Sheylla Maryelleen Felau Cerqueira

Eficácia e segurança da suplementação de ômega 3 em pacientes com a síndrome do anticorpo antifosfolípide primário

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa: Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Imunes e Infecciosos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Braga Benatti

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2017

Sheylla Maryelleen Felau Cerqueira

Eficácia e segurança da suplementação de ômega 3 em pacientes com a síndrome do anticorpo antifosfolípide primário

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa: Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Imunes e Infecciosos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Braga Benatti

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cerqueira, Sheylla Maryelleen Felau

Eficácia e segurança da suplementação de ômega 3 em pacientes com a síndrome do anticorpo antifosfolípide primário / Sheylla Maryelleen Felau Cerqueira. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e Infeciosos.

Orientadora: Fabiana Braga Benatti.

Descritores: 1.Síndrome antifosfolípídica 2.Suplementação nutricional 3.Ácidos graxos ômega-3 4.Coagulação sanguínea 5.Células endoteliais

USP/FM/DBD-412/17

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmã e meu esposo, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, por ter me guiado até aqui e pela força em continuar.

Aos meus pais Eny e Sergio, irmã Danielly e demais familiares por me apoiarem em todos os momentos.

Ao meu esposo Alexandre pelo amor, apoio e por sempre me encorajar.

Aos colegas e professores do LACRE sou muito grata pelo convívio, por toda a colaboração e ensinamentos.

À universidade, seu corpo docente e funcionários, pela oportunidade de aprendizado.

Aos profissionais do ambulatório de Reumatologia, pela disposição e toda colaboração.

Sou imensamente grata a minha orientadora Fabiana Benatti pela oportunidade, pelos ensinamentos, por toda a paciência e constante apoio.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado!!!!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas, símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	1
1.1 Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide (SAF).....	1
1.1.1 Conceito	1
1.1.2 Fisiopatogênese	2
1.1.3 SAF: Inflamação, ativação endotelial e riscos cardiovasculares.....	3
1.2 Ômega 3	5
1.2.2 Ômega 3 e inflamação.....	6
1.2.3 Ômega 3, função endotelial e riscos cardiovasculares	8
1.2.4 Efeitos da suplementação de Ômega 3 na coagulação sanguínea.....	10
2. Justificativa	11
3. Objetivos.....	11
3.1 Objetivo geral	11
3.2 Objetivos específicos.....	11
4. Metodologia.....	12
4.1 Protocolo Experimental.....	12
4.2 Recrutamento e seleção.....	13
4.3 Suplementação e vendamento.....	14
4.4 Avaliação clínica.....	14
4.5 Composição corporal.....	14
4.6 Análise plasmática.....	15
4.7 Função endotelial	15
4.8 Ingestão Dietética.....	16
4.9 Análise Estatística.....	16
5. Resultados.....	17
5.1 Características dos grupos.....	17

5.2	Efeito da suplementação no perfil lipídico.....	18
5.3	Efeito da suplementação na função endotelial.....	21
5.4	Efeito da suplementação no perfil inflamatório.....	26
5.5	Segurança da suplementação.....	26
5.6	Ingestão dietética	26
6.	DISCUSSÃO.....	26
7.	CONCLUSÃO.....	29
8.	REFERÊNCIAS.....	30

LISTA DE ABREVIACÕES

AA - Ácido Araquidônico

ALA – Ácido alpha linolênico

B2GP1 – Beta glicoproteína 1

DHA – Ácido Docosaexaenóico

EPA – Ácido Eicosapentaenóico

HDL – Lipoproteína de alta densidade

ICAM-1 – Molécula de adesão intracelular -1

IFN – Interferon

IL ra – Receptor antagonista de Interleucina

IL-1 – Interleucina 1

IL-17 – Interleucina 17

IL-1b – Interleucina 1 beta

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IMC – Índice de Massa Corporal

INR – *International Normalized Ratio*

LA – Ácido linoléico

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LES - Lúpus Eritematoso Sistêmico

LnRHI – transformação logarítmica de Índice de Hiperemia Reativa

LTB4 – Leucotrieno da série 4

LTB5 – Leucotrieno da série 5

NK – células *natural killer*

oxLDL - Lipoproteína de baixa densidade oxidada

PAI-1 – Inibidor do ativador de plasminogênio

PGE2 – Prostaglandina da série 2

PGE3 – Prostaglandina da série 3

PL - Placebo

PUFA – Ácidos graxos poliinsaturados

SAF - Síndrome do Anticorpo antifosfolípide

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TX - Tromboxanos

TXA3 – Tromboxanos da série 3

VCAM-1 - Molécula de adesão vascular -1

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

W-3 - Ômega 3

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos do grupo ω -3 e grupo PL antes da intervenção.....	19
Tabela 2. Perfil lipídico antes e após intervenção no grupo ω -3 e grupo PL.....	20
Tabela 3 – Marcadores e estimativas de função endotelial antes e depois da intervenção no grupo ω -3 e grupo PL.....	23
Tabela 4 – Perfil inflamatório antes e depois da intervenção no grupo ω -3 e grupo PL.....	24
Tabela 5. - Ingestão dietética antes e após intervenção com ω -3 e PL.	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho Experimental.....	13
Figura 2 – Fluxograma do estudo.....	18
Figura 3 – Estimativas de função endotelial antes e após intervenção no grupo ω -3 e grupo PL.....	21

Cerqueira SMF. Eficácia e segurança da suplementação de ômega 3 em pacientes com a síndrome do anticorpo antifosfolípide primário [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

RESUMO

A síndrome do anticorpo antifosfolípide (SAF) é uma doença autoimune sistêmica caracterizada por episódios trombóticos recorrentes e/ou complicações durante a gravidez e presença de anticorpos antifosfolípidos séricos (aPL). Os pacientes com SAF apresentam maior risco de aterosclerose e doenças cardiovasculares (DCVs). Estudos sugerem que as células endoteliais desempenham um papel central na patogênese do SAF uma vez que pacientes com SAF apresentam comprometimento da função endotelial quando comparados a controles saudáveis. A suplementação de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (n-3 PUFA) parece melhorar a função endotelial em pacientes com diabetes tipo 2 (DM2), dislipidemia, e lúpus eritematoso sistêmico. Dessa forma, ela poderia ser de grande relevância clínica na SAF. **Objetivo:** Avaliar a eficácia da suplementação de PUFA n-3 na função endotelial (desfecho primário) de pacientes com SAF primária. Desfechos secundários incluíram inflamação sistêmica, perfil lipídico e segurança. **Métodos:** Foi realizado um estudo clínico randomizado de 16 semanas com 22 mulheres adultas com SAF primário. As pacientes foram alocadas aleatoriamente (1:1) para receber suplementação com placebo (PL) ou n-3 PUFA (ω -3). Antes (pré) e após (Pós) 16 semanas de intervenção, elas foram avaliadas quanto a função endotelial (usando tonometria da artéria periférica), marcadores de função endotelial (concentrações circulantes de adesão intercelular molécula-1 [ICAM-1], molécula de adesão vascular-1 [VCAM-1], e-selectina e fibrinogênio), marcadores inflamatórios (concentrações circulantes de proteína C reativa [PCR], IL-6, IL-10, TNF [fator de necrose tumoral], IL-1 α e IL-1 β), perfil lipídico, segurança (razão internacional normalizada [INR] e efeitos adversos auto-relatados. **Resultados:** Após a intervenção, o grupo ω -3 apresentou aumento significativos no RHI (Índice de Hiperemia reativa) e

LnRHI (transformação logarítmica do Índice de hiperemia reativa) quando comparados com PL (+13% versus -12%, $p = 0,06$, ES = 0,9 e +23% versus -22%, $p = 0,02$, ES = 1,0). Não foram observadas alterações nas concentrações de e-selectina, VCAM-1 e fibrinogênio ($p > 0,05$). Em contrapartida, grupo ω -3 apresentou diminuição nas concentrações circulantes de IL-10 (-4% vs. +45%, $p = 0,04$, ES = -0,9) e concentração reduzida não significativa de TNF (-11% vs. +0,3%, $p = 0,12$, ES = -0,7), IL-1 β (-22% vs. +12%, $p = 0,2$, ES = -0,7) e ICAM-1 (+3% vs. +48%, $p = 0,12$, ES = -0,7) quando comparado ao PL após a intervenção. Apesar das concentrações aumentadas de colesterol total e LDL-colesterol (+6% vs. -2%, $p = 0,07$, ES = 0,7; +11% vs. -0,3%, $p = 0,02$, ES = 0,8), não foram observadas diferenças entre ω -3 e PL na relação LDL-colesterol/HDL-colesterol (+7% vs. +1%, $p = 0,4$, ES = 0,3) e triglicerídeos (-20% vs. -18%, $p = 0,5$, ES = -0,06). Nenhuma alteração no INR foi observada e nenhum efeito adverso foi relatado. **Conclusão:** Suplementação de PUFA n-3 por 16 semanas levou a melhorias na função endotelial e à ligeira diminuição no *milieu* inflamatório de pacientes com SAF primária bem controlada. Esses resultados dão suporte à suplementação de PUFA n-3 como terapia adjuvante em SAF.

Descritores: síndrome antifosfolipídica; suplementação nutricional; ácidos graxos ômega-3; coagulação sanguínea; células endoteliais

Cerqueira SMF. Effect and safety of omega-3 supplementation in patients with primary antiphospholipid syndrome [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

ABSTRACT

Antiphospholipid Syndrome (APS) is a systemic autoimmune disease characterized by recurrent thrombotic episodes and/or complications during pregnancy, and persistent serum antiphospholipid antibodies (aPL). Patients with APS are at increased risk for atherosclerosis and cardiovascular diseases (CVDs). It has been suggested that endothelial cells play a central role in the pathogenesis of APS as patients with APS show impaired endothelial function when compared with their healthy peers. Omega-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) supplementation has been shown to improve endothelial function in type 2 diabetes (T2D), dyslipidemia, and systemic lupus erythematosus. Thus, it could be of high clinical relevance in APS.

Objective: To evaluate the effectiveness of n-3 PUFA supplementation on endothelial function (primary outcome) of patients with primary APS. Secondary outcomes were systemic inflammation, lipid profile, safety, and clinical parameters. **Methods:** A 16-week randomized clinical trial was conducted with 22 adult women with primary APS. Patients were randomly assigned (1:1) to receive either placebo (PL) or n-3 PUFA (ω -3) supplementation. Before (Pre) and after (Post) 16 weeks of the intervention patients were assessed for endothelial function (using peripheral artery tonometry), endothelial function markers (circulating levels of intercellular adhesion molecule-1 [ICAM-1], vascular adhesion molecule-1 [VCAM-1], e-selectin and fibrinogen), inflammatory markers (circulating levels of C-reactive protein [CRP], IL-6, IL-10, TNF, IL-1ra, and IL-1 β), lipid profile, safety (international normalized ratio [INR] and self-reported adverse effects). **Results:** Following the intervention, ω -3 presented significant increases in RHI and LnRHI when compared with PL (+13% vs. -12%, $p=0.06$, ES=0.9; and +23% vs. -22%, $p=0.02$, ES=1.0). No changes were observed for e-selectin, VCAM-1 and fibrinogen levels ($p>0.05$). In contrast, ω -3 showed decreased circulating levels of IL-10 (-4% vs. +45%, $p=0.04$, ES=-0.9) and nonsignificant decreased levels of TNF (-11% vs. +0.3%, $p=0.12$, ES=-0.7), IL-1 β (-22% vs. +12%, $p=0.2$, ES=-0.7), and ICAM-1 (+3% vs. +48%, $p=0.12$, ES=-0.7) when compared with PL after the intervention.

Despite increased levels of total cholesterol and LDL-cholesterol (+6% *vs.* -2%, $p=0.07$, $ES=0.7$; +11% *vs.* -0.3%, $p=0.02$, $ES=0.8$), no differences between ω -3 and PL were observed in LDL-cholesterol/HDL-cholesterol ratio (+7% *vs.* +1%, $p=0.4$, $ES=0.3$) and triglycerides (-20% *vs.* -18%, $p=0.5$, $ES=-0.06$). No changes in INR were observed and no adverse effects were reported. **Conclusion:** Sixteen weeks of n-3 PUFA supplementation led to improvements in endothelial function and a slight decrease in the inflammatory milieu of patients with well-controlled primary APS. These results support a role of n-3 PUFA supplementation as an adjuvant therapy in APS.

Descriptors: antiphospholipid syndrome; supplementary feeding; fatty acids, omega-3; blood coagulation; endothelial cells

1. INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide (SAF)

1.1.1 Conceito

A Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide (SAF) é uma desordem sistêmica, autoimune, caracterizada por episódios recorrentes de trombose arterial e/ou venosa e/ou complicações obstétricas (morte fetal inexplicada, aborto espontâneo, parto prematuro ou secundária a eclampsia, pré-eclampsia grave ou insuficiência placentária) (Hughes, 1989). Além das manifestações clínicas típicas, a SAF é diagnosticada pela presença, em concentrações altas a moderadas (confirmada por duas vezes no intervalo de doze semanas), de anticorpos antifosfolípidos, a saber, anticoagulante lúpico, anticardiolipina e anti beta 2 glicoproteína (Griksa et al, 2012). Os critérios de diagnóstico utilizados são os critérios revisados de classificação e diagnóstico de Sapporo (Miyakis et. al, 2006).

Outras manifestações clínicas ou laboratoriais como embolia pulmonar, infarto do miocárdio, lesões de válvulas cardíacas, anemia hemolítica e trombocitopenia são também encontradas na SAF (Celli & Gharavi, 1998).

A SAF pode ser classificada em primária (ou idiopática) ou secundária. A SAF primária não está associada a evidências clínicas de outras doenças autoimunes. Em contrapartida, a SAF secundária é aquela associada à outras patologias auto-imunes, principalmente, ao lúpus eritematoso sistêmico (LES) (Harris & Khamashta, 1998).

A prevalência de anticorpos antifosfolípidos em populações saudáveis é menor do que 1%, podendo acometer até 5% de populações idosas saudáveis. Anticorpos antifosfolípidos podem ser induzidos por infecções, vírus, vacinas e drogas. Nesses casos, os indivíduos são assintomáticos, e os anticorpos são encontrados em concentrações baixas e com baixa associação com as manifestações clínicas de SAF (Mchrani et. al, 2009). Nas doenças autoimunes, especialmente no LES a prevalência é muito maior, sendo de 12% a 44% para anticardiolipina, de 15% a 34% para anticoagulante lúpico e de 10% a 19% de anti-B2GP1. (Cervera et. al, 1993; Cervera et al. 2002; Perez-Vasquez 1993). Estima-se que 50 - 70% dos pacientes com LES e

presença de anticorpos antifosfolípidos venham a desenvolver a SAF em 20 anos de acompanhamento (Biggioggero & Meroni, 2010)

1.1.2 Fisiopatogênese

A patogênese da trombose em pacientes com SAF primária permanece desconhecida (Yang et al. 2012). Sabe-se que, em altas concentrações, os anticorpos antifosfolípidos são capazes de se ligar a fosfolipídios aniônicos, levando a um estado de hipercoagulabilidade e, subsequentemente, à trombose (Levine, 2000). Contudo, os mecanismos pelos quais os anticorpos antifosfolípidos promoveriam este estado de hipercoagulabilidade ainda precisam ser melhores esclarecidos.

Alguns estudos sugerem que os anticorpos antifosfolípidos induzem a ativação de células endoteliais (i.e.: disfunção endotelial), devido ao aumento da expressão de moléculas de adesão e da secreção de citocinas inflamatórias, em especial, o fator tecidual induzido pela interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (Swadzba et al, 2011), e pelo metabolismo das prostaciclina (Meroni et. al., 2000). Outra hipótese supõe que o estresse oxidativo provoca lesão no endotélio do vaso, pela ação da oxLDL (lipoproteína de baixa densidade oxidada), que seria digerida pelo macrófago provocando ativação e consequente dano celular (Ames, 1994; Rand, 2003). Também há a sugestão de que os anticorpos antifosfolípidos interfiram na função de proteínas ligadoras de fosfolipídios envolvidas no processo da coagulação, como a β 2 glicoproteína I (Levine et al., 2002). A β 2 glicoproteína I, que tem sua função desconhecida (Yang et. al., 2012), possui propriedade de anticoagulante natural (Bodnar et al., 2012).

Outro conceito popular que tem sido utilizado para explicar a fisiopatogênese do SAF consiste na teoria dos dois gatilhos. Esse modelo, descrito por Meroni e colaboradores (2011), afirma que dois gatilhos são necessários para produzir a doença trombótica. O primeiro gatilho seria a presença dos anticorpos antifosfolípidos que, como citado anteriormente, são pró-inflamatórios e pró-trombóticos nas células endoteliais e em outros tipos de células. O segundo engatilha a coagulação e pode ser causado por infecção, cirurgia, imobilização, gravidez ou uso de pílulas contraceptivas.

1.1.3 SAF: inflamação, ativação endotelial e riscos cardiovasculares

A síndrome do Anticorpo antifosfolípide é uma doença autoimune que difere das outras por sua propensão a desenvolver trombozes (Hoffman et al, 2001). O estado trombofílico em SAF tem sido associado à uma doença vascular e não a um verdadeiro processo inflamatório (Cavazzana et al. 2007). Por isso, é considerada uma doença autoimune não inflamatória (Cuadrado & Hughes, 2001). Na verdade, até mesmo os critérios de classificação recentes afirmam que os sinais de inflamação podem estar ausentes nas manifestações trombóticas da SAF (Miyakis et al, 2006).

Tal afirmação é contrária a evidências de que os anticorpos antifosfolípidos, particularmente anticorpos anti $\beta 2$ glicoproteína I, são capazes de induzir um fenótipo inflamatório em ambos os monócitos e células endoteliais in vitro em modelos experimentais (Cavazzana et al, 2007). Tanto os monócitos quanto as células endoteliais apresentam regular síntese e secreção de citocinas pró inflamatórias (interleucina – 1 beta [IL-1 β], interleucina-6 [IL-6] e TNF- α) e moléculas de adesão (selectina-E, molécula de adesão intracelular-1 [ICAM-1], molécula de adesão vascular-1 [VCAM-1]) quando incubados na presença de anticorpos dependentes de $\beta 2$ glicoproteína I (B2GP1) (Bogaki et al, 2004; Cho et al, 2002; Cavazzana et al, 2007). Além disso, estudos recentes demonstraram aumento nas concentrações séricas dos fatores pró-inflamatórios IL-6, TNF- α , IL-4, IL-17, IL-23 em pacientes com SAF primário (Forasteiro e tal., 2005; Soltesz et al., 2008; Sciascia et al., 2011; Swazba et al., 2011).

Considerando esses achados, pode-se sugerir que as citocinas inflamatórias atuem como mediadores importantes da ativação de células endoteliais no desenvolvimento de SAF (Cockwell et al., 1997; Khamashta, 2006). Tanto o TNF- α quanto a IL-1 parecem estimular as células endoteliais, induzindo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (Swadzba, 2011). O endotélio ativado expressa concentrações aumentadas de fator tecidual, levando a ativação local da cascata de coagulação (Rauch et al. 2010). Embora as células endoteliais possam ter ação sobre citocinas produzidas por outras células inflamatórias, podem também ser estimuladas a produzir citocinas tais como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , que podem aumentar a expressão das moléculas de adesão (Khamashta, 2006).

Vários estudos mostram que os anticorpos antifosfolípides ativam as células endoteliais *in vitro*, demonstrado por aumento da expressão ICAM-1 e VCAM-1 (Simantov et al., 1995; Del Papa et al., 1995). Em 3 estudos, concentrações solúveis de ICAM, VCAM e selectina-E estavam significativamente aumentadas no plasma de pacientes com SAF e trombose recorrente (Wang et al., 2003; Kaplanski et al., 2000; Pierangeli et al., 2001). Por estarem envolvidas na atividade plaquetária, na ativação endotelial e no desenvolvimento plaquetário, as moléculas de adesão também podem ser uma de processo inflamatório subjacente na aterosclerose (Robinson et al., 2006).

A aterosclerose é uma doença imune/inflamatória caracterizada por alterações no metabolismo de lipoproteínas que leva a ativação do sistema inflamatório e imune, consequentemente levando a proliferação de células do músculo liso, estreitamento das artérias e formação de ateromas (Jara et al., 2003). Em SAF, vários estudos encontram aumento da prevalência de aterosclerose e outros riscos cardiovasculares (Roman & Simon, 2001; Ames et al., 2004; Ames et al., 2005). Anticorpos antifosfolípides, anti-B2GP1 e outros anticorpos como anti-oxLDL têm sido associados como fator de risco ao desenvolvimento precoce da aterosclerose observada em pacientes com SAF (Abou-Raya et al., 2006; Matsuura 2009; Silva et al., 2014, Andrade et al., 2016).

A disfunção endotelial é o primeiro estágio da aterosclerose e é um importante sinal do seu desenvolvimento (Andrade et al., 2016). Métodos não-invasivos que verificam as propriedades funcionais dos vasos são capazes de mensurar a disfunção endotelial de forma indireta, mediada por fluxo (Zanetti, 2014). Em pacientes com Síndrome do anticorpo Antifosfolípide e Lúpus Eritematoso Sistêmico, vários estudos relatam função endotelial comprometida, quando comparados aos controles saudáveis (Kaplanski et al. 2000; Bilora et al., 2004; Stalc et al., 2005; Der et al., 2007; Wright et al., 2008; Cugno et al., 2010). Gresele e colaboradores (2008), em contrapartida, relataram função endotelial normal em pacientes com SAF primária sem a presença de fatores de risco cardiovasculares.

Stalc e colaboradores (2005) verificaram que além da disfunção endotelial, foram observados concentrações elevadas de fibrinogênio e moléculas de adesão (ICAM e VCAM) em pacientes com SAF.

Quanto aos outros fatores riscos cardiovasculares, um estudo transversal realizado por Espínola-Zavaleta e colaboradores (2006) com 39 pacientes com SAF primário encontrou maior prevalência de fatores de risco tradicionais como hipertensão

(46,2%) diabetes mellitus (12,8%), hipercolesterolemia, LDL (lipoproteína de baixa densidade) elevado (28,2%), hipertrigliceridemia (15,4%) e HDL (lipoproteína de alta densidade) baixo (84,6%). Um estudo mais recente realizado por Shevchuk et al., (2013) verificou o perfil lipídico de pacientes com SAF e mostrou que nos pacientes com SAF secundário havia maior incidência de hipertrigliceridemia e aumento nas concentrações de LDL enquanto nos pacientes com SAF primário haviam baixas concentrações de HDL.

1.2 Ômega 3

Os principais representantes da família Ômega 3 (ω -3) são o ácido α -linolênico ou ALA (18:3n-3), o ácido eicosapentaenóico ou EPA (20:5n-3) e o ácido docosahexaenóico ou DHA (22:6n-3) ao ponto que os principais representantes da família Ômega 6 (ω -6) são o ácido linoléico ou LA (18:2n-6) e o ácido araquidônico ou AA (20:4n-6) (Andrade & Carmo, 2006; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013). Estes são conhecidos como essenciais, pois os seres humanos não podem sintetizá-los e, portanto, precisam obtê-los a partir da ingestão dietética (JUMP, 2002).

Apesar de não os sintetizar, nosso corpo possui a capacidade para metabolizar estes ácidos graxos através de estágios de alongação e desaturação (Jeromson et al., 2015). O ALA pode ser convertido em EPA e DHA. O LA por sua vez, converte-se em AA. Os ácidos graxos poliinsaturados AA, EPA e DHA, produtos da conversão dos essenciais ALA e LA, por sua vez, convertem-se em metabólitos com efeitos biológicos distintos (Barbosa et al., 2007).

Os ácidos graxos EPA e DHA, da família de Ômega 3 são precursores dos mediadores químicos denominados prostaglandinas da série 3 e leucotrienos da série 5 (Calder, 2006a). Também dão origem a mediadores anti-inflamatórios denominados resolvinas (Calder, 2006b). Esses mediadores mostram possuir efeitos antitrombóticos (pela inibição de agregação plaquetária), anti-ateroscleróticos, anti-inflamatórios e agem na melhora da função endotelial e diminuição da concentração de triglicerídeos (Conner et al., 2000; Din et. al, 2004; Harris et al, 2004; Calder, 2006, Barbosa et al. 2007).

De forma contrastante, o ácido linoléico, ácido graxo da família ômega 6 é convertido em ácido araquidônico, que por sua vez, é precursor da síntese dos eicosanóides da série par, ou seja, das prostaglandinas 2 (PGE2) e leucotrienos 4

(LTB4) (Calder, 2006a). Estes são mediadores químicos que desempenham efeitos biológicos envolvidos nos processos de infecção, inflamação, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária (Lee et al., 2003; Din et. al, 2004; Barbosa et al., 2007).

A proporção de ingestão de LA (Ômega 6) e ALA (Ômega 3), de forma mais importante que a quantidade total de ômega 3 na dieta, pode ser crítico para a prevenção de doenças, devido a competição entre os dois ácidos graxos essenciais pelas mesmas enzimas de desaturação ($\Delta 6$ desaturase) (Lee et. al, 2003; Barbosa et al, 2007). As enzimas envolvidas na desaturação preferem o ALA em detrimento do LA. Assim, os ácidos graxos EPA e DHA (ômega 3), bloqueiam a ação da $\Delta 6$ desaturase, inibindo a conversão do ácido linoléico (ômega 6) a ácido araquidônico e, conseqüentemente, a produção de eicosanóides PGE2 e LTB4 (Lee et. al, 2003; Calder, 2006b). As vias enzimáticas envolvidas são a ciclooxigenase (que oxida o AA para prostaglandinas) e a lipooxigenase (oxida o AA para leucotrienos) (Borges et al. 2014). Dessa forma, o consumo de ômega 3 pode resultar na diminuição da quantidade de ácido araquidônico nas membranas das células inflamatórias e imunes, por haver menos substrato disponível para a síntese de eicosanóides do ácido araquidônico (Calder 2002).

A dieta consumida atualmente pela população do ocidente, conhecida como dieta ocidental, é rica em ácido linoléico (ômega 6), presente, entre outros, nos óleos de milho, girassol e soja. O alto consumo implica no aumento da relação ômega 6: ômega 3, principalmente quando a ingestão de alimentos fontes de Ômega 3 é baixa (Garofolo & Petrilli, 2006). Alimentos como peixes ou o óleo de peixe são as principais fontes do ácido graxo Ômega 3 (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013).

1.2.2 Ômega 3 e Inflamação

Os ácidos graxos são componentes dos fosfolípidos das membranas celulares, inclusive das células do sistema imune, como neutrófilos, monócitos e linfócitos (Miles & Calder, 2012). Os ácidos graxos poliinsaturados Ômega 3, em quantidades elevadas, aumentam a quantidade de ácidos graxos na camada da célula e com isso diminuem a produção de eicosanóides, envolvidos na modulação da intensidade e duração da resposta inflamatória e imune (Calder & Grimble, 2002), citocinas e espécies reativas à oxigênio e a expressão de moléculas de adesão (CALDER 2006a).

Como citado anteriormente, os produtos sintetizados pelo ácido araquidônico, denominados eicosanóides de família par, PGE2 e os LTB4 são mediadores que possuem maior potencial pró-inflamatório (Garofolo et al. 2006). A PGE2 promove vasodilatação, induz febre local, aumenta a permeabilidade vascular e potencializa a dor e o edema causados por outros agentes, como bradicinina e histamina. Por outro lado, a PGE2 também possui característica anti-inflamatória, inibindo a produção do TNF- α e IL-1. Dessa forma, possui potencial imunossupressor, pois inibe a proliferação de linfócitos, a atividade das células natural killer e a produção de IL-2 e Interferon (IFN)- γ (Calder & Grimble, 2002; Garofolo et al., 2006; Calder, 2008). LTB4 aumenta a permeabilidade vascular, o fluxo sanguíneo e a quimiotaxia dos leucócitos, induz à liberação de enzimas lisossomais e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e de TNF- α , IL-1 e IL-6. Em todos esses aspectos, o LTB4 é pró-inflamatório (Borges et al. 2014). Os tromboxanos (TX) também provêm do metabolismo dos eicosanóides. Dentre eles, o TXA2 (tromboxanos da série 2) é o principal subproduto do AA, promovendo agregação plaquetária, adesão leucocitária e contração da musculatura lisa (Braga et al, 2007; Jiang et. al, 2016).

Como apontado anteriormente, o aumento da oferta de ácidos graxos da família ômega 3, como EPA e DHA, favorece a síntese de eicosanóides da série ímpar, como a prostaglandina da série 3 (PGE3), tromboxano da série 3 (TXA3), leucotrienos da série 5 (LTB5), resolvinas e protectinas (Miles et al, 2012; Calder 2012), que possuem características anti-inflamatórias (Garofolo et al, 2006). Esse equilíbrio proporciona menor formação de mediadores pró-inflamatórios, reduzindo alguns dos efeitos imunossupressores (Calder 2002; Ferucci et. al, 2006).

Ensaio in vitro (De Catarina et al., 1994; Khalfoun et al., 1997; Simopoulos, 2002; Zao et al., 2004; Ferucci et al., 2006) e in vivo utilizando a suplementação ou exposição a EPA e DHA têm comprovado os efeitos desse equilíbrio. Em indivíduos saudáveis, a suplementação de EPA e DHA resultou em diminuição das concentrações de Proteína C reativa (PCR), TNF- α e das interleucinas IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL-8 (Meydani et al., 1994; Trebble et al. 2003; Wallace et. al., 2003; Sjiben & Calder, 2007; Li et al., 2014). As doses avaliadas nesses estudos tiveram uma variação entre 0,49 e 7,0g de EPA + DHA e o tempo de suplementação entre 4 e 16 semanas. Uma meta análise realizada por Sjiben e Calder (2007) concluiu que as mudanças significantes na produção de citocinas por linfócitos com suplementação de EPA e DHA são

inconsistentes e encontradas apenas em doses maiores e/ou iguais a 2,0g EPA+DHA/dia.

No que tange às doenças reumatológicas autoimunes, uma meta-análise e três artigos de revisão sistemática (Calder, 2006; Sijben & Calder, 2007; Goldberg & Katz, 2007; Miles & Calder, 2012) ressaltaram os potenciais efeitos da suplementação de EPA e DHA (> 3g por dia) em pacientes com artrite reumatóide na redução na dor das articulações, número de articulações acometidas, rigidez matinal e uso de antiinflamatórios não esteroidais. Quanto à inflamação, foi visto uma diminuição nas concentrações de IL-6 e IL-1 β e também diminuição nas concentrações plasmáticas de ácido araquidônico.

Borges e colaboradores (2014) mostraram os efeitos da suplementação de EPA e DHA em diversos estudos em pacientes com LES. Foi mostrado que após a suplementação houve aumento de EPA e DHA e diminuição de ácido araquidônico nos fosfolípidios de membrana de células do sistema imune. Também houve uma redução de agregação plaquetária e na produção de LTB₄ por neutrófilos.

Bello e colaboradores (2015) avaliaram o efeito da suplementação de 3g/dia de ômega-3 nos marcadores de sICAM, VCAM, IL-6 e na função endotelial de pacientes com LES. Não foi visto diferença nas concentrações de marcadores inflamatórios após 3 meses de suplementação, mas houve uma melhora na função endotelial, a qual será discutida no próximo tópico.

1.2.3 Ômega 3, Função endotelial e Riscos Cardiovasculares

Estudos epidemiológicos têm mostrado baixa incidência de riscos cardiovasculares em populações que consomem grandes quantidades de ácidos graxos da série Ômega 3 (Caterina et al, 1994; Miles et. al, 2001; Psota et al., 2006), provavelmente devido à redução de aterosclerose (Newman et al, 1993). De fato, estudos mais recentes têm mostrado que as propriedades anti-inflamatórias provenientes do consumo de ômega 3 podem reduzir a inflamação aterogênica vascular (Mozaffarian & Wu, 2011).

O equilíbrio dietético de ácidos graxos de cadeia longa influenciam nos processos que envolvem interações entre leucócitos e o endotélio, tais como a aterosclerose e a inflamação, que possuem mecanismos similares em suas fases iniciais,

envolvendo a expressão endotelial aumentada de moléculas de adesão ou ativação endotelial (Catarina et al., 2000). O estudo realizado por Caterina e colaboradores (2004), verificou o efeito da indução de EPA e DHA nas células endoteliais. Foi visto neste estudo que o DHA teve efeito não apenas sobre as moléculas de adesão VCAM e ICAM, mas também levou à diminuição das concentrações de selectina-E.

Em indivíduos saudáveis, Miles e colaboradores (2001) observaram que a suplementação de ômega 3 em homens jovens e idosos teve uma diminuição nas concentrações de VCAM e selectina-e apenas no grupo idoso. Não houve mudança nas concentrações de ICAM em nenhum grupo. Essas observações sugerem que o ômega 3 diminui a atividade endotelial em indivíduos idosos.

Quanto à função endotelial, vários ensaios clínicos têm observado melhora na dilatação arterial mediada por fluxo após a suplementação de Ômega- 3 em populações diabéticas, obesas e com histórico de infarto do miocárdio (Zanetti et al., 2014; Haberk et al., 2011; Stirban et al., 2010; Dangardt et al., 2010; Rizza et al., 2009). A dose utilizada nesses estudos foi entre 540mg e 3000mg de EPA e entre 360mg e 3000mg de DHA. A duração dos estudos foi entre 4 e 156 semanas (aproximadamente 3 anos). Em estudo com pacientes com LES, Wright e colaboradores (2008) observaram melhora na dilatação arterial destes pacientes após 12 semanas de suplementação com 1800mg de EPA e 1200mg de DHA.

Outros fatores de riscos para doenças cardiovasculares, como hipertrigliceridemia e trombose também têm sido estudados em resposta à suplementação de ômega 3, com resultados benéficos (Mozaffarian et al., 2011; Connor, 2000; Lee & Lip, 2003; Connor et al., 1994).

Nos casos de hipertrigliceridemia, o efeito que o Ômega 3 possui em diminuir as concentrações de triglicérides são bem estabelecidos. Sabe-se que EPA e DHA inibem a secreção de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), assim diminuindo as concentrações plasmáticas de triglicérides (Robinson, 2006). Uma revisão com estudos com humanos concluiu que uma média de consumo de 3 a 4g/dia de ácidos graxos Ômega 3 diminui as concentrações plasmáticas de triglicérides em 25-30% de forma dose dependente. A mesma dose não altera o colesterol total, mas aumenta as concentrações de LDL em 5 a 10% e HDL em 1 a 3% (Harris, 1997). O aumento de LDL se dá principalmente através do aumento nas quantidades de partículas de LDL maiores, mais flutuantes e potencialmente menos aterogênicas, enquanto as partículas

de LDL menores, mais densas e potencialmente mais aterogênicas diminuem (Calabresi et al., 2000; Stalenhoef et al., 2000; Durrington et al., 2001). Já os efeitos da suplementação nas concentrações totais de colesterol não são consistentes em humanos (Balk et al., 2004; Lovegrove et al., 2004; Buckley et al., 2004; Dyerberg et al., 2004; Theobald et al., 2004; Roos et al., 2006).

Concentrações alteradas de fatores de coagulação como fibrinogênio e tempo de protombina têm sido associados com aumento do risco cardiovascular em estudos epidemiológicos (Holy e Tanner, 2010; Chambless et al. 2003; Chambless et al., 2004; Steffel et al., 2006). Grandes doses de ômega 3 tem efeitos antitrombóticos (15g/dia), baseados no aumento do tempo de coagulação (Mozzafarian et al., 2011). Estudos clínicos em humanos não têm encontrado efeitos consistentes na agregação plaquetária ou fatores de coagulação, parcialmente devido a diferenças no desenho do estudo, fonte e quantidade de ácidos graxos oferecidos e metodologia do estudo. (Hornstra, 2001; Roos et al., 2009)

1.2.4 Efeitos da suplementação de Ômega-3 na coagulação sanguínea

Existem poucos estudos que avaliam o efeito de Ômega 3 diretamente com o tempo de coagulação, avaliado pelo tempo de protrombina e INR (International Normalized Ratio). Smith e colaboradores (1989) avaliaram o efeito da suplementação de Ômega 3 em combinação com warfarina em 40 pacientes sobreviventes de infarto do miocárdio. A suplementação era composta de 3,4g de Ômega 3 por dia no período de 4 semanas. Foi observado uma diminuição no tempo de protombina, mas os autores notaram que não foi necessário ajustar a dose de warfarina nos pacientes. Nenhum excesso de sangramento foi observado em ensaios clínicos de consumo de peixe ou óleo de peixe, até mesmo entre pacientes submetidas a cirurgia ou intervenção percutânea e / ou realizando tratamento medicamentoso com anticoagulantes, como aspirina ou warfarina (Mazzafarian, 2009). Um estudo realizado por um grupo de pesquisa norueguês (Eristland et al., 1995) com 511 pacientes submetidos a cirurgia de revascularização do miocárdio com tratamento com aspirina ou warfarina. Dois dias após a cirurgia, foi adicionado ao tratamento medicamentoso 4g de ácidos graxos Ômega 3 por 3 meses. Foi constatado que a suplementação de Ômega 3 não mostrou aumento de tendência a sangramentos em adição a warfarina nem a aspirina.

Um estudo mais recente, realizado por Pryce e colaboradores (2016) mostrou uma análise retrospectiva de pacientes em uso de varfarina. 145 pacientes realizaram a suplementação com óleo de peixe ou óleo de krill (também rico em ácidos graxos Ômega 3) por 34 meses e 428 pacientes participaram como grupo controle. Não foi encontrado nenhuma diferença no INR ou eventos hemorrágicos entre os grupos de óleo de peixe, óleo de krill ou controle. Em todos os estudos citados, os autores sugerem que mesmo sem alterações no tempo de coagulação, deve haver acompanhamento para ajuste do medicamento anticoagulante com a suplementação de Ômega 3 caso necessário.

2. JUSTIFICATIVA

Contudo, nenhum estudo até o presente momento foi conduzido com pacientes com SAF e a suplementação de ω -3 PUFA. Nesse sentido, considerando que pacientes com SAF estão sob maior risco um quadro importante disfunção endotelial, possivelmente acompanhada pelo aumento de citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF- α , e risco aumentado para desenvolver eventos trombóticos e maiores riscos cardiovasculares, acreditamos que a suplementação de EPA e DHA exercerá efeitos benéficos quanto a função endotelial, perfil de citocinas inflamatórias e desfechos clínicos da doença de pacientes com SAF.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a segurança e a eficácia da suplementação de EPA e DHA sobre a função endotelial, perfil lipídico e inflamatório de pacientes com SAF primária.

3.2 Objetivos específicos

1. Verificar o efeito da suplementação de EPA e DHA na função endotelial de pacientes com SAF;

2. Verificar o efeito da suplementação de EPA e DHA no perfil inflamatório (e.g.: TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, IIL-1ra, sICAM-1, sVCAM-1) e marcadores endoteliais (fibrinogênio, selectina-e) dos pacientes com SAF;
3. Verificar o efeito da suplementação de EPA e DHA no perfil lipídico (HDL, LDL e triglicérides) dos pacientes com SAF;
4. Verificar a relação entre as possíveis alterações da função endotelial e concentrações das citocinas inflamatórias com os indicadores de avaliação clínica (e.g.: atividade da doença, qualidade de vida, dosagem e tipo de medicamentos);
5. Verificar a possível ocorrência de efeitos adversos em resposta à suplementação de EPA e DHA.

4. METODOLOGIA

4.1 Protocolo Experimental

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia (LACRE) da Disciplina de Reumatologia no departamento de Clínica Médica em parceria com o Laboratório de Hipertensão Experimental do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). O estudo obedeceu as normas éticas, e todas as voluntárias assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pela CAPPESQ (HC-FMUSP).

Esta pesquisa tratou-se de um estudo clínico, duplo-cego, randomizado e controlado por placebo, de acordo com os critérios adotados pelo CONSORT (2010). O projeto está inscrito no banco de ensaios aleatorizados norte-americano ClinicalTrial (www.clinicaltrial.gov), conforme solicitado pelos jornais científicos de grande impacto na área de saúde.

Pacientes com SAF primário foram divididos aleatoriamente em dois grupos: i) Placebo (PL) e ii) Ômega 3 (w-3). Ao longo de 16 semanas, um grupo de pacientes com SAF primário foi submetido à suplementação de w-3, enquanto o outro foi submetido à administração de PL. Todos os pacientes elegíveis ao estudo foram avaliados no período basal (PRÉ) e após 16 semanas (PÓS) quanto à função endotelial, perfil inflamatório e lipídico, composição corporal, nível de atividade física, parâmetros

clínicos (atividade da doença, qualidade de vida, dosagem e tipo de medicamentos) e possíveis efeitos adversos. Todos os voluntários foram orientados a manterem seus hábitos de atividade física e de consumo alimentar durante todo o período de estudo (Figura 1).

Figura 1. Desenho Experimental

4.2. Recrutamento e seleção de voluntários

Todas as pacientes com SAF foram recrutadas do Ambulatório de Síndrome Antifosfolípide da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram consideradas elegíveis pacientes do gênero feminino, com idade entre 18 e 45 anos, com diagnóstico de SAF primária segundo os critérios de Sapporo et al. (2006). Foram considerados critérios de exclusão: 1) pacientes com SAF secundária a outra conectivopatia e com manifestações arteriais, 2) uso de antiinflamatório de forma crônica, 3) evento hemorrágico ou trombótico ou tromboembolismo pulmonar nos últimos 3 meses, 4) pacientes menopausadas ou que não estavam em uso de progesterona, 5) amenorréia (ausência de ciclos menstruais consecutivamente por um período superior a 4 meses) por causa hormonal, 6) gravidez, 7) alterações da tireoide não controladas, 8) Diabetes Mellitus, 9) Índice de massa corporal (IMC) > 35 Kg/m², 10) doenças cardiovasculares (como por exemplo: arritmias não controladas) 11) tabagismo, 12) uso de drogas hipolipemiantes. As pacientes que se adequaram ao perfil supracitado foram informadas sobre todos os detalhes do projeto e assinam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.3 Suplementação e “vendamento”

Os suplementos foram providenciados conforme o modelo duplo-cego. A aleatorização foi gerada através de sorteio em blocos de 6 pacientes e com estratificação por índice de massa corporal e idade.

Apenas um pesquisador do estudo, sem contato com qualquer tipo de avaliação e análise dos dados, foi responsabilizado pelo ingresso e alocação dos pacientes no estudo. O grupo W-3 recebeu 1800mg de EPA e 1200mg de DHA por dia (5 cápsulas por dia da marca Naturalis®) durante todo período experimental. O grupo PL recebeu a mesma dose de óleo de soja. As cápsulas de ambos os grupos eram similares em tamanho e coloração. Todos os voluntários foram orientados a ingerir o suplemento pela manhã ou à noite. Para confirmar a aderência à suplementação, os pacientes foram inquiridos acerca do suplemento ingerido após o estudo. A porcentagem de acerto foi comparada entre os grupos como forma de assegurar a eficiência do “vendamento”.

4.4. Avaliação Clínica

A avaliação clínica avaliou a presença ou não de outras patologias e foi utilizada para o diagnóstico da SAF primária, os critérios de Sapporo et al (2006). Além disso, os dados clínicos específicos da doença, assim como idade de início e tempo de duração, foram obtidos através de revisão de prontuários e exame clínico. A avaliação da terapêutica medicamentosa incluiu a dose atual em miligramas de cada um dos medicamentos empregados para controle da doença.

4.5. Composição corporal

Os sujeitos foram pesados em balança digital. A altura foi determinada na posição anatômica, de frente para o pesquisador, com auxílio de estadiômetro. Essas medidas foram utilizadas na realização do índice de massa corporal (IMC), o qual foi calculado pela fórmula:

$$\text{IMC} = \text{Peso (Kg)} / \text{altura}^2(\text{m})$$

4.6. Análises plasmáticas

Os pacientes comparecem à enfermaria da Reumatologia em jejum noturno de 12 horas. São coletados 15 ml de sangue da veia antecubital para as posteriores análises plasmáticas. As amostras são imediatamente centrifugadas a 4°C, 3000 rotações por minuto, durante 15 minutos, e então o plasma é pipetado e dispensado em eppendorfs, que são congelados e armazenados em freezer -70 graus.

Concentrações de colesterol total, HDL-colesterol e LDL-colesterol foram determinadas por um método colorimétrico enzimático (CELM, São Paulo, Brasil). Já os marcadores de coagulação e segurança (Fibrinogênio, INR) foram determinados por um método Coagulométrico (CELM, São Paulo, Brasil).

As citocinas inflamatórias (IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-1ra e TNF), e moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, seletina-E) foram analisados através de imunoenaios utilizando kits comercialmente disponíveis em um analisador multiplex de acordo com os procedimentos do fabricante (Milliplex®, EUA).

4.7 Função Endotelial - Hiperemia reativa (tonometria arterial periférica)

A avaliação da função endotelial foi realizada usando o equipamento ENDOPAT 2000 (Itamar Medical. Israel). Trata-se de uma técnica não invasiva, observador-independente, que captura batimento a batimento por pletismografia a amplitude da onda de pulso digital (AOP), que corresponde às medidas da variação de volume digital. A técnica fornece dados para o cálculo do índice de hiperemia reativa (RHI), que é uma indicação de função endotelial e também índice de aumento (AI) que é uma medida de rigidez arterial.

O equipamento consiste em dois probes com sistema inflável colocados nos dedos indicadores do paciente. O desenho do probe permite a aplicação de uma contrapressão diastólica constante e uniformemente distribuída dentro de todo o probe, o que aumenta a sensibilidade de descarga de tensão da parede arterial. As mudanças de volume pulsátil da ponta do dedo são detectados por um transdutor de pressão e transferidos para um computador pessoal, onde o sinal de banda de passagem é filtrada (0,3 a 30 Hz), amplificado, visualizado, e armazenado.

Os estudos com RH- PAT (hiperemia reativa verificada por tonometria arterial periférica) foram realizados com o paciente em decúbito dorsal e as duas mãos no

mesmo nível em um ambiente confortável, termoneutro. O manguito de pressão arterial foi colocado em um braço superior (braço do estudo) enquanto o braço contralateral serve como controle (braço controle). Os probes do RH-PAT foram colocados em um dedo de cada mão (mesmo dedo em ambas as mãos) . Os dedos de ambos os lados do probe foram separados usando anéis de esponja, e então a gravação das respostas do volume sanguíneo pulsátil das duas mãos foi iniciada. Após um período de equilíbrio de 5 minutos, a braçadeira de pressão arterial no braço estudado foi inflada até 60 mm Hg acima da pressão sistólica durante 5 min. O manguito foi então esvaziado para induzir RH, enquanto a gravação PAT continua. Após mais 5 min o teste é finalizado. O RHI é o resultado da razão entre as médias da AOP entre os valores pós e pré oclusão. Para o cálculo do índice utiliza-se a média da AOP durante 1 minuto após 60 segundos da liberação do cuff pressórico dividido pela média da AOP durante 210 segundos pré-occlusão. O índice de aumento (AI), uma estimativa da rigidez vascular, também é calculado automaticamente, bem como a transformação logarítmica de RHI (LnRHI).. (Matsuzawa et al, 2013; Bonetti et al. 2015).

4.8 Ingesta dietética

A ingestão dietética foi avaliada usando três recordatórios dietéticos de 24 horas realizados em dias separados (2 dias da semana e 1 dia de fim de semana) utilizando um álbum de fotos de alimentos reais. O consumo de energia e macronutrientes foi analisado pelo software Avanutri (Rio de Janeiro, Brasil). A ingestão de PUFA n-3 foi estimada com base no conteúdo de DHA, EPA e ácido α -linoléico (ALA) de alimentos de acordo com o Banco de Dados Nacional de Nutrientes do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) para Referência Padrão disponível em <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>.

4.9. Análise Estatística

Para aliviar o impacto da variabilidade interindividual, todos os valores foram convertidos em pontuações delta (i.e, valores pós-pré) e depois testados por um modelo misto assumindo valores em PRE como covariável. Utilizamos a inferência aproximada sobre efeitos mistos em modelos lineares mistos (i.e, correção de Kenward-Roger) para lidar com o design. O post-hoc de Tukey foi usado para comparações múltiplas. Os

dados basais foram comparados usando os testes exatos de Fisher e os testes t de Student não pareados. Os testes exatos de Fisher também foram usados para comparar a aderência à suplementação. Finalmente, o d de Cohen foi usado para determinar o tamanho do efeito para as variáveis dependentes. Os dados são apresentados como média (desvio padrão), diferença entre mudanças de delta e intervalo de confiança de 95% (IC de 95%), salvo quando indicado o contrário. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$, com uma tendência para que a significância seja aceita em $p < 0,1$.

As análises de poder pós-hoc foram realizadas com a ajuda do software G-Power® (versão 3.1.2), que demonstrou uma potência de 65% e 73% em um nível alfa de 5% para detectar diferenças significativas no RHI e LnRHI entre grupo PL e grupo ω -3 com tamanhos de efeito de 0,9 e 1,0.

5. RESULTADOS

5.1 Características dos grupos

Setenta e um pacientes foram selecionados para participação e 35 preencheram os critérios de inclusão. Elas foram alocadas aleatoriamente ao grupo ω -3 ($n = 18$) ou PL ($n = 17$). Cinco pacientes se retiraram do estudo por razões pessoais, três pacientes ficaram grávidas, uma paciente entrou na menopausa, uma paciente foi diagnosticada com outra doença autoimune e três pacientes apresentaram complicações de saúde não relacionadas à SAF. Assim, as 22 pacientes que completaram o estudo foram analisados (ω -3 = 11, PL = 11) (Figura 2).

Figura 2. Fluxograma do estudo.

A Tabela 1 mostra as características demográficas na linha de base. Nenhuma diferença entre os grupos foi observada no basal para qualquer um dos parâmetros. O protocolo de aderência à suplementação foi de 83% no grupo ω -3 e 88% no grupo PL (comparação entre grupos, $p = 0,24$).

Também não houve diferença entre os grupos PL e ω -3 quanto aos medicamentos usados, sendo eles contraceptivo oral, anticoagulantes e hidrocloroquina. Nenhuma paciente estava em uso de corticoide durante o protocolo.

Tabela 1 - Dados demográficos do grupo ω -3 e grupo PL antes da intervenção

	Grupo Placebo (n= 11)	Grupo ω-3 (n=11)	P
Idade (anos)	37,6 (6,52)	34,8 (4,47)	2,990
IMC (kg/m²)	28,8 (4,31)	29,85 (4,32)	0,559
Tempo doença (anos)	8,4 (5,8)	10,0 (5,06)	0,519
Uso de contraceptivo oral n° (%)	5 (45,4)	4 (36,4)	0,363
Uso de HCQ n° (%)	4 (36,4)	5 (54,5)	0,333
Uso de AAS n° (%)	2 (18,2)	2 (18,2)	0,424
Uso de Anticoagulante n° (%)	9 (81,8)	9 (81,8)	0,353
Uso de corticoide n° (%)	0 (0)	0 (0)	1,000
Hipotireoidismo n° (%)	0 (0)	1 (9,1)	0,500
HAS n° (%)	1 (9,1)	3 (27,3)	0,212
Depressão n° (%)	2 (18,2)	3 (27,3)	0,397
Fibromialgia n° (%)	0 (0)	1 (9,1)	0,500

Dados expressos como média (desvio padrão) ou número de participantes (% da amostra) e nível de significância (P) calculado usando t-test ou Fischer exact test. Abreviações: HCQ = Hidroxicloroquina; AAS = ácido acetilsalicílico; HAS = hipertensão arterial.

5.2 Efeito da suplementação no perfil lipídico

Após a intervenção, o grupo ω -3, quando comparado com grupo PL, apresentou aumentos no colesterol total (+ 6% vs. -2%, $p = 0,07$, ES = 0,7), LDL-colesterol (+ 11% vs. -0,3%, $p = 0,02$, ES = 0,8) e HDL-colesterol (+ 7% vs. -2%, $p = 0,3$, ES = 0,5), embora este não tenha atingido significância estatística. Em contrapartida, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo ω -3 e grupo PL na relação LDL-colesterol / HDL-colesterol (+ 7% vs. + 1%, $p = 0,4$, ES = 0,3) e triglicérides (-20% vs. -18%, $p = 0,5$, ES = -0,06) (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil lipídico antes e após intervenção no grupo ω -3 e grupo PL.

	PL (n=11)			ω -3 (n=11)			PL vs. ω -3		
	Pré	Pós	Δ	Pré	Pós	Δ	Diferença Δ (95% CI)	P	ES
Triglicérides (mg/dl)	99.8 $\pm$ 27.8	81.5 $\pm$ 25.3	-19.5 $\pm$ 27.0	113.3 $\pm$ 62.2	91.0 $\pm$ 19.1	-22.3 $\pm$ 64.0	-6.5 (-26.7 to 13.7)	0.5	-0.06
LDL-chol (mg/dl)	104.4 $\pm$ 23.2	104.1 $\pm$ 26.9	-0.3 $\pm$ 14.5	107.7 $\pm$ 29.8	119.6 $\pm$ 21.9	11.9 $\pm$ 11.8	-12.7 (-23.6 to -1.8)	0.02	0.85
HDL-chol (mg/dl)	45.9 $\pm$ 7.5	44.8 $\pm$ 7.9	-1.1 $\pm$ 9.9	46.0 $\pm$ 9.1	49.1 $\pm$ 13.2	3.1 $\pm$ 8.5	-4.2 (-11.9 to 3.5)	0.26	0.45
Razão LDL/HDL	2.35 $\pm$ 0.73	2.38 $\pm$ 0.71	0.03 $\pm$ 0.56	2.44 $\pm$ 0.83	2.62 $\pm$ 0.94	0.18 $\pm$ 0.43	-0.17 (-0.61 to 0.27)	0.43	0.32
Colesterol total (mg/dl)	169.7 $\pm$ 24.5	165.8 $\pm$ 31.5	-3.9 $\pm$ 22.8	176.5 $\pm$ 34.8	186.2 $\pm$ 27.0	10.4 $\pm$ 17.7	-15.7 (-33.5 to 2.1)	0.07	0.67

Dados expressados em media (SD); mudança delta absoluta calculada apenas para amostras pareadas (Δ); diferenças de delta estimadas (Δ diferença), 95% intervalo de confiança (95% CI) e nível de significância (P) calculada usando Anova; *effect size* (ES). Abreviações: LDL lipoproteína de baixa densidade; HDL = lipoproteína de alta densidade

5.3 Efeito da suplementação na Função Endotelial

Após a intervenção, ω -3 apresentou aumentos significativos no RHI e LnRHI quando comparados com PL (+13% vs. -12%, $p = 0,06$, ES = 0,9 e +23% vs. -22%, $p = 0,02$, ES = 1,0). Em contrapartida, não foram observadas diferenças significativas entre grupo ω -3 e grupo PL em AI (+ 27% vs. + 16%, $p = 0,5$, ES= 0,2) (Figura 3, Tabela 3) e concentrações circulantes de fibrinogênio (-23% vs -13%, $p = 0,68$, ES= -0,1), selectina-E (-6% vs. -5%, $p = 0,71$, ES= -0,03) e VCAM-1 (+ 8% vs. +20%, $p = 0,6$, ES= -0,2). O grupo ω -3 mostrou um aumento menor nas concentrações de ICAM-1 (+3%) quando comparado com o grupo PL (+48%) após a intervenção, embora essa diferença não tenha atingido significância estatística apesar do grande *effect size* ($p = 0,12$, ES= -0,7) (Tabela 3).

Figura 3. Estimativas de função endotelial antes e após intervenção em ω -3 e PL.

Dados individuais no Pré e Pós e mudança absoluta (dados expressos como média e desvio padrão) nas estimativas de função endotelial RHI, LnRHI e AI em ω -3 e PL. Diferenças entre mudanças de delta foram calculadas usando modelo misto ajustado pelos valores Pré, * significa $p < 0.05$, ω -3 vs. PL; # significa $p = 0.06$, ω -3 vs. PL. Abreviações: RHI = índice de hiperemia reativa; LnRHI = índice de hiperemia reativa após transformação logarítmica; AI = índice de aumento.

Tabela 3 – Marcadores e estimativas de função endotelial antes e depois da intervenção no grupo ω -3 e grupo PL.

	PL (n=11)			ω -3 (n=11)			PL vs. ω -3		
	Pré	Pós	Δ	Pré	Pós	Δ	Diferença Δ (95% CI)	P	ES
Marcadores de Função Endotelial									
Fibrinogênio (mg/dl)	357 $\pm$ 71	310 $\pm$ 60	-91 $\pm$ 46	396 $\pm$ 134	307 $\pm$ 65	-98 $\pm$ 103	-14 (-96 to 69)	0.68	-0.11
Selectina-E (ng/ml)	108 $\pm$ 46	103 $\pm$ 45	-4.5 $\pm$ 43.3	93 $\pm$ 39	88 $\pm$ 41	-5.4 $\pm$ 26.9	5.6 (-25.7 to 36.9)	0.71	-0.03
ICAM -1(ng/ml)	635 $\pm$ 488	940 $\pm$ 608	279 $\pm$ 464	712 $\pm$ 584	733 $\pm$ 452	22 $\pm$ 248	245 (-85 to 576)	0.13	-0.68
VCAM-1 (ng/ml)	657 $\pm$ 253	792 $\pm$ 339	103 $\pm$ 270	583 $\pm$ 276	627 $\pm$ 176	44 $\pm$ 222	99 (-111 to 309)	0.33	-0.25
Estimativas de função endotelial									
RHI	2.08 $\pm$ 0.34	1.83 $\pm$ 0.53	-0.27 $\pm$ 0.36	1.80 $\pm$ 0.42	2.03 $\pm$ 0.36	0.20 $\pm$ 0.52	-0.37 (-0.7 to 0.01)	0.06	0.9
LnRHI	0.72 $\pm$ 0.16	0.56 $\pm$ 0.31	-0.17 $\pm$ 0.21	0.56 $\pm$ 0.24	0.69 $\pm$ 0.17	0.12 $\pm$ 0.28	-0.24 (-0.44 to -0.04)	0.02	1.0
AI	-1.8 $\pm$ 14.1	-2.1 $\pm$ 13.7	-0.3 $\pm$ 9.1	7.7 $\pm$ 14.2	9.8 $\pm$ 20.0	2.1 $\pm$ 13.4	-4.2 (-15.9 to 7.5)	0.45	0.21

Dados expressados em media (SD); mudança delta absoluta calculada apenas para amostras pareadas (Δ); diferenças de delta estimadas (Δ diferença), 95% intervalo de confiança (95% CI) e nível de significância (P) calculada usando Anova; *effect size* (ES). Abreviações: INR = international normalized ratio; ICAM-1= molécula de adesão intracelular-1; VCAM-1 = molécula de adesão vascular-1; RHI = índice de hiperemia reativa; LnRHI = índice de hiperemia reativa após transformação natural log; AI= índice de aumento

Tabela 4 – Perfil Inflamatório antes e depois da intervenção no grupo ω -3 e grupo PL.

		PL (n=11)			ω-3 (n=11)			PL vs. ω-3		
		Pré	Pós	Δ	Pré	Pós	Δ	Diferença Δ (95% CI)	P	ES
	PCR (mg/l)	3.6 ± 3.7	2.0 ± 1.0	-1.2 ± 3.3	4.4 ± 3.5	2.2 ± 1.8	-2.0 ± 2.1	-0.06 (-1.02 to 0.91)	0.9	-0.3
	IL-6 (pg/ml)	0.84 ± 0.51	0.73 ± 0.46	-0.1 ± 0.2	1.32± 0.95	1.02 ± 0.61	-0.3 ± 0.7	0.02 (-0.32 to 0.36)	0.9	-0.4
	IL-10 (pg/ml)	1.70 ± 0.57	2.47 ± 1.51	0.5 ± 0.7	2.18 ± 1.74	2.10 ± 1.68	-0.1 ± 0.3	0.77 (0.37 to 1.17)	0.001	-0.9
	TNF (pg/ml)	2.15 ± 1.00	2.16 ± 0.90	-0.1 ± 0.2	2.30 ± 0.91	2.05 ± 0.72	-0.3 ± 0.7	0.21 (-0.06 to 0.49)	0.12	-0.7
	IL1-ra (pg/ml)	49.3 ± 64.3	20.6 ± 12.3	-17.9 ± 48.7	48.7 ± 55.9	32.8 ± 44.5	-15.9 ± 64.3	-10.7 (-42.5 to 21.1)	0.48	0.04
	IL-1β (pg/ml)	0.90 ± 0.49	1.01 ± 0.60	0.11 ± 0.44	1.19 ± 0.68	0.92 ± 0.54	-0.26 ± 0.58	0.27 (-0.15 to 0.69)	0.2	-0.7

Dados expressados em média (SD); mudança delta absoluta calculada apenas para amostras pareadas (Δ); diferenças de delta estimadas (Δ diferença), 95% intervalo de confiança (95% CI) e nível de significância (P) calculada usando Anova; *effect size* (ES). Abreviações: IL = interleucina; TNF = fator de necrose tumoral

Tabela 5.- Ingestão dietética antes e após intervenção com ω -3 e PL.

	PL (n=11)			ω -3 (n=11)			PL vs. ω -3		
	Pre	Pos	Δ	Pre	Pos	Δ	Δ diferença (95% CI)	P	ES
Energia total (kcal)	1567 $\pm$ 272	1528 $\pm$ 665	-39 $\pm$ 798	1738 $\pm$ 370	1771 $\pm$ 406	-30 $\pm$ 383	-208 (-1071 to 654)	0.6	0.12
Proteína (g)	61.1 $\pm$ 20.6	80.1 $\pm$ 33.5	19.1 $\pm$ 51.2	80.7 $\pm$ 23.8	77.1 $\pm$ 17.6	-5.9 $\pm$ 41.1	-5.7 (-46.1 to 34.8)	0.8	-0.6
Proteína (%)	15.2 $\pm$ 4.2	21.7 $\pm$ 7.6	6.5 $\pm$ 11.8	19.1 $\pm$ 3.3	18.1 $\pm$ 4.6	-1.5 $\pm$ 8.0	0.8 (-8.9 to 10.6)	0.8	-0.8
Carboidrato (g)	223.0 $\pm$ 31.5	190.9 $\pm$ 94.1	-32.1 $\pm$ 101.4	219.5 $\pm$ 63.5	229.9 $\pm$ 62.4	6.5 $\pm$ 46.2	-39.2 (-148.1 to 69.5)	0.4	-0.5
Carboidrato (%)	58.2 $\pm$ 7.0	48.2 $\pm$ 6.2	-10.0 $\pm$ 12.4	50.1 $\pm$ 7.5	51.6 $\pm$ 4.6	0.9 $\pm$ 8.2	-2.8 (-12.4 to 6.9)	0.5	0.9
Gordura (g)	47.8 $\pm$ 16.5	49.2 $\pm$ 19.4	1.4 $\pm$ 29.7	59.7 $\pm$ 17.3	60.3 $\pm$ 16.6	-1.5 $\pm$ 8.0	-12.1 (-42.9 to 18.7)	0.4	0.07
Gordura (%)	26.6 $\pm$ 4.8	30.1 $\pm$ 4.5	3.5 $\pm$ 7.5	35.7 $\pm$ 18.5	30.3 $\pm$ 4.5	-5.1 $\pm$ 20.9	-0.6 (-10.9 to 9.8)	0.9	-0.5
EPA (mg) ^a	8.0 $\pm$ 0.8	6.7 $\pm$ 5.0	-1.3 $\pm$ 5.4	9.5 $\pm$ 5.4	8.0 $\pm$ 6.7	-3.1 $\pm$ 2.7	3.0 (-6.9 to 13.6)	0.5	-0.4
DHA (mg) ^a	21.3 $\pm$ 22.0	11.3 $\pm$ 13.6	-10.0 $\pm$ 34.6	25.9 $\pm$ 21.9	13.7 $\pm$ 16.2	-14.6 $\pm$ 26.4	0.6 (-17.5 to 18.6)	0.9	-0.2
ALA (mg)	326 $\pm$ 476	290 $\pm$ 304	-36 $\pm$ 205	481 $\pm$ 263	473 $\pm$ 244	26 $\pm$ 324	-153 (-448 to 143)	0.3	0.2

Dados expressados em média (SD); mudança delta absoluta calculada apenas para amostras pareadas (Δ); diferenças de delta estimadas (Δ diferença), 95% intervalo de confiança (95% CI) e nível de significância (P) calculada usando Anova; *effect size* (ES). Abreviações: EPA = ácido eicosapentaenóico; DHA = ácido docosahexanoico; ALA = ácido α -linoleico, ^a valores sem contar a suplementação

5.4 Efeito da suplementação no perfil inflamatório

Após a intervenção, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo ω -3 e grupo PL nas concentrações circulantes de PCR (-51% *vs.* -45%, $p = 0,9$, ES= -0,3), IL-6 (-23% *vs.* -13%, $p = 0,91$, ES= -0,4) e IL-1ra (-33% *vs.* -58%, $p = 0,5$, ES= 0,04). Em contrapartida, o grupo ω -3 mostrou diminuição das concentrações circulantes de IL-10 (-4% *vs.* + 45%, $p = 0,04$, ES= -0,9), TNF (-11% *vs.* +0,3%, $p = 0,12$, ES= -0,7) e IL-1 β (-22% *vs.* +12%, $p = 0,2$, ES= -0,7) quando comparado ao grupo PL após a intervenção, embora as duas últimas comparações não tenham significado estatístico apesar do grande *effect size* (Tabela 4).

5.5 Segurança da suplementação

Não houve diferenças na variação de INR entre grupos (ω -3: Pré = $2,3 \pm 0,7$ e Pós = $2,1 \pm 0,7$; PL: Pré = $2,0 \pm 0,8$ e Pós = $1,7 \pm 0,7$; diferença média entre alterações delta -0,16 [95% CI -0,92 a 0,59]; $p = 0,65$; ES = -0,17). Não houve eventos adversos auto relatados durante o protocolo.

5.6 Ingestão dietética

Não houve diferenças significativas para a ingestão total de energia, macronutrientes, EPA, DHA e ALA (sem contar suplementação) entre grupos ($p > 0,05$ para todas as variáveis, Tabela 3).

6. DISCUSSÃO

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar a segurança e a eficácia da suplementação de PUFA n-3 na SAF. Os principais achados do estudo são que 16 semanas de suplementação de PUFA n-3 levaram à melhora da função endotelial e diminuição do *milieu* inflamatório de pacientes com SAF primário bem controlada.

A disfunção endotelial mediada por aPLs tem sido associada ao risco aumentado para trombose, aterosclerose acelerada, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral em pacientes com SAF (Mineo,2013). Assim, estratégias capazes de beneficiar a função endotelial podem ser valiosas no manejo desta doença. Neste estudo, demonstramos que 16 semanas de PUFA n-3 (3g de EPA e DHA/dia) levaram a

melhora dos índices de função endotelial em pacientes com SAF primário. Embora essa melhora possa ser considerada modesta (+ 13% no RHI e + 23% na LnRHI), é preciso considerar que as pacientes apresentaram doença bem controlada, já que nenhum delas apresentou episódios hemorrágicos ou trombóticos ou utilizou prednisona nos três meses antes ou durante o estudo. Além disso, nenhuma das pacientes apresentava DM2, doença associada à disfunção endotelial e aterosclerose acelerada (Crager et al., 2003). Assim, é possível que melhorias ainda maiores possam ser observadas em pacientes com a doença mais grave ou doenças metabólicas associadas.

Apesar da melhora nos índices de função endotelial, não observamos efeitos importantes da suplementação em marcadores sistêmicos de ativação de células endoteliais, com exceção da atenuação na resposta do ICAM-1 ao PUFA n-3 no grupo ω -3 quando comparado ao PL. Isso está de acordo com uma meta-análise que mostrou que a suplementação de PUFA n-3 reduz significativamente ICAM-1, mas não VCAM-1 ou selectina-e, em indivíduos saudáveis e dislipidêmicos (Yang, et al, 2012). Como a VCAM-1 e a selectina-e são expressas em células endoteliais em resposta à ativação de citocinas, ao passo que a ICAM-1 é expressa também em várias células imunes (monócitos, macrófagos e linfócitos), os autores sugeriram que o PUFA n-3 seletivamente atua na supressão de monócitos e não de células endoteliais, levando a menores concentrações circulantes de ICAM-1, mas não dos outros marcadores de ativação endotelial.

A supressão seletiva de monócitos, que leva à diminuição da expressão e secreção de citocinas inflamatórias por essas células, também pode explicar os conhecidos efeitos anti-inflamatórios da suplementação de PUFA n-3 (calder 2006). Foi demonstrado que a suplementação de ≥ 3 g /dia de EPA e DHA leva a reduções nas concentrações circulantes de TNF na DM2 (Mori et al., 1999) e à diminuição da produção de TNF e IL-1 β por células mononucleares estimuladas por endotoxina de indivíduos saudáveis (Kelley et al., 1999). Isto está de acordo com os nossos resultados de concentrações moderadamente diminuídas de TNF e IL-1 β no grupo ω -3 quando comparado ao grupo PL. Observamos, ainda, reduções significativas nas concentrações de IL-10 no grupo ω -3 quando comparado ao grupo PL. Como a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória clássica (Mosser & Zhang, 2008), isso pode ser interpretado como deletério. No entanto, é provável que a diminuição das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 β tenha resultado na diminuição da secreção de IL-10 de uma maneira

homeostática. Portanto, nossos resultados sugerem que a suplementação de PUFA n-3 levou a uma modesta, embora existente diminuição da expressão e secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias de pacientes com SAF primário, o que pode explicar pelo menos parcialmente as melhorias na função endotelial no grupo ω -3 quando comparado ao grupo PL.

Como esperado, observamos concentrações aumentadas de colesterol total e LDL-colesterol no grupo ω -3 após a intervenção quando comparado ao grupo PL. Isso poderia sugerir que o PUFA n-3 exerce um efeito negativo sobre o risco de DCV nesses pacientes. No entanto, o aumento não significativo de HDL-colesterol em resposta à suplementação no grupo ω -3 resultou na inalteração da razão LDL-colesterol / HDL-colesterol, um preditor de risco de DCV superior ao às concentrações de colesterol total e LDL-colesterol (Kathiresan et al., 2005), o que indica ausência de efeito deletério da suplementação. Além disso, estudos anteriores demonstraram que o aumento do LDL-colesterol induzido por PUFA n-3 deriva de um aumento de partículas grandes e não aterogênicas de LDL e não de partículas pequenas, densas e aterogênicas de LDL (Krauss et al., 2004), as quais estão diretamente associadas ao risco aumentado de aterosclerose (Kathiresan et al., 2005).

Uma grande preocupação deste estudo foi que a suplementação de PUFA n-3 poderia prejudicar o tempo de protrombina, sendo assim inseguro para pacientes com SAF. No entanto, não observamos alterações no INR no grupo ω -3 em resposta à suplementação. Além disso, não houve quaisquer efeitos adversos auto-relatados ao longo da intervenção. De modo geral, esses resultados atestam a segurança do suplemento de PUFA n-3 (3 g /dia) em pacientes com SAF primária bem controlada.

Este estudo apresenta limitações. Em primeiro lugar, nossa amostra foi composta por pacientes com SAF primário bem controlado. Portanto, não podemos descartar a possibilidade de que pacientes com uma doença mais grave possam responder de forma diferente à suplementação de PUFA n-3. No entanto, como o objetivo do estudo foi avaliar a eficácia da suplementação *per se* nesses pacientes, tivemos como objetivo eliminar potenciais fatores de confusão, como a presença de importantes comorbidades ou alterações na medicação, que poderiam interferir nos resultados. Além disso, não avaliamos o consumo alimentar antes e depois da intervenção. Assim, mudanças na ingestão de PUFA n-3 podem ter influenciado os resultados. No entanto, como especificamente instruímos as pacientes a não alterarem a ingestão de alimentos ao

longo da intervenção, não acreditamos que isso possa ter impactado os resultados de forma importante.

7. CONCLUSÃO

1) A suplementação de 3g DHA + EPA/dia por 16 semanas levaram a melhora no RHI e LnRHI em pacientes com SAF primário bem controlado.

2) A suplementação com PUFA n-2 resultou em concentrações moderadamente diminuídas de TNF e IL-1 β quando comparado ao grupo PL, mostrando uma ligeira diminuição no meio inflamatório das pacientes.

3) Pela primeira vez, foi mostrado que suplementação de 3g DHA + EPA/dia não aumentou o INR em pacientes com SAF primário, mostrando que o tratamento nessas pacientes foi seguro.

4) Esses resultados suportam um papel de suplementação de PUFA n-3 como terapia adjuvante em SAF.

9. REFERÊNCIAS

Andrade, D. Bortolotto, L. Bonfa , E., Borba, E. Primary antiphospholipid syndrome: absence of premature atherosclerosis in patients without traditional coronary artery disease risk factors. *Lupus* (2016) 25, 472–478

Ames, PR. Margarita, et al. (2005). "Premature atherosclerosis in primary antiphospholipid syndrome: preliminary data." *Ann Rheum Dis* 64(2): 315-7.

Ames, PR. Sokoll, et al. (2004). "Atherosclerosis in primary antiphospholipid syndrome." *Ann Rheum Dis* 63(5): 610-1; author reply 610-11.

Ames PRJ. Antiphospholipid antibodies, thrombosis and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: a unifying ‘membrane stress syndrome’ hypothesis. *Lupus* 1994;3:371-7.

Ames PRJ, Tommasino C, Iannaccone L, Brillante M, Cimino R, Brancaccio V. Coagulation activation and fibrinolytic imbalance in subjects with idiopathic antiphospholipid antibodies--a crucial role for acquired free protein S deficiency. *Thromb Haemost.* 1996 Aug;76(2):190-4.

Arriens C., Hynan LS., Lerman RH., Karp DR., Mohan C. Placebo-controlled randomized clinical trial of fish oil’s impact on fatigue, quality of life, and disease activity in Systemic Lupus Erythematosus. *Nutrition Journal* (2015) 14:82 DOI 10.1186/s12937-015-0068-2

Atsumi T1, Khamashta MA, Andujar C, Leandro MJ, Amengual O, Ames PR, Hughes GR Elevated plasma lipoprotein(a) level and its association with impaired fibrinolysis in patients with antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* 1998 Jan;25(1):69-73.

Balk E, Chung M, Lichtenstein A, Chew P, Kupelnick B, Lawrence A, DeVine D, Lau J, for the Tufts-New England Medical Center Evidence-Based Practice Center, Boston, MA. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Cardiovascular Risk Factors and Intermediate Markers of Cardiovascular Disease: Summary, Evidence Report/Technology Assessment No. 93. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality; March 2004. AHRQ Publication No. 04-E010-2

Barbosa, K. B. F.; Volp, A. C. P.; Renhe, I. R. T.; Stribhta, P. C. Omega-3 and 6 fatty acids and implications on human health. *Nutrire:rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP, v. 32, n. 2, p. 129-145, ago. 2007.

Biggioggero M. Meroni P. L., The geoepidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome, *Autoimmunity Reviews*, 2010, A299-A304

Bohgaki M, Atsumi T, Yamashita Y, Yasuda S, Sakai Y, Furusaki A, et al. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti-beta2 Glycoprotein I antibodies. *Int Immunol* 2004;16: 1633e41.

Buckley R, Shewring B, Turner R, Yaqoob P, Minihane A. Circulating triacylglycerol and apoE levels in response to EPA and docosahexaenoic acid supplementation in adult human subjects. *Br J Nutr* 2004;92:477–483.

Calabresi L, Donati D, Pazzucconi F, Sirtori CR, Franceschini G (2000). Omacor in familial combined hyperlipidemia: effects on lipids and low density lipoprotein subclasses. *Atherosclerosis* 148: 387–396.

Calder PC. n3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory disease. *Am J Clin Nutr* 2006;83(suppl):1505S–19S. 2006

Celli, C. M. and Gharavi, A. E., Origin and pathogenesis of antiphospholipid antibodies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1998. p.723-732.

Celińska-Lowenhoff M, Iwaniec T, Padjas A, Musiał J, Undas A1. Altered fibrin clots structure/function in patients with antiphospholipid syndrome: association with thrombotic manifestation. *Thromb Haemost.* 2014 Aug;112(2):287-96. doi: 10.1160/TH13-11-0980

Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1000 patients. *Medicine (Baltimore)* 1993;72:113–124.

Cervera R, Piette JC, Font J, et al. Antiphospholipid syndrome. Clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1000 patients. *Arthritis Rheum* 2002;46:1019–1027.

Chambless L, Folsom A, Sharrett A, Sorlie PD, Couper DJ, Szklo M, Nieto F. Coronary heart disease risk prediction in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Clin Epidemiol* 2003;56: 880–890

Chambless LE, Heiss G, Shahar E, Earp MJ, Toole J. Prediction of ischemic stroke risk in the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Am J Epidemiol* 2004;160:259–269.

Cho CS, Cho ML, Chen PP, Min SY, Hwang SY, Park KS, et al. Antiphospholipid antibodies induce monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *J Immunol* 2002;168:4209e15.

Cockwell P, et al. Activation of endothelial cells in thrombosis and vasculitis. *Scan J Rheumatol* 1997;26:145–150.

Connor WE. n-23 Fatty acids and heart disease. In: Kritchevsky D, Carroll KK, eds. *Nutrition and disease update: heart disease*. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society,;7–42. 1994

Connor, W. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr*;71(suppl):171S–5S. 2000

Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* 2003; 108: 1527-1532. DOI: 10.1161/01.CIR.0000091257.27563.32

Cuadrado MJ, Hughes GRV. Hughes (antiphospholipid) Syndrome. *Rheum Dis Clin N Am* 2001;27:507-24.

Cucnik S, Kveder T, Ulcova-Gallova Z, et al. The avidity of anti-beta2-glycoprotein I antibodies in patients with or without antiphospholipid syndrome: a collaborative study in the frame of the European forum on antiphospholipid antibodies. *Lupus* 2011; 20:1166–1171.

Dangardt F, Osika W, Chen Y, et al. Omega-3 fatty acid supplementation improves vascular function and reduces inflammation in obese adolescents. *Atherosclerosis* 2010;212:580–5.

De Caterina R, Liao JK, Libby P. Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 2000.

Del Papa N, Guidali L, Spatola L, Bonara P, Borghi MO, Tincani A, Balestrieri G, Meroni PL. Relationship between anti-phospholipid and anti-endothelial cell antibodies: beta2 glycoprotein I mediates the antibody binding to endothelial membranes and induces the expression of adhesion molecules. *Clin Exp Rheumatol*. 1995;13:179–185.

Din, J. N.; Newby, D. E.; Flapan, A. D. Omega3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *Br. Med. J.*, v. 328, n. 3, p. 30-35, 2004.

Din JN, Archer R, Harding SA, Sarma J, Lyall K, Flapan AD, Newby DE. Effect of ω -3 fatty acid supplementation on endothelial function, endogenous fibrinolysis and platelet activation in male cigarette smokers. *Heart* ;99:168–174. doi:10.1136/heartjnl-2012-302924. 2013

Durrington PN, Bhatnagar D, Mackness MI, Morgan J, Julier K, Khan MA et al. (2001). An omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate administered for one year decreased triglycerides in simvastatin treated patients with coronary heart disease and persisting hypertriglyceridaemia. *Heart* 85: 544–548.

Dyerberg J, Eskesen D, Andersen P, Astrup A, Buemann B, Christensen J, Clausen P, Rasmussen B, Schmidt E, Tholstrup T, et al. Effects of trans- and n-3 unsaturated fatty acids on cardiovascular risk markers in healthy males: an 8 weeks dietary intervention study. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:1062–1070.

Engler, M. B. Engler, D. M. Pierson, L. B. Molteni, and A. Molteni, “Effects of docosahexaenoic acid on vascular pathology and reactivity in hypertension,” *Experimental Biology and Medicine*, vol. 228, no. 3, pp. 299–307, 2003.

Eritsland, J., et al. Long-term effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on haemostatic variables and bleeding episodes in patients with coronary artery disease. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, Vol. 6, 1995, pp. 17-22

Espinola-Zavaleta, N. Alexanderson-Rosas, N. Granados, M. E. Soto, and M. Amigo, Myocardial perfusion defects in patients with autoimmune diseases: a prospective study. Analysis of two diagnostic tests,” *Lupus*, vol. 15, no. 1, pp. 38– 43, 2006.

Fortmann SP, Ford E, Criqui MH, Folsom AR, Harris TB, Hong Y, Pearson TA, Siscovick D, Vinicor F, Wilson PF. CDC/AHA workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: report from the population science discussion group. *Circulation* 2004;110:e554–e559

Garofolo A.; Petrilli AS. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. *Rev. Nutr.*, Campinas, 19(5):611-621, set./out., 2006

Goua, M Mulgrew, S J. Frank, D. Rees, A. A. Sneddon, and K. W. J. Wahle, “Regulation of adhesion molecule expression in human endothelial and smooth muscle cells by omega-3 fatty acids and conjugated linoleic acids: involvement of the transcription factor NF- κ B?” *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 78, no. 1, pp. 33–43, 2008.

Grika EP, Ziakas PD, Zintzaras E, Moutsopoulos HM, and. Vlachoyiannopoulos PG. Morbidity, Mortality, and Organ Damage in Patients with Antiphospholipid Syndrome, *J Rheumatol* 2012;39;516-523

Haberka M, Mizia-Stec K, Mizia M, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids early supplementation improves ultrasound indices of endothelial function, but not through NO inhibitors in patients with acute myocardial infarction N-3 PUFA supplementation in acute myocardial infarction. *Clin Nutr* 2011;30:79–85.

Harris EN, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Rheumatology* 131; 1.445- 1.452, 1998.

Harris, W. S.; Assad, B.; Poston, C. Tissue Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio and risk for coronary heart disease. *Am. J. Cardiol.*, v. 98, n. 4, p. 19-26, 2006.

Hoffman M, Monroe DM, Roubey RAS (2001) Links between the immune and coagulation systems: how do “antiphospholipid antibodies” cause thrombosis? *Immunol Res* 22:109–116

Hong H, Xu Z, Pang B, Cui L, Wei Y, Guo W, Mao Y, Yang X. Effects of simvastatin combined with omega-3 fatty acids on high sensitive C-reactive protein, lipidemia, and fibrinolysis in patients with mixed dyslipidemia. *Chin Med Sci J* 2004;19:145–149.

Hornstra G (2001). Influence of dietary fat type on arterial thrombosis tendency. *J Nutr Health Aging* 5: 160–166.

Jump, D. B. The biochemistry of n-3 polynsaturated fatty acids. J. Biol. Chem., v. 277, n. 11, p. 8755-8758, 2002.

Jeromson S., Gallagher, IJ., Galloway SDR., Hamilton DL. Omega-3 Fatty Acids and Skeletal Muscle Health. Mar. Drugs 2015, 13, 6977-7004; doi:10.3390/md13116977

Kaplanski G, Cacoub P, Farnarier C, Marin V, Gregoire R, Gadel A, Durand JM, Harle JR, Bongrand P, Piette JC. Increased soluble vascular cell adhesion molecule 2 concentrations in patients with primary or systemic lupus erythematosus-related antiphospholipid syndrome: correlations with the severity of thrombosis. Arthritis Rheum. 2000;43:55–64.

Kathiresan S, Otvos JD, Sullivan LM, et al. Increased small low-density lipoprotein particle number: a prominent feature of the metabolic syndrome in the Framingham Heart Study. Circulation 2006; 113: 20-29.

Kelley DS, Taylor PC, Nelson GJ, et al. Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men. Lipids 1999; 34: 317-324.

Kenny D, Warltier DC, Pleuss JA, Hoffmann RG, Goodfriend TL, Egan BM. Effect of omega-3 fatty acids on the vascular response to angiotensin in normotensive men. Am J Cardiol 1992;70:1347–52.

Khamashta MA. Hughes Syndrome: Antiphospholipid Syndrome. Springer-Verlag London Ltd. 2nd edition, 2006. pag. 176-179

Krauss RM. Hold the antioxidants and improve plasma lipids? The Journal of clinical investigation 2004; 113: 1253-1255. DOI: 10.1172/JCI21637.

Laurent, S. Cockcroft, J.L. Van Bortel et al., “Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications,” *European Heart Journal*, vol. 27, no. 21, pp. 2588–2605, 2006.

Lee, KW., Lip, GYH. The role of omega-3 fatty acids in the secondary prevention of cardiovascular disease. *Q J Med* 2003; 96:465–480; doi:10.1093/qjmed/hcg092

Leeson CP, Mann A, Kattenhorn M, Deanfield JE, Lucas A, Muller DP. Relationship between circulating n-3 fatty acid concentrations and endothelial function in early adulthood. *Eur Heart J* 2002;23:216–22.

Losurdo, P Grillo, A Panizon E., “Supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids prevents increase in arterial stiffness after experimental menopause,” *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, vol. 19, no. 1, pp.114–120, 2014.

Losurdo, P Grillo, A Panizon E., “Baroreflex sensitivity and central hemodynamics after omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in an animal model of menopause,” *Vascular Pharmacology*, 2015.

Lovegrove JA, Lovegrove SS, Lesauvage SV, Brady LM, Saini N, Minihane AM, Williams CM. Moderate fish-oil supplementation reverses low-platelet, long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid status and reduces plasma triacylglycerol concentrations in British Indo Asians. *Am J Clin Nutr* 2004;79:974–982.

Lusis, AJ, *Atherosclerosis*, *Nature*, 407 (2000), pp. 233–241

Mackay I, Ford I, Thies F, Fielding S, Bachoo P, Brittenden J. Effect of Omega-3 fatty acid supplementation on markers of platelet and endothelial function in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*. 2012 Apr;221(2):514-20. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.041. Epub 2012 Jan 13.

Masson, RA . Lucas A. A.-M. Gueugneau et al., “Long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids prevent metabolic and vascular disorders in fructose-fed rats,” *Journal of Nutrition*, vol. 138, no.10, pp. 1915–1922, 2008.

Meroni PL, Del Papa N, Raschi E, et al. b2-Glycoprotein I as a ‘cofactor’ for anti-phospholipid reactivity with endothelial cells. *Lupus* 1998; 7:Suppl 2:S44-S47.

Meroni PL, Raschi E, Camera M, et al. Endothelial activation by aPL:a potential pathogenetic mechanism for the clinical manifestations of the syndrome. *J Autoimmun* 2000;15:237-40.

Miller, PEM. Van Elswyk, and D. D. Alexander, “Long-chain omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials,” *American Journal of Hypertension*, vol. 27, no. 7, pp. 885–896, 2014.

Mineo C. Inhibition of nitric oxide and antiphospholipid antibody-mediated thrombosis. *Current rheumatology reports* 2013; 15: 324. DOI: 10.1007/s11926-013-0324-4.

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RHW, de Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295–306.

Mchrani T, Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid syndrome. In: Asherson RA, editor. *Hanbook of systemic autoimmune diseases*, vol. 10. Amsterdam: Elsevier; 2009. p. 13–34.

Mori TA, Dunstan DW, Burke V, et al. Effect of dietary fish and exercise training on urinary F2-isoprostane excretion in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism* 1999; 48: 1402-1408. 1999/12/03.

Mosser DM and Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological reviews* 2008; 226: 205-218. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x.

Mozaffarian D, Wu JH. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58 (20):2047- 67.

Newman W, Mittleman B, Stamper MJ, Rogers D. Atherosclerosis in Alaska natives and non-natives. *Lancet*. 1993;341:1056-1057.

Oh PC, Koh KK, Sakuma I, Lim S, Lee Y, Lee S, Lee K, Han SH, Shin EK. Omega-3 fatty acid therapy dose-dependently and significantly decreased triglycerides and improved flow-mediated dilation, however, did not significantly improve insulin sensitivity in patients with hypertriglyceridemia. *Int J Cardiol*. 2014 Oct 20;176(3):696-702. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.07.075. Epub 2014 Aug 7.

Oosthuizen W, Vorster HH, Jerling JC, Barnard HC, Smuts CM, Silvis N, Kruger A, Venter CS (1994) Both fish and olive oil lowered plasma fibrinogen in women with high baseline fibrinogen levels. *Thromb Haemost* 72:557–562

Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GH, Harris EN. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation*. 1999.

Pase, MP Grima NA, Sarris J. “The effects of dietary and nutrient interventions on arterial stiffness: a systematic review,” *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 93, no. 2, pp. 446–454, 2011.

Perez-Vazquez ME, Villa A, Drenkard C, Cabiedes J, Alarcon-Segovia D. Influence of disease duration, continued follow up and further antiphospholipid testing on the frequency and classification category of antiphospholipid syndrome in a cohort of patients with SLE. *J Rheumatol* 1993;20:437–442.

Pryce R, Bernaitis N, Davey AK, Badrick T, Anoopkumar-Dukie S. The Use of Fish Oil with Warfarin Does Not Significantly Affect either the International Normalised Ratio or Incidence of Adverse Events in Patients with Atrial Fibrillation and Deep Vein Thrombosis: A Retrospective Study. *Nutrients* 2016, 8, 578; doi:10.3390/nu8090578

Rand, J. H. , The antiphospholipid syndrome. *Annual Review of Medicine*, 54, 409- 424. 2003

Rizza S, Tesouro M, Cardillo C, et al. Fish oil supplementation improves endothelial function in normoglycemic offspring of patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2009;206:569–74.

Roman, M. J., J. E. Salmon, et al. (2001). "Prevalence and relation to risk factors of carotid atherosclerosis and left ventricular hypertrophy in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibody syndrome." *Am J Cardiol* 87(5): 663-6, A11.

Ruboldi, P., Gerosa M, Raschi E., Testoni C., Meroni PL. Endothelium as a target for APL. *Immunobiol.* 207, 29 - 36. 2003

Sato, MY, Katsuki, H, Kanehiro et al., "Effects of ethyl all- cis-5,8,11,14,17-icosapentaenoate on the physical properties of arterial walls in high cholesterol diet-fed rabbits," *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, vol. 22, no. 1, pp. 1–9, 1993.

Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Rev Immunol.* 2008;8:349–61.

Shevchuk SV, Seheda IuS, Kuvikova IP. Dyslipidemia in patients with antiphospholipid syndrome and its association with endothelial dysfunction and atherosclerotic changes in the carotid arteries. *Lik Sprava.* 2013 Mar;(2):38-47.

Siasos G, Tousoulis D, Oikonomou E, et al. Effects of omega-3 fatty acids on endothelial function, arterial wall properties, inflammatory and fibrinolytic status in smokers: a cross over study. *Int J Cardiol* 2013;166:340e6

Sijben JW1, Calder PC. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. *Proc Nutr Soc*. 2007 May;66(2):237-59.

Simantov E, LaSala J, Lo SK, Gharavi AE, Sammaritano LR, Salmon JE, Silverstein RL. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest*. 1995;96:2211–2219.

Silva, FF. Levy RA. Carvalho JF. Cardiovascular Risk Factors in the Antiphospholipid Syndrome *Journal of Immunology Research* Volume 2014, Article ID 621270, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/621270>

Simopoulos A., 2002. Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases, *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 21, No. 6, 495–505 (2002)

Sociedade Brasileira de Cardiologia, I Diretriz sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascula, ISSN-0066-782X, Volume 100, No 1, Supl.3, Jan.2013

Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, Cannuscio CC, Mandl LA, Manson JE, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2003;107: 1303–7.

Souza. A. W. S. . Silva, N. P J. F. Carvalho, V. D. Almeida, M. A. E. Noguti, and E. I. Sato Impact of hypertension and hyperhomocysteinemia on arterial thrombosis in primary antiphospholipid syndrome,” *Lupus*, vol. 16, no. 10, pp. 782–787, 2007

Smith P, Arnesn H, Opstad T, et al. Influence of highly concentrated n-3 fatty acids on serum lipids and hemostatic variables in survivors of myocardial infarction receiving either oral anticoagulants or matching placebo. *Thromb Res* 1989;53:467–474.

Stalenhoef AF, de Graaf J, Wittekoek ME, Bredie SJ, Demacker PN, Kastelein JJ (2000). The effect of concentrated n-3 fatty acids versus gemfibrozil on plasma lipoproteins, low density lipoprotein heterogeneity and oxidizability in patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 153: 129–138.

Steffel J., Lüscher T.F, Tanner FC. Tissue Factor in Cardiovascular Diseases: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Circulation*. 2006;113:722-731

Stirban A, Nandrea S, Gotting C, et al. Effects of n-3 fatty acids on macro- and microvascular function in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2010;91:808–13.

Sundrarajun T, Komindr S, Archararit N, Dahlan W, Puchaiwatananon O, Angthararak S, Udomsuppayakul U, Chuncharunee S. Effects of n-3 fatty acids on serum interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and soluble tumour necrosis factor receptor p55 in active rheumatoid arthritis. *J Int Med Res* 2004;32:443–454.

Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000;101:948–954

Theobald HE, Chowienczyk PJ, Whittall R, Humphries SE, Sanders TA. LDL cholesterol-raising effect of low-dose docosahexaenoic acid in middle-aged men and women. *Am J Clin Nutr* 2004;79:558–563.

Uthman I., Khamastha M., Ethnic and geographical variation in antiphospholipid (Hughes) syndrome, *Ann Rheum Dis* 2005;64:1671–1676.

Wang CR, Liu MF, Tsai RT, Chuang CY, Chen CY. Circulating intercellular adhesion molecules-1 and autoantibodies including anti endothelial cells, anticardiolipin, and antineutrophil cytoplasm antibodies in patients with vasculitis. *Clin Rheumatol*. 1993;12:375–380.

Ward MM. Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases on women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42:338–46.

Xin W., Wei W., Li, XY., Short-term effects of fish-oil supplementation on heart rate variability in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2013;97:926–35. 2013

Yang Y, Lu N, Chen D, et al. Effects of n-3 PUFA supplementation on plasma soluble adhesion molecules: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American journal of clinical nutrition* 2012; 95: 972-980. DOI: 10.3945/ajcn.111.025924.

Zanetti, M. Grillo, A. Pasquale, L. Panizon. Mearelli, F. Cattin, L. Barazoni, R. Carretta, R. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Structural and Functional Effects on the Vascular Wall. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 791978, 14 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/791978>