**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

MARINA BALIEIRO CETRULO

**Efeitos da suplementação de ômega 3 no perfil lipídico, marcadores de
inflamação e do estresse oxidativo, em adultos soropositivos para o HIV em
terapia antirretroviral.**

**Ribeirão Preto
2018**

MARINA BALIEIRO CETRULO

Efeitos da suplementação de ômega 3 no perfil lipídico, marcadores de inflamação e do estresse oxidativo, em adultos soropositivos para o HIV em terapia antirretroviral.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior

Ribeirão Preto
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cetrulo, Marina Balieiro.

Efeitos da suplementação de ômega 3 no perfil lipídico, marcadores de inflamação e do estresse oxidativo, em adultos soropositivos para o HIV em terapia antirretroviral.

90 p.: il.;30cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior

1. HIV. 2. Ômega 3. Perfil lipídico. 4. Marcadores inflamatórios. 5. Estresse oxidativo..

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: CETRULO, Marina Balieiro

Título: Efeitos da suplementação de ômega 3 no perfil lipídico, marcadores de inflamação e do estresse oxidativo, em adultos soropositivos para o HIV em terapia antirretroviral.

Tese apresentada à Faculdade
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Francisco e Regina, por toda a dedicação à minha formação, que tornaram possível a conclusão desta etapa tão importante da minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior, pela oportunidade e confiança depositada em mim para realização deste trabalho, e também pela paciência e compreensão ao longo destes anos.

À equipe do Laboratório de Nutrição e Metabolismo, em especial a técnica Paula Payão, pela contribuição indispensável nas análises laboratoriais.

Aos amigos e colegas de pós-graduação Bruna Ramos da Silva, Heric Holland e Camila Manca, pelo apoio prestado na execução deste trabalho além do convívio prazeroso nos momentos de estudo.

À equipe de funcionários da Unidade Especializada em Tratamento de Doenças Infectocontagiosas (UETDI), pela colaboração durante a realização da coleta de dados.

Aos voluntários, que aceitaram participar da pesquisa, sem eles nada seria possível.

Às minhas amigas, primos e familiares que estiveram presentes nesta caminhada, com atitudes de incentivo, carinho e amor.

Ao meu noivo por todo apoio e compreensão prestados nos momentos mais difíceis.

Ao meu filho Gabriel, que me motivou e me acompanhou no final desta jornada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio financeiro à pesquisa para a realização deste estudo.

“As coisas sempre parecem impossíveis até que sejam feitas. ”

Nelson Mandela

RESUMO

CETRULO, Marina Balieiro. Efeitos da suplementação de ômega 3 no perfil lipídico, marcadores de inflamação e do estresse oxidativo, em adultos soropositivos para o HIV em terapia antirretroviral. 2018. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018.

A terapia antirretroviral mudou o panorama da AIDS, entretanto, seus efeitos tóxicos no organismo estão associados com alterações metabólicas, na composição corporal, e no aumento do risco de doenças cardiovasculares. A dieta possui importante papel no controle de doenças cardiovasculares, e o ômega 3 tem sido reportado na literatura como protetor destas doenças, atribuído principalmente à sua função anti-inflamatória e de melhora no perfil lipídico. Com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação de ômega 3 no perfil lipídico, em marcadores de inflamação e do estresse oxidativo de adultos soropositivos em terapia antirretroviral (TARV), realizamos um ensaio clínico randomizado duplo-cego por 12 semanas em 3 grupos: grupo ômega 3 (5 cápsulas de 1g de óleo de peixe/dia; total de 2750mg de ômega 3); grupo placebo (5 cápsulas de 1g de óleo de girassol/dia); grupo combinado (2 cápsulas de 1g de óleo de peixe + 3 cápsulas de 1 g de óleo de girassol/dia; total de 1100mg de ômega 3). Analisamos antes e após a intervenção, como variáveis de interesse primário, os exames bioquímicos: perfil lipídico, marcadores de inflamação (TNF- α , IL6, IL-10 e PCR) e marcadores do estresse oxidativo (MDA, GSH e vitamina E); e como variáveis de interesse secundário: perfil de ácidos graxos, proteínas totais, glicose, ácidos graxos livres e metilação do DNA. Caracterizamos a ingestão alimentar antes e após a intervenção por recordatório alimentar de 24h e classificamos o estado nutricional pelo índice de massa corporal (IMC). Nas análises estatísticas utilizamos: ANOVA de Medidas Repetidas Modelo Mixto, teste do χ^2 , teste exato do χ^2 , e teste de Shapiro-Wilks. Adotamos como nível de significância $p \leq 0.05$. Os resultados mostraram alterações estatisticamente significantes no grupo ômega 3 em que houve: aumento no colesterol total (de 194mg/dl para 212,7mg/dl; $p=0,005$), redução no MDA (de 10,5 μ M para 6,6 μ M; $p=0,001$) e aumento na vitamina E (de 8,7 μ M para 10,7 μ M; $p=0,001$); no grupo placebo: redução nos triglicérides (de 314,8mg/dl para 219,2mg/dl; $p=0,004$), aumento na IL-10 (de 1,8pg/ml para 3,2pg/ml; $p=0,03$), redução no MDA (de 9,1 μ M para 6,5 μ M; $p=0,001$), aumento na vitamina E (de 9 μ M para 11 μ M; $p=0,001$), aumento na metilação do DNA (de 45,7ng/ml para 49,4ng/ml; $p=0,007$); e no grupo combinado: aumento no HDL colesterol (de 29,2mg/dl para 33,6mg/dl; $p=0,04$); redução no MDA (de 9,2 μ M para 6,6 μ M; $p=0,001$) e aumento na vitamina E (de 11,3 μ M para 11,6 μ M; $p=0,001$). Conclusão: A suplementação com ômega 3, em doses distintas, trouxe benefícios apenas para o quadro de estresse oxidativo (MDA e vitamina E). O grupo placebo, além do estresse oxidativo, apresentou melhoria no perfil lipídico (redução nos triglicérides), na inflamação (aumento na IL-10) e na metilação do DNA. Dessa forma, fica aberta a possibilidade de investimentos em pesquisas que avaliem a suplementação com óleo de girassol (grupo placebo) em pacientes soropositivos em uso de TARV, abrindo novas alternativas terapêuticas de intervenção de baixo custo e efeitos colaterais.

Palavras-chave: HIV. Ômega 3. Perfil lipídico. Marcadores inflamatórios. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Cetrulo, Marina Balieiro. Effects of ômega 3 supplementation on lipid profile, inflammation markers and oxidative stress in adult HIV-infected patients undergoing antirretroviral therapy. 2018. 90f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018.

The antiretroviral therapy has changed the AIDS landscape worldwide, however its toxic effects on the body are associated with metabolic changes, body composition, and increased risk of cardiovascular diseases. The diet plays an important role controlling cardiovascular diseases, and omega-3 has been reported in the literature as a protection against these diseases, mainly because of its anti-inflammatory function and improvement of the lipid profile. To evaluate the effect of omega-3 supplementation on the lipid profile, in markers of inflammation, and oxidative stress of seropositive adults in antiretroviral therapy (ART); we performed a double-blind, randomized clinical trial for 12 weeks in three groups. First, the group omega-3 (5 capsules of 1g of fish oil per day, total of 2750mg of omega-3); second, the placebo group (5 capsules of 1g of sunflower oil / day); and third, the combined group (2 capsules of 1g of fish oil 3 capsules of 1g of sunflower oil / day, total of 1100mg of omega-3). We conducted pre and posttests and set primary interest variables from the following biochemical tests: lipid profile, markers of inflammation (TNF- α , IL-6, IL-10, and CRP), and markers of oxidative stress (MDA, GSH and vitamin E). We defined as secondary interest variables: profile of fatty acids, total proteins, glucose, free fatty acids and DNA methylation. We also characterized the food intake before and after the 24-hour using food recall intervention and classified the nutritional status by body mass index (BMI). In the statistical analysis, we used: Mixed Measurement Repeated ANOVA, X² test, X² exact test, and Shapiro-Wilks test. We adopted $p \leq 0.05$ as the significance level. The findings showed that there were statistically significant alterations in the omega-3 group: increase in total cholesterol (from 194mg / dl to 212.7mg / dl, $p = 0.005$), reduction in MDA (from 10.5 μ M to 6.6 μ M ; $p = 0.001$) and increase in vitamin E (from 8.7 μ M to 10.7 μ M, $p = 0.001$); in the placebo group: reduction in triglycerides (from 314.8mg / dl to 219.2mg / dl, $p = 0.004$), increase in IL-10 (from 1.8pg / ml to 3.2pg / ml, $p = 0.03$), reduction in MDA (from 9.1 μ M to 6.5 μ M, $p = 0.001$), increase in vitamin E (from 9 μ M to 11 μ M, $p = 0.001$), increase in DNA methylation (from 45.7 ng / ml to 49.4 ng / ml, $p = 0.007$); and in the combined group: increase in HDL cholesterol (from 29.2 mg / dl to 33.6 mg / dl, $p = 0.04$); reduction in MDA (from 9.2 μ M to 6.6 μ M, $p = 0.001$) and increase in vitamin E (from 11.3 μ M to 11.6 μ M, $p = 0.001$). Conclusion: Omega-3 supplementation, in different doses, benefited only the oxidative stress scenario (MDA and vitamin E). The placebo group, in addition to oxidative stress, showed improvement in the lipid profile (triglycerides rates decreased), inflammation (IL-10 rates increased), as well in the DNA methylation. However, there is an open opportunity of doing research in evaluating the sunflower oil supplementation (placebo group) in seropositive patients using HAART, that could lead to new low-cost therapeutic alternatives with less problematic side effects.

Keywords: HIV. Omega 3. Lipid profile. Inflammation. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via de formação do AA, EPA e DHA e formação dos eicosanóides.	27
Figura 2 – Possíveis mecanismos de ação do ômega 3 na redução de triglicérides.	29
Figura 3 – Esquema do planejamento experimental.	38
Figura 4 – Cápsulas fornecidas aos voluntários da pesquisa.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das análises laboratoriais para desfechos primários.....	40
Tabela 2 – Classificação do índice de massa corporal (IMC).....	48
Tabela 3 – Número de voluntários que iniciaram e número de concluintes da intervenção.....	51
Tabela 4 – Características sócio demográficas e histórico clínico dos grupos no início do estudo.....	53
Tabela 5 – Perfil lipídico antes e após intervenção entre os grupos.	54
Tabela 6 – Marcadores inflamatórios antes e após intervenção entre os grupos.....	56
Tabela 7 – Marcadores do estresse oxidativo antes e após intervenção entre os grupos.	57
Tabela 8 – Glicose antes e após intervenção entre os grupos.....	59
Tabela 9 – Proteínas totais antes e após intervenção entre os grupos.....	59
Tabela 10 – Ácidos graxos livres antes e após intervenção entre os grupos.	60
Tabela 11 – Metilação do DNA antes e após intervenção entre os grupos.....	61
Tabela 12 – Perfil sérico de ácidos graxos antes e após intervenção entre os grupos.	64
Tabela 13 – Índice de massa corporal (IMC) antes e após intervenção entre os grupos.	65
Tabela 14 – Ingestão de calorias e perfil do consumo de lipídios antes e após a intervenção entre os grupos.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Perfil lipídico do grupo ômega 3 antes e após intervenção.....	55
Gráfico 2 – Perfil lipídico do grupo placebo antes e após intervenção.	55
Gráfico 3 – Perfil lipídico do grupo combinado antes e após intervenção.	55
Gráfico 4 – Interleucina 10 (IL-10) no grupo placebo antes e após intervenção.	57
Gráfico 5 – Malondialdeído (MDA) e vitamina E do grupo ômega 3 antes e após intervenção.....	58
Gráfico 6 – Malondialdeído (MDA) e vitamina E do grupo placebo antes e após intervenção.....	58
Gráfico 7 – Malondialdeído (MDA) e vitamina E do grupo combinado antes e após intervenção.....	58
Gráfico 8 – Glicose antes e após intervenção no grupo ômega 3, grupo placebo e grupo combinado.....	59
Gráfico 9 – Proteínas totais antes e após intervenção no grupo ômega 3, grupo placebo e grupo combinado.	60
Gráfico 10 – Ácidos graxos livres antes e após intervenção no grupo ômega 3, grupo placebo e grupo combinado.	60
Gráfico 11 – Metilação do DNA antes e após intervenção no grupo ômega 3, grupo placebo e grupo combinado	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC – acetil CoA carboxilase
AGNE – ácidos graxos não esterificados
AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALA – ácido graxo α -linolênico
ANOVA – método de Análise de Variância
Apo B-100 – apoliproteínas B-100
ARA – ácido araquidônico
CD4 – linfócitos T CD4
CD8 – linfócitos T CD8
COX – enzima cicloxigenase
CRABP-1 – proteína de ligação ao ácido retinóico celular 1
DGAT – acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase
DHA – ácido graxo docosapentanóico
DNA – ácido desoxirribonucleico
DPA – ácido graxo docosapentaenóico
EPA – ácido graxo eicosapentanóico
FAS – ácido graxo sintetase
FDA - Food and Drug Administration
FXR – receptor farnesóide X
GLA – ácido graxo gamalinolênico
GSH – Glutathione reduzida
HDL – high density lipoprotein
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
IL-10 – Interleucina 10
IL-6 – interleucina 6
IP – inibidores de protease (IP)
ITRN – inibidor de transcriptase reversa análogos de nucleosídeo
ITRNN – inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo
LA – ácido graxo linoleico
LDL – low density lipoprotein
LOX – enzima lipoxigenase
LXR – receptor X do fígado
MDA – Malondialdeído

MUFA – ácido graxo monoinsaturado

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – proteína C reativa

PPAR – receptor ativado por proliferador do peroxisoma

PUFA – ácido graxo poli-insaturado

RNA – ácido ribonucleico

RXR – receptor retinóide X

SREBP-1 – proteína ligada ao elemento regulado por esterol 1c

STD – ácido graxo estearidônico

TARV – terapia antirretroviral

TNF- α – fator de necrose tumoral

UPC – unidade de pesquisa clínica

VLDL – very low density lipoprotein

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Aspectos gerais do HIV	18
1.2 Epidemiologia do HIV no Brasil e no mundo	19
1.3 Tratamento do HIV: Terapia antirretroviral (TARV)	20
1.4 HIV, antirretrovirais, síndrome da lipodistrofia e síndrome metabólica	21
1.5 Ácidos graxos poli-insaturados (PUFA's) e seu papel anti-inflamatório e cardioprotetor.....	23
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	32
2.1 Justificativa.....	32
2.2 Hipótese	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4 METODOLOGIA.....	36
4.1 Delineamento Experimental	36
4.2 Composição das cápsulas de suplementação: óleo de peixe e placebo	39
4.3 Análise bioquímica laboratorial	40
4.3.1 Perfil Lipídico.....	41
4.3.1.1 Determinação de Colesterol Total	41
4.3.1.2 Determinação de triglicérides	41
4.3.1.3 Determinação da HDL colesterol	42
4.3.2 Marcadores inflamatórios	42
4.3.2.1 Proteína C Reativa (PCR)	42
4.3.2.2 Interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral (TNF- α).....	42
4.3.3 Marcadores do estresse oxidativo.....	43
4.3.3.1 Malondialdeído (MDA)	43
4.3.3.2 Glutathiona reduzida (GSH)	43
4.3.3.3 Vitamina E	44
4.3.4 Glicose	44
4.3.5 Proteínas totais	45
4.3.6 Ácidos graxos livres	45

4.3.7	Metilação do DNA	45
4.3.8	Determinação de Ácidos Graxos.....	46
4.4	Avaliação do estado nutricional.....	47
4.4.1	Peso corporal total	47
4.4.2	Estatura.....	47
4.4.3	Cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC).....	47
4.5	Avaliação da ingestão alimentar	48
4.6	Análise estatística	49
5	RESULTADOS.....	51
5.1	Recrutamento dos voluntários.....	51
5.2	Características basais da população de estudo.....	52
5.3	Análises bioquímicas laboratoriais antes e após o período de intervenção .	54
5.3.1	Perfil lipídico	54
5.3.2	Marcadores inflamatórios	56
5.3.3	Marcadores do estresse oxidativo	57
5.3.4	Glicose.....	59
5.3.5	Proteínas totais.....	59
5.3.6	Ácidos graxos livres.....	60
5.3.7	Metilação do DNA.....	61
5.3.8	Perfil de ácidos graxos	62
5.4	Avaliação do estado nutricional antes e após o período de intervenção.....	65
5.5	Avaliação da ingestão alimentar antes e após o período de intervenção.....	65
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	ANEXOS	86
	ANEXO A - Modelo de protocolo de pesquisa e recordatório alimentar de 24h. ..	86
	ANEXO B - Parecer circunstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).	87
	Anexo C - Lauda técnico das cápsulas de ômega 3 e óleo de girassol	88

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do HIV

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o retrovírus que leva a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). A origem da doença não está totalmente elucidada na literatura causando divergência entre alguns autores. Worobey et al. (2008) relatam que a mais antiga identificação do vírus ocorreu no Congo Belga em 1959. Já para Melbye et al. (1984), não existem evidências suficientes de que o vírus tenha origem africana e sugerem que o HIV estava presente nos Estados Unidos a partir de 1976 passando para a Europa dois anos depois. Gilbert et al. (2007) acham provável que o HIV tenha migrado da África para o Haiti, e em seguida para os Estados Unidos. O que se sabe com certeza é que a primeira publicação com o relato da doença aconteceu em junho de 1981 nos Estados Unidos, onde o jornal *“Morbidity and Mortality Weekly Report”* publicou um artigo sobre cinco casos de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* em homens homossexuais (CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1982).

Apesar da origem da doença causar divergência entre alguns autores, as vias de transmissão do HIV estão muito claras na literatura: o contato sexual desprotegido, exposição sanguínea (em especial transfusões e drogas injetáveis) e a transmissão vertical, de mães infectadas aos seus filhos, tanto na hora do parto quanto na amamentação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Após a exposição ao vírus, existe um período variável em que a doença não se manifesta, no qual os testes para o HIV são negativos e apresentam resultado positivo somente em torno de 4 a 12 semanas depois da infecção. Mesmo após a soro conversão, o vírus permanece no organismo de forma latente por um período longo, e em determinado momento começa a se reproduzir dizimando os glóbulos brancos, em especial os linfócitos. (RACHID; SCHECTER, 2003).

Alguns indivíduos apresentam uma evolução da doença mais rápida do que outros, isso ocorre por razões inerentes ao próprio indivíduo (fatores genéticos e a idade), como também por característica do vírus. As características do vírus incluem tipos, grupos, subtipos, sub-subtipos e formas recombinantes. O HIV-1 e o HIV-2 são tipos distintos do vírus, sendo que o HIV-1 é o mais prevalente hoje no Brasil. Em

Ribeirão Preto (SP) o HIV-1 em sua variante B é o mais prevalente correspondendo a 57% dos casos da cidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). E em relação à progressão da doença, podemos dizer que o HIV-1 e seus subtipos provocam uma progressão mais rápida (RACHID; SCHECTER, 2003).

O HIV infecta preferencialmente os linfócitos T CD4 (CD4) e células como os macrófagos, que possuem receptores CD4, ocasionando redução das células CD4 e consequentemente redução da razão CD4/CD8 (linfócitos T CD4/linfócitos T CD8). A replicação do material genético do HIV acontece pelo processo de retro transcrição reversa, em que uma molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico) é transcrita a partir do RNA (ácido ribonucleico) pela transcriptase reversa (GALLO et al., 1984). Em pessoas infectadas pelo HIV, a persistente replicação viral leva a uma redução progressiva da imunidade celular, viabilizando diversas manifestações de doenças oportunistas graves que caracterizam a AIDS (CHAISSON; KERULY; MOORE, 2000). No Brasil, para um caso de AIDS ser notificado é preconizado o diagnóstico de ao menos uma doença indicativa oportunista e/ou contagem de células CD4 <200 células/mm³ (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

1.2 Epidemiologia do HIV no Brasil e no mundo

A infecção pelo HIV vem se mostrando como um fenômeno global, instável e dinâmico (FONSECA; BASTOS et al., 2007). Segundo o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS, 2017), 36,9 milhões de pessoas vivem com o HIV no mundo. Embora o panorama epidemiológico mundial esteja melhorando ano a ano, o número de novas infecções anuais permanece alto, em 2017 houve 1,8 milhão de novas infecções pelo HIV e 940 mil pessoas morreram por causas relacionadas à AIDS no mesmo ano (UNAIDS, 2017). No Brasil, apesar da epidemia permanecer controlada, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera que a AIDS é concentrada, uma vez que a prevalência da infecção é maior que 5% em populações com comportamento de alto risco (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O primeiro caso de AIDS no Brasil ocorreu em 1980 na cidade de São Paulo. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). De 1980 a 2017, foram identificados no país 882.810 casos de AIDS. Em média foram registrados 40 mil novos casos nos últimos

cinco anos. As regiões com maiores prevalências são as regiões Sudeste com 52,3% dos casos e a região Sul com 20,1% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Em relação ao gênero, do total de casos notificados no Brasil, desde 1980, 65,3% são do sexo masculino e 34,7% do sexo feminino. Até o ano de 2009 a proporção de casos entre homens e mulheres era de 15 para 10 respectivamente. A partir de 2009, começou uma queda nos casos de AIDS em mulheres e um aumento nos casos em homens, o que refletiu na proporção, que passou a ser no ano de 2016, de 22 casos de AIDS em homens para cada 10 casos em mulheres. Esta proporção se torna ainda maior em algumas regiões como no Sudeste e Centro-Oeste chegando em 26 casos em homens para 10 mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A faixa etária mais acometida no Brasil pelo HIV/AIDS é entre 25 e 39 anos. 52,9% dos casos do sexo masculino e 49% dos casos do sexo feminino registrados entre 1980 e 2017 estão nessa faixa etária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A mortalidade pela doença vem diminuindo ano a ano no Brasil, principalmente pela introdução do tratamento com antirretrovirais que atualmente possui uma política de tratamento a toda população. Ainda assim, no total já foram registrados no Brasil 316.088 casos de óbitos tendo HIV/AIDS como causa básica (CID10:B20 a B24) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

1.3 Tratamento do HIV: Terapia antirretroviral (TARV)

A introdução da terapia antirretroviral (TARV), também conhecida como Terapia Antirretroviral de Alta Potência (HAART – *Highy Active Antiretroviral Therapy*) modificou o status do HIV de uma doença fatal para uma doença crônica (GOEBEL, 1995). No Brasil, a TARV começou a ser distribuída gratuitamente em 1991. Em 1996 foi sancionada a Lei nº9313/96 que tornou obrigatório e de responsabilidade do Estado a disponibilização do tratamento mais adequado aos portadores de HIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996).

Os primeiros antirretrovirais que surgiram se restringiam ao inibidor de transcriptase reversa análogos de nucleosídeo (ITRN) e aos inibidores de protease (IP). Posteriormente surgiu o inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo (ITRNN) (STASZEWSKI et al., 2001).

O Programa Nacional de Doença Sexualmente Transmissível e AIDS, preconiza como tratamento a combinação destas três drogas. Incluem, geralmente, dois ITRN's, associados a um ITRNN, ou com um IP (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

O objetivo principal do tratamento com a TARV é retardar a progressão da imunodeficiência ou ainda restaurar a imunidade quando já foi afetada, desta forma é possível aumentar a qualidade e o tempo de vida do paciente soropositivo. Entretanto, nenhum medicamento é capaz ainda de erradicar o HIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Segundo recomendações do Ministério da Saúde (2008), a TARV deve ser recomendada para indivíduos sintomáticos ou com contagem de células CD4 menor que 200mm³.

Apesar dos benefícios da TARV existem efeitos tóxicos associados ao seu uso relacionados principalmente com alterações metabólicas e alterações na composição corporal e consequentemente um aumento no risco de doenças cardiovasculares (BEDIMO, 2008; BATTERHAM; GARSIA, 2011).

1.4 HIV, antirretrovirais, síndrome da lipodistrofia e síndrome metabólica

Os efeitos tóxicos associados ao uso da TARV que englobam alterações metabólicas e alterações de composição corporal são conhecidos como síndrome da lipodistrofia. Esta síndrome foi descrita de forma oficial pela Food and Drug Administration (FDA), em 1997, com uma prevalência de até 80% em usuários da TARV (PATON, 2002). As alterações na composição corporal podem ocorrer de duas formas: lipoatrofia e lipohipertrofia. Na lipoatrofia ocorre a perda de gordura subcutânea em partes do corpo como o rosto, pernas, braços e glúteos. Já na lipohipertrofia ocorre o ganho de gordura subcutânea na região abdominal, dorso cervical e nas mamas, tanto em homens quanto em mulheres (OH; HEGELE, 2007).

Das alterações metabólicas causadas pela síndrome, estão a dislipidemia em que podem ocorrer aumento sérico de colesterol total, colesterol LDL (low density lipoprotein) e triglicérides, e uma redução do HDL (high density lipoprotein), além do aumento da resistência à insulina e diabetes mellitus (BARBARO, 2006).

Pouco está esclarecido sobre a etiologia da síndrome da lipodistrofia. O que os autores sugerem é que o uso da TARV está relacionada a efeitos metabólicos

induzidos pela droga, juntamente com fatores do próprio vírus HIV, questões hormonais, genética e fatores de risco tradicionais, como dieta e sedentarismo (OH; HEGELE, 2007; BARBARO, 2006). Liang et al. (2001) mostrou que alguns IPs são capazes de inibir a absorção da glicose pelo músculo, por inibirem a molécula GLUT4, o que resultaria num aumento de gordura no sangue e também a lipohipertrofia. Já outros pesquisadores mostraram que os ITRNs e os ITRNNs, são tóxicas as mitocôndrias podendo afetar suas funções, e desta forma estariam diretamente relacionadas à lipoatrofia, à resistência insulínica e à dislipidemia (BLUMER et al., 2008; GALLANT, 2006).

Um dos mecanismos propostos para elucidar o efeito da TARV no metabolismo lipídico diz respeito aos inibidores de protease (IPs). O alvo principal desta medicação é a região catalítica da protease do HIV, que é semelhante às sequências de duas proteínas humanas que regulam o metabolismo lipídico, a região C-terminal da proteína de ligação ao ácido retinóico celular 1 (CRABP-1), e a proteína relacionada ao receptor de LDL (LPR). O papel do CRABP-1 é ligar-se ao ácido retinóico, o qual é convertido em 9-cis ácido retinóico sob a ação de enzimas do citocromo P450. O 9-cis ácido retinóico ativa o receptor ativado por proliferadores do peroxisoma gamma (PPAR- γ), responsável por inibir apoptose e aumentar diferenciação de adipócitos. Já a LPR, localiza-se nos hepatócitos e é responsável pela absorção hepática dos quilomícrons. Desta forma, os IPs causariam alterações metabólicas e lipodistróficas por aumentar a apoptose nos adipócitos e por diminuir a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, causando perda de gordura nas extremidades, redução do estoque lipídico e liberando os lipídios para o sangue (PONTE et al., 2010; TAVARES; HIRATA M.; HIRATA R., 2007).

A TARV também interfere na absorção dos ácidos graxos pelos adipócitos, deixando-os assim na circulação onde são capturados pelo fígado e incorporados em lipoproteínas ricas em triglicérides, o que explicaria a alta prevalência de hipertrigliceridemia nesta população (BARBARO, 2006).

Além das alterações da síndrome da lipodistrofia, esquemas de terapia que incluem ITRNs e ITRNNs e IPs, tem sido relacionado com uma disfunção endotelial com dano do DNA mitocondrial, morte celular, redução da enzima óxido nítrico sintetase e elevação do estresse oxidativo. Estas alterações, juntamente com a

reação autoimune à infecção viral podem contribuir para um quadro hipertensivo (BARBARO; SILVA, 2009).

Desta forma, levando em consideração as possíveis alterações de saúde do paciente soropositivo em uso de TARV, podemos dizer que estes são mais suscetíveis a desenvolver a síndrome metabólica, uma vez que segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2005) essa síndrome é considerada uma entidade complexa que associa fatores de riscos cardiovasculares como dislipidemia, diabetes, circunferência abdominal elevada e hipertensão.

Em um estudo foi comparada a síndrome metabólica entre portadores de HIV (em tratamento ou não) e indivíduos saudáveis. Naqueles que faziam uso da TARV, houve uma prevalência de 15% de síndrome metabólica enquanto que naqueles que eram soropositivos, mas não estavam em tratamento antirretroviral, a prevalência foi de 2%, essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,019$). Também foi encontrado uma maior prevalência de resistência à insulina nos pacientes em tratamento antirretroviral quando comparados aos indivíduos saudáveis (39% a 18%, $p=0,012$) (BERGENSEN et al., 2006).

Alguns autores defendem a ideia de que todas as alterações descritas até aqui estão envolvidas com uma inflamação subclínica pré-existente às alterações da síndrome metabólica, teoria defendida pela produção anormal de citocinas, aumento dos níveis de reagentes de fase aguda e de outros mediadores (YUDKIN, 2007; HOTAMISLIGIL, 2006; SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006).

1.5 Ácidos graxos poli-insaturados (PUFA's) e seu papel anti-inflamatório e cardioprotetor

Os ácidos graxos fazem parte da estrutura de grande parte dos lipídios, possuem cadeias carbonadas e são classificados de acordo com o tamanho da cadeia e a presença ou não de ligações duplas entre os carbonos. São divididos em saturados, quando não existem ligações duplas, ou insaturados, quando possuem uma ou mais ligações duplas. Os insaturados subdividem-se em ácidos graxos monoinsaturados, conhecidos com MUFA's (apenas uma ligação dupla) e ácidos graxos poli-insaturados (mais de uma ligação dupla), conhecidos também como

PUFA's. Os ácidos graxos insaturados podem existir ainda na forma *cis* ou *trans* (TVRZICKA et al., 2011).

O organismo possui capacidade de sintetizar a maioria dos ácidos graxos. No entanto, não possui o sistema enzimático dessaturases e hidrogenases adequado para a síntese de alguns PUFA's, por esse motivo estes ácidos graxos são considerados essenciais, sendo a única fonte a alimentação (TVRZICKA et al., 2011).

A nomenclatura de um ácido graxo inicia-se com o número de carbonos, seguido do número de duplas ligações e a posição da primeira dupla contada a partir do ômega. Há duas subclasses de ácidos graxos essenciais PUFA's, a família ômega 3 e a família ômega 6, os quais apresentam insaturações separadas apenas por um carbono metilênico, com a primeira insaturação no terceiro e sexto carbono respectivamente. Os principais ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 provenientes da dieta são o ácido graxo α -linolênico (ALA) e ácido graxo linoleico (LA), respectivamente (MARTIN et al., 2006).

Em células humanas LA é utilizado como substrato para a síntese do ácido araquidônico (ARA) e outros eicosanóides, enquanto o ALA é utilizado como substrato para outros importantes ácidos graxos ômega 3, o ácido eicosapentanoico (EPA) e o ácido docosapentanoico (DHA). Esta síntese ocorre pela ação de enzimas alongase e dessaturase (FETTERMAN; ZDANOWICZ, 2009). Porém, neste metabolismo, existe competição entre ômega 3 e ômega 6 pelas enzimas de dessaturação. Desta forma o alto consumo de LA interfere na dessaturação e alongação de ALA (CALDER, 2004; RUSSO, 2009).

Uma das enzimas chaves no metabolismo dos PUFA's é a delta-6-dessaturase, que metaboliza LA em ácido gamalinolênico (GLA) e ALA em ácido estearidônico (STD). A afinidade desta enzima por ALA e LA é diferente, a concentração de ALA precisa ser maior que a de LA para inibir a formação de GLA, sinalizando assim que a formação de AA é preferencial do que EPA e DHA (BENATTI et al., 2004). Após a dessaturação pela delta-6-dessaturase, a enzima delta-5-dessaturase inicia um ciclo de alongamentos e dessaturações que vão dar origem a AA e EPA, a partir de LA e ALA respectivamente. Posteriormente, EPA passa por mais dois ciclos de alongamentos e dessaturação ocorrem pela delta-6-dessaturase formando o ácido tetracosaexaenoico e tetracosapentaenoico, esses dois ácidos são

submetidos a beta-oxidação gerando o DHA e DPA (ácido graxo docosapentaenóico, pertencente à família ômega 3 (RUSSO, 2009).

A transição nutricional vivenciada nas últimas décadas, modificou o padrão do consumo de gorduras pela dieta, havendo um aumento no consumo de gordura saturada e gordura trans, e uma redução no consumo de PUFA's, em conjunto com um desbalanço na proporção do consumo de ômega 3 e ômega 6. Além disso, a dieta ocidental também é caracterizada por um aumento na ingesta calórica, redução no consumo de fibras, redução no consumo de hortifrúti e redução no consumo de antioxidantes. Essas alterações no padrão alimentar, contribuíram de forma expressiva para o aumento das doenças crônicas, que vão além das alterações presentes na síndrome metabólica. Artrite, doenças autoimunes e alguns tipos de cânceres também entram nesta lista (SIMOPOULOS, 2009).

Na dieta de nossos antepassados, na época que éramos caçadores, a natureza fornecia naturalmente uma razão equilibrada de ômega 6/ ômega 3 na dieta na ordem de 2:1 a 3:1, devido ao alto consumo de sementes, folhas e raízes, além de alimentos de origem marinha (EATON et al., 1998). Segundo relatório da FAO (1994), o balanço de ômega 6/ômega 3 nas dietas ocidentais atuais é de 20:1 a 25:1, o que é bem distante do consumo de nossos antepassados e também das recomendações atuais que são de 5:1 a 10:1. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995). Este desbalanço tem chamado a atenção na literatura científica pois pode propiciar um cenário inflamatório, o que poderia ser um “*start*” para o surgimento das doenças crônicas (SIMOPOULOS, 2009).

Nos alimentos, ômega 3 e ômega 6, são encontrados em fontes de origem vegetal e em fonte animal. O ômega 3, que é encontrado em alimentos de origem vegetal terrestre são fontes de ALA, e não de EPA e DHA, dentre eles podemos citar a semente de chia e a linhaça. Já os alimentos de origem marinha são ricos em EPA e DHA, como por exemplo as algas marinhas, óleo de peixe, peixes gordurosos como salmão, arenque e cavallinha (OLIVEIRA; RONDÓ, 2011). Já as fontes alimentares vegetais de ômega 6, nas quais encontramos as maiores concentrações, podemos citar o óleo de canola, milho e soja, e entre as fontes animais, em pequenas proporções, o ovo, leite de vaca e carne de frango (MARTIN, 2006).

Com o alto consumo de ômega 6 na dieta ocidental, os metabólitos do LA, são produzidos em maiores quantidades do que os metabólitos do ALA. É sabido que a

cascata metabólica do ômega 6 gera eicosanóides que favorecem a inflamação, enquanto que as do ômega 3 são anti-inflamatórias. Sendo assim, a dieta rica em ômega 6 poderia alterar o estado fisiológico do organismo, favorecendo o aparecimento das doenças da síndrome metabólica e outras doenças crônicas (CALDER, 2010).

Segundo Calder (2006) e Saravanan et al. (2010), o aumento na ingestão de ômega 3 resulta em um aumento de sua concentração nas células inflamatórias, sendo que esta elevação depende também da concentração de ômega 6. Pesquisas com suplementação de ômega 3 em humanos, apontam que existe uma redução de mediadores pró-inflamatórios (prostaglandinas 2, leucotrienos B4, leucotrieno E4 e tromboxano B2), além de um aumento na produção de mediadores anti-inflamatórios (leucotrienos B5 e prostaglandina E3, resolvinas e neuroprotectinas), sugerindo assim uma ação anti-inflamatória com a suplementação de ômega 3 (WALL et al., 2010).

Além do consumo de ômega 6 e ômega 3 interferirem no estado inflamatório do organismo, podem interferir também na composição da membrana celular. A membrana celular atua como uma barreira de permeabilidade seletiva que garante a manutenção de um meio químico adequado aos processos metabólicos. É formada por uma bicamada fosfolipídica, que possui uma extremidade hidrofílica, dirigida ao exterior, e a outra hidrofóbica dirigida ao interior, constituída por ácidos graxos. A conformação espacial dos fosfolipídios depende da constituição dos ácidos graxos, logo quanto maior a quantidade de PUFA's na membrana, maior é o espaço entre eles, devido às duplas ligações presentes, isso permite uma maior movimentação na membrana, tornando-a mais fluida e flexível. Desta forma, as membranas constituídas maioritariamente por PUFA's, são mais fluidas e flexíveis do que outras com menor teor (YEHUDA et al. harri, 2000).

Apesar de tanto ômega 3 quanto ômega 6 poderem ser incorporados nas membranas celulares tornando a célula mais flexível e fluida, os efeitos biológicos entre eles são distintos. Sob a ação das enzimas cicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX), o ômega 6 leva à formação de prostanóides da série 2 e leucotrienos da série 4, compostos com características pró-inflamatórias. Já o ômega 3 é precursor de prostanóides da série 3 e leucotrienos da série 5 que causam uma resposta anti-inflamatória (HARRIS, 2004; RUSSO, 2009). A figura 1, exemplifica a

competição das enzimas metabólicas do ômega 3 (EPA e DHA) pela COX, suprimindo a formação de leucotrienos e tromboxanos.

Figura 1 – Via de formação do AA, EPA e DHA e formação dos eicosanóides.

Legenda: ARA: ácido araquidônico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; COX: enzima cicloxigenase; LOX: enzima lipoxigenase; PG: prostaglandinas; LT: leucotrienos. Fonte: Adaptado de Russo, 2009.

Outro potencial benefício do ômega 3 no metabolismo, é em relação a melhora no perfil lipídico, em especial na redução do triglicérides em pacientes com hipertrigliceridemia (HARRIS et al., 2008). O mecanismo de ação dessa redução na hipertrigliceridemia ainda não está totalmente esclarecido, entretanto, existem algumas hipóteses levantadas na literatura. Estes estudos sugerem que o ômega 3 é capaz de reduzir a síntese e a secreção hepática de VLDL (very low density lipoprotein), e podem aumentar a remoção de triglicérides dos quilomícrons e da VLDL, através de sua interação com fatores de transcrição que regulam a síntese de enzimas envolvidas no metabolismo dos ácidos graxos. Esta teoria, aponta que o ômega 3 seria capaz de inibir a ativação da proteína ligada ao elemento regulado por esterol 1c (SREBP-1c), proteína essa que modula a expressão de enzimas envolvidas

na síntese de ácidos graxos. A inibição da SREBP-1c, ocorre pela ativação dos receptores retinóide X (RXR) e farnesóide X (FXR), que ao serem ativados inibem o receptor X do fígado (LXR). Além disso, o ômega 3 ativa os receptores ativados por PPARs, que modulam enzimas envolvidas na oxidação dos ácidos graxos e também inibem a SREBP-1c. Esses dois mecanismos juntos, contribuem para a redução da síntese de ácidos graxos e consequentemente no aumento da degradação dos ácidos graxos pela β -oxidação no fígado. Isso ocorre porque a inibição da SREBP-1c leva a redução da expressão da acetil CoA carboxilase (ACC) e da ácido graxo sintetase (FAS), reduzindo a síntese de ácidos graxos hepática. A SREBP-1c (inibida neste processo) também modula a expressão da acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase (DGAT), o que também reduz a síntese de triglicérides (Figura 2) (HARRIS et al., 2008).

O aumento da β -oxidação é estimulado pela ativação de PPAR- α , o que leva a uma diminuição do transporte de ácidos graxos não esterificados (AGNE) dos tecidos para o fígado. Assim, ocorre uma menor disponibilidade de ácidos graxos para a síntese de triglicérides, este fato somado à uma diminuição da síntese de apoliproteínas B-100 (Apo B-100), reduz a produção de VLDL pelo fígado. Nos tecidos periféricos ocorre um aumento na remoção de VLDL, devido a ação dos PPARs (Figura 2)(HARRIS et al., 2008).

Figura 2 – Possíveis mecanismos de ação do ômega 3 na redução de triglicérides.

Legenda: ACC: acetil CoA carboxilase; AG: ácidos graxos; AGNE: ácidos graxos não esterificados; APO B-100: apolipoproteína B-100; DGAT: acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase; FAS: ácido graxo sintase; LDL: low density lipoprotein; LPL: lipoproteína lipase; LXR: receptor X do fígado; PPAR: receptores ativado por proliferadores de peroxissomos; RXR: receptor retinóide X; SREBP-1c: proteína ligada ao elemento regulado por esterol 1c; TG: triglicérides; VLDL: very low density lipoprotein. Fonte: Adaptado de Harris et al., 2008.

Considerando os potenciais benefícios do ômega 3 para o metabolismo e a diminuição do consumo destes ácidos graxos na dieta ocidental, alguns pesquisadores se propuseram a suplementar este ácido graxo em pacientes soropositivos e investigar a resposta metabólica destes pacientes principalmente no perfil lipídico e marcadores inflamatórios. Peters et al. (2012), avaliaram em 23 indivíduos o efeito da suplementação de 4g de óleo de peixe (1,8g-EPA; 1,5g-DHA) em pacientes HIV em uso de TARV por 12 semanas, e encontraram uma redução de 27% nos triglicérides. Metkus et al. (2013) avaliaram o efeito da suplementação com ômega 3 (1,6g-EPA; 1,3g-DHA), em pacientes HIV, e observaram após 8 semanas, uma redução significativa nos triglicérides, e nos marcadores de inflamação interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α).

Devido a estudos como estes a suplementação com ômega 3 foi incluída nas recomendações de alguns países como no *European AIDS Clinical Society*, para o tratamento da hipertrigliceridemia em pacientes HIV, onde a dose sugerida é de 1g a 5g de óleo de peixe (LUNDGREN et al., 2008). No Brasil, a Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, publicaram em 2011 as Diretrizes para Terapia Nutricional na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Neste documento é

citado que a suplementação com ômega 3 reduz triglicérides sérico, ARA na fração fosfolípide e parece diminuir a lipogênese associada com a síndrome metabólica com nível de evidência B (COPPINI; JESUS, 2011). Entretanto a magnitude de sua eficácia bem como a dose recomendada não está descrita.

Na população brasileira faltam evidências que sustentem a suplementação de ômega 3 em soropositivos, o único estudo encontrado na literatura em nossa população não corrobora com os resultados observados para as populações que vivem com HIV, pois não foi encontrada melhorias no perfil lipídico e nos marcadores inflamatórios, com uma suplementação de 3g de óleo de peixe/dia (total de 0,54g EPA e 0,36g de DHA) por 24 semana (OLIVEIRA et al., 2014). O estudo em questão utilizou a suplementação de ômega 3 em uma concentração de EPA e DHA de 180/120mg, respectivamente, por cápsula. Esta é a concentração padrão existente no mercado, entretanto existem cápsulas com concentrações mais elevadas que podem trazer maiores benefícios na função cardioprotetora e anti-inflamatória.

JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

2.1 Justificativa

Na população brasileira faltam evidências que sustentem a suplementação de ômega 3 em soropositivos. O único estudo encontrado na literatura em nossa população não corrobora com os resultados observados para outras populações que vivem com HIV, pois não foi encontrada melhorias no perfil lipídico e nos marcadores inflamatórios, com uma suplementação de 3g de óleo de peixe/dia (0,54g EPA e 0,36g de DHA) por 24 semanas (OLIVEIRA et al., 2014). O estudo em questão utilizou a suplementação de ômega 3 em uma concentração de EPA e DHA de 180/120mg, respectivamente, por cápsula. Esta é a concentração padrão existente no mercado, entretanto existem cápsulas com concentrações mais elevadas que podem trazer maiores benefícios na função cardioprotetora e anti-inflamatória. Desta forma, se faz necessário investir em estudos que busquem avaliar os efeitos do ômega 3 em pacientes soropositivos no Brasil, testando dosagens distintas e com cápsulas com altas concentrações de EPA e DHA, para elucidar seus efeitos sobre o perfil lipídico, inflamação e estresse oxidativo. Os resultados podem auxiliar na criação de estratégias de intervenção e prevenção visando a melhora metabólica desses pacientes, e consequentemente melhorando sua qualidade de vida.

2.2 Hipótese

A suplementação com ácidos graxos ômega 3 em indivíduos adultos portadores do vírus HIV em tratamento antirretroviral pode reduzir a concentração sanguínea de triglicérides e uma melhora em marcadores inflamatórios e estresse oxidativo.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da suplementação de ácidos graxos ômega 3 no perfil lipídico, em marcadores de inflamação e estresse oxidativo de adultos soropositivos em uso da TARV.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a resposta metabólica em pacientes soropositivos em uso da TARV recebendo diferentes doses de ômega 3, a fim de verificar se existe um mecanismo dose-resposta;
- b) avaliar antes e após a intervenção o estado inflamatório através dos seguintes marcadores: fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), proteína C reativa (PCR);
- c) avaliar antes e após a intervenção o estresse oxidativo através dos marcadores: malondialdeído (MDA), glutathiona reduzida (GSH), vitamina E;
- d) avaliar possíveis alterações após a suplementação nos parâmetros bioquímicos: glicose, proteínas totais e metilação do DNA;
- e) determinar o perfil de ácidos graxos séricos antes e após a intervenção, para avaliar a incorporação de ácidos graxos pela suplementação com ômega 3;
- f) avaliar a ingestão alimentar antes e após a intervenção, focando prioritariamente no consumo de gorduras, em especial dos ácidos graxos essenciais (ômega 3 e ômega 6);
- g) avaliar o estado nutricional dos participantes pelo cálculo do índice de massa corporal (IMC).

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento Experimental

Trata-se de um ensaio clínico randomizado duplo-cego que foi desenvolvido na Unidade Especializada em Doenças Infectocontagiosas (UETDI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP), que possui atendimento todos os dias da semana. Os indivíduos que frequentavam este ambulatório e preenchiam os critérios de inclusão e exclusão checados previamente pelo prontuário médico, foram convidados a participar do estudo pessoalmente pelo pesquisador.

Foram incluídos:

- a) pacientes com sorologia positiva para o HIV;
- b) idade entre 18 e 69 anos;
- c) pacientes em uso da TARV estável por no mínimo 3 meses;
- d) concentração de triglicérides > 150 mg /dl.

Foram incluídos também pacientes em uso de hipolipemiantes, desde que fosse possível a manutenção da terapia ao longo da intervenção. Foram excluídos:

- a) aqueles que apresentaram histórico de alergia para qualquer tipo de alimento de origem marinha;
- b) indivíduos que faziam uso de suplementos de ômega 3 e/ou antioxidantes nos últimos 3 meses;
- c) gravidez;
- d) alcoolismo;
- e) uso de substâncias ilícitas;
- f) pacientes com doenças graves ou infecções oportunistas.

Quando havia interesse do paciente em ser voluntário da pesquisa, o pesquisador agendou o primeiro encontro na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto onde ocorreu:

- a) o fornecimento das cápsulas;
- b) a coleta de sangue (realizada pelas enfermeiras da UPC);

- c) respondeu às perguntas do protocolo de pesquisa (Anexo A) com informações sócio demográficas;
- d) realizou o primeiro recordatório alimentar de 24h (R24h)(Anexo A);
- e) foram aferidos peso e estatura (realizada por nutricionista treinado); e
- f) assinou Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o qual foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Anexo B – Parecer de aprovação).

Neste primeiro encontro, os voluntários receberam melhores esclarecimentos a respeito da pesquisa, foram orientados quanto ao consumo das cápsulas e conscientizados quanto aos demais procedimentos durante o período experimental, como a manutenção dos medicamentos que já tomavam, em especial os hipolipemiantes e a TARV, manutenção de seus hábitos dietéticos e atividade física. Ao final do período experimental (12 semanas), o pesquisador agendou por telefone o segundo encontro com os voluntários, momento em que foi questionado sobre possíveis falhas e interrompimento do tratamento com as cápsulas da pesquisa, além de serem questionados sobre a manutenção ou inclusão de medicamentos durante o período do experimento e manutenção dos hábitos alimentares e atividade física. Neste segundo e último encontro com o voluntário foi coletado pela segunda vez: o R24h, coleta de sangue e aferição do peso e da estatura.

Foram recrutados no total 81 voluntários que foram alocados de forma aleatória em um dos três grupos de intervenção:

- a) grupo ômega 3 (n=27): 5 cápsulas de 1g de óleo de peixe por dia;
- b) grupo placebo (n=28): 5 cápsulas de 1g de óleo de girassol por dia;
- c) grupo combinado (n=26): 2 cápsulas de 1g de óleo de peixe + 3 cápsulas de 1 g de óleo de girassol por dia.

A figura 3 traz a esquematização do delineamento experimental.

Além das questões do protocolo de pesquisa relacionados ao perfil sócio demográfico e de saúde, foram coletados do prontuário informações sobre o tempo de infecção pelo HIV, histórico médico, TARV e hipolipemiantes usados.

Figura 3 – Esquema do planejamento experimental.

Legenda: UETDI: Unidade Especializada em Doenças Infectocontagiosas; TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; R24h: recordatório alimentar de 24 horas; OP: óleo de peixe.

A coleta de sangue foi realizada pela equipe de enfermagem da UPC, que foi previamente contratada, seguindo todos os cuidados de higiene e assepsia. O sangue foi coletado em tubo a vácuo, da marca *BD Vacutainer Gel SST*, de 8ml cada (tampa amarela). Foram coletados 3 tubos de 8ml para cada voluntário nos dois encontros do experimento (antes e após a intervenção). O sangue coletado foi transportado até o Laboratório de Nutrição e Metabolismo da FMRP-USP, onde foi centrifugado a 3.500 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (soro) foi transferido para um tubo *ependorf* de 1 ml cada, sendo que para cada participante foi armazenado aproximadamente 3 *ependorfs* de soro. Foram mantidos sob congelamento a -80°C até o momento das análises.

4.2 Composição das cápsulas de suplementação: óleo de peixe e placebo

As cápsulas de óleo de peixe e placebo (óleo de girassol), foram adquiridas junto à Nutreflora Alimentos Funcionais e fabricados pela Indústria Farmacêutica Sorocaps LTDA. Cada cápsula de óleo de peixe continha 1000mg, sendo que 330mg eram de EPA e 220mg de DHA. Desta forma, os voluntários que estavam no grupo combinado recebeu um total de 1100mg de ômega 3 (EPA+DHA) e o grupo ômega 3 recebeu 2750mg de ômega 3 (EPA+DHA) por dia.

A empresa Nutreflora embalou em caixas e codificou os tratamentos dos grupos por cores (caixa azul, preta ou verde). Cada caixa continha cinco frascos brancos, e cada frasco continha 30 cápsulas (Figura 5). Desta forma, cada caixa foi o suficiente para 30 dias de experimento. Os voluntários receberam três caixas para o experimento de 12 semanas. A codificação por cores garantiu que o estudo permanecesse duplo-cego. A decodificação das cores foi realizada após o término de todas as análises laboratoriais.

Figura 4 – Cápsulas fornecidas aos voluntários da pesquisa.

Os certificados de análise fornecidos pela empresa (ANEXO C), indicavam que as cápsulas eram adequadas para consumo, pois foram aprovadas por testes microbiológicos, de acidez e de oxidação, além de apresentarem quantidades permitidas de metais pesados e outros contaminantes.

4.3 Análise bioquímica laboratorial

Todas as análises bioquímicas foram realizadas no *baseline*, e após 12 semanas do experimento.

Os desfechos primários ou variáveis de interesse principal foram aqueles que determinaram o perfil lipídico, os marcadores de inflamação, e marcadores do estresse oxidativo. A tabela abaixo traz as dosagens realizadas do desfecho primário:

Tabela 1 – Resumo das análises laboratoriais para desfechos primários.

Perfil lipídico	Marcadores inflamatórios	Marcadores do estresse oxidativo
Triglicérides	Proteína C reativa (PCR)	Malondialdeído (MDA)
HDL colesterol	Fator de necrose tumoral (TNF- α)	Glutathiona reduzida (GSH)
Colesterol total	Interleucina 6 (IL-6)	Vitamina E
	Interleucina 10 (IL-10)	

Os desfechos secundários ou variáveis de interesse secundário realizados antes e após o experimento foram: perfil de ácidos graxos (15 ácidos graxos foram avaliados), proteínas totais, glicose, ácidos graxos livres e metilação do DNA.

Das análises laboratoriais, o perfil lipídico, PCR, MDA, GSH, vitamina E, proteínas totais, glicose, ácidos graxos livres, metilação do DNA e perfil de ácidos graxos foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Para as dosagens de TNF- α , IL-6 e IL-10 foi enviado o soro congelado a -80C°, para o Laboratório LEAC situado na cidade de São Paulo onde foram realizadas as análises.

4.3.1 Perfil Lipídico

4.3.1.1 Determinação de Colesterol Total

O colesterol total foi determinado pelo método colorimétrico enzimático através de kits comerciais Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). Os ésteres de colesterol foram hidrolisados pela colesterol esterase a ácidos graxos e o colesterol livre, que foi então oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. O fenol e a 4-aminoantipirina foram oxidados, na presença da peroxidase e peróxido de hidrogênio, formando a antipirilquinonimina com absorvidade máxima à 500nm, com intensidade da cor vermelha formada na reação final diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra. No procedimento foi adicionado 1mL de reagente de cor a 10µL de amostra, em seguida essa solução foi incubada em banho maria a 37°C por 10 minutos, e então foi realizada a leitura a 500nm. A concentração de colesterol total das amostras foi dada a partir de um padrão conhecido de colesterol.

4.3.1.2 Determinação de triglicérides

A determinação dos triglicérides foi realizada pela metodologia colorimétrica enzimática através de kits comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). A hidrólise dos triglicérides foi realizada pela lipase da lipoproteína, liberando o glicerol, que foi convertido em glicerol-3-fosfato, pela glicerocinase. O glicerol-3-fosfato foi então oxidado à dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Posteriormente foi realizada uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina com absorbância máxima em 505nm, sendo que a intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicérides da amostra. No procedimento, foi adicionado 1 mL de reagente de cor a 10µL de amostra, em seguida essa solução foi incubada em banho maria a 37°C por 10 minutos, e então foi realizada a leitura a 505nm. A concentração de triglicérides das amostras foi dada a partir de um padrão conhecido de triglicérides.

4.3.1.3 Determinação da HDL colesterol

Para determinação do HDL colesterol sanguíneo através da precipitação seletiva de LDL e VLDL, foi utilizado Kit Colesterol HDL Liquiform Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). Em 100µL de amostra foram adicionados 100µL de precipitante de LDL e VLDL. As amostras foram agitadas em vórtex por 30 segundos e então centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos. Foram retirados 50µL do sobrenadante e adicionados a 500µL de reagente de cor de colesterol. Em seguida essa solução foi incubada em banho maria a 37°C por 10 minutos, e então realizada a leitura a 500nm. A concentração de HDL das amostras foi dada a partir de um padrão conhecido de HDL.

4.3.2 Marcadores inflamatórios

4.3.2.1 Proteína C Reativa (PCR)

Para detecção do valor sérico (soro) do PCR, foi utilizado um kit de teste Elisa “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit*” adquirido pelo laboratório LEAC. Este kit permite a identificação do PCR a partir da presença de um anticorpo conjugado com biotina específico para PCR presente na placa do kit. A amostra é adicionada na placa e em seguida adiciona-se um reagente HRP (*Horseradish Peroxidase*) e a placa é incubada. Em seguida outro reagente é adicionado e mais uma solução de ácido sulfúrico, neste momento ocorre a mudança de cor das amostras. A alteração da cor é medida então espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 450nm $\pm$ 10nm. A concentração de PCR nas amostras é então determinada por comparação com a curva padrão.

4.3.2.2 Interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral (TNF- α)

As três dosagens foram realizadas pela metodologia *Luminex xMAP* através do Kit Cat HSTCMAG do fornecedor *St Charles-Missouri-USA*.

A metodologia *Luminex xMAP* envolve um processo que cora microesferas de látex com dois fluoróforos. Os kits, desenvolvidos com estas microesferas se fundamentam no imunoensaio. Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados nas microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito (amostra) se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção foi feita através de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina ligada ao anticorpo de detecção. O equipamento Luminex movimenta as esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser classifica a microesfera e o segundo laser quantifica o sinal de reporte em casa microesfera.

As amostras do soro foram descongeladas em temperatura ambiente e preparadas para análise. Após isso as microesferas foram acopladas ao anticorpo juntamente com as amostras e os padrões. Em seguida seguiu-se com a lavagem e então procedeu-se com a incubação com o anticorpo de detecção biotinilado. Foi incubado com estreptavidina-PE, e feita a leitura no sistema Luminex xMAP.

4.3.3 Marcadores do estresse oxidativo

4.3.3.1 Malondialdeído (MDA)

Esta análise foi feita de acordo com o método proposto por Gerard-Monnier et al. (1998), com algumas adaptações. Para a dosagem de MDA no soro foram utilizados 100µl de amostra. A este foi adicionado 300µl de solução de 10mM de 1-metil-fenilindol em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e 75µl de HCL puro (37%). Logo após, os eppendorfs foram agitados em vortex e incubados em banho-maria a 45°C por 40 minutos. Após o banho, houve resfriamento das amostras em gelo e em seguida os eppendorfs foram centrifugados a 4000rpm por 10 minutos. Do sobrenadante foi feita a leitura de absorbância com comprimento de onda de 586nm. A concentração de MDA foi calculada comparando-a a uma curva de 1,1,3,3-tetrametoxipropano hidrolisado.

4.3.3.2 Glutathiona reduzida (GSH)

A dosagem de GSH foi realizada de acordo com o método descrito por Costa CM, Dos Santos RCC, Lima ES, (2006). A GSH foi dosada por meio de uma alíquota de 25 µlitros de soro com a adição de 1 ml do tampão Tris-EDTA (0.25mol/L Tris base, 0,20mol/L EDTA, pH 8.2; para 1L: 30,285tris e 74,448g EDTA) para a realização da primeira leitura no comprimento de onda de 412nm, obtendo-se A1. Posteriormente, 25 µlitros de ácido ditionitrobenzóico (DTNB) foi adicionado à esta solução e após 15 minutos de reação a temperatura ambiente, foi realizada a segunda leitura, obtendo-se A2, contra um branco de DTNB. Após a subtração dos valores obtidos A2-A1, a concentração na amostra foi calculada utilizando-se uma curva padrão de GSH, expressa em mmol/L conforme descrito pelo método.

4.3.3.3 *Vitamina E*

O soro foi descongelado em temperatura ambiente protegido por papel alumínio. Foi utilizado 200 µL + 110 µL etanol 100% com BHT + 100 µL da solução de padrão interno. Foi agitado em vortex por 5 segundos, e adicionado 400 µL de hexano e agitado em vortex novamente por 2 minutos. Em seguida a preparação foi centrifugada a 700 rpm por 5 minutos. A fase hexânica foi retirada e colocada em outro tubo e a amostra foi secada em nitrogênio. Ressuspendeu-se em 200 µL de fase móvel (JORDÃO et al., 2004).

As análises de vitamina E foram realizadas por HPLC (high-performance liquid chromatography). Para as análises foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu modelo LC-20AT; coluna tipo C-18 (150 x 4,6mm - 5µm); detector UV-visível modelo SPD-20A; fase móvel composta por acetonitrila:diclorometano:metanol 7:2:1; velocidade de fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 292nm. As concentrações foram determinadas por meio do uso de padrão externo e os resultados foram expressos em µmol/L de soro (JORDÃO et al., 2004).

4.3.4 Glicose

A glicose foi determinada utilizando-se kit para dosagem de Glicose PAP Liquiform Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), no qual a glicose oxidase catalisa uma reação, formando peróxido de hidrogênio que reage com 4-aminoantipirina e

fenol em reação oxidativa, tendo como produto uma antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade da cor é proporcional a concentração de glicose na amostra de soro. No procedimento foi adicionado 1mL de reagente de cor a 10 µL de amostra, em seguida essa solução foi incubada em banho maria a 37°C por 10 minutos, e então foi realizada a leitura a 505nm. A concentração de glicose das amostras foi dada a partir de um padrão conhecido de glicose.

4.3.5 Proteínas totais

A determinação de proteína sérica foi realizada através de kits comerciais pelo método de Biureto (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). Os íons de cobre em meio alcalino (reagente de biureto) reagiram com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, com absorbância máxima em 545nm, sendo proporcional à concentração de proteína da amostra. No procedimento, foram adicionados 50 µL de reagente de cor a 10 µL de amostra, em seguida essa solução foi incubada em banho maria a 37°C por 10 minutos, e então foi realizada a leitura a 545nm. A concentração de proteínas totais das amostras foi dada a partir de um padrão conhecido de proteínas totais.

4.3.6 Ácidos graxos livres

Os ácidos graxos livres foram dosados através do kit *EnzyChrom™ Free Fatty Acid Assay Kit (FFA-100)* que determina a concentração de ácidos graxos livres de forma colorimétrica. Neste kit os ácidos graxos livres são convertidos enzimaticamente em acetil-CoA e subsequentemente em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio resultante reage com um corante específico originando uma cor avermelhada. A densidade óptica em 570nm ou intensidade de fluorescência é diretamente proporcional a concentração de ácidos graxos livres.

4.3.7 Metilação do DNA

A metilação do DNA foi realizada através do Kit *DNA Methylation ELISA Kit Cayman Chemical*. Este ensaio é usado para a quantificação da 5-metil-2'-

deoxicitidina no soro, baseando-se na competição entre a 5-metil-2'-deoxicitidina-acetilcolinesterase (AChE) conjugado (5-metil-2'-deoxicitidina *tracer*) e uma quantidade limitada de anticorpo monoclonal de 5-metil-2'-deoxicitidina. Como a quantidade de 5-metil-2'-deoxicitidina varia, a quantidade de 5-metil-2'-deoxicitidina *tracer* que é capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal de 5-metil-2'-deoxicitidina será inversamente proporcional à concentração de 5-metil-2'-deoxicitidina na amostra. Este complexo anticorpo-5-metil-2'-deoxicitidina liga-se à IgG que foi previamente colocada na amostra. A placa com as amostras é então lavada para remover quaisquer reagentes não ligados e em seguida é adicionado outro reagente (que contém substrato para AChE. O produto desta reação enzimática tem uma cor amarela e absorve fortemente a 412nm. A intensidade dessa cor, determinada espectrofotometricamente, é proporcional à quantidade de 5-metil-2'-deoxicitidina *tracer* que é inversamente proporcional à quantidade de 5-metil-2'-deoxicitidina presente na amostra durante a incubação.

4.3.8 Determinação de Ácidos Graxos

Os ácidos graxos foram extraídos pelo método proposto por Folch et al. (1957). Em um tubo de ensaio de vidro, foi pipetado 500 µl de soro. Com uma solução de clorofórmio/metanol na proporção de 2:1, o volume do tubo de ensaio foi completado para 10 ml, 20 vezes o volume do soro. O tubo foi agitado em vortex por 1 minuto. O volume foi filtrado em papel bem fino em tubo falcon. Foi adicionado ao filtrado 1 ml de solução salina (NaCl 0,9%) para cada 5 ml de filtrado, e em seguida agitou-se o tubo suavemente, invertendo-o três vezes. Para a separação de fases completa, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 3500rpm em temperatura ambiente. A fase aquosa superior foi aspirada com pipeta pasteur e desprezada. A fase orgânica foi transferida para tubo de ensaio e seca em corrente de nitrogênio. A metilação foi feita com 1,5 ml de hexano e 0,5ml de KOH\MeOH 0,5mol\L. Em seguida agitou-se em vortex por 1 minuto e foi centrifugado por 5 minutos a 3500 rpm. A camada superior (hexânica), foi transferida para um vial de 2ml e evaporado em corrente de nitrogênio até um volume aproximado de 150 µl.

Os ácidos graxos foram determinados em um cromatógrafo a gás SHIMADZU, GC-2014 com auto-injetor AOC-20i, com coluna capilar SP2560 100m de

comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,20µm de espessura de filme. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com fluxo de 1,6ml/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C. O padrão utilizado para identificação dos ácidos graxos foi feito por um composto de mix de ácidos graxos da Supelco (Supelco 37 Component FAME Mix).

Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção relativos com os tempos de retenção relativos dos ácidos graxos do padrão. A quantificação foi feita por normalização de área e os resultados foram apresentados em porcentagem.

4.4 Avaliação do estado nutricional

O estado nutricional foi avaliado através do índice de massa corporal (IMC), que utiliza as medidas de peso corporal total e estatura do indivíduo para classificar o estado nutricional.

4.4.1 Peso corporal total

O peso foi aferido em balança eletrônica Filizola® do tipo plataforma, com capacidade máxima de 300 kg e precisão de 0,1kg. Foi seguido o procedimento técnico sugerido pelo Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN (2004) onde: o indivíduo foi orientado a utilizar vestimenta leve, sem adereços e descalça. A leitura do peso foi feita diretamente no visor.

4.4.2 Estatura

A estatura foi aferida em estadiômetro com precisão de 0.1cm. Foi seguido o procedimento técnico SISVAN (2004) onde: o indivíduo foi orientado a retirar o calçado, mantendo-se ereto com os braços estendidos ao longo do corpo, com os calcanhares juntos, tocando a haste vertical e posicionando-se no centro do equipamento.

4.4.3 Cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC)

A partir das variáveis peso e estatura foi calculado o IMC, que corresponde à razão entre o peso corporal (kg) pela estatura (m) elevada ao quadrado (P/E^2). A classificação do estado nutricional segundo o IMC foi realizada de acordo com a OMS (2004), sendo considerado:

Tabela 2 – Classificação do índice de massa corporal (IMC)

Classificação	IMC (Kg/m²)
Desnutrição Grave	< 16
Desnutrição Moderada	16 a 16,99
Desnutrição leve	17 a 18,49
Eutrófico	18,5 a 24,99
Sobrepeso	25 a 29,99
Obesidade Grau 1	30 a 34,99
Obesidade Grau 2	35 a 39,99
Obesidade Grau 3	> 40

Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004).

4.5 Avaliação da ingestão alimentar

Caracterizamos a dieta habitual dos participantes, através do método R24h, usado amplamente na avaliação dietética, devido à facilidade de aplicação e baixo custo. O método consiste na anotação do relato sobre a ingestão alimentar do dia anterior (alimentos e bebidas) (FISBERG et al., 2005).

Para padronizar a aplicação do R24h foi utilizada a técnica de "passos múltiplos" que consiste na investigação do consumo alimentar em três etapas: listagem rápida dos alimentos consumidos, descrição detalhada de quantidade e tipo de alimento e, revisão do que foi relatado. Na primeira etapa, o entrevistado citou, sem interrupções, todos os alimentos consumidos no dia anterior. Na segunda, foram obtidas informações sobre alimentos possivelmente omitidos assim como as quantidades de todos os alimentos citados, e por último todas as informações relatadas foram revisadas (JOHNSON; SOULTANAKIS; MATTHEWS, 1998).

Previamente ao cálculo do valor nutritivo, foram feitas as padronizações das preparações culinárias, sendo seus ingredientes incluídos, separadamente, no programa de cálculo nutricional. Foi considerado o tipo de alimento, quantidade, a forma de preparação, e os horários das refeições. Os alimentos foram registrados em

um protocolo na forma de medidas caseiras, e posteriormente, convertidos em gramas ou mililitros, com o auxílio da Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras proposta por Pinheiro et. al (2004).

Para o cálculo nutricional foi utilizado o software de nutrição "Dietwin Profissional 2011", atualizado com dados da Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos – TACO (NEPA-UNICAMP, 2006). Foram calculadas as calorias totais da dieta, percentual de lipídios, gorduras saturadas, MUFA's, PUFA's, ômega 6 e ômega 3.

4.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por profissional especializado na área. Para todas as variáveis foram calculadas a média, desvio padrão (DP), mediana, valor mínimo e valor máximo.

Inicialmente foram analisadas as variáveis sócio demográficas e de histórico clínico dos voluntários que caracterizavam o grupo, com a finalidade de verificar se os grupos de intervenção eram diferentes entre si de acordo com as seguintes variáveis: células CD4, células CD8, início de uso da TARV, idade, uso de hipolipemiantes, profissão, escolaridade, tabagismo, prática de exercício físico e consumo de bebida alcoólica. Para as variáveis numéricas (células CD4, células CD8, início de uso da TARV e idade) primeiramente foi verificada a normalidade das variáveis pelo teste de Shapiro-Wilks. Após esta verificação foi aplicado o método de Análise de Variância (ANOVA) na comparação entre os grupos. Para as variáveis categóricas, foi aplicado o teste do X^2 ou teste exato do X^2 .

Para as variáveis de comparação entre o antes e após foi aplicado ANOVA de Medidas Repetidas Modelo Mixto. Para aquelas variáveis que rejeitaram a hipótese de normalidade foi aplicado o teste de Shapiro-Wilks.

Adotamos como nível de significância $p \leq 0.05$ em toda a análise.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Para descrever os resultados utilizaremos a seguinte nomenclatura para os grupos: grupo ômega 3 (5 cápsulas de ômega 3 por dia); grupo placebo (5 cápsulas de óleo de girassol por dia); grupo combinado (2 cápsulas de ômega 3 + 3 cápsulas de óleo de girassol).

5.1 Recrutamento dos voluntários

Foram recrutados para o estudo 81 pacientes soropositivos em uso de TARV com hipertrigliceridemia (<150ml/dl), os quais compareceram ao primeiro encontro e receberam as cápsulas de intervenção do estudo. Ao longo do período de intervenção (12 semanas) alguns voluntários interromperam o tratamento e foram excluídos da pesquisa. A tabela 3 apresenta o número de voluntários que iniciaram a intervenção, e o número de voluntários que concluíram o protocolo da pesquisa em cada grupo.

Tabela 3 – Número de voluntários que iniciaram e número de concluintes da intervenção.

	Ômega 3	Placebo	Combinado	P-valor
n inicial	27	28	26	
n final	18 (66,7%)	22 (78,6%)	20 (76,9%)	
Desistentes	9 (33,3%)	6 (21,4%)	6 (23,1%)	0,55*

Legenda: n: número de voluntários. Análise estatística: * teste do $\chi^2=1$.

A tabela 3 mostra que houve mais desistentes no grupo ômega 3, vez que 33,3% interromperam a intervenção antes da conclusão do protocolo de pesquisa. O grupo placebo e grupo combinado tiveram 21,4% e 23,1% de desistentes respectivamente. Apesar desta diferença numérica, este valor não foi estatisticamente significativo ($p=0,55$).

Os motivos de desistência foram: o voluntário não foi localizado pelo pesquisador para agendar o segundo encontro (4 voluntários do grupo ômega 3, 3 placebo e 3 combinado); problemas gastrointestinais (3 voluntários do grupo ômega 3 e 1 do grupo combinado); esquecimento (1 voluntário do grupo ômega 3, 2 placebo e 1 combinado); gosto de peixe na boca (1 voluntário do grupo ômega 3); internação (1 voluntário do

grupo placebo); dificuldade em deglutir as cápsulas (1 voluntário do grupo combinado).

5.2 Características basais da população de estudo

As características basais da população de estudo estão descritas na Tabela 4. As variáveis numéricas das características basais (células CD4, células CD8, ano de início do HIV, ano de início da TARV e idade) não rejeitaram a hipótese de normalidade pelo teste estatístico de Shapiro-Wilks, em seguida foi aplicado o teste ANOVA na comparação entre os grupos. Para as variáveis categóricas (uso de hipolipemiante, profissão, escolaridade, tabagismo, exercício físico, consumo de bebida alcoólica, sexo, carga viral e tipo de TARV) foi utilizado o teste exato do X^2 ou teste exato do X^2 .

Após análise estatística entre os grupos, considerando as variáveis das características basais, observou-se que os grupos eram semelhantes, uma vez que nenhuma diferença estatística foi encontrada entre as variáveis.

Tabela 4 – Características sócio demográficas e histórico clínico dos grupos no início do estudo.

	Ômega 3	Placebo	Combinado	P-valor
Fatores sócio demográficos				
Variáveis numéricas apresentadas em: média (desvio padrão)				
Idade (anos)	47,6 (10,9)	48,8 (10,0)	49,9 (10,5)	0,79*
Variáveis categóricas apresentadas em: n (%)				
Sexo masculino	16 (87,5)	17 (77,3)	15 (75)	0,51**
Escolaridade				0,77**
Analfabeto/fundamental	9 (50,0)	11 (50,0)	12 (60,0)	
Médio/superior	9 (50,0)	11 (50,0)	8 (40,0)	
Profissionalmente ativos	13 (72,2)	15 (68,2)	11 (55,0)	0,17**
Praticantes de exercício físico	10 (55,6)	7 (31,8)	10 (50,0)	0,28**
Bebida alcoólica (eventual)	5 (27,8)	13 (59,1)	8 (40,0)	0,20***
Fumantes	3 (16,7)	4 (18,2)	2 (10)	0,82***
Histórico Clínico				
Variáveis numéricas apresentadas em: média (desvio padrão)				
Início HIV (ano)	2005 (8,5)	2004(6,7)	2005 (8,6)	0,88*
Início TARV (ano)	2007 (6,3)	2005 (6,5)	2007 (6,8)	0,73*
Células TCD4 (cel/mm³)	713,2 (224,4)	621,9 (155,4)	706,8 (206,0)	0,25*
Células TCD8 (cel/mm³)	1052,7 (311,9)	1243,8 (333,4)	1206,5 (352,4)	0,18*
Variáveis categóricas apresentadas em: n (%)				
Uso de hipolipemiantes	6 (33,3)	8 (36,4)	7 (35,0)	0,98**
Carga viral (cópias/ml)	<40	<40	<40	
TARV				0,48**
2 ITRNs+1 ITRNN	9 (50)	8 (36)	11 (55)	
2 ITRNs+1 IP	1 (5)	4 (18)	2 (10)	
1 ITRN+1ITRNN+1IP	8 (45)	10 (45)	7 (35)	

Legenda: TARV: terapia antirretroviral; ITRN: Inibidor de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo; ITRNN: Inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo; IP: Inibidor de protease. Cálculo estatístico do P-valor: * ANOVA; ** teste do X²; teste exato do X².

5.3 Análises bioquímicas laboratoriais antes e após o período de intervenção

Para todas as variáveis das análises laboratoriais, foi aplicado o teste estatístico ANOVA de Medidas Repetidas do Modelo Mixto comparando o antes e após a intervenção nos três grupos. Após esta análise, quando detectado diferença significativa entre o antes e após a intervenção, foi aplicado outro teste para verificar se a interação era significativa ou não, quando foi significativa, isto é, a interação não foi válida para todos os grupos, aplicou-se o teste de ANOVA de Medidas Simples para cada grupo separadamente.

5.3.1 Perfil lipídico

As variáveis triglicérides, colesterol total e HDL colesterol, que compõe o perfil lipídico dos indivíduos, e suas eventuais alterações após a intervenção estão apresentadas na Tabela 5.

As variáveis triglicérides e colesterol total rejeitaram a hipótese de normalidade nas análises estatísticas (teste de Shapiro-Wilks), foi aplicado uma transformação logarítmica para estas variáveis por este motivo.

Tabela 5 – Perfil lipídico antes e após intervenção entre os grupos.

	Ômega 3	Placebo	Combinado	P-valor*
Variáveis numéricas apresentadas em: média (desvio padrão)				
Triglicérides antes (mg/dL)	213,6 (80,6)	314,8 (244,1)	223,8 (109,9)	0,006
Triglicérides após (mg/dL)	212,9 (71,8)	219,2 (93,3)	200,5 (100,1)	
P-valor para cada grupo**	0,96	0,004***	0,15	
Colesterol total antes (mg/dL)	194,0 (47,6)	224,8 (59,5)	228,9 (79,1)	0,78
Colesterol total após (mg/dL)	212,7 (38,5)	213,6 (60,1)	219,5 (49,2)	
P-valor para cada grupo**	0,005***	0,27	0,78	
HDL antes (mg/dL)	34,3 (10,4)	28,7 (7,8)	29,2 (6,1)	0,47
HDL após (mg/dL)	29,0 (7,7)	32,6 (10,3)	33,6 (7,3)	
P-valor para cada grupo**	0,10	0,10	0,04***	

Cálculo estatístico do P-valor: * ANOVA de Medidas Repetidas Modelo Mixto; ** Anova de Medidas Simples; *** p-valor < que 0,005 (estatisticamente significante)

Analisando a Tabela 5, verifica-se uma diferença estatística após o tratamento onde o grupo:

- ômega 3: houve um aumento no colesterol total de 8,79% após a intervenção (de 194,0 mg/dL para 212,7 mg/dL; p=0,005)

- b) placebo: houve uma redução nos triglicérides de 30,3% após a intervenção (de 314,8 mg/dL para 219,2 mg/dL; $p=0,004$);
- c) combinado: houve um aumento no HDL colesterol de 13% após a intervenção (de 29,2 mg/dL para 33,6 mg/dL; $p=0,04$).

Gráfico 1 – Perfil lipídico do grupo ômega 3 antes e após intervenção.

Gráfico 2 – Perfil lipídico do grupo placebo antes e após intervenção.

Gráfico 3 – Perfil lipídico do grupo combinado antes e após intervenção.

5.3.2 Marcadores inflamatórios

As variáveis PCR, TNF- α , IL-6 e IL-10, que compõe os marcadores inflamatórios analisados, e suas eventuais alterações após a intervenção estão apresentadas na Tabela 6. Todas as variáveis de marcadores inflamatórios rejeitaram a hipótese de normalidade nas análises estatísticas (teste de Shapiro-Wilks), foi aplicado uma transformação logarítmica para estas variáveis por este motivo.

Tabela 6 – Marcadores inflamatórios antes e após intervenção entre os grupos.

	Ômega 3	Placebo	Combinado	P-valor*
Variáveis numéricas apresentadas em: média (desvio padrão)				
PCR antes (ng/ml)	1,89 (1,0)	2,0 (1,1)	1,6 (1,5)	0,49
PCR após (ng/ml)	1,89 (1,2)	1,9 (1,3)	1,3 (0,8)	
P-valor para cada grupo**				
TNF- α antes (pg/ml)	10,8 (15,7)	4,9 (2,2)	5,7 (2,3)	0,20
TNF- α após (pg/ml)	9,5 (7,7)	9,7 (10,8)	6,3 (2,6)	
P-valor para cada grupo**				
IL-6 (pg/ml)	3,0 (6,1)	0,6 (0,4)	1,6 (1,8)	0,67
IL-6 (pg/ml)	2,57 (4,2)	6,4 (18,5)	1,2 (1,4)	
P-valor para cada grupo**				
IL-10 (pg/ml)	3,0 (1,2)	1,8 (1,4)	3,4 (2,3)	0,003
IL-10 (pg/ml)	4,2 (4,8)	3,2 (1,7)	3,4 (1,8)	
P-valor para cada grupo***	0,55	0,03***	0,75	

Legenda: PCR: proteína C reativa; TNF- α : fator de necrose tumoral; IL-6: interleucina 6; IL-10: interleucina 10. Cálculo estatístico do P-valor: * ANOVA de Medidas Repetidas Modelo Mixto; ** o P-valor para as variáveis PCR, TNF- α e IL-6 não foi significativa nos três grupos, por isso não foi calculado individualmente ; *** p-valor < que 0,005 para o grupo placebo (estatisticamente significante).

Analisando a Tabela 6, verifica-se uma diferença estatística após o tratamento no grupo placebo: houve um aumento de 43,75% na IL-10 após a intervenção (de 1,8 pg/ml para 3,2 pg/ml; p=0,003).

Gráfico 4 – Interleucina 10 (IL-10) no grupo placeboantes e após intervenção.

5.3.3 Marcadores do estresse oxidativo

As variáveis MDA, GSH e vitamina E, que compõe os marcadores do estresse oxidativo, e suas eventuais alterações após a intervenção estão apresentadas na Tabela 7. A variável vitamina E rejeitou a hipótese de normalidade nas análises estatísticas (teste de Shapiro-Wilks), foi aplicado uma transformação logarítmica para esta variável por este motivo.

Tabela 7 – Marcadores do estresse oxidativo antes e após intervenção entre os grupos.

	Ômega 3	Placebo	Combinado	P-valor*
Variáveis numéricas apresentadas em: média (desvio padrão)				
MDA antes (µM)	10,5 (5,7)	9,1 (3,7)	9,2 (3,5)	0,001**
MDA após (µM)	6,6 (2,2)	6,5 (2,2)	6,6 (2,4)	
GSH antes (mM)	0,26 (0,07)	0,32 (0,17)	0,28 (0,10)	0,58***
GSH após (mM)	0,27 (0,08)	0,27 (0,07)	0,29 (0,08)	
Vitamina E antes (µM)	8,7 (5,8)	9,0 (7,7)	11,3 (9,1)	0,001**
Vitamina E após (µM)	10,7 (2,9)	11,0 (5,2)	11,6 (5,1)	

Legenda: MDA: malondialdeído; GSH: glutathiona reduzida. Cálculo estatístico do P-valor: * ANOVA de Medidas Repetidas Modelo Mixto; ** o P-valor para as variáveis MDA e Vitamina E foi significativo (< que 0,005) nos três grupos de forma igual (todos diminuíram pós intervenção para MDA e aumentaram para Vitamina E) por isso não foi calculado o P-valor individualmente; *** o P-valor para GSH não foi significativo nos três grupos, por isso não foi calculado individualmente.

Analisando a Tabela 7, verifica-se uma diferença estatística após o tratamento nos três grupos:

a) MDA reduziu nos três grupos:

- Grupo ômega 3: redução de 37,1% (de 10,5 µM para 6,6 µM; p=0,001);
- Grupo placebo: redução de 28,6% (de 9,1 µM para 6,5 µM; p=0,001);

- Grupo combinado: redução de 28,2% (de 9,2 μM para 6,6 μM ; $p=0,001$).
- b) Vitamina E aumentou nos três grupos:
 - Grupo ômega 3: aumento de 18,7% (de 8,7 μM para 10,7 μM ; $p=0,001$);
 - Grupo placebo: aumento de 18,1% (de 9,0 μM para 11,0 μM ; $p=0,001$);
 - Grupo combinado: aumento de 2,5% (de 11,3 μM para 11,6 μM ; $p=0,001$).

Gráfico 5 – Malondialdeído (MDA) e vitamina E do grupo ômega 3 antes e após intervenção.

Gráfico 6 – Malondialdeído (MDA) e vitamina E do grupo placebo antes e após intervenção.

Gráfico 7 – Malondialdeído (MDA) e vitamina E do grupo combinado antes e após intervenção.

5.3.4 Glicose

Os valores da glicose rejeitaram a hipótese de normalidade nas análises estatísticas pelo teste de Shapiro-Wilks, foi aplicado uma transformação logarítmica para esta variável por este motivo. Não houve diferença significativa antes e após a intervenção em nenhum dos grupos para glicose (Tabela 8).

Tabela 8 – Glicose antes e após intervenção entre os grupos.

	Ômega 3	Placebo	Combinado	P-valor*
Variáveis numéricas apresentadas em: média (desvio padrão)				
Glicose antes (mg/dl)	91 (16,3)	102,8 (44,5)	100,2 (20,2)	0,62
Glicose após (mg/dl)	89,4 (17,5)	103,8 (42,0)	106,1 (31,5)	

Cálculo estatístico do P-valor: * ANOVA de Medidas Repetidas Modelo Mixto; P-valor não foi significativo nos três grupos, por isso não foi calculado individualmente.

Gráfico 8 – Glicose antes e após intervenção no grupo ômega 3, grupo placebo e grupo combinado.

5.3.5 Proteínas totais

Os resultados para proteínas totais séricas estão descritos na Tabela 9. Não houve diferença significativa antes e após a intervenção em nenhum dos grupos.

Tabela 9 – Proteínas totais antes e após intervenção entre os grupos.

	Ômega 3	Placebo	Combinado	P-valor*
Variáveis numéricas apresentadas em: média (desvio padrão)				
Proteínas totais antes (g/dl)	8,3 (1,4)	8,8 (1,8)	8,0 (0,6)	0,08
Proteínas totais após (g/dl)	8,2 (1,4)	8,1(0,9)	8,6 (1,0)	
P-valor para cada grupo**	0,68	0,15	0,08	

Cálculo estatístico do P-valor: * ANOVA de Medidas Repetidas Modelo Mixto; ** o P-valor não foi significativo nos três grupos, entretanto o valor de 0,08 foi próximo de ser estatisticamente significativo, por isso, o p valor foi calculado individualmente para cada grupo, o que confirmou não haver diferença estatística antes e após a intervenção para nenhum grupo.

Gráfico 9 – Proteínas totais antes e após intervenção no grupo ômega 3, grupo placebo e grupo combinado.

5.3.6 Ácidos graxos livres

Os valores de ácidos graxos livres rejeitaram a hipótese de normalidade nas análises estatísticas pelo teste de Shapiro-Wilks, foi aplicado uma transformação logarítmica para esta variável por este motivo. Não houve diferença significativa antes e após a intervenção em nenhum dos grupos (Tabela 10).

Tabela 10 – Ácidos graxos livres antes e após intervenção entre os grupos.

	Ômega 3	Placebo	Combinado	P-valor*
Variáveis numéricas apresentadas em: média (desvio padrão)				
AG livres antes (μM)	0,035 (0,042)	0,058 (0,070)	0,025 (0,019)	0,15**
AG livres após (μM)	0,014 (0,012)	0,041 (0,028)	0,040 (0,043)	

Legenda: AG: ácidos graxos. Cálculo estatístico do P-valor: * ANOVA de Medidas Repetidas Modelo Mixto; ** o P-valor não foi significativo nos três grupos, por isso não foi calculado individualmente.

Gráfico 10 – Ácidos graxos livres antes e após intervenção no grupo ômega 3, grupo placebo e grupo combinado.

5.3.7 Metilação do DNA

Os resultados para metilação do DNA estão descritos na Tabela 11. Analisando a Tabela 11, verifica-se uma diferença estatística após o tratamento nos grupos:

- a) Placebo: aumento de 7,5% (de 45,7 ng/ml para 49,2 ng/ml; $p=0,007$);
- b) Combinado: redução de 5,5% (de 49,4 ng/ml para 46,7 ng/ml; $p=0,01$).

Tabela 11 – Metilação do DNA antes e após intervenção entre os grupos.

	Ômega 3	Placebo	Combinado	P-valor*
Variáveis numéricas apresentadas em: média (desvio padrão)				
DNA antes (ng/ml)	48,5 (1,6)	45,7 (3,6)	49,4 (1,4)	0,001*
DNA após (ng/ml)	48,2 (2,2)	49,4 (1,4)	46,7 (2,3)	
P-valor para cada grupo**	0,73	0,007***	0,01***	

Cálculo estatístico do P-valor: * ANOVA de Medidas Repetidas Modelo Mixto; ** Anova de Medidas Simples; *** p-valor < que 0,005 (estatisticamente significante)

Gráfico 11 – Metilação do DNA antes e após intervenção no grupo ômega 3, grupo placebo e grupo combinado

5.3.8 Perfil de ácidos graxos

Identificamos 15 ácidos graxos, com o auxílio de um padrão externo "mix de ácidos graxos da Supelco" (Supelco 37 Component FAME Mix), os resultados estão expostos na Tabela 12. Os picos não identificados com o padrão externo foram excluídos do cromatograma.

Os ácidos graxos que rejeitaram a hipótese de normalidade nas análises estatísticas pelo teste de Shapiro-Wilks foram: C18:1n9cis, C18:3n3, C20:3n6, C22:6n3, C18:3n3. Foi aplicado uma transformação logarítmica para estas variáveis por este motivo.

Analisamos também o somatório (Σ) dos ácidos graxos pela sua classificação: ácidos graxos saturados (C14:0, C16:0 e C18:0); ácidos graxos MUFA's (C16:1, C18:1n9c cis e trans, C18:1n7C); ácidos graxos ômega 6 (C18:2n6c, C18:3n6, C20:3n6, C20:4n6); ácidos graxos ômega 3 (C18:3n3, C20:5n3, C22:6n-3); ácidos graxos PUFA's (ômega 3+ômega 6); ácidos graxos insaturados (MUFA's+PUFAs). Somente o somatório de ácido graxos insaturados rejeitou a hipótese de normalidade nas análises estatísticas e por isso foi aplicado uma transformação logarítmica.

Analisando a Tabela 12, nota-se que houve uma alteração na concentração de quase todos os ácidos graxos antes e após a intervenção com diferença estatística, com exceção dos ácidos graxos di-homo-linolênico (AG ômega 6 - C20:3n6) e o ácido graxo DHA (AG ômega 3 – C22:6n-3) onde não houve alterações estatisticamente significante. As alterações nos ácidos graxos aconteceram no mesmo sentido em todos os grupos sendo que:

- a) aumentaram significativamente, para todos os grupos, após a intervenção os ácidos graxos:
 - *do grupo do AG saturados*: C14:0 (mirístico) e C16:0 (palmítico);
 - *do grupo MUFA's*: C16:1 (palmitoléico) e C18:1n9cis (oléico cis);
 - *do grupo n6*: C18:2n6c (LA) e C18:3n6 (GLA);
- b) e reduziram significativamente, para todos os grupos, após a intervenção os ácidos graxos:
 - *do grupo do AG saturados*: C18:0 (esteárico);

- *do grupo MUFA's*: C18:1n9trans (oléico trans), C18:1n7c (vacênico) e C20:1n9 (eicosenóico);
- *do grupo n6*: C20:4n6 (ARA);
- *do grupo n3*: C20:5n3 (EPA) e C18:3n3 (ALA).

As alterações no somatório (Σ) dos grupos de ácidos graxos também ocorreram no mesmo sentido em todos os grupos, sendo que aumentaram significativamente: $\Sigma n6$ (ômega6), Σ PUFA's (poli-insaturado), Σ insaturada (MUFA's+PUFA's) e reduziram significativamente o somatório de Σ MUFA's (monoinsaturado), Σ saturados e Σ ômega3.

Tabela 12 – Perfil sérico de ácidos graxos antes e após intervenção entre os grupos.

	Ômega 3	Placebo	Combinado	P-valor*
Variáveis numéricas apresentadas em: média (desvio padrão)				
C14:0 antes	0,84 (0,38)	0,65 (0,46)	1,4 (0,9)	0,001**
C14:0 após	2,1 (1,1)	1,9 (1,0)	2,2 (1,0)	
C16:0 antes	4,1 (1,7)	3,3 (1,9)	6,4 (4,0)	0,001**
C16:0 após	7,3 (2,6)	7,2 (2,8)	8,1 (2,3)	
C18:0 antes	32,7 (11,1)	35,9 (9,6)	26,0 (12,0)	0,001***
C18:0 após	23,6 (10,0)	23,6 (12,2)	19,9 (8,8)	
Σ AG saturados antes	37,8 (10,7)	39,9 (8,5)	33,7 (7,3)	0,001***
Σ AG saturados após	33,2 (6,9)	32,7 (9,2)	30,3 (6,1)	
C16:1 antes	5,4 (2,5)	4,6 (2,5)	8,8 (5,6)	0,001**
C16:1 após	10,6 (3,7)	10,3 (4,0)	11,6 (3,3)	
C18:1n9c (cis) antes	8,5 (8,4)	6,3 (3,4)	9,9 (5,9)	0,001**
C18:1n9c (cis) após	11,5 (4,3)	11,4 (4,8)	12,8 (3,7)	
C18:1n9c (trans) antes	3,1 (1,4)	2,8 (1,4)	1,8 (1,0)	0,001***
C18:1n9c (trans) após	1,6 (0,8)	1,7 (1,2)	1,3 (0,8)	
C18:1n7c antes	0,39 (0,19)	0,39 (0,14)	0,29 (0,16)	0,004***
C18:1n7c após	0,30 (0,11)	0,28 (0,15)	0,26 (0,10)	
C20:1n9 antes	26,8 (5,9)	29,1 (9,0)	22,7 (13,1)	0,001***
C20:1n9 após	17,0 (8,8)	16,8 (8,6)	15,2 (7,9)	
Σ AG MUFA's antes	44,3 (10,4)	43,7 (6,9)	43,6 (4,2)	0,003***
Σ AG MUFA's após	41,2 (2,1)	40,6 (2,4)	41,3 (2,4)	
C18:2n6c antes	6,7 (3,9)	6,3 (4)	9,8 (6,0)	0,001**
C18:2n6c após	12,2 (4,7)	12,4 (5,3)	13,8 (4,2)	
C18:3n6 antes	5,9 (4,0)	5,3 (5,5)	8,3 (5,1)	0,001**
C18:3n6 após	10,7 (4,5)	11,3 (5,3)	12,2 (4,3)	
C20:3n6 antes	0,64 (0,30)	0,82 (0,46)	0,73 (0,56)	0,30
C20:3n6 após	0,59 (0,20)	0,77 (1,2)	0,58 (0,24)	
C20:4n6 antes	0,20 (0,07)	0,26 (0,09)	0,20 (0,11)	0,001***
C20:4n6 após	0,12 (0,06)	0,14 (0,08)	0,12 (0,05)	
Σn6 antes	13,5 (7,7)	12,7 (9,5)	19,2 (10,7)	0,001**
Σn6 após	23,7 (9,1)	24,9 (10,7)	26,8 (8,3)	
C18:3n3 antes	0,59 (0,18)	0,58 (0,24)	1,3 (3,9)	0,001***
C18:3n3 após	0,16 (0,16)	0,16 (0,14)	0,17 (0,14)	
C20:5n3 antes	2,3 (0,8)	2,5 (0,9)	1,9 (1,2)	0,001***
C20:5n3 após	1,5 (0,7)	1,3 (0,6)	1,2 (0,6)	
C22:6n-3 antes	0,23 (0,11)	0,25 (0,10)	0,20 (0,15)	0,32
C22:6n-3 após	0,25 (0,22)	0,17 (0,19)	0,23 (0,23)	
Σn3 antes	3,1 (1,0)	4,0 (2,9)	2,6 (1,6)	0,001***
Σn3 após	1,9 (0,9)	1,6 (0,8)	1,5 (0,6)	
Σ PUFA's (n6+n3) antes	16,7 (7,3)	16,7 (11,9)	22,6 (9,6)	0,001**
Σ PUFA's (n6+n3) após	25,6 (8,4)	26,5 (10,1)	28,3 (7,9)	
Σ insaturada antes	61,0 (11,4)	60,0 (8,5)	66,2 (7,3)	0,001**
Σ insaturada após	66,8 (6,9)	67,2 (9,3)	69,6 (6,1)	

Legenda: Σ: somatório; AG: ácidos graxos; MUFA's: ácidos graxos monoinsaturados; n6: ácidos: graxos ômega 6; e n3: ácidos graxos ômega 3; PUFA's: ácidos graxos poli-insaturados; insaturada (MUFA's+PUFA's). Cálculo estatístico do P-valor: * ANOVA de Medidas Repetidas Modelo Mixto; ** p-valor < que 0,005 (aumentou após a intervenção); *** p-valor < que 0,005 (reduziu após a intervenção).

5.4 Avaliação do estado nutricional antes e após o período de intervenção

Os dados do IMC, que classificam o estado nutricional, estão expostos na Tabela 13. Não houve diferença estatística significativa em nenhum dos grupos antes e após a intervenção.

Segundo os critérios de classificação dos pontos de corte proposto por Lipischitz (1994), e recomendado pelo Ministério da Saúde (2004), a média do IMC classifica o estado nutricional dos três grupos como sobrepeso (IMC entre 25kg/m² a 29,99 kg/m²).

Tabela 13 – Índice de massa corporal (IMC) antes e após intervenção entre os grupos.

	Ômega 3	Placebo	Combinado	P-valor*
Variáveis numéricas apresentadas em: média (desvio padrão)				
IMC antes (kg/m ²)	28,3 (4,0)	27,0 (4,6)	26,1 (3,7)	0,52
IMC após (kg/m ²)	28,3 (3,6)	27,0 (4,5)	26,2 (3,6)	

Cálculo estatístico do P-valor: * ANOVA de Medidas Repetidas Modelo Mixto; o P-valor não foi significativo nos três grupos, por isso não foi calculado individualmente.

5.5 Avaliação da ingestão alimentar antes e após o período de intervenção

Para monitorar se houve modificações na dieta, especialmente no consumo alimentar de lipídios durante a intervenção, aplicamos o R24h antes do início do estudo e outro no final do estudo. Os resultados do consumo alimentar para calorias totais (Kcal), % de lipídios da dieta, gordura saturada, MUFA, PUFA, ômega 6 e ômega 3, do R24h estão expostos na Tabela 14.

Analisando os dados da Tabela 14, nota-se que não houve modificações no padrão alimentar entre os R24h realizados antes e após o estudo para nenhuma das variáveis analisadas (Kcal, % de lipídios da dieta, gordura saturada, MUFA, PUFA, ômega 6 e ômega 3).

Tabela 14 – Ingestão de calorias e perfil do consumo de lipídios antes e após a intervenção entre os grupos.

	Ômega 3	Placebo	Combinado	P-valor*
Variáveis numéricas apresentadas em: média (desvio padrão)				
Kcal antes	1474 (328)	1538 (371)	1296 (448)	0,12**
Kcal após	1535 (321)	1589 (265)	1371 (342)	
Lipídios antes (%)	28,9 (4,3)	31,5 (4,6)	26,5 (6,1)	0,32**
Lipídios após (%)	28,9 (3,6)	29,9 (3,7)	26,9 (3,9)	
MUFA's antes (g)	12,0 (4,5)	15,6 (5,7)	9,0 (3,9)	0,53**
MUFA's após (g)	11,9 (5,2)	15,0 (5,5)	9,1 (3,6)	
Saturada antes (g)	16,8 (4,3)	16,3 (6,4)	11,9 (6,0)	0,17**
Saturada após (g)	16,0 (4,4)	15,5 (5,7)	11,7 (6,0)	
PUFA's antes (g)	11,4 (3,8)	11,7 (4,5)	9,4 (3,9)	0,78**
PUFA's após (g)	11,5 (4,0)	11,5 (3,9)	9,5 (3,6)	
n6 antes (g)	9,6 (3,0)	9,1 (4,0)	7,6 (3,5)	0,24**
n6 após (g)	9,7 (3,0)	8,6 (3,7)	7,5 (3,2)	
n3 antes (g)	1,0 (0,3)	0,9 (0,4)	0,9 (0,5)	0,51**
n3 após (g)	1,0 (0,2)	0,9 (0,3)	0,8 (0,3)	

Legenda: Kcal: quilocaloria; n6: ômega 6; n3: ômega 3. Cálculo estatístico do P-valor: * ANOVA de Medidas Repetidas Modelo Mixto; **o P-valor não foi significativa nos três grupos, por isso não foi calculado individualmente.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os grupos de intervenção do estudo, grupo ômega 3, grupo placebo e grupo combinado, foram semelhantes em todos os fatores sócio demográficos (idade, sexo, escolaridade, profissão, exercício físico, consumo de bebida alcoólica e tabagismo) e histórico clínico (ano de início do HIV, ano de início da TARV, células CD4, células CD8, uso de hipolipemiantes, carga viral e esquema da TARV), não havendo diferença estatística em nenhuma destas variáveis entre os grupos. Esta observação é importante pois reduz possíveis variáveis confundidoras dos resultados obtidos após a intervenção.

É importante ressaltar que, apesar de não haver diferença estatística significativa, o grupo ômega 3 teve o maior número de desistentes, 33,3 %, durante as 12 semanas de intervenção, contra 21,4% do grupo placebo e 23,1% do grupo combinado. As razões das desistências ao longo do estudo foram diversas, sendo que 11,1% do grupo ômega 3 desistiram por problemas gastrointestinais, contra 3,8% do grupo combinado e nenhuma desistência por esse motivo no grupo placebo. É sabido que um dos efeitos colaterais da suplementação com ômega 3, são relacionados com o trato gastrointestinal, acometendo em torno de 20% em doses altas, maiores de 4g/dia por dia, e em torno de 4% em doses mais baixas, menores que 3g/dia (WANG et al., 2006). Além disso, apesar de não ter sido relatado pelos voluntários deste estudo, a sensação de “cheirar peixe” costuma ser causa frequente da descontinuação do uso do suplemento (WANG et al., 2006).

Em relação ao padrão alimentar dos voluntários, antes e após a intervenção, concluímos que não houve alterações do hábito alimentar no que se refere a calorias totais da dieta e % de lipídios, bem como a proporção dos lipídios ingeridos: gordura saturada, MUFA's, PUFA's, ômega 6 e ômega 3. O padrão alimentar foi semelhante entre os grupos antes e após a intervenção, e não houve alterações estatisticamente significante para nenhum dos macronutrientes avaliados.

Ao analisar qualitativamente a proporção de lipídios ingeridas nos grupos, houve um consumo médio de 28,9% de lipídios nos três grupos e um total de 46g (média entre os três grupos) de lipídios na dieta. O percentual de ingestão de lipídios recomendado é de 20 a 35% das calorias totais, logo o percentual de gordura ingerida

foi adequado. Destes 46g, a distribuição dos tipos de lipídios foram: 15g de gordura saturada; 12,2g de MUFA-s; e 10,8g de PUFA's (ômega 6 – 9,78; ômega 3 – 1,02g). De acordo com as recomendações de ingestão de lipídios da FAO/WHO (2010) e da Sociedade Brasileira de Cardiologia, uma distribuição adequada dos lipídios para uma dieta com 46g de lipídios seria: 9,2g de gordura saturada; 25,3g de MUFA-s; e 11,5g de PUFA's (ômega 6 – 9,6g; ômega 3 – 1,9g)(SANTOS; GAGLIARDI; XAVIER, 2013). Fazendo uma comparação entre o consumido pela população de estudo e a proporção ideal preconizada temos que: houve uma ingestão 63% maior de gordura saturada; ingestão 51,8% menor de MUFA's; e uma ingestão discretamente menor de PUFA's (2,7%). A ingestão de ômega 6 foi condizente com o recomendado, já em relação ao ômega 3 houve uma ingestão reduzida em 46%. Desta forma, podemos concluir que a população de estudo desta pesquisa tinha um alto consumo de gordura saturada, baixo consumo de MUFA's e ômega 3.

Como limitação deste estudo, em relação ao método de investigação do hábito alimentar, sabe-se que o R24h é impreciso em capturar a probabilidade de consumo da maioria dos alimentos em um determinado período, tendo como limitação o relato de um dia de ingestão alimentar poder não refletir de forma precisa o hábito alimentar. Por outro lado, o R24h é considerado uma boa ferramenta para quantificar os nutrientes ingeridos. Outra ferramenta amplamente utilizada é o Questionário de Frequência Alimentar (QFA), que teria uma probabilidade maior de refletir o padrão alimentar, entretanto não seria tão eficaz quanto o R24h em quantificar os nutrientes. Além disso, recomenda-se que o QFA seja construído e validado para a população de estudo, e para averiguar o padrão alimentar no que se refere ao consumo de lipídios na dieta necessário para este estudo, se tornaria um QFA extenso o que poderia reduzir a acurácia e adesão pelos voluntários (SLATER et al., 2003).

Em relação a composição das cápsulas utilizadas no estudo, as cápsulas de ômega 3 continham 550mg de ômega 3 por cápsula (220mg de DHA e 330mg de EPA) (ANEXO C). As cápsulas de placebo eram de óleo de girassol. A literatura reporta que a composição do óleo de girassol é majoritariamente de LA (C18:2n6) e ácido oleico (C18:1n9), em uma proporção média de 56% e 27% respectivamente (FONSECA; GUTIERREZ, 1974) (MANDARINO, 1993). Em vista disso, podemos concluir que o grupo placebo teve uma suplementação de ácido graxo ômega 6 e

oleico, ácido graxo este conhecido na dieta mediterrânea por estar presente em grandes proporções no azeite de oliva.

Existem grandes estudos clínicos randomizados comparando a quantidade de EPA e DHA da dieta habitual (não suplementado) em desfechos cardiovasculares. Esses estudos apontam resultados como redução de 29% na mortalidade coronariana com o consumo de 2 a 3 porções de peixe por dia e redução do risco cardiovascular (BURR et al., 1989) (GISSI Prevenzione, 1999) (HE et al., 2004). A partir dessas investigações iniciou-se um investimento em estudos com suplementação de ômega 3, para verificar um possível efeito cardioprotetor avaliando se haveria efeitos positivos principalmente em perfil lipídico, inflamação e estresse oxidativo. Entretanto, embora seja consensual que o consumo regular de peixes rico em ômega 3 em longo prazo traga melhoras para a saúde, a recomendação de suplementar a dieta com cápsulas de óleo de peixe permanece controversa na literatura.

Os objetivos primários deste estudo foram em relação a intervenção com ômega 3 sobre o perfil lipídico, inflamação e estresse oxidativo. Em relação ao perfil lipídico este estudo não encontrou alterações significativas para triglicérides nos grupos suplementado com ômega 3 em doses distintas: 1100mg/dia (grupo combinado) e 2750mg/dia (grupo ômega 3). Os resultados encontrados para o grupo combinado, dose de 1100mg/dia de ômega 3, corroboram com os achados de Oliveira et al. (2014), que avaliaram os efeitos da suplementação de 900mg/dia de ômega 3 por 24 semanas em pacientes soropositivos em uso de TARV no Brasil. Entretanto doses maiores como a utilizada no grupo ômega 3, de 2750mg/dia, não haviam sido testadas na população brasileira. Nossos resultados não corroboram com estudos semelhantes em outras populações. Amador-Licona et al. (2016) avaliaram uma dose de 2,4g/dia de ômega 3 e realizaram uma intervenção em 35 indivíduos soropositivos residentes do México em uso de TARV por 24 semanas. Encontram uma redução de 13,9% nos triglicérides ($p=0,04$). Domingo et al. (2018), realizaram uma intervenção em pacientes HIV com suplementação de DHA por 48 semanas e observaram uma redução de 43% nos triglicérides ($p=0,0001$). Thusgaard et al. (2009) avaliaram uma dose de 1680mg/dia de ômega 3 em 25 pacientes soropositivos em uso de TARV na Dinamarca por 12 semanas, encontram uma redução nos triglicérides de 8,9% com diferença significativa para o grupo placebo ($p=0,03$). De Truchis et al. (2007) avaliaram o efeito de 1800mg/dia mais aconselhamento dietético em 60 pacientes

soropositivos em uso de TARV na França por 8 semanas, e observaram uma redução de 24,6% no triglicérides ($p=0,0033$).

Podemos observar que os estudos citados além de serem realizados em populações distintas, são estudos de pequeno porte, e os estudos que apresentaram uma redução relevante de triglicérides tiveram um tempo de intervenção maior do que este estudo. O estudo com tempo de intervenção de 12 semanas (THUSGAARD et al., 2009) apresentou uma redução significativa somente quando comparada ao grupo placebo, não sendo significativo quando comparado com o baseline no grupo intervenção. O estudo de De Truchis et al. (2007), apesar de ter sido apenas 8 semanas de suplementação houve aconselhamento dietético concomitante a intervenção.

Em contrapartida com os resultados dos estudos citados, o grupo placebo deste estudo teve uma redução de 30,3% dos triglicérides ($p=0,004$). Este resultado, inesperado, pode ser devido a composição de ácidos graxos do óleo de girassol utilizado, rico em LA e ácido oleico. O padrão alimentar dos voluntários desta investigação apresentou uma deficiência na ingestão de MUFA's e alto consumo de gordura saturada. O ácido oleico presente no óleo de girassol é um MUFA e o LA um PUFA da família ômega 6.

A dieta do mediterrâneo é conhecida por ser cardioprotetora principalmente pelo alto teor de MUFA, em especial o ácido oleico, oriundo da alta ingestão do azeite de oliva. Uma grande revisão sistemática e meta-análise de estudos epidemiológicos e ensaios randomizados controlados, mostrou a associação a esse padrão dietético com uma melhora no perfil lipídico em especial redução nos triglicérides (KASTORINI et al., 2011). Em relação ao LA presente no óleo de girassol, apesar de sua metabolização em ARA produzir eicosanoides pró-inflamatórios, alguns estudos apontam para um efeito benéfico do LA no perfil lipídico. Uma meta-análise com sessenta estudos concluiu que uma substituição de 10% de calorias provenientes de gordura saturada por PUFA ômega 6 estava associada a uma melhora no perfil lipídico (MENSINK et al., 2003). Assim, podemos atribuir a redução dos triglicérides do grupo placebo deste estudo, ao aumento do consumo de MUFA's presente no óleo de girassol, o qual era deficiente no padrão alimentar dos voluntários, em conjunto com

o aumento da ingestão de PUFA's ômega 6, que reduziu a proporção da ingestão de gordura saturada que era elevada.

Em relação aos níveis de colesterol total e HDL para o grupo ômega 3, houve um aumento significativo de 8,8% ($p=0,005$) e uma redução não significativa estatisticamente de 15%, respectivamente. No estudo de Amador-Licona et. al. (2016) houve um discreto aumento não significativo para colesterol total e HDL de 1% e 1,6% respectivamente. Thusgaard et al. (2009) observaram uma redução não significativa de 1,8% no colesterol total e 3,1% no HDL. Domingo et al. (2018) e De Truchis et al. (2007) não avaliaram o colesterol total e o HDL após a intervenção. Em uma revisão sistemática com 14 ensaios randomizados controlados com suplementação de ômega 3, em indivíduos não infectados pelo HIV, não foi observada influência significativa sobre colesterol total e HDL (WENDLAND et al., 2005). De forma geral, os resultados em relação a colesterol total e HDL não se mostram significativos na literatura com a suplementação de ômega 3. Em nosso estudo, apesar do aumento significativo estatisticamente para colesterol total, a elevação de 15,7mg/dl pode não representar importante repercussão clínica.

Em relação aos marcadores de inflamação, o grupo tratado com ômega 3 não apresentou alterações significativas sob os marcadores analisados: PCR, TNF- α , IL-6 e IL-10. Estes resultados corroboram com outros achados na literatura. Oliveira et al. (2015) avaliaram o efeito de 900mg de ômega 3 em soropositivos em uso de TARV no Brasil por 24 semana e não encontraram alterações pós intervenção para PCR, TNF- α e IL-6. Em outro estudo recente, Swanson et al. (2018), avaliaram por 12 semanas a suplementação de 1,6g/dia de ômega 3 em pacientes soropositivos dos Estados Unidos e não encontraram alterações para PCR, TNF- α e IL-6. Thusgaard et al. (2009) avaliaram uma dose de 1680mg/dia de ômega 3 em pacientes soropositivos em uso de TARV da Dinamarca por 12 semanas e não encontraram alterações na PCR. Já o estudo de Domingo et al. (2018), que realizaram intervenção em pacientes HIV com suplementação de ômega 3 exclusivamente de DHA por 48 semanas, encontraram uma redução significativa para PCR de 52%, mas nenhuma diferença para IL-6 e TNF- α . Não encontramos na literatura nenhum ensaio clínico em indivíduos soropositivos suplementados com ômega 3 que avaliaram a IL-10.

Em contrapartida a esses resultados, o grupo placebo, que recebeu óleo de girassol teve um aumento estatisticamente significativo de 43,75% na IL-10 ($p=0,03$). Não encontramos na literatura ensaios clínicos com administração de óleo de girassol em pacientes soropositivos que avaliaram a IL-10 como marcador inflamatório. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória secretada pelos linfócitos T auxiliares, que regula a resposta imune, desempenhando papel importante sobre doenças infecciosas. Estudos em modelos animais revelam que a IL-10 pode aumentar a resistência a patógenos e facilitar a eliminação viral. No HIV, a IL-10 pode atuar na regulação das funções das células CD4 e CD8 (KWON; KAUFMANN, 2010). Portanto, um aumento na IL-10 em pacientes soropositivos, pode ser interpretado como uma importante melhoria na inflamação.

Um estudo recente avaliou indicadores inflamatórios em 79 idosos obesos ou com sobrepeso por 12 semanas, com uma suplementação de diferentes tipos de óleos: linhaça, oliva e girassol. O óleo de girassol reduziu os níveis de leptina, apoliproteína B (ApoB), relação apoliproteínaA/apoliproteínaB (ApoA/ApoB) e a distensibilidade da parede arterial e da vasodilatação fluxo-mediada (VFM). Os autores concluíram que a suplementação de ácidos graxos insaturados provenientes dos três óleos vegetais atenuou o quadro pró-inflamatório (OLIVEIRA, 2016). Esposito et al. (2004) avaliaram 180 pacientes com síndrome metabólica por 96 semanas e um uso de 2g/dia de azeite de oliva, rico em ácido graxo oleico, e verificaram uma redução no PCR. Recente revisão da literatura sobre estudos que substituíram a ingestão de gorduras e óleos ricos em ácidos graxos saturados por óleo rico em ácido oleico teve efeito favorável sobre as lipoproteínas. Além disto, mostrou também que a troca com óleos vegetais ricos em ômega 6, como o óleo de girassol, teve efeitos benéficos nos fatores de risco para a doença crônica vascular (DCV) (HUTH; FULGONI; LARSON, 2015). Um grande estudo prospectivo, o PREDIMED (*Prevention com Dieta Mediterranea*), acompanhou 7038 pacientes com alto risco para DCV por 6 anos e avaliou a ingestão de gorduras (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2015). Concluíram que o uso de MUFA e PUFA estava associado a baixo risco de DCV, enquanto que a associação com a ingestão de gordura saturada foi inversa. Portanto, a hipótese que levantamos sobre a ação positiva do óleo de girassol em relação a inflamação, deve-se às frações de LA, oleico e uma pequena fração de ALA, que podem ter agido sinergicamente para provocar estes resultados.

Em relação aos marcadores do estresse oxidativo analisados, MDA, GSH e vitamina E, verificamos que nos três grupos não houve alterações no GSH (um antioxidante enzimático) após a intervenção, contudo houve uma redução significativa no MDA e um aumento significativo para vitamina E em todos os grupos. Encontramos na literatura apenas o estudo de Amador-Licona et al. (2016) que avaliaram a suplementação de ômega 3 em pacientes soropositivos, em que os resultados da intervenção não apresentaram alterações nos marcadores de estresse oxidativo avaliados (MDA e GSH). Em estudos que avaliaram a suplementação de ômega 3 em outras comorbidades os resultados são controversos. Grundt et al. (2003) observaram um aumento na concentração de MDA após um ano de suplementação de ômega 3 em indivíduos infartados. Nordoy et al. (1998) não observaram alterações nas concentrações de vitamina E nem de peróxidos lipídicos após suplementação com 4g/dia de ômega 3 em pacientes dislipidêmicos.

Nossos resultados apontam que houve uma melhora no quadro de estresse oxidativo de todos os grupos, uma vez que o MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da ruptura de ácidos graxos PUFA's, e seus valores reduziram após a intervenção, e, a vitamina E, que é considerada um antioxidante não enzimático, aumentou em todos os grupos.

Apesar dos PUFA's serem mais suscetíveis a peroxidação lipídica, o que poderia piorar o quadro de estresse oxidativo, como é demonstrado em alguns estudos, com a diminuição no HDL e aumento na suscetibilidade da LDL à oxidação (LOUHERANTA et al., 1996)(LICHTENSTEIN et al., 1994), estes resultados se contradizem com grandes estudos populacionais que relacionam o aumento do consumo de PUFA's com a redução de eventos cardiovasculares (WAXMAN, 2004)(LINDSTROM et al., 2003). Os PUFA's estão envolvidos na modulação de genes ligados a processos oxidativos, aumentando por exemplo os PPARs e bloqueando aqueles relacionados a lipogênese. Os SREBP-1a e SREBP-1c têm sua expressão diminuída com PUFA's, o que reduziria a indução da SREBP à síntese de ácidos graxos (HANNAH et al., 2001). Estes dados poderiam justificar nossos resultados positivos em todos os grupos em relação ao estresse oxidativo, uma vez que houve aumento da ingestão de PUFA's em todos os grupos.

Das análises laboratoriais de interesse secundário, não houve diferenças significantes para glicose, proteínas totais, ácidos graxos livres. Os resultados para

glicose corroboram com outros estudos que avaliaram este parâmetro após a suplementação com ômega 3 em pacientes soropositivos em tratamento com TARV (AMADOR-LICONA et al.; 2016; WOODS et al., 2009; METKUS et al., 2013; PETERS et al., 2012). Não encontramos na literatura investigações acerca de alterações com suplementação de ômega 3 em soropositivos para proteínas totais e ácidos graxos livres. Em relação à metilação do DNA não houve diferença estatística para o grupo ômega 3. Contudo houve um aumento estatisticamente significativo de 7,5% no grupo placebo.

A metilação do DNA consiste na adição de um radical metil a uma base citosina no DNA. O mecanismo mais simples de como a metilação do DNA atua na expressão gênica é por meio do bloqueio do sítio promotor ao acesso de fatores de transcrição, ou seja, a metilação do DNA interfere diretamente na sequência de ligação dos fatores. A influência do metabolismo da dieta no controle epigenético ainda é recente na literatura. Sabe-se que o aumento no consumo de antioxidantes da dieta melhora o quadro do estresse oxidativo, o que poderia influenciar a regulação epigenética. Switzeny et al, (2012) concluíram que uma dieta rica em antioxidantes, foi capaz de alterar a metilação do DNA em diabéticos tipo 2. Por outro lado, infecções virais como o HIV podem ser fontes de estresse oxidativo (DE MARCO, 2013). Considerando esses achados, e considerando ainda que o óleo de girassol é uma fonte alimentar importante de vitamina E (grupo placebo – 5g óleo de girassol/dia – 3mg/vitamina E) (USDA, 2015), o aumento significativo da metilação do DNA no grupo placebo pode ser devido à melhora no quadro do estresse oxidativo, devido a presença de vitamina E no óleo de girassol.

A mudança no perfil de ácidos graxos após a intervenção ocorreu no mesmo sentido em todos os grupos. Houve um aumento significativo na incorporação de ácidos graxos insaturados, ocasionado pelo aumento significativo de PUFA's, que por sua vez deveu-se ao aumento significativo de ômega 6. Houve ainda uma redução significativa na incorporação de ácidos graxos saturados e uma redução no ômega 3. Estes resultados não corroboram com os achados na literatura. Swanson et al. (2018), encontraram um aumento na concentração plasmática para EPA, DHA, ômega 3 total, e PUFA's, o que os autores sugeriram ser uma evidência da adesão a suplementação com ômega 3 nos pacientes soropositivos. Metkus et al. (2013) também observaram

aumento significativo nas concentrações séricas de ômega 3 após a suplementação em soropositivos.

A não observação do aumento da concentração plasmática de ômega 3 nos grupos suplementados com este ácido graxo (grupo ômega 3 e grupo combinado), poderia indicar uma falta de adesão ao tratamento, o que justificaria os resultados não significativos no perfil lipídico e inflamação dos grupos suplementados com ômega 3. O número de desistentes da pesquisa foi maior no grupo ômega 3. Uma dose diária de 5 cápsulas de óleo de peixe por dia pode ter ocasionado efeitos desagradáveis como a sensação de cheirar peixe ou de sentir gosto de peixe na boca o que pode ter dificultado a adesão ao tratamento.

7 CONCLUSÃO

A suplementação com ômega 3, em doses distintas, para pacientes soropositivos em uso de TARV apresentou melhora significativa apenas para o quadro de estresse oxidativo (redução de MDA e aumento de vitamina E). Contudo este resultado também foi encontrado para o grupo placebo, suplementado com óleo de girassol. Os parâmetros para perfil lipídico e inflamação não apresentaram alterações com a intervenção de ômega 3. Em contrapartida, o grupo placebo, apresentou uma melhora no perfil lipídico e na inflamação, com uma redução significativa nos triglicérides e aumento na IL-10. Além disso, das variáveis de desfecho secundário o grupo placebo também apresentou um aumento na metilação do DNA.

No conjunto, nossos resultados não foram compatíveis com a hipótese inicial, de que a suplementação com ômega 3 em soropositivos em uso de TARV poderia trazer benefícios no perfil lipídico e inflamação, confirmando a hipótese apenas para o estresse oxidativo. Por outro lado, o grupo placebo, suplementado com óleo de girassol, apresentou expressiva melhoria, tanto do ponto de vista estatístico quanto clínico, no perfil lipídico, inflamação e estresse oxidativo e metilação do DNA.

Estes resultados inesperados, podem ser atribuídos a fração de MUFA's presentes no óleo de girassol, o qual era deficiente no padrão alimentar dos voluntários, além do fato de ser considerado fonte de vitamina E, um potente antioxidante.

Dessa forma, fica aberta a possibilidade de investimentos em pesquisas que avaliem a suplementação com óleo de girassol em pacientes soropositivos em uso de TARV, com o objetivo de investigar melhoras no perfil metabólico destes pacientes, muitas vezes afetado pela síndrome da lipodistrofia, abrindo novas alternativas terapêuticas de intervenção de baixo custo e efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS

AMADOR-LICONA N. Omega 3 Fatty Acids Supplementation and Oxidative Stress in HIV-Seropositive Patients. A Clinical Trial. **PLoS One**, v. 11, n. 3, 2016.

BARBARO, G. Highly active antiretroviral therapy-associated metabolic syndrome: pathogenesis and cardiovascular risk. **Am J Ther**, v.13, p. 248-260, 2006.

BARBARO, G.; SILVA, E.F. Cardiovascular complications in the acquired immunodeficiency syndrome. **Rev Assoc Med Bras**, v. 55, p. 621-630, 2009.

BATTERHAM, M.B.D.; GARSIA, R. Nutritional management of HIV/AIDS in the era of highly active antiretroviral therapy: a review. **Australian Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 58, p. 211-223, 2011.

BEDIMO, R.J. Body-fat abnormalities in patients with HIV: progress and challenges. **J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic Ill)**, v. 7, p. 292-305, 2008.

BENATTI, P. et al. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. **J Am Coll Nutr**, v.23, p.281-302, 2004.

BERGERSEN, B.M. et al. Important differences in components of the metabolic syndrome between HIV-patients with and without highly active antiretroviral therapy and healthy controls. **Scand J Infect Dis**, v. 38, p. 682-689, 2006.

BLUMER, R.M. et al. Zidovudine/lamivudine contributes to insulin resistance within 3 months of starting combination antiretroviral therapy. **AIDS**, v.22, p. 227-236, 2008.

BRASIL. Lei n. 9.313 de 13 de novembro de 1996. Dispõe sobre a distribuição gratuita de medicamentos aos portadores de HIV e doentes de AIDS. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 1996.

BURR, M.L. et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). **Lancet**, v. 30, p. 757-761, 1989.

CALDER, P.C. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. **Clin Sci (Lond)**, v. 107, p. 1-11, 2004.

CALDER, P.C. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **Am J Clin Nutr**, vol. 83, p. 1505S-1519S, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). **A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties**. California: MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1982.

CHAISSON, R.E.; KERULY, J.C.; MOORE, R.D. Association of initial CD4 cell count and viral load with response to highly active antiretroviral therapy. **JAMA**, v. 284, p. 3128-3129, 2000.

COPPINI, L.Z.C.; JESUS, R.P. **Terapia nutricional na síndrome da imunodeficiência adquirida**. In: Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral. Projeto Diretrizes. São Paulo: Associação Médica Brasileira/Conselho Federal de Medicina, p. 171-82, 2011.

COSTA, C.M.; DOS SANTOS, R.C.C.; LIMA, E.S. A simple automated procedure for thiol measurement in human and serum samples. **O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, p. 345-350, 2006.

DE MARCO, F. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. **Viruses**, vol. 5, p. 708-731 2013.

DE TRUCHIS, P. et al. Reduction in triglyceride level with N-3 polyunsaturated fatty acids in HIV-infected patients taking potent antiretroviral therapy: a randomized prospective study. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 44, p. 278-285, 2007.

DOMINGO P. et al. Effects of docosahexanoic acid supplementation on inflammatory and subcutaneous adipose tissue gene expression in HIV-infected patients on combination antirretroviral therapy (cART). A sub-study of a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Cytokine**, v. 105, p. 73-79, 2018.

EATON, S. B. et al. Dietary intake of long-chain polyunsaturated fatty acids during the paleolithic. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 83, p.12-23, 1998.

ESPOSITO, K. et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. **JAMA**, v. 292, p. 1440-1446, 2004.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization). Fats and fatty acids in human nutrition. **Report of an expert consultation. FAO Food Nutr Pap**, v. 91, p. 1-166, 2010.

FETTERMAN, J.W.J.; ZDANOWICZ M.M. Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. **Am J Health-Syst Pharm**, v. 66, p. 1169-1179, 2009.

FISBER, G.R.M., et al. **Inquéritos alimentares: métodos e bases científicos**. São Paulo, editora: Manole, 2005.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FONSECA, H.; GUTIERREZ, L. **Composição em ácidos graxos de óleos vegetais e gorduras animais**. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, v. 31, p. 485-490, 1974.

FONSECA, M.G.P.; BASTOS, F.I. Twenty five years of the AIDS epidemic in Brazil: principal epidemiological findings, 1980-2005. **Cad Saúde Pública**, v. 23, p. 333-344, 2007.

GALLANT J.E. et al. Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV. **N Engl J Med**, v. 354, p. 251-260, 2006.

GALLO, R.C. et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, v. 224, p. 500-503, 1984.

GERARD-MONNIER, D. et al. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chem Res Toxicol**, v. 11, p. 1176-1183, 1998.

GILBERT, M.T. et al. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. **Proc Natl Acad Sci**, v. 104, p. 566-570, 2007.

GISSI Prevenzione trial (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico) Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the. **Lancet**, v. 354, p. 447-455, 1999.

GOEBEL F.D. Combination therapy from a clinician's perspective. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, v. 10, p.62-68, 1995.

GRUNDT, H. et al. Increased lipid peroxidation during long-term intervention with high doses of n-3 fatty acids (PUFAs) following an acute myocardial infarction. **Eur J Clin Nutr**, v. 57, p. 793-800, 2003.

HANNAH, V.C. et al. Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. **J Biol Chem**, v. 276, p.4365-4372, 2001.

HARRIS, W.S. Are omega-3 fatty acids the most important nutritional modulators of coronary heart disease risk? **Curr Atheroscler Rep**, v.6, p. 447-452, 2004.

HARRIS, W.S. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. **Atherosclerosis**, v.197, p. 12-24, 2008.

HE, K. et al. Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies. **Circulation**, v. 109, p. 2705-2711, 2004.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, p. 860-867, 2006.

HUTH, P.J.; FULGONI, V.L.; LARSON, B.T. A systematic review of high-oleic vegetable oil substitutions for other fats and oils on cardiovascular disease risk factors: implications for novel high-oleic soybean oils. **Adv Nutr**, v. 6, p. 674-693, 2015.

JOHNSON, R. K.; SOULTANAKIS, R. P.; MATTHEWS, D. E. Literacy and body fatness are associated with underreporting of energy intake in US low income women

using the multiple-pass 24 hours recall.: a doubly labeled water study. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 98, p.1136-1140, 1998.

JORDÃO, A.A. et al. Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 459-64, 2004.

KASTORINI, C.M. et al. The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. **J Am Coll Cardiol**, vol. 57, p. 1299-1313, 2011.

KWON, D.S.; KAUFMANN, D.E. Protective and detrimental roles of IL-10 in HIV pathogenesis. **Eur Cytokine Netw**, v. 21, p. 208-214, 2010.

LIANG, J.S. et al. HIV protease inhibitors protect apolipoprotein B from degradation by the proteasome: a potential mechanism for protease inhibitor-induced hyperlipidemia. **Nat Med**, v. 7, p. 1327-1331, 2001.

LICHTENSTEIN, A.H. et al. Hypercholesterolemic effect of dietary cholesterol in diets enriched in polyunsaturated and saturated fat. Dietary cholesterol, fat saturation, and plasma lipids. **Arterioscler Thromb**, v. 14, p.168-175, 1994.

LINDSTROM, J. et al. Finnish Diabetes Prevention Study Group. The Finnish Diabetes Prevention Study (DPS): Lifestyle intervention and 3-year results on diet and physical activity. **Diabetes Care**, v.26, p.3230-3236, 2003.

LOUHERANTA, A.M. et al. Linoleic acid intake and susceptibility of very-low-density and low density lipoproteins to oxidation in men. **Am J Clin Nutr**, v. 63, p. 698-703, 1996.

LUNDGREN, J.D. et al. European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines on the prevention and management of metabolic diseases in HIV. **HIV Medicine**, v. 9, p. 72-81, 2008.

MANDARINO, J. M. G. **Características bioquímicas e nutricionais do óleo e do farelo de girassol**. EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 52, p. 25, 1993.

MARTIN, C.A., et. al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 761-777, 2006.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M.A. et al. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 58, p. 50-60, 2015.

MELBYE, M. et al. HTLV-III seropositivity in European haemophiliacs exposed to Factor VIII concentrate imported from the USA. **Lancet**, v.22, p. 1444-1446, 1984.

MENSINK, R.P. et al. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. **Am J Clin Nutr**, vol. 77, p. 1146-1155, 2003.

METKUS, T.S. Omega-3 fatty acid therapy reduces triglycerides and interleukin-6 in hypertriglyceridemic HIV patients. **HIV Med**, v. 14, p. 530-539, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Secretaria da Vigilância em Saúde). Programa Nacional de DST e Aids. **Recomendações para Terapia anti-retroviral em Adultos e Adolescentes infectados pelo HIV**. Brasília, DF, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: HIV AIDS 2017**. Brasil, 2017. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/boletim-epidemiologico-hivaids-2017>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Orientações básicas para a coleta, processamento, análise de dados e informação em serviços de saúde para o sistema de vigilância alimentar e nutricional**. Versão Preliminar. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **História da Aids**. Brasil, 2011. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/historia-da-aids>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV**. Brasil, 3ª edição, 2016.

NEPA – Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. NEPA-UNICAMP. Versão II. 2. ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP; 2006.

NORDOY, A. et al. Effects of Simvastatin and omega-3 fatty acids on plasma lipoproteins and lipid peroxidation in patients with combined hyperlipidaemia. **J Intern Med**, v. 243, p. 163-170, 1998.

OH, J.; HEGELE, R.A. HIV-associated dyslipidaemia: pathogenesis and treatment. **Lancet Infect Dis**, v. 7, p. 787-796, 2007.

OLIVEIRA, J.M. et al. Effects of a Low Dose of Fish Oil on Inflammatory Markers of Brazilian HIV-Infected Adults on Antiretroviral Therapy: A Randomized, Parallel, Placebo-Controlled Trial. **Nutrients**, v. 7, p. 6520-6528, 2015.

OLIVEIRA, J.M. et al. Effects of fish oil on lipid profile and other metabolic outcomes in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: a randomized placebo-controlled trial. **Int J STD AIDS**, v. 25, p. 96-104, 2014.

OLIVEIRA, J.M. et al. Effects of fish oil on lipid profile and other metabolic outcomes in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: a randomized placebo-controlled trial. **Int J STD AIDS**, v. 25, p. 96-104, 2014.

OLIVEIRA, J.M.; RONDÓ, P.H. Omega-3 fatty acids and hypertriglyceridemia in HIV-infected subjects on antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis. **HIV Clin Trials**, v.12, p.268-274, 2011.

OLIVEIRA, P. A. **Indicadores inflamatórios, função endotelial e outros marcadores de risco cardíaco em pacientes idosos com sobrepeso e obesidade: resposta à suplementação de azeite de oliva, óleo de linhaça e óleo de girassol.** Tese (Doutorado Ciências em Gastroenterologia) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

PATON, N.I. et al. Lipodystrophy in a cohort of human immunodeficiency virus-infected Asian patients: prevalence, associated factors, and psychological impact. **Clin Infect Dis**, v. 35, p. 1244-1249, 2002.

PETERS, B.S. et al. The effect of a 12-week course of omega-3 polyunsaturated fatty acids on lipid parameters in hypertriglyceridemic adult HIV-infected patients undergoing HAART: a randomized, placebo-controlled pilot trial. **Clin Ther**, v. 34, p. 67-76, 2012.

PINHEIRO A.B.V., et al. **Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras.** 5. ed. São Paulo, Atheneu, 2004.

PONTE, C.M.M. et al. Metabolic disorders in emerging and neglected infectious diseases. **Arq. bras. Endocrinol**, v. 54, p. 785-792, 2010.

RACHID, M.; SCHECHTER, J. **Manual de HIV / Aids.** 8 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.

RUSSO, G.L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochem Pharmacol**. v. 77, p. 937-946, 2009.

SANTOS, R.D. et al. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular (Sociedade Brasileira de Cardiologia). **Arq Bras Cardiol**, v.100, p. 1-40, 2013.

SARAVANAN, P., et al. Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. **Lancet**, v. 376, p. 540-550, 2010.

SHOELSON, S.E.; LEE, J.; GOLDFINE, A.B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, p. 1793-1801, 2006.

SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of the dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratio: medical implications. **World Rev Nutr Diet**, v.100, p. 1-21, 2009.

SISVAN (SISTEMA DE VIGILÂNCIA ALIMENTAR E NUTRICIONAL). **Orientações básicas para a coleta, o processamento, a análise de dados e a informação em serviços de saúde.** Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

SLATER, B. et al. Validação de Questionários de Frequência Alimentar - QFA: considerações metodológicas. **Rev. bras. Epidemiol**, v.6, p. 200-208, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. **Arq Bras Cardiol**, v. 84, p. 3-28, 2005.

STASZEWSKI, S. et al. Abacavir-lamivudine-zidovudine vs indinavir-lamivudine-zidovudine in antiretroviral-naïve HIV-infected adults: A randomized equivalence trial. **JAMA**, v. 285, p. 1155-1163, 2001.

SWANSON B., et al. Effects of Fish Oil on HIV-Related Inflammation and Markers of Immunosenescence: A Randomized Clinical Trial. **J Altern Complement Med**, v. 24, p. 709-716, 2018.

SWITZENY, O. J. et al. Vitamin and antioxidant rich diet increases MLH1 promoter DNA methylation in DMT2 subjects. **Clinical Epigenetics**, v. 4, p. 19, 2012.

TAVARES, V.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.51, p. 526-533, 2007.

THUSGAARD, M. et al. Effect of fish oil (n-3 polyunsaturated fatty acids) on plasma lipids, lipoproteins and inflammatory markers in HIV-infected patients treated with antiretroviral therapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Scand J Infect Dis**, v.41, p.760-766, 2009.

TVRZICKA, E., et al. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 155, p. 117-130, 2011.

UNAIDS. **Ending AIDS: Progress towards the 90-90-90 targets**. UNAIDS Report, Word Health Organization, 2017. Disponível em: <http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/Global_AIDS_update_2017_en.pdf>.

USDA (United States Department of Agriculture Agricultural Research Service). Food Composition Database. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>>, 2015.

WALL, R. et al. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. **Nutr Ver**, v. 68, p. 280-289, 2010.

WANG, C. et al. n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. **Am J Clin Nutr**, vol. 84, p. 5-17, 2006.

WAXMAN, A. World Health Assembly. WHO global strategy on diet, physical activity and health. **Food Nutr Bull**, v.25, p. 292-302, 2004.

WENDLAND, E. et al. Effect of alpha linolenic acid on cardiovascular risk markers: a systematic review. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 92, p. 166-9, 2005.

WOODS, M.N. et al. Effect of a dietary intervention and n-3 fatty acid supplementation on measures of serum lipid and insulin sensitivity in persons with HIV. **Am J Clin Nutr**, v. 90, p. 1566-1578, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Joint Consultation: fats and oils in human nutrition. **Nutr Rev**, v. 53, p.202-205, 1995.

WOROBAY, M. et al. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. **Nature**. v. 455, p. 661-664, 2008.

YEHUDA, S. et al. Fatty acid mixture counters stress changes in cortisol, cholesterol, and impair learning. **Int J Neurosci**, v.101, p. 73-87, 2000.

YUDKIN, J.S. Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome. **Horm Metab Res**, v. 39, p. 707-709, 2007.

ANEXO B - Parecer circunstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Continuação do Parecer: 1.155.329

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de ensaio clínico randomizado duplo-cego que será desenvolvido na Unidade Especializada em Doenças Infeciocontagiosas (UETDI) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCFMRP), que possui atendimento todos os dias da semana. A seleção da amostra será realizada por conveniência de forma aleatória, onde os pacientes atendidos serão convidados a participar do estudo, até que cada grupo de intervenção ou placebo tenha 30 pacientes (totaln=90).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentadas novas versões dos documentos que estão de acordo com a Resolução 466/12.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa versão 2 de 18/06/2015, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 2 de 18/06/2015, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO		
Bairro: MONTE ALEGRE	CEP: 14.048-900	
UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO	
Telefone: (16)3602-2228	Fax: (16)3633-1144	E-mail: cep@hcrp.usp.br

Anexo C - Lauda técnico das cápsulas de ômega 3 e óleo de girassol

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Produto: Cápsula de Óleo de Peixe 33/22 1000mg
 Lote: P160507
 Data de Fabricação: 10/2016
 Data de Validade: 2 anos

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Aspecto da cápsula	Cápsula gelatinosa mole, incolor, em formato 16 oblonga.	Conforme
Aspecto do conteúdo	Líquido oleoso, cor amarelo claro, odor e sabor característico e livre de material estranho.	Conforme
Umidade	Máx. 15,0%	12,12%
Peso da cápsula (conteúdo)	1000mg/cáps. (925 a 1075mg/cáps.) RSD<6,0%	995,1mg/cáps. 2,27%
Desintegração	Máx. 30 min.	08'49"
*Arsênico	<0,1ppm	<0,1
*Cádmio	<0,01ppm	<0,01
*Mercúrio	<0,005ppm	<0,005
*Chumbo	<0,05ppm	<0,05
*Estroncio	<0,5ppm	<0,5
*EPA	Min. 33,0%	37,0%
*DHA	Min. 22,0%	25,0%
Contagem Total	Máx. 300 UFC/g	<300
Fungos	Máx. 100 UFC/g	<100
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	Ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente	Ausente
<i>Salmonella sp</i>	Ausente	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente	Ausente

*Conforme laudo do fornecedor

Resultado: ☒ Aprovado ☐ Reprovado

 Dra. Aline A. Santos
 Resp. Téc. CRF-SP 56.421
 Data: 24/10/2016

Precauções Importantes

- 1-Na embalagem original armazenar na temperatura de 15 a 30°C protegendo da luz e umidade, nunca em câmara frigorífica, observando as condições de armazenamento.
- 2- Após a abertura da embalagem as cápsulas devem ser embaladas imediatamente.
- 3-As embalagens de venda e amostra devem ser impermeáveis.
- 4-ALÉRGICOS: CONTÉM PEIXE.

Av. Victor Andrew, 1350 - Bairro: Éden - Zona Industrial
 CEP: 18086-390 - Sorocaba/SP - Tel.: (15) 3238-1414

sorocaps@sorocaps.com.br
www.sorocaps.com.br

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Produto: Cápsula de Óleo de Girassol 1000mg
 Lote: P160366
 Data de Fabricação: 07/2016
 Data de Validade: 2 anos

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Aspecto da cápsula	Cápsula gelatinosa mole, incolor, em formato 16 oblonga.	Conforme
Aspecto do conteúdo	Líquido oleoso, amarelo claro, odor e sabor característico.	Conforme
Peso da cápsula (conteúdo)	1000mg/cáps. (925 a 1075mg/cáps.) RSD<6,0%	986 mg/cáps. 1,07%
Desintegração	Máx. 30 min.	09'01"
Umidade	Máx. 15,0%	14,02%
Contagem total	Máx. 300 UFC/g	<300
Fungos	Máx. 100 UFC/g	<100
Pesq. <i>Escherichia coli</i>	Ausente/g	Ausente
Pesq. <i>Salmonella sp</i>	Ausente/g	Ausente
Pesq. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente/g	Ausente
Pesq. <i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente/g	Ausente

Resultado: ☒ Aprovado ☐ Reprovado

 Dra. Aline A. Santos
 Resp. Téc. CRF-SP 56.421
 Data: 06/08/2016