

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
FACULDADE DE NUTRIÇÃO EMÍLIA DE JESUS FERREIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO  
LINHA DE PESQUISA: ALIMENTOS: DO EXPERIMENTO AO USO CLÍNICO

CAROLINA RIBEIRO PESSANHA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO DE LINHAÇA NA ESTRUTURA ÓSSEA NO  
PERÍODO PÓS-DESMAME DE RATAS *WISTAR* LACTANTES

NITERÓI, RJ

2019

CAROLINA RIBEIRO PESSANHA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO DE LINHAÇA NA ESTRUTURA ÓSSEA NO  
PERÍODO PÓS-DESMAME DE RATAS *Wistar* LACTANTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da Faculdade de Nutrição Emília de Jesus Ferreiro, da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO SOARES DA COSTA

Coorientador: Prof. Dr. GILSON TELLES BOAVENTURA

NITERÓI, RJ

2019

Ficha catalográfica automática - SDC/BNO  
Gerada com informações fornecidas pelo autor

P475a Pessanha, Carolina Ribeiro  
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO DE LINHAÇA NA ESTRUTURA ÓSSEA  
NO PERÍODO PÓS-DESMAME DE RATAS WISTAR LACTANTES / Carolina  
Ribeiro Pessanha ; Carlos Alberto Soares Da Costa, orientador  
; Gilson Telles Boaventura, coorientador. Niterói, 2019.  
41 f.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,  
Niterói, 2019.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPGCN.2019.m.12916328750>

1. Nutrição Experimental. 2. Linhaça. 3. Ratos Wistar. 4.  
Produção intelectual. I. Da Costa, Carlos Alberto Soares,  
orientador. II. Boaventura, Gilson Telles, coorientador. III.  
Universidade Federal Fluminense. Faculdade de Nutrição. IV.  
Título.

CDD -

CAROLINA RIBEIRO PESSANHA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO DE LINHAÇA NA ESTRUTURA ÓSSEA NO  
PERÍODO PÓS-DESMAME DE RATAS *WISTAR* LACTANTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da Faculdade de Nutrição Emília de Jesus Ferreiro, da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Soares da Costa (Orientador- UFF)

---

Prof.<sup>a</sup>.Dr.<sup>a</sup>. Tatiana Silveira Feijó Cardozo (Titular-UFRJ)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Renata Frauches Medeiros Coimbra (Titular-UFF)

NITERÓI, RJ

2019

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus em primeiro lugar, pois sem Ele nada seria possível. E que seja feita a vontade do Senhor sobre todas as coisas.

Aos meus pais por todo apoio, inspiração e compreensão. Vera e Jorge que sempre foram modelos de pessoas honestas, guerreiras, corajosas e batalhadoras. Nenhuma conquista minha seria possível sem o amor incondicional de vocês.

Ao meu irmão, Luiz Eduardo, que amo incondicionalmente. A ele que tanto admiro e tanto me apoia, agradeço a amizade, companheirismo e paciência. Me inspiro em você em cada passo que dou.

Ao meu orientador, Carlos Alberto, por todos esses anos de orientação, ensinamentos, amizade e respeito. Agradeço a paciência, confiança depositada em mim e oportunidades oferecidas. Obrigada por ser um ótimo exemplo de Nutricionista, professor, pesquisador e orientador.

Ao meu co-orientador, Gilson Teles, por ter aberto as portas do LabNE para mim em 2013, quando toda minha jornada acadêmica começou. Obrigada pela confiança, paciência e amizade.

À minha dupla acadêmica, Bianca Ferolla, que ao longo desses últimos anos foi parceira, amiga e dupla em trabalhos, eventos, disciplinas e cursos. Obrigada desde o início por ter tanta paciência comigo, por me ajudar tanto e estar tão presente na minha vida profissional e pessoal.

Às amigas e colegas de laboratório Letícia, Daniele e Aline. Vocês são uma herança muito valiosa que ficou do LabNE para mim. Há anos sendo solícitas em tudo que precisei. Obrigada pela amizade e paciência.

A todos amigos, novos e antigos que convivem comigo nos bons e maus momentos. Cada um teve papel fundamental nessa jornada.

A pessoas que estiveram presentes nessa caminhada.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do óleo de linhaça na composição e qualidade óssea de ratas lactantes no período pós-desmame. Ratas *Wistar* foram separadas aleatoriamente nos grupos controle (C) e experimental (OL). O grupo C recebeu dieta controle durante o período de lactação de 21 dias e 30 dias após o desmame, totalizando 51 dias de experimento. O grupo OL, como grupo C, continuou o mesmo período de estudo, porém recebendo uma dieta experimental com óleo de linhaça na composição. No final do experimento, os animais foram anestesiados, sendo avaliada a composição óssea através da absorciometria por raios-X de dupla energia (DXA) e após, na eutanásia realizada por punção cardíaca, houve a coleta de sangue para análise bioquímica do soro. Os fêmures foram coletados para análise da composição óssea por DXA, análise das dimensões ósseas, tomografia computadorizada e teste biomecânico. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t de *student* e expressas como média  $\pm$  erro padrão da média, considerando o nível de significância de  $p < 0,05$ . Nos resultados, houve diferença significativa no grupo OL que apresentou maiores valores de conteúdo mineral ósseo total, cálcio sérico, densidade mineral óssea do fêmur, massa femoral, distância entre as epífises, e largura no ponto médio da diáfise dos fêmures quando comparado ao grupo C. No teste biomecânico, valores mais altos foram encontrados no grupo OL e diferença significativa na tomografia no grupo OL, quando comparado ao grupo C. Dessa forma, observamos que o óleo de linhaça foi capaz de promover efeitos positivos na composição óssea de ratas da fêmea no período pós-desmame.

Palavras-chave: óleo de linhaça; ratos *Wistar*; pós-desmame; osso; fêmur

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of flaxseed oil on the composition and bone quality of lactating rats in the postweaning. *Wistar* rats' females were randomly separated into control (C) and experimental (OL) groups. Group C received a control diet, during the 21-day lactation period and during 30 days after weaning, totaling 51 days of experiment. The OL group, as group C, continued the same period of study, however receiving an experimental diet with flaxseed oil in the composition. The end of the experiment, the animals were anesthetized, and were evaluated the bone composition through Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) and after, euthanasia performed by cardiac puncture for biochemical analysis of serum. The femurs were collected for the analysis of bone composition by DXA, analysis of bone dimensions, computed tomography and biomechanical test. Statistical analyzes were performed using the Student's t-test and expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean, considering the level of significance of  $p < 0.05$ . In the results, significant difference in the OL group in relation to total bone mineral content, serum calcium, bone mineral density of the femur, femoral mass, distance between the epiphyses, and distance at the midpoint of the diaphysis of femurs. In the biomechanical test, higher values were found in the OL group and significant difference in tomography in the OL group. The conclusion is flaxseed oil was able to promote positive effects in bone composition of female's rats in the post weaning period.

Keywords: flaxseed oil; *Wistar* rats; postweaning; bone; femur

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 Corte de um osso seco: Osso compacto e esponjoso f13
- FIGURA 2 Resumo dos principais efeitos do aumento do PTH, em resposta da diminuição plasmática de Cálcio f14
- FIGURA 3 Delineamento Experimental. Grupo experimental Óleo de Linhaça (OL), Grupo controle (C). Com no total 6 ratos *Wistar* fêmeas por grupo, acompanhamento desde o acasalamento até os 30 dias após o desmame da amamentação f21



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição das rações experimentais	f22
TABELA 2 - Informação nutricional do óleo de linhaça	f23
TABELA 3 - Análises DXA da Composição Corporal aos 51 dias de experimento	f25
TABELA 4 - Análises Sorológicas e Parâmetros ósseos do fêmur aos 51 dias de experimento	f26
TABELA 5 – Análises ósseas no fêmur aos 51 dias de experimento	f27

## LISTA DE ABREVEATURAS

AA	Ácido Araquidônico
ALA	Ácido $\alpha$ -linolênico
C	Grupo Controle
CMO	Conteúdo Mineral Ósseo
DHA	Docosahexaenóico
DMO	Densidade Mineral Óssea
DXA	Dual-Energy X-Ray Absorptiometry
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
LA	Ácido linoleico
LABNE	Laboratório de Nutrição Experimental
LANUF	Laboratório de Avaliação Nutricional e Funcional
n-3	Ômega 3
n-6	Ômega 6
OL	Grupo Experimental (Óleo de Linhaça)
PG	Prostaglandinas
PG2	Prostaglandinas da série 2
PG3	Prostaglandinas da Série 3
PTH	Paratormônio
UFF	Universidade Federal Fluminense

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	f11
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	f13
2.1	Fisiologia óssea e amamentação .....	f13
2.2	Propriedades e benefícios da linhaça .....	f15
2.3	Óleo de linhaça e saúde óssea materna .....	f17
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	f19
3.1	Objetivo geral .....	f19
3.2	Objetivos específicos .....	f19
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	f20
4.1	Ética .....	f20
4.2	Delineamento Experimental .....	f20
4.3	Rações .....	f21
4.4	Eutanásia e Avaliações .....	f23
4.5	Análise Estatística .....	f24
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	f25
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	f28
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	f31
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	f32
<b>9</b>	<b>ANEXO</b> .....	f41
9.1	Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais .....	f41

## 1 – INTRODUÇÃO

Os períodos de gestação e aleitamento materno estão relacionados a mudanças no corpo da mulher que podem ter impacto em períodos posteriores da vida (LOCKITCH, 1997; KALKWARF, 2004; SOMA-PILLAY et al., 2016). Vários estudos relatam processos fisiológicos adaptativos associados ao metabolismo ósseo durante o período pós-parto e pós-lactação, a fim de restabelecer o equilíbrio dos processos ósseos, como remodelamento e reabsorção. Nestes períodos, fisiologicamente, o metabolismo ósseo promove o desvio de cálcio do osso para o sangue para fornecer este nutriente ao feto e ao bebê (BEZERRA et al., 2004; YUMUSAKHUYLU et al., 2013; SALLES, 2016). Entretanto, permanece inconsistente a capacidade de determinados alimentos de promover uma qualidade óssea eficaz que possa auxiliar as mães nesses períodos. Assim, alguns estudos têm investigado alimentos e nutrientes que sejam capazes não apenas de modular processos metabólicos, mas também de compensar um desequilíbrio alimentar cada vez mais frequente em muitas sociedades (DREWNOWSKI, 2009; TITUS, 2018).

Nesse contexto, pesquisas têm relatado um padrão alimentar caracterizado pelo alto consumo de produtos industrializados e mudanças no estilo de vida, que influenciam cada vez mais as escolhas alimentares das populações principalmente das mulheres. A população feminina vem sendo alvo em pesquisas epidemiológicas devido as mudanças no estilo de vida observados a longo prazo, marcadas principalmente pela inserção da mulher no mercado de trabalho e alterações hormonais significativas que constantemente ocorrem nesta população. Dessa forma, um desequilíbrio entre os nutrientes consumidos é frequentemente encontrado em populações específicas, como mulheres adultas (MALAKOUTI et al., 2015; MA, 2015; SKREDEN et al., 2017).

Existe uma associação entre o alto consumo de produtos industrializados ricos em óleos refinados e ômega 6 (n-6) e consequências negativas no organismo como aumento do risco para doenças crônicas não transmissíveis. Estudos relataram aumentos na proporção de ácido linoleico (C18: 2 n-6) para o ácido alfa-linolênico (C18: 3 n-3) na dieta, associados à diminuição da ingestão de frutas e vegetais e aumento do uso de óleos refinados (KANT e GRAUBARD, 2004; VOLP et al., 2010; BRASIL, 2014; SEGUIN et al., 2016). A proporção estimada da ingestão de n-6: n-3 atualmente varia de 10:1 a 20:1, quantidades diárias (DIRIENZO et al., 2008; KRUGER et al., 2010). Apesar de não existir um consenso sobre qual seria a proporção ideal, é de comum acordo que os valores atuais estão acima dos desejados. Sendo assim, adaptar a proporção de ácidos graxos essenciais na dieta é uma

maneira eficaz de estimular o equilíbrio dos processos metabólicos relacionados a fisiologia óssea (BARHAM et al., 2000; COSTA et al., 2012; XIAO et al., 2016). Considerando que fatores nutricionais desempenham um papel importante na saúde esquelética durante o envelhecimento e a maioria deles tem sua origem na fase adulta jovem, tem sido relevante estudar a importância da Nutrição nesses processos. Portanto, tem sido foco de alguns estudos pesquisar medidas dietéticas que sejam capazes de atuar no fortalecimento do osso, de modo a contribuir para a manutenção da saúde óssea na fase jovem (KANAYAMA et al., 2015; VARELA-LÓPEZ et al., 2017).

Com o propósito de equilibrar os processos fisiológicos através da Nutrição, destacamos a semente de linhaça, devido às suas propriedades funcionais, por conter compostos bioativos e por ser uma excelente fonte de ômega 3 (CARDOZO et al., 2010; AKANDE et al., 2010; KAJLA, 2014). A linhaça é uma planta amplamente utilizada na alimentação humana como semente, farinha ou óleo (AKANDE et al., 2010; NOVELLO e POLLONIO, 2011). Estudos experimentais investigaram os possíveis benefícios relacionados ao consumo de linhaça em ratos *Wistar*. Porém, a maioria desses estudos concentrou-se nos efeitos da linhaça em ratos machos, não investigando as interações na atividade óssea em ratas (RIBEIRO et al., 2015; PEREIRA et al., 2016; COSTA et al., 2016). Além disso, poucos são estudos que relacionam o consumo do óleo de linhaça e efeitos na estrutura óssea. Por ser rico em ômega 3, o óleo de linhaça tem mostrado um potencial efeito benéfico na saúde como em estudos clínicos e experimentais (COSTA et al., 2012; COSTA et al., 2016; FOERSTER et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

Considerando que os principais indicadores para avaliar a saúde óssea são a quantidade de tecido e de densidade mineral óssea presentes, tanto em humanos quanto em ratos (SORNAY-RENDU et al., 2005; BIVER et al., 2017), uma diminuição constante na massa óssea durante o período de lactação pode afetar negativamente a saúde óssea (VARELA-LÓPEZ et al., 2017). Nesse contexto, estudos avaliaram situações específicas nas quais houve um comprometimento com a adaptação normal da gestação, principalmente em relação à recuperação da massa óssea perdida durante a amamentação (LENORA, 2009; MALAKOUTI et al., 2015). Essas situações específicas e condições incluem: menor tempo de amamentação, idade gestacional, multiparidade e estilos de vida (LENORA, 2009; SCHNATZ et al., 2010; OKYAY et al., 2013). Vários modelos experimentais já foram documentados avaliando os efeitos da linhaça na fisiologia óssea, mas poucos foram realizados em ratas (COSTA et al., 2012; COSTA et al., 2015 PEREIRA et al., 2016).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da dieta contendo óleo de linhaça na estrutura óssea de ratas *Wistar* nos períodos de lactação e pós-lactação.

## 2- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 - Fisiologia óssea e amamentação

Aproximadamente 80% do esqueleto é composto pelo tecido ósseo compacto ou cortical, que consiste em ósteons, ou sistema de Havers que sofrem remodelamento contínuo, porém, lento. Os outros 20% consistem no tecido ósseo trabecular ou esponjoso, que estão na extremidade dos ossos longos. As perdas de massa óssea trabecular e cortical, que progridem com o envelhecimento, iniciam-se em fases diferentes para homens e mulheres. Mas em ambos os gêneros, a perda trabecular começa durante a fase adulto jovem, enquanto a perda de osso cortical é mais tardia. O tecido ósseo trabecular é o mais sensível às alterações no metabolismo. Sendo assim, a sua perda no final da vida é a grande responsável pela ocorrência de fraturas. (ENSOM, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; ANDIA, 2006; ROBLING, 2006; SCHILLING et al., 2006) (Figura 1). Por isso que muitos estudos relacionados a saúde óssea destacam a importância da preservação do tecido ósseo trabecular ao longo da vida mesmo diante de alterações fisiológicas. No caso das mulheres, que passam pelo processo da gestação, é interessante pesquisar recursos alimentares que possam dar um maior suporte para manutenção da sua saúde óssea. A fragilidade óssea predominante na população feminina antecede diversas patologias e tem sido investigado os mecanismos fisiológicos relacionados as mudanças pelas quais as mulheres passam (CUMMING e KLINEBERG, 1993; MELTON et al., 2010; SCHNATZ et al., 2010).

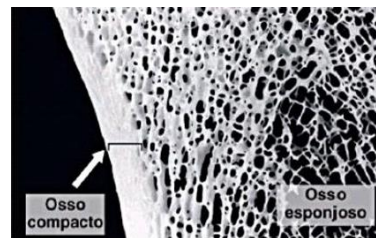


Figura 1: Corte de um osso seco: Osso compacto e esponjoso (Fonte: JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004)

Da gestação até após a amamentação o corpo da mulher passa por diversas mudanças fisiológicas para dar suporte físico e fornecer nutrientes ao feto. Tais alterações são naturais e em sua maioria, reversíveis. De modo que o organismo após a amamentação tende a voltar o

mais próximo possível de como era seu metabolismo pré-gestacional. Em relação ao metabolismo ósseo são observadas mudanças nos processos relacionados principalmente ao remodelamento (MELTON et al., 1993; HRESHCHYSHYN et al., 1998; SALLES, 2016). Numa situação normal de homeostase quando os processos de reabsorção e formação ósseas estão em equilíbrio há uma mesma quantidade de tecido ósseo na conclusão da fase de formação óssea e início da fase de reabsorção. Porém, durante a amamentação o processo de reabsorção óssea encontra-se aumentado em relação à formação devido ao conjunto de alterações presentes neste período. Por exemplo, com o objetivo de disponibilizar cálcio para a composição do leite, a absorção intestinal de cálcio é aumentada e em paralelo o cálcio é deslocado do osso para manter normal a concentração sérica de íons de cálcio (10mg/dl) (GUYTON e HALL, 2011; SOMA-PILLAY et al., 2016) (Figura 2). Nesse processo destaca-se a ação de dois hormônios: paratormônio (PTH) e calcitriol. O PTH em concentrações séricas aumentadas estimula o processo de reabsorção óssea, com maior atividade das células osteoclásticas. O calcitriol é responsável por aumentar a absorção intestinal de cálcio e em conjunto com o PTH aumenta a liberação de cálcio do osso para manter a homeostase do cálcio. Além disso, ele tem efeito direto sobre as células ósseas estimulando a osteoblastogênese e outros fatores locais necessários para a formação óssea e diminuição da degradação de tecido. Sendo assim, é bem consolidado que a ação desses dois hormônios é de extrema importância para manutenção do metabolismo ósseo, uma vez que eles equilibram os processos relacionados ao tecido. Uma alteração na liberação ou ação desses hormônios implicaria em consequências à saúde óssea (KALKWARF, 2004; YUMUSAKHUYLU et al., 2013; SOMA-PILLAY et al., 2016).

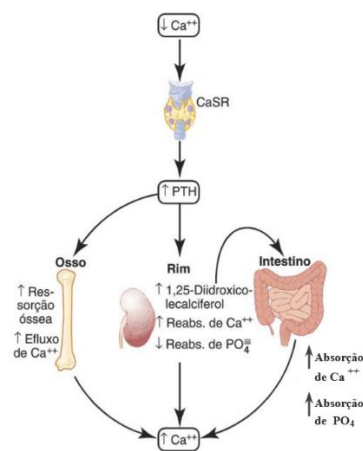


Figura 2: Resumo dos principais efeitos do aumento do PTH, em resposta da diminuição plasmática de Cálcio (Fonte: Adaptado de GUYTON e HALL, 2011).

Durante a amamentação o processo de renovação óssea está aumentado pelas razões descritas acima. É interessante considerar a possibilidade de em situações adversas (como multiparidade e gestação precoce) não ocorrer total reversão da intensidade desses processos e o osso da mulher continuar passando por um processo contínuo caracterizado pelo aumento da atividade dos osteoclastos em relação aos osteoblastos. Duas consequências mais comuns desse processo, quando somado à uma alimentação deficiente em micronutrientes (exemplo: deficiência de cálcio) ou pré-disposição genética a doenças ósseas (como a osteoporose), são os de osteopenia e fratura por fragilidade óssea (LOCKITCH , 1997; BEZERRA et al., 2004; YUMUSAKHUYLU et al., 2013). A osteopenia é definida como a diminuição da densidade mineral óssea para abaixo de valores saudáveis, porém em um estado ainda reversível. O diagnóstico da osteopenia antecede o da osteoporose que também se baseia nos valores de densidade mineral óssea. Em comparação com os homens as mulheres têm uma densidade mineral óssea medida por área (g/cm<sup>2</sup>) menor, têm maior longevidade e perdem massa óssea mais rapidamente, principalmente após a menopausa. A diminuição acentuada das concentrações séricas de estrogênio é uma das causas para essas consequências relacionadas ao osso. Outras possíveis causas estão relacionadas ao estilo de vida, hábitos alimentares, patologias associadas e histórico médico. As patologias relacionadas ao osso se correlacionam diretamente às fraturas devido a fragilidade, podendo ocasionar fraturas e lesões. No caso de mulheres que já engravidaram, os fatores de risco são: múltiplas gestações, tempo de amamentação, idade da primeira gestação e deficiências nutricionais crônicas.

## **2.2 Propriedades e benefícios da linhaça**

A linhaça é um alimento muito estudado atualmente devido às suas propriedades funcionais provenientes da sua composição. Alimentos funcionais ou com características funcionais apresentam múltiplos benefícios ao organismo. O conceito de funcional é discutido há décadas em razão dos compostos bioativos, presentes nesses alimentos, apresentarem potencial protetor e preventivo de doenças crônicas não transmissíveis principalmente. (ROBERFROID, 2002). Dentre esses alimentos destacamos a linhaça, uma semente pertencente à família da Linaceae, seu nome botânico é *Linum usitatissimum* (RUBILAR et al., 2010). É muito utilizada no consumo humano e animal sendo encontrada na cor dourada ou marrom avermelhada, brilhante, com uma textura firme e mastigável. A cor é determinada pela quantidade de pigmento exterior contido nas sementes e, quanto maior o teor de pigmento na casca, mais escura será a semente. A marrom é mais cultivada em regiões de



clima quente e úmido, como o Brasil, e a dourada encontrada em regiões frias como nos Estados Unidos e no Canadá (NOVELLO & POLLONIO, 2011). A semente pode ser consumida *in natura*, inteira ou moída, utilizada como complemento alimentar ou componente essencial de diversas preparações. A farinha pode atuar como substituta do ovo em receitas veganas e fazendo parte da composição de farinha de receitas (CARDOZO et al., 2010; MARQUES et al., 2011).

A semente de linhaça tem um perfil único de ácidos graxos, com elevada quantidade de ácido graxo poliinsaturado (73%), moderado em ácido graxo monoinsaturado (18%) e baixa quantidade de ácido graxo saturado (9%) (MORRIS, 2001). Quanto aos ácidos graxos poliinsaturados, a semente apresenta elevadas quantidade de ômega-3 e baixa concentração de ômega-6 (RUBILAR, 2010). Como o organismo humano é incapaz de sintetizar esses ácidos graxos, eles são denominados essenciais e devem ser obtidos através da alimentação (MOURA, 2008).

A semente de linhaça apresenta também grandes quantidades de fibra solúvel, com ação anti-hipercolesterolêmica e no controle do metabolismo glicídico. Além disso, a ingestão da semente de linhaça é capaz de aumentar o volume do bolo fecal e a excreção de lipídeos nas fezes. (RUBILAR, 2010; MARQUES, 2011). Tal como em outras sementes, as globulinas são a principal proteína, representando 18,6% do total protéico, seguido da albumina, em 17,7%. A semente é rica em arginina, ácido aspártico e glutâmico. A lisina, metionina e cisteína são os aminoácidos limitantes (OOMAH, 2001; RUBILAR, 2010).

As lignanas, presente na linhaça, são uma das três principais classes de compostos polifenólicos e são classificadas como fitoestrógenos (compostos difenólicos que estruturalmente se assemelham ao estrogênio) e estão associadas ao aumento da proliferação celular de precursores dos osteoblastos, relacionados à formação óssea. A linhaça apresenta também uma ampla gama de atividades biológicas, como aumento da sensibilidade insulínica e atividade antioxidante. (ORCHESON et al., 1998; MEAGHER et al., 1999; PETIT, 2009; RHEE e BRANT, 2011) A atividade antioxidante não somente inativa os radicais livres, mas também, tem um efeito indireto nos sistemas antioxidantes endógenos, como, por exemplo, da enzima glutatona (GSH), célula que possui papel central contra o estresse oxidativo (ALMEIDA et al., 2009).

A linhaça pode ser consumida de diversas formas e uma delas é como óleo de linhaça produzido industrialmente. O óleo de linhaça está disponível em lojas de produtos naturais e supermercados, vendido em garrafas para uso em saladas ou em cápsulas podendo ser utilizado como um complemento na alimentação. O óleo é produzido por uma “pressão a frio”

da semente de linhaça, com temperatura máxima permitida de 35°C. Normalmente engarrafado em recipientes à prova de luz para evitar a oxidação fotoquímica e refrigerado para limitar a auto oxidação (MORRIS e VAISEY-GENSER, 2003; ROY, 2007). Alguns estudos já investigaram os benefícios associados ao óleo de linhaça devido à facilidade da sua aderência a rotina alimentar e benefícios comprovados do consumo de ácidos graxos polinsaturados (MORRIS, 2003; RUBILAR, 2010; OLIVEIRA et al., 2012; KANAYAMA et al., 2015).

### **2.3 Óleo de linhaça e saúde óssea materna**

A correlação positiva estabelecida entre o consumo do óleo de linhaça, rico em ômega 3, e a qualidade óssea se baseia em mecanismos fisiológicos que acontecem quando ocorre uma ingestão adequada em relação a proporção dos ácidos graxos polinsaturados. Estes são divididos em ácido alfa-linolênico (ALA), precursor do ômega-3, que formará o ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), e o ácido linoleico (LA), precursor do ômega-6, convertido a ácido araquidônico (AA) (KRUGER et al., 2010; OLIVEIRA, 2015). O ômega 3 é precursor de prostaglandinas da série 3, leucotrienos da série 5, que reduzem a produção dos derivados de ácido araquidônico e têm ação anti-inflamatória (BARHAM et al., 2000; KRUGER et al., 2010). Além disso, o EPA contribui para a redução da síntese de prostaglandinas da série 2 (PG2), possibilitando o recrutamento de pré-osteoblastos, sua diferenciação e maturação, contribuindo assim para a formação óssea. Quando a ingestão de ômega 3 está aumentada, tem-se maior estímulo a expressão de osteoprotegenina, que é o receptor presente na superfície dos osteoblastos, capaz de reduzir o recrutamento e a maturação dos pré-osteoclastos e inibindo a PG2. Este ácido graxo contribui também para um menor tempo de vida média dos osteoclastos maduros. Devido ao conjunto dessas atividades, muitos estudos concluem que a ingestão de ômega 3 contribui para menor atividade do processo de reabsorção óssea (KRUGER et al., 2010; COSTA et al., 2012).

O ômega 3, ainda relacionado ao metabolismo ósseo, mostra a capacidade de estimular o aumento da atividade e produção de células osteoblásticas, responsáveis principalmente pelos processos de formação e remodelação óssea (REEVES, 1997; KAJLA, 2014; XIAO et al., 2016). O benefício da remodelação é a renovação do osso sem qualquer microfratura. Um excelente equilíbrio nos processos ósseos metabólicos contribui para a recuperação e a manutenção saudável do tecido ósseo (WALSH, 2015). A importância da manutenção e do

fortalecimento do osso correlaciona-se com uma melhoria da qualidade de vida a longo prazo. Pesquisas anteriores já relacionaram o consumo de ômega 3 em mulheres com um menor risco de fratura devido a fragilidade do esqueleto em períodos posteriores da vida (BIVER *et al.*, 2007; VAZ *et al.*, 2014; MONTALVANY-ANTONUCCI *et al.*, 2018). Considerando que, durante a gestação e pós-parto a mulher tem suas necessidades nutricionais aumentadas, seria interessante enriquecer sua dieta com alimentos fonte de nutrientes que possam trazer benefícios para sua recuperação após esses períodos, como o óleo de linhaça rico em ômega 3 (OKYAY *et al.*, 2013; KAJLA, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2015).

Estudos prévios apontam que se deve promover a ingestão de ácidos graxos do tipo ômega 3 principalmente devido ao consumo inadequado de alimentos que servem como fonte de outros nutrientes na dieta. A utilização de suplementos alimentares, por exemplo, com óleos de peixes e/ou derivados se tornam uma alternativa alimentar viável para equilibrar a proporção dos ácidos graxos na dieta (BOKOR *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2015). Alguns estudos mais específicos fazem correlações entre o tempo de amamentação, densidade mineral óssea (DMO) e risco de complicações ósseas futuras. Berning *et al* em 1993 destacaram informações mais específicas quanto à duração da amamentação e observaram maior DMO em mulheres que amamentaram por mais de 24 semanas, em relação às que nunca amamentaram. Outro estudo também mostrou relação direta entre DMO e amamentação de duração acima de oito meses. Um estudo com mães adolescentes apontou que um menor tempo de amamentação somado a ingestão dietética inadequada estão associados a um maior de risco de desmineralização óssea e problemas ósseos futuros (CHAN *et al.*, 1992). Um outro estudo de Schnatz *et al* em 2010 verificou que a prática da amamentação parece diminuir significativamente a incidência de osteoporose na pós-menopausa. Além disso, afirmaram uma associação entre osteoporose, amamentação e idade da primeira gravidez.

De acordo com recomendações da *European Food Safety Authority* (EFSA) é indispensável aumento da ingestão de DHA no período gestacional e de lactação, com a finalidade de otimizar a saúde da mãe e do bebê. Outros fatores reprodutivos, como idade da menarca, idade no primeiro parto, natimorto e aborto, são inconsistentemente relacionados a quantidade de tecido ósseo (MELTON *et al.*, 1993).

### **3 -OBJETIVOS**

#### **3.1 - Objetivo geral:**

Avaliar o efeito do óleo de linhaça na estrutura óssea de ratas *Wistar* lactantes no período pós-lactação.

#### **3.2 - Objetivos específicos:**

- Analisar a composição óssea total e dos fêmures: densidade mineral óssea, conteúdo mineral ósseo e área óssea;
- Analisar a sorologia quanto: cálcio, osteocalcina e osteoprotegerina;
- Avaliar parâmetros anatômicos: massa, distância entre as epífises e largura no ponto médio da diáfise;
- Avaliar a radiodensidade da cabeça dos fêmures;
- Analisar no fêmur as propriedades biomecânicas.

## 4- MÉTODOS

### 4.1 Ética

O protocolo utilizado neste projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, Brasil (protocolo 887/2017) (Anexo 1). Todos os procedimentos estavam de acordo com as provisões da Sociedade Brasileira de Ciência e Animais de Laboratório e o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório publicado pelos Institutos Nacionais de Saúde dos EUA (NIH Publication N 85-23, revisado em 1996).

### 4.2 Delineamento experimental

No experimento foram utilizadas ratas *Wistar (Rattus norvegicus)* obtidas da colônia do Laboratório de Nutrição Experimental (LabNE), localizado na Faculdade de Nutrição da Universidade Federal Fluminense. Durante todo o estudo os animais permaneceram em ambiente controlado de temperatura ( $23 \pm 1^\circ \text{C}$ ), umidade ( $60 \pm 10 \%$ ), com o ciclo artificial claro e escuro (luzes acesas de 7:00 - 19:00). Ratas fêmeas, com três meses de idade e nulíparas foram colocadas em gaiolas junto aos ratos machos, na proporção de duas fêmeas para um macho, e após confirmado o acasalamento foram realocadas em gaiolas individuais, com livre acesso à água e ração comercial de laboratório (Nuvilab®, Paraná, Brasil).

Durante as 24 horas após o nascimento dos filhotes, começou o período experimental, em que o excesso de filhotes foi removido, mantendo seis filhotes por mãe, de forma a obter um melhor desempenho lactotrófico por cada rato filhote (FISHBECK e RASMUSSEN, 1987).

Após, as ratas mães foram divididas em dois grupos. Grupo controle (C, n=6), que recebeu uma ração controle, no período de 21 dias de lactação e durante 30 dias no pós-desmame, totalizando 51 dias de experimento. E grupo experimental (OL, n=6), que, assim como o grupo C, prosseguiu com o mesmo período de estudo, todavia recebendo uma dieta experimental na qual em sua composição encontrava-se o óleo de linhaça (Figura 3). Os animais tiveram livre acesso à água e ração durante o estudo.

### Delineamento Experimental

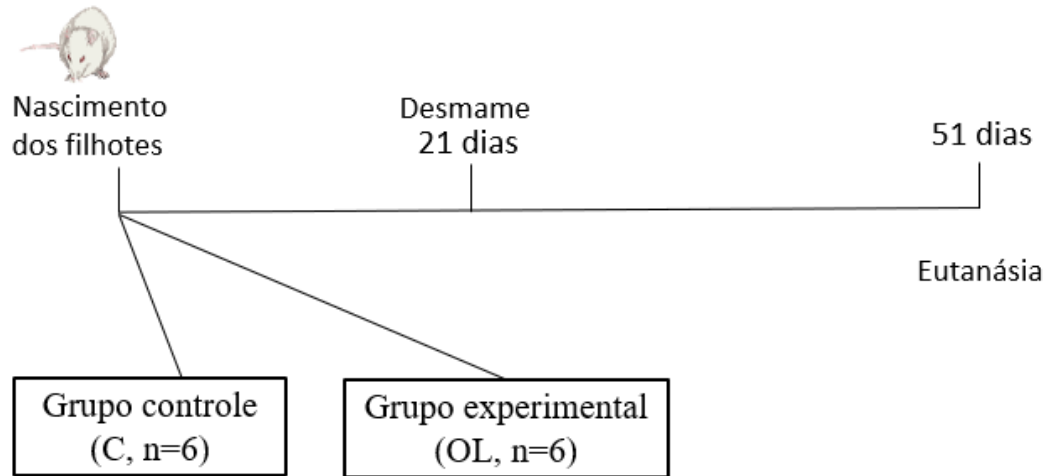


Figura 3. Delineamento Experimental. Grupo experimental Óleo de Linhaça (OL), Grupo controle (C). Com no total 6 ratos *Wistar* fêmeas por grupo, acompanhadas até os 30 dias após o desmame da amamentação, totalizando 51 dias de experimento.

### 4.3 Rações

As rações ofertadas foram confeccionadas no LabNE semanalmente e armazenadas em uma geladeira a temperatura de  $\leq 10^{\circ}\text{C}$ . Em sua composição apresentavam a mesma quantidade de nutrientes e eram isocalóricas. Até o 21º dia de experimento, período de lactação das ratas, foi ofertado a versão da ração baseada na AIN-93G, com a quantidade de nutrientes adequados para esse momento fisiológico. Durante os 30 dias pós-desmame foi utilizada a versão da ração AIN-93M que é adequada para o período de manutenção (REEVES, 1993) (Tabela 1). A principal diferença entre a ração controle e experimental é a fonte lipídica ofertada. A ração controle continha óleo de soja, enquanto a ração experimental o óleo de linhaça.

Tabela 1 – Composição das rações experimentais

Ingredientes (g/100g)	AIN-93G		AIN-93M	
	C	OL	C	OL
Caseína	20	20	14	14
Amido de milho	52,95	52,95	62,07	62,07
Açúcar	10	10	10	10
Óleo de soja	7	-	4	-
Óleo de linhaça	-	7	-	4
Celulose	5	5	5	5
Mix mineral (AIN-93M)	-	-	3.5	3.5
Mix mineral (AIN-93G)	3.5	3.5	-	-
Mix vitamínico	1	1	1	1
L-Cistina	0,3	0,3	0,18	0,18
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
BHT(mg)	0,014	0,014	0,008	0,008

Dietas formuladas de acordo com as recomendações da *American Institute of Nutrition* (AIN-93, REEVES, 1997). BHT - Terc-Butil-hidroquinona. Sendo AIN93-G dieta para período de crescimento e lactação; e AIN93-M dieta de manutenção.

Tabela 2. Informação nutricional do óleo de linhaça.

Informação nutricional (porção de 13mL – 1 colher de sopa)		
	Quantidade por porção	%VD (*)
VET	117 Kcal/491 KJ	8
Carboidrato	0 g	0
Proteína	0 g	0
Gorduras totais, das quais:	13 g	24
Gordura saturada	1,2 g	6
Gordura monoinsaturada	2,3 g	-
Gordura poliinsaturada	9 g	-
Gordura trans	0 g	-
Colesterol	0 mg	-
Fibra	0 g	0
Sódio	3,2 mg	0
n-3	6,8 g	-
n-6	1,6 g	-
n-9	2,7 g	-

(\*) Valores diários recomendados com base em uma dieta de 2000 Kcal ou 9400 KJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas. VET – Valor energético total; n-3 – ácido graxo ômega-3; n-6 – ácido graxo ômega-6; n-9 – ácido graxo ômega-9.

**Fonte:** Rótulo do óleo de linhaça (Giroil®), utilizado no presente estudo.

#### 4.4 Eutanásia e Avaliações

As ratas ao completarem 51 dias de experimento foram submetidas a um jejum de seis horas e anestesiadas através de injeção intraperitoneal de Thiopentax® (Tiopental sódico 1g, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Brasil) a 5% (0,1 mg/100g de massa corporal) sendo diluído com 50mL de água destilada para cada 1g de anestésico. E em seguida, foram submetidas à avaliação da composição corporal quanto aos parâmetros ósseos pelo equipamento *Dual-energy X-ray absorptiometry* (DXA) localizado na Faculdade Nutrição/UFF. A análise foi realizada com auxílio de um software específico (encore 2008. Version 12.20 GE Healthcare), para avaliação do conteúdo mineral ósseo (CMO), densidade mineral óssea (DMO) e área óssea (AO) em cada rata.

Após a avaliação pelo DXA, com as ratas ainda anestesiadas, elas foram submetidas à incisão mento-pubiana para abertura das cavidades torácicas e abdominal. O sangue foi coletado através de punção cardíaca, sendo assim o animal foi eutanasiado por exsanguinação total. O sangue foi alocado em tubos para serem centrifugados (Centrífuga Sigma) a 3500 rpm



(rotação por minuto) por 15 minutos para obtenção do soro e, logo após, armazenados em freezer -80°C para análises bioquímicas.

Com a extração do soro analisou-se o cálcio. As dosagens foram realizadas com o auxílio de um analisador automático de bioquímica (Bioclin BS120, Quibasa – Química Básica Ltda/Belo Horizonte-MG), localizado no LabNE/UFF. Foi analisado também a osteocalcina e osteoprotegerina com o auxílio de um leitor automático de microplacas pelo método ELISA (TP Reader NM, Thermo Plate, Hexasystems/Taboão da Serra-SP), localizado no LabNE/UFF.

Posteriormente a coleta do sangue, os fêmures foram coletados, limpos e armazenados a -80°C, para posteriores análises da: massa (mg), distância entre as epífises (mm) e a largura ponto médio da diáfise (mm). As dimensões ósseas foram mensuradas com o auxílio de uma balança analítica de precisão e de um paquímetro digital (JOMARCA, 0,01 mm).

A fim de avaliar radiodensidade da cabeça dos fêmures (direitos), estes foram analisados por um scanner de tomografia computadorizado (TC helicoidal modelo HISPEED, GE®). As imagens obtidas por meio de cortes axiais de espessura de 1 mm. A radiodensidade (expressa em unidades Hounsfield, HU) foi medida com auxílio de um sistema de análise de software informatizado (eFilm Lite, 2.0, 2003, Milwaukee, EUA), por medição Tool-Ellipse (COSTA et al., 2012).

Em seguida, estes mesmos fêmures foram levados para análise das propriedades biomecânicas realizada no Laboratório Analítico de Biomateriais Restauradores da Faculdade de Odontologia da UFF usando teste de flexão de três pontos universais na Máquina Universal de Ensaio (MUE) (DL 2000, EMIC, São José dos Pinhais, SP, Brasil). As extremidades dos ossos foram apoiadas em dois rolos de diâmetro de 3 mm e o raio de 21,70 mm. A força máxima (N), a força de ruptura (N) e o módulo elástico (MPa) foram obtidos por um software. (LATEMPA et al., 2015)

As carcaças dos animais foram recolhidas pela UFF e encaminhadas para PESAGRO-Rio (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro), porém antes ficaram armazenadas em freezer -20°C até a espera do descarte como lixo biológico.

#### **4.5 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad Prism (versão 5.00, 2007, San Diego, USA), dados analisados com o teste t de *Student*. Todos os resultados sendo expressos como média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM), considerando o nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 5 - RESULTADOS

As análises do DXA, densidade mineral óssea e área óssea totais, foram semelhantes entre os grupos controle e experimental, não apresentando diferença significativa. Já o conteúdo mineral ósseo mostrou valores aumentados no grupo experimental ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle, na análise total do DXA. A tabela 3 abaixo, apresenta dos valores dos dados quanto as análises do DXA de composição corporal total.

Tabela 3. Análises DXA da Composição Corporal aos 51 dias de experimento.

	C		OL	
	Média	EPM	Média	EPM
DMO Total (g/cm <sup>2</sup> )	0,149	0,001	0,151	0,003
CMO Total (g)	7,700	0,105	8,157*	0,172
Área Total (cm <sup>2</sup> )	51,710	0,747	54,000	0,690

Grupo Controle (C, n=6) recebeu ração controle e Grupo Experimental (OL, n=6) recebeu ração acrescida de óleo de linhaça, durante 30 dias de experimento após o período da lactação. Análises ósseas no DXA (*dual-energy X-ray absorptiometry*): DMO (densidade mineral óssea) e CMO (conteúdo mineral ósseo). Valores apresentando diferentes sobrescritos são significativamente diferentes de acordo com o Teste *T Student* considerando \* ( $p < 0,05$ ). EPM, erro padrão da média.

Em relação às análises sorológicas, os animais que receberam a dieta experimental apresentaram diferença significativa nos valores de cálcio sanguíneo analisados, sendo os valores encontrados maiores no grupo OL ( $p < 0,0001$ ) em comparação com o grupo C. Demais análises de osteocalcina e osteoprotegerina não apresentaram diferença significativa entre os grupos, como mostra a tabela 4.

Tabela 4. Análises Sorológicas e Parâmetros ósseos do fêmur aos 51 dias de experimento.

	C		OL	
	Média	EPM	Média	EPM
Cálcio (mg/dL)	9,800	0,0756	10,820***	0,083
Osteocalcina (ng/mL)	55340	6579	70500	6730
Osteoprotegerina (ng/mL)	6714	3994	9290	4267

Grupo Controle (C, n=6) que recebeu ração controle e Grupo Experimental (OL, n=6) que recebeu ração acrescida de linhaça, durante 30 dias de experimento após o período da lactação. Valores apresentando diferentes sobrescritos são significativamente diferentes de acordo com o Teste *t Student* considerando: \*\*\* ( $p < 0,0001$ ). EPM, erro padrão da média.

A Tabela 5 contém todos os dados em relação as análises feitas nos fêmures. O grupo OL mostrou maior ( $p < 0,05$ ) densidade mineral óssea comparado ao grupo C. A massa do fêmur, a distância entre as epífises e a largura do ponto médio da diáfise também foram maiores ( $p < 0,05$ ) no grupo OL em relação ao grupo controle. No teste biomecânico, o grupo OL apresentou módulo elástico maior ( $p < 0,05$ ) vs. C. No entanto, força máxima e força de ruptura foram semelhantes entre os grupos. Quanto ao exame de tomografia computadorizada, o grupo OL mostrou maior ( $p < 0,05$ ) radiodensidade da cabeça femoral em relação ao grupo C.

Tabela 5. Análises ósseas no fêmur aos 51 dias de experimento

	C		OL	
	Média	EPM	Média	EPM
DXA fêmur:				
DMO	0,1462	0,0013	0,1567**	0,0027
Parâmetros do fêmur:				
Massa do fêmur (g)	0,681	0,013	0,748***	0,0139
Distância entre as epífises (mm)	34,990	0,149	35,850**	0,181
Largura no ponto médio da diáfise (mm)	3,879	0,061	4,126*	0,073
Teste Biomecânico:				
Força máxima (N)	108,0	3,994	109,8	2,798
Força de ruptura (N)	93,86	6,794	95,50	3,096
Módulo elástico (MPa)	566900	11720	645600**	15220
Tomografia fêmur	808,4	31,41	1050**	47,82

Grupo Controle (C, n=6) que recebeu ração controle e Grupo Experimental (OL, n=6) que recebeu ração acrescida de linhaça, durante 30 dias de experimento após o período da lactação. Análises ósseas no DXA (*dual-energy X-ray absorptiometry*): DMO (densidade mineral óssea). Valores apresentando diferentes sobrescritos são significativamente diferentes de acordo com o Teste *t Student* considerando: \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\* ( $p < 0,0001$ ). EPM, erro padrão da média.

## 6 - DISCUSSÃO

Existem diversos métodos que permitem estimar, avaliar e monitorar a composição e qualidade óssea. O método de avaliação corporal por densitometria tem sido usado há décadas em pesquisas com seres humanos e ratos. A validação da DXA para animais de pequeno porte é bem descrita na literatura científica e considerada o padrão ouro para diagnósticos relacionados ao osso (LUKASKI et al., 2001; KOVACS & FULEIHAN, 2006). Em relação às análises do DXA, maiores valores de CMO encontrados no grupo OL podem sugerir uma maior atividade das células osteoblásticas do osso. O conteúdo mineral ósseo é composto principalmente por cristais de fosfato de cálcio (hidroxiapatita), que conferem dureza óssea e resistência à compressão. Neste contexto, consideramos que o ácido alfa-linolênico tenha sido capaz de promover um maior recrutamento de osteoblastos, estimulando o aumento do processo de formação óssea. Esses achados corroboram outros estudos, como Costa e Ribeiro, que encontraram efeitos benéficos no osso com a adição da farinha de linhaça à dieta de ratos *Wistar* (RIBEIRO et al., 2015; COSTA et al., 2016).

Em relação aos resultados sorológicos, o grupo OL apresentou aumento dos níveis séricos de cálcio, quando comparado ao controle, sugerindo um efeito positivo do óleo de linhaça em relação ao metabolismo desse mineral (KOVACS & KRONENBERG, 1997; KOVACS & FULEIHAN, 2006). O tecido ósseo funciona como um reservatório de cálcio e de outros minerais que são usados por vários tecidos no corpo. Quando a fonte de cálcio da dieta não é adequada ou durante a gravidez, quando ocorre um desvio de cálcio materno para a produção de leite, ocorre uma diminuição sérica desse mineral (KOVACS e FULEIHAN, 2006; WOODROW et al., 2006). Em oposição aos baixos níveis de cálcio no sangue, está consolidado na literatura que níveis muito elevados de cálcio sanguíneo, também estão associados a consequências negativas ao organismo por pré-dispor o processo de calcificação de tecidos moles. A calcificação consiste no acúmulo de sais de cálcio em tecidos moles como artérias e cartilagens, tornando-as mais rígidas. Nesse processo, o acúmulo do cálcio causa a precipitação dos íons de cálcio ao se unirem com o fosfato. O diagnóstico das calcificações em tecido moles é feito através de exames por imagem como radiografias e tomografia computadorizada, mas outros exames também devem ser utilizados para conclusão do diagnóstico (JÁCOME & ADBO, 2010; GUYTON & HALL, 211). Portanto, no presente estudo, não encontramos fundamentação teórica para associar o nível de cálcio sanguíneo maior no grupo OL a um efeito negativo no osso. Visto que as outras análises realizadas apresentaram efeitos benéficos da ingestão do óleo em relação a saúde óssea.

Quando associamos esse achado com os demais resultados da presente pesquisa, podemos sugerir que os animais do grupo experimental terem apresentado maiores valores de cálcio do que controle pode significar que houve uma maior preservação do cálcio mesmo as ratas tendo passado pelo processo de lactação (ZOCH, 2016; BOROS e FREEMONT, 2017). Este resultado pode ser interessante quando aplicado a parte clínica, uma vez que mulheres com predisposição genética a doenças ósseas poderiam se beneficiar da suplementação com óleo de linhaça no período pós-amamentação para prevenir futuras complicações como fraturas por fragilidade óssea a longo prazo (CUMMINGS e MELTON, 2002; KARLSSON, 2005; MALGO et al., 2016). Atualmente, já existem profissionais nutricionistas que prescrevem a suplementação com óleo de peixe para mulheres durante a gestação com outros objetivos, mas mostrando de maneira geral efeito positivo da adição desse ácido graxo na alimentação materna. Estudos recentes também têm investigado os efeitos da suplementação de ômega 3 durante a gestação, especialmente em casos de múltiplas gestações e ingestão dietética inadequada (FOERSTER MEREY et al., 2018; MOURA e AZEVEDO, 2018; CARVALHO et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

Quanto aos outros resultados, as concentrações de osteocalcina e osteoprotegerina foram avaliadas por serem consideradas marcadores ósseos sanguíneos (ZOCH et al., 2016). Elas são capazes de sinalizar quando há um desequilíbrio entre os processos de renovação e reabsorção ósseas. A osteocalcina é uma proteína derivada de células osteoblásticas que atua na matriz óssea auxiliando na mineralização e impedindo que esse processo ocorra em excesso (WALSH, 2015). A osteoprotegerina é uma proteína sintetizada pelos osteoblastos que atua como um receptor para regular a atividade das células osteoclasticas (MARTIN e SIMS, 2015; WALSH, 2015). Quando há diminuição da atividade da osteoprotegerina, há um aumento no processo de reabsorção óssea, que em excesso pode ser prejudicial à qualidade óssea, correlacionando-se com a fragilidade do tecido. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos nos valores dessas proteínas. No entanto, como não há diminuição aparente em seus níveis, acreditamos que não há razão para associar o óleo de linhaça a um efeito negativo quando avaliado sob a perspectiva de atividade das células ósseas.

Os resultados da análise do fêmur são um complemento dos achados descritos acima e corroboram muito com o que tem sido descrito na literatura científica (COURT-BROWN e CAESAR, 2006; GIANNOUDIS, 2006; COSTA et al., 2015). O fêmur é considerado o osso humano que apresenta maior incidência de fraturas e por isso tem sido objeto de estudos clínicos e observacionais relacionados a fragilidade e doenças ósseas (WALSH, 2015). A

análise do DXA encontrou diferença significativa no grupo OL na densidade mineral óssea, que significa a concentração de tecido em um determinado volume. Valores aumentados no grupo OL quando comparado ao grupo C sugerem que o grupo experimental tinha um osso mais denso que o controle. Em relação aos parâmetros ósseos, encontramos diferença significativa no grupo OL nos três marcadores: massa, distância entre as epífises e largura do ponto médio da diáfise. Maiores valores de massa femoral no grupo OL se relacionam com o aumento da quantidade de conteúdo mineral ósseo presente e a efetividade do processo de consolidação óssea que ocorre na fase adulta (ENSOM et al., 2002; SALLES, 2016). Valores aumentados no ponto médio da diáfise e distância entre as epífises no grupo OL sugerem também uma maior atividade do processo de remodelação. O comprimento (distância entre as epífises) está relacionado ao crescimento ósseo devido a maior atividade dos osteoblastos no processo de formação óssea que é considerado benéfico para a proteção da estrutura esquelética (JAMSA et al., 1998; BOROS K & FREEMONT, 2017).

O teste biomecânico foi realizado para avaliar o osso quanto à força máxima, resistência à ruptura e rigidez, onde é verificada a resistência do osso quando é submetido a uma tensão. Consideramos que o tecido ósseo é constituído por uma fase mineral, formada essencialmente por cristais de fosfato de cálcio, sob a forma de hidroxiapatita, que assenta numa matriz colagenosa (fase orgânica). A combinação da fase mineral com a fase orgânica confere ao tecido ósseo propriedades biomecânicas únicas (WURM, 2015). As fibras de colágeno dão elasticidade ao tecido ósseo, bem como alguma resistência à quebra. Os cristais de hidroxiapatita proporcionam alta dureza e resistência à compressão. Observamos que o grupo experimental apresentou maiores valores de módulo elástico em relação ao grupo controle, sugerindo uma maior capacidade elástica do osso, ou seja, maior capacidade do osso de se deformar devido a uma pressão, mas sem se romper (JAMSA et al., 1998; WURM, 2015). As outras forças avaliadas representam a força máxima, força que o osso tolera até a fratura ocorrer e a força de ruptura, a força suficiente para causar a ruptura do osso.

Em relação à tomografia computadorizada, utilizada em estudos com ratos também para a avaliação das propriedades geométricas do osso (BREEN et al., 1996; FERRETTI, 1996; JAMSA et al., 1998). A diferença estatística significativa no grupo OL adicionada aos outros dados do estudo sugere uma melhor composição e estrutura óssea dos ratos do grupo experimental. Em um estudo anterior, Berning et al em 1993, por meio da tomografia computadorizada, referiram que a DMO de mulheres na pós-menopausa associa-se positivamente com a duração da amamentação, confirmando-o como sítio ósseo de

mobilização durante a lactação e que, assim, deve ser considerado em pesquisas futuras. Comumente o fêmur e a coluna são utilizados em estudos relacionado ao osso por serem os sítios mais estudados quando se trata de manifestações clínicas de complicações ósseas (HRESHCHYSHYN et al., 1998).

## **7 - CONCLUSÃO**

Os resultados do presente estudo sugerem que o consumo do óleo de linhaça foi capaz de promover efeitos positivos na composição óssea de ratas fêmeas no período de lactação e pós-amamentação. Porém, mais estudos são necessários para orientar quanto a ingestão de óleo de linhaça, quantidades adequadas e seus efeitos na qualidade óssea tanto em ratos quanto em humanos.



## 8 – REFERÊNCIAS

- Akande KE, Doma UD, Agu HO, Adamu HM. Major Antinutrients Found in Plant Protein Sources: Their Effect on Nutrition. *Pakistan J Nutr* 2010 Aug, 9(8):827-32.
- Almeida KCL, Boaventura GT, Guzman-silva MA. Flaxseed (*Linum usitatissimum*) as a source of  $\alpha$ -linolenic acid in the development of the myelin sheath. *Rev Nutr* 2009 Set/Out, 22(5):747-54.
- Andia DC, CERRI PS, Spolidorio LC. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Revista de Odontologia da UNESP* 2006 Jul, 35(2):191-98
- Barham JB, Edens MB, Fonteh AN, Johnson MM, Easter L, Chilton FH. Addition of Eicosapentaenoic Acid to  $\gamma$ -Linolenic Acid-Supplemented Diets Prevents Serum Arachidonic Acid Accumulation in Humans. *J Nutr* 2000 Jun, 130(8):1925–31.
- Berning B, Kuijk Cv, Schütte HE, Kuiper JW, Drogendijk AC, Fauser BCJM. Determinants of lumbar bone mineral density in normal weight, non-smoking women soon after menopause. A study using clinical data and quantitative computed tomography. *J Bone Miner* 1993 Jan, 21(2):129–39.
- Bezerra FF, Mendonca LM, Lobato EC, O'Brien KO, Donangelo CM. Bone mass is recovered from lactation to postweaning in adolescent mothers with low calcium intakes. *Am J Clin Nutr* 2004 Nov, 80:1322–6.
- Biver E, Durosier-Izart C, Chevalley T, van Rietbergen B, Rizzoli R, Ferrari S. Evaluation of Radius Microstructure and Areal Bone Mineral Density Improves Fracture Prediction in Postmenopausal Women. *J Bone Min Res* 2018 Feb, 33(2): 328–37.
- Bokor S, Dumont J, Spinneker A, Gonzalez-Gross M, Nova E, Widhalm K et al. Single nucleotide polymorphisms in the FADS gene cluster are associated with delta-5 and delta-6 desaturase activities estimated by serum fatty acid ratios. *J Lipid Res*, 2010 Ago ,51(8):2325-33
- Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 2008 Apr, 42(4):606-15.
- Boros K, Freemont T. Physiology of ageing of the musculoskeletal system. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2017 Apr, 31(2):203–17.

Boueri BFC, Pessanha CR, da Costa LR, Ferreira MR, Melo HS, de Abreu MDC, Boaventura GT. Body composition in male rats subjected to early weaning and treated with diet containing flour or flaxseed oil after 21 days until 60 days. *J Dev Orig Hlth Dis* 2015 Sep, 6(06):553–57.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira. Brasília: Ministério da Saúde. 2014;156.

Breen SA, Millest AJ, Loveday BE, Johnstone D, Waterton JC. Regional Analysis of Bone Mineral Density in the Distal Femur and Proximal Tibia Using Peripheral Quantitative Computed Tomography in the Rat In Vivo . *Calcified Tissue International* 1996 Jun, 58(6):449–53.

Cardozo LFMF, Cardozo LLS, Chagas MA, Boaventura GT. Maternal consumption of flaxseed during lactation affects weight and hemoglobin level of offspring in rats. *The J Pediatr*. 2010 Mar/Apr,86(2):126-30.

Carvalho SMB, Nascimento JBN, Quadros IAAO, Junqueira ML, Rodrigues FR, Aidar CLG et al. Suplementação de Omega-3 no Período Gestacional: Aspectos Relevantes. *International Journal of Nutrology* 2018, 11(1): S24-S327.

Chan GM, Ronald N, Slater P, Hollis J, Thomas MR. Decreased bone mineral status in lactating adolescent mothers. *J Pediatr* Nov 1982, 101(5):767-70.

Costa CAS, Carlos AS, Gonzalez GD, Reis RP, Ribeiro MS, Santos AS, et al. Diet containing low n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids ratio, provided by canola oil, alters body composition and bone quality in young rats. *Eur J Nutr* 2012 May, 51:191-8.

Costa CAS, Santos AS, Carlos AS, Gonzalez GPL, Reis RPG, Carneiro C, Alves SS, Pereira Albuquerque KP, Silva PCA, Ribeiro DC, Boaventura GT, Moura EGM, Nascimento-Saba CCA. Impact of high-fat diet containing canola or soybean oil on body development and bone parameters in adult male rats. *Nutrición Hospitalaria*. 2015, 31(5):2147–53

Court-Brown CM, Caesar B. Epidemiology of adult fractures: A review. *Injury* 2006 Aug, 37(8):691–7.

Cumming RG, Klineberg RJ. Breastfeeding and Other Reproductive Factors and the Risk of Hip Fractures in Elderly Women. *Int J Epidemiol* 1993 Jan, 22(4):684–91.

Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *The Lancet* 2002 May, 359(9319):1761–7.

Da Costa CAS, da Silva PCA, Ribeiro DC, Pereira AD, dos Santos AS, Abreu MDC et al. Effects of diet containing flaxseed flour (*Linum usitatissimum*) on body adiposity and bone health in young male rats. *Food and Funct.* 2016 Jan,7(2):698-703.

Dirienzo MA, Lemke SL, Petersen BJ, Smith KM. Effect of substitution of high stearic low linolenic acid soybean oil for hydrogenated soybean oil on fatty acid intake. *Lipids* 2008 Mar, 43:451-6

Drewnowski A. Obesity, diets, and social inequalities. *Nutr Rev* 2009 May, 67:36–9.

Ensom MHH, Liu PY, Stephenson MD. Effect of Pregnancy on Bone Mineral Density in Healthy Women. *Obstetrical and Gynecological Survey* 2002 Mar, 57(2):99–111.

Ferretti JL, Capozza RF, Zanchetta JR. Mechanical validation of a tomographic (pQCT) index for noninvasive estimation of rat femur bending strength. *Bone* 1996 Feb, 18(2):97–102.

Giannoudis PV, Papakostidis C, Roberts C. A review of the management of open fractures of the tibia and femur. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British* 2006 Mar, 88-B(3):281–9.

Gonçalves ACS, Ferreira MF, Hasselmann MH, Faerstein E. O efeito da amamentação na massa óssea de mulheres na pós-menopausa: revisão sistemática de estudos observacionais. *Rev Bras Saúde Mater Infant* 2015 Sept, 15(3):265–78.

Guyton AC, Hall JE. Paratormônio, calcitonina, Metabolismo de Cálcio e Fosforo, Vitamina D, Ossos e Dentes. *Tratado De Fisiologia Médica*. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier 2011, 1151p. Cap 79,1005-1020.

Hreshchyshyn MM, Hopkins A, Zylstra S, Anbar M. Associations of parity, breast-feeding, and birth control pills with lumbar spine and femoral neck bone densities. *Am J Obstet Gynecol* 1988 Feb ,159(2):318-22.

Hreshchyshyn, MM, Hopkins A, Zylstra S, Anbar M. Associations of parity, breast-feeding, and birth control pills with lumbar spine and femoral neck bone densities. *Am J Obstet and Gynecol* 1988 Mar, 159(2):318–22.

Jácome AMSC, Abdo EN. Aspectos radiográficos das calcificações em tecidos moles da região bucomaxilofacial. *Odontol Clín.-Cient* 2010 Mar, 9(1):25-32.

- Jamsa T, Jalovaara P, Peng Z, Vaananen H, Tuukkanen J. Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. *Bone* 1998 Aug, 23(2):155–61.
- Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2004. 524p. cap. 8, p. 136-152.
- Kajla P, Sharma A, Sood DR. Flaxseed—a potential functional food source. *Journal of Food Science and Technology* 2014 Feb, 52(4):1857–71.
- Kalkwarf HJ. Lactation and maternal bone health. *Adv Exp Med Biol* 2004, 554:101-14.
- Kanayama A, Carvalho RLP, Munhoz AB, Jordão LF, Oliveira LC, Leme JACAL. Efeitos da ingestão de óleo de linhaça e treinamento físico sobre a massa óssea de ratos *Wistar*. *SALUSVITA Bauru* 2015 Nov, 34(2):277-89.
- Kanis JA, Reginster J-Y. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women – what is the current message for clinical practice? *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2008 Oct, 118(10):538-40.
- Kant AK, Graubard BI. Eating out in America, 1987–2000: trends and nutritional correlates. *Prev Med*. 2004 38(2):243–49.
- Karlsson MK, Ahlborg HG, Karlsson C. Maternity and bone mineral density. *Act Orthop* 2005 Jul, 76(1):2–13.
- Kovacs CS, Fuleihan GEH. Calcium and Bone Disorders During Pregnancy and Lactation. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2006 Mar, 35(1):21–51.
- Kovacs CS, Kronenberg HM. Maternal-Fetal Calcium and Bone Metabolism During Pregnancy, Puerperium, and Lactation. *Endocr Rev* 1997 Dec, 18(6):832–72.
- Kruger MC, Coetzee M, Haag M, Weiler H. Long-chain polyunsaturated fatty acids: Selected mechanisms of action on bone. *Prog Lipid Res* 2010 Mar; 49:438-49.
- Lenora, J, Lekamwasam S, Karlsson MK. Effects of multiparity and prolonged breast-feeding on maternal bone mineral density: a community-based cross-sectional study. *BMC Women's Health* 2009 Jul, 9(1):19.
- Lockitch G. Clinical Biochemistry of Pregnancy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1997 May, 34(1):67-139.

Lukaski HC, Hall CB, Marchello MG, Siders WA. Validation of Dual X-Ray Absorptiometry for BodyComposition Assessment of Rats Exposed to Dietary Stressors. *Nutrition* 2001 Aug, 17(7-8):607–13.

Ma J, Rosas LG, Lv N. Precision Lifestyle Medicine. *Am J Prev Med* 2016 March, 50(3):395–7.

Malakouti J, Sehhati F, Mirghafourvand M, Nahangi R. Relationship between Health Promoting Lifestyle and Perceived Stress in Pregnant Women with Preeclampsia. *J Caring Sci* 2015 Jun, 4(2):155-63.

Malgo F, Appelman-Dijkstra NM, Termaat MF, van der Heide HJL, Schipper IB, Rabelink TJ et al. High prevalence of secondary factors for bone fragility in patients with a recent fracture independently of BMD. *Arch Osteoporos*. 2016 Feb, 11:12.

Martin TJ, Sims NA. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Rev Endocr Metabol Disor* 2015 Jun, 16(2):131–9.

Meagher LP, Beecher GR, Flanagan VP, Li BW. Isolation and characterization of the lignans, isolariciresinol and pinoresinol, in flaxseed meal. *J Agric Food Chem* 1999 Jul; 47(8):3173-80.

Melton, LJ, Bryant SC, Wahner HW, O'Fallon WM, Malkasian GD, Judd HL et al. Influence of Breastfeeding and Other Reproductive Factors on Bone Mass Later in Life. *Osteoporosis Int* 1993 Mar, 3(2)76-83.

Merey LSF, Palhares DB, Porto KRA, Muller, KTC. Ácidos graxos polinsaturados no sangue de gestantes suplementadas com ômega-3 e óleo de linhaça dourada. *Interações* Out/Dez 2018 Jul, 19(4):845-53.

Montalvany-Antonucci CC, Zicker MC, Oliveira MC, Macari S, Madeira MFM, Andrade I, Silva TA. Diet versus jaw bones: Lessons from experimental models and potential clinical implications. *Nutrition* 2018, 45:59–67.

Morris DH, Vaisey-Genser M. Flaxseed. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* 2003, 2525–31.

Morris DH. Essential nutrients and other functional compounds in flaxseed. *Nutr Today* 2001, 36:159-62.

Moura AR, Azevedo FHC. Evidências científicas sobre a alimentação de gestantes. *Revista Saúde em Foco* 2018, 5(1):78-90

Moura AR, Azevedo FHC. Evidências científicas sobre a alimentação de gestantes. *Revista Saúde em Foco, Teresina* 2018 Jun, 5(1):78-90

Novello D, Pollonio MAR. Caracterização e propriedades da linhaça (*Linum usitatissimum L.*) e subprodutos. *Boletim Do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos* 2011 Dez, 29(2): 317-30.

Okyay DO, Okyay E, Dogan E, Kurtulmus S, Acet F, Eftal Taner C. Prolonged breast-feeding is an independent risk factor for postmenopausal osteoporosis. *Maturitas*. 2013 Dec, 74(3):270–75.

Oliveira JM, Luzia LA, Rondó PHC. Ácidos Graxos Poli-insaturados Ômega-3: saúde cardiovascular e sustentabilidade ambiental. *Segurança Alimentar e Nutricional* 2012, 19(1):89-96.

Oomah BD, Mazza G. Effect of dehulling on chemical composition and the physical properties of flaxseed. *Food Sci Technol* 1997 Mar, 30(2):135-40.

OPAS/OMS (Organização Pan Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde). Amamentação. 2003 Disponível em: <http://www.opas.org.br/sistema/fotos/amamentar.pdf>

Orcheson LJ, Rickard SE, Seidl MM, Thompson LU. Flaxseed and its mammalian lignan precursor cause a lengthening or cessation of estrous cycling in rats. *Cancer Letters* 1998 Mar; 125:69-76.

Pereira AD, Ribeiro DC, de Santana FC, de Sousa dos Santos A, Mancini-Filho J, do Nascimento-Saba, CCA, Boaventura GT. Maternal Flaxseed Oil During Lactation Enhances Bone Development in Male Rat Pups. *Lipids* 2016 Jun, 51(8):923-9.

Petit HV. Antioxidants and dairy production: the example of flax. *R Bras Zootec* 2009 Jul; 38:352-61.

Reeves PG. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. *J Nutr* 1997, 127(5): 838–41.

Rhee Y, Brunt A. Flaxseed supplementation improved insulin resistance in obese glucose intolerant people: a randomized crossover design. *J Nutr* 2011 May; 10(1)-44.

Ribeiro DC, Pereira AD, da Silva PC, dos Santos AS, de Santana FC, Boueri BF et al. Flaxseed flour (*Linum usitatissimum*) consumption improves bone quality and decreases the adipocyte area of lactating rats in the post-weaning period. *Int J Food Sci Nutr*. 2016 Jan, 67(1):29-34.

Ribeiro DC, Pereira AD, da Silva PCA., dos Santos AS, Santana FC, Boueri BFC et al. Flaxseed flour (*Linum usitatissimum*) consumption improves bone quality and decreases the adipocyte area of lactating rats in the post-weaning period. *Int J Food Sci Nutr* 2015 Dec, 67(1): 29–34.

Roberfroid M. Functional food concept and its application to prebiotics. *Dig Liver Dis* 2002 Sep, 34(2):105-10.

Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. *Annu Rev Biomed Eng* 2006, 8:455-98.

Roy HJ, Lundy S, Eriksen C. Healthier lives through education in nutrition and preventive medicine. Flaxseed a review of health benefits. *Pennington Nutrition Series* 2007, (5)1-4.

Rubilar M, Gutiérrez C, Verdugo M, Shene C, Sineiro J. Flaxseed as a source of functional ingredients *J Soil Sci Plant Nutr* 2010 Jul; 10(3): 373-77.

Salles JP. Bone metabolism during pregnancy. *Ann Endocrinol* 2016 Apr, 77(2):163-8.

Santos ES, Silva DMF, Frota TC, Vasquez YRG. Uso de ácidos graxos poli-insaturados durante a gestação: Um estudo bibliográfico. *Revista Eletrônica Acervo Saúde* 2018 Dez, 11(1)e218.

Schilling AF, Filke S, Brink S, Korbmacher H, Amling M, Rueger JM. Osteoclasts and biomaterials. *Eur J Trauma* 2006 Mar, 1(2):107-13.

Schnatz PF, Barker KG, Marakovits KA, O’Sullivan DM. Effects of age at first pregnancy and breast-feeding on the development of postmenopausal osteoporosis. *Menopause* 2010 Mar, 17(6):1161–6.

Seeman E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. *The Lancet* 2002 May, 359(9320):1841–50.

Seguin RA, Aggarwal A, Vermeulen F, Drewnowski A. Consumption Frequency of Foods Away from Home Linked with Higher Body Mass Index and Lower Fruit and Vegetable Intake among Adults: A Cross-Sectional Study. *J Environ Public Health* 2016 Jan:1–12.

Skreden M, Bere E, Sagedal LR, Vistad I, Øverby NC. Changes in fruit and vegetable consumption habits from pre-pregnancy to early pregnancy among Norwegian women. *BMC Pregnancy Childb.* 2017, 17:107.

Soma-Pillay P, Nelson-Piercy C, Tolppanen H, Mebazaa A. Physiological changes in pregnancy. *Cardiov J Africa* 2016 Mar/Apr, 27(2):89-94

Sornay-Rendu E, Munoz F, Garnero P, Duboeuf F, Delmas PD. Identification of Osteopenic Women at High Risk of Fracture: The OFELY Study. *J Bone Min Res.* 2005, 20(10):1813–19.

Titus D, Samuel EJJ, S MR. Importance of Food Science and Technology- Way to Future. *Bioorganic Phase in Natural Food: An Overview.* 2018, 11–23.

Varela-López A, Ochoa JJ, Llamas-Elvira JM, López-Frías M, Planells E, Speranza L, Quiles JL. Loss of Bone Mineral Density Associated with Age in Male Rats Fed on Sunflower Oil Is Avoided by Virgin Olive Oil Intake or Coenzyme Q Supplementation. *Int J Mol Sci* 2017 Jun, 18(7).

Volp ACP, Alfenas RCG, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC, Bressan J. Índices dietéticos para avaliação da qualidade de dietas. *Rev Nutr* 2010 Mar/Abr, 23(2):281–96.

Walsh JS. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surgery (Oxford)* 2015 Jan, 33(1):1–6.

Woodrow JP, Sharpe CJ, Fudge NJ, Hoff AO, Gagel RF, Kovacs CS. Calcitonin Plays a Critical Role in Regulating Skeletal Mineral Metabolism during Lactation. *Endocrinol* 2006, 147(9):4010–21.

Wurm S, Augat P, Bühren V. Biomechanical Assessment of Locked Plating for the Fixation of Patella Fractures. *J Orthop Trauma* 2015 Sep, 29(9), e305–e8.




Xiao W, Wang Y, Pacios S, Li S, Graves DT. Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Front Oral Biol* 2016, 18:9–16.


Yumusakhuyly Y, Turgut ST, Icagasioglu A, Baklacioglu HS, Atlig RS, Murat S, Suer N. 2013. Bone mineral changes during pregnancy and lactation. *Gynecol Endocrinol* 2013 Jun, 29(8):763–66.

Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone* 2016 Jan, 82:42–9.

## 9 -ANEXO

### 9.1 Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

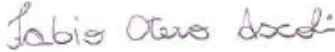




Serviço Público Federal  
Universidade Federal Fluminense  
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto n° 887, intitulado “Efeito do Tratamento com Semente de Linhaça (*Linum Usitatissimum*) Sobre a Adiposidade e a Estrutura Óssea de Ratos Wistar” sob a orientação da Profª Gilson Teles Boaventura da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 07 de dezembro de 2017. A quantidade total de animais aprovada pela CEUA para este projeto foi de 80 (oitenta) ratos e este certificado é válido por três anos após sua aprovação.

Niterói, 07 de dezembro de 2017.



---

Prof. Dr. Fabio Otero Ascoli  
Coordenador da CEUA