

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Efeito dos ácidos graxos ômega-3, ômega-6 e ômega-9 sobre
o risco cardiovascular de indivíduos adultos: Estudo clínico
de prevenção primária

Caroline Pappiani

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição em Saúde
Pública para obtenção do título de
Doutora em Ciências

Área de concentração: Nutrição em
Saúde Pública

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nágila Raquel
Teixeira Damasceno

São Paulo

2016

Efeito dos ácidos graxos ômega-3, ômega-6 e ômega-9 sobre o risco cardiovascular de indivíduos adultos: Estudo clínico de prevenção primária

Caroline Pappiani

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Coorientador: Prof. Dr. Stefan K Nilsson

Versão Revisada

São Paulo

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese.

“Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário.”

Albert Einstein

Dedicatória

Ao meu pai Cesar e minha mãe Maria Isabel que sempre me apoiaram e acreditaram nos meus sonhos.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por iluminar e abençoar o meu caminho durante toda esta longa caminhada;

Imensamente à Prof^a. Nágila por ter acreditado na minha capacidade e integridade, por abrir tantas portas e me dar a oportunidade de adquirir tanto conhecimento aprendendo inúmeras atividades em diferentes áreas e, acima de tudo, pela orientação e dedicação na condução deste trabalho;

Infinitamente aos meus pais que, sempre com muito amor e dedicação, não mediram esforços para que eu conseguisse chegar até aqui;

À minha vó por ter me hospedado na sua casa, sempre tentando me proporcionar uma qualidade de vida melhor nesse caos de São Paulo;

Às minhas irmãs maravilhosas que sempre me recepcionaram com tanto carinho todas as vezes que eu voltava para casa, me dando forças para seguir em frente;

Ao Lindo por ser meu melhor amigo e companheiro, por me ajudar tanto, por ter sido a pessoa que presenciou todos os meus momentos de desespero e mau humor, mas, que mesmo assim, sempre me incentivou a ter fé e coragem para continuar nesta jornada; e à minha segunda família Polzin Elias por me acolher com tanto amor;

Ao meu cunhado Fábio por sempre admirar o meu esforço, instigando e enriquecendo as discussões científicas ao longo desses anos;

Aos colegas do grupo que sempre foram tão prestativos, que sempre estiverem por perto auxiliando no que fosse preciso e me ajudaram muito em diversas situações, por todos os cafés, happy hours, risadas e momentos de reflexão;

À Prof^a. Dr^a. Dulcineia Saes Parra Abdalla, do Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP), pela doação dos anticorpos utilizados nas análises de LDL eletronegativa;

À Prof^a. Dr^a. Sayuri Miyamoto, do Laboratório de Lípidos Modificados do Instituto de Química (IQ-USP), pela supervisão durante as análises de ácidos graxos no plasma.

Às técnicas de laboratório Rosana e Geni por todo auxílio e ajuda nas análises;

Aos funcionários da Faculdade de Saúde Pública que me ajudaram em inúmeras ocasiões;

Aos profissionais do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário pela ajuda durante a coleta de dados;

Aos voluntários da pesquisa que se disponibilizaram a participar e tornaram esse estudo possível de ser finalizado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP por ter concedido uma bolsa de Doutorado Direto que me permitiu apresentar alguns frutos deste trabalho em Congressos internacionais;

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES por ter concedido uma bolsa de Doutorado Sanduíche para a Suécia, pelo Programa STINT;

Aos queridos Dr. Stefan Nilsson, Dr^a. Gunilla Olivecrona e toda equipe da Universidade de Umeå pela gentileza e aprendizado durante tantos meses longe de casa; e à Agneta Gustafsson por sua acolhedora hospedagem;

Ao Prof. Dr. Antônio Martins Figueiredo Neto, membro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos – INCT-FCx e Núcleo de Apoio à Pesquisa em Fluidos Complexos (NAP-FCx-USP), pelo apoio financeiro;

Agradeço também à Faculdade de Saúde Pública por transformar a minha vida profissional e acadêmica.

RESUMO

PAPPIANI, C. **Efeito dos ácidos graxos ômega-3, ômega-6 e ômega-9 sobre o risco cardiovascular de indivíduos adultos: Estudo clínico de prevenção primária.** 2016. Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 2016.

INTRODUÇÃO: As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no mundo, sendo muitos dos fatores de risco passíveis de prevenção e controle. Embora as DCV sejam complexas em sua etiologia e desenvolvimento, a concentração elevada de LDL-c e baixa de HDL-c constituem os fatores de risco modificáveis mais monitorados na prática clínica, embora não sejam capazes de explicar todos os eventos cardiovasculares. Portanto, investigar como intervenções farmacológicas e nutricionais podem modular parâmetros oxidativos, físicos e estruturais das lipoproteínas pode fornecer estimativa adicional ao risco cardiovascular. Dentre os diversos nutrientes e compostos bioativos relacionados às DCV, os lipídeos representam os mais investigados e descritos na literatura. Nesse contexto, os ácidos graxos insaturados (ômega-3, ômega-6 e ômega-9) têm sido foco de inúmeros estudos. **OBJETIVOS:** Avaliar o efeito da suplementação com ômega-3, ômega-6 e ômega-9 sobre os parâmetros cardiometabólicos em indivíduos adultos com múltiplos fatores de risco e sem evento cardiovascular prévio. **MATERIAL E MÉTODOS:** Estudo clínico, randomizado, duplo-cego, baseado em intervenção nutricional (3,0 g/dia de ácidos graxos) sob a fórmula de cápsulas contendo: ômega-3 (37% de EPA e 23% de DHA) ou ômega-6 (65% de ácido linoleico) ou ômega-9 (72 % de ácido oleico). A amostra foi composta por indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 30 e 74 anos, apresentando pelo menos um dos seguintes fatores de risco: Dislipidemia, Diabetes Mellitus, Obesidade e Hipertensão Arterial Sistêmica. Após aprovação do Comitê de Ética, os indivíduos foram distribuídos nos três grupos de intervenção. No momento basal, os indivíduos foram caracterizados quanto aos aspectos demográficos (sexo, idade e etnia) e clínicos (medicamentos, doenças atuais e antecedentes familiares). Nos momentos basal e após 8 semanas de intervenção, amostras de sangue foram coletadas após 12h de jejum. A partir do plasma foram analisados: perfil lipídico (CT, LDL-c, HDL-c, TG), apolipoproteínas AI e B, ácidos graxos não esterificados, atividade da PON1, LDL(-) e auto-anticorpos, ácidos graxos, glicose, insulina, tamanho e distribuição percentual da LDL (7 subfrações e fenótipo A e não-A) e HDL (10

subfrações). O efeito do tempo, da intervenção e associações entre os ácidos graxos e aspectos qualitativos das lipoproteínas foram testados (SPSS versão 20.0, $p < 0,05$). **RESULTADOS:** Uma primeira análise dos resultados baseada em um corte transversal demonstrou, por meio da análise de tendência linear ajustada pelo nível de risco cardiovascular, que o maior tercil plasmático de DHA se associou positivamente com HDL-c, HDL_{GRANDE} e tamanho de LDL e negativamente com HDL_{PEQUENA} e TG. Observou-se também que o maior tercil plasmático de ácido linoleico se associou positivamente com HDL_{GRANDE} e tamanho de LDL e negativamente com HDL_{PEQUENA} e TG. Esse perfil de associação não foi observado quando foram avaliados os parâmetros dietéticos. Avaliando uma subamostra que incluiu indivíduos tabagistas suplementados com ômega-6 e ômega-3, observou-se que ômega-3 modificou positivamente o perfil lipídico e as subfrações da HDL. Nos modelos de regressão linear ajustados pela idade, sexo e hipertensão, o DHA plasmático apresentou associações negativas com a HDL_{PEQUENA}. Quando se avaliou exclusivamente o efeito do ômega-3 em indivíduos tabagistas e não tabagistas, observou-se que fumantes, do sexo masculino, acima de 60 anos de idade, apresentando baixo percentual plasmático de EPA e DHA (<8%), com excesso de peso e gordura corporal elevada, apresentam maior probabilidade de ter um perfil de subfrações de HDL mais aterogênicas. Tendo por base os resultados acima, foi comparado o efeito do ômega-3, ômega-6 e ômega-9 sobre os parâmetros cardiometabólicos. O ômega-3 promoveu redução no TG, aumento do percentual de HDL_{GRANDE} e redução de HDL_{PEQUENA}. O papel cardioprotetor do ômega-3 foi reforçado pelo aumento na incorporação de EPA e DHA, no qual indivíduos com EPA e DHA acima de 8% apresentaram maior probabilidade de ter HDL_{GRANDE} e menor de ter HDL_{PEQUENA}. Em adição, observou-se também que o elevado percentual plasmático de ômega-9 se associou com partículas de LDL menos aterogênicas (fenótipo A). **CONCLUSÃO:** Ácidos graxos plasmáticos, mas não dietéticos, se correlacionam com parâmetros cardiometabólicos. A suplementação com ômega-3, presente no óleo de peixe, promoveu redução no TG e melhoria nos parâmetros qualitativos da HDL (mais HDL_{GRANDE} e menos HDL_{PEQUENA}). Os benefícios do ômega-3 foram particularmente relevantes nos indivíduos tabagistas e naqueles com menor conteúdo basal de EPA e DHA plasmáticos. Observou-se ainda que o ômega-9 plasmático, presente no azeite de oliva, exerceu impacto positivo no tamanho e subfrações da LDL.

Descritores: ômega-3; ômega-6; ômega-9; ácidos graxos; lipoproteínas; risco cardiovascular.

ABSTRACT

PAPPIANI, C. **The effect of omega-3, omega-6 and omega-9 fatty acids on cardiovascular risk in adults: a primary prevention clinical trial.** 2016. PhD Thesis – University of Public Health - USP, Sao Paulo, 2016.

INTRODUCTION: Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death worldwide and many of the risk factors are likely to prevention and control. While CVD are complex in their etiology and development, a high concentration of LDL-c and low HDL-c are the most investigated modifiable risk factors in clinical practice, although they are not able to explain all cardiovascular events. So investigate how nutritional and pharmacological interventions can modulate oxidative, physical and structural parameters of lipoproteins can provide additional estimate for cardiovascular risk. Among the many nutrients and bioactive compounds related to CVD, lipids represent the most investigated and described in the literature. In this context, the unsaturated fatty acids (omega-3, omega-6 and omega-9) have been focus of numerous studies.

OBJECTIVES: To evaluate the effect of supplementation with omega-3, omega-6 and omega-9 on cardiometabolic parameters in adults with multiple risk factors and without previous cardiovascular event. **MATERIAL AND METHODS:** Clinical trial, randomized, double-blind, based on nutritional intervention (3.0 g/day of fatty acids) containing: omega-3 (37% EPA and 23% DHA) or omega-6 (65% linoleic acid) or omega-9 (72% of oleic acid) including subjects of both sexes, aged between 30 and 74 years old, with at least one of the following risk factors: Hyperlipidemia, Diabetes Mellitus, Obesity and Hypertension. After Ethics Committee approval, the subjects were distributed in one of the three intervention groups. At baseline, the demographic (gender, age and ethnicity) and clinical (medications, current diseases and family history) data were evaluated. At baseline and after 8 weeks of intervention, blood samples were collected after 12 hours of fasting. From the plasma were analyzed: lipid profile (TC, LDL-c, HDL-c, TG), apolipoproteins AI and B, non esterified fatty acid, PON1 activity, LDL (-) and autoantibodies, fatty acids, glucose, insulin, size and distribution of LDL (7 subfractions and phenotypes) and HDL (10 subfractions). The effect of time, intervention and associations between fatty acids and qualitative aspects of lipoproteins were evaluated (SPSS version 20.0, $p < 0.05$). **RESULTS:** A first analysis of the results based on a cross sectional study showed

through the linear trend analysis adjusted by the level of cardiovascular risk, that the highest tertile of plasma DHA was positively associated with HDL-c, HDL_{LARGE} and LDL size and inversely with HDL_{SMALL} and TG. The highest tertile of plasma linoleic acid was positively associated with HDL_{LARGE} and LDL size and negatively with HDL_{SMALL} and TG. This association was not observed when we evaluated the dietary parameters. A sample including smokers supplemented with omega-6 and omega-3 showed that omega-3 positively modify the lipid profile and HDL subfractions. In linear regression models adjusted for age, sex and hypertension, plasma DHA showed negative associations with HDL_{SMALL}. When only assessed the effect of omega-3 in smokers and non-smokers, the results showed that smokers, male, over 60 years old, with low percentage of EPA and DHA (<8%), overweight and/or obese and high body fat have an increased chance to have HDL subfractions profile less cardioprotective. Based on the above results, we compared the effect of omega-3, omega-6 and omega-9 on cardiometabolic parameters. The omega-3 decreased TG, increased the percentage of HDL_{LARGE} and decreased HDL_{SMALL}. The cardioprotective role of the omega-3 was enhanced by increasing the incorporation of EPA and DHA, in which subjects with more than 8% of EPA and DHA were more likely to have HDL_{LARGE} and lower HDL_{SMALL}. In addition, it was also observed that higher omega-9 plasma levels was associated with less atherogenic LDL particles (phenotype A).

CONCLUSION: Plasma fatty acids, but not dietary, correlate with cardiometabolic parameters. Supplementation with omega-3, presents in fish oil, promote reduction in TG and improve the qualitative parameters of HDL (more HDL_{LARGE} and less HDL_{SMALL}). The benefits of omega-3 were particularly significant in smokers and those with lower baseline content of EPA and DHA. It was also observed that omega-9, presents in olive oil, had a positive impact on the size of LDL.

Descriptors: omega-3; omega-6; omega-9; fatty acids; lipoproteins; cardiovascular risk.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E IMPACTO SÓCIOECONÔMICO DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES	30
1.2 METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS	31
1.3 TAMANHO DAS LIPOPROTEÍNAS HDL E LDL	35
1.4 POTENCIAIS EFEITOS DO ÔMEGA-3, OMEGA-6 E OMEGA-9	38
2 JUSTIFICATIVA	46
3 HIPÓTESES	50
4 OBJETIVOS	54
4.1 OBJETIVO GERAL	56
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
5 MATERIAL E MÉTODOS	58
5.1 CASUÍSTICA	60
5.2 CÁLCULO AMOSTRAL	61
5.3 RISCOS E BENEFÍCIOS	63
5.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO	64
5.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	67
5.6 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO	67
5.7 AVALIAÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA E CLÍNICA	68
5.8 CONSUMO ALIMENTAR	69
5.9 ATIVIDADE FÍSICA HABITUAL	69
5.10 ANTROPOMETRIA	70
5.11 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	71
5.11.1 OBTENÇÃO DE SANGUE	71
5.11.2 METABOLISMO LIPÍDICO	71
5.11.3 LDL(-) E AUTO ANTICORPO ANTI LDL(-)	72
5.11.4 TAMANHO DAS LIPOPROTEÍNAS HDL E LDL	74
5.11.5 ÁCIDOS GRAXOS PLASMÁTICOS	74
5.11.6 GLICOSE E INSULINA	75

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	76
5.13 ASPECTOS ÉTICOS	76
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
6.1 ARTIGO 1	80
6.2 ARTIGO 2.....	100
6.3 ARTIGO 3.....	122
6.4 ARTIGO 4.....	142
6.5 ARTIGO5.....	164
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	188
8 REFERÊNCIAS	192
ANEXOS	204
ANEXO 1: ESCORE DE RISCO DE FRAMINGHAM.....	206
ANEXO 2: QUESTIONÁRIO DE ATIVIDADE FÍSICA HABITUAL	208
ANEXO 3: PROTOCOLO DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	212
APÊNDICES	216
APÊNDICE 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	218
APÊNDICE 2: LIVRO DO PARTICIPANTE.....	220
APÊNDICE 3: COMPOSIÇÃO CORPORAL, ECG E PRESSÃO ARTERIAL.....	222
APÊNDICE 4: QUESTIONÁRIO SÓCIO-ECONÔMICO E CLÍNICO	224
APÊNDICE 5: RECORDATÓRIO ALIMENTAR DE 24H.....	226
APÊNDICE 6: MANUAL DO ENTREVISTADOR.....	228
APÊNDICE 7: ATIVIDADES DOUTORADO SANDUÍCHE EM UMEÅ - SUÉCIA	232
APÊNDICE 8: ARTIGO ORIGINAL SUBMETIDO À REVISTA NUTRIENTS	244
APÊNDICE 9: ARTIGO ORIGINAL ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA ARCHIVES OF ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM	246
APÊNDICE 10: ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO NA REVISTA NUTRIRE	248
CURRÍCULO LATTES.....	250

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estrutura, mecanismo e ação dos ácidos graxos insaturados ômega-3, ômega-6 e ômega-9 na saúde cardiovascular.....45

Tabela 2. Estudos, resultados e variáveis utilizadas para o cálculo amostral do artigo 5.....62

Tabela 3. Estudos, resultados e variáveis utilizadas para o cálculo amostral dos artigos 2 e 3.....63

•ARTIGO 1

Tabela 1. Caracterização dos indivíduos, segundo perfil demográfico e clínico. São Paulo, 2015.....94

Tabela 2. Consumo de energia, macronutrientes e ácidos graxos e percentuais de ácidos graxos plasmáticos, segundo o Escore de Risco de Framingham. São Paulo, 2015.....95

Tabela 3. Classificação dos indivíduos, segundo variáveis bioquímicas e Escore de Risco de Framingham. São Paulo, 2015.....96

Tabela 4. Correlações entre ácidos graxos plasmáticos (%) e variáveis bioquímicas. São Paulo, 2015.....97

Tabela 5. Análise de tendência entre tercís de ácidos graxos plasmáticos e variáveis bioquímicas ajustados pelo Escore de Risco de Framingham. São Paulo, 2015.....98

•ARTIGO 2

Tabela 1. Características clínicas, demográficas e antropométricas de indivíduos tabagistas. São Paulo, 2015.....116

Tabela 2. Características bioquímicas de indivíduos tabagistas. São Paulo, 2015.....117

Tabela 3. Subfrações da lipoproteína HDL de indivíduos tabagistas. São Paulo, 2015.....118

Tabela 4. Modelos de regressão linear para avaliar a influência do w-3 nas subfrações da HDL de indivíduos tabagistas. São Paulo, 2015.....119

•ARTIGO 3

Table 1. Demographic, clinical and anthropometric characteristics of subjects.....137

Table 2. Biochemical characteristics of subjects.....138

Table 3. HDL subfractions of subjects.....139

Table 4. Logistic regression models according cigarette smoker.....140

•ARTIGO 4

Tabela 1. Estudos clínicos aleatorizados e controlados sobre os efeitos do ômega-3 sobre a pressão arterial.....162

•ARTIGO 5

Table 1. Demographic, clinical and anthropometric characteristics of subjects.....180

Table 2. Biochemical characteristics of subjects.....181

Table 3. HDL subfractions of subjects.....183

Table 4. LDL subfractions of subjects.....184

Table 5. Logistic regression models according to plasma percentage of w-3 (EPA + DHA > 8%).....185

Table 6. Logistic regression models according to plasma percentage of w-9 (oleic acid > p75).....186

Lista de Figuras

Figura 1. Tamanho e densidade das lipoproteínas.....	32
Figura 2. Metabolismo das lipoproteínas.....	34
Figura 3. Tamanho da lipoproteína HDL.....	36
Figura 4. Tamanho da lipoproteína LDL.....	36
Figura 5. Vias da biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados.....	42

•ARTIGO 2

Figura 1. Percentual de variação nas subfrações da HDL após 8 semanas de intervenção, segundo os grupos w-3 e w-6.....	120
---	-----

•ARTIGO 4

Figura 1. Processos de dessaturação e alongação do ômega-3 e ômega-6 e conseqüente geração de compostos bioativos.....	160
Figura 2. Possíveis efeitos inibitórios do ômega-3 sobre vias que levam à hipertensão.....	161

Lista de Abreviaturas

AA – ácido araquidônico

ABCA1 – transportador *ATP binding cassette subfamily A member 1*

ADAM – reagente 9-antrildiazometano

AHA – *American Heart Association*

ALA – ácido alfa-linolênico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AO – ácido oleico

APO - apolipoproteínas

ATP – adenosina trifosfato

ATPase – enzima adenosina trifosfatase

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BHT – antioxidante 2,6-di-tert-butil-p-hidroxitolueno

BIA – impedância bioelétrica

CC – circunferência da cintura

CE – ésteres de colesterol

CETP – proteína de transferência de ésteres de colesterol

COX – cicloxigenases

CT – colesterol total

DAC – Doença Arterial Coronariana

DAG – 1,2-diacilglicerol

DASH – *Dietary Approaches to Stop Hypertension*

DCV – Doenças Cardiovasculares

DGLA – ácido linoleico di-homo-gama

DHA – ácido docosaheptaenoico

DLP – Dislipidemia

DM – Diabetes Mellitus

DPA – ácido docosapentaenoico

DTPA – reagente dietileno-triamino-penta-acetato

ECA – enzima conversora de angiotensina

ECG – eletrocardiograma

EDTA – antioxidante ácido etileno-diamino-tetra-acético

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPA – ácido eicosapentaenoico

ERF – Escore de Risco de Framingham

FDA – *Food and Drug Administration*

FL – fosfolipídeos

FPLC – *fast protein liquid chromatography*

%GC – percentual de gordura corporal

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

HDL – lipoproteína de baixa densidade

HOMA-IR – *homeostasis model assessment – insulin resistance*

HPLC – *high performance liquid chromatography*

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

IDL – lipoproteína de densidade intermediária

IMC – índice de massa corporal

LA – ácido linoleico

LCAT – enzima lecitina colesterol acil transferase

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LDL(-) – lipoproteína de baixa densidade eletronegativa

LDLox – lipoproteína de baixa densidade oxidada

LLH – lipase lipoproteica hepática

LOX – lipoxigenases

LPL – lipase lipoproteica

MAb – anticorpo monoclonal

NEFAs – ácidos graxos não esterificados

NOSe – enzima óxido nítrico sintase

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPD – ortofenilendiamina

PA – pressão arterial

PAD – pressão arterial diastólica
PAS – pressão arterial sistólica
PBS – tampão fosfato-salina
PG – prostaglandina
PKC – proteína quinase C
PLTP – proteína de transferência de fosfolipídeos
PMSF – fluoreto de fenil-metil-sulfonila
PON1 – paraoxonase
PPARs – receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PUFA – ácidos graxos poli-insaturados
SR-BI – receptor *scavenger* classe B tipo I
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG – triacilglicerois
TMB – substrato tetra-metil-benzina
VLDL – lipoproteína de densidade muito baixa
w-3 – ômega-3
w-6 – ômega-6
w-9 – ômega-9

Apresentação

Esta Tese é composta por uma **Introdução** na qual são apresentados os aspectos epidemiológicos das doenças cardiovasculares, o metabolismo das lipoproteínas, a importância das subfrações da HDL e LDL e os possíveis efeitos dos ácidos graxos insaturados (ômega-3, ômega-6 e ômega-9) na saúde cardiovascular.

São partes integrantes desta Tese a **Justificativa, Objetivos e Material e Métodos**. Os **Resultados** estão organizados sob a forma de artigos científicos, a saber:

Artigo 1 – Associação do tamanho da LDL e HDL com os ácidos graxos w-3 e w-6 plasmático é influenciada pelo nível do risco cardiovascular.

Artigo 2 – Impacto da suplementação com ácidos graxos w-3 nas subfrações da HDL de indivíduos tabagistas.

Artigo 3 – The beneficial effect of omega-3 supplementation in high density lipoprotein is influenced by cigarette smoking.

Artigo 4 – Ácidos graxos ômega-3 e Hipertensão Arterial Sistêmica: Evidências científicas baseadas em ensaios clínicos controlados.

Artigo 5 – Impact of omega-3, omega-6 and omega-9 in quali- and quantitative lipoprotein profile in individuals with lower EPA and DHA plasmatic levels.

Na parte final são apresentadas as **Considerações finais, Referências** (citadas na Introdução e Material e Métodos), **Anexos, Apêndices e Currículo Lattes**, incluindo demais produções científicas realizadas durante o Doutorado.

Os artigos que compõem esta Tese foram redigidos no idioma e formatação exigidos pelos periódicos científicos nos quais foram aceitos ou submetidos. Este formato de apresentação de Tese atende às recomendações do Guia de Apresentação de Teses da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E IMPACTO SOCIOECONÔMICO DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as DCV foram responsáveis por 17 milhões de mortes em 2008 e, estimativas para o ano 2030, propõem que mais de 23 milhões de óbitos serão decorrentes das DCV, representando um aumento aproximado de 40% (OMS, 2011).

As taxas de mortalidade por DCV são maiores em países de média e baixa renda do que em países ricos, especialmente entre os adultos. Em 2005, Strong et al. estimaram que 35 milhões de mortes seriam decorrentes das DCV, acidente vascular cerebral (AVC), câncer e outras doenças crônicas e que somente 20% ocorreriam em países ricos. Segundo os mesmos autores, se a incidência anual de mortalidade por doenças crônicas reduzisse 2%, 36 milhões de mortes seriam evitadas até o ano de 2015.

O Brasil segue tendência semelhante. Segundo relatório da OMS, mais de 30% do total de mortes ocorridas em 2012 estão relacionadas com as DCV, contribuindo para 40% das mortes atribuídas às doenças crônicas (OMS, 2014). Dessa forma, por se tratar de um problema de saúde global, as DCV contribuem de modo significativo nos recursos destinados aos programas de políticas públicas, impactando diretamente na expectativa de vida da população, bem como no crescimento econômico.

Além do papel essencial da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) na gênese da aterosclerose, é amplamente reconhecido que o baixo conteúdo de colesterol associado à lipoproteína de alta densidade (HDL-c) predispõe de modo independente à aterosclerose, e que o aumento do HDL-c diminui o ateroma. Apesar desse fato, a terapia medicamentosa direcionada ao aumento do HDL-c não tem obtido o sucesso esperado (INEU et al., 2006). Diante disso, o tratamento medicamentoso da modulação do LDL-c ainda é o principal foco dos programas de intervenção (GRANT e MEIGGS, 2007; DEEG et al., 2007).

Em adição, o uso das estatinas continua sendo o principal agente na prevenção cardiovascular primária e secundária. As estatinas são medicamentos que agem na inibição da principal enzima envolvida na síntese de colesterol (HMG-CoA redutase), reduzindo o LDL-c

entre 18-60%. Sua ação no metabolismo do HDL-c não é bem definida, mas sabe-se que elas podem aumentar o conteúdo sérico entre 5 e 15% (INEU et al., 2006).

Mesmo diante dos inquestionáveis benefícios associados ao uso das estatinas, as limitações no manejo do baixo HDL-c, associadas ao fato de que cerca de 5% dos pacientes apresentam efeitos adversos, torna a identificação de novas ferramentas de intervenção importante. Destaca-se ainda que, mesmo naqueles indivíduos mais bem controlados, cerca de 30% dos fatores de risco seguem com valores acima das metas propostas pelas Diretrizes de Cardiologia.

1.2 METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS

As lipoproteínas são partículas responsáveis prioritariamente pelo transporte de lipídeos. Estes complexos são constituídos por colesterol e seus ésteres, triacilglicerois (TG), fosfolipídeos (FL) e componentes minoritários (vitaminas antioxidantes e substâncias lipossolúveis), envolvidos por um esqueleto proteico denominado apolipoproteínas (APO). Com base na densidade, as lipoproteínas são classificadas em: quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (XAVIER et al., 2013), como pode ser observado na **Figura 1**.

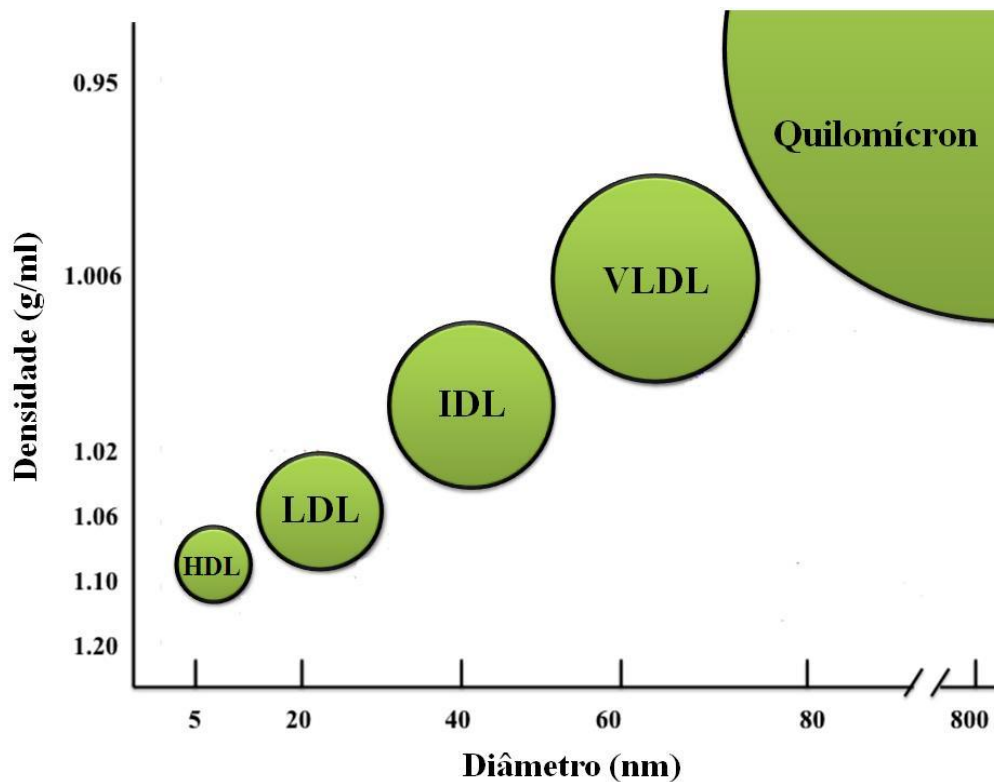


Figura 1. Classificação das lipoproteínas segundo tamanho e densidade das partículas. Os quilomícrons, que são constituídos em grande parte por triacilgliceróis, são as maiores e menos densas dentre as moléculas de lipoproteínas. As lipoproteínas de alta densidade (HDL) são substancialmente menores, mais densas e constituídas na maior parte por proteínas e ésteres de colesterol. Adaptado de BLAHA; BLUMENTHAL; BRINTON e JACOBSON, 2008.

O colesterol é o esteroide mais abundante nos tecidos biológicos, sendo transportado principalmente pela LDL. Além de ser constituinte das membranas celulares, é precursor na síntese de hormônios, vitamina D e ácidos biliares. Enquanto 25% do colesterol plasmático são provenientes da dieta, o restante é sintetizado pelo fígado. O colesterol plasmático ocorre tanto na forma livre (30% do total) como esterificada (70% do total) (MOTTA, 2003).

Os TG são formados a partir de três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e constitui uma das formas de armazenamento energético mais importante no organismo, depositado principalmente nos tecidos adiposo e muscular. O TG da dieta (exógeno) é hidrolizado pela ação das lipases pancreáticas e sais biliares para formar glicerol e ácidos graxos livres que, posteriormente, serão re-esterificados para formar TG ao nível dos enterócitos. Após a re-esterificação, o TG é associado a outros lipídeos e APO para formar quilomícrons (MOTTA, 2003).

Os quilomícrons são moléculas de alto peso molecular, transportadas pelo sangue para todos os tecidos e são a principal forma de transporte de TG exógeno para os tecidos. Após uma

refeição, os quilomícrons são formados na mucosa intestinal. Os ácidos graxos e o colesterol são re-esterificados para formar TG e ésteres de colesterol. Estes compostos são “empacotados” com as APO B, APO A, FL, colesterol livre e chegam à circulação, sendo a APO A transferida para a HDL. Os quilomícrons assim modificados interagem com a lipase lipoproteica (LPL), que promove a hidrólise das ligações ésteres, resultando na liberação e incorporação de ácidos graxos livres pelas membranas celulares. O processo de transferência de TG favorece a geração dos quilomícrons remanescentes, com menor conteúdo de TG, que são mais facilmente captados pelo fígado, onde são metabolizados (MOTTA, 2003).

Os TG continuamente sintetizados no fígado formam um *pool* com aqueles originários da dieta, que é incorporado à VLDL (endógena) para serem transportados aos tecidos periféricos. Em menor extensão, a mucosa intestinal também secreta VLDL (exógena). Quando madura, a VLDL é composta principalmente de TG, colesterol não esterificado e é rica em APO B. Durante esse processo, a APO C é transferida da HDL e os TG são removidos da VLDL. As partículas residuais são conhecidas como “VLDL remanescentes” (ou IDL) e são rapidamente convertidas em LDL ou removidas da circulação pelos receptores hepáticos (MOTTA, 2003).

A LDL é formada a partir da VLDL e da degradação dos quilomícrons, sendo considerada uma partícula lipídica aterogênica, pois o colesterol associado a essa partícula representa mais de 60% do colesterol plasmático. As partículas de LDL são ricas em ésteres de colesterol, sendo a APO B a apolipoproteína mais abundante. A LDL é removida da circulação por dois processos. Um envolve a ligação da LDL aos receptores com afinidade pela APO B (LDL-R) expressos nas membranas dos hepatócitos e de células dos tecidos periféricos. A LDL é então incorporada pela célula por invaginação da membrana celular. Após ser internalizada, a partícula funde-se com os lisosomas, a APO B é desdobrada e os ésteres de colesterol (CE) são hidrolisados, fornecendo colesterol livre para as células. O outro mecanismo envolve receptores (B/E) independentes de captação do colesterol pelas células que estão presentes, particularmente, nos macrófagos (MOTTA, 2003).

A HDL exerce papel importante no transporte reverso do colesterol, sendo essa a função mais bem descrita na literatura. Isso confere à HDL ação cardioprotetora, porque ela atua na captação do colesterol dos tecidos periféricos para o tecido hepático, onde é incorporado à bile e depois excretado (RYE; BARTER, 2014). O colesterol captado pela HDL é esterificado pela enzima lecitina colesterol acil transferase (LCAT) e transferido para as lipoproteínas ricas em

APO B (VLDL e LDL) pela ação da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), ou removido pelos receptores *scavengers* classe B tipo I (SR-BI) no fígado, após as HDL terem sofrido ação da lipase lipoproteica hepática (LLH). Como resultado, são geradas APO AI livres que retornam ao interstício para captar colesterol dos tecidos periféricos. A ação sinérgica da proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) sobre a HDL gera partículas menores que serão capazes de reiniciar o ciclo de captação do colesterol (YAZDANYAR; YEANG; JIANG, 2011). O metabolismo das lipoproteínas pode ser observado na **Figura 2**.

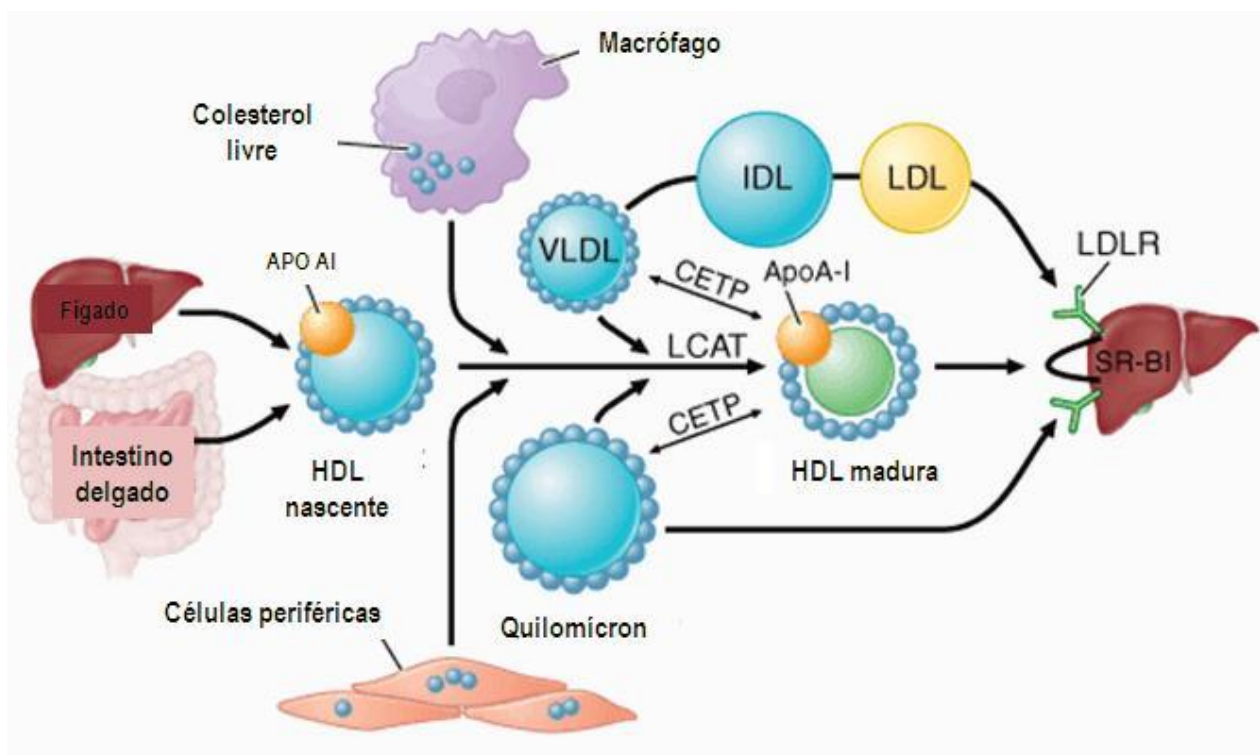


Figura 2. Metabolismo das lipoproteínas. As APO AI são secretadas pelo intestino e fígado e, em combinação com os fosfolípidos, formam as HDL nascentes. As APO AI também se originam pela ação da enzima lipase lipoproteica, que hidrolisa triacilgliceróis dos quilomícrons e da VLDL, levando à redução do volume e estimulando a transferência de componentes de superfície, que se incorporam às HDL nascentes. O colesterol livre e os fosfolípidos são incorporados à HDL por ação do transportador ABCA1 e da proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP). Ao nível celular, a lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) esterifica o colesterol livre e, então, os ésteres de colesterol deslocam-se para o núcleo, levando ao aumento do seu volume. Mediante transferências de componentes lipídicos, mediadas pela proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), e também pela ação da enzima lipase lipoproteica hepática, ocorre a redução do tamanho e da densidade da HDL. Simultaneamente ocorre a captação de ésteres de colesterol pelo hepatócito, por meio do receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-BI). Adaptado de Harrison's Internal Medicine, 17th edition – FAUCI; KASPER; LONGO; BRAUNWALD; HAUSER; JAMESON; LOSCALZO, 2008.

1.3 TAMANHO DAS LIPOPROTEÍNAS HDL E LDL

As subfrações lipoproteicas variam quanto ao tamanho, densidade e composição química. As propriedades físicas das lipoproteínas vêm sendo estudadas há décadas e o atual estado da arte sugere que o tamanho das partículas pode fornecer mais detalhes sobre o risco cardiovascular (PACKARD et al., 2000; BERNEIS et al., 2002; DIFFENDERFER et al., 2014).

Segundo a revisão sistemática de Chung et al. (2009), os métodos de avaliação das subfrações de lipoproteínas publicadas na literatura incluem: eletroforese em gel, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ressonância magnética nuclear (RMN), ultracentrifugação e isotacoforese capilar (CITP).

De acordo com Yvan-charvet et al. (2010) e Pirillo et al. (2013), partículas grandes de HDL são mais competentes no transporte reverso de colesterol. No entanto, soma-se a essa ação cardioprotetora o papel antioxidante, anti-inflamatório e antitrombótico da HDL (TABET; RYE, 2009; VAN HIMBERGEN et al., 2005; NOFER; BRODDE; KEHREL, 2010).

Em estudos de prevenção primária e secundária, a concentração de partículas grandes de HDL esteve inversamente correlacionada com a doença arterial coronariana (DAC). Por outro lado, a concentração de HDL pequenas foi positivamente associada com DAC e aterosclerose (ASZTALOS et al., 2006; HIRAYAMA et al., 2009).

No estudo de Framingham, indivíduos com doença coronariana apresentavam partículas pequenas elevadas e partículas grandes reduzidas, quando comparados aos controles. As evidências são de que a HDL nascente se correlaciona com o efluxo de colesterol, mediado pelo receptor ABCA1. As partículas maiores diminuem de tamanho à medida que, via receptor SR-BI, transferem colesterol para as células. Os resultados desse estudo sugerem que a maturação da HDL em partículas maiores está comprometida, o que seria decorrente de defeito no transporte reverso de colesterol e, provavelmente, prejuízo para outras atividades antiaterogênicas da HDL (ASZTALOS et al., 2006).

O modo como as subfrações de HDL (**Figura 3**) são remodeladas é fundamental para a compreensão do papel antiaterogênico dessa lipoproteína, um campo ainda em fase de investigação e com muitas perspectivas.

Baseando-se em propriedades físico-químicas das partículas, como tamanho e densidade, o estudo clássico de Austin et al. (1988) propôs dois fenótipos relacionados às subfrações de LDL: fenótipo A (LDL grande) e fenótipo não-A ou B (LDL pequena e densa).

O papel aterosclerótico da LDL é fortemente influenciado pelo equilíbrio entre o número de partículas de LDL, o seu tamanho e o conteúdo de colesterol associado à partícula. As partículas menores oxidam mais facilmente, pelo fato da APO B estar mais exposta ao meio aquoso (McNAMARA et al., 1996).

A expliação mais aceita associada à oxidação da LDL relaciona-se ao excesso de LDL circulante no plasma que, após migrarem para o espaço subendotelial, sofrem mudanças estruturais pela presença de radicais livres. Essas partículas de LDL modificadas causam ativação e disfunção endotelial, facilitando a migração dos monócitos para o espaço subendotelial, onde se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos ativados passam a expressar receptores *scavengers* que reconhecem as partículas de LDL oxidadas (LDLox), passam a acumular colesterol e ésteres de colesterol sem serem capazes de ativar um *feedback* negativo. O processo não controlado de captação de LDLox pelos macrófagos favorece à formação de células espumosas e, conseqüentemente, da placa aterosclerótica (GETZ, 2005).

Desde os estudos pioneiros de Goldstein e Brown (1974), ganhadores do Prêmio Nobel, o papel da LDLox passou a ser considerado fundamental no processo aterogênico. Inúmeros modelos (oxidação com CuSO₄, íons de ferro, peroxinitro, dentre outras) *in vitro* foram propostos na tentativa de mimetizar as modificações que os radicais livres promovem na LDL. Entretanto, inúmeras críticas também foram descritas devido ao distanciamento entre as reações *in vitro* e os sistemas biológicos envolvendo as reações radicalares.

Diante dessa controvérsia, em 1988, uma fração da LDL com maior carga negativa foi isolada do plasma de indivíduos, sendo denominada LDL eletronegativa (-), a qual apresentava características semelhantes à LDLox (AVOGARO et al., 1988). No entanto, estudos mostraram que o *pool* de LDL(-) não é formado exclusivamente por reações de oxidação presentes na LDL, essa partícula também origina-se de outros processos como: glicação não enzimática, enriquecimento em ácidos graxos não esterificados (NEFAs), modificações enzimáticas por fosfolipases A₂, reação cruzada com a hemoglobina e outros mecanismos ainda não identificados (SANCHEZ-QUESADA et al., 2004). Portanto, a subfração de LDL(-) constitui-se em um *pool* de partículas heterogêneas em tamanho e com tendência a agregação, com conteúdo diminuído de

fosfolípídeos e vitamina E, e aumento de colesterol livre e proteínas, quando comparada à LDL nativa (AVOGARO et al., 1988).

1.4 POTENCIAIS EFEITOS DO ÔMEGA-3, OMEGA-6 E ÔMEGA-9

Classicamente, a dieta sempre foi associada à DCV, seja diretamente influenciando a aterosclerose, ou indiretamente influenciando os fatores de risco associados. Dentre os diversos nutrientes e compostos bioativos relacionados às DCV, certamente os lipídeos representam os mais investigados e descritos na literatura.

Dentre os lipídeos, os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (w-3) têm sido foco de inúmeros estudos. Ao contrário do w-3 com 20 ou mais unidades de carbono, o w-3 com 18 carbonos são encontrados nos alimentos vegetais (GRUNDT e NILSEN, 2008). O ácido alfa-linolênico (ALA, C18:3) está presente no óleo de soja, canola e linhaça, enquanto os seus derivados, o ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5) e o ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6) podem ser encontrados, principalmente, nos óleos e peixes de águas frias e algas marinhas (DIN et al., 2004; CHAN e CHO, 2009). Embora esses ácidos graxos sejam considerados essenciais ao homem, pequenas quantidades de ALA podem ser convertidas em EPA (5%) e DHA (0,5%) (CHAN e CHO, 2009).

Ainda que o w-3 de origem animal tenha grande participação nos efeitos citados acima, estudos têm mostrado que o w-3 de origem vegetal também apresenta ação cardioprotetora (ROS e MATAIX, 2006; DIN et al., 2004).

Os ácidos graxos w-3 têm mostrado efeitos cardioprotetores na prevenção de DCV primárias e secundárias. Os mecanismos incluem a redução das concentrações de TG, redução da arritmia, diminuição da agregação plaquetária, estabilização da placa de ateroma, redução da pressão sanguínea e redução da sobrecarga cardíaca. Em uma meta-análise com 17 estudos populacionais (n > 56.000) demonstrou-se que alta concentração de TG é um fator de risco independente para DCV (HOKANSON e AUSTIN, 1996) e, portanto, o papel do w-3 como coadjuvante no tratamento da hipertrigliceridemia, tem merecido destaque (TRUMBO et al., 2002; ESLICK et al., 2009; WEI e JACOBSON, 2011).

Estudos de prevenção secundária, como o *The Diet and Reinfarction Trial – DART* (ingestão semanal de 2-3 porções de peixes ricos em w-3 durante 2 anos) e o *The GISSI Prevenzione Group* (suplementação de 1g/dia de w-3 durante 3 anos e meio), mostraram que o consumo de w-3 reduziu o número de eventos clínicos e mortes por DCV (BURR et al., 1989; *The GISSI Prevenzione Group*, 1999). Esses resultados foram reforçados pela revisão sistemática de Wang et al. (2006) que selecionou 11 ensaios clínicos (6 baseados em intervenção com suplemento e 5 com dieta ou aconselhamento dietético) e 1 estudo de coorte de prevenção secundária. A maioria dos estudos mostrou significativa redução de mortalidade por todas as causas, morte súbita, por infarto agudo do miocárdio (IAM) e/ou AVC, após a suplementação com óleo de peixe ($\geq 850\text{mg/dia EPA + DHA}$).

Apesar desses resultados positivos, os benefícios do w-3 na prevenção primária ainda são pouco descritos na literatura. Somando-se a esse fato, Hooper et al. (2006), em uma revisão que avaliou o efeito do consumo de w-3 sobre as DCV, sendo 48 estudos randomizados e 41 estudos de coorte, concluíram que os resultados são inconsistentes. Mais recentemente, uma meta-análise de Rizos et al. (2012), incluindo 20 ensaios clínicos, randomizados, a suplementação com w-3 não se associou com menor risco de mortalidade por todas as causas (morte cardíaca, súbita, IAM e/ou AVC).

Resultados do *Global, regional and national consumption levels of dietary fats and oils in 2010*, que incluiu 266 inquéritos nutricionais específicos de cada país, mostraram que a média de consumo total de w-3 no Brasil foi de 1,7g/dia. Esse consumo, no entanto, foi atribuído apenas a fontes alimentares de w-3 de origem vegetal (por exemplo, linhaça e óleo de soja) (MICHA et al., 2014). Contudo, segundo posicionamento da *Food and Agriculture Organization* e Organização Mundial da Saúde (FAO/OMS, 2010), as recomendações para o consumo de w-3, consideradas ótimas, equivalem a mais de 2% do valor calórico total da dieta, ou seja, aproximadamente, 4,4g/dia de w-3.

Assim como o w-3, o ômega-6 (w-6) também é um ácido graxo essencial, não sendo sintetizado endogenamente em quantidades adequadas às necessidades biológicas, portanto, é preciso obtê-lo a partir da dieta. O ácido linoleico (LA, C18:2) está presente em óleos vegetais como óleo de girassol, milho, soja e canola, sendo convertido em seu derivado biologicamente ativo - o ácido araquidônico (AA, C20:4) (FAGUNDES, 2002).

Alguns estudos demonstram que os ácidos graxos w-6 são substratos para a síntese de eicosanoides inflamatórios e carcinógenos, aumentando o risco de câncer, morte súbita, doença cardíaca, vasoconstrição, aumento da pressão arterial, elevação de TG, entre outras doenças inflamatórias (JAMES; GIBSON; CLELAND, 2000; KELLEY, 2001).

No entanto, não existem evidências convincentes de que a redução do consumo de w-6, por si só, confere proteção contra DCV. Na análise prospectiva de mais de 45 mil homens do *Health Professionals Follow-up Study*, por exemplo, a ingestão de w-6 teve pouca influência no risco cardiovascular (MOZAFFARIAN et al., 2005).

Resultados combinados de estudos clínicos randomizados e observacionais fornecem evidências de que a substituição entre 5% - 10% da energia consumida de ácidos graxos saturados e carboidratos refinados (por exemplo, açúcar, pão branco, arroz branco, batata) por w-6 reduz o risco de DCV (HARRIS; POSTON; HADDOCK, 2007; KRIS-ETHERTON; FLEMING; HARRIS, 2010).

Além disso, um estudo realizado com pacientes obesos encontrou diferentes resultados entre o perfil de ácidos graxos da dieta e no plasma com fatores de risco cardiometabólicos. Enquanto o w-6 da dieta apresentou correlação negativa com o colesterol total (CT), o w-6 plasmático apresentou correlação negativa com TG (HERNÁNDEZ-MORANTE et al., 2008). Apesar desses resultados, o papel biológico do w-6 parece depender da relação deste ácido graxo com o w-3. Segundo Simopoulos et al. (1999) é necessário reduzir a quantidade de w-6 das dietas e aumentar a concentração de w-3 para que haja equilíbrio na proporção entre eles. Essa afirmação tem como ponto central o fato desses ácidos graxos competirem pelas mesmas enzimas envolvidas nos processos de dessaturação e alongação e de seus produtos terem ações biológicas opostas. Evidências epidemiológicas confirmam os distintos mecanismos modulados por esses ácidos graxos ao evidenciar que dietas ocidentais, na qual o aumento no consumo de w-6, seguido da redução no consumo de w-3, apresentou forte correlação com a prevalência de DCV. Essas observações foram reforçadas por Molendi-Coste et al. (2011).

Segundo relatório da *Food and Agriculture Organization* (FAO, 1994) a proporção média da razão w-6/w-3 nas dietas ocidentais variavam entre 20:1 - 25:1, perfil bastante diferente das atuais recomendações da FAO/OMS (5:1 a 10:1). Somando-se a esse fato, a terceira etapa da revolução industrial observada no século XX (era tecnológica) contribuiu de modo marcante para a incorporação de novos hábitos alimentares, no qual se destacam o uso rotineiro de alimentos

processados e óleos vegetais. Esses eventos contribuíram significativamente para a redução no consumo dos alimentos fontes de w-3 e aumento na ingestão de ácidos graxos w-6.

Além desses aspectos, sabe-se que estes ácidos graxos competem pela mesma enzima (delta-6 dessaturase), assim como os seus principais derivados (AA e EPA) também apresentam competição pelos mesmos sítios de ligação (FAGUNDES, 2002). De acordo com Kelley (2001) os produtos finais dos processos de dessaturação e alongação, os eicosanoides, exercem funções antagônicas em diversos processos de sinalização celular (**Figura 5**). Enquanto os leucotrienos e tromboxanos das séries 3 e 5 têm forte ação anti-inflamatória, aqueles das séries 2 e 4 são potentes agentes pró-inflamatórios (JAMES; GIBSON; CLELAND, 2000).

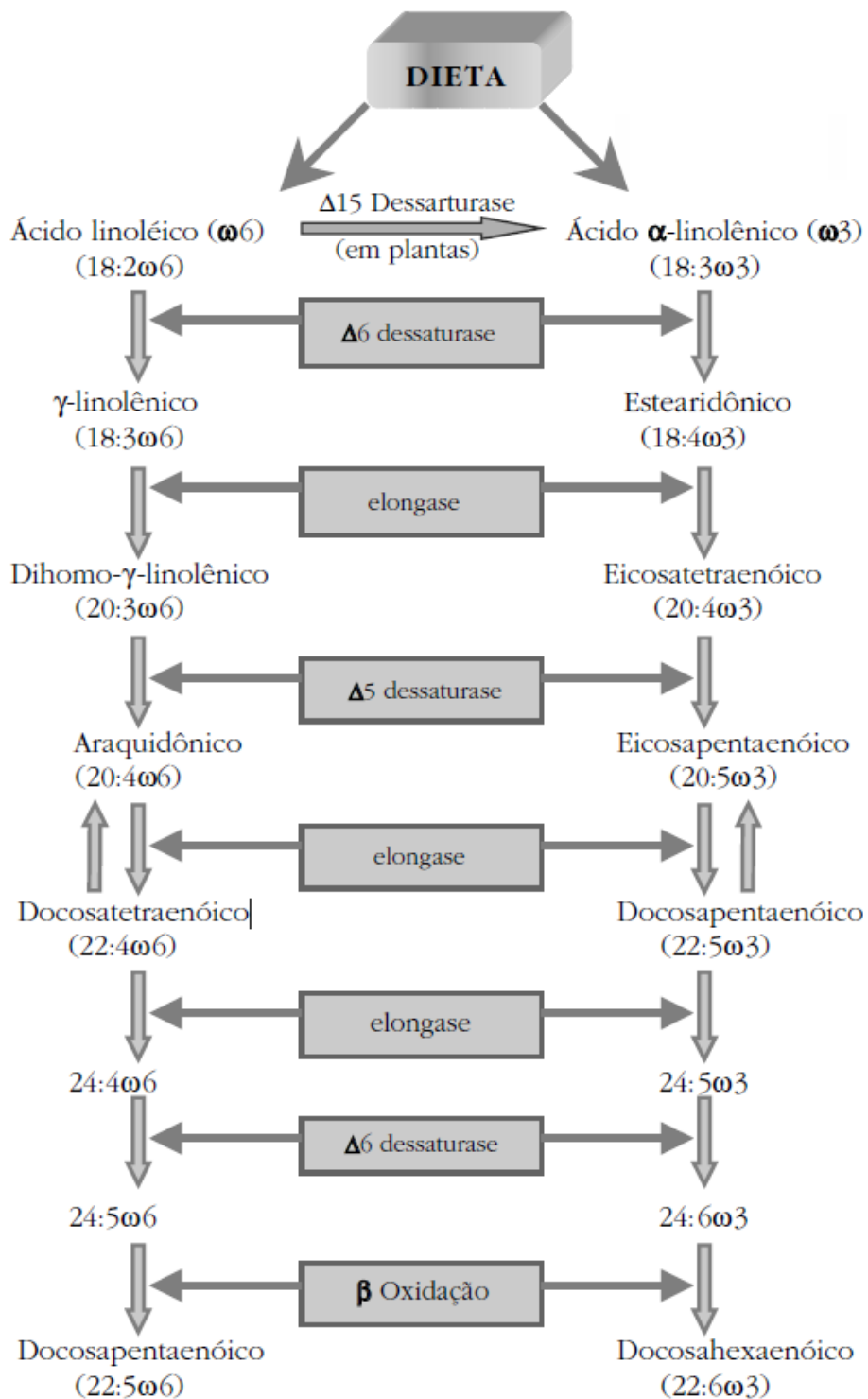


Figura 5. Vias da biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados. Adaptado de CALDER, 1998; YODIM et al., 2000; TEITELBAUM e WALKER, 2001.

As evidências científicas relacionadas ao w-6 são ainda muito controversas. Enquanto alguns estudos demonstram seu papel inflamatório, outros defendem sua ação positiva no metabolismo lipídico. Além disso, enquanto alguns autores defendem que seus efeitos estejam associados ao equilíbrio com o consumo do w-3, outros consideram que a razão w-6/w-3 não é mais um conceito útil quando o consumo dessas gorduras está dentro das recomendações (WIJENDRAN e HAYES, 2004; STANLEY, 2007) e que não existe uma correlação entre o alto consumo de LA e baixo consumo de ALA (HARIKA et al., 2013).

Nesse sentido, avaliar o efeito da suplementação com w-6 sobre os fatores de risco cardiovascular é um tema de grande interesse científico, sobretudo na população brasileira, pois esse ácido graxo está amplamente difundido no hábito alimentar da população, sendo encontrado em inúmeros alimentos e produtos consumidos diariamente.

Atualmente, as recomendações para uma dieta saudável enfatizam o consumo de ácidos graxos insaturados em detrimento dos saturados e *trans* (gordura vegetal hidrogenada), ou seja, a qualidade dos lipídeos na dieta representa um componente importante para a redução do risco cardiovascular (AHA, 2000). Esse fato é reforçado pela baixa incidência de DCV em países ou grupos populacionais que têm uma alimentação rica em hortaliças, frutas, leguminosas, cereais integrais e peixes (VOGEL; BERGER, 2001; SABATÉ et al., 2001; ROS et al., 2004).

Mesmo considerando o potencial efeito isolado de alguns nutrientes sobre o desenvolvimento de DCV, alguns padrões dietéticos também têm demonstrado efeito cardioprotetor (ESTRUCH et al., 2006). Dentre esses, grande atenção tem sido direcionada à dieta Mediterrânea devido ao seu elevado conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados, associado basicamente ao consumo do azeite de oliva. Há fortes evidências de que o efeito antioxidante do azeite de oliva esteja associado aos componentes fenólicos e elevada quantidade do ácido oleico (OA, C18:1) presente nesse alimento (aproximadamente 70-80%) (ALONSO et al., 2006; TERÉS et al., 2008).

O efeito do consumo de azeite de oliva (25ml/dia) sobre a oxidação da LDL foi avaliado em 200 indivíduos saudáveis. Além da significativa redução no consumo de ácido linoleico, o aumento de uma unidade na razão ácido oleico/linoleico foi associado com a diminuição de 4,2 mg/L no valor de isoprostanos. Houve também aumento na concentração de HDL, o que reforça o uso desse alimento como fonte de gordura capaz de modificar fatores de risco cardiovascular (CÍCERO et al., 2008).

Além do azeite de oliva ser uma excelente fonte de w-9, esse ácido graxo também constitui a principal fonte de gordura das oleaginosas (nozes e castanhas). Pela sua composição única, é provável que as nozes e castanhas também exerçam efeito modulador sobre os fatores de risco cardiovascular clássicos e emergentes (ROS, 2009).

As amêndoas contêm 69,24% dos seus lipídeos sob a forma de w-9 e seu consumo tem sido associado à redução na oxidação da LDL, na formação de isoprostanos e redução no CT (YANG, 2009; JENKINS et al., 2008). Esses dados foram reforçados pelo estudo PREDIMED (*PREvención con Dieta MEDiterránea*), conduzido por Estruch et al. (2006), no qual o efeito do azeite de oliva foi comparado a uma dieta hipogordurosa (7% gordura saturada) e um mix de oleaginosas (15g/dia de nozes: 7,5g de avelãs + 7,5g de amêndoas). Os resultados mostraram que os dois tipos de suplemento produziram efeitos benéficos na glicose plasmática, razão CT/HDL-c e pressão arterial.

Em outro estudo baseado no mesmo delineamento, verificou-se que após 3 meses de intervenção, o conteúdo de LDLox diminuiu no grupo da dieta suplementada com azeite de oliva (-10,6 U/L) e com oleaginosas (-7,3 U/L), mas não houve alterações significativas no grupo que recebeu a dieta hipogordurosa (FITÓ et al., 2007).

O efeito anti-inflamatório do consumo de oleaginosas também tem evidenciado a ação cardioprotetora desses alimentos. A redução na proteína C reativa, interleucina 6 e fibrinogênio foi diretamente associada ao consumo de oleaginosas (> 4 vezes/semana) em um estudo com 6.080 indivíduos. Os autores destacaram que não houve interação significativa entre consumo de nozes e castanhas e o índice de massa corporal (IMC) ou relação cintura/quadril, reiterando a ideia de que dietas com quantidades consideráveis de gorduras insaturadas não provocam aumento de massa corporal (ESTRUCH et al., 2006; JIANG et al., 2006).

Frente aos resultados encontrados, a **Tabela 1** resume os possíveis efeitos do w-3, w-6 e w-9 na saúde cardiovascular.

Tabela 1. Estrutura, mecanismo e ação dos ácidos graxos insaturados ômega-3, ômega-6 e ômega-9 na saúde cardiovascular.

Ácido Graxo	Estrutura	Mecanismo	Ação
Ômega-3 (w-3)			
α -linolênico ALA	C-18:3	anti-inflamatório antioxidante hipocolesterolêmico hipolipidêmico hipotensor	↓ estresse oxidativo ↓ oxidação ↓ inflamação ↓ agregação plaquetária
eicosapentaenoico EPA	C-20:5	anti-inflamatório antioxidante hipotensor ↑ sensibilidade à insulina	↓ estresse oxidativo ↓ oxidação ↓ inflamação
docosahexaenoico DHA	C-22:6	anti-inflamatório hipolipidêmico	↓ declínio da função mental ↑ cognição ↑ acuidade visual ↓ crescimento de células cancerígenas
Ômega-6 (w-6)			
linoleico LA	C-18:2	↑ expressão vascular da molécula-1 de adesão hipocolesterolêmico hipolipidêmico ↑ sensibilidade à insulina	↑ oxidação ↑ inflamação ↓ CT ↓ LDL-c
araquidônico ARA	C-20:4	↑ agregação plaquetária ↑ vasoconstrição ↑ síntese de eicosanóides	↑ inflamação ↑ dano vascular ↑ estresse oxidativo
Ômega-9 (w-9)			
oleico OA	C-18:1	hipolipidêmico hipotensor ↓ aterogenicidade	↓ LDL-c ↓ oxidação da LDL

Adaptado de JOHNSON e BRADFORD, 2014; SANTOS et al., 2013.

2. JUSTIFICATIVA

Devido ao impacto social e econômico das DCV é importante que pesquisas, sobretudo baseadas na prevenção, se desenvolvam para reduzir a ocorrência de eventos clínicos.

Essa temática torna-se mais relevante quando verificamos que vários fatores de risco são modificáveis e diretamente associados ao estilo de vida. Somando-se a esses aspectos, alguns indivíduos, mesmo sem elevado risco cardiovascular, apresentam eventos clínicos, o que indica que outros fatores de risco, além dos clássicos, estão presentes e não são controlados pelos medicamentos atualmente disponíveis.

Nesse contexto, a dieta ocupa posição de destaque. Dentre os fatores dietéticos, o consumo de ácidos graxos insaturados (w-3, w-6 e w-9) parece ter efeito modulador sobre diversos fatores de risco clássicos e emergentes, embora os últimos sejam ainda pouco explorados. Portanto, é provável que o risco cardiovascular desses indivíduos seja modificado com a suplementação desses ácidos graxos.

Destaca-se que até a presente data, o monitoramento simultâneo dos marcadores propostos no presente estudo não foi foco de investigação baseada na suplementação com diferentes ácidos graxos em indivíduos brasileiros, como pode ser verificado no site: www.clinicaltrials.gov e no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (REBEC).

3. HIPÓTESE

Com base nos aspectos citados e tendo em vista a importância da prevenção primária das DCV, este estudo propôs avaliar o efeito da suplementação com w-3, w-6 e w-9 em parâmetros cardiometabólicos de indivíduos adultos sem evento cardiovascular prévio.

Nesse sentido, as hipóteses propostas para o presente estudo foram:

1. A suplementação com w-3 e w-9 modificaria positivamente os fatores de risco cardiovascular clássicos (colesterol total e frações);
2. A suplementação com w-6 teria ação neutra sobre os fatores de risco cardiovascular clássicos e emergentes;
3. A suplementação com w-3 modificaria positivamente os fatores de risco cardiovascular emergentes: tamanho da lipoproteína HDL;
4. A suplementação com w-9 modificaria positivamente os fatores de risco cardiovascular emergentes: tamanho da lipoproteína LDL;
5. Marcadores bioquímicos do consumo de ácidos graxos se associariam mais robustamente com marcadores cardiometabólicos;
6. Subgrupos de indivíduos seriam mais beneficiados com a suplementação com ácidos graxos insaturados.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação com w-3, w-6 e w-9 sobre os parâmetros cardiometabólicos em indivíduos adultos sem evento cardiovascular prévio.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Artigo 1:** Avaliar se os ácidos graxos insaturados da dieta e do plasma se associam com o tamanho das partículas de LDL e HDL, e verificar se essas associações são influenciadas pelo nível de risco cardiovascular.
- **Artigo 2:** Avaliar o efeito da suplementação com w-3, comparado ao w-6, nas subfrações da HDL em indivíduos tabagistas.
- **Artigo 3:** Avaliar o efeito da suplementação com w-3 no tamanho das lipoproteínas em indivíduos tabagistas e não-tabagistas.
- **Artigo 4:** Revisão sobre o papel do w-3 na Hipertensão Arterial Sistêmica, baseada em ensaios clínicos controlados.
- **Artigo 5:** Avaliar o efeito da suplementação com w-3, w-6 e w-9, nos fatores de risco cardiovascular em indivíduos com baixo percentual plasmático de EPA e DHA.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CASUÍSTICA

A população do estudo foi composta por indivíduos de ambos os sexos, atendidos no Hospital Universitário vinculado à Universidade de São Paulo. Todos os participantes passaram pelo processo de esclarecimento e, somente após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Apêndice 1**), realizou-se a coleta de dados. Todos os procedimentos de obtenção de amostras, análises, divulgação dos resultados e preservação da identidade dos participantes seguiram as normas do Conselho Nacional de Saúde, no que se refere à ética em pesquisa com seres humanos (BRASIL, 1999).

O princípio de randomização baseou-se no fato de que os participantes do estudo tinham a mesma probabilidade de receber uma das três intervenções a serem testadas (YUSUF et al., 1984). Esse princípio foi respeitado e realizado de maneira adequada, reduzindo o risco de erros sistemáticos (ou viés), produzindo um equilíbrio entre os diversos fatores de risco que podem influenciar no desfecho clínico a ser medido (COLLINS et al., 1996). Essas informações foram consideradas antes do início do estudo, sendo os procedimentos de randomização descritos abaixo:

O processo foi baseado na distribuição aleatorizada de indivíduos, onde cada participante teve 33,3% (1:3 intervenção) de chance de ser inserido em uma das intervenções (www.randomization.com). A distribuição dos indivíduos nos grupos seguiu a ponderação 1:2, onde cada grupo deveria apresentar a mesma proporção de homens e mulheres, ainda que a aleatorização pudesse permitir que os grupos apresentassem no final um determinado sexo a mais, mas sem diferenças entre os grupos. Segue abaixo um modelo exemplificando a randomização utilizada:

Id: 0100100 / 0200200 / 0300300 / ...

Sendo:

2 primeiros dígitos = tipo de intervenção (w-3, w-6, w-9)

3 dígitos intermediários = ordem de inclusão do paciente, conforme assinatura do TCLE

2 últimos dígitos = tempo (basal/00 e T8/08)

As cápsulas foram produzidas pela empresa Relthy (Indaiatuba, São Paulo, Brasil), ou seja, os manipuladores das matérias primas e codificações não estavam envolvidos diretamente com o ensaio clínico.

Além disso, o procedimento duplo cego foi garantido porque tanto os pesquisadores envolvidos no estudo quanto o próprio participante, não tiveram conhecimento de quem estaria fazendo uso de determinada intervenção.

A idade não foi considerada no delineamento da randomização uma vez que, de acordo com os critérios do *Score de Risco de Framingham* (30 a 74 anos), essa variável faz parte da equação preditiva que calcula o risco absoluto de eventos coronarianos em 10 anos, segundo sexo, conforme *American Heart Association* (D'AGOSTINO et al., 2008; MOSCA et al., 2011). Nas análises estatísticas, a idade e outras variáveis que poderiam influenciar os desfechos biológicos foram consideradas como fatores de controle e testadas em modelos ajustados.

5.2 CÁLCULO AMOSTRAL

A literatura apresenta inúmeras estratégias para cálculo amostral. No presente estudo, o tamanho da amostra foi calculado visando atender os objetivos de cada artigo científico. O cálculo amostral foi baseado na diferença entre as médias e desvio padrão (TAYLOR, 1988), resultando em uma amostra de 23 indivíduos/grupo de intervenção ($\alpha=0,05$; $1-\beta=0,90$) para o *artigo 5* e 17 indivíduos/grupo de intervenção ($\alpha=0,05$; $1-\beta=0,80$) para os *artigos 2 e 3*.

Visando melhor descrever a estratégia usada no cálculo amostral realizamos uma pesquisa bibliográfica na plataforma *online Pubmed*. Os estudos selecionados envolveram a suplementação de w-3 e/ou w-6 e/ou w-9 e alguns parâmetros bioquímicos relacionados aos desfechos do presente estudo (perfil lipídico e tamanho de lipoproteínas), com variação estatisticamente significativa nesses parâmetros.

Dessa forma, para o cálculo do tamanho amostral (*artigo 5*) foram consideradas informações dos seguintes estudos: Satoh et al. (2007) utilizaram suplementação de w-3 por 12 semanas em indivíduos com diabetes tipo 2 (n=44) e encontraram como resultado uma magnitude de redução de 21,74% da concentração de partículas pequenas de LDL; Damsgaard et al. (2008)

utilizaram suplementação de w-3 e w-9 e adição de óleos e margarinas ricos ou pobres em w-6 por 8 semanas em homens saudáveis (n=66) e encontraram como resultado uma magnitude de redução de 6% na fração LDL-c; Vecka et al. (2012) utilizaram suplementação de w-3 e placebo (w-9 + w-6) por 6 semanas em pacientes dislipidêmicos (n=60) e encontraram uma magnitude de redução de 26% na concentração plasmática de TG.

Para estimar o tamanho de amostra em cada grupo foram calculados o valor da magnitude padronizada de efeito e os valores especificados de α bidirecional de 0,05 e β de 0,10 (poder estatístico de 90%), com o auxílio de uma tabela que utiliza o teste *t-student* para comparar as médias das variáveis (HULLEY et al., 2003). Para o cálculo amostral, considerou-se a mesma magnitude de efeito e o mesmo desvio padrão do estudo Satoh et al. (2007), uma vez que foi o estudo que avaliou a variável bioquímica de maior impacto, o tamanho da lipoproteína LDL.

Todos os dados para este cálculo amostral encontram-se na **Tabela 2**:

Tabela 2. Estudos, resultados e variáveis utilizadas para o cálculo amostral do artigo 5.

Referência	Variável	Antes da intervenção	Após a intervenção	<i>E</i>	<i>E/S</i>	Tamanho da amostra
Damsgaard et al. (2008)	LDL-c (mg/dL)	105,7 (7,0)	99,5 (6,6)	6,20	0,94	27
Vecka et al. (2012)	TG (mg/dL)	236,7 (135,3)	175,33 (66,75)	61,37	0,92	27
Satoh et al. (2007)	LDL _{PEQUENA} (mmol/L)	0,23 (0,04)	0,18 (0,04)	0,05	1,25	23

Resultados apresentados em média (DP).

E (magnitude de efeito esperada): antes da intervenção – após a intervenção.

E/S (magnitude padronizada de efeito): *E* (magnitude do efeito esperada) ÷ *S* (desvio padrão da variável).

Para o cálculo do tamanho amostral (*artigos 2 e 3*) foram consideradas informações dos seguintes estudos: Neff et al. (2008) utilizaram suplementação de 2g/dia de w-3 (n=19) e placebo (n=17) por 4,5 meses em adultos obesos e encontraram como resultado uma magnitude de redução de 28% na concentração plasmática de TG; Kelley et al. (2007) utilizaram

suplementação de 3g/dia de w-3 (n=17) e placebo (n=17) por 90 dias em pacientes dislipidêmicos e encontraram uma magnitude de aumento de 40% nas partículas grandes de HDL.

Para estimar o tamanho de amostra, foram calculados o valor da magnitude padronizada de efeito e os valores especificados de α bidirecional de 0,05 e β de 0,20 (poder estatístico de 80%), com o auxílio de uma tabela que utiliza o teste *t-student* para comparar as médias das variáveis (HULLEY et al., 2003). Para o cálculo amostral, considerou-se a mesma magnitude de efeito e o mesmo desvio padrão do estudo Kelley et al. (2007), uma vez que foi o estudo que avaliou as subfrações de HDL.

Todos os dados para este cálculo amostral encontram-se na **Tabela 3**:

Tabela 3. Estudos, resultados e variáveis utilizadas para o cálculo amostral dos artigos 2 e 3.

Referência	Variável	Antes da intervenção	Após a intervenção	<i>E</i>	<i>E/S</i>	Tamanho da amostra
Neff et al. (2011)	TG (mg/dL)	122 (49)	88 (39)	34	0,87	21
Kelley et al. (2007)	HDL _{GRANDE} (μmol/L)	3,2 (0,5)	4,5 (0,7)	1,3	1,85	17

Resultados apresentados em média (DP).

E (magnitude de efeito esperada): antes da intervenção – após a intervenção.

E/S (magnitude padronizada de efeito): *E* (magnitude do efeito esperada) ÷ *S* (desvio padrão da variável).

5.3 RISCOS E BENEFÍCIOS

Apesar de ser um estudo de intervenção, o risco considerado foi mínimo, pois os óleos utilizados nas cápsulas fazem parte do hábito alimentar da população brasileira e são considerados GRAS (geralmente aceito como seguro à saúde). Além disso, foram previamente aprovados pela ANVISA na modalidade de suplemento alimentar. De acordo com a literatura, em raras situações, eventuais efeitos adversos poderiam estar associados ao consumo do óleo de peixe. Por sua vez, destaca-se que essas reações, na maioria das vezes, não são fatores indicativos

de suspensão do consumo do w-3. Esses efeitos adversos foram rigorosamente monitorados durante o estudo, seguindo padrões éticos e científicos.

Os benefícios resultantes deste estudo baseiam-se na avaliação do potencial dos ácidos graxos a serem testados e a capacidade de reduzir o risco cardiovascular. Neste contexto, os benefícios são ainda considerados experimentais, embora possam ir desde efeitos neutros até positivos (melhora do perfil clínico).

Além da disponibilização de meios de contato 24h com a equipe de pesquisadores, ao término do estudo, todos os participantes receberam os resultados dos exames, assim como foi dada orientação nutricional documentada de modo a permitir que o indivíduo incorpore a melhor intervenção ao seu hábito alimentar.

5.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O protocolo seguiu o delineamento de um estudo clínico, randomizado, duplo cego, baseado em intervenção nutricional, com seguimento de 8 semanas, cadastrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos – ReBEC (RBR-2vfhfv), conforme descrito abaixo:

Triagem - Identificação de indivíduos com características de interesse para o presente estudo. Assinatura do TCLE e agendamento do início do estudo.

Período Basal (T0) - Aplicação dos questionários socioeconômico, clínico, antropometria, atividade física, consumo alimentar; coleta de sangue; entrega das cápsulas.

Período 8 semanas (T8) - Aplicação dos questionários clínico, antropometria, atividade física, consumo alimentar; coleta de sangue.

No momento basal (T0) os participantes receberam o suplemento contendo w-3 (**3,0 gramas/dia**), ou w-6 (**3,0 gramas/dia**), ou w-9 (**3,0 gramas/dia**) encapsulados, sendo fornecida a quantidade exata para ser consumida até a próxima etapa do estudo (T8).

Cada participante foi orientado a consumir diariamente e individualmente o suplemento, distribuídos do seguinte modo: 1 cápsula no desjejum, 1 cápsula no almoço e 1 cápsula no jantar.

No caso de esquecimento, as cápsulas poderiam ser consumidas a qualquer hora dentro do mesmo dia. Além disso, foi entregue um livro de registros (**Apêndice 2**), no qual o participante deveria preencher as intercorrências ocorridas durante o estudo, tais como:

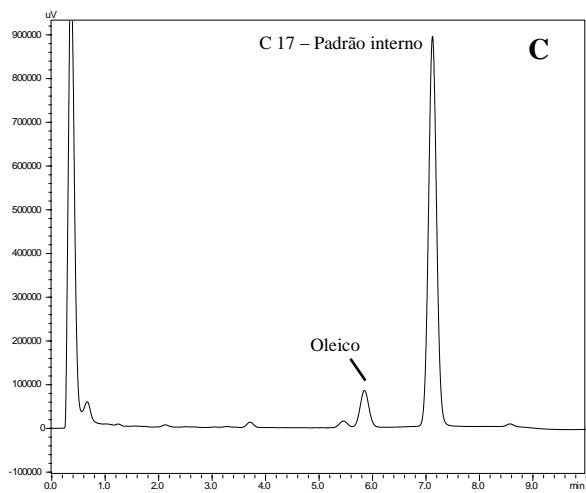
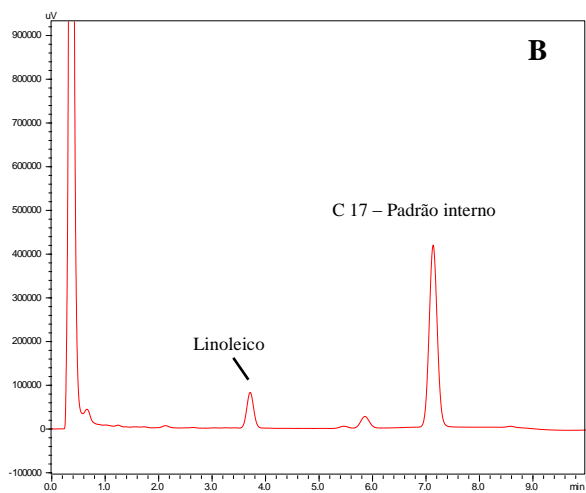
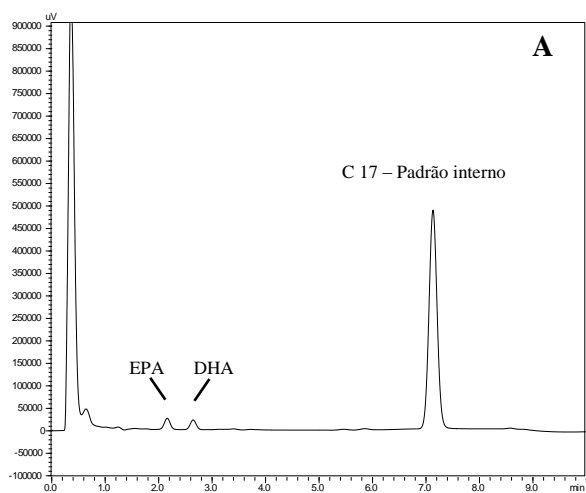
1. Dividir o suplemento com outra pessoa;
2. Esquecer de consumir;
3. Sinais e sintomas adversos associados ao consumo;
4. Número de cápsulas* que sobraram até o dia da entrevista seguinte.

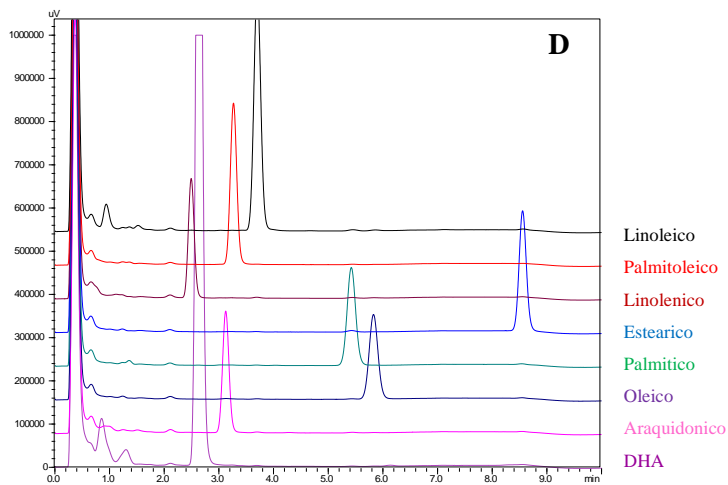
*ao término do estudo, o frasco foi devolvido para conferência da adesão à intervenção.

Os suplementos utilizados no protocolo de intervenção tiveram as seguintes características:

1. **Grupo w-3** – Cápsulas de óleo de peixe contendo 37% de EPA e 23% DHA.
2. **Grupo w-6** – Cápsulas de óleo de girassol contendo 65% de LA.
3. **Grupo w-9** – Cápsulas de azeite de oliva contendo 72% de OA.

As imagens abaixo mostram a análise do conteúdo de ácidos graxos das cápsulas. Visando manter a randomização do estudo, optou-se pelo uso de cápsulas aromatizadas. Destaca-se que o uso de suplementos encapsulados foi escolhido devido à facilidade no controle e individualização da intervenção ao longo do estudo. O fornecimento de alimentos fonte foi excluído por favorecer as seguintes condutas: divisão do alimento em preparações familiares, difícil controle do consumo individual, respostas atribuídas ao alimento e não ao conteúdo de ácido graxo, dentre outros.





A – Cápsula w-3. B – Cápsula w-6. C – Cápsula w-9. D – Padrões externos.

5.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos indivíduos que apresentaram o TCLE devidamente preenchido e assinado, com as seguintes características clínicas:

1. Homens e mulheres;
2. Idade entre 30 e 74 anos;
3. Risco cardiovascular estratificado pelo *Escore de Risco de Framingham* – ERF
(Anexo 1)

5.6 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

Os indivíduos que preencheram algum dos critérios abaixo não participaram do estudo:

- Pacientes desnutridos;
- Grávidas ou lactantes;
- Indivíduos que participavam de outros protocolos de intervenção;
- Evento cardiovascular prévio. Esse critério foi avaliado por história clínica e confirmado com a análise do eletrocardiograma (ECG) avaliado por um médico do Hospital Universitário;
- Portadores de doenças agudas ou crônicas graves. Doenças agudas foram identificadas por uma avaliação clínica e as doenças graves pelo prontuário eletrônico disponível no sistema interno do Hospital Universitário (sugestiva de sobrevida inferior a 6 meses);
- Usuários de drogas ilícitas;
- Alcoolistas;
- Pessoas alérgicas ou intolerantes a algum componente da intervenção;
- Pacientes com alterações psiquiátricas não controladas, que foram avaliadas por meio de avaliação clínica.

Destacamos que os pacientes passaram por uma avaliação clínica e de composição corporal, na qual peso (kg), altura (m), circunferência da cintura (cm), pressão arterial (mmHg) e temperatura foram aferidos (**Apêndice 3**). Associadas a essas informações, foram feitos questionamentos sobre uso de medicamentos, cirurgias e doenças. Essa avaliação foi realizada por pesquisadores de campo e contou com a colaboração da equipe de Enfermagem e a supervisão de um Médico. Destaca-se que todo trabalho de campo foi realizado no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário.

5.7 AVALIAÇÃO SOCIOECONÔMICA E CLÍNICA

Foi aplicado um questionário previamente estruturado (**Apêndice 4**), que abordou as seguintes variáveis: sexo, idade, etnia, nível de escolaridade, renda familiar e número de indivíduos que moram na residência, história clínica atual, antecedentes familiares de doenças crônicas (pai e mãe) e uso regular de medicamentos e/ou vitaminas.

5.8 CONSUMO ALIMENTAR

A avaliação do consumo alimentar foi realizada pela aplicação de dois recordatórios de 24 horas (R24h) no momento basal e ao término do estudo (T0 e T8), em dias alternados (um durante a semana e um dia no final de semana), para contemplar variações diárias inter e intra-indivíduos e melhor descrever o hábito alimentar dos participantes (**Apêndice 5**).

Foi utilizado um formulário padrão e o seu preenchimento foi baseado no método *multiple pass* (JOHNSON et al., 1996; GUENTHER et al., 1998). Esse método consiste em três elementos: listagem rápida dos alimentos, descrição detalhada e revisão. Baseado nessa técnica foi possível definir e quantificar todos os alimentos consumidos nas últimas 24 horas. Com o objetivo de reduzir viés de informação, foi utilizado o registro fotográfico alimentar contendo modelos de utensílios com medidas caseiras e porções de alimentos (ZABOTTO et al., 1996). Para esta etapa, todos os pesquisadores de campo receberam treinamento para aplicação do inquérito alimentar (**Apêndice 6**).

A energia, os macronutrientes (proteínas, lipídeos, carboidratos), fibras e ácidos graxos (saturados, monoinsaturados, poli-insaturados, w-3, w-6, w-9 e razão w-6/w-3) foram analisados pelo Programa *Food Processor* (ESHA Research, 2012). Os R24h que apresentaram valores de ingestão energética menor que 500 ou superior a 5000 kcal/dia foram excluídos do estudo por falta de sensibilidade do método de inquérito nutricional ou por representarem valores de consumo considerados *outliers*.

A variabilidade intrapessoal foi corrigida pelo programa *Multiple Source Method* (MSM) (Department of Epidemiology of the German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke, versão 1.0.1, 2011), que produz uma estimativa do consumo habitual de cada nutriente e utiliza a metodologia proposta por Nusser et al. (1996).

5.9 ATIVIDADE FÍSICA HABITUAL

Foi aplicado um questionário para avaliar a atividade física habitual (**Anexo 2**) e, de acordo com a somatória das respostas, foi calculado o *Escore* Total de Atividade Física preconizado pelo Baecke (1982) e validado para a população brasileira por Florindo e Latorre (2003).

5.10 ANTROPOMETRIA

A avaliação dos parâmetros foi feita pela mensuração da massa corporal (Kg), estatura (m), circunferência da cintura (cm) e dados de composição corporal (percentuais de gordura corporal e massa magra). A massa corporal foi aferida com os indivíduos utilizando o mínimo de roupas, descalços, utilizando a balança digital Toledo[®], modelo 2096PP/2 (Toledo, São Paulo, Brasil) com limite de capacidade de 200 Kg e precisão de 50 g. A estatura foi medida pelo estadiômetro fixo Seca[®] (TBW, São Paulo, Brasil) com limite de 2,1 m e precisão de 1 mm. Os indivíduos estavam descalços, em posição ereta, com os pés paralelos, calcanhares, panturrilha, glúteos, ombros e cabeça encostados no estadiômetro (LOHMAN et al., 1988). Esses dados foram utilizados para o cálculo do índice de massa corporal (IMC), definido como massa corporal em quilos dividido pela estatura em metros quadrados (Kg/m^2). Utilizando uma fita inelástica, flexível e com precisão 1 mm (TBW, São Paulo, Brasil) foi obtida a medida da circunferência da cintura (CC), adotando-se como referencial anatômico o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. O indivíduo foi orientado a permanecer com o abdômen relaxado, ficar em pé, manter os braços paralelos ao corpo e pés unidos.

Para a realização da impedância bioelétrica (BIA), utilizou-se o aparelho *Bioelectrical Body Composition Analyzer*[®], modelo Quantum II (RJL Systems, Michigan, USA), no qual foi aplicada uma corrente de 425 μA a uma frequência de 50 KHz. As medidas foram tomadas do lado direito do corpo e o indivíduo foi orientado a permanecer deitado, com os braços em ângulo de 30° em relação ao seu corpo e as pernas sem contato entre si. Calçados e meias foram retirados e durante o teste o indivíduo permaneceu imóvel. Como preparo, foi orientado um jejum de 8 horas e evitar o consumo de bebidas alcoólicas e a prática de atividade física pelo mesmo período, além de urinar antes da realização do exame. O equipamento apresenta individualmente os valores brutos de resistência (R), reactância (X_c) e ângulo de fase (°).

O cálculo do percentual de gordura corporal (%GC) foi realizado pelo programa *Cyprus*, versão 2.5 – *Body Composition Analysis System* (RJL Systems[®], Detroit, USA), considerando sexo, idade, massa corporal, estatura, nível de atividade física, resistência e reatância.

5.11 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

5.11.1 Obtenção de sangue

As amostras de sangue (20 mL) foram coletadas após um jejum de 12 horas. Para análises que utilizaram soro, o sangue foi coletado em tubos seco com gel de separação. Para a análise da glicose plasmática, o sangue foi coletado em tubos com fluoreto de sódio. Para análises que utilizaram plasma, o sangue foi coletado em tubos *vacutainer* contendo o anticoagulante e antioxidante ácido etileno-diamino-tetra-acético - EDTA (1 mg/mL) (BD, Brasil), mantido em gelo e protegido da luz. Ao plasma e/ou soro (3000 rpm, 10 min, a 4°C) acrescentou-se os seguintes inibidores de proteases: aprotinina (10 µg/mL), benzamidina (10 µM) e fluoreto de fenilmetilsulfonila - PMSF (5 µM), além do antioxidante 2,6-di-tert-butil-p-hidroxitolueno - BHT (100 µM). Todas as amostras foram aliqüotadas de acordo com o número de análises, visando evitar sucessivas etapas de degelo e armazenadas a -80°C até o momento das análises.

5.11.2 Metabolismo lipídico

Por meio da aplicação manual de reagentes enzimáticos, foram analisadas as concentrações de CT e TG no plasma e colesterol na HDL (Labtest, Minas Gerais, Brasil). O conteúdo de colesterol associado à LDL foi calculado pela fórmula de Friedewald (1972): $LDL-c = CT - HDL-c - TG/5$. Essa fórmula foi aplicada para os indivíduos com $TG < 400$ mg/dL.

As apolipoproteínas APO AI e B foram analisadas por método padrão utilizando o Autokit APO AI[®] e Autokit APO B[®] (Wako Chemicals USA Inc., Richmond, VA, EUA), pelo método imuno-turbidimétrico.

A partir dos resultados bioquímicos, foram calculadas as razões TG/HDL-c, CT/HDL-c, LDL-c/HDL-c, não HDL-c, APO B/APO AI, HDL-c/APO AI, LDL-c/APO B.

A concentração dos Ácidos Graxos Não Esterificados (NEFAs) foi analisada pelo kit comercial *Free Fatty Acid Quantification Kit* (Wako Chemicals USA Inc., Richmond, VA, EUA) por reação colorimétrica. As análises foram feitas no sistema semi-automático Cobas Mira.

A atividade da paraoxonase (PON1) foi analisada pela adição de 500 µl de tampão Tris-HCl 0,1 M e pH 8,05, contendo 2 mmol/L de CaCl₂ e 1,1 mmol/L de paraoxon (Sigma Chemical Co) em 25 µL de soro. Em seguida, 200 µL da solução foram distribuídos em placas de fundo plano contendo 96 poços. A leitura foi feita em duplicata utilizando o leitor de microplacas (Microplate Reader, Benchmark, Bio-RAD) com comprimento de onda de 405 nm, a 37°C. Para o cálculo da atividade foram feitas 6 leituras em intervalos de um minuto cada. Os resultados foram expressos em nmol min⁻¹. mL⁻¹ (MACKNESS et al., 1991).

5.11.3 LDL(-) e auto-anticorpos anti LDL(-)

A LDL(-) foi detectada pelo método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) sanduíche, seguindo protocolo padronizado pelo nosso grupo de pesquisa. A sensibilização das placas (Costar[®], modelo 3690, Corning, USA) foi feita com anticorpo monoclonal anti LDL(-) (MAb 1A3) (10 µg/mL, 50,0 µL/poço), diluído em tampão carbonato-bicarbonato, (0,25 M, pH 9,6), sendo as placas incubadas em período *overnight* (17h) a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes com PBS-*tween* (0,05%). Em seguida, as placas foram bloqueadas com leite desnatado (Molico[®], Nestlé, São Paulo, Brasil), diluído a 2% em PBS-*tween* (0,01%) e incubadas a 37°C por 90 minutos. A seguir, as placas foram lavadas três vezes com PBS-*tween* (0,05%). Foi adicionado 50,0 µL/poço de plasma (1:1000) em tampão PBS (0,01%) com leite desnatado (Molico[®], Nestlé, São Paulo, Brasil) diluído a 1%, sendo a placa incubada novamente por 90 minutos em 37°C. Após essa etapa, as placas foram lavadas, conforme descrito

anteriormente, e foi adicionado anticorpo monoclonal anti LDL(-) biotilado (MAb-2C7) (10 µg/mL, 50,0 µL/poço). As placas foram incubadas em 37°C por 1 hora e, em seguida, foram lavadas conforme protocolo. Após essa etapa, foram adicionados 50,0 µL/poço de estreptoavidina-peroxidase (1:80000) diluída em PBS (0,01%) com leite desnatado (Molico®, Nestlé, São Paulo, Brasil) diluído a 1%. As placas foram incubadas por 1 hora, em 37°C e, novamente lavadas, conforme protocolo. A reação de cor foi desenvolvida após adição de uma pastilha (5 mg) de ortofenilenodiamina (OPD) diluída em 5,5 mL de tampão citrato-fosfato (0,1 M, pH 4,2) e 5 µL de água oxigenada (H₂O₂). As placas foram incubadas por 10 minutos em 37°C, protegidas da luz. A reação foi bloqueada com 50µL/poço de H₂SO₄ (2,0 M) e a absorbância monitorada em 492 nm. Os resultados foram expressos a partir da média das absorbâncias das amostras descontando o branco e, posteriormente, aplicados à curva padrão e multiplicados pela respectiva diluição, sendo os resultados expressos em mg/ml.

Os auto-anticorpos anti LDL(-) foram detectados por ELISA de captura de anticorpo. A LDL(-), isolada por FPLC, foi diluída em tampão carbonato-bicarbonato (0,25 M, pH 9,6) até concentração final de 1 µg de proteína/poço, e incubada em período *overnight* (15h) a 4°C. Os espaços livres foram bloqueados com 5% de leite desnatado diluído em tampão fosfato-salina 0,01mol/L (PBS - pH 7,4) e incubados a 37°C por 90 minutos. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS-*tween* (0,05%). As amostras foram diluídas (1:300) em PBS-*tween* (0,01%) e incubadas em temperatura de 37°C por 90 minutos. As placas foram novamente lavadas, conforme protocolo. Foi adicionado 50,0 µL/poço de anti-IgG humana marcada com peroxidase, (1:5000) diluída em PBS. As placas foram incubadas por 90 minutos, à 37°C, seguida de lavagem, conforme protocolo. A reação de cor se desenvolveu pela adição de substrato composto por 3,3',5,5'- tetrametilbenzina (TMB), tampão citrato-fosfato (0,1M, pH 4,2) e H₂O₂ (30%) (250/12/10, µL/mL/µL). As placas foram incubadas por 30 minutos à 37°C, sob proteção da luz. A reação foi bloqueada com 50 µL/poço de H₂SO₄ (2,0 M) e a absorbância monitorada em 450 nm. Os resultados foram gerados aplicando-se a média das absorbâncias das amostras, descontando o branco, à equação da curva padrão de MAb 2C7 (0,004 – 0,125 mU/L).

5.11.4 Tamanho das lipoproteínas HDL e LDL

O tamanho das lipoproteínas foi analisado pelo sistema Lipoprint (Lipoprint System®; Quantimetrix, Redondo Beach, CA) que se baseia na separação e quantificação de subfrações de lipoproteínas por meio de gel de poliacrilamida não desnaturante. As subfrações identificadas na eletroforese foram integradas para determinar a área relativa de cada subunidade de lipoproteína (percentual de cada subfração) e, posteriormente, multiplicadas pela concentração de CT da amostra para calcular a quantidade de colesterol em cada subfração. Os resultados permitiram a identificação de sete subfrações de LDL, sendo as subfrações LDL-1 e LDL-2 classificadas como grandes e as subfrações LDL-3 a LDL-7 como partículas menores e mais densas. Para a HDL, foram identificadas dez subfrações, sendo as partículas HDL-1 a HDL-3 classificadas em grandes, HDL-4 a HDL-7 em intermediárias e HDL-8 a HDL-10 em pequenas. Fenótipos A e não-A foram determinados para a LDL utilizando como ponto de corte 25,5 nm. Razões de partículas de HDL grandes e pequenas $(\text{HDL-1} + \text{HDL-2}) / (\text{HDL-9} + \text{HDL-10})$ e de partículas de LDL grandes e pequena $(\text{LDL-1} + \text{LDL-2}) / \text{LDL-3}$ foram calculadas a partir do percentual das subfrações lipoproteicas.

5.11.5 Ácidos graxos plasmáticos

O percentual de adesão dos participantes ao protocolo de intervenção foi avaliado por dois métodos: contagem de cápsulas consumidas ao longo do estudo e perfil de ácidos graxos no plasma.

Inicialmente, os lipídeos foram extraídos utilizando o método de Bligh e Dyer (1959), utilizando-se 100 μl de plasma, 50 μl de hidróxido de sódio, 50 μl de ácido heptadecanoico (padrão interno), 350 μl de etanol com antioxidante BHT a 150 μM para evitar oxidações dos lipídeos durante o procedimento e 50 μl de H_2O com 100 μM de DTPA. Esta mistura permaneceu em repouso por 90 min em ambiente escuro e após este período, os ácidos graxos livres foram extraídos utilizando-se 2 ml de acetato de etila com BHT e hexano (1:9) e 1 ml de

NaCl 1% com 100 μ M de DTPA. Após esta etapa, as amostras foram agitadas (vórtex) por 2 min e permaneceram em gelo por 5 min. Foi retirado o sobrenadante somente com lipídeos. A quantificação dos ácidos graxos foi realizada utilizando sonda fluorescente 9-antrildiazometano (ADAM) (NIMURA e KINOSHITA, 1980). Os lipídeos extraídos foram secados sob fluxo de nitrogênio. A partir das amostras secas e hidrolisadas, foi realizada a reação de derivatização. Os lipídeos foram resuspendidos em 50 μ l de acetato de etila e derivatizados com 50 μ l de ADAM (0,25 mg/ml) em temperatura ambiente, sob proteção da luz e mantidos por 30 min em gelo. Os ácidos graxos derivatizados foram analisados pelo HPLC utilizando uma coluna Kinetex C18 (50x3,0mm com 2,6 μ m de tamanho de partícula) e pré-coluna C18. Para cada corrida de amostras do plasma no HPLC, correu também uma amostra de branco apenas com padrão interno (ácido heptadecanoico), uma amostra de ADAM puro e uma amostra de padrão externo (mix de ácidos graxos separados – EPA, DHA, araquidônico, palmitoleico, palmítico, linoleico, linolênico, esteárico) para determinar o tempo de retenção dos ácidos graxos em cada corrida e proceder a integração dos mesmos de acordo com este tempo. Para a separação dos ácidos graxos utilizou-se um gradiente de acetonitrila e H₂O, partindo de um gradiente de 79 % de acetonitrila, chegando a 93 %, com fluxo de 1,45 mL/min e 12 min para cada análise. A fluorescência foi monitorada em 350 nm e sua emissão analisada em 450nm. Após integração dos picos obtidos em cada corrida, foi calculado o percentual de área de cada pico.

5.11.6 Glicose e insulina

A glicose e insulina plasmáticas foram analisadas pelos kits comerciais Glicose PAP Liquiform[®] (Labtest, Minas Gerais, Brasil) e *Insulin Human Direct ELISA Kit*[®] (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). A resistência à insulina foi calculada pelo índice HOMA-IR (*homeostasis model assessment – insulin resistance*) $HOMA-IR = [\text{concentração da insulina de jejum } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicemia de jejum (mmol/L)}] / 22,5$.

5. 12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis qualitativas, utilizou-se o teste Qui-quadrado (χ^2) e os dados estão apresentados na forma de valor absoluto (n), seguido da sua respectiva porcentagem (%).

Para a apresentação dos dados quantitativos, assim como para a determinação dos testes que foram utilizados, considerou-se o tipo de distribuição dessas variáveis pelo teste de aderência *Kolmogorov-Smirnov* ($p > 0,05$).

As variáveis com distribuição normal estão apresentadas sob a forma de média e desvio padrão e foram realizados testes paramétricos (*t-student*, ANOVA, correlação de *Pearson*). Para as demais variáveis, a apresentação está na forma de mediana (p50) e intervalos interquartis (p25 e p75) e foram realizados testes não paramétricos (*Mann-Whitney*, *Kruskal-Wallis*, correlação de *Spearman*).

De acordo com o objetivo de cada artigo, foram utilizadas estratégias para avaliar o efeito tempo (análise intragrupo) pelo delta ($\Delta = T8 - T0$) ou efeito intervenção pela comparação das médias antes e após a intervenção ($T0$ vs $T0$ e $T8$ vs $T8$). Além disso, de acordo com o delineamento de cada artigo, foram testados modelos de regressão linear ou logística (*Odds Ratio*).

Todos os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences*[®] (SPSS), versão 20.0, considerando como valor de significância $p < 0,05$.

5. 13 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública (COEP/FSP) e do Hospital Universitário (**Anexo 3**).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ARTIGO 1: PUBLICADO NA REVISTA DA SOCIEDADE DE CARDIOLOGIA
DO ESTADO DE SÃO PAULO – SOCESP v.25, p. 139-145, 2015.

ASSOCIAÇÃO DO TAMANHO DA LDL E HDL COM OS ÁCIDOS GRAXOS W-3 E W-6
PLASMÁTICO É INFLUENCIADA PELO NÍVEL DO RISCO CARDIOVASCULAR

*THE ASSOCIATION BETWEEN SIZE OF LDL AND HDL AND THE PLASMA FATTY ACIDS ω -3 E ω -6 IS
INFLUENCED BY THE LEVEL OF CARDIOVASCULAR RISK*

Caroline Pappiani¹

Caroline de Oliveira Gallo¹

Patricia Azevedo de Lima¹

Flávia De Conti Cartolano¹

Nágila Raquel Teixeira Damasceno¹

¹Universidade de São Paulo,
Faculdade de Saúde Pública,
Departamento de Nutrição,
São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

Introdução: Embora haja consenso sobre os efeitos do w-3 e w-6 na saúde cardiovascular, o mesmo não se aplica à influência desses sobre o tamanho das lipoproteínas. **Objetivo:** Relacionar o w-3 e w-6 com partículas de LDL e HDL e avaliar a influência do risco cardiovascular nessa associação. **Métodos:** Estudo transversal (n=371) com adultos e idosos, ambos os sexos, entre 30-74 anos, estratificados pelo Escore de Risco de Framingham. Após caracterização demográfica e clínica, os ácidos graxos da dieta e do plasma foram analisados. Perfil lipídico, apolipoproteínas e glicemia foram avaliados após jejum de 12h. O tamanho e percentual de LDL e HDL foram analisados no sistema Lipoprint. **Resultados:** Ácido linoleico plasmático se correlacionou com HDL_{GRANDE}, HDL_{PEQUENA} e tamanho de LDL. O DHA também se correlacionou com HDL_{GRANDE}, HDL_{PEQUENA} e tamanho de LDL. Na análise de tendência linear ajustada, o maior tercil de DHA se associou com HDL_{GRANDE}, HDL_{PEQUENA}, TG e HDL-c e o ácido linoleico se associou com HDL_{GRANDE}, HDL_{PEQUENA}, TG e tamanho de LDL. **Conclusão:** Os resultados obtidos mostram que o w-6 e w-3 plasmáticos se associaram com partículas maiores de LDL e HDL, sendo essas associações influenciadas pelo nível de risco cardiovascular.

Descritores: Ácidos Graxos Ômega-3; Ácidos Graxos Ômega-6; Lipoproteínas.

ABSTRACT

Introduction: Although there is a consensus as to the positive effects of the fatty acids w-3 and w-6 on cardiovascular health, the same cannot be said concerning the influence of these on the size of lipoproteins. **Objective:** To correlate w-3 and w-6 with LDL and HDL particles, and evaluate the influence of cardiovascular risk in this association. **Methods:** This is a cross-sectional study (n=371) with adults and elderly people, of both sexes, aged between 30-74 years old, stratified by Framingham Risk Score. After the demographic and clinical evaluation, fatty acids from diet and plasma were analyzed. Lipid profile, apolipoproteins and glucose were assessed after 12h of fasting. The size and percentage of LDL and HDL were analyzed in the Lipoprint system. **Results:** Plasma linoleic acid was associated with HDL_{LARGE}, HDL_{SMALL} and LDL size. DHA also correlated with HDL_{LARGE}, HDL_{SMALL} and LDL size. In the adjusted linear trend analysis, the highest tertile of DHA was associated with HDL_{LARGE}, HDL_{SMALL}, TG and HDL-c and linoleic acid was associated with HDL_{LARGE}, HDL_{SMALL}, TG and LDL size. **Conclusion:** The results show that the plasma fatty acids w-3 and w-6 were associated with larger LDL and HDL particles, and these associations were influenced by the cardiovascular risk level.

Descriptors: Fatty Acids Omega-3, Fatty Acids Omega-6; Lipoprotein.

INTRODUÇÃO

Segundo dados recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS), 48% da mortalidade global são atribuídas às doenças cardiovasculares (DCV) e o Brasil apresenta tendência semelhante. Os programas de políticas públicas têm estimulado a modificação de fatores de risco tradicionais, que constituem a base de todos os modelos de predição de risco cardiovascular aceitos atualmente.

Dentre os fatores de risco modificáveis, a dieta ocupa papel de destaque. Ácidos graxos (AG) insaturados em detrimento dos saturados e *trans*, associados ao consumo de hortaliças, frutas, leguminosas, cereais integrais e peixes têm mostrado efeitos positivos em alguns fatores de risco e na incidência de DCV¹.

No entanto, estima-se que dietas ocidentais apresentam proporções de ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 (ω -6) e ômega-3 (ω -3) que variam de 20:1 a 25:1, enquanto as recomendações atuais propõem (5:1 a 10:1)². Sabe-se que estes ácidos graxos competem pela enzima Δ -6 dessaturase, assim como seus principais derivados (ácido araquidônico - AA e eicosapentaenoico - EPA) também apresentam competição pelos mesmos sítios de ligação³. Os produtos finais dos processos de dessaturação e alongação desses ômegas, os eicosanoides, exercem funções antagônicas em diversos processos de sinalização celular, tendo os leucotrienos e tromboxanos das séries 3 e 5 maior ação anti-inflamatória, enquanto aqueles das séries 2 e 4 são potentes agentes pró-inflamatórios⁴.

Embora haja consenso em relação ao efeito desses ácidos graxos sobre alguns fatores de risco tradicionais, o mesmo não se aplica aos novos potenciais biomarcadores.

De acordo com Verhoye et al.⁵, o monitoramento de subfrações de lipoproteínas podem fornecer estimativa adicional ao risco cardiovascular. Existem evidências de que partículas pequenas e densas de LDL sejam mais aterogênicas devido a sua menor afinidade ao receptor B/E de LDL, a diminuição no *clearance*, maior susceptibilidade à oxidação e maior capacidade de migração para a camada subendotelial da parede arterial, favorecendo o acúmulo de colesterol, de produtos de oxidação e inflamação.

Um estudo transversal de base populacional mostrou que concentrações elevadas de ω -6 foram inversamente associadas às partículas de LDL pequenas, enquanto relação positiva foi observada com o tamanho de HDL, sugerindo papel adicional do ω -6 na redução do risco de

DCV⁶. De modo semelhante, indivíduos com dislipidemia (DLP) suplementados com w-3 mostraram aumento no tamanho das partículas de LDL e redução de TG, resultando em um perfil menos aterogênico⁷.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi identificar se os ácidos graxos w-3 e w-6 da dieta e do plasma se associam com o tamanho das partículas de LDL e HDL, e avaliar se essas associações são influenciadas pelo nível de risco cardiovascular.

MÉTODOS

Estudo transversal formado por indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 30 e 74 anos, estratificados segundo *Escore de Risco de Framingham*.

Os participantes foram recrutados do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP - São Paulo, Brasil). Não foram incluídos gestantes, lactantes, indivíduos que participavam de outros estudos, evento cardiovascular prévio (monitorado por eletrocardiograma e avaliação clínica), usuários de drogas ilícitas e alcoolistas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Após caracterização demográfica e clínica da amostra, o peso e a altura foram mensurados com precisão de 0,1 kg e 0,1 cm, respectivamente, com equipamentos calibrados e métodos padronizados. A partir desses parâmetros, o índice de massa corporal (IMC) foi calculado (kg/m^2) e classificado (OMS, 2000). Usando uma fita inelástica, flexível e com precisão 1,0 mm (TBW®, São Paulo, Brasil), a medida da circunferência da cintura (CC) foi obtida e classificada (OMS, 2000). A composição corporal foi avaliada por bioimpedância elétrica (BIA) (Analyzer® modelo Quantum II, Sistemas RJL, Michigan, EUA) e o percentual de gordura corporal (%GC) foi estimado por meio do programa Cyprus, versão 2.5 (RJL Systems®, Detroit, EUA), considerando sexo, idade, peso, altura, nível de atividade física, resistência e reactância.

O consumo alimentar baseou-se na aplicação de dois recordatórios de 24 horas (R24h), em dias alternados (um durante a semana e outro no final de semana), visando contemplar variações diárias intra e interindividual e melhor descrever o hábito alimentar dos participantes. Foi utilizado um formulário padrão para a aplicação do R24h e o preenchimento foi baseado no método *multiple pass*. Com o objetivo de reduzir os vieses de informação, foi utilizado o registro fotográfico alimentar, que continha modelos de utensílios com medidas caseiras e porções de

alimentos. A energia, os macronutrientes (proteínas, lipídeos e carboidratos) e ácidos graxos (saturados, monoinsaturados e poli-insaturados) foram analisados pelo Programa *Food Processor* (ESHA Research Corp, Salem OR). A partir dos resultados brutos, o consumo foi ajustado pela energia. A variabilidade intrapessoal foi corrigida por meio do programa *Multiple Source Method* - MSM (versão 1.0.1, 2011), que estima o consumo habitual de cada nutriente.

Após jejum de 12h, 20 ml de sangue foram coletados em tubo seco (soro), tubo contendo EDTA (1,0 mg /mL) (plasma) e tubo com fluoreto de sódio (análises de glicose). Adicionou-se ao plasma (3000 rpm, 15 min, 4°C) ou soro os seguintes inibidores de proteases: aprotinina (10 ug/ml), benzamidina (10 mM) e PMSF (5 mM) e o antioxidante BHT (100 mM). As amostras foram mantidas a -80°C até o momento das análises.

Concentrações plasmáticas de TG, colesterol total (CT) e colesterol associado à lipoproteína de alta densidade (HDL-c) foram analisadas por meio de kits comerciais Labtest® (Minas Gerais, Brasil). O colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) foi calculado usando a equação de Friedewald. Para classificação dos indivíduos, foram utilizados os valores de referência propostos pela V Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. As apolipoproteínas AI e B foram analisadas por métodos convencionais (Wako® Chemicals EUA Inc., Richmond, VA, EUA). Os ácidos graxos plasmáticos foram analisados por meio de HPLC, seguindo o protocolo de Bligh e Dyer⁸ e Nimura e Kinoshita⁹. O tamanho das lipoproteínas (HDL e LDL) foi analisado pelo sistema Lipoprint (Lipoprint System®; Quantimetrix, Redondo Beach, CA). As subfrações LDL-1 e LDL-2 foram classificadas como grande e as subfrações LDL-3 a LDL-7 como partículas menores e mais densas. As partículas HDL-1 a HDL-3 foram classificadas em grandes, HDL-4 a HDL-7 em intermediárias e HDL-8 a HDL-10 em pequenas. A glicose plasmática foi analisada por meio de kit (Glicose PAP Liquiform®, Labtest, Minas Gerais, Brasil). A análise de insulina plasmática foi realizada por meio de kit *Insulin Human Kit*® (Life Technologies, Grand Island, NY). Foi calculado o modelo de avaliação da homeostase - resistência à insulina (HOMA-IR), sendo a resistência à insulina definida como HOMA-IR > 4,65. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as variáveis qualitativas foi utilizado o teste qui-quadrado (χ^2) e os dados estão apresentados na forma de valor absoluto, seguido da sua respectiva porcentagem (%). Para a apresentação dos dados quantitativos, assim como para a determinação dos testes utilizados, foi considerado o tipo de distribuição dessas variáveis (teste *Kolmogorov-Smirnov*, $p > 0.05$). As variáveis com distribuição normal são apresentadas sob a forma de média e desvio padrão e as demais por mediana (p50) e intervalos interquartis (p25 e p75). A magnitude das correlações adotou a seguinte classificação: $r < 0,4$ (correlação fraca), $0,4 \leq r < 0,5$ (correlação moderada) e $r \geq 0,5$ (correlação forte). Foram realizadas análises de tendência linear entre os tercis de ácidos graxos plasmáticos e variáveis bioquímicas. Esses modelos foram controlados pela pontuação do ERF, visando identificar a influência do nível de risco cardiovascular nas associações entre tamanho de lipoproteínas e ácidos graxos. Os testes estatísticos foram realizados no programa SPSS versão 20.0 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Observou-se predominância do sexo feminino (62%), raça branca (67%) e mais de 53% declararam ser não fumante. A média da idade foi de 53 anos. Os antecedentes familiares de doenças crônicas mostraram elevada frequência de hipertensão arterial sistêmica (HAS) (64%), diabetes mellitus (DM) (38%) e infarto agudo do miocárdio (IAM) (28%). Em se tratando das doenças crônicas auto-referidas, HAS foi a mais frequente (58%), seguida de DLP (55%) e DM (21%). Destaca-se ainda a elevada prevalência de obesidade (52%), %GC elevado (74%) e CC muito elevada (71%) (tabela 1).

A tabela 2 apresenta o consumo alimentar e o percentual de ácidos graxos plasmáticos, segundo ERF. Em relação à dieta, observou-se que quanto maior o risco cardiovascular menor o consumo de calorias, carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos graxos saturados. Em se tratando do plasma, observou-se perfil semelhante entre os grupos, exceto para o ácido araquidônico cujo percentual foi maior no grupo com risco cardiovascular intermediário.

A análise de correlação entre os ácidos graxos plasmáticos e dietéticos mostrou que os ácidos graxos oleico ($r=0,175$), araquidônico ($r=0,120$), palmítico ($r=0,125$) e DHA ($r=0,203$) se correlacionaram positivamente, embora de modo fraco.

Os parâmetros bioquímicos mostraram que quanto mais elevado o risco cardiovascular maior a concentração plasmática de CT, TG, APO B e glicemia de jejum. Observou-se também que quanto maior o risco cardiovascular, menor o percentual de HDL_{GRANDE}, seguido pelo reduzido tamanho das partículas de LDL (tabela 3).

A maioria dos ácidos graxos da dieta não se correlacionou com os marcadores bioquímicos, exceto o ácido graxo araquidônico que apresentou correlação positiva com o tamanho das partículas de LDL ($r=0,167$). O ácido palmítico se correlacionou positivamente com o percentual de HDL_{PEQUENA} ($r=0,132$) e negativamente com HDL_{GRANDE} ($r=-0,126$), enquanto o ácido docosahexaenóico (DHA) apresentou correlação negativa com TG e glicemia de jejum ($r=-0,164$; $r=-0,129$, respectivamente).

A tabela 4 evidencia que os ácidos graxos do plasma se correlacionaram com maior número de marcadores bioquímicos, além das relações terem sido mais robustas do que as observadas com os ácidos graxos da dieta. Os resultados mostraram que o ácido linoleico apresentou correlação positiva com HDL-c ($r=0,116$), percentual de HDL_{GRANDE} ($r=0,290$) e tamanho de LDL ($r=0,226$) e correlação negativa com TG ($r=-0,301$), APO B ($r=-0,280$) e percentual de HDL_{PEQUENA} ($r=-0,298$). Resultados semelhantes, porém, menos robustos, foram encontrados com o ácido araquidônico, o qual apresentou correlação positiva com HDL-c ($r=0,180$) e negativa com TG ($r=-0,191$).

Os resultados encontrados na tabela 4 foram reforçados pela análise de tendência linear dos tercís de ácidos graxos plasmáticos e variáveis bioquímicas (tabela 5), no qual o ERF evidenciou seu impacto nessas associações. Os resultados confirmaram o papel cardioprotetor dos ácidos graxos poli-insaturados w-6, uma vez que os indivíduos no maior tercís de ácido linoleico apresentaram maior redução no TG e percentual de HDL_{PEQUENA}, seguido de aumento no percentual de HDL_{GRANDE} e no tamanho de LDL. Os maiores tercís de ácido araquidônico se associaram à redução no TG e aumento no HDL-c. Em relação ao w-3, os maiores tercís de DHA se associaram à redução no TG e percentual de HDL_{PEQUENA} e aumento no HDL-c, HDL_{GRANDE} e tamanho de LDL.

DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que os ácidos graxos w-6 (linoleico e araquidônico) e w-3 (DHA) se relacionaram com um perfil lipoproteico menos aterogênico, no qual se destacou a presença de partículas de HDL e LDL maiores, em detrimento de HDL pequenas, sendo essas associações influenciadas pelo nível de risco cardiovascular dos indivíduos. O papel dos ácidos graxos w-3 e w-6 na iniciação e desenvolvimento das DCV já foi previamente descrito na literatura¹⁰. Entretanto, os resultados do presente estudo tornam-se particularmente inéditos ao mostrar que os ácidos graxos do plasma, mais que os da dieta, se associaram com marcadores cardiometabólicos e que essas associações são influenciadas pelo nível de risco cardiovascular.

Portanto esses resultados ampliam o papel positivo dos ácidos graxos poli-insaturados sobre o risco cardiovascular. De acordo com Asztalos et al.¹¹ pacientes com doença arterial coronariana (DAC) mostraram predominância de partículas pequenas de HDL quando comparadas às partículas grandes. Evidências epidemiológicas sugerem que o aumento da proporção de partículas pequenas e densas de lipoproteínas está fortemente associado com o risco de DAC¹². Perfil semelhante também foi descrito por El Harchaoui et al.¹³ ao mostrarem que partículas pequenas de HDL estão associadas a diversos componentes da Síndrome Metabólica e aumentado risco de DAC.

O papel pró-aterogênico da LDL-c é inquestionável e tem sido foco de todos os programas de prevenção e tratamento das DCV¹⁴. Entretanto, esse parâmetro não é capaz de explicar todos os eventos cardiovasculares; sugerindo que outras características associadas à LDL, além do seu conteúdo de colesterol, são importantes na determinação das características aterogênicas dessa partícula. De acordo com Despres et al.¹⁵, a LDL é um partícula heterogênea em termos de tamanho e características físicoquímicas. Em consenso com a literatura, nossos resultados mostraram que as subfrações de LDL variaram em função do ERF e que essa distribuição foi influenciada pelos ácidos graxos w-3 e w-6.

Ao contrário do papel aterogênico da LDL, são consistentes as evidências epidemiológicas mostrando que o HDL-c é um fator de risco cardiovascular independente¹⁶. O papel antiaterogênico da HDL se deve a participação em funções que vão além do transporte reverso de colesterol, onde se destacam o papel antioxidante, anti-inflamatório e anti-trombótico. Segundo Kontush e Chapman¹⁷ essas funções são fortemente influenciadas pela heterogeneidade

da HDL em termos estruturais (tamanho, densidade e outras propriedades físicoquímicas), tornando as subfrações de HDL partículas com distintas ações anti-aterogênicas. De modo semelhante ao observado para a LDL, os resultados apresentados no presente estudo mostram que os ácidos graxos w-3 e w-6 do plasma se associam a um perfil de subfrações de HDL menos aterogênico.

Nossos resultados mostraram também que o ácido graxo linoleico e seu derivado, o ácido araquidônico, se relacionaram com o HDL-c e inversamente com TG. A relação TG/HDL-c, conhecida como índice de aterogenicidade¹⁸, tem forte impacto na geração de partículas de LDL pequenas e densas¹⁹, além de manter relação direta com o desenvolvimento da aterosclerose²⁰. Em se tratando do risco cardiovascular, nossos resultados mostraram que quanto maior o risco cardiovascular, mais elevada a concentração plasmática de CT, TG, APO B e glicemia de jejum, enquanto o percentual de HDL_{GRANDE} foi menor, seguido pelo reduzido tamanho das partículas de LDL. Apesar desse perfil, correlações semelhantes não foram observadas entre os marcadores bioquímicos e os ácidos graxos da dieta, indicando possíveis limitações na avaliação do consumo alimentar. Essa possibilidade foi confirmada quando os ácidos graxos da dieta e presentes no plasma apresentaram fracas correlações entre si, evidenciando os vieses dos métodos subjetivos de avaliação da dieta.

Apesar da importância da dieta na prevenção e no controle dos fatores de risco cardiovascular, seu monitoramento é bastante complexo e passível de erros aleatórios e sistemáticos, o que torna o uso de marcadores bioquímicos do consumo alimentar uma ferramenta mais sensível em estudos de associação entre dieta e DCV²¹.

Uma das limitações do método R24h deve-se à elevada variabilidade da ingestão de nutrientes em diferentes dias, o que confere ao método pouca representatividade do consumo habitual. Além disso, por ser um método dependente da memória, o paciente pode tanto sub-relatar os alimentos realmente consumidos, como referir alimentos que não foram incluídos na dieta²². É importante destacar que tais limitações não se restringem ao R24h, mas também estão presentes na avaliação de consumo por meio de registro alimentar e questionários de frequência alimentar²³. Mesmo com tais vieses, a relação entre nutrientes e doenças crônicas tem sido amplamente descrita em estudos epidemiológicos²⁴, fato esse nem sempre confirmado pelos estudos clínicos²².

É importante destacar que os parâmetros dietéticos variaram inversamente ao risco cardiovascular, ou seja, indivíduos com alto ERF relataram menor consumo de energia, macronutrientes e ácidos graxos saturados. Essa aparente contradição em relação ao perfil clínico reflete um evento típico da epidemiologia reversa e já tem sido descrita por outros estudos. Esse perfil sugere que indivíduos com alto ERF, por saberem que possuem alguns fatores de risco cardiovascular alterados, adotam comportamento alimentar mais saudável ou passam a relatar alimentos sabidamente menos aterogênicos. Essas observações foram reforçadas pelas fracas correlações entre os marcadores de consumo alimentar e parâmetros cardiovasculares tradicionais e novos monitorados no presente estudo. De modo semelhante, Kabagambe et al.²⁵ verificaram que ácidos graxos do tecido adiposo de voluntários apresentaram fracas correlações com a ingestão de ácidos graxos informada nos inquéritos alimentares. Desse modo, nossos resultados confirmam a superioridade dos marcadores bioquímicos de consumo em se relacionar com parâmetros cardiovasculares tradicionais e novos.

CONCLUSÃO

Os ácidos graxos plasmáticos w-3 e w-6 se correlacionaram com os marcadores cardiovasculares tradicionais e também com o tamanho da HDL e LDL, reforçando a importância dos biomarcadores de consumo na avaliação da relação entre dieta e DCV. Essas associações se mantiveram quando os modelos de tendência linear foram ajustados pelo nível de risco cardiovascular. Portanto, um maior conteúdo de ácidos graxos w-3 e w-6 no plasma pode modificar fatores de risco cardiovasculares tradicionais e novos, sobretudo associados com o tamanho das partículas de HDL e LDL.

REFERÊNCIAS

1. Kelly JH, Sabaté J. Nuts and coronary heart disease: an epidemiological perspective. *British Journal of Nutrition*. 2006;96(S2):S61-S7.
2. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*. 2008;233(6):674-88.

3. Fagundes LA. Ômega-3 e Ômega-6: o equilíbrio dos ácidos gordurosos essenciais na prevenção de doenças. Porto Alegre: Fundação de Radioterapia do Rio Grande do Sul, p. 111, 2002.
4. James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71(S):343-8.
5. Verhoye E, Langlois MR. Circulating oxidized low-density lipoprotein: a biomarker of atherosclerosis and cardiovascular risk? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2009;47(2):128-37.
6. Choo J, Ueshima H, Curb JD, Shin C, Evans RW, El-Saed A, et al. Serum n-6 fatty acids and lipoprotein subclasses in middle-aged men: the population-based cross-sectional ERA-JUMP Study. *The American journal of clinical nutrition.* 2010;91(5):1195-203.
7. Lee MW, Park JK, Hong JW, Kim KJ, Shin DY, Ahn CW, et al. Beneficial effects of omega-3 fatty acids on low density lipoprotein particle size in patients with type 2 diabetes already under statin therapy. *Diabetes & metabolism journal.* 2013;37(3):207-11.
8. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology.* 1959;37(8):911-7.
9. Nimura N, Kinoshita T. Fluorescent labeling of fatty acids with 9-anthryldiazomethane (ADAM) for high performance liquid chromatography. *Analytical Letters.* 1980;13(3):191-202.
10. Jakobsen MU, et al. Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:1425-32.
11. Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Cox CE, Batista MC, et al. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2004;24(11):2181-7.
12. Nishikura T, Koba S, Yokota Y, Hirano T, Tsunoda F, Shoji M, Hamazaki Y, Suzuki H, Itoh Y, Katagiri T, Kobayashi Y. Elevated small dense low-density lipoprotein cholesterol as a predictor for future cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21(8):755-67.
13. El Harchaoui K, Arsenault BJ, Franssen R, Després J-P, Hovingh GK, Stroes ES, et al. High-density lipoprotein particle size and concentration and coronary risk. *Annals of internal medicine.* 2009;150(2):84-93.
14. Ballantyne C, Kullo I. Conditional risk factors for atherosclerosis. *Mayo Clin Proc.* 2005; 80(2):219-230.

15. St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Bernard MP, Despres JP, et al. Comparison of various electrophoretic characteristics of LDL particles and their relationship to the risk of ischemic heart disease. *Circulation*. 2001;104:2295-9.
16. Sacks FM, Expert Group on HDL cholesterol. The role of high density lipoprotein (HDL) cholesterol in the prevention and treatment of coronary heart disease: expert group recommendations. *Am J Cardiol*. 2002; 15:139–143.
17. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic small, dense HDL-guardian angel of the arterial wall? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006; 3:144–153.
18. Dobiášová M, Frohlich J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in APO B-lipoprotein-depleted plasma (FERHDL). *Clinical biochemistry*. 2001;34(7):583-8.
19. Hirayama S, Miida T. Small dense LDL: an emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta*. 2012;414:215-24.
20. Von Eckardstein A, Nofer J-R, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(1):13-27.
21. de Carvalho Yokota RT, Miyazaki ES, Ito MK. Applying the triads method in the validation of dietary intake using biomarkers Método das tríades na validação do consumo alimentar com biomarcadores. *Cad Saúde Pública*. 2010;26(11):2027-37.
22. Fisberg RM, Marchioni DML, Colucci ACA. Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009;53(5):617-24.
23. Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D. Development, validation and utilization of food-frequency questionnaires - a review. *Public Health Nutr* 2001; 5(4): 567-87.
24. Wu H, Flint AJ, Qi Q, van Dam RM, Sampson LA, Rimm EB, Holmes MD, Willett WC, Hu FB, Sun Q. Association Between Dietary Whole Grain Intake and Risk of Mortality: Two Large Prospective Studies in US Men and Women. *JAMA Intern Med*. 2015 Jan 5.
25. Kabagambe EK, Baylin A, Allan DA, Siles X, Spiegelman D, Campos H. Application of the method of triads to evaluate the performance of food frequency questionnaires and biomarkers as indicators of long-term dietary intake. *American Journal of Epidemiology*. 2001;154(12):1126-35.

Tabela 1. Caracterização dos indivíduos, segundo perfil demográfico e clínico. São Paulo, 2015.

Variável	n	%
Sexo		
Masculino	141	38,2
Feminino	230	61,8
Raça		
Indígena	2	0,5
Amarelo	10	2,7
Negro	31	8,3
Pardo	79	21,5
Branco	249	67,0
Fumante		
Sim	70	19,1
Ex-Fumante	103	27,7
Não	198	53,2
Antecedente familiar^a		
Obesidade	66	17,8
AVC	69	18,6
Infarto	103	27,8
DM	141	38,0
HAS	238	64,2
Doenças auto referidas^b		
DM	76	20,5
DLP	203	54,7
HAS	216	58,2
Índice de Massa Corporal		
Baixo peso	5	1,3
Eutrofia	67	18,1
Sobrepeso	107	28,8
Obesidade	192	51,8
% Gordura Corporal		
Baixo	7	1,9
Adequado	88	24,1
Elevado	270	74,0
Circunferência da Cintura		
Sem risco	48	13,0
Elevada	61	16,4
Muito elevada	262	70,6

n=371. Resultados apresentados em número (n) e frequência (%). AVC: Acidente Vascular Cerebral; DM: Diabetes Mellitus; DLP: Dislipidemia; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; ^apai e/ou mãe do indivíduo teve ou tem alguma doença crônica; ^bdoenças atuais auto-relatadas pelo indivíduo.

Tabela 2. Consumo de energia, macronutrientes e ácidos graxos e percentuais de ácidos graxos plasmáticos, segundo o Escore de Risco de Framingham. São Paulo, 2015.

	Escore de risco de Framingham				p
	Total (n=371)	Baixo (n=99)	Intermediário (n=135)	Alto (n=137)	
Dieta					
Energia (kcal)	1610 (1300-1912)	1665 (1445-2032)	1650 (1323-1895)*	1543 (1238-1845)*	0,020
Lipídeos (g)	51 (40-66)	57 (46-72)	51 (40-65)	49 (38-63)*	0,027
Carboidratos (g)	211 (177-254)	237 (188-268)	210 (176-251)*	207 (170-253)*	0,031
Proteínas (g)	71 (60-85)	80 (61-89)	68 (60-83)*	70 (55-84)*	0,024
AG linoleico (g)	4 (3-5)	4 (3-6)	4 (3-5)	4 (3-5)	0,189
AG araquidônico (g)	0,1 (0,1-0,1)	0,1 (0,1-0,2)	0,1 (0,1-0,1)	0,1 (0,1-0,1)	0,121
AG oleico (g)	9 (6-11)	9 (8-12)	8 (6-12)	9 (6-11)	0,132
AG linolênico (g)	0,5 (0,4-0,6)	0,5 (0,4-0,7)	0,5 (0,3-0,6)	0,5 (0,3-0,6)	0,094
EPA (mg)	20 (10-40)	20 (10-50)	20 (10-33)	20 (10-40)	0,099
DHA (mg)	50 (20-100)	70 (40-130)	50 (20-100)*	50 (20-90)*	0,011
AG esteárico (g)	2 (2-3)	3 (2-4)	2 (2-3)	2 (2-3)	0,149
AG palmítico (g)	5 (4-7)	6 (5-8)	5 (4-7)	5 (4-7)	0,132
AG saturados (g)	16 (11-23)	19 (15-25)	16 (11-23)*	14 (9-23)*	0,007
AG monoinsaturados (g)	11 (8-17)	12 (9-19)	10 (7-18)	12 (8-17)	0,270
AG poli-insaturados (g)	5 (3-8)	6 (4-8)	5 (3-7)	5 (3-8)	0,164
Plasma					
AG linoleico (%)	32 (27-38)	28 (<1-37)	32 (23-37)	28 (<1-35)	0,074
AG araquidônico (%)	19 (16-24)	16 (<1-20)	19 (14-23)*	17 (<1-22)	0,045
AG oleico (%)	29 (25-34)	27 (<1-33)	28 (22-32)	27 (<1-32)	0,659
AG linolênico (%)	1 (<1-2)	<1 (0-2)	1 (<0-2)	1 (<1-2)	0,371
EPA (%)	2 (<1-6)	<1 (0-4)	1 (<1-4)	<1 (0-5)	0,117
DHA (%)	6 (4-8)	5 (<1-8)	5 (3-8)	5 (1-7)	0,393
AG esteárico (%)	3 (2-5)	2 (<1-3)	2 (<0-4)	2 (0-4)	0,067
AG palmítico (%)	5 (3-8)	4 (<1-7)	5 (2-8)	4 (1-7)	0,092

Valores apresentados em mediana (p25-p75). Valor de significância $p < 0,05$ referente aos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

AG: ácido graxo; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; * Intermediário ou Alto *versus* Baixo.

Tabela 3. Classificação dos indivíduos, segundo variáveis bioquímicas e Escore de Risco de Framingham. São Paulo, 2015.

Variáveis bioquímicas	Escore de risco de Framingham				p
	Total (n=371)	Baixo (n=99)	Intermediário (n=135)	Alto (n=137)	
CT (mg/dL)	202 (175-228)	198 (169-215)	203 (180-224)	206 (175-244)**	0,022
TG (mg/dL)	131 (98-194)	112 (80-181)	122 (94-184)	144 (105-215)*,**	0,001
HDL-c (mg/dL)	36 (30-43)	36 (29-42)	36 (31-46)	36 (30-42)	0,377
LDL-c (mg/dL)	135 (111-160)	132 (108-155)	135 (113-159)	139 (111-171)	0,317
APO AI (mg/dL)	129 (115-147)	123 (113-150)	132 (118-148)	131 (114-146)	0,242
APO B (mg/dL)	103 (87-120)	98 (84-112)	103 (86-116)	106 (90-126)*,**	0,009
HDL _{PEQUENA} (%)	19 (15-25)	18 (15-23)	19 (13-24)	20 (15-26)	0,068
HDL _{INTERMEDIÁRIA} (%)	50 (47-53)	51 (48-53)	50 (47-53)	51 (48-53)	0,776
HDL _{GRANDE} (%)	29 (23-35)	31 (25-36)	31 (23-37)	29 (22-34)*,**	0,039
LDL _{PEQUENA} (%)	1,6 (0,8-4,5)	1,4 (0,7-2,7)	1,5 (0,6-5,1)	1,8 (0,9-5,3)	0,092
LDL _{GRANDE} (%)	27 (23-31)	27 (24-30)	26 (23-30)	27 (23-31)	0,850
LDL (nm)	27 (26,5-27,2)	27 (26,8-27,3)	27 (26,5-27,2)	27 (26,5-27,1)*	0,026
GLI (mg/dL)	98 (91-111)	94 (87-100)	97 (91-108)	102 (95-118)*,**	<0,001
Insulina (µIU/mL)	16 (13-22)	14 (11-22)	15 (13-22)	17 (13-22)	0,489
HOMA-IR	4 (3-6)	4 (3-5)	4 (3-5)	4 (3-6)	0,055

Resultados apresentados em mediana (p25-p75). Diferença entre os grupos pelos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com valor de significância $p < 0,05$. APO AI: apolipoproteína AI; APO B: apolipoproteína B; CT: colesterol total; GLI: glicemia de jejum; TG: triacilgliceróis; * Intermediário ou Alto *versus* Baixo; ** Alto *versus* Intermediário.

Tabela 4. Correlações entre ácidos graxos plasmáticos (%) e variáveis bioquímicas. São Paulo, 2015.

AG plasmáticos (%)	HDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)	APO B (mg/dL)	HDL_{GRANDE} (%)	HDL_{PEQUENA} (%)	LDL (nm)	GLI (mg/dL)	HOMA-IR
Linoleico	0,116	-0,301	-0,280	0,290	-0,298	0,226	n.s.	n.s.
Araquidônico	0,180	-0,191	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Oleico	n.s.	-0,179	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
DHA	0,164	-0,319	n.s.	0,207	-0,168	0,190	-0,142	-0,173
Esteárico	n.s.	n.s.	n.s.	-0,191	0,259	n.s.	n.s.	n.s.
Palmítico	n.s.	n.s.	n.s.	-0,174	0,139	n.s.	n.s.	0,170

n=291. Valor de significância $p < 0,05$ referente ao teste de correlação de Spearman. AG: ácidos graxos; APO B: apolipoproteína B; DHA: ácido docosahexaenoico; GLI: glicemia de jejum; TG: triacilgliceróis; n.s.: não significativo.

Tabela 5. Análise de tendência entre tercís de ácidos graxos plasmáticos e variáveis bioquímicas ajustados pelo Escore de Risco de Framingham. São Paulo, 2015.

	AG linoleico (%)			P
	T1	T2	T3	
	<28,8	≥28,8 - <36,1	≥36,1	
HDL-c (mg/dL)	36	37	39	0,058
TG (mg/dL)	177	167	119	<0,001
HDL _{GRANDE} (%)	27	30	33	<0,001
HDL _{PEQUENA} (%)	23	20	17	<0,001
LDL (nm)	27	27	27	0,001
	AG araquidônico (%)			P
	T1	T2	T3	
	<17,0	≥17,0 - <21,7	≥21,7	
HDL-c (mg/dL)	34	38	39	0,003
TG (mg/dL)	176	153	135	0,003
HDL _{GRANDE} (%)	29	30	31	0,179
HDL _{PEQUENA} (%)	21	20	19	0,081
LDL (nm)	27	27	27	0,061
	DHA (%)			P
	T1	T2	T3	
	<4,6	≥4,6 - <7,2	≥7,2	
HDL-c (mg/dL)	35	36	40	0,001
TG (mg/dL)	188	147	126	<0,001
HDL _{GRANDE} (%)	28	29	33	<0,001
HDL _{PEQUENA} (%)	21	21	18	0,002
LDL (nm)	27	27	27	0,006
	AG esteárico (%)			P
	T1	T2	T3	
	<1,86	≥1,86 - <3,7	≥3,7	
HDL-c (mg/dL)	37	38	37	0,681
TG (mg/dL)	141	150	168	0,067
HDL _{GRANDE} (%)	32	30	28	0,006
HDL _{PEQUENA} (%)	18	20	23	<0,001
LDL (nm)	27	27	27	0,460
	AG palmítico (%)			P
	T1	T2	T3	
	<3,7	≥3,7 - <7,1	≥7,1	
HDL-c (mg/dL)	37	39	36	0,418
TG (mg/dL)	133	166	165	0,022
HDL _{GRANDE} (%)	31	31	27	0,009
HDL _{PEQUENA} (%)	19	19	22	0,005
LDL (nm)	27	27	27	0,238

n=291. Valor de significância $p < 0,05$ referente à análise de tendência linear. AG: ácido graxo; DHA: ácido docosahexaenoico; TG: triacilgliceróis.

6.2 ARTIGO 2: ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA DE NUTRIÇÃO
v.29, n. 4, 2016.

IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS W-3 NAS SUBFRAÇÕES DA HDL
DE INDIVÍDUOS TABAGISTAS

IMPACT OF W-3 FATTY ACIDS SUPPLEMENTATION ON HDL SUBFRACTIONS IN SMOKERS

Caroline Pappiani¹

Nágila Raquel Teixeira Damasceno¹

¹Universidade de São Paulo,
Faculdade de Saúde Pública,
Departamento de Nutrição,
São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

Introdução: A doença cardiovascular é a principal causa de morbimortalidade precoce em todo o mundo e o baixo conteúdo de colesterol associado à lipoproteína de alta densidade predispõe à aterosclerose. No entanto, a concentração de colesterol nessa partícula parece não ser capaz de explicar todos os eventos cardiovasculares, sendo o monitoramento das subfrações uma estimativa adicional ao risco cardiovascular. O tabagismo é um fator de risco independente para doença cardiovascular. Estudos mostram que indivíduos tabagistas têm baixo conteúdo plasmático de ômega-3 e ensaios clínicos demonstram que esses ácidos graxos conferem proteção cardiovascular. **Objetivo:** Avaliar o efeito da suplementação com ômega-3 nas subfrações da HDL em indivíduos tabagistas. **Metodologia:** Ensaio clínico, randomizado, duplo-cego. Foi selecionada uma amostra com 33 tabagistas, de ambos os sexos, com idade entre 30 e 60 anos, suplementados com ômega-3 (n=17) ou placebo (ácidos graxos ômega-6, n=16) por 2 meses. As subfrações da HDL foram analisadas pelo sistema Lipoprint. Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa SPSS, versão 20.0. **Resultados:** A média da idade foi 49 anos, com predominância da raça branca. Após a intervenção, o grupo ômega-3 modificou positivamente o perfil lipídico e as subfrações da HDL dos tabagistas. Nos modelos de regressão linear testados, o percentual de DHA plasmático apresentou associações negativas com percentual da HDL_{PEQUENA}. **Conclusão:** A suplementação com ômega-3 está associada com uma alteração favorável na distribuição das subfrações da HDL, aumentando a HDL_{GRANDE} e diminuindo a HDL_{PEQUENA}, reforçando a importância do ômega-3 na saúde cardiovascular de indivíduos tabagista.

Descritores: ômega-3; ácidos graxos; lipoproteínas; tabagismo.

ABSTRACT

Introduction: Cardiovascular disease is the leading cause of premature mortality worldwide and the low cholesterol content associated with high density lipoprotein predisposes to atherosclerosis. However, the cholesterol content in this lipoprotein does not seem to be able to explain all cardiovascular events. In this sense, evaluate lipoprotein subfractions can be an additional estimate in relation to cardiovascular risk. Smoking is an independent risk factor for cardiovascular disease. Studies show that smokers have lower plasmatic content of omega-3 and clinical trials have shown that these fatty acids provide cardiovascular protection. **Objective:** Evaluate the effect of omega-3 supplementation in HDL subfractions of smokers. **Methodology:** This is a randomized and double-blind clinical trial. It was selected 33 smokers, both sexes, aged between 30 and 60 years old, supplemented with omega-3 (n = 17) or omega-6 (n = 16) during 8 weeks. HDL subfractions were analyzed using Lipoprint system. Statistical analyses were performed with SPSS software, version 20.0. **Results:** Mean age was 49 years, with a predominance of the white ethnicity. After the intervention, omega-3 group improved lipid profile and HDL subfractions of smokers. According to linear regression models, plasmatic DHA (%) showed negative associations with the percentage of HDL_{SMALL}. **Conclusion:** Supplementation with omega-3 is associated with positive modifications in HDL subfractions, increasing HDL_{LARGE} and decreasing HDL_{SMALL}, strengthening the importance of omega-3 in cardiovascular health of smokers.

Descriptors: omega-3; fatty acids; lipoproteins; smoking.

INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morbimortalidade precoce em todo o mundo e, de um modo geral, a aterosclerose é a base fisiopatológica para os eventos clínicos primários e secundários. Esta se desenvolve ao longo de décadas de maneira insidiosa, podendo os primeiros sinais serem fatais ou altamente limitantes¹.

Além do papel essencial da lipoproteína de baixa densidade (LDL) na gênese da aterosclerose, é amplamente reconhecido que o baixo conteúdo de colesterol associado à lipoproteína de alta densidade (HDL-c) predispõe, de modo independente, à aterosclerose e que o aumento da concentração plasmática dessa lipoproteína diminui o risco cardiovascular. No entanto, apesar do papel inquestionável dessas lipoproteínas no desenvolvimento da aterosclerose, a concentração de colesterol nessas partículas não é capaz de explicar todos os eventos cardiovasculares. Nesse sentido, o monitoramento de subfrações lipoproteicas pode fornecer uma estimativa adicional ao risco cardiovascular.

Atualmente, o papel anti-aterogênico da HDL tem sido amplamente discutido, pois sabe-se que, além do transporte reverso de colesterol, suas propriedades antioxidante, anti-plaquetária, anti-trombótica, anti-inflamatória e vasodilatadora podem contribuir para sua ação cardioprotetora². Além do conteúdo de colesterol, estas funções estão relacionadas com os diferentes componentes da HDL, que influenciam diretamente no tamanho desta lipoproteína. Asztalos et al.³ mostraram que as partículas grandes de HDL (HDL_{GRANDE}) estão associadas com menor risco de DCV, enquanto as partículas pequenas (HDL_{PEQUENA}) foram associadas com risco aumentado. Os mesmos autores propuseram que o aumento no percentual de HDL_{GRANDE} induzido pelo w-3 foi associado com um elevado potencial anti-inflamatório e que os mecanismos pelos quais o w-3 aumenta o tamanho da HDL poderiam estar relacionados com alterações na transferência de lipídeos, mediada pela redução da atividade da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP).

Além dos fatores de risco associados ao perfil lipídico, sabe-se que o sedentarismo, a obesidade e o tabagismo representam fatores de risco modificáveis e esses têm sido foco da maioria dos programas de prevenção de DCV. Embora o tabagismo seja um hábito socialmente tolerável, consequências negativas para a saúde cardiovascular têm sido claramente identificadas,

tais como ações vasculares diretas⁴, estresse oxidativo⁵, efeitos trombogênicos⁶ e dislipidemias secundárias⁷.

O tabagismo é um fator de risco independente para aterosclerose e DCV e, embora o seu papel fisiopatológico no risco cardiovascular não esteja totalmente compreendido, a disfunção endotelial mediada pelos radicais livres é considerada um evento chave⁸. Nesse contexto, os lipídeos encontram-se entre os compostos sensíveis às modificações por radicais livres, sendo os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) os principais alvos de processos oxidativos e fonte de produtos radicalares⁹.

Estudos mostram que indivíduos tabagistas têm baixo conteúdo plasmático de ômega-3 (w-3), principalmente ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5) e ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6)¹⁰. Além disso, baixos níveis de PUFA foram associados com um maior risco de DCV¹¹.

Ensaio clínicos demonstram os efeitos benéficos do w-3 em pacientes com DCV e os mecanismos pelos quais eles conferem proteção cardiovascular estão relacionados ao seu papel anti-inflamatório¹², efeito na redução plasmática dos triacilgliceróis¹³, na redução da frequência cardíaca de repouso¹⁴, na redução da pressão arterial¹¹, na redução da arritmia¹⁵ e na melhora da capacidade funcional do miocárdio¹⁶. Recentemente, Din et al.¹⁷ demonstraram que o w-3 melhorou a fibrinólise e a função endotelial em indivíduos tabagistas, considerado um grupo de alto risco para eventos cardiovascular.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da suplementação com w-3 nas subfrações da HDL em indivíduos tabagistas.

MÉTODOS

O ensaio clínico foi do tipo controlado, randomizado, duplo-cego, paralelo, com seguimento de 8 semanas e intervenção nutricional baseada na suplementação com ácidos graxos. Para o presente estudo, foi selecionada uma amostra com 33 tabagistas, de ambos os sexos, com idade entre 30 e 60 anos, suplementados com w-3 (n=17) ou w-6 (ômega-6, n=16). No presente estudo, o cálculo amostral foi baseado na diferença entre as médias e desvio padrão, utilizando $\alpha=0,05$ e poder estatístico de 80%. Desse modo, estimou-se que o tamanho amostral mínimo para observar o efeito do w-3 sobre o tamanho da HDL seria de 17 indivíduos por grupo.

Os participantes foram recrutados do Hospital Universitário na Universidade de São Paulo (USP - São Paulo, Brasil). Não foram incluídas gestantes, lactantes, indivíduos que participavam de outros protocolos de investigação, evento cardiovascular prévio (monitorado por meio de eletrocardiograma e avaliação clínica), usuários de drogas ilícitas e alcoolistas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

O protocolo de intervenção utilizou cápsulas de w-3 (óleo de peixe composto por 37% de EPA, 23% de DHA, 20% de outros ácidos graxos poli-insaturados e 20% de ácidos graxos monoinstaurados) e cápsulas de w-6 (óleo de girassol contendo 70% de ácido linoleico, 20% de ácidos graxos monoinsaturados e 10% de ácidos graxos saturados). As cápsulas foram produzidas, embaladas e aleatorizadas pela empresa Relthy (Indaiatuba, São Paulo, Brasil) visando garantir que o estudo se mantivesse cego durante toda a intervenção. Os indivíduos foram orientados a ingerir três cápsulas ao dia distribuídas nas três principais refeições (desjejum, almoço e jantar), durante 8 semanas. Foi entregue um livro diário para cada indivíduo, no qual foi realizado o registro de efeitos adversos, eventuais mudanças no uso de medicamentos e motivo do não uso da suplementação. O nível de aderência à intervenção foi avaliado por meio da contagem do número de cápsulas restantes ao término da intervenção e confirmado por meio da análise de ácidos graxos no plasma, conforme o método de Nimura e Kinoshita¹⁸.

Após caracterização demográfica e clínica da amostra, o peso e a altura foram mensurados com precisão de 0,1 kg e 0,1 cm, respectivamente, com equipamentos calibrados e métodos padronizados. A partir desses parâmetros, o índice de massa corporal (IMC) foi calculado (kg/m^2). Usando uma fita inelástica, flexível e com precisão 1,0 mm (TBW®, São Paulo, Brasil), a medida da circunferência da cintura (CC) foi obtida. A composição corporal foi avaliada por bioimpedância elétrica (BIA) (Analyzer® modelo Quantum II, Sistemas RJL, Michigan, EUA) e o percentual de gordura corporal (%GC) foi estimado por meio do programa Cyprus, versão 2.5 (RJL Systems®, Detroit, EUA), considerando sexo, idade, peso, altura, nível de atividade física, resistência e reactivância.

Após jejum de 12h, 20 ml de sangue foram coletados em tubo seco (soro), tubo contendo EDTA (1,0 mg /mL) (plasma) e tubo com fluoreto de sódio (análise de glicose). Adicionou-se ao plasma (3000 rpm, 15 min, 4°C) ou soro os seguintes inibidores de proteases: aprotinina (10

ug/ml), benzamidina (10 mM) e PMSF (5 mM) e o antioxidante BHT (100 mM). As amostras foram mantidas a -80°C até o momento das análises.

As concentrações plasmáticas de triacilgliceróis (TG), colesterol total (CT) e HDL-c foram analisadas por meio de kits comerciais (Labtest, Minas Gerais, Brasil) em sistema semi-automático Cobas®. O colesterol associado à LDL foi calculado usando a equação de Friedewald (1972). As apolipoproteínas APO AI e B foram analisadas por método padrão, utilizando o Autokit APO AI® e Autokit APO B® (Wako Chemicals USA Inc., Richmond, VA, EUA). Os kits comerciais da Wako são baseados no método de imunoenensaio turbidimétrico para determinação quantitativa de apolipoproteínas específicas no plasma.

As subfrações da HDL foram analisadas pelo sistema Lipoprint (Lipoprint System®; Quantimetrix, Redondo Beach, CA). Foram identificadas 10 subfrações sendo as partículas HDL-1 a HDL-3 classificadas em grandes, HDL-4 a HDL-7 em intermediárias e HDL-8 a HDL-10 em pequenas. A glicose plasmática foi analisada por meio de kit comercial (Glicose PAP Liquiform®, Labtest, Minas Gerais, Brasil). Todas as análises foram realizadas em duplicata e os coeficientes de variação intra e inter ensaios ficaram abaixo de 10%.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis qualitativas foi utilizado o teste Qui-quadrado (χ^2) e os dados estão apresentados na forma de valor absoluto, seguido da sua respectiva porcentagem (%). Para a apresentação dos dados quantitativos, assim como para a determinação dos testes utilizados, foi considerado o tipo de distribuição dessas variáveis (teste *Shapiro-Wilk*). As variáveis com distribuição normal são apresentadas sob a forma de média e desvio padrão e as demais por mediana (p50) e intervalos interquartis (p25 e p75). A diferença entre os grupos (efeito intervenção) foi testada pela comparação de médias pelo teste *t-Student* para as variáveis paramétricas e *Mann Whitney* para as variáveis não paramétricas. O efeito tempo (T8 versus T0) em ambos os grupos foi avaliado pelos testes *t-Student* pareado e *Wilcoxon*, a depender da normalidade da variável. Foi utilizada a técnica de análise de ensaios aleatorizados e controlados “intenção-de-tratar”, em que os indivíduos são comparados – em termos de resultados finais – dentro dos grupos para os quais foram inicialmente aleatorizados, independentemente de terem desistido do estudo (*drop-outs*). Para avaliar a influência do w-3 nas subfrações da HDL

(variáveis dependentes) foram realizadas análises de regressão linear simples e múltipla. Como variável independente foi testado o percentual de EPA, de DHA e a soma (EPA + DHA) incorporados ao plasma após intervenção. No entanto, a variável que atendeu aos pressupostos da regressão linear foi o percentual de DHA. Essa variável independente foi testada na forma bruta e ajustada pela idade (modelo 1), idade e sexo (modelo 2) e idade, sexo e hipertensão arterial sistêmica (HAS) auto-relatada (modelo 3). Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences*[®] (SPSS), versão 20.0. O valor de significância considerado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na tabela 1 estão descritas as características clínicas, demográficas e antropométricas dos tabagistas. Em ambos os grupos a média da idade foi 49 anos, com predominância da raça branca (w-3 = 76% e w-6 = 63%). Observou-se que os grupos também foram semelhantes em relação ao sexo (w-3 = 53% masculino e w-6 = 50%). Quanto às demais variáveis, os grupos também foram considerados estatisticamente semelhantes, sendo que os parâmetros antropométricos evidenciaram presença de excesso de peso, bem como elevada circunferência da cintura e percentual de gordura corporal.

Os resultados do percentual de adesão dos participantes à intervenção mostraram que 84% das cápsulas de w-3 foram ingeridas, sendo esse percentual associado ao aumento de 87,5% do DHA e 70% do EPA no plasma desses indivíduos (dados não apresentados).

O perfil bioquímico está apresentado na tabela 2. Comparando o efeito intervenção, no momento basal os grupos foram considerados semelhantes para todas as variáveis. No entanto, após 8 semanas, houve diferença no CT, LDL-c, não HDL-c, LDL-c/APO B, CT/HDL-c e LDL-c/HDL-c, indicando que o grupo w-3 modificou positivamente o perfil lipídico dos tabagistas em comparação ao w-6. Além disso, avaliando o efeito tempo, observou-se que no grupo w-3 houve redução do CT, não-HDL-c, TG, LDL-c/APO B, TG/HDL-c, CT/HDL-c e LDL-c/HDL-c, enquanto o grupo w-6 não apresentou mudanças significativas.

O percentual e a concentração das subfrações da HDL estão apresentados na tabela 3. No momento basal os grupos foram considerados semelhantes para todas as variáveis, com exceção do percentual da subfração HDL-10 e HDL_{PEQUENA}. Contudo, ao avaliarmos o efeito intervenção,

observou-se que o grupo w-3 promoveu aumento da HDL_{GRANDE}, sendo essa variação associada à elevação da subfração HDL de maior tamanho (HDL-1). Perfil inverso foi encontrado na HDL_{PEQUENA}, cuja subfração HDL-10 foi a que apresentou maior redução. O efeito positivo do w-3 se manteve após o ajuste do percentual das subfrações pelo conteúdo de colesterol associado à HDL. O efeito do w-3 no tamanho das partículas foi confirmado nas comparações entre os grupos, visto que houve ausência do efeito tempo ($p > 0,05$ para ambas as intervenções). A figura 1 mostra as principais mudanças nas subfrações da HDL induzidas pelo w-3 após 8 semanas de intervenção.

Foram testados todos os pressupostos para inclusão de variáveis nos modelos de regressão linear, sendo que o percentual da HDL-1, HDL-2, HDL-3, HDL_{GRANDE}, HDL-8, HDL-9, HDL-10 e HDL_{PEQUENA} preencheram os requisitos para a modelagem. No modelo de regressão linear bruto, observou-se que o percentual de DHA plasmático influenciou de maneira significativa as variáveis dependentes: HDL_{GRANDE}, HDL-8, HDL-9, HDL-10 e HDL_{PEQUENA}. Após a intervenção, o DHA plasmático foi associado à redução de 18% da variação no percentual da HDL-8, 19% da HDL-9, 32% da HDL-10, 32% da HDL_{PEQUENA} e aumento de 17% da HDL_{GRANDE} dos tabagistas. Em todos os modelos testados, independente do ajuste, o percentual de DHA plasmático apresentou associações negativas com percentual da HDL-10 e HDL_{PEQUENA}, ou seja, nos modelos múltiplos, as variações permaneceram significativas, independente da inclusão das variáveis de ajuste (idade, sexo e HAS), conforme apresentado na tabela 4.

DISCUSSÃO

Aproximadamente 30% de todas as mortes por DCV nos Estados Unidos são atribuíveis ao tabagismo a cada ano¹⁹. Em adição, dados epidemiológicos obtidos com populações da América do Sul, América Central e América do Norte mostram que as mortes por DCV atribuídas ao tabagismo são duas vezes mais prevalentes do que aquelas atribuídas ao câncer de pulmão e doenças respiratórias²⁰. Esse elevado impacto negativo do tabagismo sobre a saúde cardiovascular é resultante do efeito nocivo direto do fumo, mas também da ação sinérgica com outros fatores de risco, aumentando a incidência de DCV e outras doenças crônicas.

Os resultados apresentados no presente estudo mostraram que o w-3 contribuiu para a redução do risco cardiometabólico de indivíduos tabagistas pela modificação de vários

parâmetros lipídicos. De acordo com Kajikawa et al.⁷ o tabagismo está associado ao aumento nas concentrações plasmáticas de CT e LDL-c, em detrimento da redução no HDL-c. O presente estudo mostrou que a suplementação com w-3 foi capaz de melhorar o perfil lipídico de tabagistas uma vez que, após 8 semanas de intervenção, houve redução plasmática de CT e LDL-c.

Resultado semelhante foi relatado por Ebrahimi et al.²¹ no qual, após 6 meses de suplementação com EPA (180mg) e DHA (120mg) em pacientes com Síndrome Metabólica, foi encontrada redução plasmática de CT e LDL-c, mas, não foram observadas modificações no HDL-c.

Em uma meta-análise com ensaios clínicos randomizados, placebo-controle, Jacobson et al.²² mostraram que o EPA poderia reduzir, mas que o DHA seria capaz de aumentar o LDL-c. No presente estudo, a suplementação de w-3 foi realizada concomitantemente, de forma a fornecer 1,11g de EPA e 0,69g de DHA por dia. Sendo assim, não foi possível avaliar os potenciais efeitos diferenciais entre os dois ácidos graxos.

Apesar do impacto positivo do w-3 no perfil lipídico clássico, sabe-se que as variações nesses parâmetros não permitem avaliar as modificações qualitativas das lipoproteínas. Asztalos et al.³ mostraram que partículas grandes de HDL se associam com menor risco de DCV, enquanto que as partículas pequenas foram associadas a um maior risco. Os resultados obtidos nesses estudos são reforçados pela observação de que a funcionalidade da HDL é fortemente influenciada pela distribuição de suas subfrações e que o transporte reverso do colesterol (TRC), considerado a principal função biológica da HDL, se associa às partículas grandes^{3,23}.

De acordo com o estudo de De Roos et al.²⁴ o uso de óleo de peixe (1,5 g/dia) em indivíduos saudáveis promoveu aumento de partículas grandes de HDL, enquanto os resultados descritos por Neff et al.²⁵ com indivíduos com excesso de peso e por Kelley et al.²⁶ em indivíduos com hipertrigliceridemia, mostraram que a suplementação com DHA (2-3g/d) contribuiu para o aumento dessas mesmas subfrações.

Nossos resultados confirmam o papel protetor do w-3 no aumento do percentual de partículas de HDL grandes e na simultânea redução de partículas pequenas de HDL em indivíduos tabagistas. Erkkilä et al.²⁷ também encontraram efeitos positivos no tamanho da partícula de HDL em um estudo com indivíduos com doença coronária, após 8 semanas de intervenção baseada na ingestão de peixes fonte de w-3, pelo menos quatro vezes por semana.

Atualmente sabe-se que a composição da HDL, que vai além do conteúdo de colesterol, e o tamanho dessa partícula determinam sua funcionalidade. Dessa forma as funções da HDL incluem o TRC, função antioxidante, antiplaquetária, antitrombótica, anti-inflamatória e vasodilatadora². Embora o presente estudo não tenha avaliado aspectos funcionais da HDL, o aumento no percentual de HDL grande induzido pelo w-3 tem sido associado ao maior potencial anti-inflamatório³.

O tabagismo e os produtos da combustão do tabaco (nicotina, monóxido de carbono e outros produtos gasosos e radicalares) têm potentes ação inflamatória. Nesse contexto, o w-3 ao modular vias moleculares anti-inflamatórias (cicloxigenases e lipoxigenases), mediadores celulares (receptor Toll-like e NF-kB) e modificar o metabolismo lipídico, apresenta múltiplas ações de proteção a saúde cardiovascular do indivíduo tabagista. Particularmente em relação ao papel anti-inflamatório da HDL, tem sido descrito que indivíduos tabagistas têm menos HDL e APO AI, ou seja, parâmetros particularmente reduzidos nas HDL pequenas²⁸. No presente estudo não foram observadas alterações na concentração total de HDL-c e APO AI e suas interrelações, entretanto o w-3 foi capaz de reduzir as partículas de HDL pequenas, com destaque para as subfrações HDL10.

Ao longo das últimas duas décadas, inúmeros estudos identificaram efeitos positivos da HDL sobre as funções das células endoteliais. Em paralelo, sabe-se que indivíduos tabagistas apresentam elevada instabilidade vascular associada ao aumento de moléculas de adesão (ICAM, VCAM e e-Selectina). No endotélio, a HDL inibe marcadores inflamatórios (IL-6 e TNF- α) e moléculas de adesão²⁸. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo têm potencial de contribuir para uma melhor função endotelial em indivíduos tabagistas por meio dos efeitos pleiotrópicos do w-3 ao nível inflamatório, qualidade das subfrações da HDL e ação antiplaquetária. Definir especificamente o papel funcional das subfrações de HDL ainda é uma lacuna na literatura, sobretudo ao nível dos ensaios clínicos.

Desse modo, indivíduos tabagistas podem ser beneficiar da suplementação com w-3 e do consumo de alimentos fonte desse ácido graxo, pelos diversos mecanismo descritos e que potencialmente são modulados positivamente pelas partículas de HDL grandes, conforme demonstraram nossos resultados.

Destaca-se também o fato dos indivíduos tabagistas inclusos no estudo fazerem uso de estatinas durante o período de intervenção. Esses indivíduos não foram excluídos e esse

parâmetro não foi considerado um viés, visto que a modulação do HDL-c com estatina é limitada, além do fato que a relação entre HDL e risco para DCV permanece inalterada²⁹.

Essas observações reforçam a importância do w-3 na modulação não farmacológica da HDL. Isso porque, considerando que não houve modificação no esquema terapêutico durante o período de intervenção, os resultados obtidos confirmam a importância da suplementação com w-3 como parte da estratégia global de tratamento de indivíduos tabagistas com dislipidemias.

No presente estudo, o tamanho da amostra poderia ser considerado uma limitação. No entanto, o número de indivíduos é comparável com estudos anteriores³⁰ e foi suficientemente adequado para confirmar estatisticamente os benefícios do w-3 em indivíduos tabagista. A duração do estudo foi de 8 semanas, representando um período suficiente para promover aumento de ácidos graxos circulantes e modular positivamente o metabolismo lipídico.

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que a suplementação com w-3 modificou positivamente o perfil lipídico (CT e LDL-c), bem como melhorou a distribuição das subfrações de HDL em tabagistas, no qual as maiores partículas (HDL-1) aumentaram e as menores (HDL-10) foram reduzidas. Este resultado contribui para reforçar a importância do w-3 na saúde cardiovascular de indivíduos tabagista, mesmo sob tratamento com estatina.

REFERÊNCIAS

1. Prevention of Cardiovascular Disease: Guidelines for Assessment and Management of Cardiovascular Risk. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2007.
2. Gordon SM, Davidson WS. Apolipoprotein A-I mimetics and high-density lipoprotein function. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012;19(2):109-14. <http://dx.doi.org/10.1097/MED.0b013e32835056d4>.
3. Asztalos BF, de la Llera-Moya M, Dallal GE, Horvath KV, Schaefer EJ, Rothblat GH. Differential effects of HDL subpopulations on cellular ABCA1- and SR-BI-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 2005;46(10):2246-53. <http://dx.doi:10.1194/jlr.M500187-JLR200>.
4. Erhardt L. Cigarette smoking: an undertreated risk factor for cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2009;205(1):23-32. <http://dx.doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.01.007>.

5. Freikman I, Amer J, Cohen JS, Ringel I, Fibach E. Oxidative stress causes membrane phospholipid rearrangement and shedding from RBC membranes--an NMR study. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(10):2388-94. <http://dx.doi: 10.1016/j.bbamem.2008.06.008>.
6. Fisher SD, Zareba W, Moss AJ, Marder VJ, Sparks CE, Hochman J, et al. Effect of smoking on lipid and thrombogenic factors two months after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2000;86(8):813-8. [http://dx.doi:10.1016/S0002-9149\(00\)01098-5](http://dx.doi:10.1016/S0002-9149(00)01098-5).
7. Kajikawa S, Harada T, Kawashima A, Imada K, Mizuguchi K. Highly purified eicosapentaenoic acid prevents the progression of hepatic steatosis by repressing monounsaturated fatty acid synthesis in high-fat/high-sucrose diet-fed mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2009;80(4):229-38. <http://dx.doi: 10.1016/j.bbalip.2009.01.014>.
8. Rahman MM, Laher I. Structural and functional alteration of blood vessels caused by cigarette smoking: an overview of molecular mechanisms. *Curr Vasc Pharmacol*. 2007;5(4):276-92. <http://dx.doi:10.2174/157016107782023406>.
9. Reddy RD, Yao JK. Environmental factors and membrane polyunsaturated fatty acids in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003;69(6):385-91. <http://dx.doi:10.1016/j.plefa.2003.08.009>.
10. Ionescu N, de Freitas C, Bueno AA. Perturbations in blood phosphatidylcholine and sphingomyelin Fatty Acid composition in a sample population of cigarette smokers. *Indian J Clin Biochem*. 2013;28(4):361-7. <http://dx.doi:10.1007/s12291-013-0327-y>.
11. Mozaffarian D. Does alpha-linolenic acid intake reduce the risk of coronary heart disease? A review of the evidence. *Altern Ther Health Med*. 2005;11(3):24-30; quiz 1, 79.
12. Micallef MA, Garg ML. Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals. *Atherosclerosis*. 2009;204(2):476-82. <http://dx.doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.020>.
13. Harris WS, Bulchandani D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Curr Opin Lipidol*. 2006;17(4):387-93. <http://dx.doi: 10.1097/01.mol.0000236363.63840.16>.
14. McLennan PL. Myocardial membrane fatty acids and the antiarrhythmic actions of dietary fish oil in animal models. *Lipids*. 2001;36 Suppl:S111-4. <http://dx.doi: 10.1007/s11745-001-0692-x>.
15. Leaf A, Kang JX, Xiao YF, Billman GE. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. *Circulation*. 2003;107(21):2646-52. <http://dx.doi: 0.1161/01.CIR.0000069566.78305.33>.
16. Mozaffarian D, Rimm EB. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA*. 2006;296(15):1885-99. <http://dx.doi: 10.1001/jama.296.15.1885>.

17. Din JN, Archer RM, Harding SA, Sarma J, Lyall K, Flapan AD, et al. Effect of ω -3 fatty acid supplementation on endothelial function, endogenous fibrinolysis and platelet activation in male cigarette smokers. *Heart*. 2013;99(3):168-74. [http://dx.doi: 10.1136/heartjnl-2012-302924](http://dx.doi:10.1136/heartjnl-2012-302924).
18. Nimura N, Kinoshita T. Fluorescent Labeling Of Fatty Acids With 9-Anthryldiazomethane (ADAM) For High Performance Liquid Chromatography. *Analytical Letters*. 1980; 13(3):191-202. <http://dx.doi:10.1080/00032718008082552>
19. U.S. Department of Health and Human Services. Reducing the Health Consequences of Smoking: 25 Years of Progress. A Report of the Surgeon General. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. DHHS Publication no. (CDC). 1989; 89-8411.
20. Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Murray CJL. Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004. <http://dx.doi:10.1371/journal.pmed.0010027>.
21. Ebrahimi M, Ghayour-Mobarhan M, Rezaiean S, Hoseini M, Parizade SM, Farhoudi F, et al. Omega-3 fatty acid supplements improve the cardiovascular risk profile of subjects with metabolic syndrome, including markers of inflammation and auto-immunity. *Acta Cardiol*. 2009;64(3):321-7. [http://dx.doi: 10.2143/AC.64.3.2038016](http://dx.doi:10.2143/AC.64.3.2038016).
22. Jacobson TA, Glickstein SB, Rowe JD, Soni PN. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on low-density lipoprotein cholesterol and other lipids: a review. *J Clin Lipidol*. 2012;6(1):5-18. <http://dx.doi:10.1016/j.jacl.2011.10.018>.
23. Mora S, Otvos JD, Rifai N, Rosenson RS, Buring JE, Ridker PM. Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. *Circulation*. 2009;119(7):931-9. <http://dx.doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.816181>.
24. de Roos B, Geelen A, Ross K, Rucklidge G, Reid M, Duncan G, et al. Identification of potential serum biomarkers of inflammation and lipid modulation that are altered by fish oil supplementation in healthy volunteers. *Proteomics*. 2008;8(10):1965-74. <http://dx.doi:10.1002/pmic.200700457>.
25. Neff LM, Culiner J, Cunningham-Rundles S, Seidman C, Meehan D, Maturi J, et al. Algal docosahexaenoic acid affects plasma lipoprotein particle size distribution in overweight and obese adults. *J Nutr*. 2011;141(2):207-13. <http://dx.doi:10.3945/jn.110.130021>.
26. Kelley DS, Siegel D, Vemuri M, Mackey BE. Docosahexaenoic acid supplementation improves fasting and postprandial lipid profiles in hypertriglyceridemic men. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(2):324-33. <http://dx.doi:10.3945/jn.108.100354>.
27. Erkkilä AT, Schwab US, Lehto S, de Mello VD, Kangas AJ, Soininen P, et al. Effect of fatty

and lean fish intake on lipoprotein subclasses in subjects with coronary heart disease: a controlled trial. *J Clin Lipidol*. 2014;8(1):126-33. [http://dx.doi: 10.1016/j.jacl.2013.09.007](http://dx.doi.org/10.1016/j.jacl.2013.09.007).

28. Kontush A, Lindahl M, Lhomme M, Calabresi L, Chapman MJ, Davidson WS. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:3-51. [http://dx.doi: 10.1007/978-3-319-09665-0_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-09665-0_1).

29. Ineu ML, Manenti E, da Costa JLV, Moriguchi E. Manejo da HDL: avanços recentes e perspectivas além da redução de LDL. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87(6):788-794. <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2006001900017>.

30. Mostad IL, Bjerve KS, Lydersen S, Grill V. Effects of marine n-3 fatty acid supplementation on lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance in subjects with type II diabetes. *Eur J Clin Nutr*. 2008;62(3):419-29. [http://dx.doi:10.1038/sj.ejcn.1602703](http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602703).

Tabela 1. Características clínicas, demográficas e antropométricas de indivíduos tabagistas. São Paulo, 2015.

Variáveis*	w-3 (n=17)	w-6 (n=16)	p
Idade (anos)	49 (10)	49 (10)	0,976
Sexo (%)			
masculino	9 (53)	8 (50)	0,866
feminino	8 (47)	8 (50)	
Raça (%)			
brancos	13 (76)	10 (63)	0,199
negros	2 (12)	--	
outros	2 (12)	6 (36)	
IMC (kg/m²)	29 (6)	29 (6)	0,739
CC (cm)	98 (16)	98 (10)	0,988
GC (%)	31 (13)	32 (13)	0,770
PAS (mmHg)	128 (19)	131 (20)	0,604
PAD(mmHg)	78 (10)	81 (9)	0,484

*Resultados apresentados em média e desvio padrão para as variáveis quantitativas e em valor absoluto (n) e frequência (%) para as variáveis qualitativas. IMC: índice de massa corporal; CC: circunferência da cintura; GC: percentual de gordura corporal; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica. Diferença entre os grupos testada pelo teste *t-Student* para as variáveis quantitativas e teste χ^2 para as variáveis qualitativas. Valor de significância $p<0,05$.

Tabela 2. Características bioquímicas de indivíduos tabagistas. São Paulo, 2015.

Variáveis (mg/dL)	w-3 (n=17)		w-6 (n=16)		p*	p**
	T0	T8	T0	T8		
CT	196 (32)	173 (28) ^a	212 (55)	212 (55)	0,298	0,020
LDL-c	127 (32)	110 (25) ^a	139 (48)	144 (49)	0,396	0,039
HDL-c	37 (10)	39 (10)	34 (7)	35 (7)	0,297	0,210
nHDL-c	159 (31)	134 (24) ^a	178 (55)	182 (50)	0,221	0,002
APO AI	134 (25)	136 (29)	131 (30)	133 (25)	0,715	0,747
APO B	100 (23)	104 (19)	109 (26)	114 (24)	0,276	0,187
HDL-c/APO AI	0,27 (0,05)	0,28 (0,05)	0,26 (0,06)	0,26 (0,04)	0,673	0,192
LDL-c/APO B	1,30 (0,39)	1,05 (0,16) ^a	1,26 (0,20)	1,21 (0,20)	0,732	0,019
APO AI/APO B	0,75 (0,17)	0,78 (0,14)	0,87 (0,29)	0,87 (0,17)	0,156	0,107
TG	143 (107-181)	122 (63-186)	158 (120-211)	112 (84-129)	0,517	0,954
TG/HDL-c	4 (3-7)	2 (1-6)	5 (3-7)	5 (3-7)	0,231	0,122
CT/HDL-c	5 (4-7)	5 (4-5) ^a	6 (5-8)	6 (5-7)	0,176	0,001
LDL-c/HDL-c	3 (3-5)	3 (2-3) ^a	4 (3-5)	4 (3-5)	0,279	0,008
GLICEMIA	93 (88-97)	95 (89-104)	95 (90-102)	93 (87-102)	0,528	0,564

Resultados apresentados em média (desvio padrão) para as variáveis paramétricas e em mediana (intervalo interquartil) para as variáveis não paramétricas. CT: Colesterol total; LDL-c: Lipoproteína de baixa densidade; HDL-c: Lipoproteína de alta densidade; nHDL-c: Fração de colesterol não HDL-c; APO AI: apolipoproteína AI; APO B: apolipoproteína B; HDL-c/APO AI: Razão entre HDL-c e APO AI; LDL-c/APO B: Razão entre LDL-c e APO B; APO AI/APO B: Razão entre apolipoproteínas; TG: Triacilgliceróis; TG/HDL-c: razão entre triacilgliceróis e HDL-c; CT/HDL-c: razão entre colesterol total e HDL-c; LDL-c/HDL-c: razão entre LDL-c e HDL-c. Diferença entre os grupos testada pelo teste *t-Student* para as variáveis paramétricas e teste Mann Whitney para as variáveis não paramétricas, com valor de significância $p < 0,05$. Diferença intragrupo (efeito tempo) testada pelo teste *t-Student* pareado para as variáveis paramétricas e teste Wilcoxon para as variáveis não paramétricas. Valor de significância $p < 0,05$.

*diferença testada no momento basal (T0) (w-3 versus w-6).

**diferença testada após a intervenção (T8) (w-3 versus w-6).

^adiferença testada antes e após a intervenção (T8 versus T0).

Tabela 3. Subfrações da lipoproteína HDL de indivíduos tabagistas. São Paulo, 2015.

Variáveis	w-3 (n=17)		w-6 (n=16)		p*	p**
	T0	T8	T0	T8		
Percentual (%)						
HDL-1	9,5 (3,8)	10,2 (2,9)	8,5 (3,7)	7,6 (3,2)	0,466	0,018
HDL-2	12,2 (4,2)	12,5 (5,3)	9,7 (2,9)	9,7 (2,9)	0,065	0,070
HDL-3	6,8 (2,2)	7,2 (2,5)	5,9 (1,7)	5,9 (1,7)	0,250	0,106
HDL-4	9,6 (1,8)	9,4 (1,4)	8,7 (1,4)	8,5 (1,2)	0,118	0,004
HDL-5	11,5 (1,7)	11,2 (1,6)	11,1 (1,0)	10,8 (1,2)	0,496	0,460
HDL-6	22,4 (2,9)	21,9 (3,3)	21,9 (2,0)	21,9 (2,0)	0,572	0,999
HDL-7	7,8 (1,5)	7,7 (1,5)	7,9 (1,1)	8,2 (0,8)	0,664	0,242
HDL-8	7,6 (1,7)	7,6 (2,0)	8,2 (1,4)	8,6 (1,2)	0,258	0,101
HDL-9	6,6 (1,9)	6,2 (1,8)	6,4 (1,3)	6,7 (1,4)	0,785	0,410
HDL-10	6,0 (3,6)	5,9 (3,4)	11,3 (4,5)	11,9 (4,5)	0,001	<0,001
HDL _{GRANDE}	28,4 (8,3)	29,9 (9,8)	24,2 (7,2)	23,2 (6,6)	0,132	0,029
HDL _{INTERMEDIÁRIA}	51,3 (4,2)	50,3 (5,5)	49,7 (2,3)	49,5 (2,3)	0,204	0,590
HDL _{PEQUENA}	20,3 (6,7)	19,7 (6,5)	25,9 (6,1)	27,2 (5,9)	0,017	0,002
Concentração (mg/dL)						
HDL-1	3 (2-5)	4 (3-6)	3 (2-4)	3 (2-3)	0,292	0,010
HDL-2	4 (2-7)	4 (2-7)	3 (2-4)	3 (2-5)	0,090	0,102
HDL-3	2 (1-3)	2 (2-4)	2 (1-3)	2 (1-3)	0,496	0,143
HDL-4	4 (2-4)	4 (3-5)	3 (2-3)	3 (2-3)	0,118	0,041
HDL-5	4 (3-5)	4 (3-5)	4 (3-4)	4 (3-4)	0,417	0,198
HDL-6	8 (7-10)	8 (7-10)	7 (6-9)	8 (7-9)	0,226	0,473
HDL-7	3 (2-3)	3 (2-4)	3 (2-3)	3 (3-3)	0,642	0,953
HDL-8	3 (2-3)	3 (2-4)	3 (2-3)	3 (3-4)	0,691	0,521
HDL-9	2 (2-3)	2 (2-3)	2 (2-2)	2 (2-3)	0,300	0,969
HDL-10	2 (1-4)	2 (2-3)	4 (3-5)	4 (3-6)	0,004	0,006
HDL _{GRANDE}	10 (6-14)	10 (7-15)	7 (5-10)	7 (5-10)	0,138	0,045
HDL _{INTERMEDIÁRIA}	18 (16-22)	19 (15-23)	15 (15-19)	16 (15-20)	0,102	0,286
HDL _{PEQUENA}	7 (5-10)	7 (6-9)	9 (7-10)	10 (7-11)	0,099	0,013

Resultados apresentados em média (desvio padrão) para as variáveis paramétricas e em mediana (intervalo interquartil) para as variáveis não paramétricas. HDL_{GRANDE}: partículas grandes de HDL (1 a 3); HDL_{INTERMEDIÁRIA}: partículas intermediárias de HDL (4 a 7); HDL_{PEQUENA}: partículas pequenas de HDL (8 a 10). Diferença entre os grupos testada pelo teste *t-Student* para as variáveis paramétricas e teste Mann Whitney para as variáveis não paramétricas, com valor de significância $p < 0,05$.

*diferença testada no momento basal (T0) (w-3 versus w-6).

*diferença testada após a intervenção (T8) (w-3 versus w-6).

Tabela 4. Modelos de regressão linear para avaliar a influência do w-3 nas subfrações da HDL de indivíduos tabagistas. São Paulo, 2015.

Modelos	β	IC (95%)	R²	p
Bruto				
% HDL _{GRANDE}	0,413	(0,02 ; 1,76)	0,171	0,045
% HDL-8	-0,424	(-0,37 ; -0,01)	0,179	0,039
% HDL-9	-0,440	(-0,34 ; -0,02)	0,193	0,032
% HDL-10	-0,566	(-0,91 ; -0,19)	0,320	0,004
% HDL _{PEQUENA}	-0,564	(-1,52 ; -0,32)	0,318	0,004
Modelo 1				
% HDL _{GRANDE}	0,438	(0,02 ; 1,86)	0,178	0,127
% HDL-8	-0,382	(-0,36 ; 0,02)	0,201	0,095
% HDL-9	-0,420	(-0,34 ; 0,01)	0,198	0,099
% HDL-10	-0,560	(-0,93 ; -0,16)	0,321	0,017
% HDL _{PEQUENA}	-0,544	(-1,53 ; -0,25)	0,323	0,017
Modelo 2				
% HDL-10	-0,595	(-0,98 ; -0,18)	0,336	0,039
% HDL _{PEQUENA}	-0,536	(-1,56 ; -0,20)	0,324	0,046
Modelo 3				
% HDL-10	-0,633	(-1,02 ; -0,22)	0,393	0,041
% HDL _{PEQUENA}	-0,591	(-1,61 ; -0,32)	0,440	0,021

Modelo 1: ajustado pela idade; Modelo 2: ajustado pela idade e sexo. Modelo 3: ajustado pela idade, sexo e HAS.

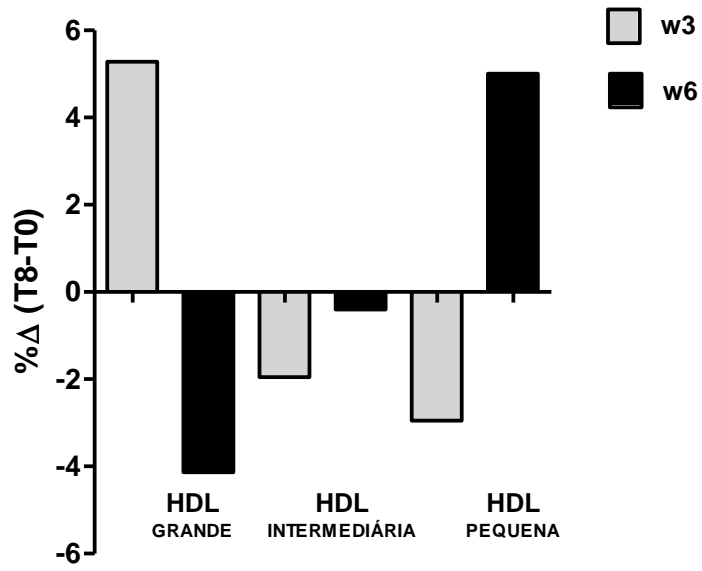


Figura 1. Percentual de variação nas subfrações da HDL após 8 semanas de intervenção, segundo os grupos w-3 e w-6.

6.3 ARTIGO 3: SUBMETIDO À REVISTA NUTRITION, METABOLISM AND CARDIOVASCULAR DISEASE

THE BENEFICIAL EFFECT OF OMEGA-3 SUPPLEMENTATION IN HIGH DENSITY LIPOPROTEIN IS INFLUENCED BY CIGARETTE SMOKING

Caroline Pappiani¹

Stefan K Nilsson²

Antonio M Figueiredo Neto³

Nágila Raquel Teixeira Damasceno¹

¹University of Sao Paulo,
School of Public Health,
Department of Nutrition,
Sao Paulo, Brazil

²Umeå University,
Physiological Chemistry,
Department of Medical Biosciences,
Umeå, Sweden

³University of Sao Paulo,
Physics Institute,
Sao Paulo, Brazil

ABSTRACT

Introduction: Cigarette smoking is an independent risk factor for cardiovascular diseases and the effects include vascular actions, oxidative stress, thrombogenic effects, secondary dyslipidemia and modifications in lipid composition of lipoproteins. Studies have shown that smokers have lower plasma content of omega-3 and lower levels of polyunsaturated fatty acids were associated with a higher cardiovascular risk. Clinical trials have demonstrated beneficial cardioprotective traits of omega-3. However, it is not clear if omega-3 can affect the size of lipoproteins in smokers and thus contributing to a less atherogenic lipid profile. **Objective:** To evaluate the effect of omega-3 supplementation on lipoprotein properties in smokers. **Methods:** A clinical trial with fish oil supplementation containing 37% of EPA and 23% of DHA. The subjects include 17 smokers and 44 non-smokers, both sexes, between 30 and 74 years old and each individual who had the habit of smoking, independent of cigarette type and amount, were considered smoker. The subjects had a clinical evaluation and lipoprotein subfractions size were analyzed using Lipoprint system. **Results:** The mean age was 49 (9.5) years old in the smoker group and 52 (10.6) in the non-smoker group and ethnicity were predominantly white. Logistic regression models underlined that to be smoker, man, above 60 years old, with plasma EPA and DHA below 8%, overweight and/or obese and high body fat, increase the risk for an unfavorable HDL subfraction distribution. **Conclusion:** Cigarette smoking exerts multiple negative effects on lipoprotein metabolism and omega-3 supplementation is able to improve the lipid profile of smokers.

Descriptors: omega-3; fatty acids; cigarette smoking; HDL, lipoprotein.

INTRODUCTION

Cigarette smoking is an independent risk factor responsible for 10% of all cardiovascular diseases (CVD), although it can be prevented and modifiable¹. The link between cigarette smoking and cardiovascular health includes direct vascular actions², oxidative stress³, thrombogenic effects⁴ and secondary dyslipidemia⁵.

Free radicals and oxidants present in cigarette smoke promote an environment which contributes to endothelial dysfunction, systemic inflammation and oxidative modifications⁶.

Beside the negative role of cigarette smoking described above, this harmful habit promotes changes in lipid composition of lipoproteins which increase cardiovascular risk. Craig et al.⁷ analyzed the effect of smoking on serum lipids and showed a correlation between smoking and increased total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL-c) and triacylglycerol (TG), and decreased high-density lipoprotein (HDL-c) and apolipoprotein AI (APO AI) levels. Similar results has been reported, demonstrating that smoking modifies serum lipid profiles in a proatherogenic way⁸.

Regarding the increased susceptibility of polyunsaturated fatty acids (PUFA) to free radicals, it is plausible that smokers have reduced levels of these fatty acids. In addition, others studies have shown that smokers have lower plasma content of omega-3 (w-3), especially eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6)⁹. Furthermore, lower levels of PUFA were associated with a higher risk of CVD¹⁰.

Clinical trials have demonstrated beneficial cardioprotective traits of w-3 in humans such as anti-inflammatory properties¹¹, reduction of plasma TG¹² and lower blood pressure¹⁰. Recently, Din et al.¹³ demonstrated that w-3 improved fibrinolysis and endothelial function in smokers, both considered as risk modulators for cardiovascular events. However, it is not clear if modifications promoted by w-3 in lipids, proteins and antioxidant content in lipoproteins are able to affect size of lipoproteins in smokers and thus contributing to a less atherogenic plasma lipid profile.

The aim of this study was to evaluate the effect of w-3 supplementation on lipoprotein properties in smokers.

METHODS

Clinical trial based on a nutritional intervention with w-3 supplementation containing 37% of EPA and 23% of DHA. For this trial, 17 smokers and 44 non-smokers, both sexes, between 30 and 74 years old were enrolled. Each individual who had the habit of smoking, independent of cigarette type and amount, were considered smokers.

Subjects were recruited from the University Hospital at the University of Sao Paulo (USP - Sao Paulo, Brazil). Pregnant, lactating, individuals participating in other research protocols, patients with previous cardiovascular events (monitored by electrocardiogram and clinical evaluation), former smokers, illegal drug users and alcoholics were excluded. The study was approved by the Ethics Committee: School of Public Health #2264 and University Hospital #1126/11, University of Sao Paulo. All participants signed the free and informed consent.

The intervention protocol (w-3 capsules) were produced, packaged and randomized by Relthy Company (Indaiatuba, Sao Paulo, Brazil). Subjects were instructed to use 3 capsules per day distributed in 3 main meals (breakfast, lunch and dinner) during 8 weeks. A diary book was given to each individual to hold record of adverse effects, any medical alteration and reasons for non-use of supplementation. The level of adherence to the intervention was evaluated by the number of capsules remaining count at the end of the intervention and confirmed by blood fatty acids analysis, according to Nimura and Kinoshita¹⁴ protocol.

The subjects had a clinical evaluation, in which blood pressure and temperature were measured. Anamnestic information about medications use, recent surgery, current diseases and family history of chronic diseases was collected. This evaluation was performed by field researchers with the collaboration of the University Hospital team under the supervision of a specialized doctor.

Weight and height were measured with accuracy of 0.1 kg and 0.1 cm, respectively, with calibrated equipment and standardized methods. From these parameters, body mass index (BMI) was calculated (Kg/m^2). Using an inelastic tape, flexible and accurately 1.0 mm (TBW®, São Paulo, Brazil) waist circumference (WC) was measured. Body composition was assessed by bioelectrical impedance analysis (BIA) (Analyzer® model Quantum II, RJL Systems, Michigan, USA) and body fat (%) was estimated by Cyprus, version 2.5 (RJL Systems®, Detroit, USA), taking sex, age, weight, height, physical activity, resistance and reactance into consideration.

A questionnaire was applied to evaluate the habitual physical activity score and calculate the Total Physical Activity according to Baecke¹⁵ validated for Brazilian population by Florindo & Latorre¹⁶.

Subjects were stratified according to American Heart Association updated Framingham Risk Score calculating the absolute risk for coronary events in 10 years^{17, 18}.

Food intake was collected by two 24-hour recall administered by trained nutritionists using a standardized protocol based on the multiple pass method. Photographic records representing standard household measures were used during the interview to facilitate the estimation of portion size. Food intake was analyzed using the program Food Processor (ESHA Research, Oregon, USA) and the data consumption was adjusted for energy¹⁹. The individual variability was refined through the Multiple Source Method program - MSM (version 1.0.1, 2011)²⁰.

After 12 hours of fasting, 20 ml of blood was collected in tubes containing EDTA (1.0 mg/ml). Plasma was obtained (3000 rpm, 15 min, 4°C) and protease inhibitors: aprotinin (10 ug/ml), benzamidine (10 mM), PMSF (5mM) and BHT antioxidant (100 mM) were added. Samples were aliquoted and stored at -80°C.

Plasma concentrations of TG, total cholesterol (TC) and HDL-c were analyzed using a semi-automatic Cobas® system (Labtest, Minas Gerais, Brazil). LDL cholesterol (LDL-c) was calculated using Friedwald's equation²¹. Apolipoproteins AI and B (APO AI and APO B) were analyzed by standard method (Wako® Chemicals USA Inc., Richmond, VA, USA). Lipoprotein subfractions size were analyzed using Lipoprint system® (Quantimetrix, Redondo Beach, CA) and the percentage of very low-density lipoprotein (VLDL) and intermediate low-density lipoprotein (IDL) were identified. For LDL, 7 subfractions were identified: LDL-1 and LDL-2 particles were classified as large and from LDL-3 to LDL-7 as small. For HDL, 10 subfractions were identified: from HDL-1 to HDL-3 particles were classified as large, from HDL-4 to HDL-7 as intermediate and from HDL-8 to HDL-10 as small. Phenotype A and non-A were determined for LDL using cut-off point 25.5 nm. HDL ratio (HDL-1 + HDL-2) / (HDL-9 + HDL-10) was calculated. Plasma glucose was analyzed using Glucose PAP Liquiform® kit (Labtest, Minas Gerais, Brazil). All analyzes were performed in duplicate and intra- and inter-coefficients of variation assays were below 10%.

STATISTICAL ANALYSIS

Chi-square test was used for qualitative variables and results are shown as absolute values and their respective percentage. For quantitative data variable distribution was tested by Kolmogorov-Smirnov ($p > 0.05$).

For variables with normal distribution, data is presented as mean with standard deviation, and parametric statistical tests were used. For non-normal distributed, variables non-parametric tests were used and values are presented as median (p50) and interquartile range (p25 and p75).

The odds ratio was estimated to observe the influence of cigarette smoking on the size of HDL. The independent variable (smoker) was generated as a dichotomous data and subjects were classified as "yes" or "no" (reference). The dependent variable was %HDL_{LARGE} and values after the intervention (T8) were stratified into percentiles and has generated a dichotomous variable in which individuals with values above the median (p50) were classified as "1" (reference) and below were classified as "0". In the multivariate model, sex, age and plasma EPA + DHA (%) were used as a covariate adjustment, with a 95% confidence interval. In the dichotomous variable "sex", women were classified as "1" (reference) and men as "0". In the dichotomous variable "age", individuals below 60 years were classified as "1" (reference) and above as "0", according to the World Health Organization²². In the dichotomous variable EPA + DHA (%) individuals above 8% EPA+DHA were classified as "1" (reference) and below as "0", according to Harris and Von Schacky²³.

All analyses were performed with SPSS software version 20.0 and p-value<0.05 was considered significant.

RESULTS

The clinical, demographic and anthropometric data of the subjects are summarized in table 1. The mean age was 49 (9.5) years in the smoker group and 52 (10.6) years in the non-smoker group. Ethnicity were predominantly white (smoker group =76% and non-smoker = 61%). The smoker group was equally distributed in sex (53% men and 47% women) but the non-smoker group had a predominance of women (25% men and 75% women). The groups showed

significant differences in BMI and body fat at baseline. For the others parameters, both groups presented a similar profile.

At baseline the groups were similar for all biochemistry variables. However, after 8 weeks of intervention, w-3 supplementation was associated with significant reduction in TC, LDL-c, non-HDL-c, LDL-c/APO B and LDL-c/HDL-c in the smoker group (table 2). The distribution of HDL subfractions is shown in table 3. At baseline the groups presented similar data. In the non-smoker group HDL_{LARGE} subfraction was increased and this variation was associated with an increase in the HDL-1 subfraction. Accordingly, there was a significant reduction in HDL_{SMALL} related to a significant change in the HDL-9 subfraction. In relation to LDL, none of the subfractions and phenotypes did show significant difference between intervention groups; LDL_{SMALL} particles (p=0.075), LDL_{LARGE} (p=0.087), LDL_{SIZE} (p=0.121), LDL_{PHENOTYPE A} (p=0.263). The same results were found in relation to VLDL (p=0.876), IDL_{LARGE} (p=0.369), IDL_{INTERMEDIATE} (p=0.067) and IDL_{SMALL} (p=0.565) (data not shown).

After testing all conditions for inclusion variables in the logistic regression models, the percentage of HDL_{LARGE} fulfilled all requirements for modeling. The raw model confirmed the association between HDL particle size and cigarette smoking (OR= 5.16, p= 0.012). In adjusted models (A and B) the results remained significant, but were influenced by covariate associations. Model C (adjusted for sex, age and plasma EPA+DHA) showed that the smoker group had a higher risk to have a lower percentage of HDL_{LARGE} particles (OR= 4.85, p= 0.039). Because the groups showed differences in body composition, regression models were also adjusted for body fat and body weight (Model D and Model E, respectively) which was significant (OR = 6.99, p = 0.029). To summarize, these models underlined that to be smoker, man, above 60 years old, with plasma EPA and DHA below 8%, overweight and/or obese and high body fat, increased the risk for an unfavorable HDL subfraction distribution (table 4).

DISCUSSION

Our study revealed that w-3 supplementation can add cardiovascular protection and counteract the negative role of cigarette smoking on vascular function and cholesterol content in lipoproteins. Improvement of the plasma lipid profile was observed in smokers after the w-3 intervention.

Previously, many studies have demonstrated that smoking induces a more atherogenic lipid profile characterized by higher TC, LDL-c, TG and lower levels of HDL-c²⁴. This suggests multiple mechanisms causing dyslipidemia among smokers, such as: I - catecholamine and adenylyl cyclase pathways induced tissue lipolysis²⁵; II - direct stimulus of nicotine in epinephrine release, leading to increased adipose tissue derived serum non-esterified fatty acids. This stimulates hepatic VLDL synthesis and secretion resulting in increased serum cholesterol and increased TG, which is inversely related to HDL concentration²⁶ and III - acute effect of cigarette smoking on insulin sensitivity, contributing to increased LDL-c, VLDL and TG, inhibition of lipoprotein lipase activity and stimulation of hepatic lipase²⁷.

Regarding the modulation of these mechanisms, it is plausible that w-3 can contribute to reduce the negative effects of cigarette smoking in lipid metabolism. In humans, w-3 efficiently reduces TG, with less pronounced effects on TC, LDL-c, and HDL-c²⁸. The mechanisms by which w-3 increases HDL-c are related to alterations in lipid transfer mediated by a reduction in activity of cholesterol ester transfer protein, which transfers cholesterol esters from HDL to rich-APO B lipoproteins (VLDL and LDL)²⁹. Furthermore, w-3 affects VLDL metabolism, increasing APO B content and reducing TG transport, resulting in smaller VLDL which are converted to LDL subfractions³⁰. The effects of w-3 on LDL metabolism are more complex. W-3 suppresses cholesterol synthesis and may reduce cholesterol absorption. LDL removal normally occurs via LDL receptor (B/E receptor). There is evidence that w-3 down-regulates the LDL receptor in hepatic cells³¹. Abnormal LDL composition has been described to influence the binding affinity to the LDL receptor³². Surprisingly in our study, w-3 supplementation did not promote significant modifications on lipoprotein composition e.g. VLDL distribution, IDL subfractions or LDL size in the groups (smoker and non-smoker).

Traditional biochemical lipid profile quantification used to evaluate cholesterol and TG cannot evaluate qualitative modifications in lipoprotein subclasses. Therefore, measurements of lipoprotein size can add clinically relevant information. While two subjects can show the same content of LDL cholesterol, lipoprotein size differences can affect inter-individual disease risk assessments³³. Our results confirmed the differences between quantitative and qualitative aspects of lipoproteins after w-3 supplementation. W-3 improved the lipid profile of smokers (reducing plasma TC and LDL-c), although the HDL composition (increasing HDL_{LARGE} and reduced HDL_{SMALL}) was improved only in non-smokers. Asztalos et al.³⁴ showed that HDL_{LARGE} particles

are associated with lower risk for CVD, while small particles were associated with increased risk. The same authors proposed that the increase in HDL_{LARGE} percentage induced by w-3 was associated with a higher anti-inflammatory potential.

Recently, the anti-atherogenic role of HDL has been debated and it has been associated with reverse cholesterol transport, antioxidant, anti-platelet, anti-thrombotic, anti-inflammatory and vasodilator properties³⁵. These functions are related to different components of HDL, beside the cholesterol content, which directly influence the size of this lipoprotein. It is likely that cigarette smoking exerts negative effects in non-cholesterol components of HDL.

Smoke combustion products (nicotine, carbon monoxide, radicals and other gaseous products) have potent oxidant and inflammatory action³⁶. In this context, w-3 supplementation could modulate anti-inflammatory molecular pathways (cyclooxygenase and lipoxygenase) or cellular mediators³⁷. In addition w-3 can modify lipid metabolism to improve cardiovascular health of smokers. However, the increase of HDL_{LARGE} with simultaneous decrease of HDL_{SMALL} particles was only observed in non-smokers. This suggests that some components present in lipoproteins, such as antioxidants or anti-inflammatory factors (PON-1, APO AI, AII, AIV, E and J)³⁸ can be negatively affected by cigarette smoking.

Our findings underline the complexity of w-3-smoking interaction. The negative effects of cigarette smoking and the ability of w-3 to modulate multiple aspects related to cardiovascular risk were confirmed by the odds ratios analysis. Our results show that sex, age and adiposity affects the inter-relationship between w-3 and cigarette smoking. For the first time we demonstrated the relevance of the sum EPA + DHA plasma content for w-3 supplementation promoted CVD benefits, in which subjects with EPA + DHA lower than 8% are four times more likely to have lower HDL_{LARGE} content. Previously, Harris and von Schacky²³ proposed 8% EPA+DHA red blood cells as a potential cutoff point to prevent cardiovascular events. EPA+DHA values lower than 4% were associated with high risk for CVD related death. Fatty acids monitored in this study were only analyzed in plasma, but similar to other studies, plasma EPA+DHA content were associated with cardiovascular risk³⁹.

CONCLUSION

The present study confirmed that cigarette smoking exerts multiple negative effects on

lipoprotein metabolism and that w-3 supplementation is able to improve the negative lipid profile of smokers. However, improvements in lipoprotein size were only seen in HDL particles of non-smoking subjects.

REFERENCES

1. WHO. WHO global report: Mortality attributable to tobacco. 2012:392.
2. Erhardt L. Cigarette smoking: an undertreated risk factor for cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2009;205(1):23–32.
3. Freikman I, Amer J, Cohen JS, Ringel I, Fibach E. Oxidative stress causes membrane phospholipid rearrangement and shedding from RBC membranes—an NMR study. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(10):2388–94.
4. Fisher SD, Zareba W, Moss AJ, Marder VJ, Sparks CE, Hochman J, et al. Effect of smoking on lipid and thrombogenic factors 2 months after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2000;86(8):813–8.
5. Kajikawa S, Harada T, Kawashima A, Imada K, Mizuguchi K. Highly purified eicosapentaenoic acid prevents the progression of hepatic steatosis by repressing monounsaturated fatty acid synthesis in high-fat/high-sucrose diet-fed mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2009;80(4):229–38.
6. Messner B, Bernhard D. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:509–15.
7. Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE. Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *BMJ*. 1989;298:784–788
8. Nakamura K, Barzi F, Huxley R, Lam TH, Suh I, Woo J, Kim HC, Feigin VL, Gu D, Woodward M; Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. Does cigarette smoking exacerbate the effect of total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol on the risk of cardiovascular diseases? *Heart*. 2009;95:909–916.
9. Ionescu N, de Freitas C, Bueno AA. Perturbations in Blood Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Fatty Acid Composition in a Sample Population of Cigarette Smokers. *Indian J Clin Biochem*. 2013; 28(4):361-367.

10. Mozaffarian D. Does alpha-linolenic acid intake reduce the risk of coronary heart disease? A review of the evidence. *Altern Ther Health Med*. 2005;11(3):24-30.
11. Micallef MA, Garg ML. Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals. *Atherosclerosis*. 2009 Jun;204(2):476-82.
12. Harris WS, Bulchandani D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Curr Opin Lipidol*. 2006;17(4):387-93.
13. Din JN, Archer RM, Harding SA, Sarma J, Lyall K, Flapan AD, Newby DE. Effect of w-3 fatty acid supplementation on endothelial function, endogenous fibrinolysis and platelet activation in male cigarette smokers. *Heart*. 2013;99:168–74.
14. Nimura N, Kinoshita T. Fluorescent labeling of fatty acids with 9-anthryldiazomethane (ADAM) for high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*. 1980;13(3):191-202.
15. Baecke JA, Burema J, Frijters JE. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr* 1982;36:936-42.
16. Florindo AA, Latorre MRDO. Validação e Reprodutibilidade do Questionário de Baecke de avaliação da atividade física habitual em homens adultos. *Rev Bras Med Esporte*. 2003; 9:121-8.
17. D’agostino RB, Vasan RS, et al., General cardiovascular risk profile for use in primary care: The Framingham Heart Study. *Circulation*, 2008;.117:743-753.
18. Mosca L, Benjamin EJ. Effectiveness-Based Guidelines for the Prevention of Cardiovascular Disease in Women 2011 Update: A Guideline From the American Heart Association. *Circulation*. 2011; 123 (11):1243-1262.
19. Mackerras D. Energy adjustment the concepts underlying the debate. *J. Clin. Epidemiol*. 1996; 49(9): 957-962.
20. The Multiple Source Method (MSM).Version 1.0.1. Potsdam: Department of Epidemiology of the German Institute of Human Nutrition; 2008-2011. Disponível em <http://msm.dife.de/>.
21. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972; 18:499-502.
22. WHO Active Ageing – A Police Framework. A Contribution of the World Health Organization to the second United Nations World Assembly on Aging. Madrid, Spain, April, 2002.
23. WS Harris, C Von Schacky. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med*. 2004;39:212–220.

24. Campbell SC, Moffatt RJ, Stamford BA. Smoking and smoking cessation - The relationship between cardiovascular disease and lipoprotein metabolism: A review. *Atherosclerosis*. 2008; 201:225–35.
25. Devaranavadgi BB, Aski BS, Kashinath RT, Huntakari IA. Effect of cigarette smoking on blood lipid – A study in Belgaum, Northern Karnataka, India. *Global J. of Med. Research*. 2012; 12(6): 57-61.
26. Muscat J, Harris R, Haley N, Wynder E. Cigarette smoking and plasma cholesterol. *Am Heart J*. 1991; 121:141-47.
27. Eliasson B, Mero N, Taskinen M, Smith U. The insulin resistance syndrome and postprandial lipid intolerance in smokers. *Atherosclerosis*. 1997; 129: 79-88.
28. Harris WS. n3 Fatty acids and lipoproteins: comparison of results from human and animal studies. *Lipids* 1996;31:243–52.
29. Abbey M, Clifton P, Kestin M, Belling B, Nestel P. Effect of fish oil on lipoproteins, lecithin:cholesterol acyltransferase, and lipid transfer protein activity in humans. *Arteriosclerosis* 1990;10:85–94.
30. Nestel PJ. Effects of n-3 fatty acids on lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 1990;10:149–67.
31. Roach PD, Kambouris AM, Trimble RP, Topping DL, Nestel PJ. The effects of dietary fish oil on hepatic high density and low density lipoprotein receptor activities in the rat. *FEBS Lett* 1987;222: 159–62.
32. Lindsey S, Pronczuk A, Hayes KC. Low density lipoprotein from humans supplemented with n3 fatty acids depresses both LDL receptor activity and LDLr mRNA abundance in HepG2 cells. *J Lipid Res* 1992;33:647–58.
33. Otvos JD, Mora S, Shalurova I, Greenland P, Mackey RH, Goff DC Jr. Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and particle number. *J Clin Lipidol*. 2011;5(2):105–13. Epub 2011/03/12. doi:10.1016/j.jacl.2011.02.001
34. Asztalos BF, de la Llera-Moya M, Dallal GE, Horvath KV, Schaefer EJ, Rothblat GH. Differential effects of HDL subpopulations on cellular ABCA1- and SR-BI-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res*. 2005;46(10):2246-53.
35. Gordon SM, Davidson WS. Apolipoprotein A-I mimetics and high-density lipoprotein function. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2012;19(2):109-14.
36. Adler KB, Fischer BM, Wright DT, Cohen LA, Becker S: Interactions between respiratory epithelial cells and cytokines: relationships to lung inflammation. *Ann NY Acad Sci* 1994, 725:128-145

37. Kalupahana NS, Claycombe KJ, Moustaid-Moussa N. (n-3) Fatty Acids Alleviate Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance: Mechanistic Insights. *Adv. Nutr.* 2011; 2:304-316.
38. Camont L, Chapman M J, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends. Mol. Med.* 2011; 17:594–603
39. Harris WS. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: A case for omega-3 index as a new risk factor. *Pharmacological Research.* 2007; 55:217-223.

Table 1. Demographic, clinical and anthropometric characteristics of subjects.

Variables*	smoker (n=17)	non-smoker (n=44)	p
Age (years)	49 (9.5)	52 (10.6)	0.339
Sex (%)			
Men	9 (53)	11 (25)	0.039
women	8 (47)	33 (75)	
Race (%)			
White	13 (76)	27 (61)	0.517
Black	2 (12)	7 (16)	
Others	2 (12)	10 (23)	
BMI (kg/m²)	28.6 (5.9)	32.9 (6.6)	0.024
WC (cm)	97.7 (16.1)	102.9 (13.1)	0.201
Body Fat (%)	30.9 (12.7)	40.9 (11.7)	0.005
SBP (mmHg)	127.8 (19.2)	137.8 (19.4)	0.075
DBP (mmHg)	78.4 (10.2)	82.5 (10.2)	0.166
Current drugs (%)			
Statins	1 (6)	10 (23)	0.259
Antihypertensive	8 (47)	22 (50)	0.230
Hypoglycemic	5 (30)	7 (16)	0.096
Current diseases (%)			
Dyslipidemia	8 (47)	20 (45)	0.910
Hypertension	9 (53)	26 (60)	0.663
Diabetes	5 (30)	6 (14)	0.151
Familiar history of diseases(%)	15 (88)	39 (88)	0.965
Framingham risk score (%)			
Low	4 (23)	10 (23)	0.137
Intermediate	2 (12)	16 (36)	
High	11 (65)	18 (41)	
Physical activity	6.9 (1.2)	7.1 (1.4)	0.701
Energy intake (kcal)	1727 (551)	1649 (694)	0.679

*Data presented as mean and standard deviation. A comparative analysis for continuous variables was performed by Student's t-test and for categorical variables by Pearson Chi-Square ($p < 0.05$). BMI: body mass index; WC: waist circumference; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure.

Table 2. Biochemical characteristics of subjects.

Variables	smoker (n=17)		non-smoker (n=44)		p*	p**
	Baseline	8 wk	Baseline	8 wk		
TC (mg/dL)	195 (32)	173 (28)	202 (35)	192 (39)	0.504	0.037
LDL-c(mg/dL)	126 (32)	109 (25)	140 (33)	131 (37)	0.166	0.028
HDL-c (mg/dL)	37 (10)	39 (10)	37 (11)	40 (10)	1.000	0.695
non-HDL-c (mg/dL)	159 (30)	134 (24)	165 (36)	153 (39)	0.497	0.027
APO AI (mg/dL)	135 (25)	137 (29)	131 (29)	132 (26)	0.640	0.560
APO B (mg/dL)	100 (23)	104 (19)	100 (20)	104 (25)	0.995	0.974
HDL-c/APO AI	0.27 (0.04)	0.28 (0.05)	0.28 (0.05)	0.30 (0.06)	0.523	0.273
LDL-c/APO B	1.3 (0.4)	1.1 (0.2)	1.4 (0.2)	1.3 (0.4)	0.223	0.015
APO AI/APO B	0.8 (0.2)	0.8 (0.1)	0.8 (0.2)	0.8 (0.2)	0.500	0.559
NEFA (mg/dL)	0.7 (0.3)	0.6 (0.3)	0.7 (0.3)	0.7 (0.3)	0.904	0.578
PON1 (<i>nmol.min-1.ml-1</i>)	55 (28)	61 (34)	54 (32)	54 (33)	0.843	0.452
TG (mg/dL)	143 (107-181)	122 (63-185)	112 (91-152)	93 (73-117)	0.128	0.536
TG/HDL-c	4 (2-7)	2 (1-6)	3 (2-5)	2 (2-3)	0.392	0.747
CT/HDL-c	5 (4-7)	5 (4-5)	6 (5-7)	5 (4-6)	0.706	0.212
LDL-c/HDL-c	3 (3-5)	3 (2-3)	4 (3-5)	4 (3-4)	0.237	0.026
Glucose (mg/dL)	93 (89-98)	95 (89-104)	98 (89-108)	95 (87-104)	0.195	0.841
LDL(-) (U/L)	7.2 (3.9-17.6)	7.1 (2.9-16.2)	5.1 (2.9-21.1)	4.7 (1.9-23.1)	0.499	0.729
Anti-LDL(-) (mg/mL)	8.2 (3.6)	8.1 (3.3)	7.9 (3.9)	7.6 (3.7)	0.749	0.682

Data presented as mean (standard deviation) or median (p25-p75). A comparative analysis was performed by Student's t-test or Mann Whitney test ($p < 0.05$). TC: total cholesterol; LDL-c: cholesterol fraction in low density lipoprotein; HDL-c: cholesterol fraction in high density lipoprotein; non-HDL-c: cholesterol fraction non HDL-c; APO AI: apolipoprotein AI; APO B: apolipoprotein B; HDL-c/APO AI: HDL-c and APO AI ratio; LDL-c/APO B: LDL-c and APO B ratio; APO AI/APO B: apolipoproteins ratio; NEFA: non-esterified fatty acids; PON1: paraoxonase-1; TG: triacylglycerol; TG/HDL-c: TG and HDL-c ratio; CT/HDL-c: TC and HDL-c ratio; LDL-c/HDL-c: LDL-c and HDL-c ratio.

*difference tested at baseline (Baseline) (smoker *versus* non-smoker).

**difference tested after intervention (8 wk) (smoker *versus* non-smoker).

Table 3. HDL subfractions of subjects.

Variables (%)	smoker (n=17)		non-smoker (n=44)		p*	p**
	Baseline	8 wk	Baseline	8 wk		
HDL-1	9.5 (3.8)	10.2 (2.9)	10.9 (4.2)	12.9 (3.6)	0.224	0.008
HDL-2	12.2 (4.2)	12.5 (5.3)	13.0 (4.4)	14.9 (4.7)	0.497	0.079
HDL-3	6.8 (2.2)	7.1 (2.5)	7.6 (2.3)	8.8 (2.1)	0.224	0.016
HDL-4	9.6 (1.8)	9.4 (1.4)	9.5 (1.8)	10.1 (1.2)	0.875	0.054
HDL-5	11.4 (1.7)	11.2 (1.6)	11.1 (1.6)	11.1 (1.3)	0.453	0.790
HDL-6	22.4 (2.9)	21.9 (3.3)	21.3 (3.7)	19.6 (3.0)	0.283	0.011
HDL-7	7.8 (1.5)	7.7 (1.5)	7.4 (1.9)	6.5 (1.4)	0.460	0.006
HDL-8	7.6 (1.6)	7.6 (2.1)	7.3 (2.2)	6.4 (1.9)	0.544	0.041
HDL-9	6.6 (1.9)	6.2 (1.8)	5.5 (2.0)	4.8 (1.3)	0.069	0.002
HDL-10	6.0 (3.6)	5.9 (3.4)	6.2 (4.7)	4.6 (3.3)	0.888	0.169
HDL _{LARGE}	28.4 (8.3)	29.9 (9.8)	31.5 (9.7)	36.6 (8.5)	0.250	0.010
HDL _{INTERMEDIATE}	51.3 (4.2)	50.3 (5.5)	49.4 (5.1)	47.4 (4.7)	0.177	0.043
HDL _{SMALL}	20.3 (6.7)	19.7 (6.5)	19.0 (8.0)	15.9 (5.6)	0.565	0.024
HDL _{RATIO}	1.99 (0.97-3.11)	1.53 (1.19-2.76)	2.32 (1.35-3.28)	3.22 (2.14-5.00)	0.506	0.016

Data presented as mean (standard deviation) or median (p25-p75). A comparative analysis was performed by Student's t-test or Mann Whitney test ($p < 0.05$). HDL_{LARGE}: HDL large particles (1 to 3); HDL_{INTERMEDIATE}: HDL intermediate particles (4 to 7); HDL_{SMALL}: HDL small particles (8 to 10). HDL_{RATIO}: (HDL1 + HDL2) / (HDL9 + HDL10).

*difference tested at baseline (Baseline) (smoker *versus* non-smoker).

**difference tested after intervention (8 wk) (smoker *versus* non-smoker).

Table 4. Logistic regression models according cigarette smoker.

Model	Dichotomous variable	OR*	CI (95%)*	p*
Raw data	HDL _{LARGE} (%)			
	< <i>p</i> 50	5.16	1.44-18.46	0.012
Model A	> <i>p</i> 50	ref.		
	sex			
Model B	<i>men</i>	5.23	1.39-19.58	0.014
	<i>women</i>	ref.		
Model C	age (years)			
	> <i>60</i>	5.50	1.43-21.15	0.013
Model D	< <i>60</i>	ref.		
	EPA+DHA (%)			
Model E	< <i>8%</i>	4.85	1.08-21.64	0.039
	> <i>8%</i>	ref.		
Model F	body fat (%)			
	> <i>30%</i>	6.44	1.25-33.32	0.026
Model G	< <i>30%</i>	ref.		
	body weight (kg)			
Model H	> <i>p</i> 50	6.99	1.22-40.16	0.029
	< <i>p</i> 50	ref.		

Model A: raw data model adjusted for sex.

Model B: raw data model adjusted for sex and age.

Model C: raw data model adjusted for sex, age and EPA+DHA(%).

Model D: raw data model adjusted for sex, age, EPA+DHA(%) and body fat (%).

Model E: raw data model adjusted for sex, age, EPA+DHA(%), body fat (%) and body weight (kg).

EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; OR: odds ratio; CI: confidence interval.

*OR, CI (95%) and p values are related to independent variable (%HDL_{LARGE}).

6.4 ARTIGO 4: PUBLICADO NA REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE
HIPERTENSÃO

v.18(3), p. 73-84, 2015.

ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 E HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA: EVIDÊNCIAS
CIENTÍFICAS BASEADAS EM ENSAIOS CLÍNICOS CONTROLADOS

OMEGA-3 FATTY ACIDS AND HYPERTENSION: SCIENTIFIC EVIDENCE BASED ON CONTROLLED
CLINICAL TRIAL

Márcia Gowdak¹

Flávia De Conti Cartolano²

Caroline Pappiani²

Nágila Raquel Teixeira Damasceno²

¹Sociedade de Cardiologia do
Estado de São Paulo (SOCESP) –
São Paulo (SP), Brasil.

²Universidade de São Paulo,
Faculdade de Saúde Pública,
Departamento de Nutrição,
São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica é um dos principais fatores de risco independente para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares. O tratamento efetivo da doença depende das mudanças no estilo de vida, assim como do tratamento medicamentoso. A recomendação do consumo de peixe é ressaltada nas principais propostas de dieta saudável. A principal atenção dos pesquisadores está relacionada ao óleo de peixe, rico em ácidos graxos ômega-3 e seus componentes ativos, o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA). O efeito hipotensor da suplementação de ácidos graxos ômega-3 tem sido estudado. A presente revisão discute as evidências científicas, baseadas em estudos clínicos aleatorizados e controlados, sobre o efeito da suplementação do ômega-3 no controle da pressão arterial.

Descritores: ácidos graxos, ômega-3, hipertensão, ensaios clínicos.

ABSTRACT

Hypertension is the major independent risk factors for the development of cardiovascular disease. The effective treatment of the disease depends on the lifestyle changes and medical therapy. Fish consumption is a common advice as part of a healthy diet in the main dietary advice. Most scientists have their attention on omega-3 fatty acids and their active components, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). The hypotensive effect of omega-3 has been investigated. The present review discusses the scientific evidences for the effect of omega-3 supplementation to control blood pressure.

Decriptors: omega-3, fatty acids, hypertension, clinical trials.

INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um dos principais fatores de risco independente para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares¹. Segundo a Organização Mundial de Saúde², a prevalência mundial de HAS em indivíduos acima de 18 anos é de 22%. Nas últimas décadas, embora a proporção da população hipertensa tenha apresentado modesta redução, o número absoluto da doença tem aumentado em função do crescimento e envelhecimento da população.

No Brasil, a prevalência de hipertensão é de 30,8%, de acordo com os dados da OMS³, e sua distribuição média segundo o gênero é de 36,8% e 25,3% em homens e mulheres, respectivamente.

A HAS é multifatorial em sua gênese e desenvolvimento e depende do controle dos diversos fatores de risco modificáveis para a sua prevenção ou tratamento associado à medicação.

A obesidade é o fator de risco modificável que mais eleva o risco de desenvolvimento da HAS. O excesso de peso está frequentemente relacionado com a resistência à insulina e a resistência à leptina, condições fisiológicas que aumentam a atividade do sistema nervoso simpático, favorecendo a reabsorção de sódio e água pelo rim, com consequente aumento do débito cardíaco, da resistência vascular periférica e da pressão arterial sistêmica⁴.

Diante do cenário epidemiológico da HAS e dos fatores associados, assume-se que o tratamento efetivo da doença depende das mudanças no estilo de vida, assim como do tratamento medicamentoso. Neste sentido, a prática de atividade física e a adequação da dieta contribuem para a redução do risco de doença cardiovascular.

Entre as principais recomendações dietéticas, temos a diminuição do sódio, a mudança no padrão alimentar e a diminuição do consumo de bebidas alcoólicas. No contexto do padrão alimentar destaca-se a clássica dieta DASH⁵ (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*), além do estilo Mediterrâneo⁶, ambas caracterizadas pelo aumento do consumo de frutas e vegetais, aumento do consumo de laticínios e derivados do leite, além da diminuição das gorduras saturadas e aumento das gorduras insaturadas. A recomendação do consumo de peixe é ressaltada nas duas propostas e a principal atenção dos pesquisadores está relacionada ao óleo de peixe, rico em ácidos graxos ômega-3 e seus componentes ativos, o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA). A quantidade de ômega-3 nos peixes é bastante variável, o que

dificulta a avaliação do impacto desse ácido graxo isoladamente no controle da pressão arterial (PA) e como coadjuvante no tratamento da HAS. Além disso, a presença de outros nutrientes pode funcionar com um fator de confusão na interpretação dos resultados. Desta forma, a maioria das pesquisas tem estudado o efeito do suplemento de ômega-3 na diminuição da PA de indivíduos hipertensos e normotensos.

Os mecanismos que poderiam explicar o seu efeito hipotensor são inúmeros, dos quais podemos destacar: produção de eicosanóides com propriedades vasodilatadoras; ação inibidora do sistema renina-angiotensina; aumento da síntese de óxido nítrico pela ativação da enzima óxido nítrico sintase-endotelial; inibição dos receptores α -adrenérgicos e consequente diminuição da liberação de cálcio intracelular^{7,8}.

A presente revisão discute as evidências científicas, baseadas em estudos clínicos aleatorizados e controlados, sobre o efeito da suplementação do ácido graxo ômega-3 no controle da HAS. Serão discutidos os possíveis mecanismos de ação ao nível metabólico e molecular, assim será avaliada a resposta clínica frente a diferentes dosagens e duração das intervenções. Foram pesquisados na base de dados Pubmed artigos publicados nos últimos 10 anos, usando os seguintes descritores: ômega-3, DHA, EPA, óleo de peixe, hipertensão.

Aspectos estruturais dos ácidos graxos ômega-3 e relevância na saúde e na doença

Para entender o papel dos ácidos graxos ômega-3 sobre a PA é importante conhecer o seu metabolismo e as interações com os ácidos graxos ômega-6. Ambos os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) compartilham das mesmas vias metabólicas e oxidativas; no entanto os seus produtos metabólicos finais têm efeitos fisiológicos antagônicos⁹.

Após as reações de dessaturação e alongação, o ácido linoleico (LA, 18:2, ômega-6) converte-se em ácido linoleico di-homo-gama (DGLA, 20:3, ômega-6), que é convertido em ácido araquidônico (AA, 20:4, ômega-6). O ácido araquidônico (AA) é precursor de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos das séries 2 e 4, mediadas por cicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX). Ambas as prostaglandinas e os leucotrienos modulam respostas fisiológicas associadas à vasoconstrição, agregação de plaquetas e síntese de mediadores inflamatórios^{10,11}.

Por meio da ação das enzimas COX e LOX sobre o EPA, são gerados eicosanoides (leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas) da série ímpar (E3 e E5) que possuem propriedades anti-aterogênicas, anti-inflamatórias e vasodilatadoras¹². Esses irão competir com a ação dos eicosanoides da série par (E2 e E4) gerados a partir do AA. Um exemplo dessa competição ocorre quando há aumento da formação da PGI₃, uma prostaciclina sabidamente vasodilatadora, com consequente redução da produção de tromboxano A₂, um potente vasoconstritor¹³. Além disso, o DGLA, um precursor direto do AA, também compete pela via COX/LOX levando à produção da PGE₁, outro agente vasodilatador com propriedade anti-plaquetária¹⁴.

Em paralelo, o ácido alfa linolênico (ALA, 18:3, ômega-3) sofre reações de dessaturação e alongação para formar o EPA (20:5, ômega-3), que é um precursor de prostaglandinas da série 3 e leucotrienos da série 5⁹. Essas prostaglandinas são fisiologicamente menos potentes do que as formadas a partir do AA e os seus efeitos no tônus vascular, agregação plaquetária e inflamação são antagonísticos¹⁰. Posteriormente, o EPA é convertido em DHA (22:6, ômega-3). Além disso, o EPA e DHA são também precursores de lipoxinas, resolvinas e protectinas, compostos que modulam a inflamação e servem como reguladores endógenos do tônus vascular e PA¹¹.

Esses derivados de EPA e DHA (resolvinas, protectinas e maresinas) têm o papel pró-resolutivo na inflamação por meio da inibição do fator nuclear kappa B e diminuição do recrutamento de neutrófilos¹⁵⁻¹⁸. A figura 1 descreve os processos de dessaturação e alongação do ômega-3 que favorecem a geração de compostos bioativos capazes de modular as vias que controlam a PA.

Aspectos moleculares de ação dos ácidos graxos ômega-3 nas HAS

Os ácidos graxos poli-insaturados possuem múltiplas e complexas atividades biológicas, que variam desde a ação direta em receptores até a modulação da expressão gênica¹⁹. Especificamente em relação aos ácidos graxos ômega-3 e o controle da PA, os efeitos anti-hipertensivos são multifatoriais e envolvem a modulação da função endotelial e complacência arterial (grandeza utilizada para expressar a razão entre variação do volume e a variação de pressão), juntamente com um efeito cardíaco, mediado pela diminuição da frequência cardíaca⁷. Atualmente, os possíveis mecanismos para tais efeitos incluem: supressão de eicosanoides

vasoconstritores, regulação do sistema renina-angiotensina, maior produção e/ou liberação de óxido nítrico, inibição de receptores alfa-adrenérgicos, mudanças no fluxo intracelular de cálcio, aumento da fluidez da membrana, além da ativação ou inibição de fatores de transcrição, por exemplo, a proteína de ligação a elemento regulador de esterol e de receptores nucleares, por exemplo, os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), o fator nuclear hepático e o receptor retinóide X⁷.

Modificações dos perfis de ácidos graxos plasmáticos e teciduais têm sido amplamente descritas após a suplementação com ômega-3²⁰⁻²⁶, com incorporação de EPA e DHA em detrimento da presença de ácidos graxos da família ômega-6. Desta maneira, o aumento da produção de mediadores com ações vasodilatadoras, antitrombóticas e anti-inflamatórias na presença da disponibilidade aumentada de ômega-3 tecidual é resultado, tanto do aumento de seus precursores na membrana plasmática, quanto da competição com os ácidos graxos ômega-6 pelas enzimas metabólicas comuns em suas vias de metabolização¹⁴. Embora o mesmo conjunto de dessaturases e elongases possa sintetizar AA e DHA a partir de seus respectivos precursores, é bem estabelecido que o aumento dietético do ALA inibe a síntese de AA a partir de LA²⁷⁻³¹.

Evidências científicas propõem que os efeitos benéficos do ômega-3 sobre a PA vão além da produção de prostanóides com propriedades vasodilatadoras. Os efeitos antagonistas do ômega-3 sobre os receptores da angiotensina II podem também ser responsáveis pela modulação da hipertensão por este ácido graxo^{32,33}. Os ácidos graxos ômega-3 também demonstram ter ação inibidora sobre o sistema renina-angiotensina, por meio da modulação na secreção da renina e da atividade ECA^{34,35}. Em um estudo experimental com ratos alimentados durante 4 semanas com óleo de linhaça (representando 20% da energia consumida) observou-se a diminuição da secreção de renina³⁴. Além disso, a redução da expressão e atividade da ECA foram observadas em ratos hipertensos com 6 semanas de idade, após serem alimentados com uma dieta contendo 10% de ALA. Posteriormente, essas observações foram confirmadas por ensaios *in vitro*, no qual o EPA inibiu mais efetivamente a atividade da ECA (EPA>ALA>DHA>LA>AA)¹⁴.

Outro mecanismo pelo qual o ômega-3 pode modular a PA sistêmica é por meio do estímulo da liberação de óxido nítrico, que tem função vasodilatadora³⁶. Esse efeito parece ser devido a modificações lipídicas e estruturais nas cavéolas, levando ao deslocamento para o plasma da enzima óxido nítrico sintase (NOSe), que está ligada à caveolina-1. Essa migração para o citossol levaria a ativação da NOSe³⁷. Ademais, a ativação da NOSe nas células da

musculatura lisa vascular também parece estar relacionada à inibição do fator de crescimento derivado de plaquetas. Esse fator é regulador da atividade da NOSe e é modulado pelo ômega-3^{38,39}. Dessa maneira, a incorporação de EPA e DHA em fosfolipídeos da membrana endotelial irá atuar modulando o tônus vascular e, possivelmente, na complacência arterial⁴⁰.

McVeigh et al.⁴¹ mostraram que, em indivíduos com diabetes tipo 2, a complacência arterial melhorou significativamente após 6 semanas de suplementação com óleo de peixe em comparação com azeite de oliva. Em pacientes dislipidêmicos, a suplementação com EPA ou DHA melhorou a complacência arterial em 35 e 27%, respectivamente⁴⁰. Pase et al.⁴² demonstraram em sua meta-análise resultados que corroboram com tais achados. Além disso, os ácidos graxos ômega-3 pode reduzir a frequência cardíaca⁴³⁻⁴⁵, sugerindo um efeito cardíaco sinérgico associado com aos efeitos anti-hipertensivos, possivelmente, mediado pela atividade β -adrenérgica e o sistema nervoso autônomo¹⁹.

A inibição da ativação de receptores alfa-adrenérgicos também tem sido descrita⁸. Como resultado dessa inibição, tem-se a diminuição da produção do inositol 1,4,5-trifosfato responsável pela estimulação da liberação de cálcio intracelular a partir do retículo endoplasmático. Contudo, postula-se que as propriedades vasodilatadoras do EPA e do DHA são medidas por mecanismos intracelulares, além do estímulo à liberação de óxido nítrico, anteriormente descrito.

No estudo de Taffet et al.⁴⁶, ratos alimentados com uma dieta suplementada com EPA e DHA apresentaram diminuição na atividade da adenosina trifosfatase (ATPase), transportadora de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático do músculo cardíaco, evidenciando o papel desses ácidos graxos na modulação da liberação de cálcio intracelular e, conseqüentemente, na contração muscular. Portanto, a inibição da ativação de receptores alfa-adrenérgico juntamente com a diminuição da atividade da ATPase contribuiria positivamente para o papel do ômega-3 no controle da PA.

Além disso, a inibição da ativação dos receptores alfa-adrenérgicos também irá resultar na menor formação de 1,2-diacilglicerol (DAG), um ativador da proteína quinase C (PKC), que é responsável pela ativação da bomba de sódio e potássio e dos canais de cálcio na membrana celular, modulando a contração muscular. Contudo, estudos sugerem que a PKC e suas várias isoformas regularam diretamente os receptores ativados pelos PPARs⁴⁷⁻⁴⁹. Assim, uma vez que a PKC é essencial para a ativação dos PPARs e existe forte evidência da ação de ômega-3 através

desses receptores, é pouco provável que a contribuição desta via (inibição PKC) seja crucial na diminuição da PA associada ao ômega-3.

Em adição, estudos baseados em modelos animais sugerem que os efeitos dos ácidos graxos ômega-3 na modulação da PA também podem estar relacionados com seus efeitos sobre as catecolaminas e ATP. Hashimoto et al.⁵⁰ mostraram que ratos alimentados com DHA apresentaram redução da noradrenalina no plasma e aumento de ATP, liberado tanto espontaneamente e, em resposta à noradrenalina a partir de segmentos de artéria caudal. Esses animais tiveram 44% menos noradrenalina plasmática e PA atenuada. Os níveis plasmáticos de ATP foram inversamente associados com a PA. A relevância dessas associações se deve ao fato do ATP ter ação vasodilatadora, estimulando a liberação de óxido nítrico a partir de células endoteliais, através da ação direta nas células do músculo liso. Portanto, o aumento da liberação de ATP a partir de células endoteliais vascular, em conjunto com reduzida noradrenalina plasmática, poderia contribuir para a redução na PA associada ao ômega-3.

Contudo, Abeywardena e Patten⁵¹ destacaram que, enquanto uma grande variedade de mecanismos pode contribuir para a ação do ômega-3 na redução da PA, o papel das células endoteliais vasculares parece ser central nesta modulação. A figura 2 destaca os mecanismos associados à homeostase da PA modulados pelo ômega-3.

Evidências de eficácia clínica do ômega-3 na HAS

O consumo elevado de ômega-3 tem sido associado com efeitos cardioprotetores e melhora da função endotelial, por meio dos seus efeitos benéficos sobre a PA, perfil lipídico, agregação plaquetária e pelas suas propriedades anti-inflamatórias⁵².

Diferentes meta-análises mostraram que doses relativamente altas de ômega-3 podem levar a reduções da PA clinicamente relevantes nos indivíduos com hipertensão não tratada. Na meta-análise de Appel et al.⁵³ incluindo 17 ensaios clínicos, a redução da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) em indivíduos hipertensos foi 5,5 e 3,5 mmHg, respectivamente, em um período de intervenção (3g/dia) de até 3 meses.

Outra meta-análise incluindo 36 estudos, mostrou uma redução de 2,1 mmHg na PAS e 1,6 mmHg na PAD, com um consumo médio de 3,7 g/dia de óleo de peixe durante 12 semanas⁵⁴.

No entanto, em um estudo randomizado, 162 indivíduos saudáveis receberam uma dieta com elevada proporção de ácidos graxos saturados ou de ácidos graxos monoinsaturados. Ambos os grupos foram ainda distribuídos aleatoriamente para receber suplementação com óleo de peixe (3,6 g/dia) ou placebo (azeite de oliva, 3,6g/dia). O principal objetivo foi avaliar os efeitos de diferentes tipos de gordura sobre a PA em indivíduos saudáveis. Os resultados mostraram que a suplementação não afetou a pressão, independente da quantidade de gordura na dieta⁵⁵. Resultado semelhante foi observado em um estudo realizado com 37 voluntários saudáveis, mas, foi utilizado uma dose menor de ômega-3 (1,0 g/dia)⁵⁶.

Em um estudo transversal, Ramel et al.⁵⁷ analisaram a associação entre fatores de risco cardiovascular, dieta e índice ômega-3 nas membranas eritrocitárias em 324 indivíduos, com idades entre 30-35 anos e com excesso de peso na Espanha, Islândia e Irlanda. Entre os participantes, 32% tinham PA elevada. Os resultados não apresentaram associação entre as variáveis e PAS ou PAD.

Resultados semelhantes foram encontrados por Szabo et al.⁵⁸ em pacientes com doença cardiovascular. Neste estudo duplo-cego, 2501 indivíduos foram randomizados em 4 grupos: suplementação com ômega-3 (1,2 g/dia EPA e DHA), suplementação com vitaminas do complexo B, a combinação das 2 intervenções e placebo (cápsulas de gelatina). No entanto, após 5 anos de intervenção, os autores não encontraram efeito na PA.

Há poucos anos foi publicado o estudo de intervenção dietética LIPGENE⁵⁹. Este estudo avaliou o efeito do ômega-3 sobre a PA de indivíduos com síndrome metabólica por 12 semanas, e os voluntários foram aleatorizados para uma das quatro dietas, evitando viés. Em duas dietas, 38% da energia total eram fornecidas sob a forma de gorduras: uma elevada em ácidos graxos saturados e outra em monoinsaturados. Nas outras 2 dietas, 20% da energia era proveniente de gorduras: uma com suplementação de 1-2 g/dia de ômega-3 e outra com ácido oleico ou óleo de girassol. Não houve diferenças na PAS e PAD entre as diferentes dietas, e os autores concluíram que a dose era muito baixa em comparação com outros estudos.

Em um estudo de intervenção dietética⁶⁰, 69 voluntários com excesso de peso e HAS tratada, foram aleatorizados em uma das 4 dietas diferentes:

1. dieta de peixe contendo 3,65 g/dia de ômega-3;
2. dieta de baixas calorias (< 30% de gordura);
3. combinação de ambas as dietas;

4. dieta controle (dieta habitual dos participantes).

Os indivíduos que consumiram grande quantidade de ômega-3 apresentaram redução da PAS e PAD (6,0 e 3,0 mmHg, respectivamente). No entanto, a redução foi maior com a combinação de ambas as dietas (PAS = 13,0 mmHg e PAD = 9,3 mmHg).

O efeito do ômega-3 na PA em indivíduos com dislipidemia tem sido controverso. Em um estudo retrospectivo, o efeito da suplementação com ômega-3 durante 12 meses foi avaliado em 111 indivíduos com hipertrigliceridemia e HAS sem tratamento. Os indivíduos receberam 2 g/dia de ômega-3, contendo, pelo menos, 85% de EPA e DHA. Os resultados mostraram redução significativa da PAS e PAD (2,7 mmHg e 1,4 mmHg, respectivamente)⁶¹.

Resultados semelhantes foram encontrados no estudo realizado por Iketani, Takazawa e Yamashina⁶² no qual avaliaram 24 pacientes com hiperlipidemia não tratada. Desses, 13 pacientes receberam suplementação com EPA (1,8 g/dia) e 11 receberam estatina (10 mg/dia), durante 3 meses. No grupo ômega-3, os resultados mostraram redução significativa da PAS e PAD (7% e 8%, respectivamente).

Em outro estudo, 60 pacientes hiperlipidêmicos foram distribuídos aleatoriamente para um dos quatro grupos: placebo (óleo de girassol, 4 g/dia), óleo de peixe (4 g/dia, sendo 1,4 g/dia de ômega-3), esteróis vegetais (2 g/dia) e a combinação de óleo de peixe e esteróis. Houve tendência, não significativa, em diminuir PAS e PAD nos grupos contendo ômega-3⁶³. Por outro lado, foi demonstrado que a suplementação com dose baixa de ômega-3 (1 g/dia) em longo prazo (6 meses) não reduziu a PA em voluntários com excesso de peso e hipertrigliceridemia⁶⁴.

Carter et al.⁶⁵ também avaliaram o efeito do ômega-3 na PA em pacientes normo e pré-hipertensos (n=67, sendo 38 normo e 29 pré-hipertensos). Neste estudo randomizado, duplo-cego, os participantes receberam 9g de óleo de peixe (2,7g EPA e DHA) ou 9g de placebo (azeite de oliva) durante 8 semanas. No entanto, após a intervenção, não houve diferença nos valores da PA dos indivíduos.

Recentemente, Vernaglione et al.⁶⁶ publicaram um estudo prospectivo a respeito dos efeitos do ômega-3 sobre a PA e outras variáveis em 24 pacientes em hemodiálise. No estudo do tipo *crossover*, depois da avaliação basal, os pacientes tiveram que seguir períodos consecutivos de 4 meses com diferentes suplementos: 2 g/dia de azeite de oliva, seguido de 2 g/dia de ômega-3 e, novamente 2 g/dia de azeite de oliva. Ambas PAS ($T_{\text{BASAL}} = 131$ mmHg e $T_{\text{FINAL}} = 122$ mmHg)

e PAD ($T_{\text{BASAL}} = 83$ mmHg e $T_{\text{FINAL}} = 71$ mmHg) reduziram significativamente após o período de suplementação com ômega-3.

Além disso, Miller et al.⁶⁷ realizaram uma meta-análise baseada em 70 estudos clínicos aleatorizados controlados e observaram que indivíduos hipertensos tiveram redução da PAS e PAD após receberam doses diárias de EPA e DHA iguais ou superiores a 2 gramas. Esses resultados foram baseados em intervenções com alimentos fonte de ômega-3 e suplementação com cápsulas contendo ômega-3 em intervalo de tempo superior a 3 semanas.

A tabela 1 apresenta os principais estudos que avaliaram o efeito do ômega-3 sobre a PA.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A HAS é um grave problema de saúde pública com repercussões diretas na incidência de doenças cardiovasculares. Devido aos múltiplos fatores causais e a complexidade dos mecanismos associados à sua gênese, o tratamento multidisciplinar deve envolver o uso de medicamentos e a mudança no estilo de vida, com ênfase na dieta. Particularmente no que se refere ao consumo alimentar, grande atenção tem sido dada ao possível papel benéfico dos ácidos graxos ômega-3 no tratamento da HAS.

O ômega-3 tem se mostrado capaz de modular a PA por meio da promoção da vasodilatação, regulação do sistema renina-angiotensina, maior produção e/ou liberação de óxido nítrico, inibição de receptores α -adrenérgicos, mudanças no fluxo intracelular de cálcio, aumento da fluidez da membrana, além da ativação ou inibição de fatores de transcrição.

A participação desses mecanismos tem sido confirmada por estudos clínicos aleatorizados e controlados, em que intervenções com ômega-3, particularmente EPA e DHA, administrados em doses superiores a 2g/dia, com duração superior a 3 semanas, foram eficazes na redução da PA em indivíduos hipertensos.

REFERÊNCIAS

1. Rosendorff et al. (2007) Treatment of hypertension in the prevention and management of ischemic heart disease: a scientific statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research and the Councils on Clinical Cardiology and Epidemiology and Prevention. *Circulation*, v. 115, n. 21, p. 2761-88.

2. Organização Mundial da Saúde (2014a) Global status report on non communicable diseases. Série de Relatos Técnicos. Genebra.
3. Organização Mundial da Saúde (2014b) Non communicable diseases country profiles 2014. Série de Relatos Técnicos. Genebra.
4. Hall JE et al. (2015) Obesity-induced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms. *Circ Res*, v. 116, n. 6, p. 991-1006.
5. Salehi-Abargouei A et al. (2013) Effects of Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH)-style diet on fatal or non fatal cardiovascular diseases--incidence: a systematic review and meta-analysis on observational prospective studies. *Nutrition*, 29(4): p. 611-8.
6. Toledo E et al. (2013) Effect of the Mediterranean diet on blood pressure in the PREDIMED trial: results from a randomized controlled trial. *BMC Med*, 11: p. 207.
7. Mori TA, Burke V & Beilin LJ (2007) Dietary fats and blood pressure. In *Comprehensive Hypertension*. Section I: Epidemiology, pp. 77–88 [GYH Lip & JE Hall, editors].
8. Engler MB (1994) Vascular effects of omega-3 fatty acids: possible therapeutic mechanisms in cardiovascular disease. *J Cardiovasc Nurs*, v. 8, n. 3, p. 53-6.
9. Cook H & McMaster C (2002) Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th ed., pp. 181–204 [DE Vance, editor].
10. Biscione F, Pignalberi C, Totteri A, Messina F & Altamura G (2007) Cardiovascular effects of omega-3 free fatty acids. *Curr Vasc Pharmacol*. 5, 163–172.
11. Das U (2008) Essential fatty acids and their metabolites could function as endogenous HMG-CoA reductase and ACE enzyme inhibitors, anti-arrhythmic, anti-hypertensive, anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, cytoprotective, and cardioprotective molecules. *Lipids Health Dis* 7, 37.
12. Poudyal H et al. (2011) Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res*, v. 50, n. 4, p. 372-87.
13. Chin JPF & Dart AM (2007) How do fishoil affects vascular function? *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 22: 71-81.
14. Kumar KV, DAS UN (1997) Effect of cis-unsaturated fatty acids, prostaglandins, and free radicals on angiotensin-converting enzyme activity in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 214, n. 4, p. 374-9.
15. Serhan CN et al. (2004) Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, v. 73, n. 3-4, p. 155-72.

16. Serhan CN (2007) Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and pro-resolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol*, v. 25, p. 101-37.
17. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*, v. 8, n. 5, p. 349-61.
18. Serhan CN et al. (2009) Maresins: novel macrophage mediators with potent anti-inflammatory and pro-resolving actions. *J Exp Med*, v. 206, n. 1, p. 15-23.
19. Mozaffarian D, Wu JH (2011a) Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol*, v. 58, n. 20, p. 2047-67.
20. Sanders TA, Roshanai F (1983) The influence of different types of omega 3 polyunsaturated fatty acids on blood lipids and platelet function in healthy volunteers. *Clin Sci (Lond)*, v. 64, n. 1, p. 91-9.
21. Blonk MC et al. (1990) Dose-response effects of fish-oil supplementation in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr*, v. 52, n. 1, p. 120-7.
22. Harris WS, Windsor SL, Dujovne CA (1991) Effects of four doses of n-3 fatty acids given to hyperlipidemic patients for six months. *J Am Coll Nutr*, v. 10, n. 3, p. 220-7.
23. Marsen TA et al. (1992) Pharmacokinetics of omega-3-fatty acids during ingestion of fish oil preparations. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 46, n. 3, p. 191-6.
24. Katan MB et al. (1997) Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesterylesters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study. *J Lipid Res*, v. 38, n. 10, p. 2012-22.
25. Healy DA et al. (2000) Effect of low-to-moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids*, v. 35, n. 7, p. 763-8.
26. Rees D et al. (2006) Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. *Am J Clin Nutr*, v. 83, n. 2, p. 331-42.
27. Mohrhauer H, Holman RT (1963) EFFECT OF LINOLENIC ACID UPON THE METABOLISM OF LINOLEIC ACID. *J Nutr*, v. 81, p. 67-74.
28. Hassam AG (1977) The influence of alpha-linolenic acid (18:3 omega3) on the metabolism of gamma-linolenic acid (18:3 omega6) in the rat. *Br J Nutr*, v. 38, n. 1, p. 137-40.
29. Hwang DH, Carroll AE (1980) Decreased formation of prostaglandins derived from arachidonic acid by dietary linolenate in rats. *Am J Clin Nutr*, v. 33, n. 3, p. 590-7.
30. Marshall LA, Johnston PV (1981) alpha-Linolenic and linoleic acids and the immune response. *Prog Lipid Res*, v. 20, p. 731-4.

31. Marshall LA, Johnston PV (1982) Modulation of tissue prostaglandin synthesizing capacity by increased ratios of dietary alpha-linolenic acid to linoleic acid. *Lipids*, v. 17, n. 12, p. 905-13.
32. Juan H, Sametz W (1986) Vasoconstriction induced by noradrenaline and angiotensin II is antagonized by eicosapentaenoic acid independent of formation of trienoic eicosanoids. *NaunynSchmiedebergsArchPharmacol*, v. 332, n. 3, p. 288-92.
33. Juan H, Sutter D, Sametz W (1987) Influence of eicosapentaenoic acid on noradrenaline and angiotensin-induced contractions of the rabbit aorta: mode of action. *ProgClinBiol Res*, v. 242, p. 57-62.
34. Codde JP et al. (1984) An inhibitory effect of dietary polyunsaturated fatty acids on rennin secretion in the isolated perfused rat kidney. *J Hypertens*, v. 2, n. 3, p. 265-70.
35. Ogawa A et al. (2009) Effect of dietary alpha-linolenic acid on vascular reactivity in aorta of spontaneously hypertensive rats. *J OleoSci*, v. 58, n. 5, p. 221-5.
36. Mori TA et al. (2000) Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on vascular reactivity of the forearm microcirculation in hyperlipidemic, overweight men. *Circulation*, v. 102, n. 11, p. 1264-9.
37. Li Q et al. (2007) Docosahexaenoic acid affects endothelial nitric oxide synthase in caveolae. *ArchBiochemBiophys*, v. 466, n. 2, p. 250-9.
38. Fox PL, Dicorleto PE (1988) Fish oils inhibit endothelial cell production of platelet-derived growth factor-like protein. *Science*, v. 241, n. 4864, p. 453-6.
39. Schini VB et al. (1992) The induction of nitric oxide synthase activity is inhibited by TGF-beta 1, PDGFAB and PDGFBB in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, v. 216, n. 3, p. 379-83.
40. Nestel P et al. (2002) The n-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid increase systemic arterial compliance in humans. *Am J Clin Nutr*, v. 76, n. 2, p. 326-30.
41. McVeigh GE et al. (1994) Fish oil improves arterial compliance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *ArteriosclerThromb*, v. 14, n. 9, p. 1425-9.
42. Pase MP, Grima NA, Sarris J (2011) Do long-chain n-3 fatty acids reduce arterial stiffness? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Br J Nutr*, v. 106, n. 7, p. 974-80.
43. Bao DQ et al. (1998) Effects of dietary fish and weight reduction on ambulatory blood pressure in overweight hypertensives. *Hypertension*, v. 32, n. 4, p. 710-7.
44. Mori TA et al. (1999) Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans. *Hypertension*, v. 34, n. 2, p. 253-60.

45. Mozaffarian D et al. (2005) Effect of fish oil on heart rate in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Circulation*, v. 112, n. 13, p. 1945-52.
46. Taffet GE et al. (1993) The calcium uptake of the rat heart sarcoplasmic reticulum is altered by dietary lipid. *J MembrBiol*, v. 131, n. 1, p. 35-42.
47. Sotiropoulos KB et al. (2006) Adipose-specific effect of rosiglitazone on vascular permeability and protein kinase C activation: novel mechanism for PPAR gamma agonist's effects on edema and weight gain. *FASEB J*, v. 20, n. 8, p. 1203-5.
48. Gray JP et al. (2005) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by protein kinase C. *Biochemistry*, v. 44, n. 30, p. 10313-2.
49. Blanquart C et al. (2004) The protein kinase C signaling pathway regulates a molecular switch between transactivation and transrepression activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *MolEndocrinol*, v. 18, n. 8, p. 1906-18.
50. Hashimoto M et al. (1999) The hypotensive effect of docosahexaenoic acid is associated with the enhanced release of ATP from the caudal artery of aged rats. *J Nutr*, v. 129, n. 1, p. 70-6.
51. Abeywardena MY, Patten GS (2011) Role of ω 3 long-chain polyunsaturated fatty acids in reducing cardio-metabolic risk factors. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 11(3):232-46.
52. Gebauer SK, Psota TL, Harris WS & Kris-Etherton PM (2006) n-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr* 83, Suppl. 6, 1526S–1535S.
53. Appel LJ, Miller ER III, Seidler AJ & Whelton PK (1993) Does supplementation of diet with 'fish oil' reduce blood pressure? A meta-analysis of controlled clinical trials. *Arch Intern Med* 153, 1429–1438.
54. Geleijnse JM, Giltay EJ, Grobbee DE, Donders AR & Kok FJ (2002) Blood pressure response to fish oil supplementation: meta-regression analysis of randomized trials. *J Hypertens*. 20, 1493–1499.
55. Rasmussen BM, Vessby B, Uusitupa M, Berglund L, Pedersen E, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LL, Hermanen K, Kanwu study group, et al. (2006) Effects of dietary saturated, monounsaturated, and n-3 fatty acids on blood pressure in healthy Subjects. *Am J Clin Nutr*. 83, 221–226.
56. Shah AP, Ichiuji AM, Han JK, Traina M, El-Bialy A, Meymandi SK & Wachsner RY (2007) Cardiovascular and endothelial effects of fish oil supplementation in healthy Volunteers. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 12, 213–219.

57. Ramel A, Pumberger C, Martinez AJ, Kiely M, Bandarra NM & Thorsdottir I (2009) Cardiovascular Risk Factors in young, overweight, and obese European adults and associations with physical activity and omega-3 index. *Nutr Res.* 29, 305–312.
58. Szabo de Edelenyi F, Vergnaud AC, Ahluwalia N, Julia C, Hercberg S, Blacher J, Galan P. (2012) Effect of B-vitamins and n-3 PUFA supplementation for 5 years on blood pressure in patients with CVD. *Br. J. Nutr.* 107(6):921-927.
59. Gulseth HL, Gjelstad IM, Tierney BC, Shaw DI, Helal O, Hees AM, Delgado J, Leszczynska-Golabek I, Karlstro`m B, Lovegrove J, Defoort C, Blaak EE, Lopez-Miranda J, Dembinska-Kiec A, Rise´rus U, Roche HM, Birkeland KI & Br Drevon CA (2010) Dietary fat and blood pressure modifications in subjects with the metabolic syndrome in the dietary intervention LIPGENE study. *J Nutr.* 104, 160–163.
60. Bao DQ, Mori T, Burke V, Puddey IB & Beilin LJ (1998) Effects of dietary fish and weight reduction on ambulatory blood pressure in overweight hypertensives. *Hypertension* 32, 710–717.
61. Cicero AF, Derosa G, Di Gregorio V, Bove M, Gaddi AV & Borghi C (2010) Omega 3 polyunsaturated fatty acids supplementation and blood pressure levels in hypertriglyceridemic patients with untreated normal-high blood pressure and with or without metabolic syndrome: a retrospective study. *Clin Exp Hypertens* 32, 137–144.
62. Iketani T, Takazawa K, Yamashina A (2013) Effect of eicosapentaenoic acid on central systolic blood pressure. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013 Feb;88(2):191-5.
63. Micallef MA & Garg ML (2009) Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals. *Atherosclerosis.* 204, 476–482.
64. Murphy KJ, Meyer BJ, Mori TA, Burke V, Mansour J, Patch CS, Tapsell LC, Noakes M, Clifton PA, Barden A, Puddey IB, Beilin LJ & Howe PR (2007) Impact of foods enriched with n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on erythrocyte n-3 levels and cardiovascular Risk factors. *Br J Nutr.* 97, 749–757.
65. Carter JR, Schwartz CE, Yang H, and Joyner MJ (2012) Fish oil and neurovascular control in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 15;303(4):H450-6.
66. Vernaglione L, Cristofano C & Chimienti S (2008) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and proxies of cardiovascular disease in hemodialysis: a prospective cohort study. *J Nephrol.* 21, 99–105.
67. Miller PE, Elswyk MV, Alexander DD (2014) Long-Chain Omega-3 Fatty Acids Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid and Blood Pressure: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *American Journal of Hypertension* 27(7).

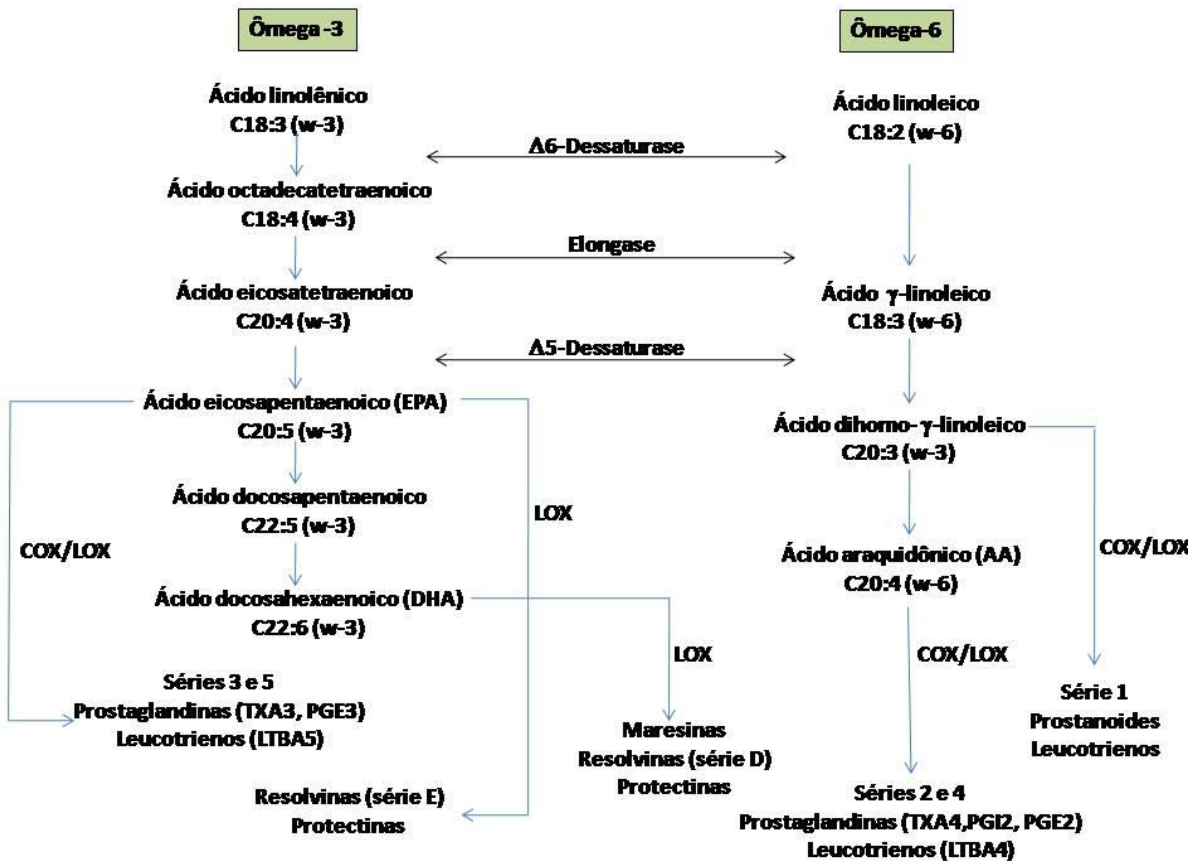


Figura 1 - Processos de dessaturação e elongação do ômega-3 e ômega-6 e consequente geração de compostos bioativos. LOX: lipoxigenase, COX: ciclooxigenase.

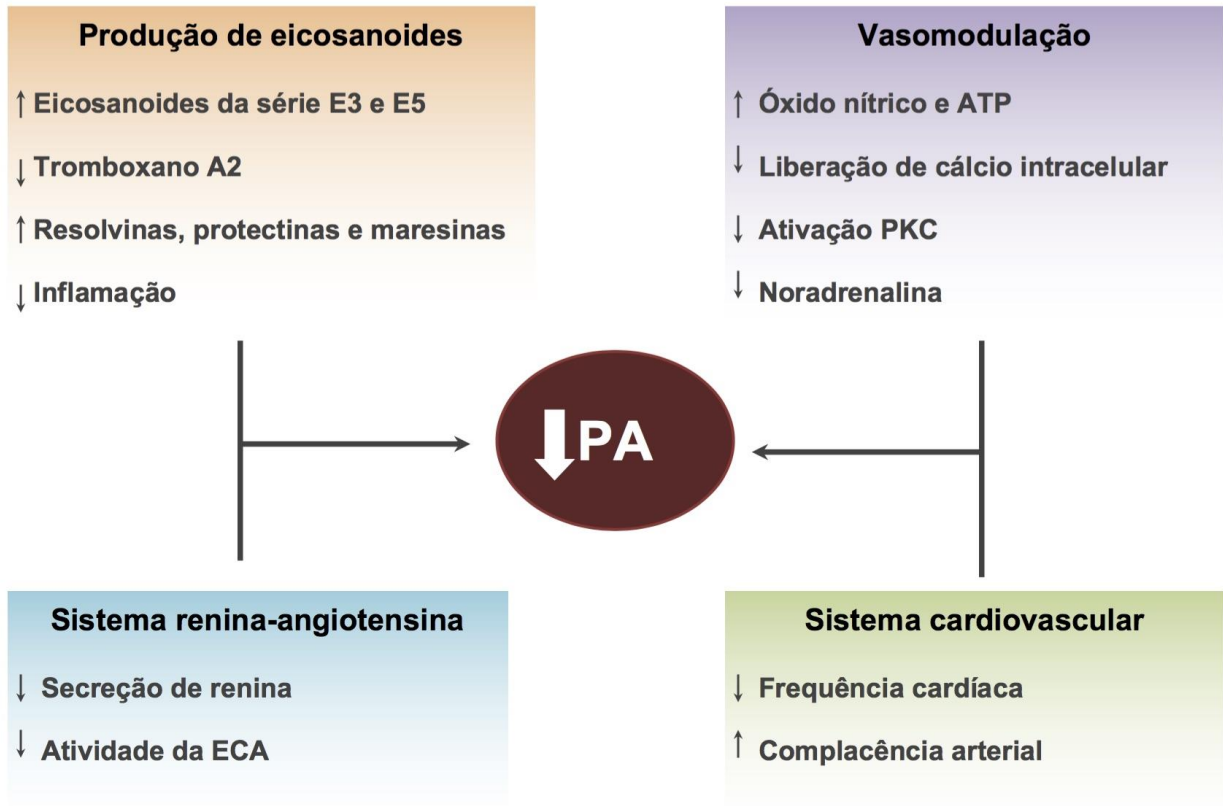


Figura 2 - Possíveis efeitos inibitórios do ômega-3 sobre vias que levam à hipertensão. Os efeitos anti-hipertensivos do ácido graxo ômega-3 são multifatoriais e envolvem: a) produção de eicosanoides vasodilatadores e mediadores pró-resolução, supressão da liberação de tromboxano A2 e da inflamação; b) modulação da função endotelial; c) inibição da secreção de renina e da atividade da ECA; d) diminuição da frequência cardíaca e aumento da complacência arterial. PA – pressão arterial; ECA – enzima conversora da angiotensina; ATP – adenosina trifosfato; PKC – proteína quinase C.

Tabela 1. Estudos clínicos aleatorizados e controlados sobre os efeitos do ômega-3 sobre a pressão arterial.

Autor	Ano	Tipo do estudo	n	Duração	Dosagem w3 (g/dia)	Efeito na PA (PAS e PAD)
Miller et al.	2014	Meta-análise*	1620	> 3 semanas	3,8	↓
Geleijnse et al.	2002	Meta-análise*	1404	12 semanas	3,7	↓
Appel et al.	1993	Meta-análise*	291	< 3 meses	3,0	↓
Bao et al.	1998	EC/Dieta ^b	63	16 semanas	3,65	↓
Rasmussen et al.	2006	EC/Suplementação ^a	162	3 meses	3,6	=
Carter et al.	2012	EC/Suplementação ^a	67	8 semanas	2,7	=
Vernaglione et al.	2008	EC/Suplementação ^a	24	4 meses	2,0	↓
Cicero et al.	2010	EC/Suplementação ^a	111	12 meses	2,0	↓
Iketani et al.	2012	EC/Suplementação ^a	24	3 meses	1,8	↓
Micallef et al.	2009	EC/Suplementação ^a	15	3 semanas	1,4	=
Gulseth et al.	2010	EC/Suplementação ^a	486	12 semanas	1,2	=
Szabo et al.	2012	EC/Suplementação ^a	2501	5 anos	1,2	=
Murphy et al.	2007	EC/Dieta ^b	86	6 meses	1,0	=

* tempo médio de duração e dosagem média de suplementação.

^a estudo clínico baseado em suplementação com ômega-3.

^b estudo clínico baseado em dieta rica em alimentos fonte de ômega-3.

PA: pressão arterial; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica.

6.5 ARTIGO 5

IMPACT OF OMEGA-3, OMEGA-6 AND OMEGA-9 IN QUALI- AND QUANTITATIVE
LIPOPROTEIN PROFILE IN INDIVIDUALS WITH LOWER EPA AND DHA
PLASMATIC LEVELS

Caroline Pappiani¹

Stefan K Nilsson²

Antonio M Figueiredo Neto³

Nágila Raquel Teixeira Damasceno¹

¹University of Sao Paulo,
School of Public Health,
Department of Nutrition,
Sao Paulo, Brazil

²Umeå University,
Physiological Chemistry,
Department of Medical Biosciences,
Umeå, Sweden

³University of Sao Paulo,
Physics Institute,
Sao Paulo, Brazil

ABSTRACT

Introduction: Cardiovascular disease is the leading cause of mortality worldwide and despite being multifactorial, the high concentration of LDL-c and low HDL-c are modifiable risk factors most monitored in clinical practice, although are not able to explain all cardiovascular events. Therefore, investigate how nutritional and pharmacological interventions may modify the size of the lipoprotein can provide additional estimate on cardiovascular risk. **Objective:** To evaluate the impact of supplementation with omega-3, omega-6 and omega-9 on the size of LDL and HDL in adults. **Methods:** Clinical study, randomized, based on nutritional intervention (3.0 g/day of fatty acids) containing (37% EPA and 23% DHA) or omega-6 (65% acid linoleic acid) or omega-9 (oleic acid 72%). Individuals of both sexes, aged between 30 and 74 years old, with at least one of the following risk factors: hyperlipidemia, diabetes, obesity and hypertension were enrolled. At baseline individuals were characterized according demographic and clinical data. At baseline and after 8 weeks of intervention, blood samples were collected after 12 hours of fasting to analyze lipid profile (TC, LDL-c, HDL-c, TG), apolipoproteins (APO AI and B) and the size and percentage of LDL (7 subfractions and phenotype) and HDL (10 subfractions). The effect of time, intervention and associations between fatty acids and qualitative aspects of lipoproteins were tested (SPSS version 20.0, $p < 0.05$). **Results:** At baseline, the groups were similar for all biochemical variables. After 8 weeks of intervention, supplementation with omega-3 was associated with a significant reduction in TG compared with the groups. The omega-3 group showed an increase in the percentage of HDL_{LARGE} and reduced HDL_{SMALL}. Logistic regression models showed that individuals with a percentage of EPA and DHA above 8% were more likely to have HDL_{LARGE} and lower HDL_{SMALL}. In addition, it is also noted that a high percentage of oleic acid ($> p75$) was associated with less atherogenic LDL particles (phenotype A). The omega-6 was not associated with any lipoprotein subfraction. **Conclusion:** The results of this study confirm the hypotriglyceridemic effect of omega-3 and expands its cardioprotective functions showing the association with less atherogenic HDL qualitative aspects. The results also showed that omega-9 plays an important role in the quality of LDL, improving the less atherogenic subfractions. Therefore, these results show an unprecedented way in which omega-3 and omega-9 exert additional cardioprotective those functions already established in the literature.

Descriptors: omega-3; omega-6; omega-9; fatty acids; lipoprotein; cardiovascular risk.

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases (CVD) is the leading cause of death worldwide. According to World Health Organization¹, CVD accounted for 17 million deaths in 2008 and estimates for the year 2030 suggest that more than 23 million deaths will be relate to CVD, representing an increase of approximately 40%.

In addition to the essential role of cholesterol content associated with low density lipoprotein (LDL-c) in atherosclerotic process, it is widely recognized that reduced cholesterol content in high density lipoproteins (HDL-c) predisposes to atherosclerosis. Despite the unquestionable role of these lipoproteins in the development of atherosclerosis, the cholesterol content is not able to explain all cardiovascular events. Therefore, lipoprotein subfractions analysis could provide an additional estimate for the cardiovascular risk². So, monitoring the quali- quantitative aspects related to lipoproteins remains the focus of the pharmacological, dietary and behavioral strategies directed to prevent or control cardiovascular risk factors³.

Historically, the negative impact of cholesterol, saturated fatty acids (SAFA) and, more recently, trans fatty acids on CVD have been confirmed⁴. Inversely, some studies based on replace SAFA for polyunsaturated fatty acids (PUFA) showed reduction in fatal and non-fatal cardiovascular events for high-risk participants⁵. The most recognizable potent bioactive lipid mediators are arachidonic acid (AA, C20:4, w-6), eicosapentaenoic acid (EPA, C22:5, w-3) and docosahexaenoic acid (DHA, C20:6, w-3), synthesized from their dietary essential precursors linoleic (LA, C18:3, w-6) and alpha-linolenic (ALA, C18:3, w-3) FA, respectively⁶.

Particularly in relation to w-3, Calder⁷ showed that consumption of oil fish protects against CVD morbidity and mortality. Regarding several mechanisms (antiinflammatory, antithrombotic and hypocholesterolemic) able to explain the favorable associations between EPA and DHA and CVD risk, Harris and Von Schacky⁸ proposed the use of w-3 index (EPA + DHA content in membrane cells). According to the authors, the w-3 index may represent a physiologically relevant, modifiable and independent marker of risk for death from CVD in which values $\geq 8\%$ was associated to reduce CVD death.

Parallel the recognition of the w-3 benefits, there was a period of great enthusiasm for replacing dietary SAFA for w-6 with the primary goal to reduce CVD⁹. However, previous

studies showed that the w-6 essential FA leads to production of AA, which is the substrate for proinflammatory and prothrombotic eicosanoids¹⁰.

Regarding that, the balance between w-3 and w-6 FA is a critical step for their biological and cardiovascular actions. In the review of Simopoulos⁶, the high content of w-6 of typical Western diet (15-20/1) has been associated with increase CVD prevalence, mortality and morbidities. So, many proposals for a better ratio between these FA have been showed: 4/1¹¹, 2/1¹² and 1/1¹³.

However, the impact of fatty acids in CVD is not limited to w-3 and w-6, the omega-9, oleic acid (OA, C18:1, w-9), has been suggested to occupy a role in the metabolism of the essential FA and have been considered as potential disease mediators¹⁴. Some evidences show that the cardioprotective role of w-9 present in olive oil and nuts is related with the content of fibers, minerals, vitamins and bioactive compounds, in addition to the high content of monounsaturated fatty acid^{15,16}.

Together, these unsaturated FA may act individually, additively or synergistically as precursors and critical elements within different metabolic pathways, improving lipid metabolism and, consequently, contributing to a better cardiovascular profile¹⁷. So, it's plausible that the biological effect of these FA depends of the previous plasma and membrane FA status.

Based on this background, the aim of this study was to evaluate the effect of w-3, w-6 and w-9 FA supplementation on cardiovascular risk factors in adults with low plasma EPA and DHA levels.

METHODS

It is a randomized, parallel, non-control clinical study, based on a nutritional intervention with w-3 supplementation (37% of EPA and 23% of DHA) or w-6 (65% of LA) or w-9 (72% of OA). For this trial, 84 individuals (w-3 = 29, w-6 = 29, w-9 = 26), both sexes, between 30 and 74 years old were enrolled. Plasma EPA + DHA below 8% at baseline time were used to identify individuals with high cardiovascular risk, according to Harris and Von Schacky⁸.

Subjects were recruited from the University Hospital at the University of Sao Paulo (USP - Sao Paulo, Brazil). Pregnant and lactating women, individuals participating in other research protocols, patients with previous cardiovascular events (monitored by electrocardiogram and

clinical evaluation), illegal drug users and alcoholics were excluded. The study was approved by the Ethics Committee: School of Public Health #2264 and University Hospital #1126/11, University of Sao Paulo. All participants signed the free and informed consent.

The intervention protocol (capsules) were manufactured, packaged and randomized by Relthy Company (Indaiatuba, São Paulo, Brazil) in order to ensure that the study remained double-blinded throughout the intervention. Subjects were instructed to use 3 capsules per day distributed in 3 main meals (breakfast, lunch and dinner) during 8 weeks. A diary book was given to each individual to hold record of side effects, modifications in current medications used and reasons for non-use of supplementation. The level of adherence to the intervention was evaluated by the counting number of capsules that remaining at the end of the intervention and confirmed by plasma fatty acids analysis, according to Nimura and Kinoshita¹⁸ protocol. The quantification of fatty acids was performed using fluorescent probe 9-anthryldiazomethane (ADAM). The derivatized fatty acids were analyzed by HPLC using a C18 column Kinetix (50x3.0mm with 2.6 μ M particle size) and pre-column C18. For each samples run it was also ran a blank sample only containing the internal standard (heptadecanoic acid), a sample of pure ADAM and external standard sample (mixed separate fatty acids - EPA, DHA, arachidonic, palmitoleic, palmitic, linoleic, linolenic, stearic) to determine the retention time of the fatty acid in each run and carry out integration thereof according to this time.

The subjects had a clinical evaluation, in which blood pressure and temperature were measured. Anamnestic information about medications use, recent surgery, current diseases and family history of chronic diseases was collected. This evaluation was performed by field researchers with the collaboration of the University Hospital team, under the supervision of a specialized doctor.

Weight and height were measured with accuracy of 0.1 kg and 0.1 cm, respectively, with calibrated equipment and standardized methods. From these parameters, body mass index (BMI) was calculated (Kg/m^2). Using an inelastic tape, flexible and accurately 1.0 mm (TBW®, São Paulo, Brazil) waist circumference (WC) was measured. Body composition was assessed by bioelectrical impedance analysis (BIA) (Analyzer® model Quantum II, RJL Systems, Michigan, USA) and body fat (%) was estimated by Cyprus, version 2.5 (RJL Systems®, Detroit, USA), taking sex, age, weight, height, physical activity, resistance and reactance into consideration.

The habitual physical activity score was determined according to Baecke¹⁹, validated for Brazilian population by Florindo and Latorre²⁰.

Subjects were stratified according to Framingham Risk Score²¹ updated for calculate the absolute risk for coronary events in 10 years²².

Food intake was collected by two 24-hour recall administered by trained nutritionists using a standardized protocol based on the multiple pass method. Photographic records representing standard household measures were used during the interview to facilitate the estimation of portion size. Food intake was analyzed using the program Food Processor (ESHA Research, Oregon, USA) and the individual variability was refined through the Multiple Source Method program - MSM (version 1.0.1, 2011)²³.

After 12 hours of fasting, 20 ml of blood was collected in tubes containing EDTA (1.0 mg/ml). Plasma was obtained (3000 rpm, 15 min, 4°C) and protease inhibitors: aprotinin (10 ug/ml), benzamidine (10 mM), PMSF (5mM) and BHT antioxidant (100 mM) were added. Samples were aliquoted and stored at -80°C.

Plasma concentrations of TG, total cholesterol (TC) and HDL-c were analyzed using a semi-automatic Cobas® system (Labtest, Minas Gerais, Brazil). LDL cholesterol (LDL-c) was calculated using Friedwald's equation²⁴. Apolipoproteins AI and B (APOAI and APOB) were analyzed by standard method (Wako® Chemicals USA Inc., Richmond, VA, USA). Lipoprotein subfractions size were analyzed using Lipoprint system® (Quantimetrix, Redondo Beach, CA) and percentage of very low-density lipoprotein (VLDL) and intermediate low-density lipoprotein (IDL) were identified. For LDL, 7 subfractions were identified: from LDL1 and LDL2 particles were classified as large and from LDL3 to LDL7 as small. For HDL, 10 subfractions were identified: from HDL1 to HDL3 particles were classified as large, from HDL4 to HDL7 as intermediate and from HDL8 to HDL10 as small. Phenotype A and non-A were determined for LDL using cut-off point 25.5 nm. HDL ratio (HDL1+HDL2)/(HDL9+HDL10) was calculated from percentage of lipoprotein subfractions. Plasma glucose was analyzed using Glucose PAP Liquiform® kit (Labtest, Minas Gerais, Brazil). All analyzes were performed in duplicate and intra- and inter-coefficients of variation assays were below 10%.

STATISTICAL ANALYSIS

Chi-square test was used for qualitative variables and results are shown as absolute values and their respective percentage. For quantitative data, variable distribution was tested by Kolmogorov-Smirnov ($p > 0.05$).

For variables with normal distribution, data is presented as mean and standard deviation, and parametric tests were used. For non-normal distribution, non-parametric tests were used and values are presented as median (p50) and interquartile range (p25 and p75).

The logistic regression models were estimated to observe the association between plasma levels of unsaturated fatty acids with the size of lipoproteins. After test all criteria to include the variables: w-6, LDL-2, LDL_{LARGE} and LDL_{RATIO} did not fulfilled the requirements for modeling. The w-3 and w-9 variables were generated as a dichotomous data and subjects were classified according to their plasma percentage. In the dichotomous variable w-3 subjects were classified according to Harris and Von Schacky⁸, above or below 8% EPA+DHA. In the dichotomous variable w-9 (OA) subjects were classified according percentile above or below “p75”. The w-3 group fulfilled the premise with HDL particle size and w-9 group with LDL particle size. The variables HDL-1, HDL-2, HDL_{LARGE}, HDL_{RATIO}, HDL-9, HDL-10, HDL_{SMALL}, LDL-1, LDL_{SIZE}, LDL-3 and LDL_{SMALL} were stratified into percentiles in which individuals with values below “p75” were classified as “1” (reference) and above as “0”. The variable LDL_{PATTERN} “phenotype non-A” was classified as “1” (reference) and “phenotype A” as “0”. In the multivariate models, sex and age were used as a covariate adjustment, with a 95% confidence interval.

All analyses were performed with SPSS software version 20.0 and p -value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

The clinical, demographic and anthropometric data of the study subjects are summarized in **Table 1**. The mean age was 48 (9.7) years in the w-3 group, 52 (9.3) years in the w-6 group and 55 (10.1) years in the w-9 group. Ethnicity was predominantly white. The w-3 and w-6 group were equally distributed in sex but the w-9 group had a predominance of women. The groups showed significant differences only in the mean age at baseline. For the others parameters, the groups presented a similar profile.

At baseline, the groups were similar for all biochemistry variables. However, after 8 weeks of intervention, w-3 supplementation was associated with significant reduction in TG in comparison with w-6 and w-9 group (**Table 2**).

The distribution of HDL subfractions is shown in **Table 3**. At baseline, the groups presented similar data. In the w-3 group, HDL_{LARGE} subfraction was increased and this variation was associated with an increase in the HDL1 and HDL2 subfractions. Accordingly, there was a significant reduction in HDL_{SMALL} related to a significant change in the HDL8, HDL9 and HDL10 subfractions. All results are differences between the w-3 group with the other groups (w-6 and w-9). In relation to LDL, none of the subfractions did show significant difference between intervention groups (**Table 4**). The same results were found in relation to VLDL, IDL_{LARGE}, IDL_{INTERMEDIATE} and IDL_{SMALL} (data not shown).

The raw model confirmed the association between HDL particle size and plasma percentage of w-3 (OR= 6.238, p=0.014 for HDL_{LARGE}; OR=0.441, p=0.030 for HDL_{SMALL}). In adjusted models (for age and sex) the results remained significant and showed that the percentage of EPA + DHA above 8% increases the probability to have a higher percentage of HDL-1 (OR= 3.651, p= 0.024), HDL-2 (OR= 5.241, p= 0.028) and HDL_{LARGE} particles (OR= 6.153, p= 0.016). Furthermore, the results also showed that the percentage of EPA + DHA above 8% seems to be a protective factor for HDL small particles: HDL-9 (OR= 0.512, p= 0.049), HDL-10 (OR= 0.290, p= 0.002) and HDL_{SMALL} (OR= 0.403, p= 0.021). These results were confirmed by the ratio between large and small HDL particles (OR= 5.528, p= 0.023). Together, these models underlined that plasma EPA + DHA above 8% increased the probability to have a cardioprotective HDL subfractions distribution (**Table 5**).

Otherwise, the raw model for LDL confirmed the association between phenotype A (OR= 3.409, p= 0.002) with plasma w-9. After adjustment, OA was associated with higher probability to have less LDL small particles: LDL-3 (OR= 0.453, p= 0.047) and LDL_{SMALL} (OR= 0.404, p= 0.031). Moreover, the results also showed that OA above p75 increased the probability to have a higher percentage of LDL-1 (OR= 4.147, p= 0.043) and LDL_{SIZE} (OR= 5.100, p= 0.034), accepted as less atherogenic subfractions (**Table 6**).

DISCUSSION

This study confirms the hypotriglyceridemic effect of omega-3 with reductions in serum TG of 23.8%.

Elevated levels of circulating TG have been identified as an independent risk factor for developing CVD and w-3 have well-established TG lowering effects in hyperlipidemic individuals²⁵. The 2002 Institute of Medicine²⁵ report on Dietary Reference Intakes that “supplementation with fish oil, which is high in EPA and DHA, reduces TG concentrations, and LDL-c and HDL-c are either increased or unchanged”.

Wei and Jacobson²⁶ compared the efficacy of DHA to EPA and found that individuals who consumed either DHA or EPA experienced reductions in serum TG of 18.5 % and 32 %, respectively. The results of a systematic review by Eslick et al.²⁷ showed that 3.25 g/day of fish oil (1.9 g of EPA and 1.35 g of DHA) reduced serum TG by 14 %.

The results revealed that w-3 supplementation was related with a less atherogenic HDL qualitative aspect, because a higher w-3 plasmatic level was associated with an increase in the percentage of HDL_{LARGE} and reduced HDL_{SMALL}.

Dietary fats have been shown to influence lipoprotein concentrations. A cardioprotective effect of w-3 has been shown in epidemiologic studies and clinical trials²⁸. In addition to plasma lipoprotein concentrations, changes in the distribution of particles within each lipoprotein class in response to dietary intakes may be relevant to the development of CVD because the atherosclerotic process may be influenced by variations in the composition of these lipoproteins²⁹.

The inverse relationship between plasma levels of HDL-c and CVD has been extensively described³⁰. However, several lines of evidence have indicated that HDL functionality can be impaired under pathological conditions, suggesting that the assessment of HDL function might be more relevant than that of HDL-c plasma levels³¹. In CVD, variations in HDL subfraction levels and functions are frequently observed, suggesting that HDL_{LARGE} particles are inversely associated while HDL_{SMALL} particles are positively associated with CVD³².

According to Roos et al.³³ w-3 supplementation in healthy subjects promoted increase of HDL_{LARGE} particles, while the results described by Neff et al.³⁴ with overweight individuals and by Kelley et al.³⁵ in subjects with hypertriglyceridemia, showed that w-3 supplementation contributed to the increase of those subfractions. Erkkilä et al.³⁶, in a study based on the source of fish intake rich in w-3, also found positive effects on the size of HDL particles with patients with

coronary disease.

The study also showed that w-9 plays an important role in the quality of LDL, because a higher w-9 plasmatic level was associated with LDL_{PHENOTYPE A}, an increase in LDL_{SIZE} and reductions of LDL_{SMALL}.

Several studies suggested that the presence of small and dense LDL is associated with an increased risk of CVD. LDL size is dependent on both genetic and environmental factors such as dietary fat composition³⁷.

Previous studies showed that monounsaturated fatty acids intake slightly reduced³⁸ or did not affect³⁹ LDL size, when compared with saturated. In individuals with atherogenic LDL phenotype, characterized by a predominance of small and dense subfractions (phenotype non-A), lowering of plasma LDL-c levels represented a reduction in the numbers of circulating LDL_{SMALL}. In contrast, in the majority of healthy individuals with LDL_{LARGE} subfractions (phenotype A), a proportion of the reduction in plasma LDL-c was due to depletion of the cholesterol content of LDL subfractions and the shift from larger to smaller LDL diameters⁴⁰.

It has been proposed that the oleic acid may be responsible for the cardioprotective effect associated with olive oil consumption⁴¹. Olive oil is believed to exert its biological benefits mainly via constituent antioxidants. The major groups of compounds thought to contribute to its observed health benefits include phenolics and oleic acid, of which have been found to inhibit oxidative stress. These compounds are believed to act in the blood vessels to prevent LDL oxidation⁴².

CONCLUSION

The results confirmed the hypotriglyceridemia effect of w-3 and expands its cardioprotective functions showing an association with a better qualitative aspects of HDL. This study also showed that w-9 plays an important role in the quality of LDL, improving a less atherogenic subfraction. Therefore, these results showed an unprecedented way in which w-3 and w-9 fatty acids exert additional cardioprotective those functions already established in the literature.

REFERENCES

1. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. Mendis S, Puska P, Norrving B editors. **World Health Organization**, Geneva 2011.
2. Säemann MD, Poglitsch M, Kopecky C, Haidinger M, Hörl WH and Weichhart T. The versatility of HDL: a crucial anti-inflammatory regulator. **Eur J Clin Invest.** 2010; 40 (12): 1131–1143.
3. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. **Nat Med.** 2011; 17: 1410-1422.
4. Eckel RH, Jakicic JM, Ard, JD, Hubbard VS, de Jesus JM, Lee IM, Lichtenstein AH, Loria CM, Millen BE, Houston Miller N, Nonas CA, Sacks FM, Smith SC Jr, Svetkey LP, Wadden TW, Yanovski SZ. 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology American/Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **Circulation.** 2013;00:000–000.
5. Ebbesson SOE, Voruganti VS, Higgins PB, Fabsitz RR, Ebbesson LO, Laston S, Harris WS et al. Fatty acids linked to cardiovascular mortality are associated with risk factors. **Int J Circumpolar Health.** 2015 Aug 12;74:28055. doi: 10.3402/ijch.v74.28055.
6. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Exp Biol Med** (Maywood). 2008; 233:674–688.
7. Calder, PC. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: Evidence explained and mechanisms explored. **Clin. Sci.** 2004, 107, 1–11.
8. Harris WS, Von Schacky C. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? **Prev Med.** 2004;39:212–220.
9. DiNicolantonio JJ. The cardiometabolic consequences of replacing saturated fats with carbohydrates or w-6 polyunsaturated fats: Do the dietary guidelines have it wrong? **Open Heart.** 2014;1:e000032.
10. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale. **Biochimie.** 2009; 91:791–795.
11. Zampelas A, Paschos G, Rallidis L, Yiannakouris N. Linoleic acid to alpha-linolenic acid ratio. From clinical trials to inflammatory markers of coronary artery disease. **World Rev Nutr Diet.** 2003; 92:92–108.
12. GISSI-Prevenzione Investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. **Lancet.** 1999; 354:447–455.

13. Liou YA, King J, Zibrik D, Innis SM. Decreasing linoleic acid with constant α -linolenic acid in dietary fats increases (n-3) eicosapentaenoic acid in plasma phospholipids in healthy men. **J Nutr.** 2007; 137:945–95.
14. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet - PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea) Study Investigators. **N Engl J Med** February 25, 2013. doi: 10.1056/NEJMoa1200303.
15. Ros E: Health benefits of nut consumption. **Nutrients.** 2010, 2:652–682.
16. Salas-Salvado J, Fernandez-Ballart J, Ros E, Martinez-Gonzalez MA, Fito M, Estruch R, et al. PREDIMED Study Investigators: effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. **Arch Intern Med.** 2008, 168:2449–2458.
17. Johnson M, Bradford C. Omega-3, Omega-6 and Omega-9 Fatty Acids: Implications for Cardiovascular and Other Diseases. **J Glycomics Lipidomics.** 2014; 4: 123.
18. Nimura N, Kinoshita T. Fluorescent labeling of fatty acids with 9-anthryldiazomethane (ADAM) for high performance liquid chromatography. **Analytical Letters.** 1980;13(3):191-202.
19. Baecke JA, Burema J, Frijters JE. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. **Am J Clin Nutr.** 1982;36:936-42.
20. Florindo AA, Latorre MRDO. Validação e Reprodutibilidade do Questionário de Baecke de avaliação da atividade física habitual em homens adultos. **Rev Bras Med Esporte.** 2003; 9:121-8.
21. D’agostino RB, Vasan RS, et al., General cardiovascular risk profile for use in primary care: The Framingham Heart Study. **Circulation.** 2008;.117:743-753.
22. Mosca L, Benjamin EJ. Effectiveness-Based Guidelines for the Prevention of Cardiovascular Disease in Women 2011 Update: A Guideline From the American Heart Association. **Circulation.** 2011; 123 (11):1243-1262.
23. The Multiple Source Method (MSM). Version 1.0.1. Potsdam: Department of Epidemiology of the German Institute of Human Nutrition; 2008-2011. Disponível em <http://msm.dife.de/>.
24. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem.** 1972; 18:499-502.
25. Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. **J Am Diet Assoc.** 2002;102:1621–30.

26. Wei MY, Jacobson TA. Effects of eicosapentaenoic acid versus docosahexaenoic acid on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. **Curr Atheroscler Rep.** 2011;13:474–83.
27. Eslick GD, Howe PR, Smith C, Priest R, Bensoussan A. Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. **Int J Cardiol.** 2009;136:4–16.
28. Wang C, Harris WS, Chung M, Lichtenstein AH, Balk EM, Kupelnick B et al. n–3. Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary- prevention studies: a systematic review. **Am J Clin Nutr.** 2006;84:5–17.
29. El Harchaoui K, van der Steeg WA, Stroes ES, Kuivenhoven JA, Otvos JD, Wareham NJ et al. Value of low-density lipoprotein particle number and size as predictors of coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. **J Am Coll Cardiol.** 2007;49:547–53.
30. Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grundy SM et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. **N Engl J Med.** 2007;357:1301-1310.
31. Smith JD: Dysfunctional HDL as a diagnostic and therapeutic target. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2010;30:151-155.
32. Camont L, Chapman MJ, Kontush A: Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. **Trends Mol Med.** 2011;17:594-603.
33. de Roos B, Geelen A, Ross K, Rucklidge G, Reid M, Duncan G, et al. Identification of potential serum biomarkers of inflammation and lipid modulation that are altered by fish oil supplementation in healthy volunteers. **Proteomics.** 2008;8(10):1965-74.
34. Neff LM, Culiner J, Cunningham-Rundles S, Seidman C, Meehan D, Maturi J, et al. Algal docosahexaenoic acid affects plasma lipoprotein particle size distribution in overweight and obese adults. **J Nutr.** 2011;141(2):207-13.
35. Kelley DS, Siegel D, Vemuri M, Mackey BE. Docosahexaenoic acid supplementation improves fasting and postprandial lipid profiles in hypertriglyceridemic men. **Am J Clin Nutr.** 2007;86(2):324-33.
36. Erkkilä AT, Schwab US, Lehto S, de Mello VD, Kangas AJ, Soininen P, et al. Effect of fatty and lean fish intake on lipoprotein subclasses in subjects with coronary heart disease: a controlled trial. **J Clin Lipidol.** 2014;8(1):126-33.
37. Tabas I, Williams KJ, Borén J: Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. **Circulation.** 2007, 116:1832-44.

38. Kratz, M, Gulbahce, E, von Eckardstein, A, Cullen, P, Cignarella, A, Assmann, G, Wahrburg, U. Dietary mono- and polyunsaturated fatty acids similarly affect LDL size in healthy men and women. **J. Nutr.** 2002; 132: 715–718.
39. Rivellese, AA, Maffettone, A, Vessby, B, Uusitupa, M, Hermansen, K, Berglund, L et al. Effects of dietary saturated, monounsaturated and n-3 fatty acids on fasting lipoproteins, LDL size and post-prandial lipid metabolism in healthy subjects. **Atherosclerosis.** 2003, 167: 149–158.
40. Moreno JA, Pérez-Jiménez F, Marín C, Gómez P, Pérez-Martínez P, Moreno R et al. The Effect of Dietary Fat on LDL Size Is Influenced by Apolipoprotein E Genotype in Healthy Subjects. **J. Nutr.** 2004, 134(10): 2517-2522.
41. Samieri C, Féart C, Proust-Lima C, Peuchant E, Tzourio C, et al. Olive oil consumption, plasma oleic acid, and stroke incidence: the Three-City Study. **Neurology.** 2011; 77: 418-425.
42. Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. **Altern Med Ver.** 2007; 12: 331-342.

Table 1. Demographic, clinical and anthropometric characteristics of subjects.

Variables*	w-3 (n=29)	w-6 (n=29)	w-9 (n=26)	p
Age (years)	48 (9.7)	52 (9.3)	55 (10.1)	0.036
Sex (%)				
Men	14 (48)	13 (45)	8 (31)	0.385
Women	15 (52)	16 (55)	18 (69)	
Race (%)				
White	22 (76)	20 (69)	19 (73)	0.505
Black	3 (10)	5 (17)	1 (4)	
Others	4 (14)	4 (14)	6 (23)	
BMI (kg/m²)	30.8 (6.1)	32.2 (5.6)	31.6 (6.2)	0.650
WC (cm)	102 (11.8)	104 (12.6)	102 (14.9)	0.715
Body Fat (%)	34.4 (13.3)	35.7 (12.2)	38.3 (10.2)	0.512
SBP (mmHg)	133.7 (17.0)	133.6 (20.1)	131.6 (13.7)	0.884
DBP (mmHg)	82.1 (11.0)	81.7 (10.3)	80.1 (9.9)	0.766
Smoker (%)	10 (34.5)	4 (14)	6 (23)	0.455
Current drugs (%)				
Statins	2 (7)	5 (17)	8 (31)	0.168
Antihypertensive	13 (45)	16 (55)	11 (42)	0.220
Hypoglycaemic	4 (14)	6 (21)	8 (31)	0.585
Current diseases (%)				
Dyslipidemia	12 (41)	15 (52)	15 (58)	0.470
Hypertension	14 (48)	19 (65)	16 (61)	0.380
Diabetes mellitus	4 (14)	6 (21)	8 (31)	0.284
Familial history of chronic diseases (%)	25 (86)	27 (93)	25 (96)	0.388
Framingham risk score (%)				
Low	9 (31)	5 (17)	2 (8)	0.243
Intermediate	8 (28)	12 (41.5)	10 (38)	
High	12 (41)	12 (41.5)	14 (54)	
Physical activity	6.7 (1.4)	7.4 (1.4)	7.0 (1.5)	0.201
Energy intake (kcal)	1801 (604)	1611 (343)	1684 (445)	0.317

*Data presented as mean and standard deviation for quantitative variables and absolute value (n) and frequency (%) for qualitative variables. A comparative analysis for continuous variables was performed by ANOVA and for categorical variables by Chi-Square ($p < 0.05$). BMI: body mass index; WC: waist circumference; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure.

Table 2. Biochemical characteristics of subjects.

Variables	w-3 (n=29)		w-6 (n=29)		w-9 (n=26)		p*	p**
	T0	T8	T0	T8	T0	T8		
TC (mg/dL)	206 (28)	183 (34)	204 (41)	192 (55)	212 (38)	208 (42)	0.668	0.130
LDL-c(mg/dL)	141 (30)	122 (32)	137 (36)	126 (48)	138 (28)	131 (37)	0.905	0.749
HDL-c (mg/dL)	35 (9)	38 (9)	35 (12)	40 (13)	35 (9)	42 (13)	0.895	0.422
non-HDL-c (mg/dL)	170 (26)	145 (32)	169 (41)	150 (54)	178 (38)	163 (45)	0.601	0.330
NEFA (mg/dL)	0.7 (0.4)	0.6 (0.3)	0.6 (0.3)	0.6 (0.3)	0.7 (0.2)	0.6 (0.2)	0.252	0.899
APO AI (mg/dL)	128 (25)	127 (24)	123 (30)	132 (25)	137 (22)	139 (28)	0.182	0.266
APO B (mg/dL)	104 (17)	104 (23)	102 (24)	108 (27)	111 (24)	112 (31)	0.317	0.538
APO AI/APO B	0.8 (0.15)	0.8 (0.19)	0.9 (0.4)	0.8 (0.2)	0.8 (0.2)	0.8 (0.2)	0.574	0.997
HDL-c/APO AI	0.28 (0.24-0.30)	0.31 (0.27-0.33)	0.27 (0.24-0.32)	0.31 (0.28-0.33)	0.25 (0.22-0.29)	0.30 (0.24-0.35)	0.137	0.728
LDL-c/APO B	1.33 (1.17-1.57)	1.14 (0.94-1.33)	1.34 (1.18-1.53)	1.13 (0.94-1.36)	1.31 (1.17-1.41)	1.16 (0.96-1.28)	0.544	0.925
PON1 (nmol.min- l.ml-1)	55 (23-74)	55 (21-70)	53 (26-82)	55 (23-82)	61 (24-83)	57 (22-90)	0.777	0.572
TG (mg/dL)	122 (100-181)	93 (77-125)	138 (90-178)	100 (80-150)	157 (104-260)	149 (103-217)	0.329	0.017
TG/HDL-c	3 (3-6)	2 (2-4)	4 (3-6)	3 (2-4)	5 (3-8)	4 (2-5)	0.396	0.333
CT/HDL-c	6 (5-7)	5 (4-6)	5 (5-8)	5 (4-5)	6 (5-8)	5 (4-6)	0.646	0.282
LDL-c/HDL-c	4 (3-5)	3 (3-4)	3 (3-5)	3 (2-4)	4 (3-5)	3 (3-4)	0.788	0.501
Glucose (mg/dL)	96 (91-100)	95 (89-103)	97 (92-112)	96 (90-106)	100 (92-108)	96 (88-114)	0.384	0.731
Insulin (µIU/mL)	18 (13-26)	18 (13-23)	16 (13-21)	16 (13-22)	16 (12-24)	16 (11-25)	0.436	0.718
HOMA-IR	4.6 (3.2-6.2)	3.8 (3.4-5.7)	4.3 (2.8-5.9)	3.9 (2.9-6.5)	4.1 (2.9-6.3)	4.1 (2.9-6.8)	0.887	0.940
LDL(-) (U/L)	5.2 (3.4-11.2)	3.8 (2.6-8.0)	3.1 (1.8-15.9)	2.8 (1.1-11.5)	3.3 (1.1-12.3)	2.9 (1.2-8.4)	0.325	0.495
anti LDL(-) (mg/mL)	7.5 (3.6-10.9)	6.7 (3.8-11.7)	6.1 (4.7-11.3)	6.8 (3.7-10.2)	9.5 (5.3-12.1)	10.2 (4.5-12.1)	0.568	0.278

Data presented as mean (standard deviation) or median (p25-p75). A comparative analysis was performed by ANOVA or Kruskal Wallis test ($p < 0.05$). TC: total cholesterol; LDL-c: cholesterol fraction in low density lipoprotein; HDL-c: cholesterol fraction in high density lipoprotein; non-HDL-c: cholesterol fraction non HDL-c; APOAI: apolipoprotein AI; APOB: apolipoprotein B; HDL-c/APOAI: HDL-c and APOAI ratio; LDL-c/APOB: LDL-c and APOB ratio; APOAI/APOB: apolipoproteins ratio; NEFA: non-esterified fatty

acids; PON1: paraoxonase-1 activity; TG: triacylglycerol; TG/HDL-c: TG and HDL-c ratio; CT/HDL-c: TC and HDL-c ratio; LDL-c/HDL-c: LDL-c and HDL-c ratio; LDL (-): electronegative LDL; anti LDL(-): antibody anti electronegative LDL.

*difference tested at baseline (T0) (w-3 *versus* w-6 *versus* w-9).

**difference tested after intervention (T8) (w-3 *versus* w-6 *versus* w-9).

Table 3. HDL subfractions of subjects.

Variables (%)	w-3 (n=29)		w-6 (n=29)		w-9 (n=26)		p*	p**
	T0	T8	T0	T8	T0	T8		
HDL-1	10.7 (3.9)	11.7 (3.0)	10.9 (3.7)	8.7 (3.2) ^a	8.8 (2.9)	8.6 (2.4) ^b	0.069	<0.001
HDL-2	11.9 (4.2)	13.7 (5.0)	11.2 (4.2)	10.4 (3.3) ^a	10.9 (3.6)	10.5 (4.0) ^b	0.604	0.006
HDL-3	6.9 (2.0)	7.6 (2.2)	6.9 (2.3)	6.5 (2.3)	6.6 (1.7)	6.6 (2.1)	0.874	0.112
HDL-4	9.4 (1.8)	9.7 (1.2)	8.9 (1.6)	8.5 (1.6) ^a	9.1 (1.4)	9.1 (1.8)	0.524	0.020
HDL-5	11.3 (1.5)	11.5 (1.3)	10.9 (1.5)	10.5 (1.3) ^a	11.5 (1.4)	11.4 (0.9)	0.317	0.006
HDL-6	22.2 (2.6)	21.3 (3.4)	21.7 (2.8)	22.1 (2.7)	23.1 (2.2)	22.8 (2.1)	0.135	0.139
HDL-7	7.8 (1.5)	7.2 (1.6)	7.7 (1.6)	8.4 (1.3) ^a	8.2 (1.0)	8.5 (1.2) ^b	0.333	0.001
HDL-8	7.6 (1.8)	6.9 (2.2)	7.3 (2.0)	8.4 (1.6) ^a	8.4 (1.6)	8.5 (1.8) ^b	0.105	0.002
HDL-9	6.1 (2.1)	5.6 (1.6)	6.5 (1.6)	7.0 (1.5) ^a	6.5 (1.8)	6.6 (1.7)	0.712	0.004
HDL-10	5.9 (3.9)	4.7 (2.8)	7.8 (4.5)	9.3 (4.5) ^a	6.8 (3.4)	7.5 (3.8) ^b	0.214	<0.001
HDL_{LARGE}	29.5 (7.6)	33.0 (9.4)	29.0 (9.0)	25.6 (7.4) ^a	26.3 (7.1)	24.0 (8.2) ^b	0.284	<0.001
HDL_{INTERMEDIATE}	50.7 (3.7)	49.7 (5.4)	49.3 (3.8)	49.5 (3.5)	51.9 (3.8)	51.6 (3.4)	0.054	0.149
HDL_{SMALL}	19.7 (6.8)	17.2 (5.5)	21.6 (7.6)	24.8 (6.8) ^a	21.7 (5.9)	24.2 (7.9) ^b	0.470	<0.001
HDL_{RATIO}	1.9 (1.3-3.1)	2.3 (1.5-4.2)	1.6 (0.8-2.9)	1.1 (0.8-1.7) ^a	1.4 (0.9-2.2)	1.6 (0.7-2.1) ^b	0.372	<0.001

Data presented as mean (standard deviation) or median (p25-p75). A comparative analysis was performed by ANOVA or Kruskal Wallis test ($p < 0.05$). HDL_{RATIO}: (HDL1 + HDL2) / (HDL9 + HDL10). HDL_{LARGE}: HDL large particles (1 to 3); HDL_{INTERMEDIATE}: HDL intermediate particles (4 to 7); HDL_{SMALL}: HDL small particles (8 to 10).

*difference tested at baseline (T0) (w-3 versus w-6 versus w-9).

**difference tested after intervention (T8) (w-3 versus w-6 versus w-9).

^adifference between w-3 and w-6. ^bdifference between w-3 and w-9. (Post Hoc Multiple Comparisons – Tukey).

Table 4. LDL subfractions of subjects.

Variables (%)	w-3 (n=29)		w-6 (n=29)		w-9 (n=26)		p*	p**
	T0	T8	T0	T8	T0	T8		
LDL-1	17.1 (3.7)	18.2 (4.9)	16.9 (4.6)	18.4 (4.3)	15.2 (5.2)	15.7 (4.0)	0.258	0.058
LDL-2	10.7 (6.4-12.7)	12.7 (8.4-15.8)	9.2 (6.6-12.6)	11.1 (7.4-13.2)	10.9 (8.8-13.7)	12.8 (9.4-14.4)	0.364	0.276
LDL-3	1.4 (0.8-3.4)	2.4 (0.9-5.7)	1.4 (0.6-3.0)	1.4 (0.0-3.2)	2.1 (0.9-7.2)	2.8 (0.9-5.3)	0.249	0.197
LDL-4	-	-	-	-	-	-	-	-
LDL-5	-	-	-	-	-	-	-	-
LDL-6	-	-	-	-	-	-	-	-
LDL-7	-	-	-	-	-	-	-	-
LDL_{LARGE}	26.9 (5.2)	30.2 (4.1)	26.5 (6.0)	28.9 (6.1)	26.2 (5.7)	27.6 (3.8)	0.884	0.137
LDL_{SMALL}	1.4 (0.8-3.6)	2.4 (0.9-6.5)	1.4 (0.6-3.2)	1.4 (0.0-3.2)	2.1 (0.9-8.8)	3.0 (0.9-6.6)	0.274	0.218
LDL_{RATIO}	19.2 (12.4)	14.8 (12.6)	21.5 (17.2)	17.3 (11.7)	14.0 (14.0)	12.0 (11.9)	0.208	0.368
LDL_{SIZE} (nm)	27.0 (26.7-27.2)	26.9 (26.4-27.2)	27.1 (26.7-27.2)	27.0 (26.7-27.2)	26.9 (26.2-27.1)	26.7 (26.4-27.0)	0.126	0.175

Data presented as mean (standard deviation) or median (p25-p75). A comparative analysis was performed by ANOVA or Kruskal Wallis test ($p < 0.05$). LDL_{LARGE}: LDL large particles (1 to 2); LDL_{SMALL}: LDL small particles (3 to 7). LDL_{RATIO}: LDL_{LARGE} and LDL_{SMALL} ratio.

- Lipoprint System® (the values are not presented because the detection of subfractions were close to zero).

*difference tested at baseline (T0) (w-3 versus w-6 versus w-9).

**difference tested after intervention (T8) (w-3 versus w-6 versus w-9).

Table 5. Logistic regression models according to plasma percentage of w-3 (EPA + DHA > 8%).

Dichotomous variables	Raw data		Model A		Model B	
	OR	p	OR	p	OR	p
%HDL-1						
< p75	1.000		1.000		1.000	
> p75	3.164	0.039	3.255	0.035	3.651	0.024
%HDL-2						
< p75	1.000		1.000		1.000	
> p75	5.624	0.021	5.590	0.021	5.241	0.028
%HDL_{LARGE}						
< p75	1.000		1.000		1.000	
> p75	6.238	0.014	6.232	0.014	6.153	0.016
HDL_{RATIO}						
< p75	1.000		1.000		1.000	
> p75	5.624	0.021	5.672	0.020	5.528	0.023
%HDL-9						
< p75	1.000		1.000		1.000	
> p75	0.476	0.046	0.470	0.043	0.512	0.049
%HDL-10						
< p75	1.000		1.000		1.000	
> p75	0.293	0.001	0.296	0.002	0.290	0.002
%HDL_{SMALL}						
< p75	1.000		1.000		1.000	
> p75	0.441	0.030	0.441	0.030	0.403	0.021

OR: Odds Ratio.

Model A: adjusted for age.

Model B: adjusted for age and sex.

Table 6. Logistic regression models according to plasma percentage of w-9 (oleic acid > p75).

Dichotomous variables	Raw data		Model A		Model B	
	OR	p	OR	p	OR	p
%LDL-1						
< p75	1.000		1.000		1.000	
> p75	5.095	0.030	5.188	0.028	4.147	0.043
LDL_{SIZE}						
< p75	1.000		1.000		1.000	
> p75	5.355	0.025	5.779	0.020	5.100	0.034
LDL_{PATTERN}						
phenotype non-A	1.000		1.000		1.000	
phenotype A	3.409	0.002	3.591	0.002	3.185	0.007
%LDL-3						
< p75	1.000		1.000		1.000	
> p75	0.385	0.013	0.376	0.013	0.453	0.047
%LDL_{SMALL}						
< p75	1.000		1.000		1.000	
> p75	0.357	0.008	0.349	0.008	0.404	0.031

OR: Odds Ratio.

Model A: adjusted for age.

Model B: adjusted for age and sex.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ácidos graxos poli-insaturados plasmáticos se correlacionam com parâmetros cardiometabólicos, reforçando a importância dos biomarcadores de consumo na avaliação da relação entre dieta e DCV. Este resultado torna-se relevante uma vez que, não somente o ômega-3, como também o ômega-6, apresentou associação positiva com HDL-c, HDL_{GRANDE} e tamanho de LDL e negativa com TG e HDL_{PEQUENA}.

No entanto, em indivíduos tabagistas, a suplementação com ômega-3 se mostrou mais efetiva do que o ômega-6, modificando positivamente o perfil lipídico e a distribuição das subfrações de HDL, promovendo o aumento das partículas grandes e redução das partículas pequenas, reconhecidas como mais aterogênicas.

Quando avaliou-se o efeito do ômega-3 na presença ou não do tabagismo, observou-se que os benefícios no perfil lipídico clássico foram relevantes nos indivíduos tabagistas. Entretanto, o aumento das partículas grandes de HDL e redução das pequenas, induzido pelo ômega-3, foi significativo nos indivíduos não tabagistas.

Por outro lado, os resultados deste estudo confirmam o efeito hipotriglicidêmico do ômega-3 e expande suas funções cardioprotetoras ao mostrar associação com aspectos cardioprotetores da HDL nos indivíduos com menor conteúdo plasmático basal de EPA e DHA. Além disso, os resultados mostram também que o ômega-9 desempenha papel importante nas subfrações da LDL. Isso porque elevado percentual plasmático de ômega-9 apresentou associação com o fenótipo A de LDL, relacionado às partículas grandes e menos densas.

Portanto, estes resultados mostram que os ácidos graxos insaturados, principalmente o ômega-3 e ômega-9, exercem funções adicionais aquelas bem estabelecida na literatura; estimulando a geração de partículas de HDL com perfil cardioprotetor e de LDL menos aterogênicas.

8. REFERÊNCIAS (Introdução e Material e Métodos)

ALONSO, A.; RUIZ-GUTIERREZ, V.; MARTÍNEZ-GONZÁLES, M.A. Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: epidemiological, clinical and experimental evidence. **Public Health Nutr**, v.9, n. 2, p. 251-7, 2006.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. AHA Scientific Statement. Dietary guidelines. Revision 2000. A statement for health care professionals from the nutrition committee of the American Heart Association. **Circulation**. v.102, p.2284-99, 2000.

ASZTALOS, B. F.; DEMISSIE, S.; CUPPLES, L. A.; COLLINS, D.; COX, C. E.; HORVATH, K. V. et al. LpA-I, LpA-I:A-II HDL and CHD-risk: the framingham offspring study and the veterans affairs HDL intervention trial. **Atherosclerosis**;188:59–67, 2006.

AUSTIN, M. A.; BRESLOW, J. L.; HENNEKENS, C. H.; BURING, J. E.; WILLETT, W. C.; KRAUSS, R. M. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. **J. Am. Med. Assoc**; 260: 1917–1921, 1988.

AVOGARO P, CAZZOLATO G, BITTOLO-BON G. Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma. **Atherosclerosis**;91:163–71, 1991.

BAECKE, J. A.; BUREMA, J.; FRIJTERS, J. E. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. **Am J Clin Nutr**;36:936-42, 1982.

BERNEIS, K. K; KRAUSS, R. M. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. **J Lipid Res**;43:1363–1379, 2002.

BLAHA, M. J.; BLUMENTHAL, R. S.; BRINTON, E. A.; JACOBSON, T. A. The importance of non-HDL cholesterol reporting in lipid management. **Journal of Clinical Lipidology**; 2(4):267-273, 2008.

BLIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**;37(8):911-7, 1959.

BRASIL. Resolução nº 292 de 08 de julho de 1999. Regulamenta as pesquisas coordenadas do exterior ou com participação estrangeira e pesquisas que envolvam remessa de material biológico para o exterior. **Brasília, CNS: 1999.**

BURR, M. L. et al. Effects of changes in fat and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). **Lancet**; 2(8666):757-818, 1989.

CALDER, P. C. N-3 fatty acids and mononuclear phagocyte function. In: Medical fatty acids in inflammation. p. 1-27. JM Kramer, editor. Basel: Birkhauser Verlag; 1998.

CHAN, E.J.; CHO, L. What can we expect from Omega-3 fatty acid? **Cleveland clinic Journal of Medicine**, v.76, n.4, p. 245-251, 2009.

CHUNG, M.; LICHTENSTEIN, A. H.; IP, S. et al. Comparability of methods for LDL subfraction determination: A systematic review. **Atherosclerosis**, 205:342-348, 2009.

CICERO, A.F.G. et al. Changes in LDL fatty acid composition as a response to olive oil treatment are inversely related to lipid oxidative damage: the EUROLIVE study. **J Am College Nutr**, v. 27, n. 2, p. 314-20, 2008.

COLLINS, R.; PETO, R.; GRAY, R.; PARISH, S. **Large-scale randomized evidence: trials and overviews**. In: Weatherall DJ, Ledingham JGG, Warrell DA, editors. Oxford Textbook of Medicine. 3rd edition. Oxford: Oxford University Press; 1996: 21-32.

DAMSGAARD, C. T. et al. Fish Oil in Combination with High or Low Intakes of Linoleic Acid Lowers Plasma Triacylglycerols but Does Not Affect Other Cardiovascular Risk Markers in Healthy Men. **The Journal of Nutrition – Nutrition and Disease**. 138: 1061-1066, 2008.

D'AGOSTINO R.B.; VASAN R.S.; et al., General cardiovascular risk profile for use in primary care: The Framingham Heart Study. **Circulation**, v.117, p. 743-753, 2008.

DEEG, M.A. et al. Primary care physician treatment of low HDL: Rational approach or Pandora's box? **Journal of Clinical Lipidology**, v. 1, n. 3, p. 198-202, 2007.

DIFFENDERFER, M. R.; SCHAEFER, E. J. The composition and metabolism of large and small LDL. **Curr Opin Lipidol**. 2014.

DIN, J. N.; NEWBY, D. E.; FLAPAN, A. D. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease – fishing for a natural treatment. **BMJ**, v.328, n.3, p. 30-35, 2004.

EBRAHIMI, M.; GHAYOUR-MOBARHAN, M.; REZAEIAN, S.; HOSEINI, M.; PARIZADE, S.M.; FARHOUDI, F.; et al. Omega-3 fatty acid supplements improve the cardiovascular risk profile of subjects with metabolic syndrome, including markers of inflammation and auto-immunity. **Acta Cardiol**, v. 64, n. 3, p. 321–327, 2009.

ERKKILÄ, A. T. et al. Effect of fatty and lean fish intake on lipoprotein subclasses in subjects with coronary heart disease: a controlled trial. **J Clin Lipidol**, 8(1):126-33, 2014.

ESLICK, G. D.; HOWE, P. R.; SMITH, C.; PRIEST, R.; BENSOUSSAN, A. Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. **Int J Cardiol**;136:4–16, 2009.

ESTRUCH, R. et al. for the PREDIMED Study Investigators. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. **Ann Intern Med**, v. 145, n. 1, p. 1-11, 2006.

FAGUNDES, L. A. **Ômega-3 e Ômega-6: o equilíbrio dos ácidos gordurosos essenciais na prevenção de doenças**. Porto Alegre: Fundação de Radioterapia do Rio Grande do Sul, p. 111, 2002.

FAO **Fats and oils in human nutrition**, paper n.57, 1994.

FAO/WHO. **Fats and fatty acids in human nutrition**. Report of an expert consultation. Food and Nutrition Paper 91. Rome: FAO; 2010.

FAUCI, A. S.; KASPER, D. L.; LONGO, D. L.; BRAUNWALD, E.; HAUSER, S. L.; JAMESON, J. L.; LOSCALZO, J. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 17th edition - 2008.

FITÓ, M. et al. for the PREDIMED Study Investigators. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized, controlled trial. **Arch Intern Med**, v. 167, p.1195–203, 2007.

FLORINDO, A.A; LATORRE, M.R.D.O. Validação e Reprodutibilidade do Questionário de Baecke de avaliação da atividade física habitual em homens adultos. **Rev Bras Med Esporte**. v.9, p.121-8, 2003.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, p. 499-502, 1972.

GETZ, G. S. Immune function in atherogenesis. **Journal of Lipid Research**; v. 46, 2005.

GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M. S. Binding and degradation of low density lipoprotein by cultured human fibroblasts. **J. Biol. Chem**; 249, pp. 5154–5162, 1974.

GRANT, R.W.; MEIGS, J.B. Prevalence and treatment of low HDL cholesterol among primary care patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, n. 3, p. 479-84, 2007.

GRUNDT, H.; NILSEN, D. W. T. N-3 fatty acids and cardiovascular disease. **Haematologica**, v. 93, n. 6, p. 807-812, 2008.

GUENTHER, P. M. et al. Questionnaire design and data collection procedures. In: **Design and Operation: The Continuing Survey of Food Intakes by Individuals and the Diet and Health Knowledge Survey**, chapter 4, p. 42-63, U.S.: 1994-1996.

HARIKA, R. K.; EILANDER, A.; ALSSEMA, M.; OSENDARP, S. J.; ZOCK, P. L. Intake of fatty acids in general populations worldwide does not meet dietary recommendations to prevent coronary heart disease: a systematic review of data from 40 countries. **Ann Nutr Metab**; 63:229-38, 2013.

HARRIS, W. S.; POSTON, W. C.; HADDOCK, C. K. Tissue n-3 and n-6 fatty acids and risk for coronary heart disease events.. **Atherosclerosis**;193(1):1-10, 2007.

HERNÁNDEZ-MORANTE, J. J.; LARQUÉ, E.; LUJÁN, J. A.; ZAMORA, S.; GARAULET, M. N-6 From Different Sources Protect From Metabolic Alterations to Obese Patients: A Factor Analysis. **Obesity** (17), 452–459, 2008.

HIRAYAMA, A.; SAITO, S.; UEDA, Y.; TAKAYAMA, T.; HONYE, J.; KOMATSU, S. et al. Qualitative and quantitative changes in coronary plaque associated with atorvastatin therapy. **Circ J**;73(4):718-25, 2009.

HOKANSON, J. E.; AUSTIN, M. A. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. **J Cardiovasc Risk**;3(2):213-9, 1996.

HOOVER, L. et al. Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review. **BMJ**, (published 24 march 2006).

HULLEY, S. B. et al. **Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica**. Capítulo 6. Pg. 83 a 104. 2ª. ed. Porto Alegre. Artmed. 2003.

INEU, M.L. et al. HDL management: Recent advances and perspectives beyond LDL reduction. **Arq Bras Cardiol**, v. 87, n. 6, p. 718-24, 2006.

JAMES, M. J.; GIBSON, R. A.; CLELAND, L. G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. **Am J Clin Nutr**. v.71(S), p.343-8, 2000.

JENKINS, D.J. et al. Almonds reduce biomarkers of lipid peroxidation in older hyperlipidemic subjects. **J Nutr**, v. 138, p. 908-13, 2008.

JIANG, R. et al. Nut and seed consumption and inflammatory markers in the multi-ethnic study of atherosclerosis. **Am J Epidemiol**, v. 163, n. 3, p. 222 -31, 2006.

JOHNSON, R. K. et al. Comparison of multiple-apss 24-hour recall estimates of energy intake with total energy expenditure determined by doubly labeled water method in young children. **J Am Diet Assoc**, v. 96, p. 1140-1144, 1996.

JOHNSON, M.; BRADFORD, C. Omega-3, Omega-6 and Omega-9 Fatty Acids: Implications for Cardiovascular and Other Diseases. **J Glycomics Lipidomics** v.4, p.123, 2014.

KELLEY, D. S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. **Nutrition**. v.17, p.669-73, 2001.

KELLEY, D. S.; SIEGEL, D.; VEMURI, M.; MACKEY, B. E. Docosahexaenoic acid supplementation improves fasting and postprandial lipid profiles in hypertriglyceridemic men. **Am J Clin Nutr**. 2007;86(2):324-33.

KINGWELL, B. A.; CHAPMAN, M. J.; KONTUSH, A.; MILLER, N. E. HDL-targeted therapies: progress, failures and future. *Nat Rev Drug Discov*;13:445–64, 2014.

KRIS-ETHERTON, P.; FLEMING, J.; HARRIS, W. S. The debate about n-6 polyunsaturated fatty acid recommendations for cardiovascular health. *J Am Diet Assoc*;110(2):201-4, 2010.

LOHMAN, T.; GOINS, S. **Assesment of body composition and energy balance**. In: LAMB, D.; MURRAY R, editors. *Perspective in Exercise Science and Sports Medicine*. Carmel, IN: Cooper Publishing; pp. 61–105, 1998.

MACKNESS MI, HARTY D, BHATNAGAR D, WINOCOUR PH, ARROL S, ISHOLA M, DURRINGTON PN: Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 86 : 193-199, 1991.

McNAMARA, J. R.; SMALL, D. M.; ZHENGLING, L.; SCHAEFER,E. J. Differences in LDL subspecies involve alterations in lipid composition and conformational changes in apolipoprotein B. *Journal of Lipid Research*; v. 37,1996.

MICHA, R.; KHATIBZADEH, S.; SHI, P.; FAHIMI, S.; LIM, S.; ANDREWS, K. G. et al. Global, regional, and national consumption levels of dietary fats and oils in 1990 and 2010: a systematic analysis including 266 country-specific nutrition surveys. *BMJ*; vol. 348, p. g2272, 2014.

MOLENDI-COSTE, O; Legry, V; Leclercq, IA. Why and HowMeet n-3 PUFA Dietary Recommendations? *Gastroenterology Research and Practice*. v. 123, p 1-11, 2011.

MOSCA, L.; BENJAMIN E.J. Effectiveness-Based Guidelines for the Prevention of Cardiovascular Disease in Women 2011 Update: A Guideline From the American Heart Association. *Circulation*. v.123 (11), p. 1243-1262, 2011.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações**. 4ª Ed. Porto Alegre: Ed. Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial, EDUCS – Caxias do Sul, p.121-141, 2003.

MOZAFFARIAN, D. et al. Interplay between different polyunsaturated fatty acids and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*;111(2):157-64, 2005.

NEFF, L. M.; CULINER, J.; CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; SEIDMAN, C.; MEEHAN, D.; MATURI, J. et al. Algal docosahexaenoic acid affects plasma lipoprotein particle size distribution in overweight and obese adults. *J Nutr.* 2011;141(2):207-13.

NIMURA N, KINOSHITA T. Fluorescent labeling of fatty acids with 9-anthryldiazomethane (ADAM) for high performance liquid chromatography. **Analytical Letters**;13(3):191-202, 1980.

NOFER, J. R.; BRODDE, M. F.; KEHREL, B. E. High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 37: 726–735, 2010.

NUSSER, S. M.; FULLER, W. A.; GUENTHER, P. M. Estimation of usual dietary intake distributions: Adjusting for measurement error and nonnormality in 24 hour food intake data. In: TREWIN, D. (Ed.). **Survey Measurement and Process Quality**. New York: NY: Wiley. p.689-709, 1996.

O'DONOGHUE, M. L. Lipoprotein(a) for risk assessment in patients with established coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol**; 63(6):520-527, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global Atlas on Cardiovascular Disease, Prevention and Control. **Série de Relatos Técnicos**. Genebra, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Noncommunicable disease country profiles 2014. **Série de Relatos Técnicos**. Genebra, 2014.

PACKARD, C.; CASLAKE, M.; SHEPHERD, J. The role of small, dense low density lipoprotein (LDL): a new look. **Int J Cardiol**;74(Suppl 1):S17–S22, 2000.

PIRILLO, A.; NORATA, G. D.; CATAPANO, A. L. Treating High Density Lipoprotein Cholesterol (HDL-C): Quantity Versus Quality. **Current Pharmaceutical Design**; 19, 3841-3857, 2013.

RIZOS, E. C.; NTZANI, E. E.; BIKA, E.; KOSTAPANOS, M. S.; ELISAF, M. S. Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta analysis. **JAMA**; 308(10): 1024-1033, 2012.

ROS, E. I; NUNEZ, A.; PEREZ-HERAS, M.; SERRA, R.; GILABERT, E; CASALS and R. DEULOFEU. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. **Circulation** v.109, n.13, p.1609-14, 2004.

ROS, E.; MATAIX, J. Fatty acid composition of nuts – implications for cardiovascular health. **British Journal of Nutrition**, v. 96, suppl. 2, p. 29-35, 2006.

ROS, E. Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr**, v. 89, p.1649S-56S, 2009.

RYE, K. A.; BARTER, P. J. Cardioprotective functions of HDLs. **J Lipid Res**; 55(2):168-79, 2014.

SABATÉ, J; RADAK, T.; BROWN, J Jr. **The role of nuts in cardiovascular disease prevention**. In Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods, pp. 486–491 [R Wildman, editor]. Boca Raton: CRC Press, 2001.

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L.; BENÍTEZ, S.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Electronegative low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol*;15(3):329-35. Review, **2004**.

SANTOS, R. D.; GAGLIARDI, A. C. M.; XAVIER, H. T.; MAGNONI, C. D.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A. M. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**;100(1Supl.3):1-40, 2013.

SATOH, N. et al. Purified eicosapentaenoic acid reduces small dense LDL, remnant lipoprotein particles, and C-reactive protein in metabolic syndrome. **Diabetes Care**, v. 30, n. 1, p. 144-146, 2007.

SIMOPOULOS, A. P. et al. Workshop on the essentiality of a recommended dietary intakes of omega-6 and omega-3 fatty acids. **Journal of American College of Nutrition**. v.18, p. 487, 1999.

SPSS INCORPORATION. Statistical Package for the Social Sciences for Windows Student Version/ SPSS [computer program]. Release 15.0. Chicago: Marketing Department; 2005.

STANLEY, J. C. Should we be concerned about the dietary n-6:n-3 polyunsaturated fatty acid ratio? **Lipid Technol**; 19:112-3, 2007.

STRONG, K. et al. Preventing chronic disease: how many lives can we save? **Lancet**, v. 366, p. 1578-82, Oct. 2005.

TABET, F.; RYE, K. High-density lipoproteins, inflammation and oxidative stress. **Clin Sci (Lond)** 116: 87–98, 2009.

TAYLOR, D. W. **The calculations of sample size and power in the planning of randomized clinical trials**. Millcroft Seminar; 1988.

TEITELBAUM, J. E.; WALKER, W. A. Review: The role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. **J Nutr Biochem**; 12(1):21-32, 2001.

TERÉS, S. et al. Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. **PNAS**, v. 105, n. 37, p. 13811-16, 2008.

TRUMBO, P.; SCHLICKER, S.; YATES, A. A.; POOS, M. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. **J Am Diet Assoc**;102:1621–1630, 2002.

VAN HIMBERGEN, T. M.; ROEST, M.; de GRAAF, J.; JANSEN, E. H. J. M.; HATTORI, H.; KASTELEIN, J. J. P. et al. Indications that paraoxonase-1 contributes to plasma high density lipoprotein levels in familial hypercholesterolemia. **Journal of Lipid Research**; volume 46, 2005.

VECKA, M. et al. N-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of atherogenic dyslipidemia. **Neuroendocrinology Letters**. 33(Suppl.2):87-92, 2012.

VOGEL, R. A.; BERGER, H. Epidemiologia e prevenção da doença cardíaca coronariana. **Editora de publicações científicas**. v.1, p. 1-23, 2001.

WANG, C. et al. N-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alfa-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary – and secondary – prevention studies: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 5-17, 2006.

WEI, M. Y.; JACOBSON, T. A. Effects of eicosapentaenoic acid versus docosahexaenoic acid on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. **Curr Atheroscler Rep**;13:474–483, 2011.

WIJENDRAN, V.; HAYES, K. C. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. **Annu Rev Nutr**; 24:597-615, 2004.

XAVIER H. T., IZAR M. C., FARIA NETO J. R., et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**, 2013.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: a review. **Food Science and Technology**, v.42, p.1573-80, 2009.

YAZDANYAR, A.; YEANG, C.; JIANG, X. C. Role of phospholipid transfer protein in high-density lipoprotein- mediated reverse cholesterol transport. **Curr Atheroscler Rep**; 13(3):242-8, 2011.

YOUDIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **Int J Dev Neurosci**; 18(4/5):383-99, 2000.

YUSUF, S.; COLLINS, R.; PETO, R. Why do we need some large, simple randomized trials? **Stat Med**; 3:409-20, 1984.

YVAN-CHARVET, L.; WANG, N.; TALL, A. R. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 Transporters in Cholesterol Efflux and Immune Responses. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**; 30:139-143, 2010.

ZABOTTO, C. B.; VIANNA, R. P. T.; GIL, M. F. **Registro Fotográfico para Inquéritos Dietéticos – Utensílios e Porções**. Goiânia: Nepa – UNICAMP, 1996.

ANEXO 1

Escore de Risco de Framingham – ERF

Supplemental Data

**Effectiveness-Based Guidelines for the Prevention of Cardiovascular Disease in Women—2011 Update:
A Guideline From the American Heart Association**
Mosca et al
© 2011 American Heart Association, Inc.

General Cardiovascular Disease (10-Year Risk)

(Based on D’Agostino RB Sr, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, Kannel WB. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008;117:743–753.)

Outcome

CVD (coronary death, myocardial infarction, coronary insufficiency, angina, ischemic stroke, hemorrhagic stroke, transient ischemic attack, peripheral artery disease, heart failure)

Duration of follow-up

Maximum of 12 years, 10-year risk prediction

Population of interest

Individuals 30 to 74 years old and without CVD at the baseline examination

Predictors

- Age
- Diabetes
- Smoking
- Treated and untreated systolic blood pressure
- Total cholesterol
- HDL cholesterol

Estimate of Risk of CVD in Women							
Points	Age	HDL	Total Cholesterol	SBP Not Treated	SBP Treated	Smoker	Diabetic
<-3				<120			
-2		60+					
-1		50-59			<120		
0	30-34	45-49	<160	120-129		No	No
1		35-44	160-199	130-139			
2	35-39	<35		140-149	120-129		
3			200-239		130-139	Yes	
4	40-44		240-279	150-159			Yes
5	45-49		280+	160+	140-149		
6					150-159		
7	50-54				160+		
8	55-59						
9	60-64						
10	65-69						
11	70-74						
12	75+						

SBP indicates systolic blood pressure.

CVD Risk							
Points	Risk		Points	Risk		Points	Risk
-2 or less	Below 1%		6	3.40%		14	11.60%
-1	1.00%		7	3.90%		15	13.50%
0	1.10%		8	4.60%		16	15.60%
1	1.50%		9	5.40%		17	18.10%
2	1.80%		10	6.30%		18	20.90%
3	2.10%		11	7.40%		19	24.00%
4	2.50%		12	8.60%		20	27.50%
5	2.90%		13	10.00%		21+	Above 30%

Table 7. CVD Points for Men

Points	Age, y	HDL	Total Cholesterol	SBP Not Treated	SBP Treated	Smoker	Diabetic
-2		60+		<120			
-1		50-59					
0	30-34	45-49	<160	120-129	<120	No	No
1		35-44	160-199	130-139			
2	35-39	<35	200-239	140-159	120-129		
3			240-279	160+	130-139		Yes
4			280+		140-159	Yes	
5	40-44				160+		
6	45-49						
7							
8	50-54						
9							
10	55-59						
11	60-64						
12	65-69						
13							
14	70-74						
15	75+						
Points allotted							Total

Table 8. CVD Risk for Men

Points	Risk, %
≤ -3 or less	<1
-2	1.1
-1	1.4
0	1.6
1	1.9
2	2.3
3	2.8
4	3.3
5	3.9
6	4.7
7	5.6
8	6.7
9	7.9
10	9.4
11	11.2
12	13.2
13	15.6
14	18.4
15	21.6
16	25.3
17	29.4
18+	>30

ANEXO 2

Questionário de Atividade Física Habitual

Nome: _____ ID: _____

Data: ___/___/___

Nos últimos doze meses:					
ATIVIDADE FÍSICA OCUPACIONAL					
1. Qual tem sido sua principal ocupação? _____	1		3		5
2. No trabalho o Sr(a) senta: nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / sempre	1	2	3	4	5
3. No trabalho o Sr(a) fica em pé: nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / sempre	1	2	3	4	5
4. No trabalho o Sr(a) anda: nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / sempre	1	2	3	4	5
5. No trabalho o Sr(a) carrega carga pesada: nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / sempre	1	2	3	4	5
6. Após o trabalho o Sr(a) carrega carga pesada: muito freqüentemente / freqüent. / algumas vezes / raramente / nunca	5	4	3	2	1
7. No trabalho o Sr(a) sua: muito freqüentemente / freqüent. / algumas vezes / raramente / nunca	5	4	3	2	1
8. Em comparação com outros da sua idade, o Sr(a) pensa que seu trabalho é fisicamente: muito mais pesado / mais pesado / tão pesado quanto / mais leve / muito mais leve	5	4	3	2	1
Escore de AFO					
EXERCÍCIO FÍSICO NO LAZER					
9. O Sr(a) pratica ou praticou esporte ou exercício físico nos últimos 12 meses: Sim / Não					
9.1 Qual esporte ou exercício você pratica ou praticou mais freqüentemente? _____	1		3		5
9.2 Quantas horas por semana? <1 1-2 2-3 3-4 >4	1	2	3	4	5
9.3 Quantos meses por ano? <1 1-3 4-6 7-9 >9	1	2	3	4	5
9.4 Se você faz ou fez um segundo esporte ou exercício físico, qual o tipo? _____	1		3		5
9.5 Quantas horas por semana? <1 1<2 2<3 3-4 >4	1	2	3	4	5
9.6 Quantos meses por ano? <1 1-3 4-6 7-9 >9	1	2	3	4	5
9.7 Resultado Final da Questão 9 0	1	2	3	4	5
10. Em comparação com outros da sua idade o Sr(a) pensa que sua atividade física durante as horas de lazer é: muito maior / maior / a mesma / menor / muito menor	5	4	3	2	1
11. Durante a horas de lazer o Sr(a) sua: muito freqüentemente / freqüentemente / algumas vezes / raramente /	5	4	3	2	1

nunca					
12. Durante as horas de lazer o Sr(a) pratica esporte ou exercício físico: nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / muito freqüentemente	1	2	3	4	5
Escore de EFL					
ATIVIDADE FÍSICA DE LAZER E LOCOMOÇÃO					
13. Durante as horas de lazer o Sr(a) vê televisão: nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / muito freqüentemente	1	2	3	4	5
14. Durante as horas de lazer o Sr(a) anda: nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / muito freqüentemente	1	2	3	4	5
15. Durante as horas de lazer o Sr(a) anda de bicicleta: nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / muito freqüentemente	1	2	3	4	5
16. Durante quantos minutos por dia o Sr(a) anda a pé ou de bicicleta indo e voltando do trabalho, escola ou compras? <5 / 5-15 / 16-30 / 31-45 / >45	1	2	3	4	5
Escore de ALL					
17. Somatória Total dos Pontos					
18. ESCORE TOTAL					

Fórmula para Cálculo do Escore do Questionário de Atividade Física Habitual (AFH)

O Escore Total de Atividade Física foi calculado como o preconizado pelo estudo de Baecke, 1982¹.

- **Atividade Física Ocupacional (AFO)**

Cálculo da primeira questão referente ao tipo de ocupação: Intensidade (tipo de ocupação) = 1 para profissões com gasto energético leve, 3 para profissões com gasto energético moderado ou 5 para profissões com gasto energético vigoroso (determinada pela resposta do tipo de ocupação, o gasto energético da profissão deve ser conferido no compêndio de atividades físicas de Ainsworth, 2000).

$$\text{Escore de AFO} = \frac{Q1 + (6 - Q2) + Q3 + Q4 + Q5 + Q6 + Q7 + Q8}{8}$$

- **Exercício Físico no Lazer (EFL)**

Cálculo da questão 9 referente à prática de esporte/exercício físicos:

- Intensidade (tipo de modalidade) = 0,76 para modalidades com gasto energético leve, 1,26 para modalidades com gasto energético moderado ou 1,76 para modalidades com gasto energético vigoroso (determinado pela resposta do tipo de modalidade, deve ser conferido no compêndio de atividades físicas de Ainsworth, 2000).

- Tempo (hora por semana) = 0,5 para menos de uma hora por semana, 1,5 entre maior que uma hora e menor que duas horas por semana, 2,5 para maior que duas horas e menor que três horas por semana, 3,5 para maior que três e até quatro horas por semana ou 4,5 para maior que quatro horas por semana (determinado pela resposta das horas por semana de prática).

- Proporção (meses por ano) = 0,04 para menor que um mês, 0,17 entre um a três meses, 0,42 entre quatro a seis meses, 0,67 entre sete e nove meses ou 0,92 para maior que nove meses (determinado pela resposta dos meses por ano de prática).

Para cálculo desta questão, os valores devem ser multiplicados e somados:

Mod. 1 (intensidade x tempo x proporção) + Mod. 2 (intensidade x tempo x proporção)

Após o resultado deste cálculo, para o valor final, deverá ser estipulado um escore de 1 a 5 de acordo com critérios especificados abaixo:

0 (sem exercício físico) = 1 / entre 0,01 até < 4=2 / entre 4 até < 8=3 / entre 8 até < 12=4 / ≥12,00 = 5

O escore final de EFL deverá ser obtido de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Escore de EFL} = \frac{Q9 + Q10 + Q11 + Q12}{4}$$

- **Atividade Física de Lazer e Locomoção (ALL)**

O escore final de ALL deverá ser obtido de acordo com a fórmula abaixo:


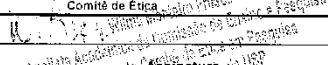
$$\text{Escore de ALL} = \frac{(6 - Q13) + Q14 + Q15 + Q16}{4}$$

$$\text{Escore total de atividade física (ET)} = \text{AFO} + \text{EFL} + \text{ALL}$$

¹FLORINDO AA, LATORRE MRDO. Validação e Reprodutibilidade do Questionário de Baecke de avaliação da atividade física habitual em homens adultos. *Rev Bras Med Esporte* 2003; 9:121-8.

ANEXO 3


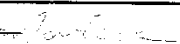
**Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital Universitário e
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo**

		MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP	
PROJETO RECEBIDO NO CEP		CAAE - 0063.0.207.198-11	
Projeto de Pesquisa Propriedade físico-químicas da LDL e da HDL, marcadores cardiometabólicos e oxidativos podem ser modulados pelo consumo de ômega-3, ômega-6 e ômega-9 em indivíduos com risco cardiovascular intermediário			
Área(s) Temática(s) Especial(s) Não se aplica		Grupo	Fase Não se aplica
Pesquisador Responsável			
CPF 48008249315	Pesquisador Responsável Nágia Raquel Teixeira Damasceno	Assinatura	
Comitê de Ética			
Data de Entrega 07/07/2011	Recebimento:  Assinatura		

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.

<http://portal2.saude.gov.br/sisnep/cep/caae.cfm?VCOD=420620>

07/07/2011

		MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP	
PROJETO RECEBIDO NO CEP		CAAE - 0063.0.207.198-11	
Projeto de Pesquisa Propriedade físico-químicas da LDL e da HDL, marcadores cardiometabólicos e oxidativos podem ser modulados pelo consumo de ômega-3, ômega-6 e ômega-9 em indivíduos com risco cardiovascular intermediário			
Área(s) Temática(s) Especial(s) Não se aplica		Grupo	Fase Não se aplica
Pesquisador Responsável			
CPF 48008249315	Pesquisador Responsável Nágia Raquel Teixeira Damasceno	Assinatura	
Comitê de Ética			
Data de Entrega 27/04/2011	Recebimento:  Assinatura		

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.

<http://portal2.saude.gov.br/sisnep/cep/caae.cfm?VCOD=420620>

10:53:48



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo

OF.COEP/228/11

1 de julho de 2011.

Prezada pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, analisou, de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, o protocolo de pesquisa n.º 2264, intitulado "PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA LDL E DA HDL, MARCADORES CARDIOMETABÓLICOS E OXIDATIVOS PODEM SER MODULADOS PELO CONSUMO DE ÔMEGA-3, ÔMEGA-6 E ÔMEGA-9 EM INDIVÍDUOS COM RISCO CARDIOVASCULAR INTERMEDIÁRIO?", do grupo III, sob responsabilidade da pesquisadora Nágila Raquel Teixeira Damasceno, considerando-o APROVADO "AD REFERENDUM".

Cabe lembrar que, de acordo com a Res. CNS 196/96, são deveres do(a) pesquisador(a): 1) Comunicar de imediato qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste Comitê de Ética em Pesquisa para dar continuidade à pesquisa; 2) Manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo COEP, no caso eventual auditoria; 3) Comunicar formalmente a este Comitê quando houver o encerramento da pesquisa; 4) Elaborar e apresentar relatórios parciais e final; 5) Justificar perante o COEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Prof. Tit. Claudio Leone
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - FSP/USP

Ilm.ª Sr.ª
Prof.ª Dr.ª Nágila Raquel Teixeira Damasceno
Departamento de Nutrição
Faculdade de Saúde Pública/USP



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo

OF.COEP/01/16

03 de fevereiro de 2016.

Prezada Pesquisadora

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, **analisou** em sua 8.^a/15 Sessão Ordinária, em 11/12/15, de acordo com a Resolução n.º 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, o **ADENDO** (inclusão de novas análises biológicas), ao protocolo de pesquisa n.º 2264, intitulado "**Propriedades físico-químicas da LDL e da HDL, marcadores cardiometabólicos e oxidativos podem ser modulados pelo consumo de ômega-3, ômega-6 e ômega-9 em indivíduos com risco cardiovasculares intermediário?**", sob responsabilidade da pesquisadora **Nágila Raquel Teixeira Damasceno**, considerando-o **APROVADO**.

Cabe lembrar que, de acordo com a Res. CNS 466/12, são deveres do(a) pesquisador(a): **1)** Comunicar de imediato qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste Comitê de Ética em Pesquisa para dar continuidade à pesquisa; **2)** Manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo COEP, no caso eventual auditoria; **3)** Comunicar formalmente a este Comitê por ocasião do encerramento da pesquisa; **4)** Elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **5)** Justificar perante o COEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Prof.ª Tit. Maria Regina Alves Cardoso
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - FSP/USP

Ilm.ª Sr.ª
Nágila Raquel Teixeira Damasceno
Departamento de Nutrição da FSP/USP



Fls. n° 109
CEP/HU-USP



São Paulo, 6 de agosto de 2011.

Ilmo(a) Sr(a)

Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Serviço de Nutrição e Dietética do Hospital Universitário
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Propriedade físico-químicas da LDL e da HDL, marcadores cardiometabólicos e oxidativos podem ser modulados pelo consumo de ômega-3, ômega-6 e ômega-9 em indivíduos com risco cardiovascular intermediário?" - **Pesquisador(a) responsável:** Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno - **Co-Autor(es):** Dr. Antonio Figueiredo, Dr. Magnus Ake Gidlund, Dra. Sayuri Miyamoto, Dr. Raul Cavalcante Maranhão, Dra. Dulcinea S. P. Abdalla, Dr. Rodrigo Diaz Olmos, Marlene Nuñez Aldin, Adriane Bueno Marangoni, Carôline Pappiane, Claudia Assef Sanibal - **Registro CEP-HU/USP:** 1126/11 - **SISNEP CAAE:** 0063.0.207.198-11.

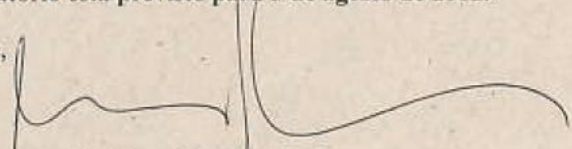
Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 5 de agosto de 2011, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, inciso IX.2, letra "c".

O primeiro relatório está previsto para 5 de agosto de 2012.

Atenciosamente,


Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP
Avenida Professor Lúcio Prestes, 2565 - Cidade Universitária - 05508-000 - São Paulo - SP
Tels.: (11) 3091-9457 - Fax: (11) 3091-9479 - E-mail: cep@hu.usp.br

APÊNDICE 1



Universidade de São Paulo

Faculdade de Saúde Pública

Av. Dr. Arnaldo, 715 – CEP 01246-904 – São Paulo – Brasil - coep@fsp.usp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: **Propriedades físico-químicas da LDL e da HDL, marcadores cardiometabólicos e oxidativos podem ser modulados pelo consumo de ômega-3, ômega-6 e ômega-9 em indivíduos com risco cardiovascular?**

O motivo que nos leva a estudar a Síndrome Metabólica e, principalmente, os riscos cardiovasculares, é o fato de que essas doenças são um dos principais problemas de Saúde Pública no mundo e a relação das cardiopatias com os hábitos alimentares. A pesquisa se justifica pela necessidade de avaliar por quais mecanismos o ômega-6 está envolvido nesse processo. Portanto, o objetivo desse projeto é avaliar o efeito da suplementação com ômega-6 sobre a prevalência de Síndrome Metabólica em indivíduos adultos. O procedimento de coleta de material será da seguinte forma: será coletada uma amostra de sangue e também serão aplicados dois questionários: um sobre seu nível socioeconômico, clínico e outro sobre suas atividades físicas habituais e sua dieta. Esses questionários serão aplicados em três momentos (Basal, 4 semanas e 8 semanas).

DESCONFORTOS E RISCOS E BENEFÍCIOS: Existem desconfortos e riscos mínimos que envolvem enjôos em função do jejum e pequenos hematomas no local de punção, ambos relacionados a coleta de material. Entretanto, esses desconfortos se justificam pelo benefício que essa pesquisa trará se identificarmos o papel do ômega-6 os fatores de risco cardiovascular.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: Em caso de evidências de risco a saúde pelos resultados encontrados, os participantes serão orientadas a procurar o atendimento médico ou nutricional.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico e laboratorial permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DA(O) PARTICIPANTE: Eu, _____, CPF nº _____, fui informada(o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. A professora orientadora Profa. Dra. Nagila Raquel Teixeira Damasceno certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar a estudante Caroline Pappiani ou a professora orientadora Profa. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno no telefone (11) 3061-7865 ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, sito à Av. Dr. Arnaldo, 715, Cerqueira César – São Paulo, SP.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
Nome	Assinatura da Testemunha	Data

APÊNDICE 2

Livro do Participante

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Saúde Pública Hospital Universitário
Departamento de Nutrição Serviço de Nutrição e Dietética

**CARDIO
NUTRI**

Nome: _____

ID: _____

Pesquisador: _____

DIÁRIO DO PARTICIPANTE

Prezado Sr(a),

O projeto CARDIONUTRI tem como objetivo avaliar o efeito do consumo de determinados tipos de gorduras (ômega-3, ômega-6, ômega-9 ou placebo) sobre diversos parâmetros cardiometabólicos, ou seja, sobre variáveis relacionadas com a saúde do seu coração. Portanto, sua colaboração por meio do uso correto das cápsulas, comparecimento em todas as consultas e registro de todas as informações solicitadas neste diário é fundamental para a veracidade dos resultados obtidos. Desde já, agradecemos sua participação e nos colocamos à disposição para esclarecer todas as dúvidas que possam surgir durante o desenvolvimento desse estudo. Lembramos que ao término do estudo, o participante receberá todos os resultados dos seus exames.

Período: 1^o mês do estudo

Data início: ____/____/____

Data final: ____/____/____

OBS.: Não esqueça de trazer na próxima consulta o frasco e as cápsulas que sobraem.

CONTATOS: Faculdade de Saúde Pública da USP – 3061 7865
Hospital Universitário da USP – 3091 9538
Pesquisadora Profa. Dra. Nágila Damasceno – 2369 8581
E-mail: cardionutri@gmail.com

SEMANA 1

Registre as intercorrências ocorridas durante o estudo. Preencha as questões abaixo:

1. O Sr.(a) dividiu o suplemento com outra pessoa? () Sim () Não
Se sim, com quem? _____
Por qual motivo? _____

2. Preencha a tabela abaixo:

DIA / DATA	CAPSULA 1 CAFÉ DA MANHÃ	CAPSULA 2 ALMOÇO	CAPSULA 3 JANTAR
1 ___/___	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____
2 ___/___	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____
3 ___/___	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____
4 ___/___	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____
5 ___/___	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____
6 ___/___	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____
7 ___/___	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____

3. Sr.(a) apresentou algum dos sintomas abaixo?

DIA	AZIA	VÔMITO	GASES	DIARREIA
1	() S () N	() S () N	() S () N	() S () N
2	() S () N	() S () N	() S () N	() S () N
3	() S () N	() S () N	() S () N	() S () N
4	() S () N	() S () N	() S () N	() S () N
5	() S () N	() S () N	() S () N	() S () N
6	() S () N	() S () N	() S () N	() S () N
7	() S () N	() S () N	() S () N	() S () N

DIA	CONSTIPAÇÃO	COCEIRA	SANGRAMENTO	OUTROS
1	() S () N	() S () N	() S () N	() S () N
2	() S () N	() S () N	() S () N	() S () N
3	() S () N	() S () N	() S () N	() S () N
4	() S () N	() S () N	() S () N	() S () N
5	() S () N	() S () N	() S () N	() S () N
6	() S () N	() S () N	() S () N	() S () N
7	() S () N	() S () N	() S () N	() S () N

APÊNDICE 3

Composição Corporal, Eletrocardiograma e Pressão Arterial

NOME: _____ N° Cardionutri: _____

DATA: ____/____/____

Composição corporal - Impedância Bioelétrica (BIA)

	T=0		T=8S	
Resistência	<u>A52</u>		<u>A60</u>	
Reactância	<u>A53</u>		<u>A61</u>	
% MG (BIA)	<u>A54</u>		<u>A62</u>	
%MM (BIA)	<u>A55</u>		<u>A63</u>	

Eletrocardiograma:

A64 Valor do ponto E no Heart Square: _____, _____ cm

A65 Valor de V4 no HeartSquare: _____, _____ cm

A66 Tempo (mm:ss): _____: _____

A67 Qualidade do traçado (1 – péssimo a 5 – excelente):

[] 1 [] 2 [] 3 [] 4 [] 5

A68 Se a qualidade for abaixo de 4, descreva quais os problemas e em quais derivações estes ocorreram:

Pressão arterial:

	T=0		T=8S	
PAD1 x PAS 1	<u>A69</u>		<u>A81</u>	
PAD2 x PAS 2	<u>A70</u>		<u>A82</u>	
PAD3 x PAD3	<u>A71</u>		<u>A83</u>	
FC1	<u>A72</u>		<u>A84</u>	
FC2	<u>A73</u>		<u>A85</u>	
FC3	<u>A74</u>		<u>A86</u>	

Antropometria

	T=0		T=8S	
Altura (m)	<u>A40</u>			
Peso (Kg)	<u>A41</u>		<u>A49</u>	
IMC (kg/m²)	<u>A42</u>		<u>A50</u>	
CC (cm)	<u>A43</u>		<u>A51</u>	

Entrevistador (T=0): _____

Entrevistador (T=8S): _____

APÊNDICE 4

Questionário Sócio-Econômico e Clínico

() HU		REG:
A0 Data: / /		Retorno: / /
A1 Nome:		Data de Nasc.: / /
Endereço:		
Bairro:		CEP:
Cidade:		Telefone:
A3 Sexo: <u>1</u> () M <u>2</u> () F	A4 Idade:	ERF:
A5 Raça: <u>1</u> () Branco <u>2</u> () Negro <u>3</u> () Pardo <u>4</u> () Amarelo <u>5</u> () Indígena		
A6 Estado Civil: <u>1</u> () Solteiro <u>2</u> () Casado <u>3</u> () Viúvo <u>4</u> () Divorciado <u>5</u> () Outros		
A7 Trabalha atualmente: <u>1</u> () SIM <u>2</u> () NÃO <u>3</u> () Aposentado <u>4</u> () Outros: _____		
A8 Profissão: _____		
A9 Escolaridade: <u>1</u> () Analfabeto <u>5</u> () Ensino Médio Completo <u>2</u> () Ensino Fundamental Incompleto <u>6</u> () Ensino Superior Incompleto <u>3</u> () Ensino Fundamental Completo <u>7</u> () Ensino Superior Completo <u>4</u> () Ensino Médio Incompleto <u>8</u> () Outros: _____		
A10 Quantas pessoas moram na sua casa? _____ A11 Quantas crianças? _____		
A12 Renda média mensal: <u>1</u> () Menos que 1 SM <u>3</u> () Entre 6 e 10 SM <u>2</u> () Entre 1 e 5 SM <u>4</u> () Mais que 10 SM		
A13 Fumante: <u>1</u> () SIM <u>2</u> () NÃO		
A14 Consome bebida alcoólica: <u>1</u> () SIM <u>2</u> () NÃO		
A15 Tipos de bebidas alcoólicas mais consumidas: <u>1</u> () Cerveja <u>3</u> () Cachaça <u>5</u> () Vinho tinto <u>2</u> () Vinho branco <u>4</u> () Outras: _____		
A16 Freqüência de Consumo: <u>1</u> () Diário <u>2</u> () Semanal: _____ <u>3</u> () Mensal: _____ <u>4</u> () Menos de 1x/mês		
A17 Quantidade de bebida alcoólica ingerida no intervalo acima? _____		
A18 Consumo de outros tipos de drogas: <u>1</u> () SIM <u>2</u> () NÃO		
A19 Qual (s): _____		
A20 Possui alguma doença? <u>1</u> () SIM <u>2</u> () NÃO		
A21 Qual doença: _____		

1() Diabetes Mellitus	6() Insuficiência Renal Crônica
2() Hipertensão Arterial	7() Atresia Biliar
3() Hipotireoidismo	8() Doença Auto-Imune
4() Doença Hepática	9() Doença Coronariana
5() Outras Qual (is)? _____	
A22 Diagnóstico Clínico de DAC ou equivalente: 1() SIM 2() NÃO	
A23 Qual diagnóstico:	
1() História de Infarto do Miocárdio	7() Revascularização do Miocárdio
2() Angina	8() Angioplastia
3() Alterações eletrocardiográficas isquêmicas	9() Aterosclerose
4() Doença Arterial Periférica	10() Aneurisma de Aorta Abdominal
5() Doença Arterial Carotídea (ataque isquêmico transitório ou Acidente Vascular Cerebral de origem carotídea ou obstrução da carótida >50%)	
6() Diabetes Mellitus	11() Outros: _____
A24 Fez algum tipo de cirurgia: 1() SIM 2() NÃO	
A25 Qual(is): _____	
A26 Quando: _____	
A27 Está usando algum medicamento e/ou suplemento: 1() SIM 2() NÃO	
A28 Qual:	
1() Estatinas	4() Ferro/Zinco
2() Anti-hipertensivo	5() Vitamina
3() Hipoglicemiante	6() Fibrato
	7() Outro: _____
A29 Qual(is): _____	
A30 Posologia: _____	
A31 Indicação: _____	
A32 Você tem alguma alergia ou intolerância alimentar: 1() SIM 2() NÃO	
A33 Qual(is): _____	
A34 Antecedentes familiares de doenças crônicas: 1() SIM 2() NÃO	
() Pai	
1() Obesidade	4() AVC
2() Hipertensão	5() Diabetes
3() Infarto	6() Doença Vascular Periférica
	7() Outro: _____
() Mãe	
1() Obesidade	4() AVC
2() Hipertensão	5() Diabetes
3() Infarto	6() Doença Vascular Periférica
	7() Outro: _____
A35 Gestante ou Lactante: 1() SIM 2() NÃO	
A36 Está recebendo algum tipo de Orientação Nutricional: 1() SIM 2() NÃO	
A37 Qual frequência: 1() Esporádica 2() Mensal 3() Trimestral 4() Semestral 5() Outras	

Entrevistador:

APÊNDICE 5**Recordatório Alimentar de 24h**

NOME: _____

TEL: _____

DATA: __/__/__

DIA DA SEMANA: ()dom ()seg ()ter ()qua ()qui ()sex ()sáb

Horário e Local	Alimentos ou Preparações	Quantidade	Marca Comercial	OBS

Entrevistador: _____

Tempo da entrevista: _____

APÊNDICE 6

Manual do Entrevistador

Para o sucesso da aplicação do método de inquérito alimentar escolhido, é preciso que o entrevistador atente-se a algumas questões, que serão descritas ao longo deste manual.

Apresentação inicial do entrevistador:

- É de extrema importância, antes da aplicação do inquérito alimentar, que o entrevistador se apresente, explicando os objetivos da entrevista e informando ao entrevistado a duração média da mesma.
- Esclarecer que todos os dados coletados são de ordem confidencial.
- Expor ao entrevistado o direito à não participação, sem qualquer prejuízo.

Considerações importantes:

- Os entrevistadores deverão estar treinados e com amplo conhecimento dos hábitos e costumes da comunidade em estudo, assim como dos alimentos e modo de prepará-los.
- Para auxiliar na quantificação do tamanho e volume das porções consumidas, será utilizado material de suporte com registros fotográficos.
- O entrevistador deverá estabelecer um canal de comunicação em que se obtenha a informação por meio de um diálogo agradável, uma vez que a qualidade da informação dependerá da memória e da cooperação do entrevistado.
- Respostas precisas e não tendenciosas exigem respeito e atitude neutra diante de hábitos e consumo de alimentos do entrevistado. Para tanto, o entrevistador deverá evitar expressar sentimentos de surpresa, tristeza ou decepção, o que poderia induzir o entrevistado a subestimar ou superestimar a quantidade de alimentos, dependendo da reação que ele observe.

Recordatório de 24 horas

Definição:

O Recordatório de 24 horas é um método de inquérito alimentar realizado mediante uma entrevista pessoal, na qual o entrevistado relata detalhadamente os alimentos consumidos no dia anterior, desde o primeiro alimento ingerido após acordar até a última refeição antes de dormir, incluindo os alimentos consumidos dentro e fora do domicílio.

Metodologia:

A aplicação do Recordatório de 24 horas deve obedecer a seguinte metodologia:

Passo 1: Pergunte ao indivíduo:

“O Sr(a) pode, por favor, me dizer tudo o que comeu ou bebeu ontem, desde o momento que acordou até antes de dormir, começando pelo primeiro alimento ou bebida consumida?”.

Transcreva tudo o que for dito, sem preocupação com quantidade, por enquanto. Não interrompa a informante.

Passo 2: Pergunte o horário e local da refeição.

“O Sr(a) pode lembrar o horário (mais ou menos) e em que lugar?”

Anote os horários e o local referido.

Passo 3: Volte à descrição dos alimentos e pergunte as quantidades em medidas caseiras consumidas, de cada alimento ou preparação.

- a. No caso de alimentos como frutas, pães, biscoitos e ovos, pergunte quantas unidades foram consumidas. Exemplo: 1 fatia de pão de forma, 1 pão francês, 1 pão de queijo, 1 biscoito recheado, etc.
- b. Se possível, registre a marca comercial e variedade dos alimentos. Exemplo: banana nanica, prata, maçã.
- c. No caso de alimentos compostos, como por exemplo, café com leite, mingaus, vitaminas e sopas, pergunte os ingredientes, quantidades e medidas utilizadas na preparação.
- d. Para alimentos como carnes (vaca, frango, porco, peixe) utilize unidades como: fatia (pequena, média, grande), pedaço (pequeno, médio, grande), posta (pequena, média, grande).
- e. Registre se a preparação da carne foi frita, assada, à milanesa ou grelhada.

- f. No caso de verduras e legumes, pergunte os ingredientes da salada. Legumes (cenoura, abobrinha, berinjela, milho, etc): registre em colheres de sopa ou de servir e pergunte o tipo de preparação (cozidos ou refogados).
- g. Para preparações habituais como arroz, feijão e macarrão utilize as medidas caseiras de referência (colher de sopa, de servir, concha, pegador de macarrão).
- h. Certifique-se da presença ou não de temperos nas saladas, açúcar/adoçante nas bebidas, manteiga/requeijão/outras no pão/biscoito/ou torrada e suas quantidades.
- i. Não faça perguntas tendenciosas. Exemplo: “Você tomou café da manhã? Você come pouco?”.
- j. Ao longo da entrevista, lembre-se de perguntar se houve sobras e quantificá-las.

Revisão do recordatório:

Ao final da entrevista é importante que o entrevistador dê ao entrevistado a oportunidade para lembrar-se de algum alimento que porventura tenha consumido, mas esquecido de referir por ocasião da entrevista.

Por fim, é importante anotar o nome do entrevistador e quanto tempo durou a entrevista.

APÊNDICE 7

Atividades Doutorado Sanduíche em Umeå - Suécia



Ministério da Educação
Coordenação de Aperfeiçoamento
de Pessoal de Nível Superior

RELATÓRIO PARCIAL *Estágio de Doutorado (Sandwich)*

Nome: **CAROLINE PAPPANI**

Coordenador: **NÁGILA RAQUEL TEIXEIRA DAMASCENO**

Processo: **BEX 5436/14-1**

Técnico/CAPES: **ANGELA BACKX NORONHA**

Área: **BIOQUIMICA DA NUTRICAÇÃO**

Período: De **26/01** até **26/06/2015**

Instituição onde se realiza: **UMEÅ UNIVERSITET**

Co-orientador estrangeiro: **STEFAN K NILSSON**

“Animal Course” e Estudo Experimental

Para que as atividades com o estudo experimental fossem iniciadas, a aluna teve que ser aprovada no Curso teórico sobre “laboratório de ciência animal para pesquisadores” e no Treinamento prático com ratos e camundongos sobre manipulação e imobilização, aplicação de injeção, coleta de sangue, biópsia, anestesia, eutanásia e dissecação realizado no “Umeå Center for Comparative Biology (UCCB)”.

Após a finalização dos cursos, o estudo piloto foi estruturado e desenvolvido no UCCB. O esqueleto segue abaixo.

Pilot Study – Does w-3 influence development and function of BAT?

Animals: Black 6

Age: 12 weeks

Gender: Male

Number: 24 (6 per group)

Groups: cold exposure *versus* warm temperature

Diet: high fat rich in w-3 *versus* w-6

Follow up: 8 weeks

Week -1 (31/March-06/April): Weigh animals and food. Divide mice in 4 groups. Take 4h fasting blood sample for plasma HPLC and FFA analysis (50µl plasma). Save frozen erythrocytes (for omega analysis in Brazil). Take fasting blood glucose.

Week 0 (07-13/April): Baseline Echo-MRI for all groups. Follow weight and food intake once/week. Put mice on specific diets and into climate chambers +8 (+15 in the first week) and +28 degrees.

Week 1-5 (14/April-18/May): Follow weight and food intake once/week.

* from April 22 start to follow food intake 3 times/week

* from May 04 start single cage

Week 6 (19-25/May): Do energy expenditure pairwise for warm group. Madde will do Echo-cardiography for cold group.

Week 7 (26/May-01/June): Do energy expenditure pairwise for cold group. Madde will do Echo-cardiography for warm group.

Week 8 (02-08/June): Do mixed glucose and fat tolerance test for for all groups. Endpoint Echo-MRI for all groups.

Week 9 (09-12/June): Sacrifice mice after 4h fasting. Take blood sample for plasma HPLC and FFA analysis (50µl plasma). Do heart perfusion (5 animals/day). Save frozen erythrocytes (for omega analysis in Brazil). Collect tissues for LPL analysis, for qPCR analysis and for histology (focus on browning effects in adipose tissue).

Laboratório

Além disso, a aluna aprendeu algumas técnicas laboratoriais que foram realizadas ao término do estudo piloto. Os protocolos encontram-se abaixo.

LPL activity

Protocol

* 2 sets of tubes (Kimble 13x100 mm), one set with and one without incubation mixture, triplicates (blank and sample)

* prepare the incubation mix (for blank and eight samples) up to 20 μl sample volume

30 x	100 μl Inc. buffer	3000 μl
	10 μl ^3H -II (5 mg/ml final)	300 μl
	5 μl PMSF-HIFRS	150 μl
	<u>60 μl milliporvatten</u>	<u>1800 μl</u>
	180 μl / tube	

* Add water if necessary (to the blank and to the tubes with sample volume less than 20 μl).

* Pipette 180 μl of the incubation mix to each tube.

* Thaw and keep your samples in ice-water.

* Add your sample to the tubes (the ones with mix) Note the exact time you add sample to each tube, vortex and put it in in a 25°C water-bath with shake.

* After adequate incubation time, the reaction is stopped by adding 2 ml/tube extraction-mixture (iso-propanol, heptane and 1 M H_2SO_4 , 40:48.3:1).

* Add 0,5 ml water.

* Vortex properly.

* Spin for 3 min, 2250 rpm (HERMLE Z 400), 2 phases.

* While spinning, take the other set of tubes and add 1 ml alkaline ethanol to each tube.

* After spinning, transfer 800 μl from the top phase to the corresponding tube filled with 1 ml alkaline ethanol and continue with that set of tubes.

* Add 3 ml heptan (first wash).

* Vortex properly.

- * Spin for 3 min, 2250 rpm.
- * Take away most of the top phase. Use vacuum-suction and a Pasteur-pipette connected to a vacuum bottle so you can collect the top (heptane) phase,
- * Add 3 ml heptan (second wash)
- * Vortex properly
- .
- * Spin for 3 min, 2250 rpm.
- * Take away the top phase.
- * Transfer 800 μ l from the bottom liquid to a 6 ml scintillation tube.
- * Add 4 ml scintillation liquid (Opti-phase[®]Hi safe[®] 3 + HAc).
- * Close and label on top.
- * Vortex.
- * Ready for counting in a β -counter, 1 or 5 min.
- * Pour, the remaining solvents in the tubes, into a separation funnel.

ELISA for LPL

Coating

- *Affinity purified chicken IgG against bovine-LPL. Dilute the antibody in PBS (10mM Na – phosphate buffer, 0.15M NaCl pH 7.4) to concentration 7 μ g/ml
- *Pipette 100 μ l/well (Perkin Elmer, Spectra Plate 96 HB)
- * Incubate at 37°C for 4 hours

Sample preparation

- * On every plate:
 - 2 hu-post hep standards diluted 1:80, 1:160 and 1:320 times
 - 1 hu-pre hep standard diluted 1:10, 1:20 and 1:40 times
 - bovine standard* 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7ng/ml (in duplicate)
- *for calibration curve: b-LPL 500ng/ml in PBS, 15% glycerol, BSA 1mg/ml

- * Wash four times with PBS-tween. Empty the wells completely by inverting the plate and bang it on the table against tissues a couple of times
- * Pipette 100µl/well of your diluted samples
- * Incubate in refrigerator overnight
- * Wash four times with PBS-tween as before
- * Pipette 100µl/well of monoclonal ab (5D2 diluted 1:10000 in conjugated buffer)
- * Incubate at room temperature for 3 hours
- * Wash four times with PBS-tween as before
- * Conjugat: Pipette 100µl/well of anti-mouse IgG HRP A-2254 from Sigma (diluted 1:8000 in conjugate buffer)
- * Incubate at room temperature for 2 hours
- * Wash four times with PBS-tween as before
- * Substrate: Dissolve OPD-tablets (Dako S2045, 2mg) in 12 ml H₂O and add 5 µl H₂O₂ (4 tablets/plate)
- * Pipette 100µl/well (keep in darkness 5-30 min)
- * Stop the reaction by adding 100 µl/well of 0.5 M H₂SO₄
- * Read at 490 nm (Program Spf short cut)

ELISA for angiotensin-like protein 4 (ANGPTL4)

Based on ELISA kit from "R&D Systems", cat. nr DY3485

Protocol

- *Add 100 µl of capture AB (0.8 µg/ml PBS)
- *Incubate for 4 h at 37°C
- *Wash 4 times
- *Block with 200 µl of 1% BSA
- *Incubate for 1.5-2 h room temperature
- *Wash 4 times
- *Apply 100 µl of the standard (from 0 to 20 ng/ml in 1% BSA 0.1% Tween) or serum sample (diluted 1/10 to 1/80 in 1% BSA 0.1% Tween)
- *Incubate overnight at 4°C

- *Wash 4 times
- *Add 100 μ l of detection AB (0.2 μ g/ml in 1% BSA)
- *Incubate for 1 h at room temperature
- *Wash 4 times
- *Add 100 μ l of streptavidin-HRP diluted 1:200 in 1% BSA
- *Incubate for 30 minutes at room temperature (in darkness)
- *Wash 4 times
- *Add 100 μ l of OPD solution (for 20-30 minutes)
- *Stop the reaction with 100 μ l of 0.5 M H₂SO₄
- *Read absorbance at 490 nm

Atividades Complementares

Cursos acadêmicos

A aluna participou e foi aprovada em duas disciplinas para alunos de Doutorado, uma em fevereiro "Research methodology and philosophy of science" e outra em maio "Methods in Social Epidemiology".

“Lab Meeting” e “Journal Club”

Toda segunda-feira de manhã era a reunião semanal do grupo “lab meeting”. Todos os alunos e professores participavam e era discutido o que foi realizado na semana anterior e o que seria feito no decorrer da atual semana.

Além disso, toda quarta-feira a tarde ocorreu o “journal club”. Cada semana, um aluno ou professor selecionava e apresentava um artigo para o grupo. O artigo podia ser atual ou não, contanto que fosse um tema interessante e que fizesse parte da linha de pesquisa do grupo.

Em uma das semanas, um artigo foi apresentado pela referida aluna e, nesse mesmo dia, ela apresentou sobre o seu projeto de Doutorado e atividades realizadas na USP.

Eventualmente, quando algum aluno finalizava o seu Projeto de Pesquisa, ao invés de apresentar um artigo, ele apresentava para o grupo os resultados encontrados no seu estudo. A aluna teve a oportunidade de assistir a três dessas apresentações.

Outras atividades

Para que o estudo piloto fosse desenvolvido, a aluna fez uma pesquisa científica sobre estudos experimentais e tecido adiposo marrom, bem como sobre estudos com humanos e ANGPTL4.

Nesse sentido, anteriormente ao início da pesquisa no UCCB, a aluna começou a observar as atividades diárias de outros alunos em seus projetos experimentais. Com o Doutorando Fredrick Anderson, a aluna pôde observar as seguintes etapas: ultrassonografia, câmara de aclimatização, protocolo de gasto energético, protocolo de sacrificar e dissecar os camundongos. Com a “Analista de Laboratório (Laboratorieanalytiker)” Jessica Nilsson, a aluna não apenas observou como também pôde ajudar na pesquisa, participando das etapas de pesagem dos animais e da ração e do protocolo de composição corporal (Echo-MRI).

Além disso, sempre que teve a oportunidade de participar de eventos científicos dentro da Universidade, como seminários e workshops, a aluna assim o fez.

Experiência acadêmica, científica e cultural

A oportunidade de vivenciar a rotina e o dia-a-dia de uma cultura completamente diferente foi indescritível. Morar em um país de primeiro mundo foi algo maravilhoso e único, uma experiência inesquecível. Além disso, tive o prazer de desfrutar de todas as oportunidades dentro da Universidade, seja academicamente quanto cientificamente. O espaço cedido pelo grupo era incrível. Eu tinha a minha própria bancada no laboratório, com todo o material necessário e, caso algo estivesse faltando, tudo era providenciado em questão de 24 horas. Eu tive um computador com senha pessoal e acesso livre a todas as instalações do Departamento. O Prof. Stefan e os demais membros da equipe estavam sempre à disposição para me auxiliar nas atividades. Esses meses me fizeram crescer muito profissionalmente, aprendi técnicas laboratoriais nunca vistas antes pelo meu grupo aqui no Brasil e fiz disciplinas que me fizeram evoluir muito no inglês e na relação com outros alunos internacionais. Além disso, trabalhei em um estudo experimental, algo inédito para mim. Foi concedida a mim total autonomia para cuidar dos animais (camundongos) e o espaço do biotério era impressionante. Eu não tenho nenhuma queixa quanto às instalações da Universidade em Umeå, muito pelo contrário, me surpreendi bastante. Felizmente finalizei o estudo piloto, no entanto, inúmeras análises precisam ser feitas, visto que, o estudo terminou duas semanas antes da minha partida, o que me permitiu apenas duas semanas para dar início nas análises laboratoriais. Sendo assim, seria de extrema importância que algum(a) outro(a) aluno(a) do meu grupo tivesse a oportunidade de ir para lá dar continuidade nessas etapas futuras. No mais, agradeço imensamente a CAPES pela concessão da bolsa que permitiu enriquecer ainda mais o meu Doutorado.

Cronograma

ETAPAS	FEV	MAR	ABR	MAIO	JUN	JUL- AGO
Academic course	x			x		
Lab meeting and Journal Club	x	x	x	x	x	
Online course laboratory animal science	x					
Practical course animal facility		x				
Jessica's experiment		x	x			

ELISA: LPL and ANGPTL4 with CARDIONUTRI sample		x	x			
Pilot study with mice			x	x	x	
LPL assay with heart perfusion sample					x	
Relatório de atividades						x
Prestação de contas						x

Sugestão de atividades sequenciais

Segue abaixo uma proposta das análises com as amostras dos camundongos que poderiam ser finalizadas na próxima missão de estudos:

- *LPL activity (coração, baço, rim, fígado, tecido adiposo branco e marrom e músculo);
- *Histologia
- *Análise de genes pelo método qPCR
- *HPLC para perfil lipídico
- *Análise de ácidos graxos

6-2-2015

Caroline Pappiani

Course Certificate - Part One

We hereby confirm that Caroline Pappiani has completed the theoretical part of the web-based course in Laboratory Animal Science for Researchers – Rodents and Lagomorphs.

Caroline Pappiani has to contact the education officer at an Animal Facility at the university that admitted the participant to be able to complete the practical part of the training.

Course Content

Ethics and Animal Use
Swedish Legislation
Animal Records
Identification Methods
Biology
Husbandry
Animal Care and Supervision
Ethology
Humane Endpoints
Anesthesia, Analgesia and Euthanasia
Diseases in Laboratory Animals
Animal Experimental Methodology
Genetically Modified Organisms
Alternative Methods
Safety in Biomedical Facilities



Course certificate
Umeå University
Umeå Center for Comparative Biology (UCCB)

Laboratory Animal Science for Researchers. -Rodents and Lagomorphs. 3 ECTS*

Caroline Pappiani

860922-XXXX

Has, in accordance with the provisions of the Higher Educational Ordinance (1993:100) completed the above course and been awarded the following grade

Grade: Pass

Date: March 19, 2015

The theoretical and practical content of the course are in accordance with Swedish legislation and EU Directive (2010/63/EU) regulating the protection of animals used for scientific purpose. The course also meets the requirements for species-specific education and training.

Content of the web-based theoretical part: Ethics and animal use. Swedish legislation. Animal records. Identification methods. Biology. Husbandry. Animal care and supervision. Ethology. Humane endpoints. Anesthesia, analgesia and euthanasia. Diseases in laboratory animals. Animal experimental methodology. Genetically modified organisms. Alternative methods. Safety in biomedical facilities.

Practical training (mouse/rat): Handling and restraining. Injections (sc, ip, iv). Blood sampling. Biopsi. Anesthesia. Euthanasia. Dissection.

On behalf of the Office of the Vice Chancellor

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Leif Carlsson'.

Leif Carlsson, Professor

The grade awarded for the course is Pass. *European Credit Transfer System



Umeå University
 Dept of Public Health and Clinical Medicine
Epidemiology and Global Health
 SE-901 85 Umeå, Sweden
 Phone: +46 90 785 12 06

Course certificate
 Course Code: MEFU004

Research Methodology and Philosophy of Science – an introduction, hp 3 ECTS

Vetenskapsteori och vetenskapliga metoder - en introduktion, 3 hp

Caroline Pappiani

860922

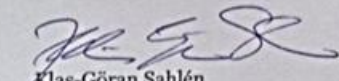
has, in accordance with the provisions of the Higher Educational Ordinance (1993:100)
 completed the above course and been awarded the following grade

Pass

2015-04-13

This course is an introduction to common concepts and theories used in research methodology (quantitative and qualitative methods), epidemiological studies and philosophy of science. The educational format is a mixture of plenary lectures, group work sessions, participant's own presentations and a take home assignment.

On behalf of the Office of the Vice Chancellor


 Klas-Göran Sahlén
 Principal course coordinator

The grade awarded for the course is pass. An academic year is equivalent to 40 weeks of full-time study and comprises 60 higher education credits. One term of full time studies corresponds to 30 higher education credits. This course certificate is in accordance with a syllabus issued on June 12, 2007.



Umeå University, SE-901 87 Umeå, Sweden
Epidemiology and Global Health
Karin Johansson
Phone: +46 90 785 2769. Fax: +46 90 138977
E-mail: karin.johansson@epiph.umu.se
www.umu.se

LETTER OF ACCEPTANCE
2015-02-06

Admission to the research course Methods in Social Epidemiology

I hereby inform you that you are accepted to the course "Methods in Social Epidemiology", 3 ECTS, May 18-22, 2015.

If you are prevented from taking the course, please inform me as soon as possible.

Further information about the course will be sent to you later on.

Best regards

UMEÅ UNIVERSITY
Epidemiology and Global Health
Dept. of Public Health and Clinical Medicine
Umeå, Sweden

A handwritten signature in blue ink that reads 'Karin Johansson'.

Karin Johansson
Course administrator

APÊNDICE 8



Article

The Lipid Accumulation Product as Biomarker for New Cardiovascular Risk Factors

Flávia De Conti Cartolano^{†*}, Caroline Pappiani[†], Maria Camila Pruper de Freitas[†], Antônio Augusto Ferreira Carioca[†], Nágila Raquel Teixeira Damasceno^{††}

[†] Affiliation Department of Nutrition, School of Public Health, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil; c.pappiani@usp.br (C.P.); camilapruper@usp.br (M.C.P.F.); dr.augusto@usp.br (A.A.F.C.); nagila@usp.br (N.R.T.D.)

^{*} Correspondance: fdeconti@usp.br; Tel.: +55-11-3061-7865

^{††} These authors contributed equally to this work.

Abstract: The Lipid Accumulation Product (LAP) index represents a simple tool able to identify individuals with traditional cardiovascular risk factors. However, its association with potential new biomarkers is not described in the literature. The aim of this study was to associate the LAP index with classic and new biomarkers in Brazilian individuals. This cross-sectional study included patients (n=351) of both genders and ages between 30-74 years. Complete clinical, socio-demographic and familial history disease data were assessed by structure questionnaire. Blood samples were collected after 12h of fasting. Lipid profile, lipoprotein subclasses (size and concentration), blood glucose and insulin were monitored. The LAP index was divided into tertiles and a linear trend was evaluated with the average value of biochemical variables in each tertile using a general linear model test. The results showed that higher values of the LAP index were positively associated with classic cardiovascular risk biomarkers and values of intermediate high density lipoprotein (HDL), small HDL and small low density lipoprotein (LDL). Higher values of the LAP index were also associated with lower values of the HDL-Cholesterol (HDL-C) and percentage of large HDL and large LDL. These findings suggest that LAP index is a robust biomarker to identify individuals with changes in lipoprotein size.

Keywords: LAP index, lipoprotein size, cardiovascular risk.

PACS: J0101

2014-0068

original article

Association of the conicity index with diabetes and hypertension in Brazilian women

Mirelli Dantas Andrade¹, Maria Camilla Pruper de Freitas¹, Aiyne Mayumi Sakumoto¹, Caroline Pappiani¹, Samantha Caesar de Andrade², Vhiane Laudelino Vieira², Nágila Raquel Teixeira Damasceno¹

ABSTRACT

Objective: The goal of this study was evaluate the conicity index (C index) in women and its association with hypertension (SAH) and diabetes mellitus (DM). **Subjects and methods:** This was a cross-sectional study, with 573 women between 20 and 59 years of age. After analysis of clinical and demographic characteristics, anthropometric variables were measured and used to calculate the C index. Plasma glucose and lipid profile were evaluated by standard methods. The analysis of the results was based on logistic regression and the odds ratio (OR) was calculated, which was used to assess the association of the variable outcome with the variable exposure using two logistic regression models that tested the possible influence of the C index in the chance of developing SAH or DM. A confidence interval of 95% was used. **Results:** In the crude and adjusted models, the OR confirmed the association of the C index with DM and HAS. Compared with women that showed C index $p < 75$, the risk of women with C index ($p > 75$) developing DM and SAH was 1.72 and 1.75, respectively. Results demonstrated that the negative impact of age on these associations significantly raised the odds of women having DM and SAH. The high C index was also linked to low HDL-C. **Conclusion:** The C index is an important tool in estimating the risk of diabetes and hypertension in women. Besides, high C indexes are negatively associated with HDL-C, an important lipid marker related to cardiovascular risk.

Keywords

Conicity index; diabetes; hypertension; hyperglycemia

¹Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (FSP/USP), São Paulo, SP, Brazil

²Centro de Referência para a Prevenção e Controle de Doenças Associadas à Nutrição (CERNutri), Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula Souza (CSEGPS), Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (FSP/USP), São Paulo, SP, Brazil

Correspondence to:

Nágila Raquel Teixeira Damasceno
Faculdade de Saúde Pública,
Departamento de Nutrição,
Universidade de São Paulo
Av. Doutor Arnaldo, 715
01240-004 - São Paulo, SP, Brazil
nagle@usp.br

Received on Jun/30/2015
Accepted on Nov/5/2015

INTRODUCTION

Cardiovascular disease (CVD) is the main cause of early morbidity and mortality all over the world, significantly affecting the resources of public policy programs. Although CVDs are multifactorial, it is known that systemic arterial hypertension (SAH) and diabetes mellitus (DM) are, respectively, the first (13%) and the third (6%) cardiovascular risk factors in the worldwide population (1). Besides these factors, overweight and obesity have an important negative role, as they are, together, responsible for 5% of the CVDs. Following the global trend, in 2012, CVDs were responsible for 33% of all deaths and 74% of the deaths caused by chronic, non-transmissible diseases in Brazil (1).

It is known that obesity has a direct impact on the development of CVD, and it is an aggravating circumstance for risk factors such as dyslipidemias (DLP), SAH, and DM. According to the World Health Organization, increased obesity is also one of the main

health concerns worldwide. It is estimated that, in all regions of the world, obesity has doubled from 1980 to 2008 and, in 2012, it was estimated that obesity affected half billion people (12% of the population) (1).

Considering the role of obesity in CVD, Valdez proposed the Conicity Index (C Index), which was developed as an indicator of obesity and body fat distribution (2). This index considers that central obesity, more than generalized obesity, is associated with the development of CVD (3,4).

The C index is based on the hypothesis that people that accumulate fat around the abdomen have a shape similar to a double cone (that is, two cones sharing the same base, one placed over the other), whereas those people that have less fat in the central region have the shape of a cylinder. Therefore, C index estimation uses variables such as weight, height, and abdominal circumference (AC). The index is calculated using the formula below (4,5).

APÊNDICE 10

Nutrire. 2015 Dec;40(3):262-269

ARTIGO ORIGINAL

<http://dx.doi.org/10.4322/2316-7874.79715>

Associação entre o Produto da Acumulação Lipídica e marcadores aterogênicos é independente do sexo, idade e uso de medicamentos hipolipemiantes

Association between Lipid Accumulation Product and atherogenic markers is sex, age and lipid-lowering drugs use independent

ABSTRACT

Objective: This study aimed to evaluate the association between Lipid Accumulation Product and biochemical markers and verify how it is affected by sex, age and medication use. **Methods:** This is a cross-sectional study including biochemical, clinical, demographic and anthropometric data from 617 individuals, both sexes, between 20 and 59 years old, without previous cardiovascular event. Data was collected between 2000 and 2014. The influence of Lipid Accumulation Product on the biochemical variables levels was assessed by multiple linear regression analysis for men and women. Statistical analyzes were performed using SPSS version 20.0 software at significance level of $p < 0.05$. **Results:** Both sexes presented overweight and increased waist circumference. The median Lipid Accumulation Product was 57.8 and men showed higher values than women. In both sexes, the Lipid Accumulation Product significantly influenced the total cholesterol and high-density lipoprotein levels and these results were adjustment variables (age and hypolipidemic agents) independent. **Conclusions:** Results showed that Lipid Accumulation Product was associated with low HDL levels and increased concentrations of TC regardless of sex, age and lipid-lowering drugs.

Keywords: Obesity, abdominal. Dyslipidemia. Cardiovascular diseases.

RESUMO

Objetivo: Analisar a associação do Produto da Acumulação Lipídica com marcadores bioquímicos e verificar a influência do sexo, idade e uso de medicamentos sobre as associações. **Métodos:** O estudo é de corte transversal com 617 indivíduos de ambos os sexos e idade entre 20 e 59 anos, sem registro de evento cardiovascular prévio. Dados bioquímicos, clínicos, demográficos e antropométricos foram coletados entre os anos de 2000 e 2014. Para analisar a influência do Produto da Acumulação Lipídica na concentração das variáveis bioquímicas, foram realizadas análises de regressão linear múltipla para homens e mulheres. As análises estatísticas foram feitas no programa SPSS versão 20.0 considerando um valor de significância $p < 0,05$. **Resultados:** Ambos os sexos apresentaram excesso de peso e circunferência da cintura elevada. A mediana do Produto da Acumulação Lipídica foi 57,8 sendo que os homens apresentaram valores superiores às mulheres. Em ambos os sexos, o Produto da Acumulação Lipídica influenciou de maneira significativa as concentrações de colesterol total e colesterol associado à lipoproteína de alta densidade e estes resultados foram independentes das variáveis de ajuste (idade e medicamentos hipolipemiantes). **Conclusão:** Os resultados obtidos mostram que o Produto da Acumulação Lipídica se associou com baixos valores de HDL e elevada concentração de CT, independentemente do sexo, idade e medicamentos hipolipemiantes.

Palavras-chave: Obesidade central. Dislipidemia. Doenças cardiovasculares.

Alyne Mayumi Sakamoto^{1*},
Caroline Pappiani¹, Mirelli Dantas
Andrade¹, Maria Camilla Pruper
de Freitas¹, Samantha Caesar
de Andrade², Viviane Laudelino
Vieira², Náglia Raquel Tebela
Damasceno¹

¹Departamento de Nutrição,
Faculdade de Saúde Pública,
Universidade de São Paulo - USP,
São Paulo-SP, Brasil

²Centro de Referência para a
Prevenção e Controle de Doenças
Associadas à Nutrição - CRINutri,
Centro de Saúde Escola Geraldo
de Paula Souza - CSEGPS,
Faculdade de Saúde Pública - FSP,
Universidade de São Paulo - USP,
São Paulo-SP, Brasil

*Dados para correspondência:

Alyne Mayumi Sakamoto
Departamento de Nutrição,
Faculdade de Saúde Pública - Av.
Doutor Arnaldo, 715, CEP 01246-904,
São Paulo-SP, Brasil
E-mail: alyne.mayumi@gmail.com

CURRÍCULO LATTES

22/02/2016

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Caroline Pappiani)

 Currículo **Lattes**

English

[Dados gerais](#)
[Formação](#)
[Atuação](#)
[Projetos](#)
[Produções](#)
[Eventos](#)
[+](#)


Caroline Pappiani

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6547065785545540>

Última atualização do currículo em 19/02/2016.

Possui Graduação em Nutrição pela Fundação Universidade Regional de Blumenau (2010). Realizou estágio de Doutorado Sanduíche na Universidade de Umeå - Suécia (2015). Atualmente é Doutoranda em Ciências, na área de Nutrição em Saúde Pública, pela Faculdade de Saúde Pública da USP (FSP-USP) e membro da Equipe de Pesquisadores do Estudo CARDIONUTRI (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

Caroline Pappiani 

Nome em citações bibliográficas

PAPPIANI, C.

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
 Av. Dr. Arnaldo, 715, Departamento de Nutrição
 Cerqueira Cesar
 01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil
 Telefone: (11) 30617865



Dados gerais Formação Atuação Projetos Produções Inovação Eventos Orientações Bancas Citações



Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8729581028091781>

Última atualização do currículo em 09/02/2016

Possui Graduação em Nutrição pela Universidade Estadual do Ceará (1995), Mestrado (1997) e Doutorado (2001) em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo. Realizou estágios de Pós-doutoramento em Imunologia (USP, 2004) e Nutrição e Endocrinologia (Universidade de Barcelona, Espanha, 2010). Atualmente é professora associada da Universidade de São Paulo, vinculada ao Depto de Nutrição e diretora da Divisão de Nutrição e Dietética do Hospital Universitário da mesma universidade. Mantém colaboração com grupos e universidades nacionais e internacionais, visando à excelência na formação de mestres, doutores e pós-doutores na área de Nutrição. É membro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos (INCT-FCx), membro do conselho deliberativo do Núcleo de Apoio à Pesquisa de Fluidos Complexos (NAP-FCx), coordenadora do Programa de Cooperação Internacional Brasil - Suécia (STINT-CAPEP) e conselheira científica do Conselho Regional de Nutrição (CRN-3). Nos últimos anos tem coordenado pesquisas na área de Nutrição e Doenças Crônicas (DCV, Obesidade, Câncer), com ênfase em aspectos lipídicos, oxidativos e inflamatórios. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Nome em citações bibliográficas

DAMASCENO, N. R. T.; DAMASCENO, NAGILA RAQUEL TEIXEIRA; DAMASCENO, N. R. T.; DAMASCENO, NÁGILA RAQUEL TEIXEIRA