

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO**

DANIELLA DE MORAES MIZURINI

**INFLUÊNCIA DA FONTE LIPÍDICA DA DIETA DESDE O
PERÍODO PERINATAL ATÉ O ENVELHECIMENTO SOBRE A
SUSCETIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO DE ACIDENTES
TROMBOEMBÓLICOS - ESTUDO EM RATOS**

**RIO DE JANEIRO
2006**

DANIELLA DE MORAES MIZURINI

**INFLUÊNCIA DA FONTE LIPÍDICA DA DIETA DESDE O
PERÍODO PERINATAL ATÉ O ENVELHECIMENTO SOBRE A
SUSCETIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO DE ACIDENTES
TROMBOEMBÓLICOS - ESTUDO EM RATOS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Nutrição do
Instituto de Nutrição da Universidade Federal do
Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em
Nutrição.**

**Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Tavares do Carmo
Co-Orientador: Dr^a. Susana Ortiz Costa**

**Rio de Janeiro
2006**

Mizurini, Daniella de Moraes

Influência da fonte lipídica da dieta desde o período perinatal até o envelhecimento sobre a suscetibilidade ao desenvolvimento de acidentes tromboembólicos - Estudo em ratos/ Daniella de Moraes Mizurini, Rio de Janeiro: UFRJ/CCS, 2006. xvii, 109f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Nutrição, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2006.

Orientadores: Maria das Graças Tavares do Carmo e Susana Ortiz Costa

1. ácidos graxos 2. dieta 3. coagulação 4. plaquetas
5. trombose 6. ratos

DANIELLA DE MORAES MIZURINI

Influência da Fonte Lipídica da Dieta desde o Período Perinatal até o
Envelhecimento sobre a Suscetibilidade ao Desenvolvimento de Acidentes
Tromboembólicos Estudo em Ratos

Rio de Janeiro, de de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria das Graças Tavares do Carmo
Instituto de Nutrição/UFRJ
Presidente

Dra. Susana Ortiz Costa
Instituto de Nutrição/UFRJ
Co-orientador

Dra. Fátima Lucia de Carvalho Sardinha
Instituto de Nutrição/UFRJ
Revisor

Dra. Claudia Maria da Penha Oller do Nascimento
Departamento de Fisiologia/UNIFESP

Dr. Robson de Queiroz Monteiro
Instituto de Bioquímica Médica/UFRJ

Dra. Eliane Fialho de Oliveira
Instituto de Nutrição/UFRJ

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Prof. Dra. Maria das Graças Tavares do Carmo e Dra. Susana Ortiz Costa, durante o curso de Pós-Graduação em Nutrição, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**“Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina.”**

Cora Coralina

Dedicatória

Aos meus Pais, que souberam compreender e aceitar a minha escolha. E compartilharam comigo todas as vitórias e amarguras do caminho que escolhi seguir. Sou grata pela maior riqueza que vocês poderiam me dar: minha educação e formação.

Obrigada por acreditarem no meu êxito !

Agradecimentos

À minha orientadora Prof^a. Maria das Graças, pela confiança em mim depositada. Por permitir que eu fizesse parte da sua equipe, me incentivar constantemente e querer sempre o melhor pra mim. Espero ter correspondido às expectativas! Agradeço a oportunidade, o apoio, o incentivo e a amizade.

À Susana, que me permitiu ir além da relação aluno/orientador. Muito obrigada por ter me ajudado em todos os momentos, desde o auxílio nos experimentos às crises eventuais. Suas palavras nunca foram em vão... Você plantou uma semente!

À minha querida irmã, Ivana pelas várias noites que a obriguei a dormir de luz acesa, enquanto trabalhava no computador. Valeu pela paciência!

Aos meus avós, Yara e Antonio que sempre patrocinaram meus sonhos.

Aos meus tios Sonia e Lauro e a minha prima Adriana, que acreditaram desde o início no meu potencial e não me deixaram desistir no meio do caminho. Ao meu primo Alexandre por me socorrer inúmeras vezes em que meu computador tinha vontade própria. Não posso deixar de agradecer pelos documentos impressos (e não foram poucos!!!).

À querida amiga Amanda que me fez conhecer o mundo da pesquisa. Foram tantas as alegrias, conquistas e comemorações. Apesar de tudo, sobrevivemos e conseguimos chegar até aqui!

À Dra. Lucia Vianna pelo seu exemplo de amor a pesquisa. Obrigada por me mostrar que devo buscar sempre mais. Isto é só o começo!

Às amigas do Laboratório de Bioquímica Nutricional:

Ana Paula, obrigada pelos conselhos, pelas broncas e puxões de orelha, e principalmente pela disponibilidade em ouvir minhas lamentações. Você me fez enxergar a minha essência e me tornar uma pessoa melhor.

À Giselle, pelos momentos de descontração, risadas, as palavras de otimismo e pelo seu alto astral contagiante. É bom começar o dia com um abraço afetuoso.

À Daniella Duque pelos toques, companheirismo, confiança. Não sei como agradecer a disponibilidade e atenção em compartilhar minhas angústias. Obrigada por me fazer sorrir nos momentos mais difíceis.

À Ingrid, minha filha científica, pela ajuda nos experimentos e pela disponibilidade total e irrestrita. Você foi imprescindível na realização deste trabalho.

À Érika, pelo apoio, palavras de incentivo e pela sua preocupação comigo. Não posso esquecer das guloseimas, sempre bem vindas. Obrigada também pelas orações.

À Dilza, Monique, Luciana, Priscila e Marcele, pelos momentos agradáveis dentro e fora do laboratório.

Meninas, sem vocês todo este trajeto não teria tido a mesma graça.

A Prof^a Fátima Sardinha pelo apoio e atenção. Agradeço também pelas colocações sempre tão oportunas.

Ao Laboratório de Hemostase e Venenos do Instituto de Bioquímica da UFRJ, pela colaboração essencial na realização das análises. Em especial, ao Prof. Robson Monteiro, pela disponibilidade, atenção e paciência.

Aos funcionários do Instituto de Nutrição Josué de Castro pela cordialidade. Faço um agradecimento especial ao Sr. Jorge, pelo carinho e atenção.

Ao bioterista, “Seu Zezinho”, pela atenção e cuidado com meus ratinhos.

Aos ratos, não somente um objeto de estudo. Eterno agradecimento pela passividade.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

Sumário

Dedicatória	vi
Agradecimento	vii
Lista de tabelas	xi
Lista de figuras	xii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xiv
Resumo	xvi
Abstract	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 A Importância nutricional dos lipídeos	3
2.2 Ácidos Graxos: origem dietética e seus efeitos no organismo	5
2.3 Trombose	12
2.3.1 Parede vascular	13
2.3.2 Plaquetas	14
2.3.3 Coagulação sanguínea.....	17
2.3.4 Aterosclerose	19
2.4 Lipídeos dietéticos e Trombose.....	20
3 OBJETIVOS	26
4 METODOLOGIA.....	27
4.1 Animais e condições experimentais	27
4.2 Grupos experimentais	27
4.3 Formulação das rações.....	28
4.4 Avaliação do consumo alimentar e da massa corporal	30
4.5 Coleta de sangue	31
4.6 Perfil lipídico sanguíneo	32
4.6.1 Concentração de colesterol total	32
4.6.2 Concentração de HDL-colesterol	32
4.7 Ensaio de agregação plaquetária.....	33
4.8 Tempo de coagulação sanguínea	34
4.8.1 Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).....	34
4.8.2 Tempo de protrombina (TP)	35
4.9 Quantificação dos ácidos graxos nos lipídios totais das plaquetas e da ração	35

4.10 Trombose venosa.....	36
4.11 Análise estatística	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Consumo alimentar e massa corporal.....	38
5.2 Composição percentual de ácidos graxos das dietas experimentais	40
5.3 Composição percentual de ácidos graxos dos lipídeos totais das plaquetas .	42
5.4 Perfil lipídico sanguíneo	45
5.5 Tempo de coagulação sanguínea	47
5.6 Agregação plaquetária	51
5.7 Trombose venosa.....	53
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÕES	76
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

Lista de tabelas

- Tabela 1** - Composição das rações utilizadas para ratos machos após o desmame (g/100 g) (AIN-93 com modificações)..... 30
- Tabela 2** - Composição percentual média de ácidos graxos das dietas experimentais..... 41
- Tabela 3** - Valores percentuais de ácidos graxos dos lipídeos totais das plaquetas de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 dias 44
- Tabela 4** - Valores percentuais de ácidos graxos dos lipídeos totais das plaquetas de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 180 dias 45
- Tabela 5** - Concentrações de colesterol total e HDL-colesterol dos filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 e 180 dias de vida 47

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura de ácidos graxos saturados e insaturados.....	6
Figura 2. Isomeria <i>cis-trans</i> dos ácidos graxos	8
Figura 3. Formação do Trombo.....	13
Figura 4. Adesão plaquetária.....	14
Figura 5. Eventos que levam à formação do tampão plaquetário.....	16
Figura 6. Módulo esquemático representativo da Cascata de coagulação: vias extrínseca e intrínseca	19
Figura 7. Eicosanóides derivados dos ácidos graxos das séries n-3 e n-6	22
Figura 8. Consumo alimentar (g de ração/100g massa corporal) de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas após a lactação até o 180º dia de vida	39
Figura 9. Evolução ponderal dos filhotes machos desde o nascimento até o 180º dia de vida pós-natal.....	39
Figura 10. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) (A) e Tempo de Protrombina (TP) (B) de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 e 180 dias de vida.....	38
Figura 11. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) (A) e Tempo de Protrombina (TP) (B) de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 e 180 dias de vida.....	39
Figura 12. Curva de Agregação Plaquetária e EC ₅₀ de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 (A e B) e 180 dias (C e D)	52

Figura 13. EC₅₀ Agregação Plaquetária de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 e 180 dias..... 53

Figura 14. Peso do Trombo Venoso de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 e 180 dias 54

Figura 15. Peso do Trombo Venoso de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 e 180 dias 54

Lista de abreviaturas e símbolos

AA	Ácido araquidônico
ADP	Adenosina difosfato
AG	Ácidos graxos
AGM	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AGPI-CL	Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa
AGS	Ácidos graxos saturados
CETP	Proteína transferidora de éster de colesterol
COX-1	Ciclooxigenase 1
DHA	Ácido docosahexaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FT	Fator tecidual
FVa	Fator V ativado
FVIIa	Fator VII ativado
FIXa	Fator IX ativado
Fxa	Fator X ativado
Gplb	Glicoproteína Ib
Gplb/IX	Glicoproteína Ib/IX
GpIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade
HETEs	Ácidos hidroxieicosatetraenóico
HPETEs	Ácidos hidroperoxieicosatetraenóico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
Lp(a)	Lipoproteína a
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTs	Leucotrienos
LXs	Lipoxinas
n-3	Omega 3
n-6	Omega 6
NO	Óxido nítrico

OMS	Organização Mundial de Saúde
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGA ₂	Prostaglandina A ₂
PGE ₁	Prostaglandina E ₁
PGF _{2a}	Prostaglandina F _{2a}
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PGI ₃	Prostaglandina I ₃
PGs	Prostaglandinas
PL	Fosfolipídeos
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
TG	Triacilgliceróis
TP	Tempo de protrombina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
TXA ₃	Tromboxano A ₃
TXs	Tromboxanos
VICAM-1	Molécula de adesão vascular 1
VLDL-c	Lipoproteína de muito baixa densidade
vWF	Fator de von Willebrand

Resumo

Objetivos: Tem sido demonstrado que o tipo de lipídeo da dieta afeta significativamente a trombogenicidade. No presente estudo avaliamos os efeitos da ingestão de diferentes lipídios dietéticos desde o período da lactação até as fases jovem e de envelhecimento, na coagulação sanguínea, agregação plaquetária e formação de trombos venosos de ratos machos. **Métodos:** Ratas Wistar receberam dietas isocalóricas e normolipídicas confeccionadas conforme as recomendações do AIN-93 durante a lactação e que continuou a ser dada aos filhotes (n=8/grupo) após o desmame até o 45° e 180° dia de vida pós-natal. Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais de acordo com a fonte lipídica dietética: Óleo de Soja (GS), Óleo de Palma (GPA), Gordura Vegetal parcialmente Hidrogenada (GVPH), Óleo de Canola (GC) e Óleo de Peixe (GPX). Nos filhotes machos, aos 45 ou 180 dias de idade, avaliamos: ingestão alimentar, massa corporal, concentração sérica de colesterol total e HDL-colesterol, composição percentual de ácidos graxos dos lipídeos totais das plaquetas, tempo de coagulação sanguínea (TTPa e TP), agregação plaquetária e formação de trombo venoso. **Resultados:** Aos 45 dias observamos: a) menor incorporação de AA e maior incorporação de EPA nos lipídeos totais das plaquetas dos animais do grupo peixe; b) incorporação de ácidos graxos *trans* nas plaquetas dos animais do grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, refletindo o perfil de ácidos graxos da dieta; c) valores reduzidos de colesterol total e HDL no grupo peixe; d) os animais dos grupos canola e peixe apresentaram encurtamento do tempo de protrombina em relação aos animais dos outros grupos; e) os animais dos grupos palma e gordura vegetal hidrogenada apresentaram menor sensibilidade ao ADP, indicando menor agregação plaquetária; f) não houve diferença no peso do trombo venoso entre os grupos. Aos 180 dias: a) os animais do grupo peixe apresentaram valores séricos de colesterol total reduzidos, enquanto o grupo canola apresentou maior concentração de HDL-c comparado aos grupos palma, gordura vegetal parcialmente hidrogenada e peixe; b) maior incorporação de EPA nos lipídeos totais das plaquetas dos animais do grupo peixe; c) menor incorporação de AA nos grupos canola e peixe, entretanto o grupo canola foi o que apresentou razão AA/EPA mais elevada e incorporação de ácidos graxos *trans* nos lipídeos totais das plaquetas dos animais do grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada, refletindo o perfil de ácidos graxos da dieta; d) o grupo gordura vegetal hidrogenada promoveu, nas plaquetas dos animais, maior sensibilidade ao ADP, sugerindo maior agregação plaquetária, comparado ao grupo soja; e) os animais dos grupos palma e canola apresentaram tempo tromboplastina parcial ativada, mais prolongado, sugerindo maior coagulabilidade, comparado aos animais dos grupos soja, gordura vegetal hidrogenada e peixe; f) o grupo canola apresentou peso de trombo venoso maior em comparação aos demais grupos. **Conclusões:** o consumo de gordura hidrogenada, rica em ácidos graxos *trans*, exerceu efeito anti hemostático no início da vida, entretanto seu consumo a longo prazo promove alterações que implicam na propensão à eventos tromboembólicos. A ingestão de óleo de peixe e canola embora predisponha a uma hipercoagulabilidade na fase jovem, o prolongado consumo desses óleos promove o prolongamento do tempo de coagulação sanguínea. O consumo de dietas à base de óleo de canola na fase de envelhecimento predispõe a formação de eventos trombóticos.

Abstract

Objective: It has been demonstrated that the dietary fat type significantly affects the thrombosis tendency. In the present study we evaluated the effects of different dietary lipids intake, from lactation to the early and old ages, on blood coagulation, platelet aggregation, and venous thrombosis of male rats. **Methods:** Female rats Wistar were fed isoenergetic and normolipidic diets complying with the AIN-93 recommendations during lactation. After weaning, the male pups (8 per group) received its respective diets until 45th or 180th day of life. The animals were divided in five experimental groups according to the dietary fat source: Soy Oil (GS), Palm Oil (GPA), Hydrogenated Soy Oil (GVPH), Canola Oil (GC), and Fish Oil (GPX). In the male rats, at the 45th or 180th days of age, we evaluated food intake, body weight, total cholesterol and HDL-cholesterol levels, platelet fatty acid composition, blood coagulation time (TTPa and TP), platelet aggregation, and venous thrombus formation. **Results:** At 45 days we observed: a) platelet lipids of rats from fish oil group contained less AA and higher EPA than those of other groups; b) trans fatty acids were detected only in the platelets of hydrogenated soy oil group, reflecting the dietary fatty acid composition; c) the fish oil group had lower total cholesterol and HDL levels; d) prothrombin time of canola oil and fish oil groups were shorter than that of the other groups; e) the animals of palm and hydrogenated soy oil groups showed lower sensitivity to ADP, indicating lower platelet aggregation; f) there was not difference in the venous thrombus weight among the groups. At 180 days: a) levels of total cholesterol were lower in the fish oil group, while canola oil group showed higher levels of HDL-c compared to the palm oil, hydrogenated soy oil and fish oil groups; b) platelet lipids of rats from fish oil group contained higher EPA than those of other groups; c) lesser incorporation of AA in the canola oil and fish oil groups, however the canola oil group showed higher AA/EPA ratio and trans fatty acids were detected only in the platelets of hydrogenated soy oil group, reflecting the dietary fatty acid composition; d) the hydrogenated soy oil group showed, in the platelets, higher sensitivity to ADP, suggesting higher platelet aggregation compared to the soy oil group; e) the activated partial thromboplastin time of palm oil and canola oil groups was longer than that of the soy oil, hydrogenated soy oil and fish oil groups, suggesting hypercoagulant ability; f) there was a higher venous thrombus weight in canola oil fed rats relative to those fed other diets. **Conclusions:** hydrogenated soy oil intake, rich in trans fatty acids, showed anti-hemostatic effect in the early life, however its long-term intake seems to promote adversely effects on hemostasis, possibly leading to higher thrombosis propensity. Although fish oil and canola oil intake leads to higher blood coagulability in the young age, the long-term intake of these oils leads to a elongated time of blood coagulation. Diets containing canola oil predisposes venous thrombosis in later life.

1 INTRODUÇÃO

O consumo de lipídeos, pela população mundial, vem aumentando significativamente nas últimas décadas. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) refere que, em várias regiões do Brasil, o consumo de lipídeo ultrapassa a quantidade recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (IBGE, 2004; WHO, 2003).

A influência do consumo excessivo de lipídeos sobre o desenvolvimento de doenças cardiovasculares tem merecido intensa investigação científica, particularmente a hipótese de que a composição lipídica da dieta poderia alterar a função de células e fatores envolvidos na hemostase (Hornstra, 2001), predispondo os indivíduos para o aparecimento de enfermidades relacionadas com a formação excessiva de trombos.

A formação de trombos pode resultar na oclusão de vasos sanguíneos e no desenvolvimento de doenças de grande importância clínica e econômica como o infarto do miocárdio, derrame, gangrena de extremidades, trombose venosa e embolia pulmonar. Em conjunto, estas doenças são a principal causa de morte não-natural nos países ocidentais (Heinrich et al, 1994).

Alterações da hemostase, incluindo a atividade dos fatores da coagulação e das plaquetas, da parede arterial e do perfil lipídico sanguíneo estão inseridas no conjunto de evidências que mostra uma associação positiva entre composição lipídica da dieta e desenvolvimento de eventos trombóticos.

Assim, tem sido demonstrado que os ácidos graxos podem apresentar propriedades trombogênicas ou antitrombogênicas. Vários estudos têm sugerido que os ácidos graxos saturados são aterogênicos e favorecem a agregação plaquetária

(Chait et al, 1992; Spady, 1999), enquanto os ácidos graxos poliinsaturados reduzem a atividade das plaquetas e a capacidade trombogênica da parede arterial (Renaud, 1990). Além disso, tem sido demonstrado que a composição dos fosfolipídeos das plaquetas pode ser modificada pelos ácidos graxos da dieta tanto em roedores (Nordoy et al, 1985) e humanos (Tremoli et al, 1995), alterando, portanto, a atividade dessas células. Há relatos na literatura que o consumo de dietas ricas em lipídeos promove aumento da atividade dos fatores da coagulação sanguínea (Hornstra, 2001).

Da mesma forma, tem se demonstrado a importante participação dos eicosanóides no processo de formação do trombo. Refere-se ainda que os eicosanóides originados a partir de ácidos graxos poliinsaturados n-6 possuem atividade pró-inflamatória e pró-trombótica.

Há evidências de que a nutrição pós-natal (Moura et al, 2002), pode influenciar o adulto a um risco para doenças crônicas, sugerindo que a nutrição nas etapas iniciais da vida tem um efeito marcante sobre a saúde na maturidade. Neste sentido a adequada oferta de ácidos graxos poliinsaturados essenciais durante a vida pós-natal pode constituir aspecto nutricional de relevância para a saúde futura (Dutta-Roy, 1997).

Embora tem sido proposta uma associação entre a quantidade dos lipídios ingeridos e a extensão das alterações tromboembólicas, há consenso acerca da necessidade de maior e melhor compreensão dos processos celulares e moleculares, através dos quais o lipídeo da dieta influencia o desenvolvimento de trombos em diferentes fase da vida.

2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 A importância nutricional dos lipídeos

Os lipídeos são macronutrientes que desempenham funções energéticas, estruturais e hormonais no organismo. Compondo membranas celulares, influenciam a função dessas membranas. Como compostos precursores de eicosanóides, regulam o processo de coagulação sanguínea, pressão arterial e função imunológica assim como também são precursores de hormônios essenciais para a função reprodutiva (como por exemplo, o estrogênio e a progesterona) e saúde óssea (como por exemplo, o calcitriol). Constituem ainda veículos para as vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) além de substrato energético (Mattes, 2005). Lipídeos, adicionalmente, conferem sabor aos alimentos e sensação de saciedade, compõem os estoques de gordura corporal (tecido adiposo) e são fontes de ácidos graxos essenciais (Calder, 1996), como o ácido linoléico, o ácido alfa-linolênico e, incluído mais recentemente, o ácido docosahexaenóico (DHA) (Galli, 1994).

A maior parte das gorduras é ingerida na forma de triacilgliceróis (TG) e de fosfolipídeos. Os triacilgliceróis, também chamados gorduras neutras, são os lipídeos mais simples e abundantes representando os principais componentes de armazenamento ou depósito de gordura nas células de plantas e animais (Connor, 1996).

Há evidências de que os lipídeos podem modular a funcionalidade do sistema endócrino (Borkman et al, 1993; Stein et al, 1997). Alguns estudos têm demonstrado que os lipídeos ativam ou inibem enzimas pela interação entre moléculas e podem regular a expressão gênica de várias proteínas relacionadas ou não com o seu próprio metabolismo (Otton et al, 1998).

Se por um lado, os lipídeos são elementos fundamentais na dieta, o risco derivado do consumo excessivo destes, especialmente de gorduras saturadas, está bem estabelecido e detalhadamente descrito em numerosas publicações (Kinsella, 1987; Galli, 1994; Pan e Ciang, 1995; Lichtenstein et al, 1998). O aumento do risco de desenvolvimento de enfermidades cardio-cérebro-vasculares, obesidade e o desenvolvimento de certos tipos de câncer (mamário, uterino, prostático e de colón) é também outro fato bem documentado (Enig et al, 1978; Weisburger, 1991; Vessby, 2000).

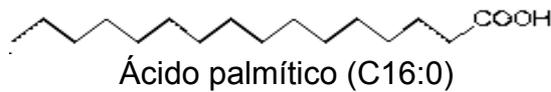
Em países desenvolvidos o consumo de lipídeos vem aumentando na última década (Connor, 1996; Valenzuela, 1997). Indica-se que cerca de 30% do total das quilocalorias ingeridas diariamente sejam provenientes dos lipídeos, segundo recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS). Entretanto, em muitos países, principalmente entre os de maior grau de desenvolvimento sócio-econômico, esta percentagem alcança cerca de 40% (Estados Unidos e alguns países europeus) (Connor, 1996). Em levantamento realizado no Brasil, a partir de dados de ingestão de macronutrientes no período dos últimos 30 anos, constatou-se um aumento significativo do consumo de gorduras em várias regiões do Brasil, chegando a ultrapassar o limite máximo recomendado pela OMS, em detrimento do consumo de carboidratos. Além disso, foi verificado que o consumo de lipídeos apresenta relação positiva com a renda familiar mensal *per capita*, especialmente o de gordura saturada (IBGE, 2004).

2.2 Ácidos Graxos: origem dietética e seus efeitos no organismo

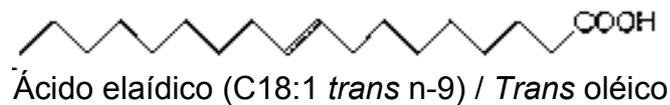
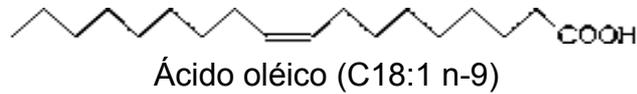
Os ácidos graxos são compostos formados por uma cadeia de carbonos e um grupo carboxila terminal. Os mais comuns apresentam entre 12 e 22 átomos de carbono (Turatti et al, 2002). Os ácidos graxos são geralmente representados por símbolos numéricos. Considerando como exemplo o ácido linoléico (C18:2 n-6), o número justaposto ao C indica o número de átomos de carbono, o segundo número, após dois pontos, o número de duplas ligações e o número após o “n” expressa a posição da última dupla ligação a partir do grupamento metil terminal (Siddiqui et al, 2004).

Os ácidos graxos podem ser classificados de acordo com a presença ou não de duplas ligações na cadeia carbônica (insaturações) em: saturados, quando não possuem insaturação na molécula; monoinsaturados, quando apresentam uma insaturação e poliinsaturados, quando possuem mais de uma insaturação na molécula, conforme representado na Figura 1 (Graziola et al, 2002). Estes últimos podem ser ainda classificados em n-3 e n-6, de acordo com a localização da última dupla ligação em relação ao seu grupamento metil terminal (Siddiqui et al, 2004).

SATURADOS



MONOINSATURADOS



POLIINSATURADOS

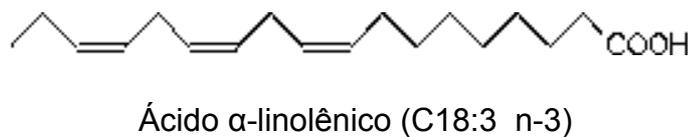
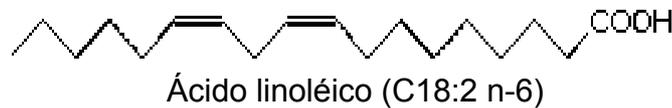


Figura 1. Estrutura de ácidos graxos saturados e insaturados.

A principal origem dietética de ácidos graxos saturados é a fonte alimentar de origem animal, essencialmente a carne vermelha, ovos, leite e seus derivados. Alguns óleos vegetais, de países tropicais, como o óleo de coco e o óleo de palma também possuem elevado conteúdo de ácidos graxos saturados. Os ácidos graxos monoinsaturados são encontrados no azeite de oliva, óleo de canola e em menor concentração no óleo de amendoim. Os ácidos graxos poliinsaturados da família n-6 são encontrados em muitos óleos vegetais comumente consumidos pela população, tais como, óleo de milho, soja e girassol. Já os ácidos graxos poliinsaturados da família n-3 estão em menor percentual nos óleos vegetais, sendo fonte destes ácidos graxos óleos extraídos da soja, nozes e linhaça (Weissberg, 1999). Outros

representantes da família n-3, C20:5 n-3 (ácido eicosapentaenóico) e C22:6 n-3 (ácido docosahexaenóico), são essencialmente encontrados em peixes de água salgada (Galli, 1994).

Um dos procedimentos tecnológicos mais utilizados no processamento dos óleos e azeites é a hidrogenação catalítica, que permite obter formas sólidas e semi-sólidas dos óleos vegetais, facilitando seu manejo e principalmente sua estabilidade (Dutton, 1978). O produto resultante é menos suscetível à oxidação e em alimentos substitui melhor a gordura animal que tende a ser mais sólida à temperatura ambiente (Lichtenstein, 1995). A hidrogenação dos óleos é um processo amplamente utilizado para obtenção de margarinas e manteigas para consumo doméstico e industrial (Pedersen, 1994). Durante este processo, os ácidos graxos insaturados, presentes nos triacilgliceróis que compõem os óleos, são hidrogenados em diferentes graus, dependendo da intensidade do processo (Smidovnick et al, 1993). Quando a hidrogenação é somente parcial, são obtidos produtos de menor ponto de fusão, semi-sólidos, com algum grau de insaturação, contudo, também contêm um percentual de ácidos graxos com isomeria posicional e geométrica diferente do produto original (Young, 1986).

Os ácidos graxos na natureza apresentam, em sua maioria, somente a isomeria tipo *cis* (Sommerfeld, 1983). Durante a hidrogenação, as duplas ligações dos ácidos graxos que formam os triacilgliceróis, mudam sua posição espacial adquirindo uma isomeria geométrica *trans*, em que os dois átomos de hidrogênio da dupla ligação encontram-se em lados opostos da molécula de ácido graxo (Figura 2). Este processo imprime ao ácido graxo maior estabilidade estrutural.

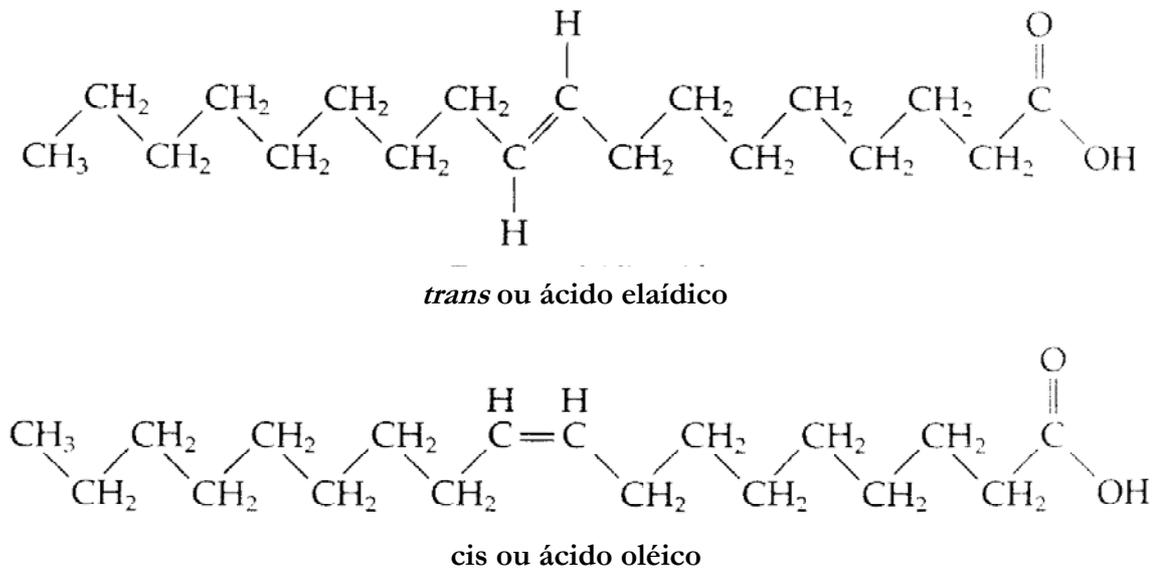


Figura 2. Isomeria *cis-trans* dos ácidos graxos.

Apesar dos ácidos graxos com isomeria *cis* serem os mais comuns na natureza, em nossa alimentação habitual, consumimos uma certa quantidade de ácidos graxos *trans* provenientes dos produtos lácteos e seus derivados (Wonsil et al, 1994) bem como das carnes dos animais ruminantes (Beare-Rogers, 1988). Entretanto, a maior fonte de ácidos graxos *trans* na alimentação humana é proveniente do consumo de gordura hidrogenada. Este tipo de gordura possui uma menor suscetibilidade à oxidação do que o óleo em sua forma natural e é considerada a melhor substituta da gordura animal em certos produtos alimentícios, pois tende a ser mais sólida à temperatura ambiente. Ácidos graxos *trans* também são encontrados em gorduras para frituras, normalmente utilizadas em restaurantes, alimentos assados tais como biscoitos (cookies), tortas, bolachas e “corn chips”, sendo umas das principais fontes de ingestão, os produtos do tipo “fast food”.

Muller et al (2001) sugeriram a substituição dos óleos hidrogenados pelo óleo de palma nos produtos alimentícios. Segundo estes autores, o óleo de palma, ao

contrário do óleo de soja ou de outro óleo vegetal insaturado, não necessita de hidrogenação para atingir a consistência semelhante à da margarina. Isto se dá pelo fato deste possuir característica semi-sólida à temperatura ambiente, conferida pela presença de grande quantidade do ácido graxo saturado palmítico.

De acordo com Mattson et al (1975) os ácidos graxos *trans* estão relacionados com algumas alterações metabólicas que resultam na fragilidade dos eritrócitos, no aumento do tamanho das mitocôndrias e na alteração dos cardiomiócitos, as quais foram observadas em ensaios biológicos com animais que consumiam dietas contendo ácidos graxos *trans*. Essas alterações, possivelmente, são devidas à modulação das características físico-químicas da membrana celular, induzidas pela presença destes ácidos graxos.

É sabido que as propriedades físico-químicas das membranas são fortemente determinadas pela natureza dos ácidos graxos incorporados na bicamada lipídica, os quais, por sua vez podem influenciar diversas funções celulares, incluindo a responsividade hormonal (Vessby, 2000). Estudos com culturas de células demonstraram que o aumento do conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas das células ocasionou aumento da sua fluidez (Yorek et al, 1989; Field et al, 1988).

Alguns estudos mostram ainda os efeitos dos isômeros *trans* no metabolismo lipoprotéico, apontando que seu consumo elevado aumenta a concentração plasmática da LDL-c (*Low Density Lipoprotein-Cholesterol*), de maneira similar aos ácidos graxos saturados (Mesink e Katan, 1990) e diminuem a concentração plasmática de HDL-c (*High Density Lipoprotein-Cholesterol*) (Troisi et al, 1992). Desta maneira, parece que os efeitos dos ácidos graxos *trans* no perfil das

lipoproteínas plasmáticas são mais desfavoráveis que aqueles produzidos pelos ácidos graxos saturados.

Há evidências de que os ácidos graxos *trans* interferem no metabolismo dos ácidos graxos essenciais, produzindo uma diminuição na conversão destes aos seus respectivos eicosanóides (Rosenthal e Doloresco, 1984). As enzimas envolvidas nestas reações são fortemente inibidas pelos isômeros *trans* do ácido linoléico (Rosenthal e Doloresco, 1984) e pelo ácido elaídico (isômero *trans* do oléico) (Koletzko et al, 1989).

A partir da década de 1980, alguns estudos vêm mostrando um efeito indesejável proveniente do consumo excessivo de gordura poliinsaturada. Illingworth et al (1984), analisaram o efeito de ácidos graxos poliinsaturados n-3 dietéticos e observaram que este tipo de gordura diminui a síntese de lipoproteínas e, conseqüentemente, a produção hepática de VLDL-c (*Very Low Density Lipoprotein-Cholesterol*).

Há evidências de que os ácidos graxos saturados de origem animal apresentam-se como fatores dietéticos de risco para o desenvolvimento de doença coronariana aterosclerótica. De outro modo, os ácidos graxos monoinsaturados (AGM), particularmente o ácido oléico, têm mostrado efeito protetor (Katan, 2000). Dietas ricas em AGM reduzem, em indivíduos normolipêmicos, as concentrações plasmáticas de LDL-c, LDL-c oxidada e a proliferação de células musculares lisas (Moretti, 1999). Além disso, a substituição da gordura saturada por monoinsaturada (oléico) na dieta, promove redução nos teores de colesterol total e LDL-c, sem alterar significativamente as concentrações de HDL-c, o que pode ser explicado pelo aumento da atividade dos receptores da LDL-c (Stipanuk, 2000).

Devido, portanto, à capacidade de modificar o padrão de lipoproteínas circulantes, principalmente pela redução de LDL-c, além da capacidade de suprimir a resposta inflamatória local, os AGM apresentam grande potencial antiaterogênico e parecem explicar, em parte, os efeitos benéficos das dietas mediterrâneas, que têm como base alimentar peixes, grãos, oleaginosas e azeite de oliva, sobre a colesterolemia e risco de doença coronariana obstrutiva.

A comparação dos efeitos do óleo de palma, óleo de soja parcialmente hidrogenado e ácido graxo poliinsaturado, sobre os lipídeos séricos, permitem a indicação do óleo de palma como razoável substituto do óleo de soja na confecção de margarina, pelo fato de que por não requerer hidrogenação para atingir consistência semi-sólida, não haveria formação dos ácidos graxos *trans* (Muller et al, 2001) e seus conseqüentes efeitos maléficos descritos anteriormente. Além disso, o óleo de palma também é rico em vitaminas A, E e β -caroteno (Kato et al, 1985; Chong e Ng, 1991), substâncias que têm uma potente ação antioxidante e propriedades “varredoras” de radicais livres. Estas funções protegem as membranas celulares contra o estresse oxidativo e risco carcinogênico potencial (Manorama et al 1993). Neste sentido, Nesaretem et al (1993) demonstraram que o consumo prolongado de óleo de palma através da dieta fornecida à ratos resultou em efeito protetor contra danos oxidativos, possivelmente decorrente da maior concentração de antioxidantes neste óleo, tal como os tocotrienóis. De outro modo, também são conhecidas substâncias tóxicas, presentes no óleo de palma, potencialmente capazes de promover prejuízos ao fígado (Isong et al, 1997; Osim et al, 1999). Assim, permanecem controversos os efeitos do óleo de palma sobre a saúde.

2.3 Trombose

A trombose é definida como a formação patológica de um coágulo dentro de um vaso sanguíneo, principalmente artérias ou veias. Dentre as doenças cardiovasculares, aquelas enfermidades relacionadas com a formação excessiva de trombos ocupam um importante lugar entre as causas de mortalidade e morbidade nos países ocidentais.

A trombose venosa é uma condição patológica que manifesta-se em períodos pós-traumáticos e pós-operatórios como um depósito de fibrina e hemácias em regiões de estase (Andriamanpandry et al, 1999). Classicamente, as três causas da trombose venosa são a estase sanguínea, danos na parede vascular e alterações na composição sanguínea, como no número de leucócitos e plaquetas circulantes.

A trombose arterial é uma doença que afeta grande parte da população de países industrializados, sendo uma conseqüência freqüente da aterosclerose (Andriamanpandry et al, 1999). A sua principal causa está associada a ruptura de uma placa aterosclerótica que lesa a parede do vaso e promove a exposição das fibras de colágeno subendoteliais. A ruptura desta placa dispara uma série de eventos, mediados por plaquetas, no sítio da injúria. Assim, a trombose arterial é uma das manifestações agudas da aterosclerose, representando a principal causa de síndromes coronarianas agudas (angina instável, infarto do miocárdio e morte súbita) (Viles-Gonzalez e Badimon, 2004).

2.3.1 Parede vascular

O endotélio normal possui uma superfície anti-hemostática. Os mecanismos responsáveis por esta resistência são decorrentes do isolamento que o endotélio confere às substâncias trombogênicas do subendotélio bem como da produção ativa de substâncias anticoagulantes por parte das células endoteliais. A lesão do endotélio provoca a exposição dessas substâncias trombogênicas, como o colágeno e fator de von Willebrand (vWF), que leva à adesão e ativação das plaquetas e ao desencadeamento do processo de coagulação (Figura 3), ocorrendo ainda perda da capacidade de produzir fatores que impedem a adesão plaquetária (prostaciclina e óxido nítrico), levando a formação do trombo (Praticò, 2005).

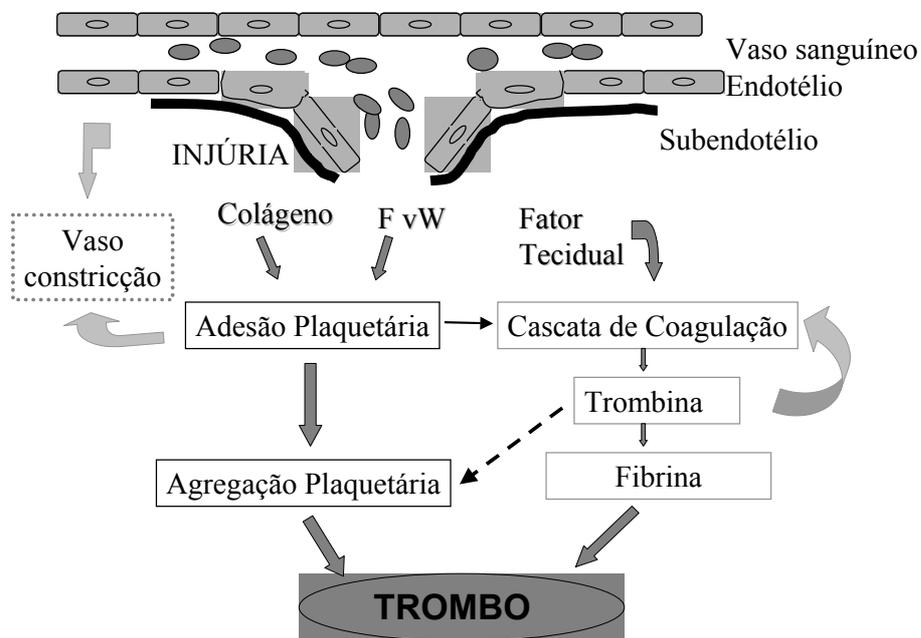


Figura 3. Formação do Trombo. A intensificação dos eventos referidos leva à formação de trombos, podendo resultar na oclusão de vasos sanguíneos e no desenvolvimento de doenças de grande importância.

2.3.2 Plaquetas

Nas regiões de lesão endotelial, as plaquetas aderem à matriz extracelular em decorrência, principalmente, da interação entre o fator de von Willebrand e o colágeno. Conforme representação esquemática na Figura 4, o vWF atua como uma ponte de aderência entre o colágeno e o receptor GpIb plaquetário, estabelecendo uma ligação transitória que diminui a velocidade das plaquetas facilitando desta forma sua ativação (De Marco et al, 1985).

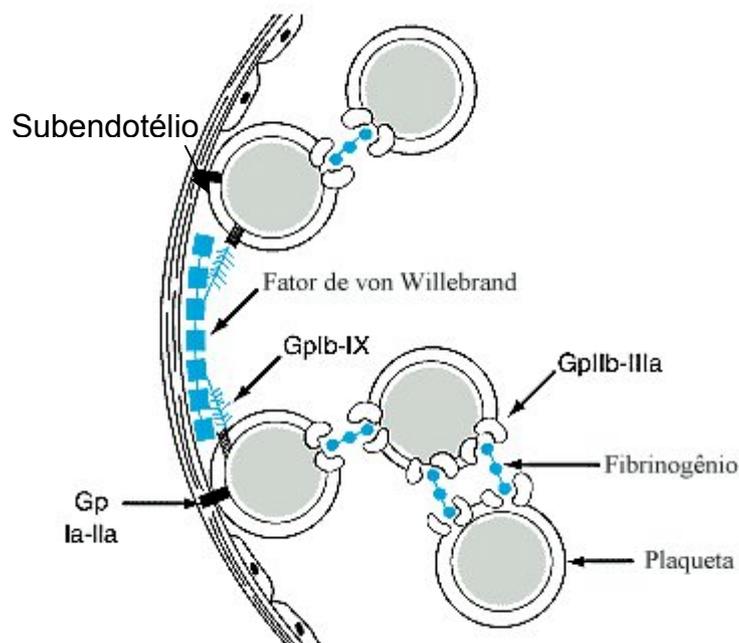


Figura 4. Adesão plaquetária. A adesão plaquetária ao sub-endotélio é facilitada pelo vWF , que forma uma ponte entre os receptores GpIb/IX das plaquetas e o colágeno sub-endotelial. A adesão entre as plaquetas é feita através dos receptores GpIIb/IIIa , intermediado pelo fibrinogênio.

A ativação plaquetária resulta em mudanças significativas em sua forma, produzindo pseudópodes alongados que as tornam extremamente adesivas, exposição e mudanças na conformação do receptor GIIb/IIIa na superfície das

mesmas. Esses receptores, então ativados, ligam-se ao fibrinogênio, formando-se pontes fibrinogênio-plaquetas ativadas. Além disso, as plaquetas passam a secretar uma série de substâncias de seus grânulos, como adenosina difosfato (ADP), serotonina, fibrinogênio, tromboxano A₂ e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), conforme representado na Figura 5. O ADP e a serotonina estimulam o recrutamento de plaquetas adicionais. O fibrinogênio é liberado dos grânulos alfa das plaquetas transformando-se numa fonte adicional dessa proteína, em locais de lesão endotelial. O tromboxano A₂ promove vasoconstrição e maior agregação plaquetária. O fator de crescimento derivado de plaquetas (platelet-derived growth factor – PDGF), tem potente efeito mitogênico nas células musculares lisas, contribuindo para a aterosclerose e reoclusão arterial, em locais de lesão repetitiva (Wagner e Burger, 2003; Praticò, 2005).

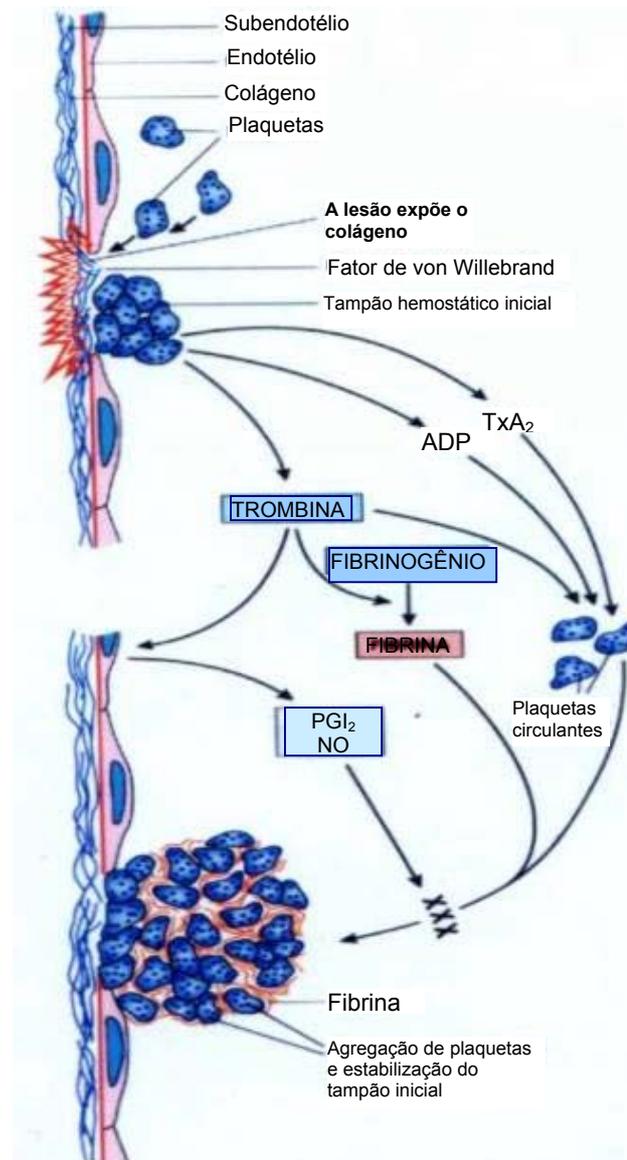


Figura 5. Eventos que levam à formação do tampão plaquetário.

As plaquetas ativadas ao rearranjar os seus lipídeos de membrana expõem determinados fosfolipídeos, em torno dos quais os fatores de coagulação podem se concentrar, acelerando a formação de trombina. A trombina ocupa uma posição central no processo de coagulação, ela é formada como resultado de uma cadeia de reações que ocorre principalmente na membrana de plaquetas e de fatores da coagulação ativados, e por sua vez promove a formação de fibrina a partir do fibrinogênio, que se une então ao tampão plaquetário a fim de torna-lo mais firme e estável (Wagner e Burger, 2003).

2.3.3 Coagulação sanguínea

A iniciação do processo de coagulação depende da exposição do sangue a componentes que, normalmente, não estão presentes no interior dos vasos, em decorrência de lesões estruturais (injúria vascular) ou alterações bioquímicas (por exemplo, liberação de citocinas) (Franco, 2001). A característica central da cascata da coagulação é a ativação seqüencial de proenzimas e substâncias precursoras inativas (zimogênios), em enzimas ativas, o que resulta em uma grande amplificação do processo. A cascata de reações enzimáticas que leva a formação de trombina pode ser ativada por duas vias: intrínseca ou extrínseca. Estas duas vias, representadas na Figura 6, se interrelacionam através de uma série de reações e convergem para uma via final comum. Esta divisão do sistema de coagulação é atualmente entendida como inadequada do ponto de vista fisiológico, tendo em vista que a divisão não ocorre *in vivo* (Franco, 2001). De qualquer modo, há evidências de que a via intrínseca é importante para a manutenção e crescimento do coágulo, enquanto que a via extrínseca é crucial para o início da sua formação (Davie et al, 1991).

A fase inicial da coagulação ocorre com a exposição do fator tecidual (FT) ao espaço intravascular. O fator tecidual é capaz de se ligar ao Fator VII e à sua forma ativada (FVIIa), que corresponde a aproximadamente 1% da concentração plasmática total de Fator VII em indivíduos normais, dando início à via extrínseca da cascata de coagulação (Franco, 2001; Viles-Gonzalez e Badimon, 2004). O complexo FT-FVIIa tem como substratos principais o fator IX e o fator X, cuja clivagem resulta na formação de FIXa e FXa, respectivamente. O Fator X ativado promove então a ativação do Fator V, formando o complexo FXa-FVa, também conhecido como “protrombinase”, que converte a protrombina em trombina (Miller,

2005). Todavia, uma vez que há gênese de trombina, essa enzima é capaz de ativar fatores da via intrínseca da coagulação. Todos os fatores integrantes da via intrínseca estão presentes no sangue circulante e a reação em cadeia pode ser desencadeada pelo contato com plaquetas ativadas, componentes do tecido subendotelial (como por exemplo o colágeno) e também pela trombina. A reação inicial envolve a ativação do Fator XII pelo contato, principalmente pelo colágeno exposto pela lesão endotelial. O Fator XII ativado atua enzimaticamente sobre o fator XI para ativá-lo. O Fator XIa, por sua vez, age enzimaticamente sobre o Fator IX para ativar este fator também. O FIXa forma então um complexo pró coagulante com o FVIIIa, que também recebe o nome de “tenase” intrínseca. Este complexo FIXa-FVIIIa promove a ativação do Fator X. O Fator X, uma vez ativado, se liga ao FVa originando o complexo protrombinase (FXa-FVa) que promove a clivagem da protrombina em trombina (Franco, 2001; Miller, 2005). Deste modo, o Fator X encontra-se na intercessão das então chamadas vias intrínseca e extrínseca. Uma pequena quantidade de fator VII ativado pode ativar muitas moléculas de Fator X, que por sua vez ativa um número ainda maior de moléculas de protrombina em trombina. A trombina promove a quebra do fibrinogênio formando uma molécula de monômero de fibrina que se polimeriza com outros monômeros de fibrina formando um coágulo frágil, que pode ser fragmentado com facilidade. Além disso, a formação de trombina também é capaz de ativar o Fator XIII em Fator XIIIa, responsável pela formação de ligações covalentes entre os monômeros de fibrina, estabilizando a rede de fibrina (Franco, 2001; Miller, 2005).

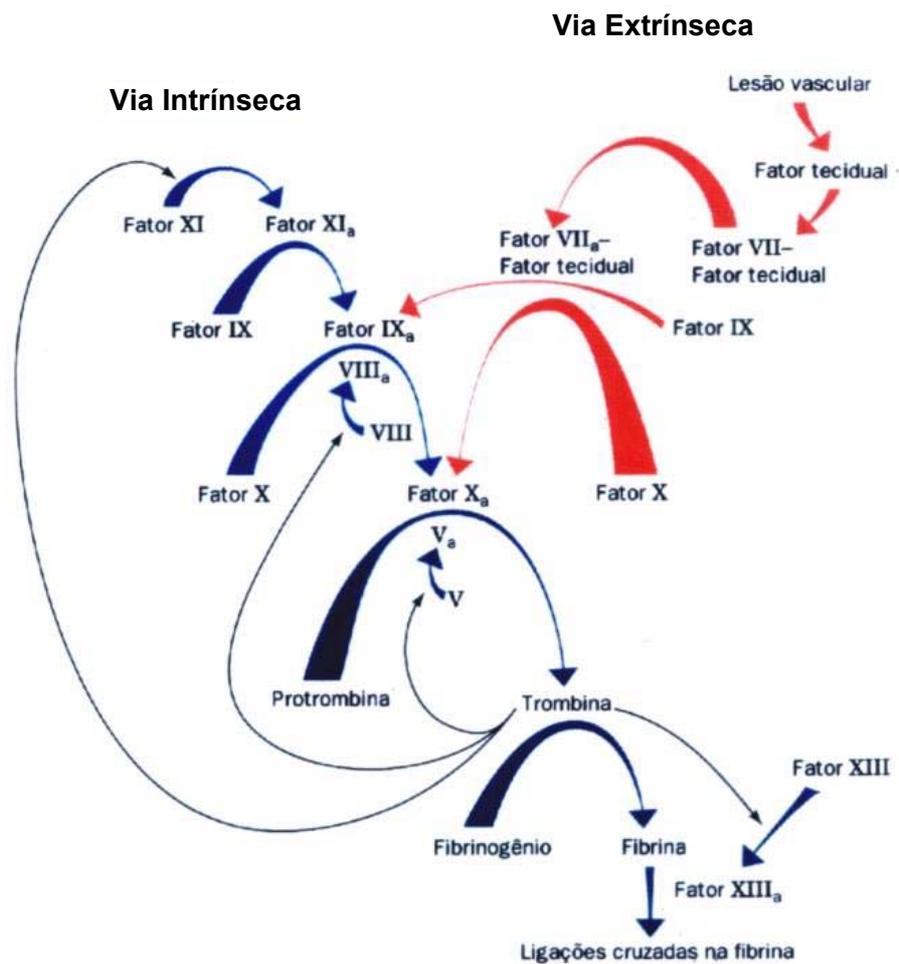


Figura 6. Módulo esquemático representativo da Cascata de coagulação: vias extrínseca e intrínseca. a = ativado.

2.3.4 Aterosclerose

Evidências experimentais sugerem que a aterosclerose constitui processo crônico e contínuo, caracterizado por resposta inflamatória em associação com a deposição subendotelial de lipídios na parede da artéria (Ross, 1993; Ross, 1999). Desta forma, a manifestação histológica inicial do processo aterosclerótico é a “estria gordurosa”, estando comumente presente já em artérias de crianças (Weissberg, 1999).

No processo de aterogênese, o aumento da concentração plasmática de LDL-colesterol promove o transporte acelerado desta lipoproteína para dentro da parede arterial (Szitányi et al, 2003). Isso acarreta, além de um excesso de colesterol no subendotélio, a oxidação das partículas de LDL-colesterol. As células endoteliais são então ativadas e passam a expressar selectinas e moléculas de adesão (ICAM-1 e VICAM-1) que atraem células inflamatórias e facilitam a sua migração para o interior do espaço subendotelial. Neste local, as células inflamatórias se diferenciam em macrófagos que fagocitam componentes lipídicos através de receptores “scavenger”, dando origem às células espumosas (Weissberg, 1999) que, por sua vez, lesam o endotélio por ação tóxica direta. Além disso, citocinas e fatores de crescimento, secretados pelos macrófagos, facilitam a migração e proliferação de células musculares lisas e síntese de componentes da matriz extracelular, formando uma capa fibrótica. Seja através da ação tóxica direta da LDL-colesterol oxidada ou pela ruptura da placa, o endotélio é lesionado, favorecendo a deposição e agregação de plaquetas e ativação da cascata de coagulação que, através dos processos descritos anteriormente, resulta na formação de trombo no sítio da lesão.

2.4 Lipídeos dietéticos e trombose

Vários estudos vêm demonstrando uma forte associação entre acidentes tromboembólicos e o tipo de lipídio dietético consumido (Hornstra e Kester, 1997; Andriamampandry et al, 1999; De La Cruz et al, 2000). Neste sentido, pesquisas realizadas em animais e humanos sugerem que os fatores envolvidos na gênese da trombose podem ser modulados pelo lipídio da dieta (Mahrabian et al, 1990; Miller, 1997; Tholstrup et al, 1994; Oosthuizen et al, 1994; Sanders et al, 2000).

Diferentes alterações na função plaquetária foram observadas a partir da modulação dos lipídeos dietéticos. Alguns estudos mostram que a agregação plaquetária está aumentada em situações de consumo de dietas ricas em gorduras saturadas (Grundy e Denke, 1990; Chait et al, 1992; Spady 1999). De outro modo, há indícios de redução da agregação plaquetária em animais alimentados com ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, principalmente os da série n-3 (Renaud, 1990; Pirich et al, 1999; De La Cruz et al, 2000). Adicionalmente, tem sido proposto que o tipo de lipídio da dieta altera a composição dos ácidos graxos constituintes dos fosfolipídeos das plaquetas, o que poderia ocasionar mudanças na função plaquetária (Turpeinen et al, 1998; Nieuwenhuys e Hornstra, 1998).

Os ácidos graxos essenciais linoléico e α -linolênico são muito importantes no processo de agregação plaquetária. Conforme já mencionado, nas células animais estes ácidos graxos, por ação de enzimas elongases e Δ -dessaturases, originam, respectivamente os ácidos araquidônico (AA), eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). Lipoxigenases e ciclooxigenases produzem eicosanóides a partir do AA e EPA, conforme representação na Figura 7 (Mantzioris et al, 1995).

A síntese das prostaglandinas (PGs), incluídas entre os eicosanóides produzidos, inicia-se com a hidrólise do AA e de outros ácidos graxos poliinsaturados com 20 átomos de carbono na posição sn-2 dos fosfolipídeos (Youdim et al, 2000). Durante a formação das PGs existe uma competição entre as duas diferentes classes de ácidos graxos poliinsaturados. O EPA e DHA competem com o AA pela ação da ciclooxigenase e da lipoxigenase para síntese de PGs e leucotrienos (LTs). O AA é o precursor de duas séries de prostanóides (PGA_2 , PGE_2 , PGF_{2a} , e tromboxano A_2) e dos leucotrienos da série 4 (LTB_4). O EPA fornece as PGs e TXs da série 3 e LTs da

série 5, estes são tipicamente, menos ativos que os seus produtos correspondentes do AA (Mantzioris et al, 1995; Teitebaum e Walker, 2001).

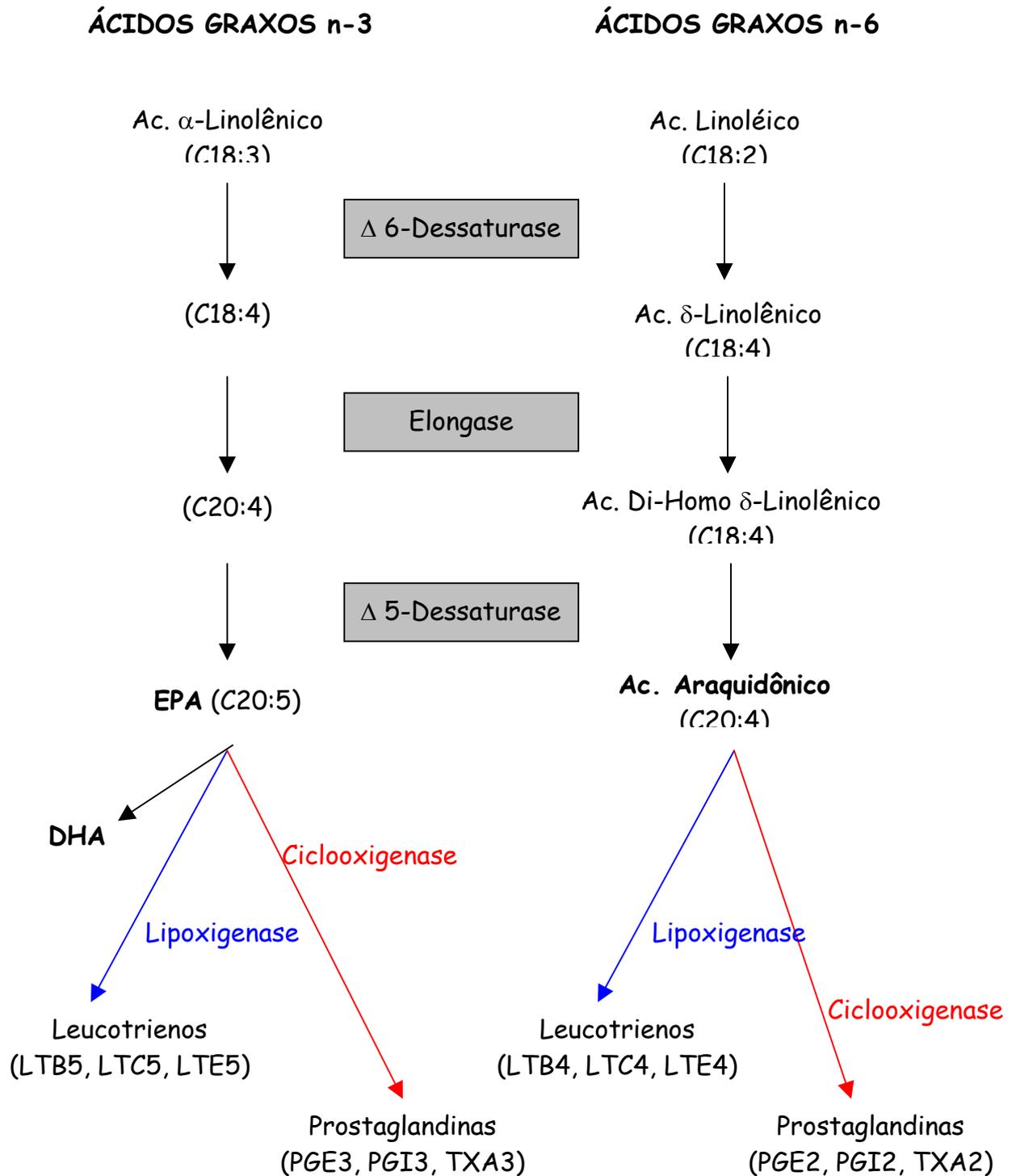


Figura 7. Eicosanóides derivados dos ácidos graxos das séries n-3 e n-6.

Os eicosanóides derivados do AA, como o TXA₂, são potentes agentes pró-inflamatórios e agregantes de plaquetas (Mantzioris et al, 1995). De outro modo, os TXA₃ são compostos que apresentam pequena atividade tanto na agregação plaquetária quanto na vasconstrição. Já a PGI₃, também derivada do EPA, apresenta elevada atividade vasodilatadora e inibidora da agregação plaquetária. Entre tantas evidências, sabe-se que o tipo e a quantidade de eicosanóides produzidos dependem do tipo de lipídio ingerido na dieta (Rose e Connolly, 1999; Youdim et al, 2000; Long e Orlando, 2000). Portanto, há evidências de que a manipulação lipídica das dietas tem efeito direto na composição dos lipídeos celulares, o que afeta a disponibilidade e o tipo de precursores de eicosanóides produzidos, alterando ainda a distribuição dos lipídeos plasmáticos e a composição da membrana plasmática de muitas células, incluindo as plaquetas (Hirai et al, 1980).

Em adição, estudos têm demonstrado que os isômeros *trans* de ácidos graxos afetam adversamente a homeostase dos eicosanóides. Através da inibição da $\Delta 6$ -dessaturase, enzima responsável pela dessaturação dos ácidos graxos linoléico e linolênico, os ácidos graxos *trans* reduzem a disponibilidade dos ácidos graxos precursores das prostaglandinas com atividade anti hemostática PG₁ e PG₃ (Mahfouz et al, 1980; Lawson et al, 1983; Kummerow et al, 2004; Stachowska et al, 2004).

Outro importante processo na formação do trombo, a coagulação sanguínea, também pode sofrer modificações em função do tipo e a quantidade de lipídio ingerido. Há relato de que os ácidos graxos afetam não somente a concentração dos fatores ativados da coagulação como também sua atividade coagulante (Tholstrup et al, 2003). Além de haver uma correlação entre ácidos graxos saturados,

monoinsaturados e poliinsaturados e o aumento pós-prandial da atividade coagulante do Fator VII e a concentração do Fator VII ativado, pesquisas têm demonstrado diferença na atividade do FVII de acordo com o tipo e a quantidade de ácidos graxos ingeridos (Larsen et al, 1997; Kelly et al, 2001; Smith et al, 2003). Leray et al (2001) observaram uma diminuição da atividade coagulante do complexo Fator VII-X após ingestão de dieta à base de óleo de peixe, com conseqüente aumento do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).

Uma relação bem estabelecida entre lipídeos e trombose é mediada pelas lipoproteínas. Segundo Shindo et al, *apud* Tousoulis et al (2002) teores elevados de LDL-c e talvez de lipoproteína a (Lp(a)) podem atrair monócitos que aderem ao endotélio induzindo a transformação dessas células em macrófagos que desestabilizam o tampão plaquetário e aumentam a expressão do fator tecidual. É sabido que, quando em elevadas concentrações, as partículas de LDL-c são transportadas do fluido intersticial para o espaço subendotelial, onde elas são oxidadas (Szitányi et al, 2003). A LDL-c oxidada induz a expressão do fator tecidual nos macrófagos e diminui a atividade anticoagulante do endotélio (Ross, 1993). Em estudo realizado por Malyszco et al (1994) foi demonstrada uma relação positiva entre LDL-c e agregação plaquetária e entre HDL-C e atividade fibrinolítica, sendo assim os autores concluíram que a LDL-c pode ser trombogênica, enquanto a HDL-c pode proteger contra o processo de trombose.

No presente trabalho temos como proposta estudar diversas fontes lipídicas usualmente consumidas pela população na coagulação sanguínea, agregação plaquetária e formação de trombos venosos. Utilizamos como fonte de AGPI n-6, o óleo de soja; como fonte de AGPI n-3 de cadeia longa, o óleo de peixe; como fonte de AGM, o óleo de canola; como fonte de AGS de origem vegetal (óleo de palma) e

uma fonte de ácidos graxos *trans* (gordura vegetal parcialmente hidrogenada). Estes lipídeos dietéticos foram selecionados porque eles são comumente usados na nutrição humana.

O modelo experimental proposto baseou-se no reconhecimento de que investigações anteriores demonstraram a influência de ácidos graxos dietéticos no desenvolvimento de acidentes trombóticos, seja por interferir nos processos de coagulação sanguínea e de ativação e agregação plaquetária, bem como na formação de trombos. Entretanto, a maioria das investigações foi realizada utilizando-se dietas hiperlipídicas, ácidos graxos isoladamente, e em muitos casos sem adequação dos ácidos graxos essenciais. Reconhecendo-se que estes modelos não refletem o consumo de lipídeos habitual da população, interessava-nos a utilização de um protocolo feito com as fontes lipídicas comerciais usualmente consumidas além do fornecimento adequado de ácidos graxos essenciais. A maioria dos estudos as dietas usadas são oferecidas aos animais adultos e sabendo-se que a composição do leite materno reflete o consumo dietético de lipídeos pela mãe e que a fase de desenvolvimento pós-natal é um período crítico, objetivamos introduzir estas diferentes fontes lipídicas durante a lactação e observarmos as respostas obtidas durante a fase de jovem e suas possíveis consequências na fase de envelhecimento.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito dos ácidos graxos dietéticos poliinsaturados da série n-6 (óleo de soja) e n-3 (óleo de peixe), monoinsaturados (óleo de canola), saturados (óleo de palma) e *trans* (gordura vegetal parcialmente hidrogenada), oferecidos desde o período da lactação e durante todo o período experimental, na predisposição de ratos machos jovens (45 dias de vida pós-natal) e em fase de envelhecimento à trombose (180 dias de vida pós-natal).

3.2 Específicos

Em ratos machos jovens e envelhecidos, que consumiram dietas com diferentes tipos de ácidos graxos, avaliar:

- a evolução da massa corporal;
- o consumo alimentar;
- as concentrações séricas de colesterol total e HDL-colesterol;
- o percentual relativo de ácidos graxos nos lipídeos totais das plaquetas, particularmente os ácidos graxos essenciais, araquidônico e EPA;
- o tempo de coagulação do plasma;
- a capacidade de agregação e ativação plaquetária;
- a incidência de trombose venosa.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais e condições experimentais

Ratos Wistar machos e fêmeas com 03 a 04 meses de idade foram mantidos no biotério do Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 por 12 horas) e temperatura ($24\pm 1^\circ\text{C}$) e com livre acesso à ração e água. O acasalamento foi realizado durante o período de 10 dias, na proporção de 3 fêmeas para 1 macho. Durante o período de gestação as mães receberam dieta comercial.

Após o nascimento, foram separados aleatoriamente 08 filhotes machos por ninhada para um melhor desempenho lactotrófico. As ratas lactantes foram separadas em cinco grupos experimentais mantidas em gaiolas individuais, recebendo ração manipulada, isocalórica e normolipídica, contendo diferentes fontes lipídicas. No 21º dia de vida, os animais de cada grupo foram separados da mãe, agrupados em gaiolas coletivas e receberam dieta manipulada contendo a mesma fonte lipídica que a dieta materna até a data dos experimentos.

4.2 Grupos experimentais

A partir do primeiro dia de lactação, os animais foram divididos em cinco grupos, segundo a dieta que receberiam durante toda a lactação e após desmame:

Grupo Óleo de Soja (GS): formado por animais que receberam dieta manipulada à base de caseína contendo 7% de óleo vegetal à base de soja (AGPI n-6 e n-3);

Grupo Óleo de Palma (GPA): formado por animais que receberam dieta manipulada à base de caseína contendo 5% de óleo de palma (rico em AGS palmítico) e 2% de óleo de soja;

Grupo Gordura Vegetal Parcialmente Hidrogenada (GVPH): formado por animais que receberam dieta manipulada à base de caseína contendo 6% de gordura parcialmente hidrogenada (rica em AGS e fonte de ácidos graxos *trans*) e 1% de óleo de soja;

Grupo Óleo de Canola (GC): formado por animais que receberam dieta manipulada à base de caseína contendo 6% de óleo de canola (rico em AGM) e 1% de óleo de soja;

Grupo Óleo de Peixe (GPX): formado por animais que receberam dieta manipulada à base de caseína contendo 6% de óleo de peixe (ROPUFA[®] '75' n-3 EE) (AGPICL n-3) e 1% de óleo de milho (AGPI n-6).

4.3 Formulação das rações

A preparação das rações foi realizada no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Instituto de Nutrição da UFRJ. A formulação, incluindo os percentuais de lipídios, que variaram de acordo com a proposta de composição dietética de cada grupo experimental, estão descritos na Tabela 1. Todos os ingredientes das rações foram homogeneizados em batedeira industrial e adicionados de água em quantidade suficiente para a aquisição de uma textura adequada para a formação dos “pellets”. Estes foram então, colocados em estufa com circulação de ar, à temperatura de 65°C por 24 horas. As rações prontas foram acondicionadas em recipientes plásticos sob refrigeração e oferecidos em porções diárias aos animais.

Todas as dietas foram confeccionadas de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (Reeves, 1993) com modificações. O óleo de soja adicionado às dietas dos grupos GPA, GVPH e GC permitiu adequar as necessidades dos ácidos graxos essenciais linoléico e α -linolênico às recomendações da AIN-93, enquanto a adição de óleo de milho à dieta do grupo GPX permitiu adequar as necessidades do ácido graxo essencial linoléico.

Tabela 1 - Composição das rações utilizadas para ratos machos após o desmame (g/100 g) (AIN-93 com modificações)

Ingredientes (g/100 g)	GS	GPA	GVPH	GC	GPX
Caseína	15	15	15	15	15
Amido	68,07	68,07	68,07	68,07	68,07
Óleo de soja	7	2	1	1	-
Óleo de Palma	-	5	-	-	-
Gor. Hidrogenada	-	-	6	-	-
Óleo de Canola	-	-	-	6	-
Óleo de peixe	-	-	-	-	6
Óleo de milho	-	-	-	-	1
BHT	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014
Mist. Vitaminas ^a	1	1	1	1	1
Mist. Minerais ^b	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Celulose	5	5	5	5	5
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
L-cistina	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18

^a Mistura de Vitaminas (g/kg dieta) incluem: tiamina HCl, 0,6; riboflavina, 0,6; piridoxina HCl 0,7; niacina, 3,0; pantotenato de cálcio, 1,60; ácido fólico, 0,20; biotina, 0,02; vitamina B12, 2,5; vitamina A-palmitato (500 IU/g) 0,80; vitamina E-acetato (500 IU/g) 2,5; vitamina D3, (400 IU/g) 0,25; vitamina K1, 0,75 (AIN-93M vitamin mix DYETS #310025, Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA).

^b Mistura de Minerais fornecem (g/kg): carbonato de cálcio, 357,0; fosfato de potássio monobásico, 250,0; citrato de potássio H₂O, 28,0; cloreto de sódio, 74,0; sulfato de potássio, 46,6; óxido de magnésio, 24,0; sulfato ferroso 7H₂O, 5,21; carbonato cúprico, 0,3; carbonato de manganês, 0,63; carbonato de zinco, 1,65; sulfato de cromo potássio 12 H₂O, 0,27; iodato de potássio, 0,01; selenato de sódio, 0,01; ácido bórico, 0,08; amônio paramolibdato, 0,01; sódio metassilicado 9H₂O, 1,45; carbonato de níquel, 0,03; cloreto de lítio, 0,02; vanádio amônio, 0,007 (AIN-93M mineral mix DYETS #210025, Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA).

GS (grupo soja), GPA (grupo palma), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada), GC (grupo canola), GPX (grupo peixe).

4.4 Avaliação do consumo alimentar e da massa corporal

O consumo de ração e a massa corporal das ratas lactantes foram registrados em dias alternados até o final do período de lactação.

Durante a lactação e até o término do período experimental, a massa corporal dos filhotes machos foi aferida individualmente a cada 7 dias. O controle do consumo de ração dos filhotes após o desmame foi realizado a cada dois dias, mantendo-se assim até o 45º ou 180º dia de vida dos animais.

Todas as medidas foram realizadas no período da tarde (13:00 às 15:00 horas), em balança eletrônica aferida e com capacidade para 1100 g.

4.5 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada através de punção cardíaca com os animais anestesiados após administração intramuscular de Ketamina (100 mg/kg PC) e Xilazina (16 mg/kg PC).

Para a realização do lipidograma, alíquotas de sangue foram coletadas, após jejum de 12 horas, sem anticoagulante e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente para obtenção do soro. Para o ensaio de coagulação sanguínea e agregação plaquetária as amostras de sangue foram coletadas com anticoagulante citrato de sódio 3,8 % (1:10, v/v) e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) e a 3000 rpm por 10 minutos para obtenção de plasma pobre em plaquetas (PPP), nesta ordem. Para a determinação do perfil de ácidos graxos das plaquetas, as alíquotas de sangue foram obtidas em seringas contendo EDTA 0,2 M (1:5, v/v) e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente para a obtenção do plasma rico em plaquetas.

4.6 Perfil lipídico sanguíneo

4.6.1 Concentração de colesterol total

O colesterol total foi determinado por método enzimático, através de “kit” comercial da marca Gold Analisa Diagnóstica Ltda (Belo Horizonte, MG), utilizando como padrão, colesterol em solução aquosa. Este método baseia-se na reação, catalisada pela colesterol esterase, de hidrólise dos ésteres de colesterol da amostra produzindo colesterol livre, o qual em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina produz um composto róseo-avermelhado detectado em espectrofotômetro a 500 nm. A absorbância é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra.

Amostras de 10 μ L de soro dos animais foram acrescentadas de 1 mL de reagente de cor, em seguida agitadas e levadas ao banho-maria (D2800-Kottermann) a 37°C durante 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 500 nm em espectrofotômetro (Du 650-Beckman). As concentrações de colesterol foram calculadas a partir de curvas-padrão e o resultado expresso em mg/dL.

4.6.2 Concentração de HDL-colesterol

O HDL-colesterol foi determinado por método enzimático, através de “kit” comercial da marca Gold Analisa Diagnóstica Ltda (Belo Horizonte, MG). O método baseia-se na precipitação de quilomícrons, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL) pela mistura de fosfotungstato e íons de magnésio,

sem alterar a solubilidade das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Esta, a partir de reações catalisadas pela colesterol esterase e pela colesterol oxidase, forma peróxido de hidrogênio que através da oxidação catalisada pela peroxidase produz um composto de coloração avermelhada detectado em espectrofotômetro a 500 nm.

Alíquotas de 200 μ L de soro dos animais foram adicionadas de 500 μ L de precipitante e mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos para obtenção de um sobrenadante límpido. Amostras de 100 μ L do sobrenadante foram acrescidas de 1 mL de reagente de cor, em seguida agitadas e levadas ao banho-maria (D2800-Kottermann) a 37°C durante 10 minutos. A leitura da absorbância das amostras foi realizada a 500 nm em espectrofotômetro (Du 650-Beckman). As concentrações de HDL-colesterol foram calculadas a partir de curvas-padrão e o resultado expresso em mg/dL.

4.7 Ensaio de agregação plaquetária

A função plaquetária pode ser avaliada por meio de provas de agregação, quando um agonista é adicionado à uma suspensão de plaquetas (PRP), estimulando-as e promovendo sua agregação. Essa agregação diminui a turbidez do PRP, alterando a transmissão de luz por essa suspensão, que é mensurada pelo agregômetro de plaquetas.

A agregação plaquetária foi acompanhada turbidimetricamente durante 05 minutos, em aparelho Chrono-log Aggregometer, após a adição de ADP, tendo como referência o plasma pobre em plaquetas. Este aparelho monitora a diferença de transmitância de luz produzida pelo processo de agregação das plaquetas em plasma ou ressuspensas em tampão adequado. Para os experimentos de

agregação, alíquotas de 400 µL de plasma rico em plaquetas foram pré-aquecidas a 37°C por 2 minutos em uma cubeta de vidro siliconizada. Após esta etapa a reação foi iniciada pela adição de ADP 0,4 mM. Foram realizados seis ensaios com concentrações diferentes de ADP (36 µM, 25 µM, 13 µM, 6,5 µM, 2,7 µM e 1,3 µM) para cada animal. A extensão máxima do aumento da transmitância da luz foi determinada para quantificar a agregação plaquetária. Após a realização das curvas de agregação plaquetária foi calculada a concentração necessária de ADP para promover 50% de agregação plaquetária (EC₅₀).

4.8 Tempo de coagulação sanguínea

A mensuração do tempo de coagulação foi realizada no plasma pobre em plaquetas através dos testes de Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa), que avalia alterações da via intrínseca da coagulação e Tempo de Protrombina (TP) que avalia a via extrínseca da coagulação. Para a determinação do tempo de coagulação foi utilizado um coagulômetro Amelung KC4 e os ensaios realizados em quadriplicata.

4.8.1 Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa)

O método baseia-se na determinação do tempo de coagulação de uma alíquota de plasma (PPP) a 37°C após recalcificação em presença de um substituto plaquetário e de um ativador.

50 µL de PPP foram pré-aquecidos a 37°C por 1 minuto e depois incubados com 50 µL de cefalina (biolab-Mérieux S/A) por 2 minutos. Após esta etapa foram

adicionados 100 μL de CaCl_2 25 mM (biolab-Mérieux S/A) determinando-se, a partir de então, o tempo de coagulação.

4.8.2 Tempo de Protrombina (TP)

Este é um método global que explora o sistema extrínseco da coagulação, em que utiliza-se plasma (PPP), a 37°C , em presença de um excesso de tromboplastina tissular e de cálcio.

50 μL de PPP foram pré-aquecidos a 37°C por 2 minutos e acrescidos de 100 μL de tromboplastina cálcica (biolab-Mérieux S/A). O tempo foi cronometrado até a formação do coágulo.

4.9 Quantificação dos ácidos graxos nos lipídios totais das plaquetas e da ração

As plaquetas foram obtidas a partir da centrifugação do plasma rico em plaquetas a 1000 rpm por 10 minutos. As plaquetas resultantes no precipitado foram ressuspensas em 5 mL de solução de oxalato de amônia 1% durante 10 minutos para que ocorresse a lise de hemácias remanescentes e centrifugadas por 3000 rpm por 10 minutos para obtenção de um novo precipitado de plaquetas. As plaquetas foram novamente ressuspensas em solução tampão fosfato (PBS) com ácido ascórbico 5 mM, pH 7,4. Este procedimento foi realizado por três vezes. Ao final das lavagens, as plaquetas foram ressuspensas em 200 μL de PBS e estocadas a -70°C até o momento da metilação das amostras.

A extração, saponificação e metilação dos ácidos graxos da ração e das plaquetas foram realizadas, em duplicata, partindo de uma alíquota de 0,2 g ou 0,2 mL da amostra (ração ou plaquetas, respectivamente) de acordo com o método descrito por Lepage e Roy (1986). Os ésteres metílicos foram quantificados por cromatografia gás-líquido, utilizando-se um cromatógrafo Perkin Elmer autosystem XL equipado com detector de chama ionizável e um software Turbochrom. Os ácidos graxos foram separados com coluna capilar SP-2560 (Supelco Inc, Bellefonte, PA) com 100 m x 0,25 mm x 0,20 μ m. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste. As temperaturas de injeção e detecção foram respectivamente, 260°C e 280°C. A temperatura da corrida foi programada para iniciar a 135°C durante 5 minutos com subida de 2°C/minuto até 195°C. A partir daí, com subida de 4°C até alcançar 240°C, permanecendo por 2,5 minutos. O tempo total da corrida somou 45 minutos. A pressão do gás de arraste foi de 32 Psi. A razão de split foi de 1:70. Os ésteres foram identificados por comparação com seu tempo de retenção com padrões conhecidos (Sigma, Supelco e Nuchek). Os resultados foram expressos como percentual de ácidos graxos totais.

4.10 Trombose venosa

A trombose venosa foi avaliada através do modelo descrito por Vogel et al (1989), usando-se tromboplastina de cérebro de coelho (biolab-Mérieux S/A) como agente trombogênico. Os animais foram anestesiados com administração intramuscular de Ketamina (100 mg/kg PC) e Xilazina (16 mg/kg PC). Já anestesiados, os animais foram colocados em decúbito dorsal, prendendo-se as patas e cabeça. O abdômen foi aberto cirurgicamente e a sua parede anterolateral

foi afastada com pinças hemostáticas para a localização da veia cava inferior, próximo as veias renais. Procedeu-se então, a dissecação da veia cava até a região de confluência das veias ilíacas comuns, isolando-a do conjuntivo adjacente e da aorta abdominal. Foram colocados fios de algodão com nós frouxos (para que não houvesse obstrução do fluxo sanguíneo) na veia renal esquerda, na extremidade cranial da veia cava imediatamente abaixo da veia renal direita e na extremidade caudal, respeitando-se a distância de 1 cm entre estas duas extremidades. O estímulo trombótico foi induzido administrando-se na veia cava 0,5 mL de uma solução de tromboplastina (3 mg/kg PC) juntamente com a oclusão das ligaduras. Após 20 min, os animais foram sacrificados e o segmento de 1 cm foi retirado do animal. O trombo retirado do segmento foi lavado em solução salina, seco à 60°C por 1 hora e seu peso aferido em balança analítica. A capacidade de induzir e/ou prevenir a formação de trombo apresenta relação direta com o peso deste.

4.11 Análise estatística

Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) fator dois, para a determinação dos níveis de significância entre os grupos nas duas idades estudadas e para a comparação entre os valores médios dos resultados obtidos entre os grupos foi aplicado o pós-teste de BONFERRONI, adotando-se $p < 0,05$ como nível mínimo de significância. A análise estatística foi feita através do programa GraphPad Prism versão 4.0 (GraphPad software, USA) Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

5 RESULTADOS

5.1 Consumo alimentar e massa corporal

A avaliação do consumo alimentar expresso em gramas de ração/100 g de massa corporal dos grupos estudados assim como a massa corporal dos animais expressa em gramas, estão representados nas figuras 8 e 9.

Imediatamente após o desmame e, após 21 dias, observou-se um menor consumo de dieta nos grupos GVPH e GC, quando comparado ao dos demais grupos estudados. Os animais alimentados com gordura vegetal hidrogenada (GVPH) permaneceram revelando tendência ao menor consumo de ração em relação aos demais grupos. Entretanto, entre o 105 e 180 dias de vida, não houve diferença significativa entre os grupos.

A Figura 9 revela que não há diferença significativa entre a massa corporal dos animais dos cinco grupos estudados desde o nascimento até a 3ª semana de vida. Entretanto, aos 45 dias, os animais que receberam dieta com óleo de palma e gordura vegetal hidrogenada apresentaram maior ganho de massa corporal comparado aos animais pertencentes aos demais grupos. Considerado o período restante estudado (dias 90, 133 e 180), os animais do grupo GC apresentaram massa corporal inferior a dos grupos GPA, GVPH e GPX.

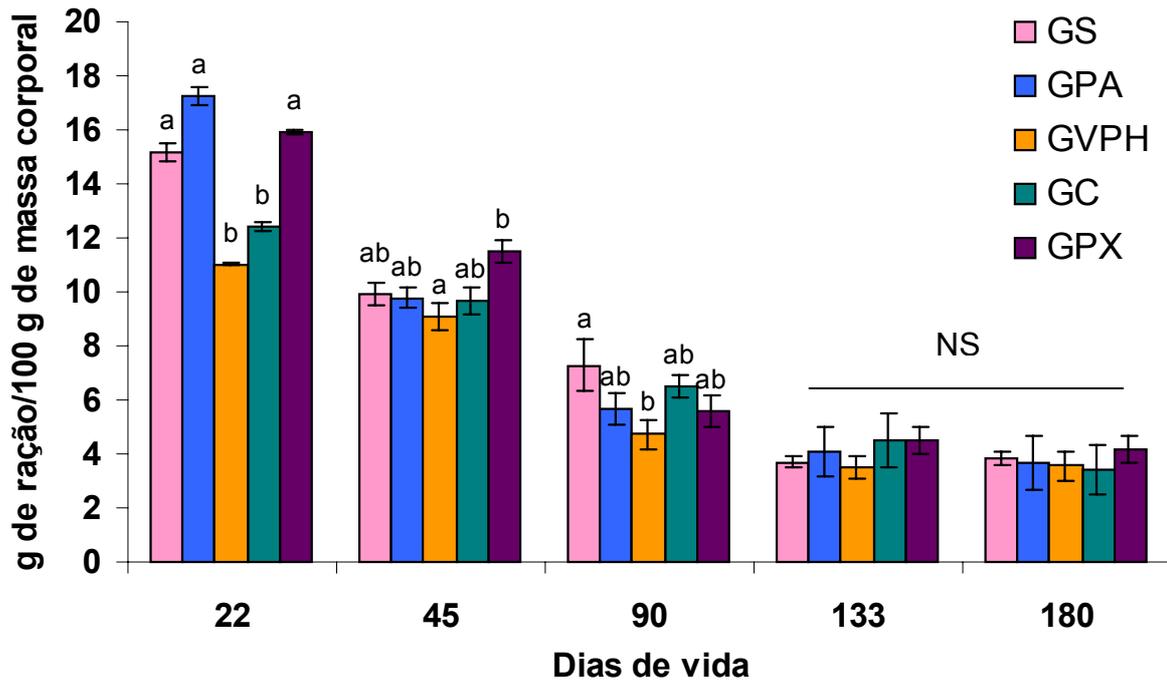


Figura 8 – Consumo alimentar (g de ração/100g massa corporal) de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas após a lactação até o 180º dia. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (n=8). NS: não significativo. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). GS (grupo soja), GPA (grupo palma), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada), GC (grupo canola), GPX (grupo peixe).

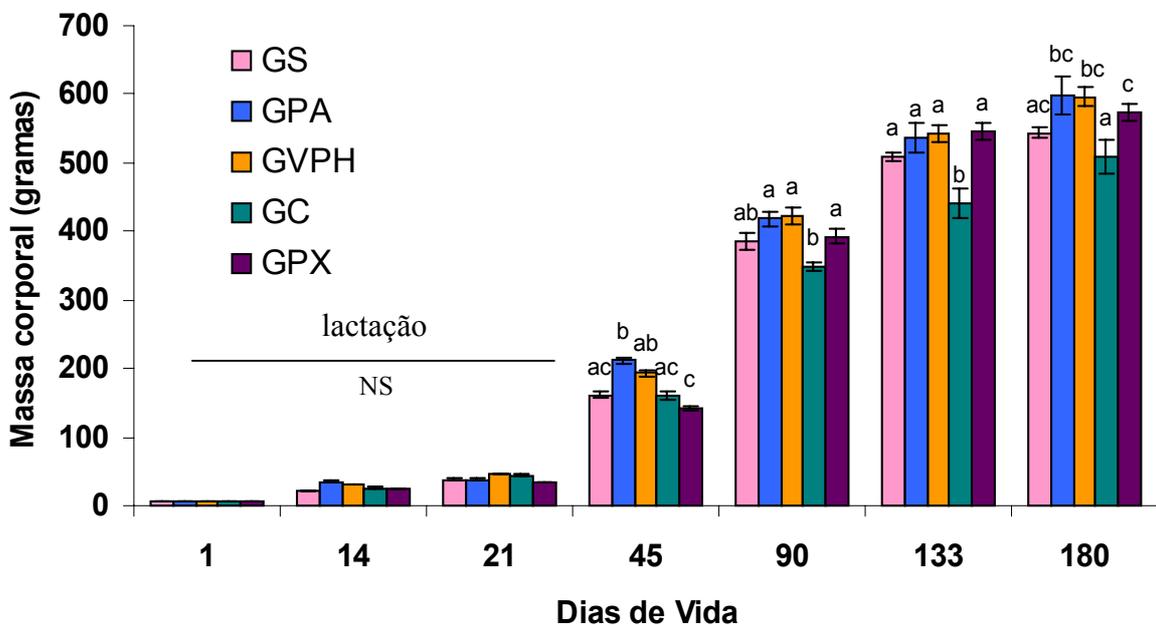


Figura 9 – Evolução ponderal dos filhotes machos desde o nascimento até o 180º dia de vida pós-natal. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (n=8). NS: não significativo. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). GS (grupo soja), GPA (grupo palma), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada), GC (grupo canola), GPX (grupo peixe).

5.2 – Composição percentual de ácidos graxos das dietas experimentais

Os resultados apresentados na Tabela 2 correspondem aos valores percentuais médios de ácidos graxos das dietas confeccionadas com diferentes fontes lipídicas.

Em relação aos ácidos graxos saturados (AGS), os valores percentuais de ácidos graxos C16:0, C18:0 e o somatório dos AGS foram maiores nas dietas confeccionadas com óleo de palma e gordura vegetal hidrogenada em relação às demais dietas. Conforme esperado, o valor percentual do AG palmítico (C16:0) apresentou-se mais elevado na dieta contendo óleo de palma, assim como detectou-se a presença de isômeros *trans* apenas nas dietas contendo gordura vegetal hidrogenada, visto que através do processo industrial de obtenção deste tipo de gordura, há a formação de ácidos graxos com isomeria *trans*. Os valores percentuais do AG oléico (C18:1 n-9) e o do AG linoléico (C18:2 n-6) apresentaram-se elevados nas dietas confeccionadas com óleo de canola e soja, respectivamente. Os AGPI de cadeia longa, EPA e DHA foram encontrados somente na dieta à base de óleo de peixe, sendo também importante ressaltar a presença de significativa quantidade de ácido linoléico encontrada nessa dieta, resultante da adição de óleo de milho, que apresenta um elevado percentual desse ácido graxo em sua composição.

Tabela 2 - Composição percentual média de ácidos graxos das dietas experimentais

Ácidos Graxos	Dietas (% do total de ácidos graxos)				
	GS	GPA	GVPH	GC	GPX
Total AGS	19,64	43,25	36,58	11,86	14,44
C14:0	1,34	0,84	0,07	0,98	1,44
C16:0	14,45	39,00	10,24	8,07	6,90
C18:0	3,71	3,41	12,15	2,63	3,07
<i>Trans</i> AGM	n.d	n.d	14,12	n.d	n.d
C18:1 <i>trans</i> n-9 / n-7 isômeros	n.d	-	14,12	n.d	n.d
Total AGM	19,92	33,50	25,08	57,90	12,96
C18:1 n-9	19,03	33,00	19,92	57,07	9,51
C18:1 e outros <i>cis</i> -isomerôs ^a	n.d	0,41	4,82	n.d	0,38
C20:1	0,52	0,09	0,32	0,39	1,70
C24:1	n.d	n.d	0,02	n.d	0,60
<i>Trans</i> AGPI	n.d	n.d	0,69	n.d	n.d
C18:2 (n-6) <i>tc</i> ^b	n.d	n.d	0,17	n.d	n.d
C18:2 (n-6) <i>ct</i> ^b	n.d	n.d	0,40	n.d	n.d
C18:2 (n-6) <i>tt</i> ^b	n.d	n.d	0,12	n.d	n.d
Total AGPI	60,15	22,95	23,36	30,17	72,48
C18:2 (n-6)	55,87	21,18	20,75	23,73	10,85
C18:3 (n-3)	3,59	1,77	2,61	4,93	1,13
C20:5 (n-3) EPA	n.d	n.d	n.d	n.d	35,04
C22:6 (n-3) DHA	n.d	n.d	n.d	n.d	17,24
Total <i>trans</i>	n.d	n.d	14,81	n.d	n.d

[#] o somatório inclui ácidos graxos que não estão referidos na tabela. n.d – não detectado. ^a inclui todos os isômeros *cis* de posição do 18:1 exceto o 18:1 (n-9); ^b c, *cis* dupla ligação t, *trans* dupla ligação. AGS - ácidos graxos saturados, AGM - ácidos graxos monoinsaturados; AGPI - ácidos graxos poliinsaturados. EPA – ácido eicosapentaenóico, DHA – ácido docosahexaenóico. GS (grupo soja), GPA (grupo palma), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada), GC (grupo canola), GPX (grupo peixe).

5.3 – Composição percentual de ácidos graxos dos lipídeos totais das plaquetas.

As Tabelas 3 e 4 apresentam os valores percentuais de ácidos graxos dos lipídeos totais das plaquetas dos filhotes machos com diferentes fontes lipídicas aos 45 e 180 dias, respectivamente.

Aos 45 dias (Tabela 3), o grupo GC apresentou o maior percentual de ácidos graxos saturados em relação aos grupos GS e GVPH. O GPA também apresentou percentuais significativamente maiores de AGS comparados aos valores correspondentes do GS e GVPH. Dentre os AGS detectados, aquele que se apresentou em maior proporção nos lipídeos totais das plaquetas de todos os grupos estudados foi o ácido graxo palmítico (C16:0). O teor total dos ácidos graxos monoinsaturados (total AGM) foi significativamente maior no GC, representado pelo elevado conteúdo do ácido graxo oléico (C18:1 n-9). O GPA também mostrou conteúdo elevado de ácido graxo oléico. Considerada a soma dos ácidos graxos poliinsaturados (total AGPI), foi detectado valor percentual reduzido no GC em relação aos valores correspondentes aos demais grupos. O GC também apresentou percentual de ácido graxo linoléico (C18:2 n-6) similar ao do grupo GS e, significativamente maior, quando comparado aos valores correspondentes aos grupos GPA, GVPH e GPX. O conteúdo de AA mostrou-se mais elevado no GVPH e mais reduzido no GPX, entre todos os grupos estudados. O GPX incorporou significativamente mais EPA nos lipídeos totais das plaquetas do que os demais grupos. Menor razão AA/EPA foi verificada para o GPX. Como esperado, os ácidos graxos *trans* foram detectados somente nas plaquetas do grupo GVPH.

Na Tabela 4 encontram-se os valores percentuais de ácidos graxos das plaquetas dos animais aos 180 dias. O GC apresentou proporção de AGS total significativamente maior comparada às correspondentes dos grupos GPA e GVPH, sendo o C16:0 também o que foi detectado em maior proporção. Os maiores valores percentuais de AGM totais foram encontrados nos grupos GPA e CG, enquanto que o menor percentual foi observado no GS. Assim como observado aos 45 dias, o GC apresentou o maior percentual de ácido graxo oléico (C18:1 n-9) e o menor percentual de AGPI totais. Não foi observada diferença significativa entre os valores de ácido graxo linoléico (C18:2 n-6) detectados nas plaquetas de todos os animais, enquanto que o ácido graxo linolênico (C18:3 n-3) só foi detectado nas plaquetas do grupo GPX. Este grupo, além disso, apresentou percentual significativamente menor de AA e maior de EPA em relação aos demais grupos. O GC apresentou valor de AA significativamente menor do que os grupos GS, GPA e GVPH. Também foi verificada menor razão AA/EPA para o grupo GPX, seguido do GPA, assim como ácidos graxos *trans*, também foram detectados somente nas plaquetas do grupo GVPH.

Aos 180 dias, os grupos GPA, GC e GPX mostraram redução significativa nos valores percentuais do total de AGS, comparados aos valores correspondentes aos 45 dias de vida. Para o GPX também verificou-se redução da quantidade de ácido graxo palmítico (C16:0) entre os dois períodos. No GPA ocorreu aumento no conteúdo total de AGM, enquanto que nos grupos GS e GPA os aumentos verificados foram relativos ao conteúdo total de AGPI. Os grupos GS, GPA e GC mostraram aumento nos teores de AA. Maior razão AA/EPA foi verificada nos grupos GS, GVPH e GC. O percentual de ácidos graxos *trans*, no grupo GVPH, também elevou-se significativamente entre os períodos estudados (Tabela 4).

Tabela 3 - Valores percentuais de ácidos graxos dos lipídeos totais das plaquetas de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 dias

Ácidos Graxos (%)	GS	GPA	GVPH	GC	GPX
Total AGS #	58,5±1,5^a	62,8±1,5^b	57,7±1,1^a	62,3±1,3^b	59,5±1,7^{ab}
C16:0	36,4±1,1 ^a	39,6±0,04 ^{ab}	37,3±1,4 ^a	41,2±1,6 ^b	38,9±0,6 ^{ab}
C18:0	21,1±1,5 ^a	20,3±1,6 ^a	15,4±0,5 ^b	18,2±0,9 ^{ab}	17,2±0,6 ^b
<i>Trans</i> AGM	n.d	n.d	1,6±0,2	n.d	n.d
Total cis AGM #	7,7±0,3^a	7,0±0,6^a	8,2±0,2^a	11,7±0,5^b	7,2±0,3^a
C18:1 n-9	4,7±1,2 ^a	6,0±1,0 ^{ab}	4,1±0,2 ^a	8,8±0,5 ^b	4,6±0,2 ^a
Total AGPI #	34,2±0,6^{ab}	30,8±1,6^a	36,2±1,7^b	26,3±1,1^c	33,9±1,3^b
C18:2 (n-6)	7,7±0,5 ^a	4,2±0,2 ^b	3,6±0,2 ^b	6,8±0,5 ^a	4,2±0,2 ^b
C18:3 (n-3)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C20:4 (n-6) (AA)	22,9±1,6 ^a	19,5±1,5 ^{ac}	28,7±1,1 ^b	16,6±0,9 ^c	9,9±0,4 ^d
C20:5 (n-3) (EPA)	1,7±0,1 ^a	2,2±0,3 ^a	2,8±0,2 ^a	1,4±0,3 ^a	15,1±0,5 ^b
C22:6 (n-3) (DHA)	1,3±0,6	1,7±0,6	1,1±0,2	1,6±0,5	1,6±0,1
AA/EPA	13,5±0,5 ^a	8,9±0,7 ^{bc}	10,3±0,5 ^{ab}	11,9±0,9 ^{ab}	6,2±0,4 ^c
Total trans	n.d	n.d	1,6±0,2	n.d	n.d

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (n= 4 a 7). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes (p<0,05) para valores da mesma linha.

o somatório inclui ácidos graxos que não estão referidos na tabela. n.d - não detectado. AGS - ácidos graxos saturados; AGM - ácidos graxos monoinsaturados; AGPI - ácidos graxos poliinsaturados; AA - ácido araquidônico EPA - ácido eicosapentaenoico; DHA - ácido docosahexaenoico. GS (grupo soja), GPA (grupo palma), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada), GC (grupo canola), GPX (grupo peixe).

Tabela 4 - Valores percentuais de ácidos graxos dos lipídeos totais das plaquetas de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 180 dias

Ácidos Graxos (%)	GS	GPA	GVPH	GC	GPX
Total AGS #	55,8±1,0^{ab}	54,3±1,1^{a*}	54,8±2,5^a	58,6±1,4^{b*}	55,1±0,1^{ab*}
C16:0	36,9±1,2 ^{ac}	33,7±0,6 ^b	36,2±1,5 ^{ab}	38,7±2,1 ^a	33,8±0,04 ^{bc*}
C18:0	16,4±0,7 ^{ab*}	16,9±0,2 ^{a*}	13,2±2,5 ^b	17,1±0,5 ^a	16,4±0,03 ^{ab}
<i>Trans</i> AGM	n.d	n.d	5,1±0,5 [*]	n.d	n.d
Total cis AGM #	4,7±1,2^a	10,9±0,4^{b*}	9,0±0,7^c	12,3±0,6^b	7,6±0,1^c
C18:1 n-9	3,2±0,2 ^a	4,4±0,2 ^a	4,6±0,8 ^a	6,6±0,8 ^b	3,7±0,01 ^a
Total AGPI #	39,0±1,6^{a*}	34,2±1,2^{b*}	35,7±2,1^{ab}	28,7±1,3^c	37,3±0,6^{ab}
C18:2 (n-6)	5,3±0,2	3,3±0,3	4,1±0,9	5,1±0,7	4,1±0,07
C18:3 (n-3)	n.d	n.d	n.d	n.d	0,7±0,1
C20:4 (n-6) (AA)	28,5±0,7 ^{a*}	26,2±0,4 ^{ab*}	24,6±1,4 ^b	20,7±1,1 ^{c*}	11,2±0,3 ^d
C20:5 (n-3) (EPA)	1,6±0,1 ^a	2,9±0,3 ^a	1,6±0,5 ^a	1,0±0,2 ^a	16,3±0,07 ^b
C22:6 (n-3) (DHA)	1,1±0,5	0,6±0,1	2,3±0,3	1,5±0,6	3,1±0,03
AA/EPA	17,8±0,8 ^{ac*}	9,0±0,7 ^b	15,4±0,6 ^{a*}	20,7±1,0 ^{c*}	3,6±0,2 ^d
Total trans	n.d	n.d	5,1±0,5[*]	n.d	n.d

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (n= 3 a 4). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes (p<0,05) para valores da mesma linha. * p<0,05 vs 45 dias.

o somatório inclui ácidos graxos que não estão referidos na tabela. n.d - não detectado. AGS - ácidos graxos saturados; AGM - ácidos graxos monoinsaturados; AGPI - ácidos graxos poliinsaturados; AA - ácido araquidônico EPA - ácido eicosapentaenoico; DHA - ácido docosahexaenoico. GS (grupo soja), GPA (grupo palma), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada), GC (grupo canola), GPX (grupo peixe).

5.4 – Perfil lipídico sanguíneo

A Tabela 5 apresenta os valores relativos as concentrações circulantes de colesterol total e HDL-c dos filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas desde a lactação, aos 45 e 180 dias de vida.

Aos 45 dias os animais do grupo GVPH e GC apresentaram concentrações de colesterol sérico mais elevadas quando comparadas aos valores respectivos aos animais dos grupos GS e GPA. Os animais do GPX apresentaram concentração reduzida em relação aos valores respectivos em relação aos demais grupos estudados. Na fase de envelhecimento (180 dias de vida), os grupos GS e GPA apresentaram valores de colesterol total mais elevados em relação as concentrações relativas dos grupos GC e GPX. Os animais do GPX foram os que demonstraram a menor concentração sérica de colesterol total nas duas idades estudadas.

A análise dos resultados relativos às concentrações séricas de HDL-c aos 45 dias de vida, revela que os animais do GVPH e do GPX apresentaram valores significativamente menores quando comparados aos valores respectivos dos demais grupos. Entretanto, aos 180 dias, os animais do GC apresentaram maiores concentrações de HDL-colesterol em relação aos respectivos teores de GPA, GVPH e GPX, embora tenha sido similar à concentração verificada para o grupo GS.

A comparação dos valores séricos de colesterol total e HDL-c, obtidos nas duas fases do desenvolvimento estudadas, revela que aos 180 dias, os animais alimentados com óleo de soja (GS) e óleo de palma (GPA) apresentaram aumento significativo na concentração de colesterol total quando comparados aos valores relativos aos 45 dias de vida. Considerada a concentração de HDL-c, o grupo que recebeu dieta à base de gordura vegetal hidrogenada (GVPH) também apresentou aumento significativo na concentração sérica desta lipoproteína aos 180 dias de vida.

Tabela 5 - Concentrações de colesterol total e HDL-colesterol dos filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 e 180 dias de vida

	GS	GPA	GVPH	GC	GPX
Colesterol total (mg/dL)					
45 dias	62,74 ± 2,32 ^a (8)	57,40 ± 1,54 ^b (8)	70,68 ± 1,63 ^c (8)	69,22 ± 1,10 ^c (8)	50,52 ± 2,18 ^d (8)
180 dias	78,83 ± 4,67 ^{a*} (12)	76,55 ± 3,53 ^{a*} (11)	71,80 ± 1,94 ^{ab} (10)	65,36 ± 3,83 ^b (8)	52,05 ± 4,50 ^c (8)
HDL – colesterol (mg/dL)					
45 dias	37,49 ± 3,26 ^{ac} (6)	44,89 ± 5,18 ^a (6)	23,62 ± 1,97 ^b (6)	38,97 ± 3,55 ^c (6)	28,78 ± 2,85 ^b (6)
180 dias	42,90 ± 2,07 ^{ab} (10)	37,33 ± 3,64 ^{ac} (6)	36,97 ± 2,29 ^{ac*} (6)	48,70 ± 1,51 ^b (6)	30,55 ± 2,31 ^c (10)

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. () número de animais. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) para valores da mesma linha. * $p < 0,05$ vs 45 dias. GS (grupo soja), GPA (grupo palma), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada), GC (grupo canola), GPX (grupo peixe).

5.5 – Tempo de coagulação sanguínea

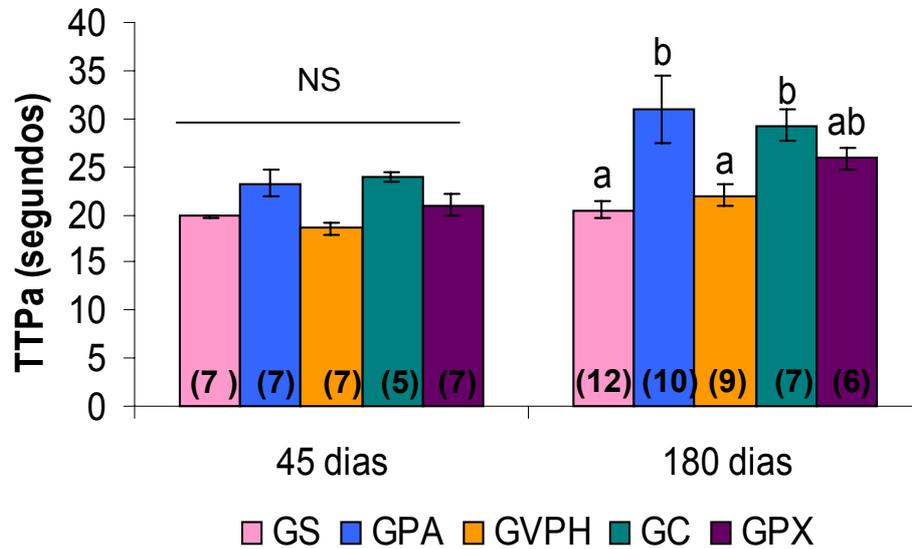
A Figura 10 A e B apresenta os resultados de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e tempo de protrombina (TP) dos filhotes machos alimentados com as diferentes fontes lipídicas, estudados aos 45 e 180 dias de vida.

Aos 45 dias, observa-se que não houve diferença no TTPa dos grupos investigados. De outro modo, os TP relativos aos GS, GPA e GVPH revelaram-se significativamente mais longo quando comparados aos valores respectivos dos grupos GC e GPX.

Entretanto, aos 180 dias, os animais dos grupos GPA e GC apresentaram TTPa mais longo do que o TTPa dos grupos GS e GVPH. Considerado o TP, o grupo GC revelou tempo mais longo ao do grupo GVPH.

A Figura 11 A e B apresenta os resultados relativos aos diferentes testes para a mensuração do tempo de coagulação, nas duas fases investigadas (45 e 180 dias), respectivos aos filhotes machos pertencentes aos grupos experimentais estudados. Os animais alimentados com dieta à base de óleo de palma (GPA) apresentaram, aos 180 dias de vida, apresentaram TTPa mais prolongado do que aos 45 dias, indicando um aumento do tempo de coagulação (Figura 1 A). O TP dos grupos GC e GPX também apresentou-se mais prolongado aos 180 dias, enquanto que o TP do grupo GPA encurtou significativamente em relação ao TP verificado aos 45 dias (Figura B).

A



B

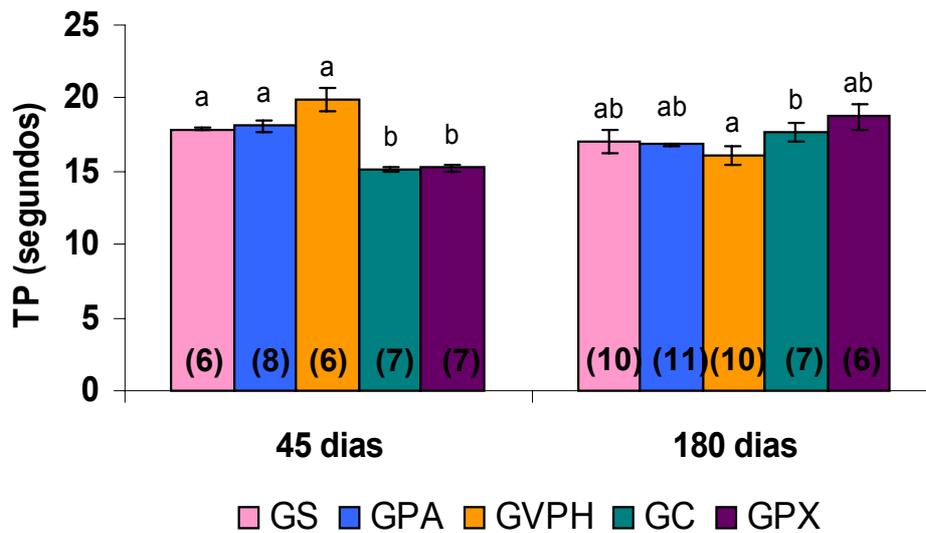


Figura 10 – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) (A) e Tempo de Protrombina (TP) (B) de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 e 180 dias de vida. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. () número de animais. NS: não significativo. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). GS (grupo soja), GPA (grupo palma), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada), GC (grupo canola), GPX (grupo peixe).

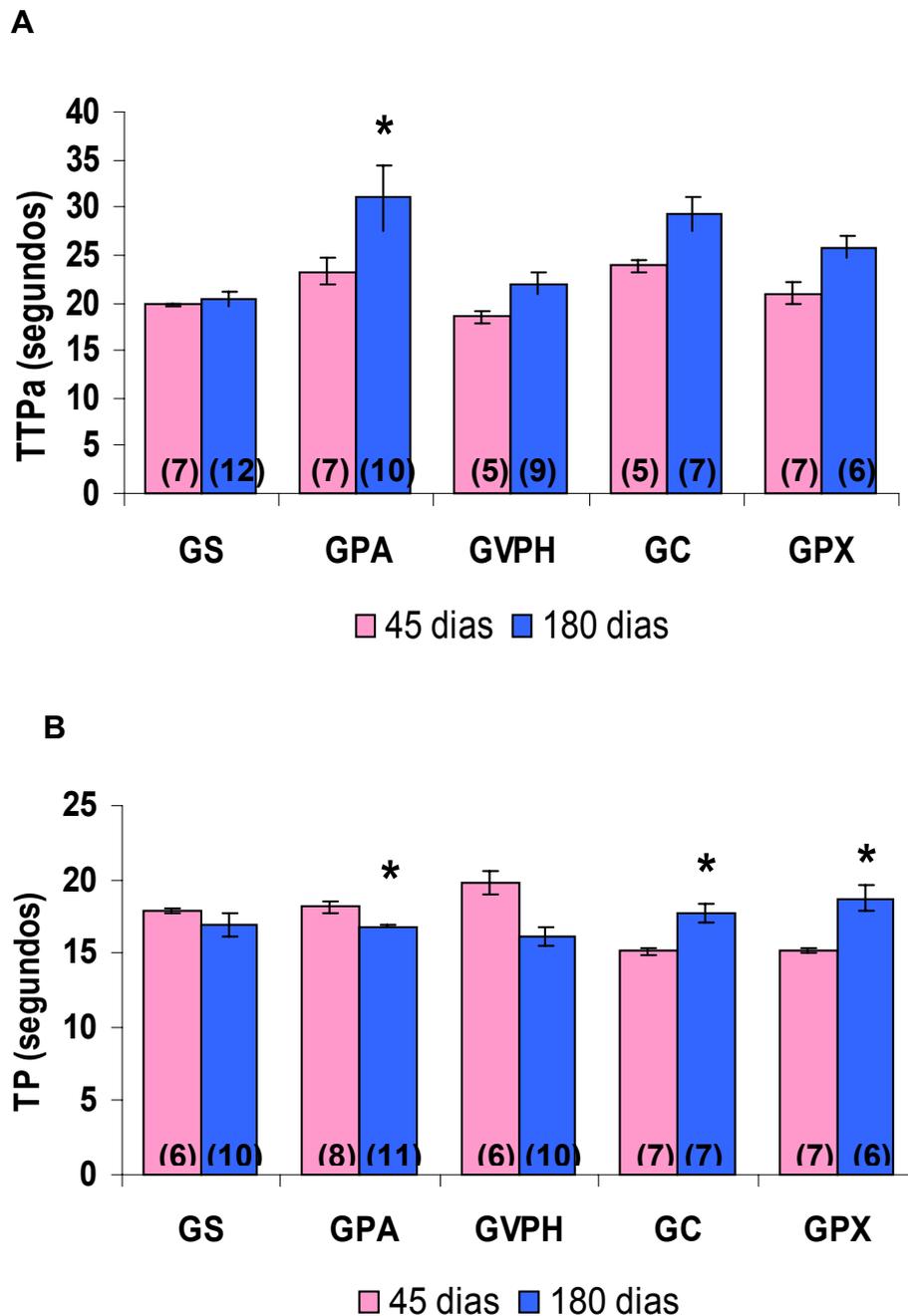


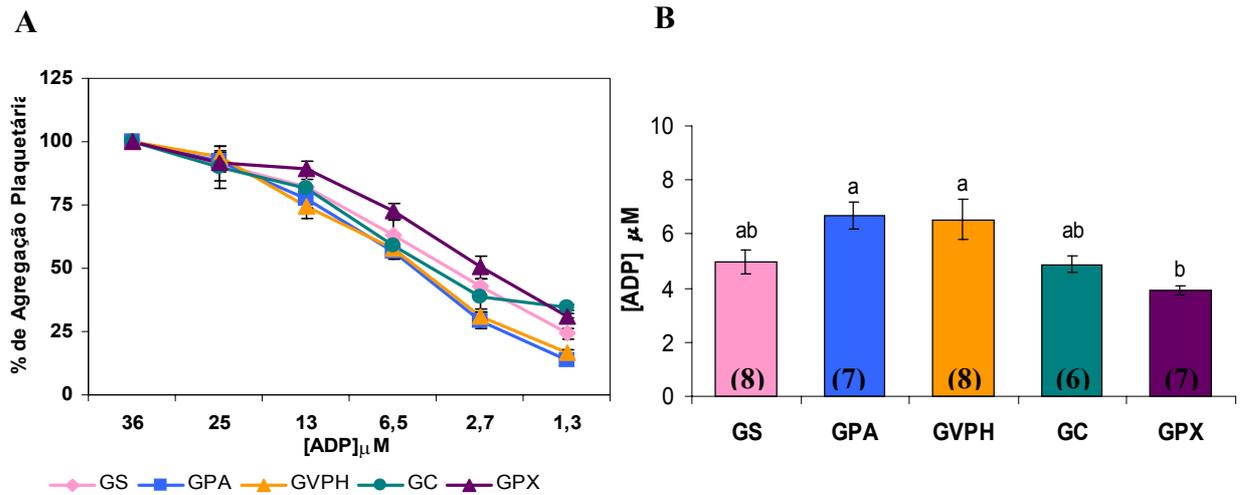
Figura 11 – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) (A) e Tempo de Protrombina (TP) (B) de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 e 180 dias de vida. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média. () número de animais. * representa diferença significativa em relação aos 45 dias ($p < 0,05$). GS (grupo soja), GPA (grupo palma), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada), GC (grupo canola), GPX (grupo peixe).

5.6 – Agregação plaquetária

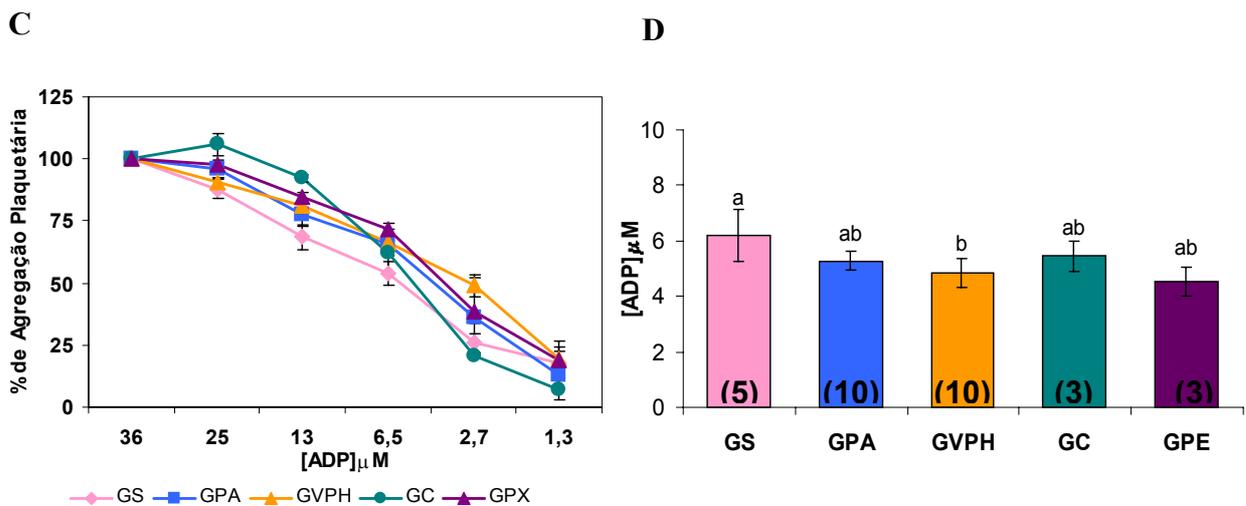
A partir das curvas de agregação plaquetária (Figura 12 A e C) obtidas através da administração de diferentes concentrações do indutor de agregação, adenosina difosfato (ADP) ao plasma rico em plaquetas (PRP) obtido dos animais aos 45 e 180 dias, foi calculada a concentração de ADP necessária para promover 50% de agregação máxima (EC_{50}) para todos os grupos estudados (Figura 12 B e D).

Aos 45 dias, o grupo que recebeu dieta com óleo de peixe apresentou valor de EC_{50} menor do que os valores correspondentes aos grupos GPA e GVPH, indicando que os animais do GPX apresentaram maior sensibilidade ao agonista administrado (ADP) (Figura 12 B). No 180º, o GVPH apresentou valor de EC_{50} menor do que o valor do GS, revelando que os animais alimentados com gordura vegetal hidrogenada, nesta fase, foram os que apresentaram maior sensibilidade ao indutor de agregação administrado, quando comparados àqueles alimentados com dietas à base de óleo de soja (Figura 12 D).

A Figura 13 apresenta os dados de concentração de ADP necessária para promover 50% de agregação plaquetária (EC_{50}), obtidos dos grupos submetidos à ingestão de dietas de diferentes bases lipídicas, estudados aos 45 e 180 dias de vida. Ocorreu aumento da sensibilidade ao agonista, verificada através da diminuição do valor de EC_{50} nos animais com 180 dias do GVPH. Tendência semelhante pode ser observada nos animais de mesma idade do grupo GPA ($p = 0,08$).



45 dias de vida



180 dias de vida

Figura 12 – Curva de Agregação Plaquetária e EC₅₀ de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 (A e B) e 180 dias (C e D). Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. () número de animais. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes (p<0,05). GS (grupo soja), GPA (grupo palma), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada), GC (grupo canola), GPX (grupo peixe).

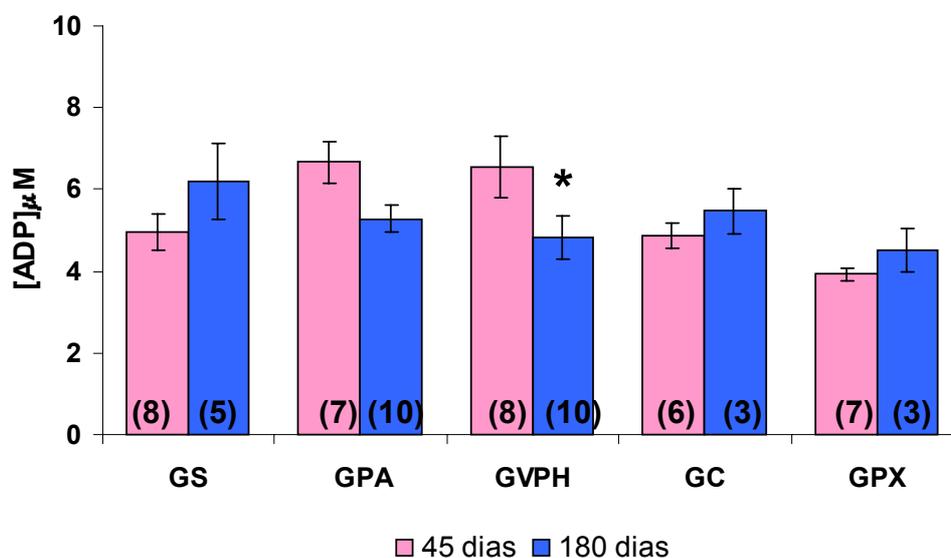


Figura 13 – EC₅₀ Agregação Plaquetária de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 e 180 dias. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média. () número de animais. * representa diferença significativa em relação aos 45 dias ($p < 0,05$). GS (grupo soja), GPA (grupo palma), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada), GC (grupo canola), GPX (grupo peixe).

5.7 – Trombose venosa

A Figura 14 mostra que, na fase jovem (45 dias), não há diferença significativa na formação de trombos entre os animais que consumiram diferentes fontes lipídicas. Entretanto, na fase de envelhecimento (180 dias), o grupo que recebeu dieta com óleo de canola apresentou peso de trombo cerca de 2 vezes maior que o valor obtido para o GS e GPX.

Ao comparar os dados relativos às duas idades investigadas (Figura 15), observa-se que aos 180 dias, o grupo GC demonstrou a formação e trombos 1,5 vezes mais pesados quando comparado ao valor obtido aos 45 dias. Para os demais grupos não foi observada significância estatística entre as diferenças encontradas.

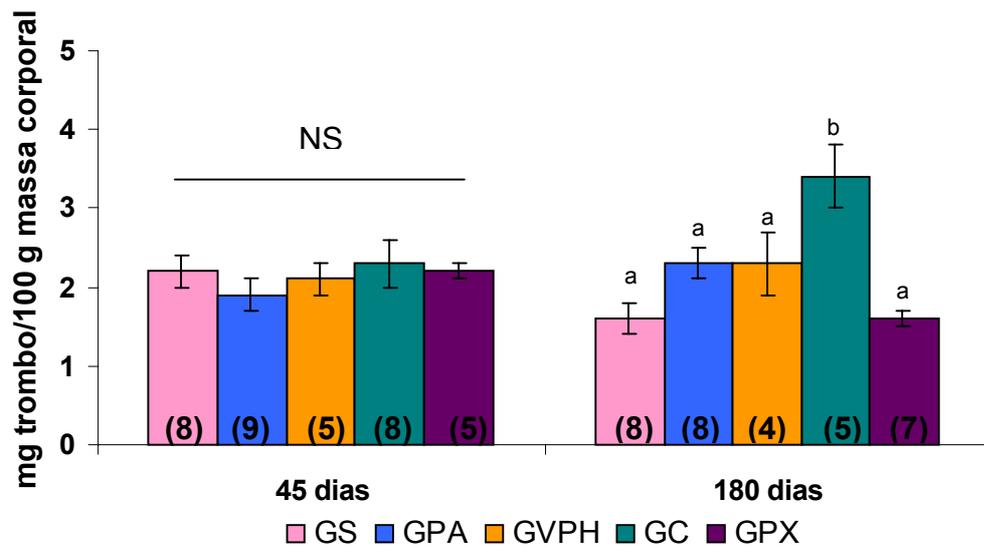


Figura 14 – Peso do Trombo Venoso de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 e 180 dias. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). () número de animais. NS: não significativo. GS (grupo soja), GPA (grupo palma), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada), GC (grupo canola), GPX (grupo peixe).

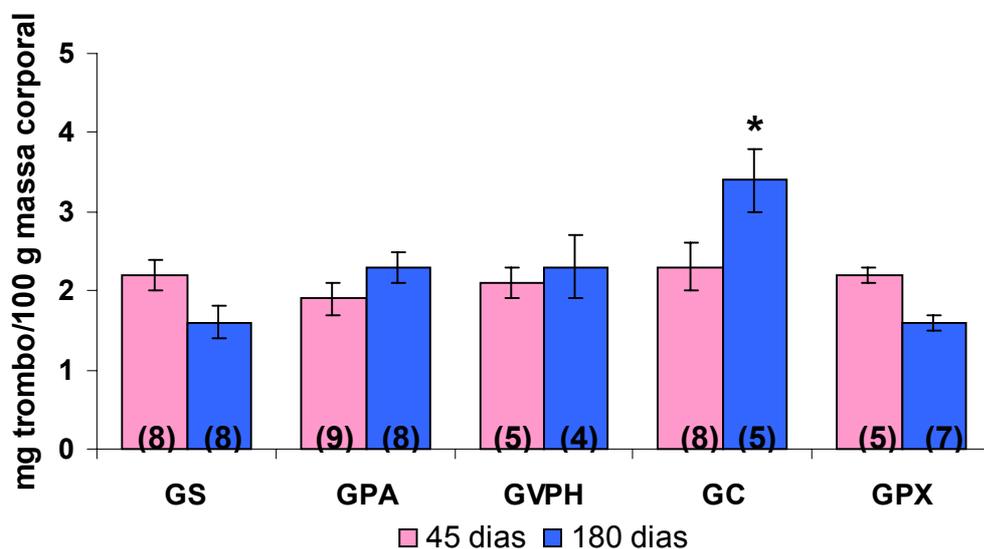


Figura 15 – Peso do Trombo Venoso de filhotes machos alimentados com diferentes fontes lipídicas aos 45 e 180 dias. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média. () número de animais. * representa diferença significativa em relação aos 45 dias ($p < 0,05$). GS (grupo soja), GPA (grupo palma), GVPH (grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada), GC (grupo canola), GPX (grupo peixe).

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, tem sido crescente o interesse sobre os possíveis efeitos dos ácidos graxos dietéticos sobre os distúrbios da hemostasia, especialmente porque que estas alterações constituem um fator de risco aterogênico independente. Ainda que a constituição da dieta, ingerida durante a maturidade, tenha sido identificada como um fator crítico, poucos estudos têm investigado o impacto da ingestão dos diferentes ácidos graxos dietéticos, durante a infância, sobre a saúde do indivíduo nas fases mais tardias da vida. Há referência de que a nutrição na infância influencia o metabolismo, crescimento e desenvolvimento neural, podendo programar o aparecimento de doenças na maturidade, tais como a obesidade, aterosclerose, hipertensão, diabetes tipo II e doenças cardiovasculares e tromboembólica (Das, 2003). Buscando aprofundar o conhecimento dessas relações, neste trabalho nos propusemos a estudar o efeito dos ácidos graxos dietéticos poliinsaturados da série n-6, n-3, monoinsaturados, saturados e *trans*, oferecidos desde o período da lactação, na predisposição de ratos machos jovens (45 dias de vida pós-natal) e em fase de envelhecimento (180 dias de vida pós-natal) à trombose e/ou distúrbios da hemostasia.

Em nossas dietas experimentais, os percentuais de ácidos graxos poliinsaturados da série n-6, n-3, monoinsaturados, saturados e *trans* variaram de acordo com o percentual da fonte lipídica específica adicionada à dieta, normolipídica, à base de caseína. Conforme esperado, na dieta com gordura hidrogenada, observamos a presença dos ácidos graxos *trans*, sendo o ácido graxo elaídico (C18:1 n-9t), o que apresentou-se em maior proporção. Na dieta com óleo de palma, os ácidos graxos mais abundantes são os ácidos graxos saturados, sendo

o ácido graxo palmítico (C16:0), o detectado em maior quantidade. Nas dietas com óleo de soja (ricas em ácidos graxos polinsaturados), os ácidos graxos essenciais estão em maior quantidade e o principal representante é o ácido linoléico (C18:2 n-6). O ácido graxo oléico (C18:1 n-9) encontra-se em maior concentração na dieta a base de óleo de canola, justificando o alto valor percentual de AGM nessa dieta. Cabe ressaltar a presença do ácido eicosapentanóico (C20:5 n-3) e do docosahexaenóico (C22:6 n-3) nas dietas com óleo de peixe e a ausência desses ácidos graxos nas demais dietas utilizadas no presente estudo.

A análise dos efeitos dessas fontes lipídicas sobre o consumo alimentar dos animais, na idade jovem, revela que, dietas normolipídicas, ricas em ácido graxo monoinsaturado oléico ou isômeros *trans*, promoveram menor ingestão alimentar. De outro modo, as dietas à base de ácidos graxos poliinsaturados (GS e GPX) e ácido graxo saturado palmítico (C16:0) induziram um maior consumo alimentar nos animais. Apesar do poder de saciedade, imediato, do lipídeo dietético ser comparativamente fraco, em relação ao de carboidratos, é provável que o tipo de lipídio consumido possa modificar o padrão de ingestão durante a alimentação. De acordo com Leonhardt e Langhans (2004), as propriedades físico-químicas dos lipídeos são responsáveis pela sua eficácia em promover a saciedade, de modo que a oxidação posprandial dos ácidos graxos ingeridos pode desempenhar papel importante no controle da ingestão alimentar. Esses autores mostraram que, em condições de baixa oxidação, como ocorre com o consumo de dietas ricas em gorduras saturadas, verifica-se maior consumo alimentar. Apesar das evidências, são controversos os resultados dos estudos que mostram uma associação entre o controle da ingestão alimentar e o tipo de lipídeo ingerido. Portillo et al (2001) demonstraram que animais alimentados com óleo de palma apresentaram maior

ingestão alimentar comparados àqueles alimentados com azeite de oliva e óleo de girassol. No entanto, Colandre et al (2003) não observaram diferença significativa no consumo de dieta com diferentes fontes lipídicas. Tem sido sugerido que dependendo do tipo de lipídios na dieta, estes podem conduzir à hiperfagia, devido às suas propriedades organolépticas, tais como, elevada palatabilidade e textura característica (Pereira et al, 2003).

Considerando a evolução da massa corporal dos animais, verificamos que aqueles incluídos no grupo que ingeriu dieta contendo gordura vegetal hidrogenada, apesar do menor consumo de ração, apresentaram tendência ao maior ganho de massa corporal, semelhante aos animais alimentados com óleo de palma. Uma possibilidade que justifica o aumento da massa corporal, decorrente do tipo de ácido graxo dietético ingerido, é a sua eficiência metabólica. Segundo Jones (1989), a composição dos ácidos graxos da gordura da dieta é o que determina o quanto será utilizado para produção de energia e o quanto será armazenado no tecido adiposo. Refere-se adicionalmente que, o diferente ganho de peso, promovido por dietas à base de lipídeos de distintas fontes alimentares, pode ser justificado dada às diferentes taxas de oxidação dos ácidos graxos. Jones et al (1985) demonstraram que o ácido graxo esteárico (C18:0) sofre menos oxidação, sendo portanto mais armazenado, proporcionando acúmulo de lipídeos no tecido adiposo e maior ganho de peso, sugerindo que constitui ácido graxo mais passível de promover a obesidade. De outro modo, os ácidos graxos insaturados são oxidados mais rapidamente do que os ácidos graxos saturados (Delany et al, 2000). Ainda em relação aos AGS, Leyton et al (1987) demonstraram que a oxidação diminui conforme aumenta o número de carbonos da cadeia. Considerados os AGPI, há referência de que o ácido linolênico (C18:3 n-3) apresenta maior taxa de oxidação

do que o ácido oléico (C18:1 n-9) e, ambos, apresentam taxa de oxidação maior do que a do ácido linoléico (C18:2 n-6). Estudos em humanos também demonstraram que o ácido oléico é oxidado mais rapidamente do que o ácido palmítico (Watkins et al, 1982; Jones et al, 1985). Entretanto, alguns estudos sugerem que a diferença no ganho de peso, promovida pelo lipídeo dietético, reflete diferenças relacionadas às variações na eficiência de absorção deste macronutriente. Portillo et al (2001), comparando a eficiência alimentar de diversas gorduras dietéticas, observaram que os animais alimentados com gordura saturada de origem animal (rica em ácido esteárico – C18:0), apresentaram absorção reduzida de lipídeo, frente àqueles que receberam dietas à base de azeite de oliva, óleo de girassol ou óleo de palma. O déficit energético resultante justifica o menor ganho de peso observado naqueles animais. Jones et al (1985) encontraram evidências, em humanos, que mostram a ocorrência de oxidação preferencial do ácido graxo oléico em relação ao linoléico. Justificativa provável para esta relativa elevada taxa de oxidação, reside no reconhecimento de que o AG oléico é preferencialmente incorporado aos TG, os quais constituem fonte de energia.

Nossos achados, indicativos de maior ganho de peso entre os animais que consumiram óleo de palma (rico em ácido palmítico) e menor ganho, entre aqueles alimentados com óleo de canola (rico em ácido oléico), permitem-nos sugerir que, a qualidade lipídica da dieta, independentemente da quantidade oferecida deste macronutriente, desde períodos iniciais do desenvolvimento orgânico, pode contribuir para um maior ganho de peso corporal, em etapas posteriores da vida.

A hiperatividade das plaquetas e sua adesão e agregação no local da injúria aterosclerótica são processos criticamente importantes na formação de trombos oclusivos e na patogênese de doenças cardiovasculares (Kris-Etherton et al, 2001).

A agregação plaquetária decorre, dentre outros mecanismos, da liberação do ácido araquidônico da membrana fosfolipídica das plaquetas, processo ativado pela enzima fosfolipase A₂. Subseqüentemente, a enzima cicloxigenase (COX-1) converte o ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos. Esses são então convertidos, pela enzima tromboxana sintetase, em tromboxano A₂ (TXA₂), que funciona como um potente agonista indutor da agregação (Bernardi e Moreira, 2004).

A manipulação lipídica das dietas, por outro lado, tem efeito direto na composição dos lipídeos celulares, o que afeta a disponibilidade e o tipo de precursores de eicosanóides. Em 1980, o estudo de Hirai e colaboradores mostrou que o consumo de óleo de peixes marinhos ou de EPA, altera a distribuição dos lipídios plasmáticos e a composição lipídica de muitas células, incluindo a de plaquetas. Este tipo de dieta acarreta aumento no tempo de coagulação e redução na reatividade das plaquetas em humanos (Moncada e Vane, 1985). A produção de eicosanóides derivados do EPA, que são diferentes dos gerados a partir do ácido araquidônico, parece ser responsável pelos efeitos antitrombóticos desse tipo de dieta (Jehangir et al, 2004). Assim, reconhecendo-se que os lipídeos dietéticos apresentam importante função estrutural na composição lipídica das membranas celulares, propomos avaliar, no presente estudo, se a composição dos ácidos graxos das diferentes dietas oferecidas aos animais refletiu-se na composição dos ácidos graxos dos lipídeos totais das suas respectivas plaquetas.

De todos os ácidos graxos incorporados aos lipídeos totais das plaquetas, aquele que apresentou-se em maior proporção foi o ácido palmítico (C16:0). Tal achado é semelhante ao encontrado por outros autores (Renaud et al, 1970; Piche e Mahadevappa, 1990).

Nossos resultados referentes ao perfil de ácidos graxos dos lipídeos totais das plaquetas dos filhotes machos alimentados, desde o desmame, com dietas compostas por diferentes bases lipídicas, mostram valores percentuais significativamente maiores no somatório de AGM do grupo canola e, EPA e DHA, do grupo óleo de peixe, nos dois períodos avaliados (45 e 180 dias de vida). Estes achados indicam maior incorporação desses ácidos graxos nos lipídeos totais das plaquetas em decorrência das suas maiores proporções nos ácidos graxos das dietas manipuladas oferecidas aqueles grupos. Conforme os achados de outros autores (Tremoli et al, 1995; Nieuwenhuys e Hornstra, 1998), também verificamos aumento de EPA e DHA no grupo peixe, concomitante a diminuição do AA.

A quantidade de ácidos graxos *trans* incorporados às plaquetas dos animais estudados refletiu o perfil dos ácidos graxos das suas respectivas dietas, uma vez que estes ácidos graxos não são sintetizados pelos animais não ruminantes. A literatura refere que os isômeros *trans* diminuem a atividade da enzima $\Delta 6$ -dessaturase, alterando a biossíntese dos ácidos graxos essenciais de cadeia longa (Mahfouz et al, 1984; Kummerow et al, 2004). No entanto, no presente estudo, não observamos esse efeito nas plaquetas, uma vez que os animais tratados com ácidos graxos *trans* apresentaram, nos lipídeos totais de suas plaquetas, percentual elevado de AA e, percentuais de EPA e DHA, semelhantes aos dos grupos soja, palma e canola. Uma explicação plausível para esse achado relaciona-se à quantidade de ácido linoléico da dieta. Segundo Barrera-Relland e Block (1996), quando a quantidade de ácidos graxos essenciais na dieta encontra-se adequada, os AG *trans* não exercem efeitos inibitórios sobre a biossíntese dos AGPI-CL. Zevenberger e colaboradores (1988), propõem que o consumo de dietas ricas em isômeros *trans* apresenta efeito negativo sobre a biossíntese de AGPI, quando a

concentração de ácido linoléico é inferior a 14% da fração lipídica da dieta. Conforme mostra a Tabela 2, a dieta do GVPH continha aproximadamente 21% de ácido linoléico.

Por outro lado, a composição dos ácidos graxos dos lipídeos das plaquetas nem sempre é proporcional às quantidades dos mesmos, ou de seus precursores, fornecidos pela dieta (Piché e Mahadevappa, 1990; Nieuwenhuys e Hornstra, 1998).

O ácido linolênico, apesar de presente em todas as diferentes dietas consumidas pelos animais pertencentes aos grupos experimentais estudados, não foi incorporado nos lipídeos das plaquetas desses animais, com exceção daqueles incluídos no grupo peixe, aos 180 dias. No estudo de Piche e Mahadevappa (1990), semelhante aos nossos resultados, foi observado que o percentual de AA variou significativamente entre os grupos estudados por aqueles autores, sendo encontrado em menor proporção no grupo que recebeu óleo de fígado de bacalhau, correspondendo, no nosso estudo, ao grupo peixe. Estudos em humanos mostram que, quando dietas ricas em gordura saturada são substituídas por dietas ricas em ácidos graxos monoinsaturados, o aumento nas concentrações de ácido graxo oléico nos fosfolipídeos das plaquetas é modesto (Kwon et al, 1991) ou mesmo não observa-se qualquer tipo de alteração (Mutanen et al, 1992; Sarkkinen et al, 1994)

Nossos dados também mostram que o ácido araquidônico é o segundo em maior proporção nas plaquetas dos animais de todos os grupos experimentais, exceto nas pertencentes aos grupos canola e peixe, aos 45 dias e, ao grupo peixe, aos 180 dias. É plausível supor que o elevado percentual de AA, encontrado nas plaquetas desses animais, deva-se ao fato de que os ácidos graxos de 20 carbonos são menos oxidados do que os de 18 carbonos, sendo assim, o AA é menos oxidado do que o oléico, linolênico e linoléico (Leyton et al, 1987). Há limitada

informação acerca do grau de oxidação do AA. Coots, em 1965, observou taxa de oxidação muito reduzida e, incorporação de AA principalmente nos fosfolípidos. A reduzida taxa de oxidação dos AG de 20 carbonos, também se deve a maior incorporação desses ácidos graxos aos fosfolípidos, os quais, por sua vez, são mais facilmente incorporados às estruturas celulares do que os triglicerídeos (Sinclair *apud* Leyton et al, 1987). Adicionalmente, foi demonstrado que as plaquetas possuem uma sintase específica para o AA, provavelmente para assegurar a adequada incorporação deste AG aos fosfolípidos dessas células sanguíneas e também manter uma reduzida quantidade de AA livre no interior das mesmas (Mutanen, 1997).

Dado que a síntese de eicosanóides derivados do ácido araquidônico está associada ao aumento da agregação plaquetária, nos interessou averiguar as proporções desse ácido graxo nas plaquetas dos animais pertencentes aos diferentes grupos. Nieuwenhuys e Hornstra (1998), analisando o perfil de ácidos graxos nos fosfolípidos das plaquetas de ratos, encontraram maior proporção de AA no grupo alimentado com óleo de coco, rico em ácidos graxos saturados, comparada a do grupo de animais alimentados com óleo de girassol, rico em ácidos graxos poliinsaturados, embora, nessa última dieta, a proporção de AG linoléico, precursor do AA, tenha se apresentado mais elevada. Nossos dados mostram que, aos 45 dias de vida, as plaquetas dos animais do GVPH apresentaram maior percentual de AA, enquanto aquelas dos animais do grupo peixe, exibiram o menor percentual. Aos 180 dias, o GS apresentou percentual de AA, em suas plaquetas, maior do que o do grupo gordura vegetal hidrogenada e, o grupo peixe, o menor percentual. Aos 180 dias de vida, as razões AA/EPA dos lipídios totais das plaquetas dos animais que receberam dietas com diferentes bases lipídicas, desde o

desmame, mostraram-se 73,94%, 49,51% e 31,85% maiores do que aquelas referentes aos 45 dias de vida dos animais dos grupos canola; gordura vegetal hidrogenada e soja, respectivamente.

A elevada razão AA/EPA verificada para os lipídeos totais das plaquetas dos animais envelhecidos do grupo canola, sugestiva de maior poder de agregação plaquetária, motivou-nos a investigar a função plaquetária, tendo em vista ainda que muitos estudos têm explorado a relação entre os ácidos graxos dietéticos e a função plaquetária (Renaud et al, 1970; Nieuwenhuys e Hornstra, 1998).

Avaliamos a agregação plaquetária através da adição de um agonista (ADP) a uma suspensão de plaquetas (plasma rico em plaquetas), promotor da sua agregação. Aos 45 dias de vida, o grupo alimentado com dieta contendo óleo de peixe apresentou maior sensibilidade ao agonista, sugerindo maior tendência à agregação plaquetária, quando comparado aos grupos que receberam óleo de palma e gordura vegetal parcialmente hidrogenada. A maioria dos estudos realizados com suplementação de AGPI n-3, tem demonstrado redução na agregação plaquetária frente à administração de uma concentração fixa de agonista ou diminuição da quantidade necessária de agonista para promover a agregação (Kris-Etherton et al, 2001). Entretanto, são controversos os resultados de alguns estudos sobre a agregação plaquetária, envolvendo animais suplementados com AGPI de cadeia longa n-3. Há relatos quanto à redução, aumento ou mesmo nenhum efeito deste AG sobre a agregação (Mutanen, 1997). Freese e Mutanen (1997) demonstraram que a suplementação com EPA e DHA promoveu aumento da agregação plaquetária induzida por ADP, enquanto que quantidade semelhante de ácido linolênico suplementar não promoveu alteração. De outro modo, Nieuwenhuys e Hornstra (1998), não observaram alteração na agregação plaquetária, também

induzida por ADP, quando os animais receberam dieta contendo diferentes percentuais de EPA e DHA. Em humanos que receberam suplementação de 150 mg de EPA, observou-se redução na agregação plaquetária, induzida tanto por ADP como por outros agonistas (colágeno e adrenalina), sem que ocorresse modificação na composição dos ácidos graxos da membrana das plaquetas. (Dolecek, 1992). Recentemente, Din et al (2004) em seu estudo de revisão, sugeriram que a redução da agregação plaquetária devido à suplementação com óleo de peixe, somente é observada quando são fornecidas elevadas doses de omega-3. Adicionalmente, os resultados de estudos utilizando ácidos graxos omega 3 mostram efeitos inconsistentes sobre a fibrinólise e pobre efeito sobre a coagulabilidade sanguínea. Os autores concluem que a ingestão de pequena quantidade de AG ômega-3 não é relevante para a promoção de ação antitrombótica. Neste sentido, considerados os dados da literatura bem como os resultados do presente estudo, concluímos que a concentração de óleo de peixe presente na dieta oferecida ao GPX não foi suficiente para promover efeito anti-agregatório sobre as plaquetas dos animais incluídos nesse grupo experimental.

Aos 180 dias de vida, os animais do grupo gordura vegetal hidrogenada apresentaram valores de EC_{50} menores do que aqueles calculados para os animais do grupo soja e, comparativamente ao resultado obtido aos 45 dias, houve aumento da sensibilidade ao agonista, indicando que o consumo deste lipídeo dietético, por um longo período, pode ocasionar um aumento da agregação plaquetária.

Armstrog et al (2000), analisando os efeitos dos isômeros *trans* do ácido linolênico sobre a agregação plaquetária, observaram que a sensibilidade ao indutor (colágeno) foi semelhante entre indivíduos que consumiram dieta contendo grande ou pequena quantidade de ácidos graxos *trans*. Os valores de EC_{50} não diferiram

significativamente, indicando que o consumo de dietas contendo teores variados de ácidos graxos *trans* não promoveu mudança na função plaquetária. De outro modo, Stachowska et al (2004) verificaram que os isômeros *trans* promovem inibição das enzimas lipoxigenase e ciclooxigenase/tromboxano sintase nas plaquetas de indivíduos saudáveis.

Apesar de não ter sido estatisticamente significante, observamos uma tendência nos animais do grupo palma para o aumento da agregação plaquetária, aos 180 dias. Entretanto, a literatura refere que dietas à base de óleo de palma promovem diminuição da agregação plaquetária e da síntese de tromboxano A2 (Rand et al, 1988).

O estudo acerca da influência da fonte lipídica dietética sobre a agregação plaquetária permanece gerando resultados conflitantes. Hunter et al (2000), estudando a agregação plaquetária humana, não observaram efeito algum decorrente do consumo de ácido esteárico (AGS), ácido oléico (AGM) ou ácido linoléico (AGPI n-6), mesmo quando investigada a fluidez da membrana das plaquetas. Entretanto, Nieuwenhuys e Hornstra (1998) observaram que animais alimentados com óleo de girassol apresentaram uma tendência à menor agregação plaquetária em comparação aos animais que receberam dieta à base de óleo de coco hidrogenado. De outro modo, a hiperatividade das plaquetas, verificada entre coelhos alimentados com dieta aterogênica, foi reduzida nos animais suplementados com azeite de oliva. (De La Cruz et al, 2000). De qualquer forma, de acordo com Duque e Mello (2003), os testes funcionais de plaquetas não predizem, com acerto, a tendência à hemorragia ou à trombose.

Com o intuito de aprofundarmos este conhecimento, nos propomos a estudar outros fatores de risco associados à doença tromboembólica. Nesse sentido, os

estudos clínicos e experimentais, têm revelado uma relação, cada vez mais evidente, entre lipídeos séricos e desenvolvimento de aterosclerose e eventos trombóticos. Paralelamente, a literatura sugere que os ácidos graxos dietéticos produzem impacto significativo na concentração de lipídeos circulantes (Sánchez-Muñiz e Cuesta, 1998). Os clássicos estudos de Keys et al (1965) e Hegsted et al (1965) reportaram que os AGS aumentam os teores plasmáticos de colesterol total e LDL-colesterol, enquanto que os AGM não produzem efeito na lipemia e ainda, os AGPI n-6 diminuem colesterol total. Estudos mais recentes têm demonstrado que os AGPI n-3 de cadeia longa são hipotrigliceridêmicos, enquanto que os ácidos graxos *trans* promovem efeito hipercolesterolêmico (Gatto et al, 2001).

Nossos resultados, aos 45 dias, são condizentes com os resultados de estudos prévios que demonstram que o consumo de gordura vegetal hidrogenada, rica em ácidos graxos *trans*, promove aumento das concentrações circulantes de colesterol total e diminuição da HDL (Mesink e Katan, 1990; Denke, 1995). Embora o exato mecanismo através do qual os ácidos graxos *trans* modificam a concentração de lipídeos circulantes não esteja totalmente esclarecido, alguns autores sugerem que estes isômeros promovem aumento da atividade da enzima responsável pela transferência de ésteres de colesterol da HDL-colesterol para a LDL-colesterol e VLDL-colesterol (CETP:proteína transferidora de éster de colesterol) (van Tol et al, 1995; Gatto et al, 2001). Entretanto, os resultados obtidos para o nosso grupo gordura vegetal hidrogenada, aos 180 dias, mostram aumento significativo nos teores circulantes de HDL-colesterol, assemelhando-se aos teores verificados nos grupos soja e palma. É provável que a reduzida concentração de AG *trans*, utilizada no presente estudo, justifique o fato de não termos encontrado diferenças nas

concentrações dos lipídeos sanguíneos estudados, em relação ao grupo soja, ao longo do tempo.

Nossos resultados sugerem efeito hipocolesterolêmico do óleo de palma nos animais tratados com esse tipo de gordura, aos 45 dias de vida. Em humanos, o efeito da ingestão de óleo de palma sobre o colesterol sérico mostrou-se similar ao observado com a ingestão de azeite de oliva (Choudhury et al, 1995) ou óleo de canola (Truswell et al, 1992). O mecanismo pelo qual o óleo de palma altera o perfil lipídico sanguíneo não está totalmente elucidado, existindo diferentes hipóteses. Refere-se a peculiar composição de ácidos graxos desse óleo, tendo em vista que apresenta elevado percentual de ácido palmítico (C16:0) porém, também, grande proporção de AGM (Wahrburg, 2004) (Tabela 2). Hipótese alternativa para justificar o efeito hipocolesterolêmico do óleo de palma, atribui à presença, nesse óleo, de componentes com propriedades antioxidantes, tais como os tocotrienóis, tocoferóis e carotenóides (Edem, 2002). Contrariamente, aos 180 dias de vida, nossos animais do grupo palma apresentaram concentração elevada de colesterol total, conforme os resultados do estudo de Grundy e Vega (1988). Segundo Spady (1999), a atividade do receptor de LDL hepático, geralmente constitui o principal controlador das concentrações de LDL plasmática e, as gorduras saturadas tendem a suprimir a atividade deste receptor, reduzindo o "clearance" destas partículas e elevando as concentrações plasmáticas de colesterol a valores associados com risco aterogênico. De acordo com Champe e Harvey (2000), os ácidos graxos láurico, mirístico e palmítico são os principais ácidos graxos envolvidos na promoção de hipercolesterolemia e aterosclerose.

Muito embora já tenha sido demonstrado que o ácido oléico reduz os teores sanguíneos de colesterol (Wankenne, 2001), de forma tão efetiva quanto os AGPI

(Champe e Harvey, 2000), verificamos elevada concentração de colesterol total entre os nossos animais do grupo canola, aos 180 dias de vida. Apesar disso, esses animais apresentaram valores elevados de HDL-colesterol, tanto aos 45, quanto aos 180 dias. Champe e Harvey (2000) também encontraram que o ácido oléico não reduz o HDL-colesterol, porém mostraram a ocorrência de redução nos teores de colesterol total.

Apesar das evidências científicas sugestivas do efeito hipocolesterolêmico dos AGPI n-6, nossos resultados mostraram aumento da concentração sérica de colesterol total nos animais alimentados com dieta à base de óleo de soja, ainda que este grupo tenha apresentado, aos 180 dias, concentração significativamente maior de HDL-colesterol do que as concentrações respectivas dos grupos palma, gordura hidrogenada e peixe bem como concentração similar à do grupo canola.

Dentre as fontes lipídicas estudadas, o óleo de peixe foi a que promoveu os menores valores plasmáticos de colesterol total e HDL-colesterol. De acordo com Din et al (2004), o efeito mais evidente dos ácidos graxos ômega-3 no perfil lipoprotéico constitui na redução, dose dependente, das concentrações sanguíneas de triglicérides. De outro modo, os efeitos desse AG sobre o colesterol sanguíneo são insignificantes e de pouca importância clínica. Há referência de que o efeito hipocolesterolêmico dos AGPI n-3 só é observado em modelos experimentais envolvendo roedores, quando estes são alimentados com dietas ricas em colesterol (Sánchez-Muñiz e Cuesta, 1998). No presente estudo, evidenciamos importante efeito hipocolesterolêmico nos animais tratados com dieta à base de óleo de peixe.

Em conjunto, os resultados relativos ao perfil lipídico sanguíneo dos animais tratados com dietas compostas por diferentes bases lipídicas, desde o desmame até os 180 dias de vida, permitem-nos concluir que o grupo alimentado

com óleo de palma mostrou evolução mais desfavorável. Esse grupo, aos 180 dias, apresentou, em relação aos seus 45 dias de vida, elevação do colesterol sanguíneo e redução da concentração de HDL.

A adesão das plaquetas representa um sinal para a ativação da cascata de coagulação sanguínea. Quando o sangue coagula com muita facilidade, isto pode levar à trombose, fenômeno descritivo da coagulação em vaso sanguíneo intacto. Com base no mecanismo de ativação inicial da coagulação, foram identificadas duas vias: a via intrínseca e a via extrínseca. Essas duas vias convergem para uma via comum que termina com a formação de fibrina que, juntamente com o tampão plaquetário, formado a partir da ativação e agregação das plaquetas, forma um trombo ou um coágulo estável (Ajjan e Grant, 2005).

É reconhecida a importância das alterações na cascata de coagulação sanguínea na formação de trombos oclusivos (Miller, 1997). Do mesmo modo, tem sido revelada a influência da quantidade de lipídeo da dieta sobre os fatores da coagulação (Hunter et al, 2000). Entretanto, ainda existem muitas controvérsias acerca do envolvimento específico da composição dos ácidos graxos dietéticos com estes fatores de coagulação. Mennen et al (1996) não observaram qualquer alteração na cascata de coagulação em associação com a composição lipídica da dieta, no entanto, outros autores relataram mudanças na concentração plasmática de fatores da coagulação e/ou na atividade destes fatores, dependentes da fonte lipídica ingerida (Tholstrup et al, 1994; Tholstrup et al, 2003).

Avaliamos, no presente estudo, *in vitro*, o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), indicativo da atividade da via intrínseca da coagulação, que envolve os fatores VIII, IX, XI e XII bem como o tempo de protrombina (TP), indicativo da atividade da via extrínseca da coagulação, que envolve, especialmente o fator VII.

Através desses testes, buscamos investigar a influência dos diferentes tipos de ácidos graxos dietéticos, constituintes das dietas normolipídicas consumidas por nossos grupos de animais, sobre o tempo de coagulação sanguínea.

Aos 45 dias de vida, não verificamos diferença estatística entre os grupos para o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), sugerindo que os diferentes ácidos graxos pesquisados não promoveram alteração na via intrínseca de coagulação. Por outro lado, o tempo de protrombina (TP) mostrou-se significativamente prolongado nos grupos soja, palma e gordura vegetal hidrogenada, indicando que, nesta via, a ingestão destas fontes lipídicas, promoveu menor coagulabilidade. Para os grupos canola e peixe, observamos encurtamento no TP, sugerindo maior coagulabilidade.

Aos 180 dias, no entanto, observamos alterações nas duas vias da cascata de coagulação, em função da fonte lipídica dietética consumida. Os animais pertencentes aos grupos palma e canola apresentaram TTPa significativamente mais prolongado do que o TTPa dos animais dos grupos óleo de soja e gordura vegetal hidrogenada. Verificamos também prolongamento no tempo de protrombina (TP) no grupo peixe comparado ao TP do grupo gordura vegetal hidrogenada. Esses resultados são sugestivos de que a gordura hidrogenada, quando consumida por um período de tempo prolongado, pode estimular as vias intrínseca e extrínseca de coagulação, promovendo uma hipercoagulabilidade. Não são conhecidos os mecanismos através dos quais estas fontes lipídicas promovem os efeitos referidos. Tem sido referida hipótese que envolve processos relacionados à lipemia pós-prandial. Neste sentido, Silveira et al (1996) e Tholstrup et al (2003) reportaram que o grau de lipemia alimentar, ou seja, a quantidade de lipídeo na circulação sanguínea, tem efeito, dose dependente, sobre o *status* hemostático, principalmente

sobre a elevação da atividade coagulante de fatores da cascata de coagulação. Dietas hiperlipídicas resultam em hiperlipemia pós-prandial, o que determina maior produção de quilomícrons (Larsen et al, 2000). Essas lipoproteínas iniciam eventos que resultam na ativação do fator VII (Silveira et al, 1996; Larsen et al, 2000). Estes dados são sugestivos de uma maior ativação da via extrínseca da cascata de coagulação pelos lipídeos dietéticos, podendo resultar em encurtamento do tempo de protrombina.

O prolongamento do tempo de protrombina pode dever-se à deficiência de alguns fatores envolvidos nas vias de coagulação sanguínea, dentre estes o FVII (via extrínseca) e os fatores FII, FV, FX (vias extrínseca e intrínseca), ou ainda à presença de inibidores (deGruchy, 1983). Outra possibilidade para o prolongamento do tempo de protrombina é a redução do fator VII (Al-Jishi e Abuo Hozafa, 2003). Naito et al (2000), também observaram, nos animais alimentados com óleo de canola, tendência para tempo de protrombina mais curto do que o TP de animais alimentados com óleo de soja. O tempo de tromboplastina parcial ativada foi significativamente mais curto no grupo canola, também quando comparado ao TPPa do grupo óleo de soja. Diferentemente dos nossos resultados, Sano et al (2003) demonstraram que o tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcial ativada foram significativamente mais longos em animais que receberam dieta contendo óleo de peixe em comparação ao grupo controle (óleo de soja). Adicionalmente, estes autores encontraram que a atividade dos fatores das vias extrínseca e comum (II, V, VII e X) e da via intrínseca (VIII, IX, XI e XII), nos ratos alimentados com óleo de peixe, foi menor do que a atividade destes fatores nos ratos do grupo controle.

Os valores de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), obtidos aos 45 e 180 dias de vida, dos animais alimentados com as dietas compostas por diferentes bases lipídicas, indicam que os animais do grupo palma apresentaram, aos 180 dias de vida, TTPa cerca de 1,3 vezes maior do que aos 45 dias e, significante encurtamento do tempo de protrombina. Os animais alimentados com óleo de canola e óleo de peixe apresentaram, aos 180 dias, aumentos de aproximadamente 1,1 e 1,2 vezes respectivamente, no tempo de protrombina (TP), em relação aos valores de TP aferidos aos 45 dias.

Estes resultados indicam que a prolongada ingestão de óleo de canola e óleo de peixe proporcionou um estado de hipocoagulabilidade nos animais. É possível supor que alguns fatores da coagulação estejam com a sua atividade deprimida. Nieuwenhuys et al (1998) e Leray et al (2001), sugeriram que o efeito hipocoagulante do óleo de peixe é decorrente da redução de fatores da coagulação, dependentes de vitamina K.

O conjunto de dados da literatura bem como os nossos achados permite-nos concluir que existe grande variabilidade nos efeitos da ingestão de ácidos graxos dietéticos sobre a coagulação sanguínea. É possível especularmos que diversos fatores podem exercer influência sobre esta variabilidade, dentre estes, diferenças de tempo de administração da dieta bem como composição distinta dos lipídeos consumidos.

Cabe ressaltar que nem todo distúrbio hemorrágico ou hemostático constitui uma coagulopatia, tendo em vista que a coagulação é apenas uma etapa do processo hemostático completo (Miller, 2005). O equilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise é importante, uma vez que mecanismos fibrinolíticos, promotores da degradação enzimática do fibrinogênio e da fibrina e outros fatores de coagulação

ativados, permitem o reparo definitivo da injúria vascular e o controle sobre os eventos trombóticos (Kannel, 2005). Desta forma, se as alterações na coagulação são sempre acompanhadas da ativação da fibrinólise, favorecendo um reajuste no balanço dinâmico entre esses dois processos (Holmdahl, 1997), análises complementares da atividade fibrinolítica, como por exemplo, da síntese do ativador tecidual do plasminogênio (t-PA), da atividade do antígeno inibidor do ativador do plasminogênio do tipo 1 (PAI-1) e do tipo II (PAI-2) bem como da proteína C e S, da concentração plasmática de fibrinogênio, entre outras, seriam necessárias em investigações posteriores, buscando melhor elucidar os achados do presente estudo.

De maneira geral, sabe-se que a trombose arterial é predominantemente derivada da ativação das plaquetas, dos depósitos de lipídios e da proliferação celular na placa aterosclerótica. De outro modo, a trombose venosa é essencialmente dependente dos fatores hemostáticos (Feinbloom e Bauer, 2005). A maioria destes fatores relaciona-se às mudanças no fluxo sanguíneo bem como às mudanças na composição do sangue. Em combinação com o dano endotelial, os fatores hemostáticos criam um estado de hipercoagulabilidade localizado, podendo levar a formação excessiva de trombo (Rosendaal, 1999). Adicionalmente, estudos experimentais e clínicos têm, progressivamente, reconhecido o papel das plaquetas e do sistema de coagulação na evolução dos eventos trombóticos. Na extensão em que esses achados permitem e, considerados os nossos resultados, sugerimos que a manipulação lipídica da dieta guarda relação com a formação de acidentes trombóticos, tendo em vista que a ingestão de lipídeos dietéticos de diferentes naturezas promove alterações no sistema de coagulação sanguínea, na composição dos lipídeos totais das plaquetas e na resposta dessas células ao agonista.

Com base nessas evidências, buscamos avaliar a influência da ingestão dos diferentes lipídeos oferecidos aos animais sobre a formação de trombos venosos, nas duas fases do desenvolvimento.

Em nossos experimentos identificamos que, aos 45 dias de vida, o peso dos trombos venosos formados para todos os grupos não mostrou diferença significativa. Entretanto, os resultados encontrados aos 180 dias, demonstram que os animais do grupo canola apresentaram trombo venoso com peso significativamente maior comparado ao peso do trombo venoso dos animais pertencentes aos demais grupos experimentais e, peso também significativamente maior do que o aferido para o trombo venoso produzido pelos os animais desse mesmo grupo, aos 45 dias de vida.

Não encontramos na literatura trabalhos anteriores que tenham avaliado a influência de diferentes fontes lipídicas alimentares na formação de trombos venosos. Os dados disponíveis tratam, em sua maioria, da avaliação da formação de trombos arteriais. Aqueles que propõem analisar a formação de trombos venosos, limitam-se, em geral, ao estudo dos efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados omega-3. No entanto, há referência de que ratos alimentados com MaxEPA[®], uma mistura de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), apresentam menor peso de trombo venoso (Andriamampandry et al, 1999). Esses autores observaram, adicionalmente, que a ingestão de EPA ou DHA, isoladamente, não promoveu atividade antitrombótica, sugerindo que a combinação desses dois ácidos graxos é necessária para induzir uma resposta específica. Neste contexto, também observamos no nosso estudo, ainda que sem significância estatística, que o grupo que recebeu dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados n-3 (GPX) apresentou, aos 180 dias, trombo venoso com peso inferior ao produzido aos 45 dias de vida.

Em conjunto, nossos dados sugerem que o consumo de dietas à base de óleo de canola, desde a lactação até a fase de envelhecimento, apesar de não alterar a agregação plaquetária e promover prolongamento do tempo de protrombina, resulta em maior formação de trombo venoso. Esses achados reforçam o reconhecimento da existência de outros fatores capazes de interferir na formação do trombo, através de mecanismos que não foram avaliados no presente estudo. Neste sentido, cabe ressaltar a importância da fibrinólise na incidência de acidentes tromboembólicos, como já comentando anteriormente, considerada importante marcador de risco para doenças cardiovasculares (Miller, 2005). Adicionalmente, refere-se que alguns fatores envolvidos nesse processo, tais como o fibrinogênio, o ativador de fibrinogênio tecidual (t-PA) e o inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1), sofrem influência da composição lipídica da dieta (Lopez-Segura et al, 1996; Mutanen e Aro, 1997; Temme et al, 1999).

7 CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos e os resultados obtidos, pode-se verificar que o consumo de dietas isocalóricas e normolipídicas contendo diferentes fontes lipídicas — óleo de soja, óleo de palma, óleo de canola, gordura vegetal parcialmente hidrogenada e o óleo de peixe — oferecidas desde a lactação até a idade jovem e fase de envelhecimento, promoveu os seguintes efeitos nos filhotes machos:

Na idade jovem (até os 45 dias de vida):

- menor consumo de dieta nos grupos que receberam dietas à base de gordura vegetal hidrogenada e à base de óleo de canola comparado aos demais grupos. Aos 45 dias o grupo alimentado com dieta à base de óleo de peixe apresentou o maior consumo alimentar.
- maior ganho de massa corporal nos animais alimentados com dieta à base de óleo de palma.
- maior incorporação do ácido araquidônico nos lipídeos totais das plaquetas no grupo que recebeu dieta à base de gordura vegetal parcialmente hidrogenada e menor incorporação desse ácido no grupo alimentado com dieta à base de óleo de peixe. Dos grupos estudados, o grupo gordura vegetal parcialmente hidrogenada foi o único que apresentou incorporação de *trans* nos lipídeos totais das plaquetas.
- maior concentração sérica de colesterol total nos animais dos grupos gordura vegetal parcialmente hidrogenada e canola e concentração reduzida de colesterol total e HDL-c nos animais que receberam dieta contendo óleo de peixe, sugerindo um efeito hipolipemiante de dietas à base de óleo de peixe. O grupo que recebeu gordura vegetal parcialmente hidrogenada como fonte lipídica dietética apresentou valores de HDL-c menores comparado aos grupos soja, palma e canola.

- os grupos óleo de canola e óleo de peixe apresentaram menor tempo de coagulação sanguínea avaliada pela via extrínseca (TP), sugerindo maior coagulabilidade nos animais que consumiram dietas a base de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados.
- dietas à base de óleo de palma e gordura vegetal parcialmente hidrogenada promoveram menor sensibilidade ao agonista, permitindo-nos sugerir que essas dietas ocasionam menor agregação plaquetária comparada àquela com óleo de peixe.
- as diferentes fontes lipídicas não promoveram alteração no peso do trombo venoso nos animais dos grupos estudados.

Na fase de envelhecimento (180 dias de vida):

- não houve diferença significativa no consumo alimentar entre os grupos estudados.
- aumento da massa corporal nos animais alimentados com dieta à base de óleo de palma e com dieta à base de gordura vegetal parcialmente hidrogenada. Observou-se também menor ganho de massa corporal nos animais do grupo alimentado com óleo de canola.
- menor incorporação do ácido araquidônico nos lipídeos totais das plaquetas nos grupos peixe e canola. Observa-se também maior incorporação de EPA nos lipídeos totais das plaquetas no grupo que recebeu óleo de peixe. Dos grupos estudados, o grupo alimentado com dieta confeccionada com gordura vegetal parcialmente hidrogenada foi o único que apresentou incorporação de *trans* nos lipídeos totais das plaquetas.
- menor concentração sérica de colesterol total no grupo alimentado com óleo de peixe. Os animais do grupo canola apresentaram valores de HDL-c mais elevados comparado aos grupos palma, gordura vegetal parcialmente hidrogenada e peixe.

- os animais que consumiram óleo de palma e óleo de canola apresentaram tempo de coagulação sanguínea, avaliada pela via intrínseca (TTPa), mais prolongado, sugerindo maior coagulabilidade, comparado aos animais alimentados com dietas à base de óleo de soja, gordura vegetal hidrogenada e óleo de peixe.
- a ingestão de gordura vegetal hidrogenada promoveu, nas plaquetas dos animais, maior sensibilidade ao agonista comparado ao grupo soja, o que nos faz supor que animais alimentados com GVPH apresentaram maior agregação plaquetária do que aqueles alimentados com óleo de soja.
- os animais que receberam dieta à base de óleo de canola formaram trombos venosos com peso significativamente maior em comparação aos animais dos demais grupos.

Comparando a fase de envelhecimento (180 dias de vida) com a fase jovem (45 dias de vida):

- aumento de 1,7 vezes da relação AA/EPA nos lipídeos totais das plaquetas dos animais que receberam dieta à base de óleo de canola, sugerindo maior poder agregatório plaquetário nesse grupo.
- aumento da concentração sérica de colesterol total nos grupos que receberam dieta à base de óleo de soja e dieta à base de óleo de palma. Os animais alimentados com gordura vegetal hidrogenada apresentaram aumento da concentração de HDL-c.
- prolongamento significativo no tempo de coagulação sanguínea nos animais do grupo palma (TTPa e TP) e canola (TP) e uma diminuição no grupo de gordura hidrogenada.

- dietas a base de gordura hidrogenada e óleo de palma mostraram-se capazes de reduzir a EC_{50} , indicando maior potencial de agregação plaquetária quando esses animais se tornam envelhecidos.
- observou-se uma tendência nos animais dos grupos soja e peixe em diminuir o peso do trombo venoso, enquanto os grupos palma, gordura vegetal parcialmente hidrogenada e canola apresentaram aumento do peso do trombo venoso, embora essa diferença só tenha sido significativa para o grupo alimentado com óleo de canola.

Baseado no conjunto de dados obtidos conclui-se que o consumo de gordura hidrogenada, rica em ácidos graxos *trans*, demonstra exercer efeito anti hemostático no início da vida, entretanto seu consumo a longo prazo promove alterações no sistema hemostático, que implica na propensão à eventos tromboembólicos. Apesar da ingestão de óleo de peixe e canola predispor a uma hipercoagulabilidade na fase jovem, o prolongado consumo desses óleos promove o prolongamento do tempo de coagulação sanguínea.

A ingestão de óleo de palma a longo prazo promove aumento no tempo de coagulação da via intrínseca concomitante ao encurtamento no tempo de coagulação da via extrínseca. Contudo há uma tendência ao aumento da agregação plaquetária aos 180 dias, sugerindo que esses animais provavelmente não apresentam risco trombótico, não descartando, entretanto, a hipótese de haver alguma alteração em outras vias do sistema hemostático.

O óleo de canola, contrapondo com a maioria dos relatos da literatura, demonstrou maior propensão à trombose venosa nos animais em idade mais tardia, ainda que estudos posteriores neste modelo experimental avaliando trombose

arterial, a atividade fibrinolítica ou mesmo a síntese de ativador tecidual do plasminogênio (t-PA), ou de outras vias do sistema hemostático seriam necessárias para confirmar a sugestão que o óleo de canola pode apresentar risco para doença tromboembólicas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajjan R, Grant PJ. Coagulation and atherothrombotic disease. *Atherosclerosis*. In Press 2005.

Al-Jishi SA, Abuho Hozafa B. Effect of *Nigella sativa* on blood hemostatic function in rats. *J Ethnopharmacol* 2003;85:7–14.

Andriamampandry MD, Leray C, Freund M, Cazenave JP, Gachet C. Antithrombotic effects of (n-3) polyunsaturated fatty acids in rat models of arterial and venous thrombosis. *Thrombosis Research* 1999; 93: 9-16.

Armstrong RA, Chardigny JM, Beaufrère B, Bretillon L, Vermunt SHF, Mensink RP, Macvean A, Elton RA, Sébédio JL, Riemersma RA. No Effect of Dietary Trans Isomers of α -linolenic Acid on Platelet Aggregation and Haemostatic Factors in European Healthy Men: The TRANSLinE Study. *Thrombosis Research* 2000;100:133–141.

Ascherio A, Katan MB, Zock PL, Stampfer MJ, Willett WC. Trans fatty acids and coronary heart disease. *N Engl J Med*. 1999; 340(25):1994-8.

Barker DJP. *Mothers, babies and disease in later life*. London: BMJ Books, 1994.

Barrera-Relland D e Block JM. Ácidos grasos *trans* em aceites hidrogenados: implicaciones técnicas y nutricionales. *Grasas y Aceites* 1996; 44(4-5):28-93.

Beare-Rogers JL. Trans positional isomers of common fatty acids. *Adv Nutr Res* 1988;5:171-200.

Bernardi, PSM, Moreira HW. Analysis of the waves and aggregation patterns in patients with cardiovascular diseases in using acetylsalicylic acid compared blood donors. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2004;26(4):239-44.

Borkamn M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV. The relationship between insulin sensitivity and the fatty acid compositions or phospholipids of skeletal muscle. *N Engl J Med* 1993;328:238-44.

Calder PC. Effects of fatty acids and dietary lipids on cells of the immune system. *Proc Nutr Soc* 1996;55:127-50.

Chait A, Brunzell JD, Denke MA, Einsenberg D, Ernst ND, Franklin FA, Ginsberg H, Kotchen TA, Kuller L, Mullis RM, Nichaman MZ, Nicolosi RJ, Schaefer EJ, Stone NJ, Weidman WH. Rationale of the diet-heart statement of the American Heart Association - report of the nutrition committee. *AHA Medical/ Scientific Statement - Special Report* 1992:3008-29.

Champe PC, Harvey RA. *Bioquímica ilustrada*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2000.

Chong YH, Ng TK. Effects of Palm oil on cardiovascular risk. *Med J Malays* 1991;46: 41-50.

Choudhury N, Tan L, Truswell AS. Comparison of palmolein and olive oil: effects on plasma lipids and vitamin E in young adults. *Am J Clin Nutr* 1995;61(5):1043-51.

Colandré ME, Diez RS, Bernal CA. Metabolic effects of trans fatty acids on an experimental dietary model. *British Journal of Nutrition* 2003;89:631–8.

Connor WE. Omega-3 essential fatty acid in infant neurological development. *PUFA Information* 1996;1(1):1-6.

Coots RH. Metabolism of arachidonic acid- ^{14}C in the rat. *Journal of Lipid Research* 1965;6:494-7.

Das DK. Cardioprotection with high-density lipoproteins: fact or fiction? *Circ Res* 2003;92(3):258-60.

Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. *Biochemistry* 1991;30:10363-70.

De La Cruz JP, Villalobos MA, Carmona JA, Martin-Romero M, Smith-Agreda JM, Sanchez De La Cuesta F. Antithrombotic potencial of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol. *Thrombosis Research* 2000;100:305-15.

De Marco L, Girolami A, Zimmerman TS, Ruggeri ZM. Interaction of purified type IIB von Willebrand factor with the platelet membrane glycoprotein Ib induces fibrinogen binding to the glycoprotein IIb/IIIa complex and initiates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82(21):7424-8.

deGruchy GC. *Clinical Haematology in Medical Practice*. UK: Blackwell Scientific Publications; 1983. p.698.

DeLany JP, Windhauser MM, Champagne CM, Bray GA. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr* 2000;72(4):905-11.

Denke MA. *Trans Fatty Acids and Coronary Heart Disease Risk: Serum Lipid Concentrations in Humans*. *Am J Clin Nutr* 1995;62:693-700.

Din JN, Newby DE, Flapan AD. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease--fishing for a natural treatment. *BMJ* 2004;328(7430):30-5.

Dolecek TA. Epidemiological evidence of relationships between dietary polyunsaturated fatty acids and mortality in the multiple risk factor intervention trial. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:177–82.

Duque FL, Mello NA. Trombogênese – Trombofilia. *J Vasc Br* 2003;2(2):105-18.

Dutta-Roy AK: Fatty acid transport and metabolism in the feto-placental unit and the role of fatty acid-binding proteins. *Nutritional Biochemistry*, 1997; 8:548-57.

Dutton H. Hydrogenation of fats and oils and its significance. In: Geometric and positional fatty acid isomers. Emken E, Dutton H. Eds Am Oil Chem Soc Publ 1978. p. 99-129.

Edem DO. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review. *Plant Foods for Human Nutrition* 2002;57:319–41.

Enig MG, Munn RJ, Keeney M. Dietary fat and cancer trends - a critique. *Fed Proc* 1978;37(9): 2215-20.

Feinbloom D, Bauer KA. Assessment of hemostatic risk factors in predicting arterial thrombotic events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(10):2043-53.

Field CJ, Ryan EA, Thomson, ABR, Clandin, MT. Dietary fat and the diabetic state alter insulin binding and the fatty acyl composition of the adipocyte plasma membrane. *Biochem J* 1988;253:417-24.

Franco RF. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto* 2001;34:229-37.

Freese R, Mutanen M. Alpha-linolenic acid and marine long-chain n-3 fatty acids differ only slightly in their effects on hemostatic factors in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 1997;66(3):591-8.

Galli C. Digestion, absorption and metabolism of fatty acids. Specific role of n-6 and n-3 fatty acids. Joint FAO/WHO Expert Consultation of fats and oils in Human Nutrition. Document D/V 2816, 1994.

Gatto LM, Lyons MA, Brown AJ, Samman S. *Trans* Fatty Acids Cholesterol Metabolism: Mechanism Studies in Rats and Rabbits Fed Semipurified Diets. *Int J Food Sci Nutr* 2001;52:435-41.

Graziola F, Solis VS, Curi R. Estrutura química e classificação dos ácidos graxos. In: *Entendendo a gordura: os ácidos graxos*. Manole; 2002. p.7-23.

Grundey SM, Denke MA. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res* 1990;31:1149-72.

Grundey SM, Vega GL. Plasma cholesterol responsiveness to saturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 1988;47:822-4.

Han SN, Leka LS, Lichtenstein AH, Ausman LM, Schaefer EJ, Meydani SN. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *Journal Lipid Research* 2002;43:445–52.

Hegsted DM, McGandy RB, Myers ML, Stare FJ. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr* 1965;17:281-95.

Heinrich J, Balleisen L, Schulte H, Assmann G, van de Loo J. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk. Results from the PROCAM study in healthy men. *Arterioscler Thromb* 1994;14:54-9.

Hirai A, Hamazaki T, Terano T, Nishikawa T, Tamura Y, Kumagai A, Sajiki J. Eicosapentaenoic acid and platelet function in Japanese. *Lancet* 1980; 2:1132-3.

Hirsh J, Weitz JI. Thrombosis and anticoagulation. *Semin Hematol* 1999; 36(4 Suppl 7):118-32.

Holmdahl L. The role of fibrinolysis in adhesion formation. *Eur J Surg* 1997;Suppl 577:24-31.

Hornstra G. Influence of dietary fat type on arterial thrombosis tendency. *J Nutr Health Aging* 2001;5(3):160-6.

Hornstra G, Kester ADM. Effect of the dietary fat type on arterial thrombosis tendency: systematics studies with a rat model. *Atherosclerosis* 1997;131:25-33.

Hunter KA, Crosbie LC, Weir A, Miller GJ, Dutta-Roy AK. A residential study comparing the effects of diets rich in stearic acid, oleic acid, and linoleic acid on fasting blood lipids, hemostatic variables and platelets in young healthy men. *J Nutr Biochem* 2000;11:408-16.

Illingworth DR, Harris WS, Connor WE. Inhibition of low density lipoprotein synthesis by dietary omega-3 fatty acids in humans. *Arteriosclerosis* 1984;4:270-75.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003:análise da disponibilidade de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro; 2004.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003. Aquisição alimentar domiciliar *per capita*, Brasil e grandes regiões. Rio de Janeiro; 2004.

Isong EU, Ebong PE, Ifon ET, Umoh IB, Eka OU. Thermoxidized palm oil induces reproductive toxicity in healthy and malnourished rats. *Plant Foods Hum Nutr* 1997;51(2):159-66.

Jones PJ. Effect of fatty acid composition of dietary fat on energy balance and expenditure in hamsters. *Can J Physiol Pharmacol* 1989;67(9):994-8.

Jones PJH, Pencharz PB, Clandinin MT. Whole body oxidation of dietary fatty acids: implications for energy utilization. *Am J Clin Nutr* 1985;42:769-777.

Kannel WB. Overview of hemostatic factors involved in atherosclerotic cardiovascular disease. *Lipids* 2005;40(12):1215-25.

Katan MB. Trans fatty acids and plasma lipoproteins. *Nutr Rev* 2000;58 (6):188-91.

Kato A, Yamaoka K, Tanaka A, Komiyama K, Umezauk L. Physiological effect of tocotrienol. *Jpn Oil Chem Sci* 1985;34:375-76.

Kelly FD, Sinclair AJ, Mann NJ, Turner AH, Abedin L, Li D. A stearic acid-rich diet improves thrombogenic and atherogenic risk factor profiles in healthy males. *Eur J Clin Nutr* 2001;55(2):88-96.

Keys A. Blood lipids in man – a brief review. *J Am Diet Assoc* 1967;51(6):508-16.

Kinsella JE, Bruckner G, Mai J, Shimp J. Metabolism of trans fatty acids with emphasis on the effects of trans, trans-octadecadienoate on lipid composition, essential fatty acid, and prostaglandins: an overview. *Am J Clin Nutr*. 1981;34(10):2307-18

Kinsella JE. Effects of polyunsaturated fatty acids on factors related to cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 1987;60:23-32.

Koletzko B, Schmidt E, Bremer H, Haug M, Harzer G. Effects of long-chain polyunsaturated fatty acids on the essential fatty acids status of premature infants. *Eur J Pediatr* 1989;148:669-75.

Kris-Etherton P, Daniels SR, Eckel RH, Engler M, Howard BV, Krauss RM, Lichtenstein AH, Sacks F, St. Jeor S, Stampfer M, Grundy SM, Appel LJ, Byers T, Campos H, Cooney G, Denke MA, Kennedy E, Marckmann P, Pearson TA, Riccardi G, Rudel LL, Rudrum M, Stein DT, Tracy RP, Ursin V, Vogel RA, Zock PL, Bazzarre TL, Clark J. AHA scientific statement: summary of the Scientific Conference on Dietary Fatty Acids and Cardiovascular Health. Conference summary from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *J Nutr* 2001;131(4):1322-6.

Kummerow, FA, Zhou Q, Mahfouz MM, Smiricky MR, Grieshop CM, Schaeffer DJ. Trans fatty acids in hydrogenated fat inhibited the synthesis of the polyunsaturated fatty acids in the phospholipid of arterial cells. *Life Sciences* 2004;74:2707-23.

Kwon JS, Snook JT, Wardlaw GM, Hwang DH. Effects of diets high in saturated fatty acids, canola oil, or safflower oil on platelet function, thromboxane B2 formation, and fatty acid composition of platelet phospholipids. *Am J Clin Nutr* 1991;34:351-358.

Larsen LF, Bladbjerg EM, Jespersen J, Marckmann P. Effects of dietary fat quality on postprandial activation of blood coagulation factor VII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2904-9.

Larsen LF, Marckmann P, Bladbjerg EM, Ostergaard PB, Sidelmann J, Jespersen J. The link between high-fat meals and postprandial activation of blood coagulation factor VII possibly involves kallikrein. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60:45-54.

Lawson LD, Hill EG, Holman RT. Suppression of arachidonic acid in lipids of rat tissues by dietary mixed isomeric cis and trans octadecenoates. *J Nutr* 1983;113:1827-35.

Leonhardt M, Langhans W. Fatty acid oxidation and control of food intake. *Physiol Behav* 2004;83:645–51.

Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipid in on-step reaction. *J Lip Res* 1986;27:114-20.

Leray C, Wiesel ML, Freund M, Cazenave JP, Gachet C. Long-chain n-3 fatty acids specifically affect rat coagulation factors dependent on vitamin K. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:459-63.

Leray C, Wiesel ML, Freund M, Cazenave JP, Gachet C. Long-chain n-3 fatty acids specifically affect rat coagulation factors dependent on vitamin K relation to peroxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:459–63.

Leyton J, Drury PJ, Crawford MA. Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. *Br J Nutr* 1987;57(3):383-93. Erratum in: *Br J Nutr* 1987;58(2):following 331.

Libby P, Rid K, Maseri PM. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135–43.

Lichtenstein AH, Kennedy E, Barrier P, Danford D, Ernst ND, Grundy SM, Leveille GA, Van Horn L, Williams CL, Booth SL. Dietary fat consumption and health. *Nutr Rev* 1998;56:S19-28.

Lichtenstein AH. Trans fatty acid and hydrogenated fats –What do we know ? *Nutrition Today* 1995;30(3).

Loi C, Chardigny JM, Almanza S, et al. Incorporation and metabolism of dietary trans isomers of linol acid alter the fatty acid profile of rat tissues. *J Nutr* 2000;130:2550-5.

Long JD, Orlando RC. Eicosanoids and the esophagus. *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 2000;61:91-104.

Lopez-Segura F, Velasco F, Lopez-Miranda J, et al. Monounsaturated fatty acid-enriched diet decreases plasma plasminogen activator inhibitor type 1. *Art Thromb Vasc Bio* 1996;16:82-8.

Mahfouz MM, Johnson S, Holman RT. The effect of isomeric trans 18:1 acids on desaturation of palmitic, linoleic and eicosa-8, 11, 14-trienoic acids by rat liver microsomes. *Lipids* 1980;15:100-7.

Mahfouz MM, Smith TL, Kummerow FA. Effect of dietary fats on desaturase activities and the biosynthesis of fatty acids in rat-liver microsomes. *Lipids* 1984;19(3):214-22.

Mahrabian M, Peter JB, Barnard RJ, Lusic AJ. Dietary regulation of fibrinolytic factors. *Atherosclerosis* 1990;84:25–32.

Malyszko J, Urano T, Knofler R, Ihara H, Takada Y, Takada A. Relationships between serum lipids serotonin platelet aggregation and some fibrinolytic parameters in humans. *Life Sci* 1994;55:1619–23.

Manorama R, Chinnasamy N, Rukmini C. Effect of red palm oil on some hepatic drug-metabolizing enzymes in rats. *Food Chem Toxicol* 1993;31(8):583-8.

Mantzioris E, James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Differences exist in the relationships between dietary linoleic and α -linolenic acids and their respective long-chain metabolites. *Am. J. Clin. Nutr* 1995;61:320-24.

Mates RD. Taste and lipid metabolism in humans. *Physiol Behav* 2005; 86:691-7.

Mattson FH, Hollenbach EJ, Kligman AM. Effect of hydrogenated fat on the plasma cholesterol and triglyceride levels of man. *Am. J. Clin. Nutr* 1975;28:726-31.

Mennen LI, Schouten EG, Grobbee DE, Klufft C. Coagulation factor VII, dietary fat and blood lipids: A review. *Thromb Haemost* 1996;76:492-9.

Mesink RP, Katan MB. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med* 1990;323:439-45.

Miller G, Martin J, Mitropoulis K, Reeves B, Thompson R, Meade T, Cooper J, Cruickshank J. Plasma factor VII is activated by postprandial triglyceridemia, irrespective of dietary fat composition. *Atherosclerosis* 1991;86:163-71.

Miller GJ. Dietary fatty acids and blood coagulation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997;57:389–94.

Miller GJ. Dietary fatty acids and the haemostatic system. *Atherosclerosis* 2005;179:213-27.

Moncada S, Vane JR. Prostacyclin in the cardiovascular system. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res* 1985;15:257-9.

Moretti RB. "Alimentos funcionais: Uma Panacéia Mundial". In: Tavares M, Turatti JM. *Seminário sobre Óleos e Gorduras: Tendências e Inovações*. Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras, São Paulo; 1999. p. 73.

Moura AS, Franco Sá, CCN, Cruz, HG, Costa CL. Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of insulin and leptin. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:617-22.

Muller H, Seljeflot I, Solvoll K, Pederse JI. Partially hydrogenated soybean oil reduces postprandial t-PA activity compared with palm oil. *Atherosclerosis* 2001;155:467-76.

Mutanen M. Cis-unsaturated fatty acids and platelet function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (1997) 57(4 & 5), 403-410.

Mutanen M, Aro A. Coagulation and fibrinolysis factors in healthy subjects consuming high stearic or trans fatty acids. *Thromb Haemost* 1997;77:99-104.

Mutanen M., Freese R., Valsta L. M., Ahola I., Ahlström A. Rapeseed oil and sunflower oil diets enhance platelet in vitro aggregation and thromboxane production in healthy men when compared with milk fat or habitual diets. *Thromb Haemostas* 1992; 67:352-6.

Naito Y, Konishi C, Ohara N. Blood coagulation and osmolar tolerance of erythrocytes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats given rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat. *Toxicol Letters* 2000;117:209–15.

Nesaretem K, Devasagayam TP, Singh BB, Basiron Y. Influence of palm oil or its tocotrienol-rich fraction on the lipid peroxidation of rat liver mitochondria and microsomes. *Biochem Mol Biol Int* 1993;30:159-67.

Nieuwenhuys CMA, Béguin S, Offermans RFG, Emeis JJ, Hornstra G, Heemskerk JWM. Hypocoagulant and lipid-lowering effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids with unchanged platelet activation in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1480–9.

Niuwenhuys CMA, Hornstra G. The effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on arterial thrombosis tendency and platelet function in rats. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998;1390:313-22.

Nordoy A, Davenas E, Ciavatti M, Renaud S. Effect of dietary (n-3) fatty acids on platelet function and lipid metabolism in rats. *Biochim Biophys Acta* 1985;835:491–500.

Oosthuizen W, Vorster HH, Jerling JC, Barnard HC, Smuts CM, Silivis N, Kruger A. Both fish oil and olive oil lowered plasma fibrinogen in women with high baseline fibrinogen levels. *Thromb Haemost* 1994;72:557–62.

Osim EE, Mbajjorgu EF, Mukarati G, Vaz RF, Makufa B, Munjeri O, Musabayane CT. Hypotensive effect of crude extract *Olea. africana* (Oleaceae) in normo and hypertensive rats. *Cent Afr J Med* 1999;45(10):269-74.

Otton R, Graziola F, Hirata MH, Curi R, Williams JF. Dietary fats alter the activity and expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat lymphoid cells and tissues. *Biochem. Mol. Biol. Int* 1998;46(3):529-36.

Pan WH, Chiang BN. Plasma lipid profiles and epidemiology of atherosclerotic diseases in Taiwan - a unique experience. *Atherosclerosis* 1995;118(2):285-95.

Pedersen A. La fabricación de margarina: Tecnología y proceso. *Aceites & Grasas* 1994;4:4-49.

Pereira LO; Francischi RP; Lancha-Junior AH. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003;47/2:111-127.

Piche LA, Mahadevappa VG. Modification of rat platelet fatty acid composition by dietary lipids of animal and vegetable origin. *J Nutr* 1990;120(5):444-9.

Pirich C, Gaszo A, Granegger S. Effects of fish oil supplementation on platelet survival and ex vivo platelet function in hypercholesterolemic patients. *Thromb Res* 1999; 96:219-27.

Portillo MP, Chávarri M, Durán D, Rodríguez VM, Macarulla MT. Differential Effects of diets That Provide Different Lipid Sources on Hepatic Lipogenic Activities in Rats Under Ad Libitum or Restricted Feeding. *Nutrition* 2001;17:467– 73.

Praticò D. Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis* 2005;181:215-24.

Rand ML, Hennsen AAHM, Hornstra G. Effects of dietary palm oil on arterial thrombosis, platelet responses and platelet membrane fluidity in rats. *Lipids* 1988;23(11):1019–23.

Reeves PG, Neilesen FH, Fahey GC. American Institute of Nutrition (AIN). Purified Rodent Diets. *Journal of nutrition* 1993;123:1939-51.

Renaud S, Kuba K, Goulet C, Lemire Y, Allard C. Relationship between Fatty-Acid Composition of Platelets and Platelet Aggregation in Rat and Man: Relation to Thrombosis. *Circ Res* 1970;26:553-564.

Renaud S. Linoleic acid, platelet aggregation and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1990;80(3):255-6.

Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol. Ther* 1999;83:217-44.

Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999;353:1167-73.

Rosenthal M, Doloresco M. The effects of trans fatty acids on fatty acid delta 5 desaturation by human fibroblasts. *Lipids* 1984;19:869-74.

Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115–126.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis—a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801–9.

Sánchez-Muñiz FJ, Cuesta C. Lipid metabolism in experimental animals. *Grasa y Aceites* 1998;49(Fasc.3-4):340-6.

Sanders TAB, deGrassi T, Miller GJ, Morrissey JH. Influence of fatty acid chain length and cis/trans isomerization on postprandial lipemia and factor VII in healthy subjects (postprandial lipids and factor VII). *Atherosclerosis* 2000;149:413-20.

Sano Y, Sato K, Uchida M, Murata M. Blood Coagulation and Fibrinolysis of Rats Fed Fish Oil: Reduced Coagulation Factors Especially Involved in Intrinsic Pathway and Increased Activity of Plasminogen Activator Inhibitor. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003;67(10):2100-05.

Sarkkinen ES, Agren JJ, Ahola I, Ovaskainen ML, Uusitupa MJ. Fatty acid composition of serum cholesterol esters, and erythrocyte and platelet membranes as indicators of long-term adherence to fat-modified diets. *Am J Clin Nutr* 1994;39:364-70.

Siddiqui RA, Shaikh SR, Sech LA, Yount HR, Stillwell W, Zaloga GP. Omega 3 fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action. *Mini Rev Med Chem* 2004;4(8):859-71.

Silveira A, Karpe F, Johnsson H, Bauer KA, Hamsten A. In vivo demonstration in humans that large postprandial triglyceride-rich lipoproteins activate coagulation factor VII through the intrinsic coagulation pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1333-9.

Smidovnick A, Stimac A, Kobe J. Effect of temperature on linoleic acid loss and 18:3 delta 9 cis, delta 12-cis, delta 15-trans formation in soybean oil. *J Am Oil Chem. Soc* 1993;69:405-9.

Smith RD, Kelly CNM, Fielding BA, Hauton D, Silva KDRR, Nydahl MC, Miller GJ, Williams CM. Long-term monounsaturated fatty acid diets reduce platelet aggregation in healthy young subjects. *British Journal of Nutrition* 2003;90(3):597-606.

Sommerfeld M. Trans unsaturated fatty acids in natural products and processed foods. *Prog Lipid Res* 1983;22:221-33.

Spady, DK. dietary fatty acids and atherosclerosis regression. *British Journal of Nutrition* 1999;82:337-8.

Stachowska E, Dolegowska, B., Chlubek, D., Wesolowska, T., Ciechanowski, K., Gutowski, P., Szumilowicz, H., Turowski, R. Dietary trans fatty acids and composition of human atheromatous plaques. *Eur J Nutr* 2004;43:313-8.

Stein DT, Stenvenson E, Chester MW, Basit M, Daniels MB, Turley SD, McGarry JD. The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J Clin Invest* 1997;100:398-403.

Stipanuk MH. *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*. W.B.Saunders Company, 2000.

Szitényi P, Janda J, Poledne R. Intrauterine undernutrition and programming as a new risk of cardiovascular disease in later life. *Physiol Res* 2003;52:389-95.

Teitelbaum JE, Walker WA. Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. *J Nutr Biochem* 2001;12:21-32.

Temme EH, Mensink RP, Hornstra G. Effects of diets enriched in lauric, palmitic or oleic acids on blood coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1999;81:259-63.

Tholstrup T, Marckmann P, Jespersen J, Sandström B. Fat high in stearic acid favorable affects blood lipids and factor VII coagulant activity in comparison with fats high in palmitic acid or high in myristic and lauric acids. *Am J Clin Nutr* 1994;59:371-7.

Tholstrup T, Marckmann P, Jespersen J, Vessby B, Jart A. Effect on blood lipids, coagulation, and fibrinolysis of a fat high in myristic acid and a fat high in palmitic acid. *Am J Clin Nutr* 1994;60:919-25.

Tholstrup T, Miller GJ, Bysted A, Sandström B. Effect of individual dietary fatty acids on postprandial activation blood coagulation factor VII and fibrinolysis in healthy young men. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1125-32.

Tousoulis D, Davies G, Ambrose J, Tentolouris C, Stefanadis C, Toutouzas P. Effects of lipids on thrombotic mechanisms in atherosclerosis. *Int J Cardiol* 2002;86:239-47.

Tremoli E, Maderna P, Marangoni F, Colli S, Eligini S, Catalano I, Angeli MT, Pazzucconi F, Gianfranceschi G, Davi G, Stragliotto E, Sirtori CR, Galli C. Prolonged inhibition of platelet aggregation after n-3 fatty acid ethyl ester ingestion by healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1995;61:607-13.

Troisi R, Willett WC, Weiss ST. Trans-fatty acid intake in relation to serum lipid concentrations in adult men. *Am J Clin Nutr* 1992;56(6):1019-24.

Truswell AS, Choudhury N, Roberts DCK. Double blind comparison of plasma lipids in healthy subjects eating potato chips fried in palmolein or canola. *Nutr Res* 1992;12:S43-S52.

Turatti JM, Gomes RAR, Athié I. *Lipídeos: Aspectos funcionais e novas tendências*. Campinas: ITAL; 2002.

Turpeinen AM, Pajari AM, Freese R. Replacement of dietary saturated by unsaturated fatty acid: Effects of platelet protein C activity, urinary content of 3,3 dinor TXB2 and in vitro platelet aggregation in healthy man. *Thromb Haemost* 1998;80:649-55.

Valenzuela A. Efectos biológicos y nutricionales de los ácidos grasos trans. ¿Cuánto es mito y cuánto es realidad?. *Aceites y Grasas* 1997:263-70.

van Tol A, Zock PL, van Gent T, Scheek LM, Katan MB. Dietary trans fatty acids increase serum cholesterylester transfer protein activity in man. *Atherosclerosis* 1995;115:129-34.

- Vessby BS. Dietary fat and insulin action humans. *Br J Nutr* 2000;83:S91-6.
- Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ. Atherothrombosis: the role of tissue factor. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(1):25-30.
- Vogel GM, Meuleman DG, Bourgondien FG, Hobbelen PM. Comparison of two experimental thrombosis models in rats effects of four glycosaminoglycans. *Thromb Res* 1989;54:399-410.
- Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2131-7.
- Wahrburg U. What Are the Health Effects of Fat? *Eur J Nutr* 2004;43(1):6-11.
- Wankenne, MA. Canola: OGM or not! *Aditivos & Ingredientes* 2001;17:28-36.
- Weisburger JH. Carcinogenesis in our food and cancer prevention. *Adv Exp Med Biol* 1991;289:137-51.
- Weissberg P. Mechanisms modifying atherosclerotic disease - from lipids to vascular biology. *Atherosclerosis* 1999; 9:147(Suppl 1):S3-10.
- Wonsil B, Herbein J, Watkins B. Dietary and ruminally derived trans 18:1 fatty acids alter bovine milk lipids. *J Nutr* 1994;124:556-65.
- World Health Organization (WHO). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation. Geneva; 2003. (WHO - Technical Report Series, 916).
- Yorek M, Leeney E, Dunlap J, Ginsberg B. Effect of fatty acid composition on insulin and IGF-1 binding in retinoblastoma cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:2087-92.
- Youdim AK, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids the brain: possible health implications. *Int. J. Dev. Neurosci* 2000;18:383-99.
- Young FV. The usage of hydrogenated fish oil in margarines, shortenings and compound fats. *Fish Oils Bull* 1986;20:1-8.
- Zevenberger JL, Houtsmuller UMT, Gottenbos JJ. Linoleic acid requirement of rats fed trans fatty acids. *Lipids* 1988;23:178-86.