frente aos agentes farmacológicos carbacol, ocitocina e prostaglandina F2 α .

A ovariectomia diminuiu a força de contração induzida pelo carbacol, ocitocina e PGF2 α , quando comparadas às obtidas no grupo FO. A diminuição da sensibilidade do útero aos fármacos foi provavelmente devido à diminuição da concentração dos estrogênios endógenos, decorrentes da retirada dos ovários (VEDERNIKOV et al., 2002), fato que pôde ser comprovado com a reposição hormonal de estradiol no grupo BE, que apresentou a resposta contrátil aumentada, semelhante à observada nos animais do grupo FO. Segundo alguns autores, este último resultado é uma resposta à atuação dos estrogênios que, como mencionado anteriormente, é responsável pela síntese tanto de proteínas contráteis quanto de enzimas regulatórias necessárias para a contratilidade uterina (WEISS, 2000).

Em nossos estudos, a contração induzida pela PGF2 α , nos animais ovariectomizados não foi alterada pelo extrato, nas diferentes doses. E, apesar de ter ocorrido aumento da reatividade uterina no grupo BE, este foi parcial, atingindo 49% em relação ao grupo FO. No estudo de Engstrom (2001), que utilizou uma dose de 50 μ g de benzoato de estradiol, por três dias consecutivos em ratas ovariectomizadas, observou uma resposta de contração uterina induzida por PGF2 α semelhante ao grupo ovariectomizado, assim como não detectou alteração na expressão de RNA mensageiro para receptor de prostaglandina. Em nosso estudo, os grupos tratados com o extrato de *L. usitatissimum*, nas doses de 250 e 500 mg/mL apresentaram reatividade uterina semelhante a do grupo BE, mostrando uma tendência a recuperação da sensibilidade do útero à PGF2 α . Picherit et al. (2000), em três meses de tratamento com daidzeína ou genisteína, as isoflavonas mais abundantes da soja, observaram que somente a daidzeína apresentou um aumento na reatividade uterina frente às maiores doses de prostaglandina (10^{-9} M) e ocitocina (10^{-11} M) utilizadas.

Gordan et al. (1997), administrando previamente 17β - estradiol em ratas ovariectomizadas, mostraram que a resposta de contração à ocitocina foi maior nas doses de 5 μ g e 10 μ g, quando comparado à maior dose (50 μ g), que induziu a uma contração semelhante ao grupo ovariectomizado, sem pré-tratamento com estradiol. Sabe-se que o estrogênio aumenta a concentração dos receptores de ocitocina (JACKSON; DUDLEY, 1998). Nos nossos resultados, o benzoato de estradiol aumentou a força de contração da ocitocina no grupo BE em relação ao OVR, restaurando a reatividade uterina à semelhança do grupo FO. Porém, nas doses testadas, o extrato não alterou a reatividade uterina quando comparada com o grupo OVR.

O mesmo padrão de resposta contrátil foi observado quando se utilizou o carbacol, a reatividade uterina mostrou uma redução com a ovariectomia, no grupo OVR, e aumento no grupo BE, à semelhança do FO. O extrato da linhaça, nas três doses, não alterou a contratilidade do útero quando comparado ao OVR. O carbacol atua nos receptores colinérgicos da musculatura lisa uterina e, com a atrofia causada pela retirada dos ovários, há uma diminuição da força de contração, já que as alterações dos níveis de esteroides ovarianos podem modificar a contratilidade do músculo liso e a densidade da população de receptores muscarínicos no útero (FERNANDEZ et al., 1995; MATUCCI et al., 1996). Por outro lado, os grupos tratados com o extrato de linhaça, não se diferiram do grupo OVR, indicando que não houve atividade estrogênica do extrato na reatividade uterina ao carbacol. Abdalla et al. (2004), utilizando ratas com ovários íntegros, tratadas com dose única de benzoato de estradiol, mostraram um aumento da resposta do útero ao carbacol duas vezes maior que os animais não tratados, indicando que o estrogênio induz o aumento da responsividade a este agonista muscarínico. Entretanto, nos estudos de Choppin et al. (1999), não foi observado qualquer influência da ovariectomia na atividade dos receptores muscarínicos uterinos, assim como não observou diferenças na proporção destes receptores entre animais falso operados e ovariectomizados.

Os resultados da reatividade uterina à $PGF2\alpha$, ocitocina e carbacol, nos grupos ovariectomizados que foram tratados com diferentes doses do extrato de *Linum usitatissimum*, estão de acordo com os dados obtidos no peso e

histomorfometria uterinos que também não revelaram aumento de sensibilidade com o uso da linhaça.

Considerando os resultados de nosso estudo, podemos sugerir que o extrato hidroalcoólico de *Linum usitatissimum* (linhaça) começa a apresentar efeitos proliferativos em tecidos do aparelho reprodutor a partir da dose de 500 mg/kg, apesar de não alterar a reatividade farmacológica do útero. O extrato também interfere no metabolismo do tecido adiposo, reduzindo a massa da gordura intra-abdominal e peso corporal. Além disso, o extrato de *L. usitatissimum* não apresenta toxicidade renal e hepática nas doses testadas. Sugerindo, portanto, que *Linum usitatissimum* apresenta potencial como alternativa à terapêutica convencional na pós-menopausa.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As sementes de *Linum usitatissimum* (linhaça) são muito conhecidas pelas suas propriedades nutricionais, porém suas funções como fitoestrógeno não são bem definidas e bastante contraditórias. No presente estudo realizado com o extrato hidroalcoólico das sementes de *L. usitatissimum* em ratas que foram submetidas à ovariectomia, foi observado que o extrato:

- Aumentou a frequência da fase pró-estro do ciclo estral;
- Nas três doses utilizadas, o extrato reduziu o ganho ponderal causado pela ovariectomia, de forma constante, até o final do tratamento;
- Reduziu a gordura intra-abdominal;
- Mostrou um discreto aumento do epitélio luminal uterino;
- Não induziu proliferação no tecido mamário e endometrial;
- Não alterou a reatividade uterina;
- Não revelou toxicidade hepática e nem renal em uso contínuo por dois meses.

Diante destes resultados, a administração oral do extrato de *L. usitatissimum*, por um período de dois meses, apresenta potencial como alternativa na terapia de reposição hormonal uma vez que mostrou alguns efeitos benéficos sobre a citologia vaginal e tecido adiposo, sem haver estimulação mamária e endometrial. Entretanto são necessários mais estudos para elucidar o mecanismo de ação dos componentes ativos do extrato para que possa ser considerado como alternativa ao esquema terapêutico na pós-menopausa.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, F. M.; MARÓSTICA, E.; PICARELLI, Z. P.; ABREU, L. C.; AVELLAR, M. C.; PORTO, C. S. Effect of estrogen on muscarinic acetylcholine receptor expression in rat myometrium. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 213, n. 2, p. 139-148, 2004.
- ADLERCREUTZ, H.; FOTSIS, T.; LAMPE, J.; WAHALA, K.; MAKELA, T.; BRUNOW, G.; HASE, T. Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography mass spectrometry. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 215, p. 5-18, 1993.
- ADLERCREUTZ, H.; VAN DER WILDT, J.; KINZEL, J.; ATTALLA, H.; WAHALA, K.; MAKELA, T.; HASE, T.; FOTSIS, T. Lignan and isoflavonoid conjugates in human urine. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 52, n. 1, p. 97-103, 1995.
- AHMAD, N.; RAHMAN, Z. U.; AKHTAR, N.; ALI, S. Effects of aqueous methanolic extract of Flax seeds (*Linum usitatissimum*) on serum estradiol, progesterone, kidney and liver functions and some serum biochemical metabolites in immature female rats. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 32, n. 2, p. 211-215, 2012.
- ALBERTAZZI, P.; SHARMA, S. Urogenital effects of selective estrogen receptor modulators: a systematic review. **Climacteric**, v.8, n. 3, p. 214-20, 2005.
- ALDRIGHI, J. M.; ALECRIN, I. N.; OLIVEIRA P. R.; SHINOMATA, H.O. Tabagismo e antecipação da idade da menopausa. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 51, n. 1, p. 51-53, 2005.
- AN, J.; TZAGARAKIS-FOSTER, C.; SCHARSCHMIDT, T.; LOMRI, N.; LEITMAN, D. Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of co-regulators by phytoestrogens. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 21, p. 17808-17814, 2001.
- ANDRADE, E. M. **Fatores de risco e prevenção de doenças cardiovasculares**. In: Marinho R. Climatério. 2ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, p. 371-377, 2000.
- ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 11, n. 3, p. 293-301, 2012.
- ARJMANDI, B. H. The role of phytoestrogens in the prevention and treatment of osteoporosis in ovarian hormone deficiency. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20, n. 5, p. 398-420, 2001.

AYERS, D.C.; LOIKE, J.U. **Lignans: Chemical, Biological, and Clinical Properties**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.

BAKER, V.L.; LEITMAN, D.; JAFFE, R. B. Selective estrogen receptor modulators in reproductive medicine and biology. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 55, n. 2, p. 21-47, 2000.

BEDELL, S.; NACHTIGALL, M.; NAFTOLIN, F. The pros and cons of plant estrogens for menopause. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2013. In press, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.12.004>.

BELL, J.M.; KEITH, M.O. Nutritional evaluation of linseed meals from fl ax with yellow or brown hulls, using mice and pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 43, n. 1-2, p. 1-18, 1993.

BOULBAROUD, S.; MESFIOUI, A.; ARFAOUI, A.; OUICHOU, A.; EL HESSNI, A. Preventive effects of flaxseed and sesame oil on bone loss in ovariectomized rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 13, p. 1696-1701, 2008.

BORRELLI, F.; ERNST, E. Alternative and complementary therapies for the menopause. **Maturitas**, v. 66, n. 4, p. 333-343, 2010.

BRUNETTE, M. G.; LECLERC, M. Renal action of progesterone: effect on calcium reabsorption. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 30, n. 194, p. 183-90, 2002.

BROOKS, J. D.; WARD, W. E.; LEWIS, J. E.; HILDITCH, J.; NICKELL, L.; WONG, E; THOMPSON, L. U. Supplementation with flaxseed alters estrogen metabolism in postmenopausal women to a greater extent than does supplementation with an equal amount of soy. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 2, p. 318-325, 2004.

BUCK, K.; VRIELING, A.; ZAINEDDIN, A. K.; BECKER, S.; HÜSING, A.; KAAKS, R.; LINSEISEN, J.; FLESCH-JANYNS, D.; CHANG-CLAUDE, J. Serum Enterolactone and Prognosis of Postmenopausal Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 28, p. 3730-3738, 2011.

BULBUL, A.; ALTUNBAS, K.; SEVIMLI, A.; YAGCI, A.; AKDAG, A.; ÇELIC, H. A. The effects of ovarian steroids on myometrial contractions in ovariectomized rats. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 158, n. 11, p. 556-561, 2007.

CAMPBELL, S. C.; BAKHSHALIAN, N.; SADAAT, R. L.; LERNER, M. R.; LIGHTFOOT, S. A.; BRACKETT, D.; ARJMANDI, B. H. Flaxseed reverses atherosclerotic lesion formation and lowers lipoprotein(a) in ovarian hormone deficiency. **Menopause**, v. 20, n. 11, p. 1176-1183, 2013.

CARBONEL, A. A. F.; SANTOS, R. H. B. R.; SIMÕES, R. S.; SILVA, R. F.; SOARES JÚNIOR, J. M.; BARACAT, E. C.; HAIDAR, M. A. Efeito de altas

doses de genisteína sobre o epitélio mamário de ratas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 33, n. 9, p. 264-269, 2011.

CARREAU, C.; FLOURIOT, G.; BENNETAU-PELISSERO, C.; POTIER, M. Enterodiol and enterolactone, two major diet-derived polyphenol metabolites have different impact on ER α transcriptional activation in human breast cancer cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 110, n. 1-2, p. 176–185, 2008.

CARTER, J. F. **Sensory evaluation of flaxseed of different varieties**. In Proceedings of the 56th Flax Institute of the United States. Flax Institute of United States, p. 201-203, 1996.

CASTELO-BRANCO, C.; CANCELO HIDALGO, M.J. Isoflavones: effects on bone health. **Climacteric**, v. 14, n. 2, p. 204–211, 2011.

CAVADAS, L. F.; NUNES, A. PINHEIRO, M.; SILVA, P.T. Abordagem da menopausa nos cuidados de saúde primários. **Acta Médica Portuguesa**, v. 23, n. 2, p. 227-236, 2010.

CHALUPKA, S. Soy isoflavones for the prevention of menopausal symptoms and bone loss - a safe and effective alternative to estrogen? **American Association of Occupational Health Nurses Journal**, v. 59, n. 11, p. 504, 2011.

CHANG, K. J.; LEE, T. T.; LINARES-CRUZ, G.; FOURNIER, S.; DE LIGNIÉRES, B. Influences of percutaneous administration of estradiol and progesterone on human breast epithelial cell cycle in vivo. **Fertility and Sterility**, v. 63, n. 4, p. 785-91, 1995.

CHAO, W. W.; LIN, B. F. Bioactivities of major constituents isolated from Angelica sinensis (Danggui). **Chinese Medicine**, v. 6, n. 29, p. 1-7, 2011.

CHOPPIN, A.; STEPAN, G. J.; LOURY, D. N.; WATSON, N.; EGLEN, R. M. Characterization of the muscarinic receptor in isolated uterus of sham operated and ovariectomized rats. **British Journal of Pharmacology**, v.127, n. 7, p. 1551-1558, 1999.

CHU, S. C.; CHOU, Y. C.; LIU, J. Y.; CHEN, C. H.; SHYU, J. C.; CHOU, F. P. Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. **Life Sciences**, v. 64, n. 24, p. 2299-2306, 1999.

CLAPAUCH, R.; ATHAYDE, A.; MEIRELLES, R. M. R.; WEISS, R.V.; PARDINI, D.P.; LEÃO, L.M.C.S.M.; MARINHEIRO, L.P.F. Terapia Hormonal da Menopausa: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina e Andrologia da SBEM em 2004. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 49, n.3, 2005.

CLARKE, H.; CABANES, A.; OLIVIO, S.; KERR, L.; BOUKER, K. B.; CLARKE, R. Do estrogens always increase breast cancer risk? **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.80, n. 2, p.163-174, 2002.

COLLI, M. C.; BRACHT, A.; SOARES, A. A.; OLIVEIRA, A. L.; BOËR, C. G.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Evaluation of the Efficacy of Flaxseed Meal and Flaxseed Extract in Reducing Menopausal Symptoms. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 9, p. 840-845, 2012.

CONNOR, W. E. Importance of N-3 fatty acids in health and disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 1, p. 171-175, 2000.

COUSE, J. F.; CURTIS, S. W.; WASHBURN, T. F.; LINDZEY, J.; GOLDING, T. S.; LUBAHN, D. B.; SMITHIES, O.; KORACH, K. S. Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene. **Molecular Endocrinology**, v. 9, n. 11, p. 1441-1454, 1995.

DAMDIMOPOULOU, P. E. P.; POWER, K. A.; HURMERINTA, T. T.; NURMI, T.; VAN DER SAAG, P. T.; MAKELA, S. I. Dietary sources of lignans and isoflavones modulate responses to estradiol in estrogen reporter mice. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n. 8, p. 996-1006, 2009.

DAUN, J. K.; BARTHET, V. J.; CHORNICK, T. L.; DUGUID, S. Structure, composition and variety development of flaxseed. In: Thompson, L.U., Cunnane, S.C. (Eds.), **Flaxseed in Human Nutrition**, 2^a ed. AOCS Press, Champaign, IL, p. 1-40, 2003.

DEAN, B.; CHANG, S.; DOSS, G. A.; KING, C.; THOMAS, P. E. Glucuronidation, oxidative metabolism, and bioactivation of enterolactone in rhesus monkeys, **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 429, n. 2, p. 244 – 251, 2004.

DESPAIGNE, D. A. Fitoestrógenos y su utilidad para el tratamiento del síndrome climatérico. **Revista Cubana de Endocrinología**, v.12, n.2, 2001.

DIEDERICHSEN, A.; RICHARDS, K. Cultivated flax and the genus *Linum* L.: Taxonomy and germplasm conservation. In **Flax, The genus *Linum***. Hardwood Academic Publishers, p. 22-54, 2003.

DILSHAD, S. M. R.; REHMAN, N. U.; AHMAD, N.; IQBAL, A.; ALI, M. A.; AHMAD, A. Effect of flax seeds (*Linum usitatissimum*) on uterine and ovarian protein contents, ovarian cholesterol, serum Estradiol and onset of puberty in immature female mice. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.14, n. 5, p.781-786, 2012.

DODIN, S; LEMAY, A; JACQUES, H; LEGARE, F; FOREST, J.C.; MASSE, B. The effects of flaxseed dietary supplement on lipid profile, bone mineral density, and symptoms in menopausal women: a randomized, double-blind, wheat germ

placebo controlled clinical trial. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 3, p. 1390-1397, 2005.

ENGSTROM, T. The regulation by ovarian steroids of prostaglandin synthesis and prostaglandin-induced contractility in non-pregnant rat myometrium-modulating effects of isoproterenol. **Journal of Endocrinology**, v. 169, n. 1, p. 33-41, 2001.

FENG, D.; SHEN, Y.; CHAVEZ, E.R. Effectiveness of different processing methods in reducing hydrogen cyanide content of flaxseed. **Journal Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 8, p. 836-41, 2003.

FERNANDEZ, A. I.; GARCIA DE BOTO, M. J.; GUTIERREZ, M.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Influence of hormonal status in relaxant effect of diethylstilbestrol and nifedipine on isolated rat uterus contraction. **General Pharmacology**, v. 26, n. 6, p. 1281-1287, 1995.

FISHER, J. S.; KOHRT, W. M.; BROWN, M. Food restriction suppresses muscle growth and augments osteopenia in ovariectomized rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, n. 1, p. 265-271, 2000.

FREEDMAN, R. R. Physiology of hot flashes. **American Journal of Human Biology**, v. 13, n. 4, p. 453-464, 2001.

FUCHS, A. R.; FUCHS, F. **Endocrinology of term and preterm labor**. In: Fuchs A. R., Fuchs F., Stabblefield P, eds. Preterm birth-causes, prevention and management, 2^a ed. Nova Iorque: McGraw Hill; 59, 1993.

FUKUMITSU, S.; AIDA, K.; UENO, N.; OZAWA, S.; TAKAHASHI, Y.; KOBORI, M. Flaxseed lignan attenuates high-fat diet-induced fat accumulation and induces adiponectin expression in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 3, p. 669-676, 2008.

GANORKAR, P. M.; JAIN, R. K. Flaxseed – A nutritional punch. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 2, p. 519-525, 2013.

GEARY, N.; ASARIAN, L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. **Physiology Behavior**, v. 67, n. 1, p. 141-147, 1999.

GENAZZANI, A. R.; GAMBACCIANI, M. Controversial issues in climacteric medicine I: Cardiovascular disease and hormone replacement therapy. **Climacteric**, v. 3, n. 4, p. 233-240, 2000.

GINSBURG, J.; PREVELIC, G. Lack of Significant Hormonal Effects and Controlled Trials of Phytoestrogens. **The Lancet**, v. 355, n. 9199, p. 163 - 164, 2000.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Reserch (Part B)**, v. 80, n. 2, p. 84-97, 2007.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, p.179-198, 2003.

GORDAN, P. L.; JENKINS, S. L.; WENTWORTH, R. A.; NATHANIELSZ, P. W. Effect of in vivo estradiol administration to bilaterally ovariectomized rats on in vitro myometrial responsiveness to prostaglandin F₂alpha and oxytocin. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 3, p. 597-601, 1997.

GREENDALE, G. A.; LEE, N. P.; ARRIOLA, E. R. The menopause. **Lancet**, v. 353, n. 9152, p. 571-580, 1999.

GREENDALE, G. A.; HUANG, M.; LEUNG, K.; CRAWFORD, S. L.; GOLD, E. B.; WIGHT, R.; WAETJEN, E.; KARLAMANGLA, A. S. Dietary Phytoestrogen Intakes and Cognitive Function During the Menopause Transition: Results from the SWAN Phytoestrogen Study. **Menopause**, v. 19, n. 8, p. 894-903, 2012.

HALIGA, R. E.; IANCU, R. I.; BUTCOVAN, D.; MOCANU, V. Flaxseed Prevents Leukocyte and Platelet Adhesion to Endothelial Cells in Experimental Atherosclerosis by Reducing sVCAM-1 and Vwf. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

HALL, C.; TULBEK, M. C.; XU, Y. Flaxseed quality and end use functionality. **Advances in food and nutrition research**, v. 51, p. 47-75, 2006.

HALBE, H. W. Osteoporose pós-menopausal: como diagnosticar e tratar. **Revista Brasileira de Medicina**, S56, p. 235-245, 1999.

HALBE, H. M.; FONSECA, A. M.; BAGNOLI, V. R. **Estrogênios em Ginecologia Endócrina Manual de Normas**. Ed. Roca, São Paulo, 2004.

HEINE, P. A.; TAYLOR, J. A.; IWAMOTO, G. A.; LUBAHN, D. B.; COOKE, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor α knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 97, n. 23, p. 12729-12734, 2000.

HO, Y. J.; WANG, C. F.; HSU, W. Y.; TSENG, T.; HSU, C. C.; KAO, M. D.; TSAI, Y. F. Psychoimmunological effects of dioscorea in ovariectomized rats: role of anxiety level. **Annals of General Psychiatry**, v. 6, n. 21, p. 1-8, 2007.

HOPERT, A. C.; BEYER, A.; FRANK, K.; STRUNCK, E.; WUNSCH, W.; VOLLMER, G. Characterization of estrogenicity of phytoestrogens in an endometrial-derived experimental model. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 9, p. 581-586, 1998.

HU, C.; YUAN, Y. V.; KITTS, D. D. Antioxidant activities of the flaxseed lignin secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the

mammalian lignans enterodiol and enterolactone in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2219-2227, 2007.

HULLEY S, GRADY D, BUSH T, FURBERG C, HERRINGTON D, RIGGS B, et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women - HERS Study. **The Journal of the American Medical Association**, v. 280, n. 7, p. 605-613, 1998.

HUTCHINS, A. M.; MARTINI, M. C.; OLSON, B. A.; THOMAS, W.; SLAVIN, J. L. Flaxseed consumption influences endogenous hormone concentrations in postmenopausal women. **Nutrition and Cancer**, v. 39, n. 1, p. 58-65, 2001.

JACKSON, M.; DUDLEY, D. J. Endocrine assays to predict preterm delivery. **Clinics in Perinatology**, v. 25, n. 4, p. 837-857, 1998.

JOHNSON, P.; KAMAL-ELDIN, A.; LUNDGREN, L. N.; AMAN, P. HPLC method for analysis of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5216–5219, 2000.

JONES, D. R.; SCHMIDT, R. J.; PICKARD, R. T.; FOXWORTHY, P. S.; EACHO, P. I. Estrogen receptor-mediated repression of human hepatic lipase gene transcription. **The Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 3, p. 383-391, 2002.

KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Description of a new method of ovariectomy in female rats. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 3, p. 462-470, 2012.

KILKKINEN, A.; STUMPF, K.; PIETINEN, P.; VALSTA, L. M.; TAPANAINEN, H.; ADLERCREUTZ, H. Determinants of serum enterolactone concentration. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 6, p. 1094–1100, 2001.

KIM, Y.; ILICH, J. Z. Implications of dietary α -linolenic acid in bone health. **Nutrition**, v. 27, n. 11-12, p. 1101-1107, 2011.

KIMURA, M.; IRAHARA, M.; YASUI, T.; SAITO, S.; TEZUKA, M.; YAMANO, S.; KAMADA, M.; AONO, T. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 4, p.1349-1353, 2002.

KOSTELAC, D.; RECHKEMMER, G.; BRIVIBA, K. Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 26, p. 7632-7635, 2003.

KREIJKAMP-KASPERS, S.; KOK, L.; GROBBEE, D. E.; DE HAAN, D. E.; ALEMAN, A.; VAN DER SCHOUW, Y. T. Dietary phytoestrogen intake and cognitive function in older women. **Journals of Gerontology A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 62, n. 5, p. 556–562, 2007.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Omega-3 fatty Acids and Cardiovascular Disease. **Journal of the American Heart Association**, v. 23, p. 151-152, 2003.

KUIPER, G. G.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HÄGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 863-870, 1997.

KUIPER, G.; LEMMEN, J.; CARLSSON, B.; CORTON, J.; SAFE, S.; VAN DER SAAG, P.; VAN DER BURG, B. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4252-4263, 1998.

KUPPERMAN, H. S.; BLATT, M. H. G. Menopausal indice. **Journal of Clinical Endocrinology**, v. 13, n.1, p. 688-694, 1953.

LEE, J.; CHO, K. Flaxseed sprouts induce apoptosis and inhibit growth in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 48, n. 4, p. 244-250, 2012.

LEWIS, J. E.; NICKELL, L. A.; THOMPSON, L. U.; SZALAI, J. P.; KISS, A.; HILDITCH, J. R. A randomized controlled trial of the effect of dietary soy and flaxseed muffins on quality of life and hot flashes during menopause. **Menopause**, v. 13, n. 4, p. 631-642, 2006.

LONG, J.A. & EVANS, H.M. **The oestrus cycle in the rat it's associated phenomena**. Memories of University of California, v.6, p.1-148, 1922.

LOWCOCK, E. C.; COTTERCHIO, M.; BOUCHER, B. A. Consumption of flaxseed, a rich source of lignans, is associated with reduced breast cancer risk. **Cancer Causes Control**, v. 24, n. 4, p. 813-816, 2013.

LUBIAN, D. M. Retirada de la terapia hormonal sustitutiva: por qué, cuándo y cómo?. **Ginecología y Obstetricia Clínica**, v. 7, n. 1, p. 37-45, 2006.

LUCAS, E. A.; WILD, R. D.; HAMMOND, L. J.; KHALIL, D. A.; JUMA S.; DAGGY, B. P.; STOECKER, B. J.; ARJMANDI, B. H. Flaxseed Improves Lipid Profile without Altering Biomarkers of Bone Metabolism in Postmenopausal Women. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.87, n.4, p.1527-1532, 2002.

LUCAS, E. A.; MAHAJAN, S. S.; SOUNG, D. Y.; LIGHTFOOT, S. A.; SMITH, B. J.; ARJMANDI, B. H. Flaxseed but Not Flaxseed Oil Prevented the Rise in Serum Cholesterol Due to Ovariectomy in the Golden Syrian Hamsters. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 3, p. 261-267, 2011.

MADHUSUDHAN, B. Potential benefits of flaxseed in health and disease - a perspective. **Agricultura e Conspectus Scientificus**, v. 74, n. 2, p. 67-72, 2009.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4, p. 609-614, 2002.

MARIOTTI, K. D. C. S.; SCHMITT, G. C.; BARRETO, F.; FORTUNATO, R. E.; SINGER, R. B.; DALLEGRAVE, E.; LEAL, M. B.; LIMBERGER, R. P. Evaluation of anti-estrogenic or estrogenic activities of aqueous root extracts of *Gunnera manicata* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 601-604, 2011.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fotoquímica experimental**. 3ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MATUCCI, R.; BIANCHI, B.; MANTELLI, L.; GHELARDINI, C.; VANNELLI, G.B.; MAGGI, M. Influence of oestrogens on muscarinic receptor density and contractile response in the guinea-pig uterus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 107, n. 2, 153-160, 1996.

MCCANN, S. E.; THOMPSON, L. U.; NIE, J.; DORN, J.; TREVISAN, M.; SHIELDS, P. G.; AMBROSONE, C. B.; EDGE, S. B.; LI, H.; KASPRZAK, C.; FREUDENHEIM, J. L. Dietary lignan intakes in relation to survival among women with breast cancer: the Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) Study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 122, n. 1, p. 229-235, 2010.

MEAGHER, L. P.; BEECHER, G. R. Assessment of data on the lignan content of foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, n. 6, p. 935-947, 2000.

MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 1801-1811, 1999.

MILDER, I. E. J.; ARTS, I. C. W.; PUTTE, B.; VENEMA, D. P.; HOLLMAN, P. C. H. Lignan content of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoreesinol, secoisolariciresinol and matairesinol. **British Journal Nutrition**, v. 93, p. 393-402, 2005.

MILLER, K. J.; CONNEY, J. C.; RASGON, N. L.; FAIRBANKS, L. A.; SMALL, G. W. Mood symptoms and cognitive performance in women estrogen users and nonusers and men. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 50, n. 11, p. 1826-1830, 2002.

MILLIGAN, S. R.; KALITA, J.C.; HEYERICK, A.; RONG, H.; DE COOMAN, L.; DE KEUKELEIRE, D. Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, n. 6, p. 2249-2252, 1999.

MODENA, M.G.; SIMONDI, P.; MUEC, A. O., et al. New evidence regarding hormone replacement therapies is urgently required Transdermal

postmenopausal hormone therapy differs from oral hormone therapy in risks and benefits. **Maturitas**, v. 52, n. 1, p. 1-10, 2005.

MONTEIRO, R.; BRADAU, R.; GOMES, W. J.; BRAILE, D. M. Tendências em experimentação animal. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 24, n. 4, p. 506-513, 2009.

MORISSET, A. S.; LEMIEUX, S.; VEILLEUX, A.; BERGERON, J.; WEISNAGEL, S. J.; TCHERNOF, A. Impact of a lignan-rich diet on adiposity and insulin sensitivity in post-menopausal women. **British Journal of Nutrition**, v. 102, n. 2, p. 195-200, 2009.

MORITO, K.; HIROSE, T.; KINJO, J.; HIRAKAWA, T.; OKAWA, M.; NOHARA, T. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.24, p. 351-356, 2001.

MORRIS, D.H. **Flax – a health and nutrition primer**. 4 ed. Winnipeg, MB: Flax Council of Canada, 106 p., 2007.

MORRIS, D.H.; VAISEY-GENSER, M. Flaxseed. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, v.10, n. 2, p. 2525-2531, 2003.

MOYA, J. M. F.; CALLEJA, J. Situación actual del tratamiento del Síndrome Vasomotor. **Ginecología y Obstetricia Clínica**, v. 6, n. 1, p. 53-61, 2005.

MUELLER, S. O.; SIMON, S.; CHAE, K.; MANFRED, M.; KORACH, K. S. Phytoestrogens and Their Human Metabolites Show Distinct Agonistic and Antagonistic Properties on Estrogen Receptor α (ER α) and ER β in Human Cells. **Toxicological Sciences**, v. 80, n. 1, p. 14-25, 2004.

MURKIES, A. L.; WILCOX, G.; DAVIS, S. R. Phytoestrogens. **The Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism**, v. 83, n. 297, 1998.

NAIR, R.; JUNANKAR, S.; O'TOOLE, S.; SHAH, J.; BOROWSKY, A. D.; BISHOP, J. M.; BOROWSKY, A. Redefining the expression and function of the inhibitor of differentiation 1 in mammary gland development. **PLoS One**, v. 5, n. 8, e11947, 2010.

NELSON, HD. Menopause. **Lancet**, v. 371, n. 9614, p. 760-770, 2008.

OPPERMANN-LISBÔA, K; WANNMACHER, L. Reposição hormonal na menopausa: benefícios e riscos. **Reprodução e Climatério**, São Paulo, n. 16, p. 11-19, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. **Investigação sobre a menopausa nos anos noventa**. Genebra, 1996.

ORCHESON, L. J.; RICKARD, S. E.; SEIDL, M. M.; THOMPSON, L. U. Flaxseed and its mammalian lignan precursor cause a lengthening or cessation of estrous cycling in rats. **Cancer Letters**, v. 125, n. 1-2, p. 69-76, 1998.

PALIN, S. L.; MCTERNAN, P. G.; ANDERSON, L. A.; STURDEE, D. W.; BARNETT, A. H.; KUMAR, S. 17 β -Estradiol and Anti-estrogen ICI: Compound 182,780 Regulate expression of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in isolated subcutaneous abdominal adipocytes. **Metabolism**, v. 52, n. 4, p. 383-388, 2003.

PATADE, A.; DEVAREDDY, L.; LUCAS, E. A.; KORLAGUNTA, K.; DAGGY, B. P.; ARJMANDI, B. Flaxseed reduces total and LDL cholesterol concentrations in native American postmenopausal women. **Journal of Women's Health**, v. 17, n. 3, p. 355-366, 2008.

PENTTINEN, P.; JAEHRLING, J.; DAMDIMOPOULOS, A. E.; INZUNZA, J.; LEMMEN, J. G.; SAAG, P.; PETTERSSON, K.; GAUGLITZ, G.; MAKELA, S.; PONGRATZ, I. Diet-Derived Polyphenol Metabolite Enterolactone Is a Tissue-Specific Estrogen Receptor Activator. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4875-4886, 2007.

PICHERIT, C.; DALLE, M.; NÉLIAT, G.; LEBECQUE, P.; DAVICCO, M. J.; BARLET, J. P.; COXAM, V. Genistein and daidzein modulate in vitro rat uterine contractile activity. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 75, n. 2-3, p. 201-208, 2000.

PELLIZZON, M. A.; BILLHEIMER, J. T.; BLOEDON, L.T.; SZAPARY, P. O.; RADER, D. J. **The Journal of the American College of Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 66-75, 2007.

PRUTHI S.; THOMPSON, S. L.; NOVOTNY, P. J.; BARTON, D. L.; KOTTSCHADE, L. A.; TAN, A. D.; SLOAN, J. A.; LOPRINZI, C. L. Pilot evaluation of flaxseed for the management of hot flashes. **Journal of the Society for Integrative Oncology**, v. 5, n. 3, p. 106-112, 2007.

PRUTHI, S.; QIN, R.; TERSTREIP, S. A.; LIU, H. M. S.; LOPRINZI, C. L.; SHAH, T. R. C.; TUCKER, K. F.; DAKHIL, S. R.; BURY, M. J.; CAROLLA, R. L.; STEEN, P. D.; VUKY, J.; BARTON, D. L. A phase III, randomized, placebo-controlled, double-blind trial of flaxseed for the treatment of hot flashes: North Central Cancer Treatment Group N08C7. **Menopause**, v. 19, n. 1, p. 48–53, 2012.

REIS FILHO, R. W., ARAÚJO, J. C., VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

RIMOLDI, G.; CHRISTOFFEL, J.; SEIDLOVA-WUTTKE, D.; JARRY, H.; WUTTKE, W. Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus, and vagina. **Environmental Health Perspectives**, v.115, n. 1, p. 62-68, 2007.

ROSSOUW, J. E.; ANDERSON, G. L.; PRENTICE, R. L.; LACROIX, A. Z.; KOOPERBERG, C.; STEFANICK, M. L.; JACKSON, R. D.; BERESFORD, S. A.; HOWARD, B. V.; JOHNSON, K. C.; KOTCHEN, J. M.; OCKENE, J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. **The**

Journal of the American Medical Association, v. 288, n. 3, p. 321–333, 2002.

RUSSELL, L.; HICKS, G.S.; LOW, A.K.; SHEPHERD, J.M.; BROWN, C.A. Phytoestrogens: a viable option? **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 324, n. 4, p.185-188, 2002.

SACCO, S. M.; JIANG, J. M. Y.; REZA-LÓPEZ, S.; MA, D. W. L.; THOMPSON, L. U.; WARD, W. E. Flaxseed combined with low-dose estrogen therapy preserves bone tissue in ovariectomized rats. **The Journal of the North American Menopause Society**, v. 16, n. 3, p. 545-554, 2009.

SACCO, S. M.; JIANG, J. M. Y.; MA, D. W. L.; THOMPSON, L. U.; WARD, W. E. Flaxseed does not enhance the estrogenic effect of low-dose estrogen therapy on marker of uterine health in ovariectomized rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 9, p. 846-850, 2012.

SACCO, S. M.; THOMPSON, L. U.; GANSS, B.; WARD, W. E. Accessibility of ³H-secoisolariciresinol diglycoside lignan metabolites in skeletal tissue of ovariectomized rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 10, p. 1208-1214, 2011.

SCHNEIDER, H. P. The International Menopause Society Report on the 10th World Congress on the Menopause, Berlin, Germany. **Climacteric**, v. 5, p. 219-228, 2002.

SETCHELL, K. D.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 3, p. 758-767, 1999.

SETCHELL, K. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 6, p.1333-1346, 1998.

SHEARMAN, A. M.; CUPPLES, L. A.; DEMISSIE, S.; PETER, I.; SCHMID, C. H.; KARAS, R. H.; MENDELSON, M. E.; HOUSMAN, D. E.; LEVY, D. Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. **Journal of the American Medical Association**, v. 290, n. 17, p. 2263–70, 2003.

SHIMOMURA, K.; SHIMIZU, H.; TSUCHIYA, T.; ABE, Y.; UEHARA, Y.; MORI, M. Is leptin a key factor which develops obesity by ovariectomy? **Journal of Endocrinology**, v. 49, n. 4, p. 417-423, 2002.

SIMBALISTA, R. L.; SAUERBRONN, A. V.; ALDRIGHI, J. M.; AREAS, J. A. G. Consumption of a flaxseed-rich food is not more effective than a placebo in alleviating the climacteric symptoms of postmenopausal women. **Journal of Nutrition**, v. 140, n. 2, p. 293-297, 2010.

SIMON J. A.; SNABES, M. Post-menopausal hormone therapy improving the risky benefit ratio with ultra-low doses of estrogens. **US Endocrinology Disease**, n. 1, p. 77–79, 2007.

SMEDS, A. I.; EKLUND, P. C.; SJOHOLM, R. E.; WILLFER, S. M.; NISHIBE, S.; DEYAMA, T. Quantification of a broad spectrum of lignans in cereals, oilseeds, and nuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1337 – 1346, 2007.

STEVENSON, J. C. Cardiovascular effects of estrogens. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 74, n. 5, p. 387–393, 2000.

SZABO, J.; IBRAHIM, W. H.; SUNVOLD, G. D.; BRUCKNER, G. G. Effect of dietary protein quality and essential fatty acids on fatty acid composition in the liver and adipose tissue after rapid weight loss in overweight cats. **America Journal Veterinary Research**, v. 64, n.3, p. 310-315, 2003.

TAYLOR, S. E.; MARTIN-HIRSCH, P. L.; MARTIN, F. L. Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. **Cancer Letters**, v. 288, n. 2, p. 133-148, 2009.

TENÓRIO, A. S.; ALVES, S. B.; BEZERRA, A. L.; SOUZA, G. M.; CATANHO, M. T.; TASHIRO, T.; GALINDO, L. C.; MORAES, S. R. Effect of physical training on the bone tissue and the calcium serum concentration in ovariectomized mice. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 280-283, 2005.

THOMPSON, L.U.; BOUCHER, B. A; LIU, Z.; COTTERCHIO, M.; KREIGER, N. Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestan. **Nutrition and Cancer**, v. 54, n. 2, p. 184-201, 2006.

THOMPSON, L. U.; CHEN, J.; LI, T.; STRASSER-WEIPPL, K.; GOSS, P. E. Dietary Flaxseed Alters Tumor Biological Markers in Postmenopausal Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 10, p. 3828-3835, 2005.

TORRES, S. M. P. S; SIMÕES, R. S.; BARACAT, M. C. P.; GOMES, R. C. T.; SOARES JÚNIOR, J. M.; CARBONEL, A. A. F.; BARACAT, E. C. Histomorfometria da mama de ratas tratadas com estrogênio e/ou progestagênio. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 2, p. 177-181, 2011.

TOU, J. C. L.; CHEN, J.; THOMPSON, L. U. Dose, timing and duration of flaxseed exposure affect reproductive indices and sex hormone levels in rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues**, v. 56, n. 8, p. 555-570, 1999.

TRUCOM, C. **A importância da linhaça na saúde**. São Paulo: Alaúde, 151 p, 2006.

UTIAN, W.H.; ARCHER, D.F.; BACHMANN, G.A.; GALLAGHER, C.; GRODSTEIN, F.; HEIMAN, J. R.; et al. Estrogen and progestogen use in

postmenopausal women: July 2008 position and statement of the North American Menopause Society. **Menopause**, v. 15, n. 4, p. 584-602, 2008.

VASCONCELLOS, L. S.; LEITE, J. M.; SABINO, K. R.; PETROIANU, A. Influência da ooforectomia na variação ponderal em ratas jovens e adultas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, n. 2, p. 299-304, 2004.

VEDERNIKOV, Y. P.; HARTKE, J. R.; LONG, M. A.; SADE, G. R.; GARFIELD, R. E. Sex hormone effects in non-pregnant rat and human myometrium. **Eurean Journal of Obstetrics and Gynecology Reproductive Biology**, v. 108, n. 1, p. 59-66, 2002.

VIGETA, S. M. G.; BRÊTAS, A. C. P. A experiência da perimenopausa e pós-menopausa com mulheres que fazem uso ou não da reposição hormonal. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 6, p. 1682-1689, 2004.

VILLASECA, P. Non-estrogen conventional and phytochemical treatments for vasomotor symptoms: what needs to be known for practice, **Climacteric**, v. 15, n. 2, p. 115–124, 2012.

WANG, L. Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. **Journal of Chromatography B**, v. 777, 289-309, 2002.

WANG, Y.F.; XU, Z. K.; YANG, D. H.; YAO, H. Y.; KU, B. S.; MA, X. Q.; WANG, C. Z.; LIU, S. L.; CAI, S. Q. The antidepressant effect of secoisolariciresinol, a lignan-type phytoestrogen constituent of flaxseed, on ovariectomized mice. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, p. 222-227, 2013.

WEISS, G. Endocrinology of parturition. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n.12, p. 4421-4425, 2000.

WILLIAMSON, E. M.; OKPAKO, D. T.; EVANS, F. J. Endocrine activity: antifertility and sex hormones, Pharmacological Methods in Selection, preparation, and pharmacological evaluation of plant material. **John Wiley e Sons**, v. 1, p. 191-216, 1996.

WOJCIKOWSKI, K., GOBE, G. Animal studies on medicinal herbs: Predictability, dose conversion and potential value. **Phytotherapy Research**, v. 28, p. 22-27, 2014.

ZANWAR, A. A.; ASWAR, U. M.; HEGDE, M. V.; BODHANKAR, S. L. Estrogenic and Embryo-Fetotoxic Effects of Ethanol Extract of *Linum usitatissimum* in Rats, **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 7, n. 1, 2010.

ANEXO