Patrícia Amante de Oliveira

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof Dr Joel Faintuch

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1º de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

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

Oliveira, Patrícia Amante de
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 / Patrícia Amante de Oliveira. -- São Paulo, 2016.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Joel Faintuch.

Descritores: 1.Inflamação 2.Endotélio vascular 3.Ácidos graxos insaturados 4.Espessura íntima-média carotídea 5.Idoso 6.Obesidade 7.Aterosclerose 8.Rigidez vascular

USP/FM/DBD-347/16

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha família:

Meu pai Sergio, que, sem maiores estudos, lutou e trabalhou incessantemente e conseguiu formar seus três filhos; com seu humor e frases inesquecíveis, de onde estiver, está cheio de orgulho de sua "princesinha";

Minha mãe Adalice, que sempre foi o suporte para todos nós seguirmos em frente com seu amor incondicional, meu porto seguro;

Meus irmãos Cláudio e Marcelo, e sobrinhas Mariana e Ana Luisa, sempre presentes em minha vida;

Minha Dinda Mariacy, que sempre acreditou em minha essência e capacidade, até mais do que eu, sempre me incentivando a ir mais e mais longe e, certamente, de onde está, olha por mim com orgulho;

E meu amor maior desta vida, maior do que eu pensei que pudesse um dia sentir, meu anjo que foi gerado e cresceu quase junto deste trabalho, fazendo parte de cada linha dele, Júlia, minha filha.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr Joel Faintuch, por sua orientação, paciência e perseverança durante todo o trabalho, sempre acreditando em minha capacidade;

Ao Prof Dr Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque, coordenador do programa de pós-graduação da área Ciências em Gastroenterologia - FMUSP, pelo apoio a todas as pesquisas e aos pesquisadores do serviço;

Ao Prof Dr Mohamed Hassan Saleh, pela importante participação examinando e reexaminando todos os pacientes, durante toda a pesquisa, sempre disposto a ajudar no que foi preciso para elaboração do estudo, desde o projeto até a defesa incluindo sua co-orientação (embora não oficial);

Aos Profs Drs Carlos Alberto Malheiros e Claudia Pinto Marques S. Oliveira e Dr Andre Dong won Lee, obrigada pelas sugestões na banca de qualificação.

Ao Dr Daniel Magnoni, Diretor de Nutrição do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, que acreditou em meu potencial e sempre me deu projetos muito maiores do que eu poderia almejar; por seu incentivo constante e por sua ajuda em concretizar este trabalho desde a etapa zero, mas acima de tudo por sua amizade e presença em minha vida;

Ao Dr Michel Kfouri filho, por sua ajuda tão essencial neste trabalho, possibilitando a realização de uma pesquisa duplo-cego e randomizada;

Ao Dr Jorge Eduardo Assef, chefe da seção de Ecocardiografia do Instiuto Dante Pazzanese de Cardiologia, pelo apoio a esta pesquisa;

À Priscila Moreira, nutricionista que me auxiliou durante toda a pesquisa, atendendo os pacientes comigo, dando todo seu apoio a eles e à pesquisa; pela amizade e convívio agradável no dia a dia no ambulatório de nutrição;

À Cristiane Kovacs, chefe do ambulatório de nutrição, por seu apoio dentro do Serviço de Nutrição do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, possibilitando a realização desta pesquisa;

Às demais colegas do Instituto, Monica Romualdo, Catharina Paiva, Fernanda Cassulo, Maria José Santos, Ana Margareth Soares, Lenita Borba, Fernanda Banduk Cury, Regina Plata, Adriana Moura, Raquel Fernandes e Marcela Barbosa pelo agradável convívio e pela amizade ao longo dos anos;

Aos estatísticos, Marcio Augusto Diniz e Leandro, que tiveram papel fundamental na análise dos dados colhidos, meu reconhecimento por sua ajuda imprescindível;

À secretária da pós-graduação, Vilma Libério, por sua constante ajuda, sempre com uma palavra positiva de incentivo, simpatia e apoio em todo o período;

À grande amiga Andrea Sayaka Masada, que sempre esteve disposta a ajudar no que foi preciso desde a compreensão no ambulatório de geriatria do Centro de Referência do Idoso até o apoio na qualificação, minha sincera gratidão pela amizade de todos estes anos;

Ao Paco, companheiro de todos estes anos e pai da nossa filha amada que, enquanto estivemos juntos, me apoiou e acompanhou minha batalha para chegar até o fim deste projeto, meu agradecimento pelos anos de amizade e carinho;

Ao Prof Dr Wilson Jacob Filho, diretor do serviço de Geriatria do HC-FMUSP, responsável pelos primeiros ensinamentos na área de geriatria, a quem devo grande parte do meu conhecimento, pelo incentivo em seguir na área de atuação sobre nutologia;

Ao Dr Abrão José Cury Junior, pela amizade sincera e apoio ao longo destes anos tanto no trabalho quanto em minha vida pessoal;

Às amigas de faculdade, de trabalho e da vida Nataly Rocha Scarin, Renata Louise Battisti Archer, Áurea Iscaro Andrade, Isabela Cardoso Pimentel Mota, Adriana Fucci, Silvia Avian, Stella Maria Pedrossian Vecchiatti e Viviane Dias, sempre presentes em minha vida especialmente nestes anos de pesquisa, pela amizade, incentivo, carinho e suporte;

Aos Grupos Cisbra e Target/Galo pela doação dos óleos de linhaça e de oliva respectivamente, que com sua importante colaboração pudemos aprimorar nossos conhecimentos científicos a respeito destes dois óleos;

Aos pacientes que acreditaram no projeto e em minha motivação à de alguma forma minimizar as alterações inerentes a senescência, na esperança de um envelhecimento bem sucedido, seguiram até o fim me ajudando a completar esta pesquisa que poderá ser replicada por profissionais da saúde, estendendo os benefícios a outros idosos.

À Deus, por toda Sua Luz em todos os momentos da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS ---------- 8

LISTA DE SÍMBOLOS ---------- 11

LISTA DE FIGURAS ---------- 12

LISTA DE TABELAS ---------- 13

LISTA DE QUADROS ---------- 14

RESUMO ---------- 15

1. INTRODUÇÃO ---------- 19

1. 1 - ***Envelhecimento e obesidade*** ---------- 20

1. 2 - Adipocinas ---------- 24

1. 3 - Resistência Insulínica e Aterosclerose ---------- 27

1. 4 - Inflamação e endotélio ---------- 29

1. 5 - Alimentação, Inflamação e Aterosclerose ---------- 32

2. HIPÓTESES ---------- 41

3. OBJETIVOS ---------- 41

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS ---------- 41

4. 1 - CASUÍSTICA ---------- 41

4. 2 .1 - CRITÉRIOS DE INCLUSÃO ---------- 41

4. 2 .2 - CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO ---------- 42

4. 2 - MÉTODO ---------- 42

4. 2 .1 - DURAÇÃO ---------- 42

4. 2 .2 - QUESTIONÁRIO E AVALIAÇÃO CLÍNICA ---------- 43

4. 2 .3 - INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA ---------- 44

4. 2 .4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA ---------- 45

5. RESULTADOS 46

6. DISCUSSÃO 55

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS 67

8. CONCLUSÃO 69

9. REFERÊNCIAS 70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AGL	Ácidos graxos livres
AHA	*American Heart Association*
AIC	Água intracelular
ALA	Ácido alfa-linolênico
Apo	Apolipoproteína
Arg-1	Arginase-1
CC	Circunferência de cintura
CIMT	*Carotid intima-media thickness* (espessura da íntima-média da carótida)
CV	Cardiovascular
DCV	Doença cardiovascular
DHA	*Docosahexaenoic acid* (ácido docosohexaenoico),
DM2	*Diabetes mellitus* tipo 2
DP	Desvio padrão
EDNO	*Endothelium-derived nitric oxide* (óxido nítrico derivado do endotélio)
EFC-L	*Eosinophil Chemotactic Factor* (fator quimiotático eosinofílico derivado do linfócito)
eNOS	*Endothelial nitric oxide synthase* (sintase endotelial do óxido nítrico)
EPA	*Eicosapentaenoic acid* (ácido eicosapentaenóico)
ET-1	Endotelina 1
EUA	Estados Unidos da América
FIZZ-1	*Resistin-like molecules or found in inflammatory zone* (proteína encontrada no local da inflamação)
FNT-alfa	Fator de necrose tumoral alfa

FVW	Fator de von Willebrand
GC	Gordura corporal
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ICAM-1	*Intercellular adhesion molecule-1* (molécula de adesão intercelular-1)
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
IRS-1	I*nsulin receptor substrate* 1 (substrato-1 do receptor de insulina)
κB^3	Kappa B^3
LA	*Linoleic acid* (ácido linoléico)
LPS	Lipopolissacarídeos derivados de bactérias
LDL	*Low density lipoprotein* (lipoproteína de baixa densidade)
MAPK	*Mitogen-activated protein kinases* (proteína quinase ativada por mitógenos)
M-CSF	*Macrophage colony-stimulating factor* (Fator macrofágico estimulador de colônia)
MCP-1	*Monocyte chemoattractant protein-1* (proteína quimiotática de monócitos)
MUFA	*Monounsaturated fatty acids* (ácidos graxos monoinsaturados)
NCEP, USA	*National Cholesterol Education Program, United States of America*
ON	Óxido nítrico
PAI-1	*Plasminogen activator inhibitor-1* (inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1)
PCB	*Polychlorinated biphenyls* (bifenilpoliclorado)
PI3-K	*Phosphoinositide 3-kinase* (fosfatidilinositol 3-quinases)

PCRus	Proteína C reativa ultrassensível
PPAR-γ	*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (receptores ativados por proliferador de peroxissoma-gama)
PREDIMED	PREvención con DIeta MEDiterránea
PUFA	*Polyunsaturated fatty acids* (ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa)
ROS	*Reactive oxigen species* (espécies reativas do oxigênio)
SDHS	*Sydney Diet Heart Study*
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TGF-β	*Transforming growth factor* (fator de transformação de crescimento)-β
Th1/Th2	Relação T helper1/T helper2
VCAM-1	*Vascular cell adhesion molecule 1* (molécula de adesão celular vascular)
VFM	vasodilatação fluxo-mediada
VLDL	*Very low density lipoprotein* (lipoproteína de muito baixa densidade)
VSMC	*Vascular smooth muscle cells* (células do músculo liso vascular)
Ym-1	Proteína secretora

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetros
g	gramas
Kcal	kilocalorias
kg/m^2	kilogramas/metro quadrado
L	litros
mg	miligramas
mg/dL	miligramas/decilitro
mg/L	miligramas/litro
μg	micrograma
mm	milímetros
uIU/mL	micro unidades internacionais/mililitro (ou μIU/mL)
ng/mL	nanograma/mililitro
UI	Unidades internacionais (IU em inglês)
RE	equivalente de retinol

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Modificação da polarização dos macrófagos M1 e M2 com o envelhecimento ---------- 21

FIGURA 2 – Marcadores inflamatórios e proteínas de fase aguda secretadas pelo tecido adiposo ---------- 23

FIGURA 3 - Via da MAPK nas células endoteliais e vasculares do músculo liso ----- 28

FIGURA 4 - Via de conversão dos ácidos linoléico e alfa-linolênico em suas cadeias longas derivativas ---------- 35

FIGURA 5 - Sínteses e ações dos mediadores lipídicos produzidos pelo AA, EPA e DHA ---------- 36

FIGURA 6 - comparação dos níveis de PCR pré e pós-intervenção ---------- 50

FIGURA 7 - comparação dos níveis de C3 pré e pós-intervenção ---------- 50

FIGURA 8 - comparação dos níveis de C4 pré e pós-intervenção ---------- 51

FIGURA 9 - comparação dos níveis de ApoA pré e pós-intervenção ---------- 51

FIGURA 10 - comparação dos níveis de ApoB pré e pós-intervenção ---------- 51

FIGURA 11 - comparação dos valores de ApoB/ApoA pré e pós-intervenção -------- 51

FIGURA 12 - comparação dos níveis de Leptina pré e pós-intervenção ---------- 51

FIGURA 13 - comparação dos níveis de Fibrinogênio pré e pós-intervenção --------- 51

FIGURA 14 - comparação dos valores de espessura da artéria carótida pré e pós-intervenção ---------- 53

FIGURA 15 - comparação da diferença do diâmetro em sístole e diástole pré e pós-intervenção ---------- 53

FIGURA 16 – comparação dos valores de VFM pré e pós-intervenção ---------- 54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - características dos pacientes antes da intervenção ---------- 46

TABELA 2 - Dados do recordatório alimentar antes (T1) e depois (T2) da intervenção (media e DP) ---------- 47

TABELA 3 - Medidas Antropométricas dos grupos no início da pesquisa (media e DP) ---------- 48

TABELA 4 - Parâmetros Bioquímicos dos grupos antes (T1) e depois (T2) da intervenção (media e DP) e valores de p ---------- 49

TABELA 5 - Valores de p na análise estatística usando teste t e *Wilcoxon* dos grupos em relação aos parâmetros bioquímicos ---------- 50

TABELA 6 – Parâmetros endoteliais ao ultrassom dos grupos antes (T1) e depois (T2) da intervenção (media e DP) ---------- 52

TABELA 7 – Valores de p na análise estatística usando teste t e *Wilcoxon* dos achados endoteliais dos grupos ---------- 53

TABELA 8 – Artigos com dados observacionais da dieta habitual quanto à composição de ALA e a resposta inflamatória e função endotelial ---------- 56

TABELA 9 – Artigos com intervenção ou avaliação da ingestão de AG e resposta inflamatória ---------- 61

TABELA 10 – Artigos com intervenção ou avaliação da ingestão de AG e a função endotelial ---------- 65

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Conteúdo de DHA e EPA nos tipos de peixes consumidos ---------- 38

QUADRO 2 - Teor percentual médio de ácidos graxos presentes nos diferentes óleos vegetais ---------- 40

RESUMO

Oliveira PA. ***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]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A obesidade é uma doença crônica com complicações para a qual se busca o tratamento e a prevenção. A gordura visceral é um órgão endócrino de armazenamento hormonal e produtor de adipocinas inflamatórias, tornando o obeso portador de inflamação crônica, que por sua vez é uma das características da aterogênese e do envelhecimento. Os níveis aumentados de interleucina-6 e fator de necrose tumoral-α, citocinas multifuncionais, estão associados à morbi-mortalidade em idosos e à patogênese da aterosclerose.

Nos dias atuais, a alimentação mundial é caracterizada pelo aumento do consumo de gordura saturada e gorduras trans, bem como pela redução do consumo de ácidos graxos ômega-3. O desequilíbrio na relação ômega-6/ômega-3 propicia um ambiente de inflamação crônica, sendo o estímulo inicial para doenças degenerativas. A substituição de gorduras saturadas por ácidos graxos poliinsaturados, de ácido α-linolênico (ALA) – ômega-3, e de ácido graxo monoinsaturado (ácido oléico – ômega-9), parece estar associada à redução do risco de doença cardiovascular. Entre duas fontes de ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico, os ácidos graxos ômega-3 provenientes de peixes e o ALA das fontes vegetais, este último é mais acessível financeiramente e amplamente disponível no mundo todo.

Este estudo foi desenhado para avaliar comparativamente o efeito do aumento do consumo de ALA proveniente de fontes vegetais sobre os indicadores inflamatórios e a reatividade endotelial em pacientes idosos e obesos ou com sobrepeso. Foram selecionados 79 pacientes para receber doses diárias de óleo de linhaça, óleo de oliva e óleo de girassol por 12 semanas consecutivas. Foram realizadas medidas antropométricas, bioquímicas e de reatividade endotelial antes e após a intervenção, sem nenhuma modificação na dieta dos participantes ou em suas medicações utilizadas, não havendo mudanças antropométricas após a conclusão do estudo. Houve melhora em

alguns parâmetros bioquímicos com o óleo de linhaça, que reduziu os níveis de PCRus, C3, C4 e fibrinogênio; com o óleo de girassol, que reduziu os níveis de leptina, ApoB e também a relação Apo B/ApoA1; e com o óleo de oliva que beneficiou a relação Apo B/ApoA1 e os níveis de C4. A espessura da artéria carótida também teve melhora significativa com os três óleos suplementados, mais acentuada com o óleo de linhaça e o óleo de oliva. Além disto, o óleo de girassol melhorou significativamente a distensibilidade da parede arterial e da vasodilatação fluxo-mediada (VFM) e o óleo de oliva apresentou tendência de melhora na VFM.

Concluímos que a suplementação de ácidos graxos insaturados provenientes dos três óleos vegetais atenuou o quadro pró-inflamatório e pró-trombótico. Ocorreu melhora do perfil de marcadores bioquímicos e resultados significativos estatisticamente nos marcadores de reatividade endotelial como redução da espessura da íntima-média da artéria carótida, melhora da distensibilidade da parede arterial e melhora da funcionalidade medida pela VFM. Foi benéfica sua introdução à dieta, a fim de reduzir o risco cardiovascular em idosos portadores de obesidade ou sobrepeso.

Descritores: inflamação; endotélio vascular; ácidos graxos insaturados; espessura íntima-média carotídea; idoso; obesidade; aterosclerose; rigidez vascular.

ABSTRACT

Oliveira PA. ***Inflammatory indicators, endothelial function and other markers of cardiac risk in overweight and obese elderly patients: response to supplementation with olive oil, linseed oil and sunflower oil [Thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo 2016.***

Obesity is a chronic disease with complications for which treatment and prevention are sought. Visceral fat is an endocrine organ of hormonal storage and a producer of inflammatory adipokines, leading to chronic inflammation in the obese person, which in turn is one of the characteristics of atherogenesis and aging. Increased levels of multifunctional cytokines, interleukin-6 and tumor necrosis factor-α are associated with morbidity and mortality in the elderly, and in the pathogenesis of atherosclerosis.

Currently, food worldwide is characterized by increased consumption of saturated and trans fats, as well as reduced consumption of omega-3 fatty acids. Imbalance in the omega-6/omega-3 ratio provides an environment of chronic inflammation, and the initial stimulus for degenerative diseases. The substitution of saturated fats by polyunsaturated fatty acids, α-linolenic acid (ALA)- omega-3, and mono-unsaturated fatty acid (omega-9 fatty acids), seems to be associated with reduced risk of cardiovascular disease. Obtaining α-linolenic acid from vegetable sources is more financially accessible and widely available worldwide than omega-3 fatty acids from fish; both are sources of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid.

This study was designed to comparatively evaluate the effect of increased ALA consumption, derived from vegetables, on inflammatory indicators and the endothelial reactivity in obese or overweight elderly patients. Seventy nine patients were selected to receive daily doses of linseed oil, olive oil and sunflower oil for 12 consecutive weeks. Anthropometric, biochemical and endothelial reactivity measurements were performed before and after the intervention, without any changes in the participants' diet or in their medications, and no anthropometric changes were identified after the conclusion of the study. Improvement in some biochemical parameters were identified with linseed oil, which reduced the levels of C-reactive protein, C3, C4 and fibrinogen; with sunflower oil, which reduced levels of leptin, ApoB and also ApoB/ApoA1 ratio; and with the olive oil that improved the ApoB/ApoA1 ratio and the C4 levels. Carotid artery

thickness also showed a significant improvement with the three supplemented oils, and was more accentuated with linseed oil and olive oil. In addition, sunflower oil significantly improved the distensibility of the arterial wall and its flow-mediated dilatation (FMD), and olive oil showed a tendency for improvement in FMD.

We concluded that the supplementation of unsaturated fatty acids from the three vegetable oils attenuated the pro-inflammatory and prothrombotic conditions. An improvement in the profile of biochemical markers and statistically significant results was identified in markers of endothelial reactivity, such as reduction of carotid artery intima-media thickness, improvement of the arterial wall distensibility and the endothelial function measured by FMD. The introduction of unsaturated fatty acids in the diet was beneficial, in order to reduce cardiovascular risk in obese or overweight elderly.

Descriptors: inflammation; endothelium, vascular; fatty acids, unsaturated; carotid intima-media thickness; aged; obesity; atherosclerosis; vascular stiffness.

1. INTRODUÇÃO

Vivemos hoje com o aumento da incidência de obesidade aonde todos os países se vêm às voltas com a nova realidade de sua população, em busca de tratamento para esta doença crônica e suas complicações, mas acima de tudo, sua prevenção. A obesidade vem sendo constantemente estudada e a cada momento surgem novas formas de enxergá-la. As pesquisas por seu entendimento completo não cessam a fim de tentar dirimir seus efeitos deletérios nos inúmeros órgãos que atinge. É sabido que a obesidade está associada à resistência insulínica e ao risco aumentado de *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), doença metabólica mais frequente no mundo atualmente. Além disto, a obesidade está associada ao risco de morte prematura e elevada morbi mortalidade cardiovascular, principalmente em indivíduos com obesidade central, incluindo infarto, acidentes vasculares encefálicos e insuficiência cardíaca[1].

O tecido adiposo já foi visto como um órgão passivo para reserva do excesso de energia sob a forma de triglicérides, mas recentemente ficou claro que o adipócito regula ativamente as vias responsáveis pelo balanço energético. Esta função é controlada por uma complexa rede de hormônios e sinais neuronais[2]. A obesidade tem importante influência nas respostas metabólicas e hormonais, incluindo mudanças nos hormônios sexuais, inflamação e resistência insulínica. A gordura visceral é, cada vez mais, considerada um órgão endócrino onde são armazenados hormônios e são produzidas adipocinas inflamatórias, adiponectina regulatória e outras moléculas regulatórias como leptina, o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (*CART – Cocaine and amphetamine-regulated transcript* -- peptídeo envolvido na manutenção de funções neurofisiológicas como comportamento alimentar e sexual, memória, controle de estresse etc) e o fator nuclear κB, que desempenham papéis importantes na causa de doenças crônicas como DM2 e doença cardíaca[3]. A aterogênese por si só não é um processo passivo de depósito lipídico, mas na verdade um tipo específico de inflamação crônica sistêmica na qual mudanças agudas podem ter consequências importantes[4].

1.1 - Envelhecimento e obesidade

Devido ao aumento da obesidade na infância, a expectativa de vida nos Estados Unidos da América (EUA) irá, pela primeira vez em sua história recente, reduzir. A *American Heart Association* (AHA) reclassificou a obesidade como um fator de risco modificável maior para doença coronariana[5]**.** Sendo assim, encontramos uma população em alto risco frente à associação de obesidade e envelhecimento, as características pró-inflamatórias destas duas entidades e o desenvolvimento de doenças crônicas, principalmente a aterosclerose**.**

Paralelamente à crescente frequência de obesidade, vemos o envelhecimento da população mundial com o aumento da expectativa de vida e consequentemente, uma maior concentração desta faixa etária nas pirâmides etárias de todos os países. O envelhecimento é um complexo processo fisiológico, que caracteristicamente, traz diferenças importantes no funcionamento do organismo. Órgãos e tecidos perdem sua integridade estrutural levando ao aumento da prevalência de doenças relacionadas ao envelhecimento. Inflamação sistêmica crônica é um problema comum ao envelhecimento e é responsável por 7 de 10 mortes em idosos, resultando em mais de 1.7 milhões de mortes por ano e contabiliza mais de 75% dos 2 trilhões de dólares gastos em saúde por ano nos EUA. Os níveis de citocinas inflamatórias como interleucina (IL)-6 e fator de necrose tumoral-alfa (FNT-α) estão elevados 2 a 4 vezes nos idosos quando comparados à população jovem, mesmo na ausência de doença crônica. Estas citocinas multifuncionais têm sido associadas à morbidade e mortalidade em idosos e há evidências suportando o papel direto do FNT-α na patogênese da aterosclerose, além do DM2 e da Doença de Alzheimer. Altos níveis de IL-6 podem também ser um fator de risco para complicações tromboembólicas. Sendo assim, envelhecer está associado diretamente à inflamação crônica e com o consequente aumento do risco de desenvolver doenças degenerativas. Em idosos, mesmo saudáveis, altos níveis de citocinas inflamatórias circulando são preditores de mortalidade[6].

Analisando melhor a inflamação no idoso, já está bem documentada a deterioração adaptativa do sistema imune dos linfócitos B e T, no entanto os efeitos na resposta imune mediada por macrófagos têm sido sub-investigados como por exemplo a polarização macrofágica. Os macrófagos isolados de indivíduos e ratos idosos apresentam funções reduzidas, variando de uma resposta defeituosa na defesa imune

precoce até uma redução da eficiência em desenvolver reações imunes específicas. Os macrófagos funcionam como controladores do sistema imune e mantém o balanço entre as atividades pró e antiinflamatórias. Podem se desenvolver em distintos subgrupos com fenótipos inflamatórios polarizados: polarização clássica (M1) induzida por citocinas do T *helper* 1 (Th1) com a ativação de macrófagos em potentes células pró-inflamatórias caracterizadas pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e citocinas pró-inflamatórias, como FNT-α (fator de necrose tumoral alfa) e interleucina-6 (IL-6). E o perfil de polarização alternativa (M2) induzida por citocinas do T *helper* 2 (Th2), caracterizada pela secreção de citocinas antiinflamatórias, incluindo IL-10. Tem sido bem documentado que células Th1 estão aumentadas com a idade, diferente das Th2, e a relação Th1/Th2 aumenta com o envelhecimento. Esta percentagem alterada contribui para a mudança de polarização do macrófago em direção ao fenótipo M1 classicamente ativado (figura 1), o que em parte explica os eventos inflamatórios crônicos observados no envelhecimento[6].

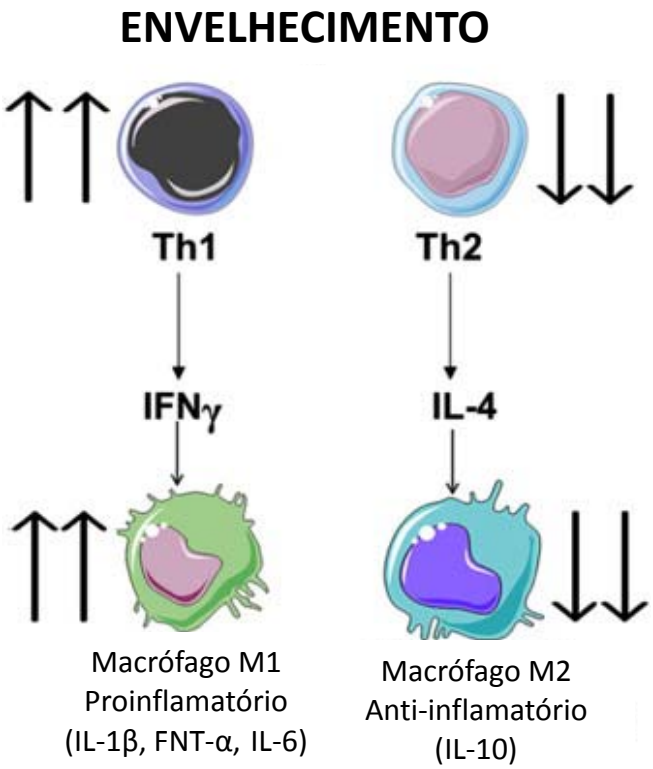

FIGURA 1: Modificação da polarização dos macrófagos M1 e M2 com o envelhecimento.
No envelhecimento, citocinas pró-inflamatórias do macrófago M1 estão aumentadas devido a inversão da relação Th1/Th2; o envelhecimento modifica a polarização macrofágica para o fenótipo M1. Adaptado de *Abdelmagid SM et al*, 2014

A própria aterosclerose é uma desordem inflamatória crônica caracterizada pelo acúmulo macrofágico de colesterol e formação de células de espuma na íntima arterial. Ambos os macrófagos M1 e M2-polarizados estão comprovadamente presentes nas placas ateroscleróticas e uma troca progressiva de M2 por M1 tem sido recentemente documentada durante o desenvolvimento da lesão aterosclerótica[7].

Mesmo sem falarmos da inflamação, as alterações no sistema vascular relacionadas ao envelhecimento fisiológico incluem dilatação luminal, espessamento da intima e da media, rigidez vascular e disfunção endotelial e calcificação. Alterações estas que ocorrem inclusive em idosos saudáveis levando a um aumento da rigidez e da espessura de grandes artérias (medido por velocimetria da onda de pulso), disfunção endotelial e subsequente aumento da pressão sistólica e de pulso. Estas características precedem e aumentam o risco de desenvolver aterosclerose. Espessamento da íntima é o passo fundamental para a formação da aterosclerose, exibindo concentrações aumentadas de fator de transformação de crescimento β (TGF-β – *transforming growth factor*) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1 - *Intercellular adhesion molecule-1*). Ambos envolvidos no remodelamento vascular, aumento da fibronectina arterial e do colágeno e na redução da atividade do óxido nítrico (ON) derivado do endotélio que originalmente tem efeitos vasodilatadores[8].

O tecido adiposo está localizado em diversos sítios anatômicos, sendo chamado como "órgão adiposo" por *Cinti et al*, com diferentes características celulares[9]. Composto por dois compartimentos principais: subcutâneo e por diversos depósitos viscerais, além de depósitos adiposos especializados como linfonodos, adipócitos mamários e células-mãe da medula óssea. Ressaltando-se a grande especialização e heterogeneidade de células adiposas dependendo da localização do tecido. Sua composição é de dois citotipos funcionalmente distintos, o tecido adiposo marrom (TAM) e o tecido adiposo branco (TAB). Este último com atribuições endócrinas, sendo consolidado não só como um mero estocador de energia, protetor mecânico e/ou regulador da temperatura corporal, mas como um órgão dinâmico envolvido em uma variada gama de processos metabólicos e fisiológicos. Classificado atualmente como um órgão secretor, produz e libera vários fatores peptídicos e não-peptídicos, sendo o foco das pesquisas atualmente, definir os principais mecanismos moleculares e

hormonais e sua inter-relação com o sistema nervoso central, compreendendo assim a regulação entre o consumo e o gasto energético[10].

Cada adipócito produz uma pequena quantidade de substâncias, mas considerando sua extensão dentro do corpo humano, o *pool* desses fatores produz um grande impacto nas funções corporais. Estas substâncias, conhecidas como adipocinas, já foram consideradas como citocinas (proteínas solúveis sintetizadas por células imunes ou não, mediadoras da comunicação intracelular pela transmissão de informações às células-alvo via interações com receptores específicos), mas se referem a proteínas secretadas (e sintetizadas) pelo tecido adiposo, podendo ser uma citocina ou não (figura 2). As adipocinas, então, são diversificadas em termos de estrutura protéica e função fisiológica, incluindo citocinas clássicas, fatores de crescimento e proteínas sistêmicas complementares, bem como proteínas envolvidas na regulação da pressão arterial, homeostase vascular, metabolismo lipídico, glicídico e angiogênese, sendo catalogadas mais de 50 diferentes moléculas. As primeiras identificadas foram a lipase protéica e a adipisina, mas o grande avanço se deu com a descoberta da leptina, que junto com a IL-6, FNT-α e a adiponectina, se destacam por estarem relacionadas a processos inflamatórios[10].

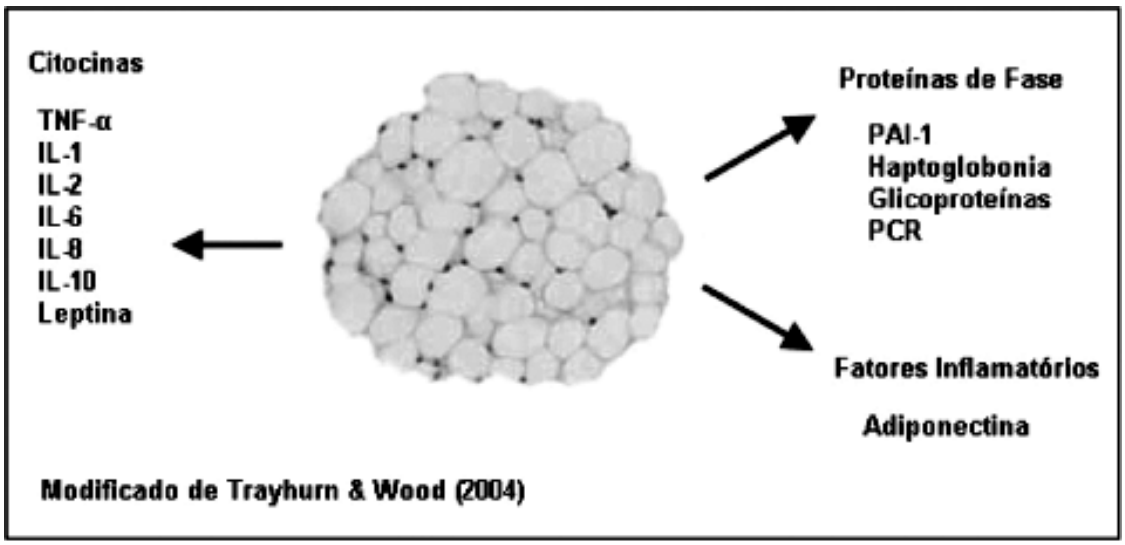

FIGURA 2: Marcadores inflamatórios e proteínas de fase aguda secretadas pelo tecido adiposo FNT-α: fator de necrose tumoral-α; IL: interleucina; PAI-1: fator de ativação do plasminogênio; PCR: proteína C reativa. Adaptado de Prado et al, 2009

Assim, a obesidade é considerada uma doença inflamatória pelo fato dos níveis circulantes de citocinas e proteínas de fase aguda associadas a inflamação apresentarem-

se elevados. Existem evidências demonstrando que o estado inflamatório pode ser devido a resistência insulínica e outras desordens também associadas à obesidade como hiperlipidemia e síndrome metabólica, acreditando-se assim que a inflamação seja uma consequência da obesidade. Mais recentemente, foi sugerido por *Das et al* que a obesidade é de fato o resultado de uma doença inflamatória[11]. Portanto, qual é a origem dos marcadores inflamatórios na obesidade? Órgãos como o fígado e células imunes? O TAB secreta fatores que estimulam a produção hepática destes marcadores inflamatórios? Ou os adipócitos são a fonte imediata de muitos destes marcadores? Muito provavelmente a melhor hipótese é que exista uma combinação destes três fatores[10].

Quanto maior a massa de tecido adiposo, maior a associação com alterações na produção de adipocina como superexpressão de FNT-α, IL-6, inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1 - *plasminogen activator inhibitor-1*), e subexpressão de adiponectina. A condição pró-inflamatória associada com estas alterações sugere ligação entre resistência à insulina e disfunção endotelial no estágio inicial do processo de aterosclerose em indivíduos obesos e em pacientes com DM2. Há evidências quanto a regulação da função endotelial pela insulina e adipocinas, visto que a redução da massa de tecido adiposo através da redução de peso em associação com exercício, reduz FNT-alfa, IL-6 e PAI-1, aumenta adiponectina e está associada a melhora na sensibilidade à insulina e função endotelial.

1.2 - Adipocinas

Leptina

Descoberta em 1997, caracteriza-se por um hormônio polipetídeo de 167 aminoácidos. Atua como um fator sinalizador entre o tecido adiposo e o sistema nervoso central, regulando a ingestão alimentar, o gasto energético e, consequentemente, a massa corporal. Entretanto, pode desenvolver outras funções fisiológicas, não sendo restrita ao apetite e ingestão de alimentos. Uma molécula pleiotrópica com ampla variedade de ações biológicas, mediadas por seis diferentes receptores na hematopoiese, atividade gastrointestinal, transporte de placenta entre outros. Destacam-se atualmente, as descobertas de sua influência sobre o sistema imune por possuir efeitos específicos na função dos linfócitos T, através da regulação da proliferação de células envolvidas na resposta imune, tanto inata quanto adquirida. Suas atuações, portanto, englobam função

reprodutora, regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, metabolismo da insulina e glicose, lipólise, atividade do sistema nervoso simpático, resposta imune, hematopoiese e angiogênese[12].

Leptina pode aumentar a agregação plaquetária e trombose arterial, promover angiogênese, prejudicar a distensibilidade arterial e induzir proliferação e migração de células do músculo liso vascular (VSMC - *vascular smooth muscle cells*). Tendo em vista a trombogenicidade induzida pela leptina entre homens e mulheres obesos, o aumento dos seus níveis estão relacionados a PAI-1 (ambos os sexos) e fator de von Willebrand (FVW) (apenas em homens), independentemente da adiposidade, resistência insulínica e quantidade de gordura visceral. Além destes mecanismos, a leptina parece aumentar a calcificação de células vasculares, fazendo da parede arterial seu alvo[13].

Adiponectina

É o mais abundante fator produzido exclusivamente pelo tecido adiposo e está envolvida na resposta inflamatória e regulação do balanço energético, desenvolvendo um papel anorexígeno e anti-inflamatório. Também aumenta a sensibilidade a insulina e inibe a inflamação vascular. Na circulação, assume duas formas diferentes, um hexomero de baixo peso molecular e um hexomero de alto peso molecular. Esta última, é mais abundante intracelular e a de baixo peso predomina na circulação. Apresentam ações específicas para cada tecido de acordo com sua isoforma e com o receptor ao qual se ligam. A resposta anti-inflamatória da adiponectina parece ser mediada pelas concentrações de outras citocinas pro-inflamatórias como a IL-6, o FNT-α e a proteína C reativa ultrassensível (PCRus), podendo ter efeitos ambiguos, pois a de alto peso molecular pode exercer efeito pró-inflamatório por induzir a síntese de IL-6, enquanto que a de baixo peso molecular atenua a síntese de IL-6 e potencializa a síntese de IL-1RA (receptor antagonista da interleucina 1), favorecendo a ação anti-inflamatória. Ao contrário da grande maioria das adipocinas, sua concentração plasmática apresenta-se menor em obesos do que em eutróficos e aumenta conforme há redução da massa corporal. Os efeitos metabólicos da adiponectina incluem aumento na sensibilidade à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo, mediado por aumentada oxidação de gordura nos tecidos. Na vasculatura, seus níveis estão fortemente ligados à função endotelial. Altera os efeitos vasculares adversos das citocinas tais como FNT-α, suprime a geração de ânion superóxido na célula endotelial eliciado por agentes como a

lipoproteína de baixa densidade (LDL-oxidada – *low density lipoprotein*) e aumenta a geração de ON endotelial. Estudos mostram que os níveis de adiponectina são menores em portadores de doença arterial coronariana, tanto que seu aumento na parede vascular lesada faz parte de uma resposta protetora contra o processo celular inflamatório, demonstrando que a adiponectina pode atenuar a proliferação de músculo liso vascular e proteger contra estenose vascular[12].

FNT-α

É uma citocina pró-inflamatória que pode inibir a proliferação de células tumorais e promover apoptose celular. Sob condições fisiológicas, o tecido adiposo produz quantidades relativamente grandes de FNT-α, sendo assim, considerado uma adipocina. Uma pequena parte se origina no próprio adipócito e a maior parte pode ser secretada por macrófagos infiltrados no tecido, fato importante na obesidade, pois age como um potente regulador interno do tecido adiposo, com ações autócrina e parácrina. Dentro do TAB, desenvolve papel fundamental na produção de várias citocinas e adipocinas que irão regular a síntese de IL-6, proteínas de fase aguda e haptoglobina. Nesse sentido, a relação desta adipocina com a obesidade tem sido alvo de estudo, correlacionando-a com o índice de massa corpórea (IMC), porcentagem de gordura corporal e hiperinsulinemia, estando sua concentração inversamente proporcional a massa corporal. Seu excesso está envolvido no desenvolvimento da resistência à insulina e os mecanismos para este efeito são aumento da liberação de ácidos graxos pelos adipócitos, diminuição da síntese e secreção da adiponectina e diminuição da habilidade da insulina em translocar o GLUT 4 (transportador de glicose tipo 4) via fosforilação do substrato receptor (IRS-1 – *insulin receptor substrate* 1). Além disso, parece que o FNT-α tem papel importante na regulação da concentração de leptina, mediando a hiperleptinemia na obesidade[10].

Resistina

É uma proteína pertencente à família de proteínas secretórias ricas em cisteína denominada "encontradas em locais de inflamação" (*FIZZ*) e foi assim denominada por sua capacidade de promover resistência à insulina. É um hormônio secretado pelo TAB e é induzido durante a adipogênese. Sua fonte em humanos não é o adipócito, mas os macrófagos, o que sugere um importante papel inflamatório. Seus efeitos no

metabolismo da glicose são antagônicos àqueles da insulina. Ao contrário da adiponectina, a resistina aumenta a expressão de moléculas de aderência – molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1 - vascular cell adhesion molecule 1) e ICAM-1 – e faz *up-regulation* da proteína quimiotáxica para monócitos (MCP-1 - *Monocyte chemoattractant protein-1*), promovendo ativação da célula endotelial via liberação de endotelina 1 (ET-1), sugerindo sua relação na fisiopatologia da doença vascular e da síndrome metabólica[14].

Portanto, a obesidade e o excesso de tecido adiposo caracterizam um aumento da produção de adipocinas que promovem impacto em diversas funções corporais, no controle da ingestão alimentar e balanço energético, no sistema imune, na sensibilidade à insulina, na angiogênese, na pressão arterial, metabolismo lipídico e na homeostase corporal. Todas estas situações estão fortemente correlacionadas com doenças cardiovasculares (DCV), comprovado pelo estudo de *Ziccardi et col* que demonstraram que a redução de 10% da massa corporal em mulheres obesas por meio de um tratamento multidisciplinar, foi associado a concentrações menores de citocinas pro-inflamatórias, aumento de adiponectina e moléculas de adesão vascular e aumento da resposta vascular, concluindo que a redução da massa corporal é um método seguro para diminuir o estado inflamatório e modular a disfunção endotelial[15].

1.3 - Resistência Insulínica e Aterosclerose

O acúmulo de gordura na região abdominal aumenta o risco cardiovascular independentemente e a resistência a insulina pode ser um dos fatores mais importantes para esta associação. No tecido cardiovascular a resistência a insulina leva a inibição da via metabólica e a hiperestimulação da via do fator de crescimento (figura 3)[16]. A via metabólica, fosfatidilinositol 3-quinase, ocorre após a ligação da insulina com seu receptor. É crítica para a captação de glicose nos tecidos-alvo dependentes de insulina e regula a produção de ON mediada por insulina. Assim, sua inibição define a resistência insulínica e leva ao defeito na captação de glicose e à piora da vasodilatação do endotélio estimulada pela insulina. A via da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK - *mitogen-activated protein kinases*) é a via das ações proliferativas da insulina, mediando o crescimento celular e a capacidade migratória das células endoteliais, além de mediar a expressão do PAI-1, fator pró-trombótico e pró-fibrótico. Estando esta hiperestimulada, ocorrerá crescimento e migração celular, bem como respostas pró-

inflamatórias e pró-trombóticas, sendo considerada uma via aterogênica. Concluindo, o estado de hiperinsulinemia pode ser, por si só, aterogênico[12].

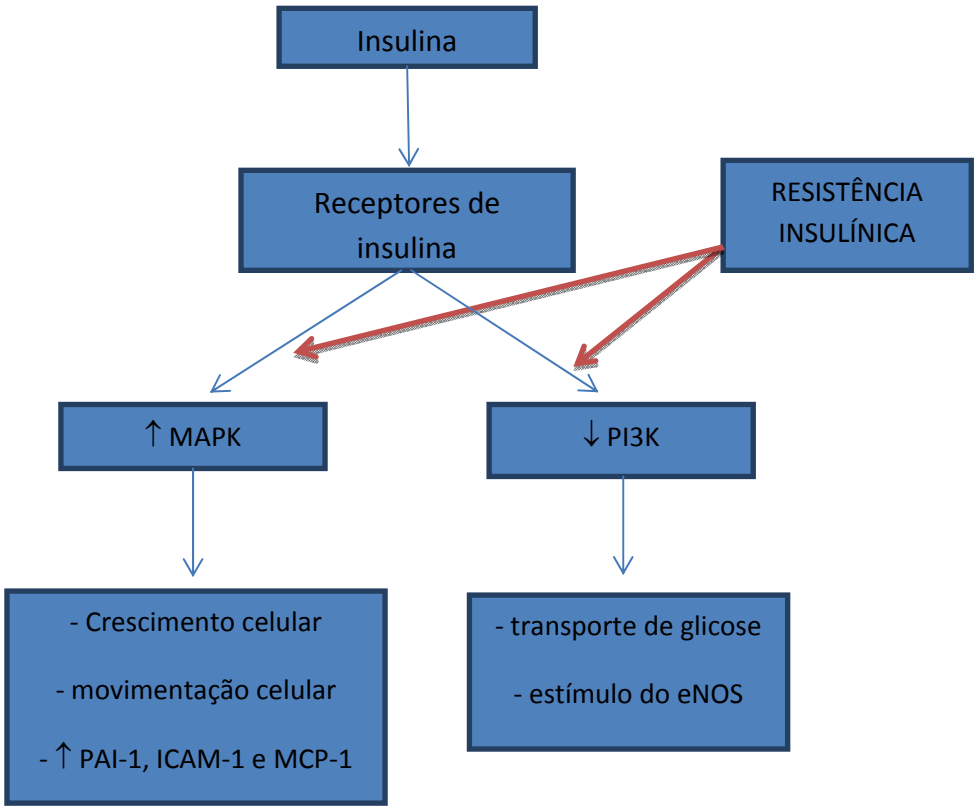

FIGURA 3: Via da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK - *mitogen-activated protein kinases*) nas células endoteliais e vasculares do músculo liso. Adaptado de Hsueh et al, 2003
eNOS: sintase endotelial do óxido nítrico (*endothelial nitric oxide synthase*); ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1 (*intra-cellular adhesion molecule-1)*; MCP-1: proteína quimiotáxica para monócitos *(monocyte chemoattractant protein-1*); PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio *(plasminogen activator inhibitor-1*); PI3-K: fosfatidilinositol 3-quinases (p*hosphoinositide 3-kinase*)

No fígado, a insulina tem um efeito indireto, pois ao suprimir a lipólise no tecido adiposo, libera menos ácidos graxos livres (AGL) para o fígado, com menos glicogenólise e menos resistência a insulina hepática. O tecido adiposo armazena AGL e triglicerídeos e também libera AGL além das adipocinas (leptina, adiponectina, resistina, PAI-1 e FNT-α). A resistência à insulina nas células adiposas leva ao aumento da lipólise e a liberação de AGL. Já no músculo esquelético, os ácidos graxos podem inibir a sinalização ao receptor da insulina, contribuindo com a resistência à insulina. O GLUT4 é o passo limitador da taxa de síntese de glicogênio estimulada pela insulina.

Aumentos plasmáticos de AGL podem inibir o transporte de glicose e a atividade da hexoquinase, demonstrando que podem reduzir a sinalização através do receptor de insulina, também levando a resistência insulínica.

Sendo assim, a resistência à insulina leva ao aumento da lipólise e liberação de AGL. Este aumentado, estimula a secreção de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL – *very low density lipoprotein*) pelo fígado. O aumento de VLDL na circulação contribui para seu acúmulo nas paredes dos vasos sanguíneos na aterosclerose. De fato, este aumento dos níveis de VLDL plasmáticos podem resultar em maiores níveis de partículas densas de LDL e consequentemente, trazer grandes quantidades de colesterol à parede do vaso, onde se une aos proteoglicanos dentro da matriz extracelular, podendo então contribuir com a formação da placa[17].

Lipoproteínas ligadas a DCV como a relação aumentada de apolipoproteína (Apo) B/A1, pequenas partículas densas de LDL e baixos níveis de lipoproteina de alta densidade (HDL – *high density lipoprotein*) colesterol são preditivas para tal desfecho em pessoas com obesidade abdominal. A resistência insulínica causa uma composição e distribuição de LDL diferenciada na dislipidemia. Ocorre uma atividade aumentada da lipase hepática que lipolisa LDLs ricas em triacilglicerol, formando mais pequenas partículas densas de LDL, que são fagocitadas por receptores clarificadores de macrófagos, mais do que o receptor normal de LDL, induzindo a aterosclerose. Portanto, a resistência insulínica da obesidade abdominal aumenta substancialmente o risco para doença coronariana[13].

1.4 - Inflamação e endotélio

Evidências sugerem que inflamação crônica de baixa intensidade promove uma maior suscetibilidade a desenvolver doenças crônicas, especialmente DCV. Primeiro proposto por *Harman* em 1956, a teoria do envelhecimento do radical livre postula que a produção intracelular de espécies reativas do oxigênio (ROS) é o maior determinante da vida útil. Atualmente, estresse oxidativo e mecanismos de defesa antioxidante prejudicados são tidos como contribuidores chave para o processo de envelhecimento cardiovascular, associado a reduzida biodisponibilidade do ON endotelial. As consequências no miocárdio senescente são aumento da oxidação e nitração protéica, biodisponibilidade reduzida, formação de lipofuscina, ativação da resposta inflamatória,

resposta aumentada ao estresse antioxidativo, apoptose e estresse do retículo endoplasmático. O envelhecimento leva à redução na produção de ON e consequentemente, à vasodilatação endotelial prejudicada, sendo esta uma manifestação precoce do envelhecimento arterial. Novas evidências demonstram uma estreita ligação entre oxidação e inflamação já que a produção excessiva ou descontrolada de radicais livres pode induzir uma resposta inflamatória, assim como radicais livres são efetivos na inflamação. Isto ocorre por uma redução global da capacidade de lidar com uma variedade de estressores, bem como um concomitante aumento progressivo do status pró-inflamatório. Múltiplas evidências agora apontam a inflamação como processo regulatório chave ligando vários fatores de risco para aterosclerose e suas complicações com biologia arterial alterada. Os processos moleculares levam a evolução da lesão de uma placa rica em lipídeos para uma placa fibrótica e depois calcificada, que pode levar a estenose. Assim, enfatiza-se que a disfunção endotelial é um marcador precoce para doença aterosclerótica, sendo considerada um fator preditor independente. Marcadores inflamatórios como proteína C reativa (PCR) aumentada, estão associados ao aumento da rigidez arterial[8].

De fato, há dois potenciais mecanismos que levam a inflamação à lesão vascular: a produção desregulada de pró e anti-citocinas inflamatórias e os níveis elevados de estresse oxidativo sistêmico mediados pelo aumento das enzimas oxidativas e a redução de enzimas anti-oxidativas, levando ao desequilíbrio do sistema. Assim, citocinas pró-inflamatórias derivadas da obesidade e ROS podem gerar resistência insulínica periférica, mas também diretamente impactar no endotélio, causando disfunção endotelial e iniciando a cascata da aterosclerose[6,8]. A inflamação por si só é um processo de cura do vaso onde há ligação, penetração e proliferação de monócitos/macrófagos na parede do vaso a fim de destruir e remover o estímulo deletério. O dano inflamatório inicial pode ser, por exemplo, a resistência à insulina que está associada a elevados níveis de marcadores inflamatórios. No entanto, quando este quadro está associado a um estímulo secundário como a hiperlipidemia, a resposta imunológica pode ficar aumentada ou crônica e o processo de aterosclerose é iniciado.

Em associação, gordura visceral e resistência a insulina aumentam o risco cardiovascular pelos fatores de risco clássicos (dislipidemia, hipertensão e dismetabolismo glicídico) e por mecanismos menos convencionais, secretados pelos adipócitos e macrófagos infiltrando o tecido adiposo**, (**órgão endócrino ativo como já

descrito anteriormente), incluindo adipocinas (leptina e adiponectina), citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e proteína C-reativa) e fatores pró-coagulantes como o Inibidor da Ativação do Plasminogênio-1 (PAI-1), que juntos levam ao aumento do estresse oxidativo e disfunção endotelial, finalmente promovendo aterosclerose[13].

O acesso à biologia endotelial é multifacetado devido às diversas funções fisiológicas e nenhuma ferramenta clínica exclusiva. Os produtos derivados do endotélio circulantes no plasma como PAI-1, VCAM-1 e ICAM-1, E-selectina, VWF têm sido usados como marcadores de atividade endotelial e correlacionados à medida da doença aterosclerótica, porém muitos destes marcadores não são específicos do endotélio vascular. Assim, foram desenvolvidas técnicas como ultrassom vascular de alta resolução para avaliar a dilatação fluxo-mediada dependente do endotélio na artéria braquial. A ação alterada do óxido nítrico derivado do endotélio (EDNO - *endothelium-derived nitric oxide*) na circulação braquial é um marcador substituto para disfunção mais relevante na circulação coronariana, servindo como um barômetro da saúde vascular em geral, e fornece informações prognósticas independentes no que diz respeito ao risco cardiovascular. Outras técnicas não invasivas estão sob investigação como medida da rigidez arterial pela onda de pulso e tonometria da amplitude de pulso, biomarcadores da função endotelial, passando por rigidez arterial com o índice de aumento (AIx = uma medida de rigidez arterial que prediz independentemente desfechos cardiovasculares), velocidade de onda de pulso da carótida e da braquial (VOP), índice cardio-tornozelo (CAVI), dilatação fluxo-mediada (FMD), EndoPat (um teste funcional para avaliar a saúde vascular de artérias grandes e pequenas; mede mudanças no volume arterial sanguíneo que resultam em um valor (EndoScore) e de acordo com a American Heart Association, prediz doença aterosclerótica e DCV subjacentes), até o ultrassom para análise de aterosclerose de carótidas; todos métodos de avaliação descritos na literatura para função endotelial[18].

Função endotelial medida pela vasodilatação fluxo-mediada (VFM) e espessura da íntima-média da carótida (CIMT - *carotid intima-media thickness*) são marcadores estabelecidos de aterosclerose subclínica e podem ser acessados não-invasivamente usando ultrassom de alta resolução.

A VFM pode ser medida no antebraço após estímulo da artéria braquial com um manguito acima da fossa flexora do braço, que insuflado por 5 minutos e desinsuflado, promove hiperemia reativa e estresse de cisalhamento, levando a vasodilatação

endotélio-dependente. É avaliado o diâmetro da artéria braquial por imagem longitudinal do vaso, calculando-se a distância entre a íntima proximal e distal. Portanto, VFM é a resposta diastólica à hiperemia reativa (isquemia mecânica e posterior vasodilatação autorregulatória) e fornece informações que predizem a extensão e severidade da aterosclerose coronariana, sendo um bom marcador da função endotelial e com implicações prognósticas similares às medidas invasivas da circulação coronariana[19,20]. Uma técnica que pode ser aplicada a grandes estudos populacionais, podendo funcionar como um teste de screening para o diagnóstico precoce da doença aterosclerótica coronariana, uma vez que a disfunção endotelial pode predizer doença vascular aterosclerótica, independente dos fatores de risco cardiovasculares mais frequentes[21].

CIMT é avaliada com o mesmo aparelho, utilizando-se um transdutor linear de alta frequência. É analisada a espessura medio-intimal na parede posterior da carótida comum onde são obtidas as médias das medidas. A medida da CIMT tem boa correlação com os achados histológicos de lesão aterosclerótica da aorta, com os achados de ultrassom e os achados em coronárias, também sendo utilizada preferencialmente por sua localizaçao, pequena mobilidade e praticidade de acesso. A distribuição dos valores da CIMT é muito heterogêna para definir um valor universal ou regional populacional, mas é sabido que aumenta progressivamente com o envelhecimento[22]. Para a população brasileira, um trabalho realizado com 210 individuos aparentemente saudáveis no InCor, divididos em grupos de faixa etária, encontrou-se o valor médio de 0,71 mm (DP ± 1,2 mm) para pessoas acima de 61 anos[23]. Já o limite superior normal descrito como fator de risco pelo Guideline Europeu é de 0,9 mm e pela Associação Brasileira de Cardiologia de 1,0 mm[24]. A CIMT já foi demonstrada como estando desproporcionalmente aumentada em pacientes com obesidade[25,26] e é um marcardor precoce bem validado para eventos futuros de doença cardíaca isquêmica[27], classificada como fator preditor independente usado para calcular a taxa de risco para eventos CV de Framingham[28].

1.5 - Alimentação, Inflamação e Aterosclerose

A rápida mudança em nossa dieta, particularmente nos últimos 150 anos, é forte promotora de doenças crônicas como aterosclerose, hipertensão essencial, obesidade, diabetes, artrites e outras doenças autoimunes, muitos cânceres, especialmente de

mama, cólon e próstata. As mudanças mais impactantes são notadas nos tipos de alimentos consumidos, bem como na quantidade de ácidos graxos essenciais e no conteúdo de antioxidantes da dieta. Somado à dieta, estilo de vida sedentário e exposição a substâncias nocivas, interagem com processos controlados geneticamente levando a doenças crônicas[4].

A dieta das sociedades industrializadas é caracterizada por (1) aumento na ingesta energética e redução no gasto energético, (2) aumento do consumo de gordura saturada, ácidos graxos ômega-6 e gorduras trans e redução do consumo de ácidos graxos ômega-3, (3) redução dos carboidratos complexos e fibras, (4) aumento dos cereais e redução de frutas e legumes, e (5) redução do consumo de proteína, antioxidantes e cálcio[4]. O aumento dos ácidos graxos trans é deletério para a saúde pois inibe a incorporação de outros ácidos graxos à membrana celular, reduz HDL, aumenta LDL, aumenta a agregação plaquetária e os níveis de Apo A entre outros efeitos colaterais. Mas o desequilíbrio no consumo entre ômega-6 e ômega-3 tem chamado atenção nos últimos estudos por estimular um ambiente de inflamação crônica e consequentemente, ser o estímulo inicial para muitas doenças crônicas.

Os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA – *monounsaturated fatty acids*) e os poliinsaturados (PUFA – *polyunsaturated fatty acids*), são assim chamados de acordo com o número de cadeias carbônicas: cadeia longa (>12), cadeia intermediária (>6 e <12) e cadeia curta (>2 e <6); e o número de duplas ligações entre os carbonos: saturados, com apenas ligações simples entre os carbonos; monoinsaturados, com apenas uma dupla ligação entre os carbonos; e poli-insaturados, com várias duplas ligações entre os carbonos. O PUFA ômega-3 é representado por símbolos numéricos, como C18:3, sendo que o número justaposto ao símbolo C indica o número de átomos de carbono, e o segundo número, a quantidade de dupla ligações. A posição da ligação dupla na cadeia hidrocarbonada pode ser por letras gregas minúsculas, sendo alfa no primeiro carbono adjacente ao grupo carboxila, beta no segundo carbono e ômega no último carbono. O ômega-3 é um tipo de gordura poliinsaturada encontrada principalmente em peixes marinhos de água fria e em algumas sementes de plantas.

Ambos são essenciais porque humanos não o produzem e devem obtê-los a partir da dieta. Ômega-6 (18:2 n-6) é representado pelo ácido linoléico (LA – *linoleic acid*) e o ômega-3 pelo ácido alfa-linolênico (ALA – *alfa-linolenic acid*). LA é metabolizado em ácido araquidônico (AA) e ALA em ácido eicosapentaenóico (EPA –

eicosapentaenoic acid) e ácido docosahexaenóico (DHA – *docosahexaenoic acid*), porém neste metabolismo há competição entre ômega-6 e 3 pelas enzimas de dessaturação (figura 4)[29]. Assim, mesmo havendo uma preferência de ambas enzimas delta-5 e delta-6 dessaturase pelo ômega-3, o alto consumo de LA interfere na dessaturação e elongação de ALA, bem como os ácidos graxos trans interferem na dessaturação e elongação de ambos LA e ALA. Contudo, delta-6 dessaturase é o fator limitante pois há evidências de que está reduzida com o envelhecimento. Esta informação se faz importante ao fazer recomendações alimentares, já que esta enzima se encontra reduzida também em pacientes hipertensos e em alguns diabéticos. Uma relação balanceada de ácidos graxos ômega-6:ômega-3, portanto, é essencial na prevenção e no tratamento de várias doenças como doença arterial coronariana, entre muitas outras.

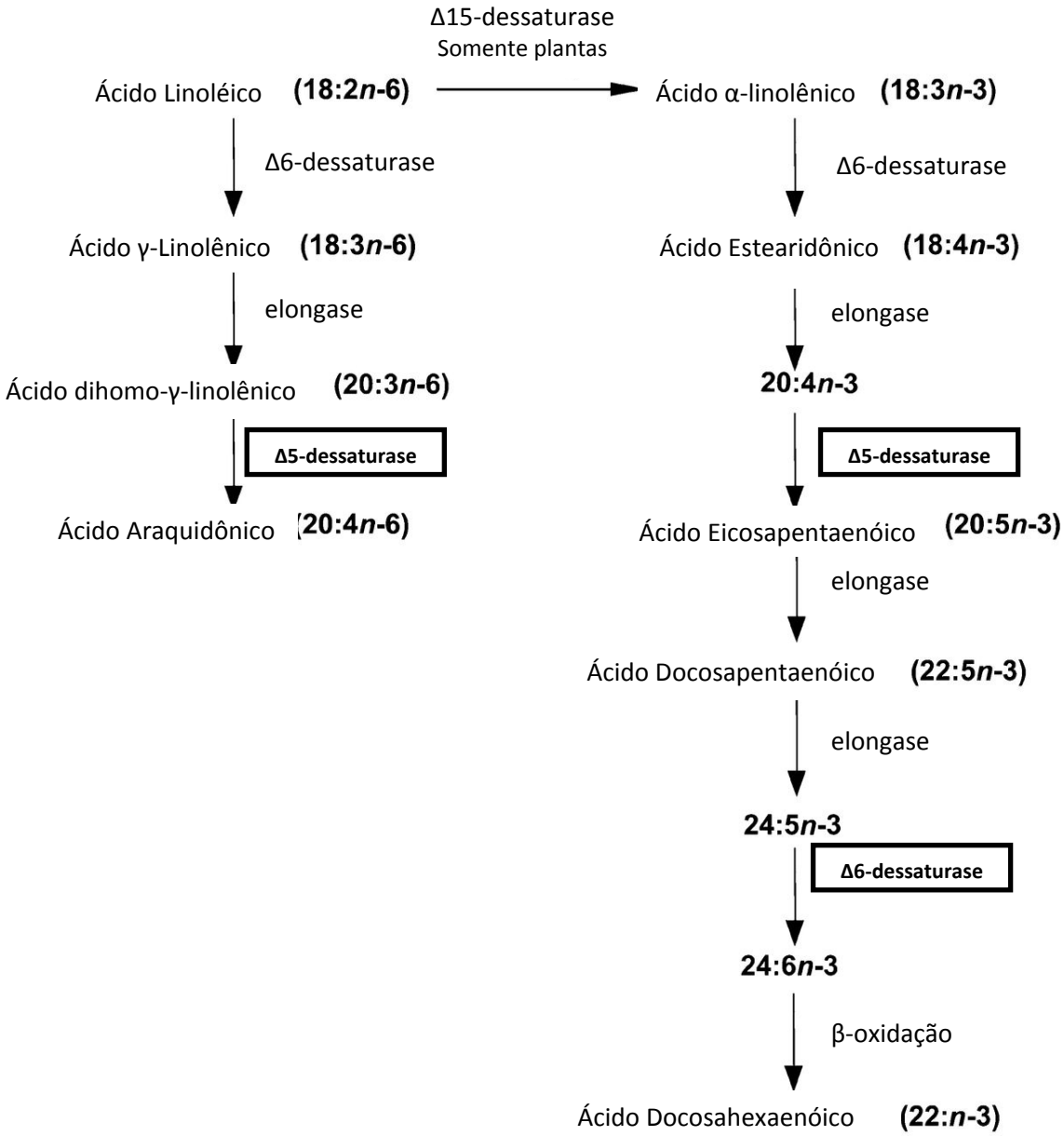

FIGURA 4: Via de conversão dos ácidos linoléico e alfa-linolênico em suas cadeias longas derivativas. Adaptado de *Calder et al*, 2004

AA e EPA são PUFAs que formam fosfolipídeos das membranas biológicas. EPA e DHA são encontrados em óleo de peixe, especialmente nos ricos em gordura e AA é encontrado predominantemente em fosfolipídeos de animais alimentados com grãos e ovos. Quando humanos ingerem peixe ou óleo de peixe, EPA e DHA da dieta parcialmente substituem os ácidos graxos ômega-6, especialmente AA nas membranas de provavelmente todas as células, mas especialmente nas membranas de plaquetas,

eritrócitos, neutrófilos, monócitos e células hepáticas. Devido ao aumento na quantidade de ômega-6 ingerido na dieta ocidental os produtos do metabolismo do eicosanóide do AA, especificamente prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, ácidos graxos hidroxi e lipocinas, são produzidos em grandes quantidades no lugar dos formados a partir do ômega-3, em especial EPA. Se estes metabólitos são formados em grandes quantidade, contribuem para a formação de trombos e ateromas, alterações alérgicas e inflamatórias e proliferação de células. Sendo assim, a dieta rica em ácidos graxos ômega-6 muda o estado fisiológico para outro que é protrombótico e proagregante, com aumento da viscosidade sanguínea, vasoespasmo e vasoconstricção e redução do tempo de sangramento. Este último também presente em pacientes com hipercolesterolemia, hiperlipoproteinemia, infarto do miocárdio, outras formas de doença aterosclerótica e diabetes (obesidade e hipertrigliceridemia). Já os eicosanóides derivados da família ômega-3 (EPA e DHA) competem com o AA pela ciclooxigenase (COX) suprimindo a formação dos mediadores pró-inflamatorios leucotrienos (LT) e tromboxanos (TX) e favorecendo a produção das séries com menor potencial inflamatório (Figura 5).

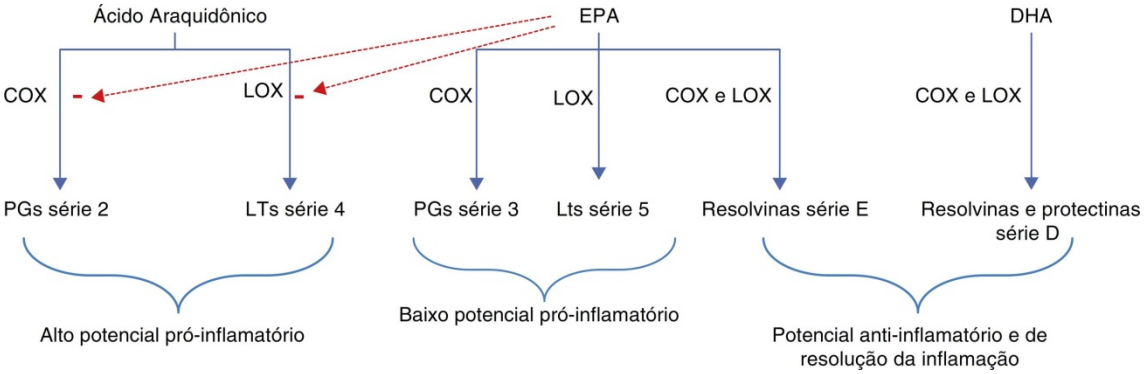

Figura **5**: Sínteses e ações dos mediadores lipídicos produzidos pelo AA, EPA e DHA.
AA: ácido araquidônico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; COX: ciclooxigenase; LOX: lipoxigenase; PG: prostaglandinas; LT: leucotrienos Adaptado de Calder et al., 2010.

Alguns óleos são ricos em precursores de PUFA ômega-3, tais como o ALA e outros são ricos em precursores do PUFA ômega-6, tais como LA. Nos mamíferos, ALA é convertido em EPA e DHA e LA em AA através das mesmas dessaturases e elongases, como descrito anteriormente[30,31]. Embora a taxa de conversão de ALA em EPA e DHA seja reduzida (7 a 9% e 0,5% respectivamente)[32,33], seu maior consumo

pode aumentar estas concentrações séricas e trazer suas propriedades protetoras cardiovasculares (CV) e anti-inflamatórias. O provável mecanismo anti-inflamatório do ALA é a redução de PUFAs oxidados, levando ao aumento da vasodilatação sistêmica, bem como redução da pressão arterial[34,35]. A substituição de gorduras saturadas por PUFA portanto, não só é necessária para equilibrar os mecanismos inflamatórios como está associada com a redução no risco de DCV[36].

Atualmente, a composição de ácidos graxos das dietas indica que os ácidos graxos saturados representam uma alta porcentagem do total de gorduras ingeridas, enquanto que a ingestão de PUFA está três vezes menor em comparação com a ingestão de saturados[37]. Há uma série de motivos para o baixo consumo de ômega-3, sendo a aversão ao sabor e a ingerir carne de peixe e o fato de muitos óleos vegetais com altos níveis de ômega-3 como óleo de linhaça por exemplo, serem pouco palatáveis e portanto pouco tolerados ou usados em quantidades desprezíveis.

O natural, sendo o Brasil um país com uma costa ampla com rios, lagos e mares, seria estimular a ingestão de peixes para melhorar a relação ômega-6/ômega-3, trazendo assim os benefícios deste balanço a toda a população. No Quadro 1 podemos ver as concentrações de DHA, EPA, DHA+EPA e a relação DHA/EPA contidas em algumas espécies consumidas[38]. Apesar de seu consumo representar quase metade da média mundial, o peixe ainda é um produto caro, sendo um dos principais motivos para ficar longe da mesa do brasileiro. Apesar disto e paralelamente ao potencial benefício cardiovascular do consumo de peixes, preocupações vêm aumentando em relação ao potencial prejuízo dos contaminadores presentes em algumas espécies de peixe, como metil mercúrio, dioxinas e bifenilpoliclorado (PCBs). Na maioria dos peixes a quantidade de mercúrio é muito baixa, sendo que a legislação brasileira considera seguro o consumo de 0,5μg/g para peixes não-predadores e 1,0μg/g para peixes piscívoros. Algumas espécies, porém, apresentam quantidades moderadas (atum, atum voador) ou grandes 1μg/g (peixe espada, tubarão, cavala, tucunaré, cação, pescada branca, tainha, garoupa, arenque e dourado são alguns exemplos)[39,40].

Peixe	DHA (g/100g)	EPA (g/100g)	DHA e EPA (g/100g)	DHA:EPA Relação
Atum (rabilo)	1.141	0.363	1.504	3.1:1.0
Atum light (enlatado em água)	0.224	0.047	0.207	4.8:1.0
Atum (albacora) Enlatado em lata)	0.629	0.233	0.862	2.7:1.0
Salmão (Atlântico, cativeiro)	1.457	0.690	2.147	2.1:1.0
Salmão (Atlântico, mar)	1.459	0.411	1.840	3.5:1.0
Salmão (Chinook)	0.727	1.010	1.737	1.0:1.4
Salmão (Sockeye)	0.700	0.530	1.230	1.3:1.0
Truta (cativeiro)	0.820	0.334	1.154	2.5:1.0
Bacalhau	0.154	0.004	0.158	38.5:1.0
Garoupa	0.213	0.035	0.248	6.1:1.0
Camarão	0.144	0.171	0.315	1.0:1.2

QUADRO 1: Conteúdo de DHA e EPA nos tipos de peixes consumidos. Adaptado de Lee HJ et al, 2008, p. 754 Abreviações: DHA, docosahexaenoico; EPA, eicosapentaenóico.

Na literatura há alguns indícios do efeito do ômega-3 proveniente do óleo de peixe na prevenção do desenvolvimento de falência cardíaca. Este mecanismo é incerto, mas pode estar relacionado ao efeito anti-inflamatório dos receptores ativados por proliferador de peroxissoma-gama (PPAR-γ - *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) no tecido adiposo, ativado pelo ômega-3, levando ao aumento da expressão, secreção e dos níveis plasmáticos da adiponectina, hormônio este com ação anti-inflamatória como já descrito acima; além de limitar a hipertrofia, o remodelamento e a disfunção contrátil do ventrículo esquerdo em resposta ao aumento da pressão arterial. Outras evidências sobre o ômega-3 são de reduzir o risco de doença coronariana, em doses farmacológicas (3,4g/dia), ser eficaz no tratamento da hipertrigliceridemia, reduzir arritmias e morte súbita por causas cardíacas[30,41]; redução do FNT-α, que está aumentado na insuficiência cardíaca; e está implicado no remodelamento e disfunção contrátil cardíacos, além de modificar a composição cardíaca de fosfolípides causando redução do ácido araquidônico, precursor da

prostaciclina e do tromboxano, aumentados na insuficiência cardíaca, exercendo efeitos diretos sobre o coração[38]. Outra evidência é da ação do ômega-3 nas membranas plaquetárias reduzindo sua agregação e a liberação de tromboxano e do FVW nas células endoteliais. O FVW media a adesão plaquetária ao endotélio vascular e o ômega-3 tem demonstrado reduzir seus níveis plasmáticos[42].

Comparado com os ácidos graxos ômega-3 dos peixes, o ALA das fontes vegetais é mais acessível financeiramente e amplamente disponível no mundo todo, com melhor potencial global em uma comparação entre as fontes de EPA e DHA. Além disto, saber se o ALA pode reduzir o risco de DCV é de considerável importância para a saúde pública[43]. O ALA de óleos vegetais como da semente de linhaça por exemplo, está relacionado a redução da doença coronariana[44].

Muitos estudos têm demonstrado que a aderência à dieta Mediterrânea reduz mortalidade por câncer e DCV na população grega e em outros países. As evidências sugerem que o MUFA (ácido oléico – ômega-9) é o componente principal para o papel protetor desta dieta. Acredita-se que o MUFA seja tão eficaz quanto o PUFA em reduzir colesterol total e LDL-colesterol ao substituirem as gorduras saturadas da dieta, baseado em recente revisão de meta-análises[44]. As modificações oxidativas do LDL são determinantes no desenvolvimento da aterosclerose, à medida que acelera a abosrção de LDL pelos macrófagos, que é o início da formação da estria gordurosa. Lipoproteínas ricas em MUFA após consumo prolongado de óleo de oliva, têm demonstrado ser menos susceptíveis ao ataque de radicais livres e à consequente oxidação, quando comparadas com as partículas enriquecidas com PUFA[45].

Baseados em toda esta discussão, questionamos a intervenção nutricional como parte do tratamento e da prevenção de doenças com componentes inflamatórios como o caso da aterosclerose. Como as composições dos óleos variam em relação a quantidade de MUFA e PUFA, utilizamos o óleo de oliva (ácido oléico (MUFA) representa 60 a 84% dos ácidos graxos presentes e 3 a 21% de LA)[45,46]; o óleo de linhaça (cerca de 75% PUFA contendo 53,5g de ALA e 12,7g de LA)[47]; e o óleo de girassol (cerca de 75% PUFA contendo 50 a 75g LA e <0,3g de ALA)[45] para comparar os efeitos anti-inflamatórios e no endotélio de cada um (quadro 2).

	PRINCIPAIS ACIDOS GRAXOS COMPONENTES (%)			ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS (%)	ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS (%)	
ÓLEO	OLÉICO (C18:1)	LA (C18:2)	ALA (C18:3)		MUFA	PUFA
OLIVA	75,2	7,1	0,7	18	66	16
LINHAÇA	20,6	13,2	53,9	9,5	19,9	68,6
GIRASSOL	32,2	55,7	0,6	11,6	23,1	65,3

QUADRO 2: Teor percentual médio de ácidos graxos presentes nos diferentes óleos vegetais Adaptado de: http://www.cnpso.embrapa.br/download/publicacao/documento_237.pdf Abreviações: LA: ácido linoléico; ALA: ácido alfa-linolênico; MUFA: ácido graxo monoinsaturado; PUFA: ácido graxo poliinsaturado

2. HIPÓTESES

1) A suplementação de ácidos graxos específicos é capaz de atenuar o quadro pró-inflamatório, pró-trombótico e dismetabólico acima declinado.

2) Tal suplementação influencia positivamente a reatividade endotelial e os indicadores morfo-funcionais arteriais

3. OBJETIVOS

1) Suplementar de forma controlada pacientes idosos com sobrepeso ou obesidade com preparado dietético de azeite de oliva ou óleo de linhaça ou óleo de girassol durante 12 semanas, observando sua tolerabilidade

2) Correlacionar prospectivamente nos três grupos paralelos – Grupo I / Oliva, Grupo II/ Linhaça e Grupo III / Girassol – antes e após a suplementação, as taxas de marcadores inflamatórios e achados de reatividade endotelial.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 - CASUÍSTICA

Esta pesquisa consiste em um estudo clínico prospectivo randomizado duplo cego. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) sob o número 3762. O IDPC e especificamente os setores de Nutrição Clínica e de Ecocardiograma contaram com infraestrutura adequada para a execução deste estudo terapêutico e se utilizou de informações clínicas, laboratoriais e de risco cardiovascular.

A população foi constituída através de contato telefônico dos pacientes do Serviço de Nutrição do IDPC. Foram contactados 187 pacientes e selecionados 79 pacientes, que concordaram em seguir o protocolo corretamente, obedecendo os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

4.1.1 - CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

- Idade de 60 - 95 anos , ambos os sexos

- Ativo, sem cadeira de rodas, em acompanhamento ambulatorial
- Síndrome metabólica ou algum dos seus componentes, conforme definidos pelo *National Cholesterol Education Program*/ NCEP, USA[48].
- Termo de consentimento livre e esclarecido

4.1.2 - CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

- Infecções agudas e crônicas.
- Insuficiências orgânicas avançadas, tais como cirrose hepática diagnosticada, casos de diálise peritonial ou hemodiálise, traqueostomia ou necessidade crônica de oxigênio.
- Diabetes Mellitus
- Traumatismo, cirurgia, evento cardiovascular ou hospitalização nos últimos 30 dias.
- Enfermidades reumatológicas ou auto-imunes em atividade.
- Moléstia de Crohn ou retocolite ulcerativa.
- Tabagismo (considerado ex-tabagista acima de 12 meses sem fumar)
- Alcoolismo ou outra dependência química.
- Câncer em acompanhamento (cirurgia, quimio ou radioterapia).
- Consumo de antibióticos, corticosteróides, imunossupressores, anticoagulantes (exceto antiagregantes plaquetários), tratamento para perda de peso (sibutramina, orlistat, dieta < 1200 Kcal/dia), uso de suplementos comerciais de Ômega-3 (óleo de peixe)
- Demência senil, outra dificuldade de entendimento ou colaboração, ou recusa em participar do estudo.

4.2 – MÉTODO:

4.2.1 - DURAÇÃO:

A duração da intervenção de cada paciente foi de 3 meses e o trabalho seguiu no período de Abril/2010 a Junho/2011. Todos os pacientes entregaram o termo de consentimento concordando em participar do estudo e em dar livre acesso a sua história médica. Foram submetidos a consulta médica, avaliação nutricional, exames

bioquímicos, exame de bioimpedância, análise da função endotelial e medidas da espessura da intima-media da artéria carótida.

4.2.2 - QUESTIONÁRIO E AVALIAÇÃO CLÍNICA:

1) Avaliação antropométrica: peso, altura, IMC, perímetro abdominal, relação cintura/quadril, recordatório alimentar

2) Síndrome metabólica: Pressão arterial sistólica e diastólica, perímetro abdominal, testes bioquímicos e histórico de diabetes, hipertensão e dislipidemia

3) Hábitos: Histórico de tabagismo (pacotes/ano), atividade física (leve, moderada, intensa)

4) Medicamentos: lista de todos medicamentos, indicações e dosagens

5) Provas bioquímicas:

Hemograma com contagem diferencial (hemoglobina, leucócitos, neutrófilos), colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicérides, ApoA, ApoB , albumina, transferrina, glicemia, insulina, creatinina, proteina C reativa, fibrinogênio, tempo de protrombina, dímero D, complemento C3 e C4 e leptina.

6) Bioimpedância

Variáveis primárias da bioimpedância (resistência, reactância e ângulo de fase) e compartimentos derivados (massa gorda, massa magra, água corporal, água intra e extra-celular) foram medidas por técnica tetrapolar padrão em aparelho Biodynamics 450 (Biodynamics, Seattle, WA. USA).

A avaliação foi realizada pela manhã após jejum de 4 horas com descontinuação de exercícios e alimentos contendo cafeína e álcool nas 24 horas anteriores ao exame.

7) Testes especializados: Função endotelial e Espessura da Íntima-media da Carótida

Álcool, cafeína, alimentos e medicações vasoativas de ação prolongada foram descontinuadas 12 horas antes do procedimento. Ultrassonografia B-modal de alta resolução com sistema de ultrassom HDI 5000 equipado com power-doppler foi utilizado (*Philips Medical Systems, São Paulo, Brasil*). Os coeficientes de variação intra e inter-exame não excederam 6% para todas as medidas.

A análise foi realizada sempre pelo mesmo profissional treinado, cego para as características clínicas dos participantes. As medidas são descritas em milímetros ou em centímetros por segundo, conforme o caso. A VFM é a resposta diastólica à hiperemia reativa (isquemia mecânica e posterior vasodilatação autorregulatória), junto com os diâmetros sistólico e diastólico medidos na artéria braquial, 3 a 5 cm acima do cotovelo, de acordo com as diretivas padrão[49,50]. Varredura longitudinal B-modal da artéria carótida obtida pelo menos a 10mm da bifurcação da carótida nas paredes proximal e distal da artéria carótida comum esquerda. Três medidas da parede posterior da artéria carótida esquerda obtidas e a média calculada para determinar a CIMT, bem como seus diâmetros registrados.

8) Tolerância ao suplemento

Ao final do estudo, os pacientes foram indagados sobre palatabilidade do suplemento (nota de 1 a 10, sendo 1 péssimo e 10 ótimo), queixas gastrointestinais (náuseas, vômitos, diarreia, cólicas, flatulência), outras queixas eventuais.

Ao final da intervenção, foram repetidos os itens 1, 5, 6 e 7 da Metodologia.

4.2.3 - INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA:

Os pacientes foram divididos entre três grupos de forma consecutiva e não selecionada para usar os óleos previamente randomizados por uma empresa especializada em serviços na área de nutrição. Os pacientes receberam 1 frasco contendo 900ml de óleo, sem identificação, além de um recipiente de 30 ml para medida individual diária do suplemento lipídico, sendo orientados a ingerir diariamente a referida quantidade, durante 12 semanas (aproximadamente 200 Kcal) em esquema duplo-cego, segundo a randomização:

- Grupo I / Oliva: 20,3g de MUFA
- Grupo II/ Linhaça: 14,4g de ALA
- Grupo III / Girassol: 15g de LA

4.2.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados de distribuição descontínua foram analisados pelo teste do Qui-Quadrado; os de distribuição contínua com características normais foram analisados pelo teste ‘t de Student’ ou análise de variância. A comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste de Wilcoxon. Foi realizada Análise de variância (ANOVA) para variáveis que seguem distribuição normal e Kruskal-Wallis para variáveis que não seguem normalidade. A normalidade foi verificada pelo teste de Anderson-Darling. Para todas as circunstâncias uma significância de 5% ($p<0,05$) foi adotada. O Software R (R project) versão 3.3.1.

5. RESULTADOS

Foram contactados cento e oitenta e sete pacientes do Serviço de Nutrição do IDPC por telefone. Selecionados os que se encaixavam aos critérios de inclusão, e excluidos os que não aceitaram participar, bem como os que preenchiam algum dos critérios de exclusão que não foram detectados ao telefone. As desistências por intolerância ao óleo foram, em todos os casos, relacionadas a distúrbios gastrointestinais. Assim, iniciaram setenta e nove pacientes e destes, setenta e seis idosos obesos ou com sobrepeso completaram o estudo. Foram submetidos ao questionário e avaliação clínica antes e depois da intervenção com a suplementação com os óleos. Os grupos randomizados foram compostos por 26 pacientes no Grupo I (Oliva), 26 pacientes no Grupo II (Linhaça) e 27 pacientes no Grupo III (Girassol) e finalizaram todos os exames da avaliação 24, 26 e 26 pacientes respectivamente.

A média de idade da população do estudo foi de 67,42 anos (DP ±5.16) e 72,4% eram mulheres. A tabela 1 resume as características dos pacientes antes da intervenção.

Tabela 1: Características dos pacientes antes da intervenção

Características inciais do grupo	***N***	***(%)***
Sexo feminino	55	72,4
Doenças		
1 a 4	40	52,6
5 a 8	36	47,4
Uso de medicação		
1 a 4	17	22,8
5 a 10	55	71,4
+ 10	4	5,7
Atividade fisica		
Sedentário	55	72,9
Ativo	21	27,1
Grau de escolaridade		
Nenhum	5	5,7
1 a 4 anos	38	54,3
5 a 8 anos	22	28,6
+ 9 anos	11	11,4

A tabela 2 mostra os dados do recordatório alimentar de todos os pacientes analisados, com suas características alimentares, além da análise posterior à intervenção que não mostra grandes mudanças na dieta, uma vez que este não era o objetivo do estudo. Pelo contrário, não era feito nenhum tipo de orientação sobre a alimentação, mas somente indicada a ingestão dos óleos diariamente em associação à dieta já adotada por cada um.

Tabela 2: Dados do recordatório alimentar antes (T1) e depois (T2) da intervenção (media e DP)

Dados do recordatório alimentar (media)	***Antes (T1)***	***Depois (T2)***	***Valor de p***
Calorias (kcal)	1342,41 (±647,6)	1241,5 (±702,3)	0,34
Proteínas (g)	63,03 (±34,8)	61,42 (±28,4)	0,40
Carboidrato (g)	169,68 (±97,6)	165,99 (±127,9)	0,53
Lipideos totais (g)	36,76 (±20,7)	35,83 (±27,4)	0,94
Colesterol (mg)	131,5 (±111,03)	151,2 (±104,5)	0,83
Gordura saturada (g)	10,7 (±8,9)	9,7 (±8,5)	0,37
Gordura poliinsaturada (g)	5,1 (±5,2)	4,7 (4,9)	0,18
Gordura monoinsaturada (g)	8,8 (±7,3)	10,4 (±6,5)	0,72
Fibras (g)	11,1 (±9,4)	10,4 (±7,8)	0,02
Vitamina A (RE)	445,9 (±751,4)	314,1 (±959,7)	0,42
Vitamina D ((μg)	2,4 (±2,6)	1,15 (±2,5)	0,23
Vitamina B12 (μg)	1,76 (±3,9)	1,17 (±4,2)	0,56
Vitamina C (mg)	70,3 (±143,6)	53,75 (±89,9)	0,01
Vitamina E (mg)	4,6 (±7,8)	5,4 (±9,8)	0,82
Folato (μg)	77,9 (±145,6)	60,5 (±111,1)	0,06
Calcio (mg)	467,9 (±309,5)	388,3 (±5,4)	0,38
Fosforo (mg)	778,8 (±378,7)	710,6 (±416,9)	0,31
Magnésio (mg)	154,1 (±73,4)	127,8 (±74,4)	0,18
Ferro (mg)	9,6 (±139,3)	10,2 (±91,1)	0,95
Zinco (mg)	6,9 (±19,9)	7 (±11,6)	0,52
Cobre (μg)	0,7 (±0,4)	0,7 (±0,4)	0,25
Iodo (μg)	41 (±55,8)	13,6 (±49,2)	0,27
Selenio (μg)	41,9 (±26,5)	39,2 (±25,8)	0,63
Magnesio (mg)	1,1 (±1,9)	1 (±1,2)	0,39
Potassio (mg)	1618,4 (±885,8)	1397,9 (±846,3)	0,13
Sodio (mg)	1171,6 (±1773,5)	1178 (±953,9)	0,43

As medidas antropométricas dos pacientes, no inicio do tratamento, estão descritas na tabela 3 e demonstram que os grupos de pacientes tinham o perfil esperado, de acordo com os critérios de inclusão, com índice de massa corpórea acima de 28kg/m^2, circunferência de cintura acima de 97cm e gordura corporal à bioimpedância

acima de 31,8kg em média, características semelhantes quando comparados os três grupos no tempo inicial em relação ao IMC, circunferência de cintura (CC), água intracelular (AIC) e gordura corporal (GC), com os valores de p 0,096, p 0,127, p 0,202 e p 0,558 respectivamente, também descritos na tabela. A comparação entre os grupos não mostrou diferença significativa em nenhum dos parâmetros antropométricos.

Tabela 3: Medidas Antropométricas dos grupos no início da pesquisa (media e DP)

Medidas Antropométricas (media)	***Grupo I – Oliva***	***Grupo II – Linhaça***	***Grupo III – Girassol***	***p value***
IMC	32,7 (±4,62)	34,4 (±3,97)	33,5 (±3,02)	0,096
CC (cm)	105,04 (±8,11)	109,48 (±9,51)	108,1 (±8,5)	0,127
AIC (L)	18,5 (±3,85)	20,2 (±5,02)	19,1 (±4,6)	0,202
Ângulo de Fase	6,1 (±0,83)	6,8 (±2,29)	6,3 (±0,87)	0,414
Reactância	53,9 (±6,82)	56,8 (±22,27)	53,4 (±9,82)	0,710
Resistência	509,7 (±60,6)	475,1 (±57,77)	485,5 (±64,1)	0,129
PMM (kg)	50,1 (±8,06)	51,7 (±9,07)	50,6 (±9,4)	0,842
GC (kg)	31,9 (±8,87)	33,8 (±7,99)	31,8 (±5,76)	0,558
AE (L)	18,1 (±2,54)	18,2 (±4,06)	18,4 (±3,42)	0,964
ACT (L)	36,6 (±5,68)	38,4 (±6,97)	37,6 (±7,6)	0,572

Abreviaturas: IMC: Índice de Massa Corpórea (peso em kg^2/altura cm); CC: Circunferência de Cintura; AIC: Água Intracelular; PMM: Peso da Massa Magra; GC: gordura corporal; AE: Água Extracelular; ACT: Água Corporal Total

Os pacientes passaram pela avaliação médica onde foram examinados e discriminadas as doenças pré-existentes e as medicações em uso. A amostra era constituida de dezessete pacientes ex-tabagistas (no mínimo doze meses sem fumar), quinze portadores de insuficência coronariana, três com antecedentes de acidente vascular cerebral, quarenta e sete hipertensos em uso de medicação, trinta e três em uso de estatina para o tratamento de dislipidemia e vinte e cinco em uso de anti-arritmicos. Após este passo, os pacientes eram orientados a colher os exames de sangue, passar em consulta com a nutricionista, que aplicava o recordatório alimentar e colhia as medidas antropométricas, bem como fazia o teste de bioimpedância. Em seguida eram encaminhados para o setor de Ecocardiograma, onde eram submetidos ao exame de ultrassom com as medidas endoteliais. Após todas as etapas concluidas, os pacientes eram randomizados para receber o óleo e chamados novamente em consulta com a nutricionista que fazia as orientações do uso do óleo e recebiam seu primeiro frasco contendo o óleo definido. Após alguns dias, recebiam contato telefônico e eram questionados sobre o uso do óleo, bem como sua tolerância e agendados para retirar o

segundo frasco, o mesmo procedimento era repetido para o terceiro frasco, quando já recebiam orientações da data para retorno e realização dos exames laboratoriais, consulta com a nutricionista e realização de bioimpedância e do ultrassom das artérias. O tempo total de cada paciente desde o início da intervenção até a reavaliação variou de 13 a 17 semanas.

Os parâmetros bioquímicos demonstrados na tabela 4 expõem o perfil dos marcadores inflamatórios dos três grupos separadamente antes (T1) e após (T2) a intervenção e caracteriza grupos semelhantes entre si. Os valores de *p* estão descritos na tabela 5.

Tabela 4: Parâmetros Bioquímicos dos grupos antes (T1) e depois (T2) da intervenção (media e DP) e valores de p

Parâmetros Bioquímicos (media)	**Grupo I – Oliva (T1)**	**Grupo I – Oliva (T2)**	**Grupo II – Linhaça (T1)**	**Grupo II – Linhaça (T2)**	**Grupo III – Girassol (T1)**	**Grupo III – Girassol (T2)**	***p value***
Transferrina (mg/dL)	254,1 (±48,9)	259,9 (±51,73)	272,6 (±52,99)	264,6 (±51,78)	260 (±34,02)	268,1 (±29,4)	0,171
Insulina (µIU/mL)	12,6 (±8,81)	11,1 (±9,84)	11,4 (±5,14)	11,4 (±5,39)	10,74 (±6,3)	10,2 (±4,93)	0,923
PCRus (mg/L)	0,44 (±0,46)	0,71 (±1,2)	0,6 (±0,93)	0,49 (±0,79)	0,51 (±1,23)	0,42 (±0,47)	0,102
Fibrinogênio (mg/dL)	352,3 (±70,76)	335,2 (±59,49)	320,4 (±74,24)	294,6 (±62,99)	315,5 (±57,2)	319,2 (±57,5)	0,553
D-dímero (mg/dL)	0,4 (±0,35)	0,34 (±0,25)	0,5 (±0,85)	0,41 (±0,46)	0,38 (±0,22)	0,72 (±0,91)	0,162
C3 complemento (mg/dL)	132 (±22,9)	127,6 (±20,26)	135 (±23,12)	124,1 (±20,63)	133,6 (±15,99)	128,5 (±21,44)	0,158
C4 complemento (mg/dL)	28,9 (±17,32)	24,2 (±6,32)	24,5 (±6,75)	21,1 (±6,22)	25,3 (±6,18)	24,7 (±7,83)	0,647
Apolipoproteina B (mg/dL)	90,5 (±20,02)	86,3 (±24,09)	97,1 (±28,18)	94,6 (±17,49)	93,4 (±22,05)	85,8 (±17,66)	0,575
Apolipoproteina A (mg/dL)	155 (±36,8)	153,6 (±23,76)	140,2 (±26,15)	140 (±26,42)	146 (±23,8)	149,2 (±25,72)	0,674
ApoB/ApoA (mg/dl)	0,6 (±0,17)	0,57 (±0,16)	0,72 (±0,25)	0,69 (±0,16)	0,65 (±0,19)	0,59 (±0,14)	0,314
Leptina (ng/mL)	26,9 (±15,65)	25,8 (±15,16)	23,2 (±18,8)	28,7 (±21,59)	26,1 (±18,7)	35,5 (±21,72)	0,169

Tabela 5: Valores de ***p*** na análise estatística usando teste t e *Wilcoxon* dos grupos em relação aos parâmetros bioquímicos

Parâmetros Bioquímicos	***Grupo I – Oliva (valor de p)***	***Grupo II – Linhaça (valor de p)***	***Grupo III - Girassol(valor de p)***
PCRus	0,653	0,074	0,935
Fibrinogênio	0,422	0,091	0,931
C3	0,912	0,038	0,107
C4	0,093	0,001	0,156
ApoB	0,113	0,219	0,010
ApoA	0,836	0,379	0,836
ApoB/ApoA	0,021	0,182	0,004
Leptina	0,205	0,201	0,002

Ainda em relação aos marcadores inflamatórios, podemos verificar que a intervenção melhorou o perfil de alguns deles como o caso do PCRus, reduzido no grupo Linhaça (p 0,074), também demonstrado na figura 6; e dos níveis de C3 e C4, reduzidos no grupo Linhaça (p 0,038 e p 0,001 respectivamente) conforme figuras 7 e 8. Os níveis de Apo B, bem como a relação ApoB/ApoA e a leptina foram reduzidos no grupo Girassol (p 0,020, p 0,004 e p 0,002 respectivamente) conforme figuras 9, 10, 11 e 12. Houve melhora da relação ApoB/ApoA (p 0,021) no grupo Oliva e tendência de melhora dos níveis de C4 no grupo Oliva (p 0,093) e do fibrinogênio no grupo Linhaça (p 0,091), conforme figura 13.

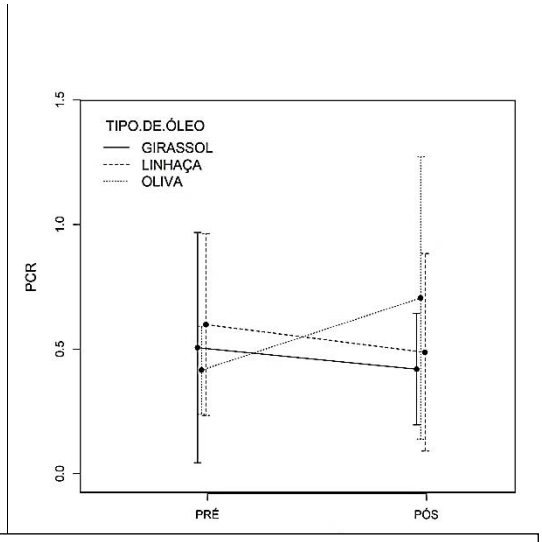

FIGURA 6: comparação dos níveis de PCR pré e pós intervenção

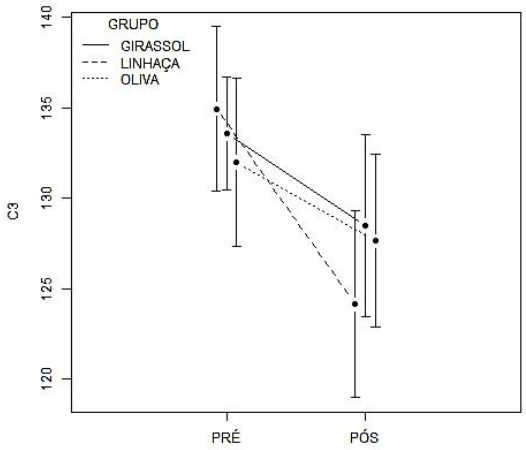

FIGURA 7: comparação dos níveis de C3 pré e pós intervenção

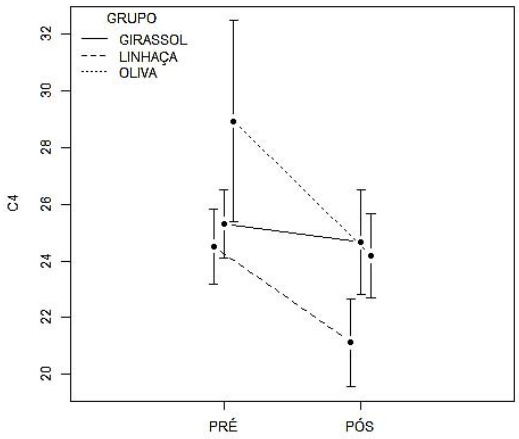

FIGURA 8: comparação dos níveis de C4 pré e pós intervenção

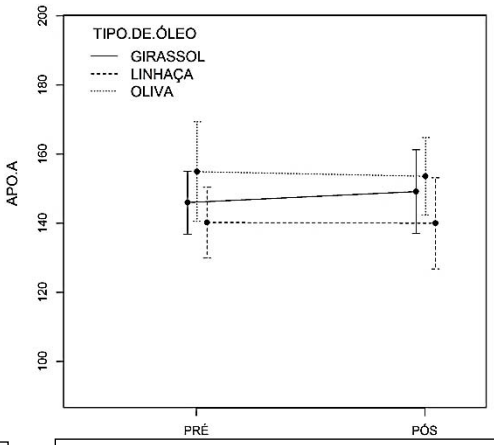

FIGURA 9: comparação dos níveis de ApoA pré e pós intervenção

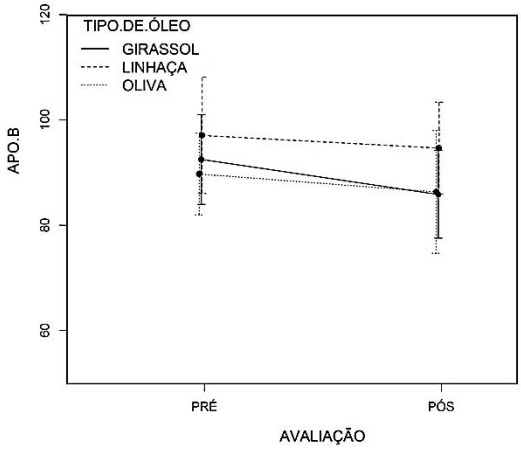

Figura 10: comparação dos níveis de ApoB pré e pós intervenção

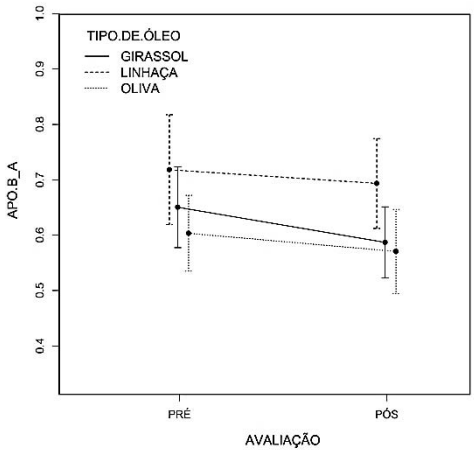

Figura 11: comparação dos valores de ApoB/ApoA pré e pós intervenção

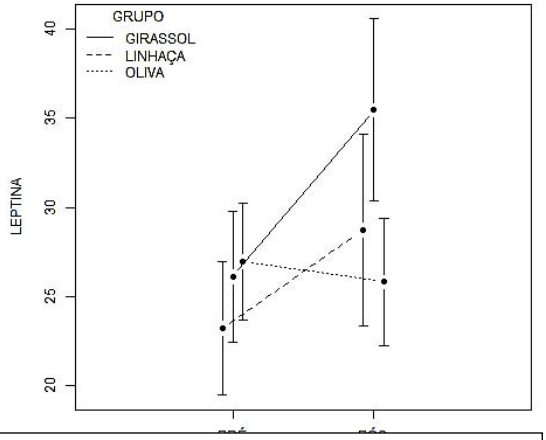

Figura 12: comparação dos níveis de Leptina pré e pós intervenção

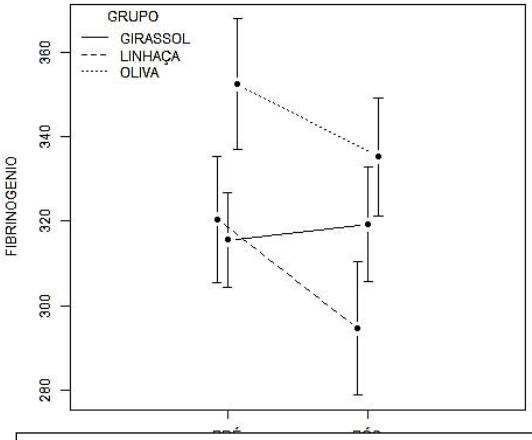

Figura 13: comparação dos níveis de fibrinogênio pré e pós intervenção

Quanto aos parâmetros endoteliais ao ultrassom, os valores de espessura da intima-media de carótida apresentaram melhora com os três tipos de óleo suplementados, com valores mais favoráveis para os óleos de linhaça e oliva conforme vemos nas figuras 14, 15 e 16 e nos valores descritos nas tabelas 6 e 7. Houve melhora na vasodilatação da artéria carótida quando a analisamos em dois momentos (sístole e diástole), demonstrando melhora na distensibilidade da parede arterial, com efeito superior no grupo Girassol (p 0,006). Além disto, a VFM apresentou melhora significativa no grupo Girassol (p 0,001) e uma tendência a melhora no grupo Oliva (p 0,054).

Tabela 6: Parâmetros endoteliais ao ultrassom dos grupos antes (T1) e depois (T2) da intervenção (media e DP)

Parâmetros endoteliais	***Grupo I – Oliva (T1)***	***Grupo I – Oliva (T2)***	***Grupo II – Linhaça (T1)***	***Grupo II – Linhaça (T2)***	***Grupo III – Girassol (T1)***	***Grupo III – Girassol (T2)***
Espessura da intima-media carótida (mm)	0,96 (±0,23)	0,85 (±0,28)	0,88 (±0,24)	0,71 (±0,16)	0,85 (±0,2)	0,82 (±0,21)
Diâmetro carotídeo diastólico(mm)	6,6 (±0,84)	6,2 (±0,75)	6,6 (±0,99)	6,2 (±1,37)	6,4 (±0,85)	6,3 (±0,93)
Diâmetro carotídeo sistólico (mm)	6,7 (±0,88)	6,4 (±0,84)	6,7 (±1,01)	6,3 (±1,4)	6,5 (±0,83)	6,4 (±0,93)
Diferença diâmetro sistólico-diastólico (mm)	0,08 (± 0,05)	0,15 (±0,24)	0,08 (±0,04)	0,09 (±0,32)	0,08 (±0,06)	0,09 (±0,32)
Diâmetro braquial inicial	3,7 (±0,63)	3,64 (±0,82)	3,81 (±0,52)	3,89 (±1,29)	3,65 (±0,78)	3,24 (±0,5)
Diâmetro braquial após 3 min	3,97 (±0,67)	4,02 (±0,78)	4,08 (±0,59)	3,99 (±0,53)	3,95 (±0,75)	3,76 (±0,49)
VFM	0,27 (±0,2)	0,38 (±0,23)	0,27 (±0,19)	0,1 (±1,2)	0,3 (±0,17)	0,52 (±0,13)

Tabela 7: Valores de p na análise estatística usando teste t e *Wilcoxon* dos achados endoteliais dos grupos

Parâmetros endoteliais	***Grupo I – Oliva (valor de p)***	***Grupo II – Linhaça (valor de p)***	***Grupo III – Girassol (valor de p)***
Espessura da intima-media carótida (mm)	0,028	0,028	0,041
Diâmetro carotídeo diastólico (mm)	0,046	0,083	0,235
Diâmetro carotídeo sistólico (mm)	0,099	0,080	0,277
Diferença diâmetro sistólico-diastólico (mm)	0,362	0,217	0,006
Diâmetro braquial inicial	0,097	0,148	0,021
Diâmetro braquial após 3 min	0,476	0,065	0,702
VFM	0,054	0,304	0,001

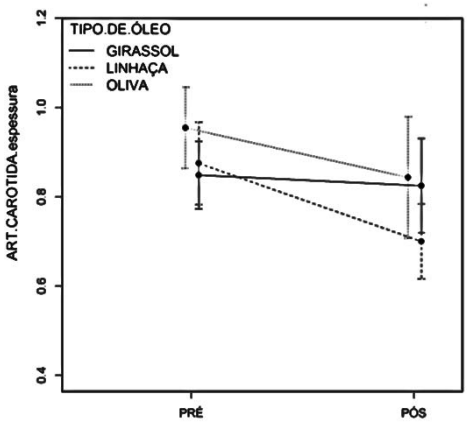

FIGURA 14: comparação dos valores de espessura da artéria carótida pré e pós intervenção

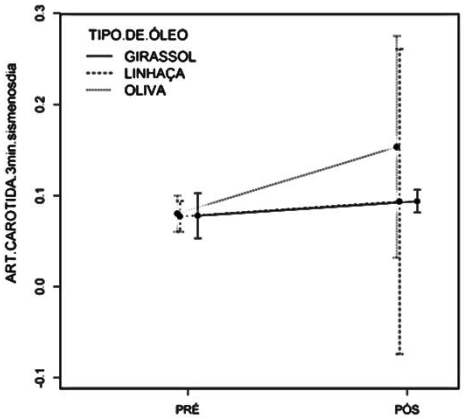

FIGURA 15: comparação da diferença do diâmetro em sístole e diástole pré e pós intervenção

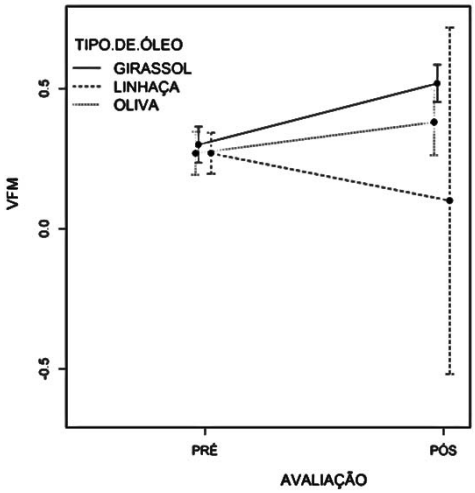

FIGURA 16: comparação dos valores de VFM pré e pós intervenção

6. DISCUSSÃO

Há poucos trabalhos na literatura avaliando obesidade e envelhecimento em conjunto, tampouco mostrando o efeito antiinflamatório dos ácidos graxos insaturados na tentativa de reduzir os eventos CV nesta população. Obesidade é reconhecida como um clássico fator de risco para aterosclerose e subsequente DCV[51], assim como o próprio envelhecimento fisiológico inclui aumento da rigidez e da espessura de grandes artérias e disfunção endotelial, características que precedem e aumentam o risco de desenvolver aterosclerose[8]. A síndrome metabólica tem sido relacionada ao envelhecimento arterial em alguns estudos prospectivos que mostram que a progressão da rigidez arterial esteve associada às mudanças relacionadas ao risco de desenvolvê-la e foi significativamente mais pronunciada em pacientes já portadores dela[52]. *Kim OY et al* demonstraram em seu estudo que a rigidez arterial relacionada a idade é ainda maior na ocorrência simultânea de síndrome metabólica e altos níveis de marcadores proinflamatórios e de estresse oxidativo[53]. Recentemente foi publicado um estudo realizado no Brasil onde os autores avaliaram se PUFA teria algum efeito sobre a síndrome metabólica. Analisaram 30 mulheres portadoras da síndrome e as submeteram a uma dieta hipocalórica associada ao uso de geléia com 3,0g de óleo de peixe microencapsulado ou placebo, por 12 semanas. Concluiram que o grupo intervenção teve redução da glicose sérica, insulinemia e resistência insulínica[54], sendo a suplementação de PUFA benéfica para o controle da síndrome metabólica e prevenindo maiores complicações.

Um dos objetivos da presente pesquisa era avaliar o efeito da suplemetação de PUFA sobre os marcadores inflamatórios e endoteliais. Encontramos muitos trabalhos comparando a quantidade de EPA e DHA da dieta habitual (não ofertado como intervenção) e seus efeitos sobre os marcadores inflamatórios ou a reatividade endotelial (tabela 8). Alguns estudos transversais, sendo um com 5488 pacientes sem DCV avaliou por questionário a dieta dos pacientes e sua relação com aterosclerose subclínica[55]; outro com 868 pacientes avaliou a ingestão de peixes comparativamente entre japoneses do Japão e japoneses residentes nos EUA e suas propriedades antiaterogênicas[56]; e outro com 1920 japoneses avaliou a quantidade de EPA e DHA proveniente da dieta e sua relação com aterosclerose carotídea[57]; todos concluiram que a ingestão de peixes (não-fritos) e PUFA ômega-3 esteve inversamente relacionada a CIMT. Assim como um

estudo de coorte realizado no Brasil que avaliou a ingestão alimentar de ômega-3 na dieta de 421 pacientes nos 3 meses que antecederam um IAM e, após o evento, a relação dos níveis de ômega-3 com os marcadores inflamatórios (PCR), bem como com a função endotelial (VFM). Concluiu que aqueles que consumiam quantidades de ômega-3 > 1,7g/dia tiveram menor resposta inflamatória e melhor função endotelial no período pós-IAM[58]. Já um estudo observacional com 281 adultos saudáveis, avaliou os dados do recordatório alimentar em relação a ingestão de EPA/DHA e identificou que o consumo de peixe e não o de frutas, vegetais, bebidas alcoólicas e produtos lácteos, foi associado a redução de biomarcadores de disfunção endotelial (83%) e baixo grau de inflamação, dentre eles PCR (40%)[59]. Portanto, assim como nos trabalhos que comprovam que os pacientes que consomem mais alimentos que contém PUFA ômega-3 apresentam redução da inflamação, a presente pesquisa demonstra a melhora dos marcadores inflamatórios com a suplementação de PUFA, principalmente ALA do óleo de linhaça.

Tabela 8: Artigos com dados observacionais da dieta habitual quanto a composição de ALA e a resposta inflamatória e função endotelial

Referência	Avaliação da dieta	Dose diária	Participantes	Idade, Anos	Interv., n (M/F)	Resultados
He et al (55)	Consumo de peixes e n-3 PUFA		Adultos sem DCV	45 a 84	5488	Melhora da CIMT
Sekikawa A et al (56)	n-3 marinho-derivado	9,2g/ 3,9g/4,8g	Japoneses/caucasianos/japoneses americanos	40-49	868M	Relação inversa entre n-3 e CIMT
Hino A et al (57)	n-3 da dieta		Japoneses de uma comunidade rural	62 (±11)	785M/1117F	Relação inversa entre n-3 e CIMT
Chagas APRC (58)	n-3 da dieta 3 meses antes do IAM	<1,7g/ >1,7g	Pacientes infartados	64 (±14)	317M/104F	Relação inversa entre n-3 e PCR e VFM no 5° dia pós-IAM
Van Bussel BCT et al (59)	Dados de EPA e DHA da dieta de base	-	Adultos saudáveis	36 anos	140M/161F	Consumo de EPA eDHA foi associado a redução de biomarcadores de disfunção endotelial 83%) e baixo grau de inflamação - PCR (40%)

n-3, ômega-3; PUFA, *polyunsaturated fatty acid*; CIMT, *carotida intima-media thickness*; DCV, doença cardiovascular; VFM, vasodilatação fluxo-mediada; IAM, infarto do miocárdio; PCR, proteina C reativa; EPA, *eicosapentaenóic acid*; DHA, *docosahexaenoic acid*

Em nossa pesquisa, dosamos as apolipoproteínas que foram descritas junto com o tabagismo, como fatores de risco de maior valor preditivo de infarto do miocárdio, principalmente a relação ApoB/ApoA1 aumentada, maior ainda que o valor de LDL-colesterol isolado[60,61]. Encontramos melhores resultados com o óleo de girassol e o óleo de oliva, que reduziram significativamente a relação ApoB/ApoA1 (p 0,004 e p 0,021 respectivamente) e o óleo de girassol, que ainda reduziu os valores isolados de ApoB (p 0,010), favorecendo a redução de fatores de risco para aterosclerose. Uma meta-análise avaliou a redução dos níveis de colesterol total e LDL, com óleo de linhaça, MUFA e ômega-6 e concluiu que a substituição de gordura saturada ou trans por ALA induz um aumento significativo na proporção de ômega-3 no plasma e reduz a relação ômega-6:ômega-3, o que traz benefícios em DCV[62]. Porém esta indicação ainda não é evidente na literatura, tendo os benefícios a longo prazo ainda incertos. Por isto, várias meta-análises vêm sendo publicadas, na tentativa de responder a esta questão. Recentemente *Michas G et al* fizeram uma revisão na literatura de meta-análises, revisões sistemáticas e estudos prospectivos de coorte avaliando o consumo de gorduras na dieta e o risco de incidência de DCV. Concluiram que o risco de DCV pode ser menor ao reduzir o consumo de gordura saturada, substituindo-se por uma combinação de PUFA e MUFA. Embora o tipo ideal de gordura insaturada seja incerto, os benefícios do PUFA parecem melhores. Já sobre o tipo de PUFA e a frequentemente citada relação ômega-6/ômega-3, há poucas evidências de seu impacto sobre o risco de DCV, sendo desafiado seu valor clínico. Os autores sugerem que talvez seja mais válido determinar o "índice ômega-3" individual, com a análise dos níveis séricos de EPA e DHA expressos como percentual dos ácidos graxos identificados, suplementando apenas aqueles com níveis baixos de PUFA ômega-3, sendo o valor recomendado para o índice ômega-3 > 8%, como nível cardioprotetor. No entanto, concluem que são necessárias pesquisas adicionais para determinar quantidades ótimas de ambos PUFAs e discernir os grupos de pessoas (pacientes e/ou população em geral) que se beneficiariam da suplementação de ômega-3[63]. Nossos resultados respondem pelo menos a uma destas perguntas ao demonstrar que idosos não-diabéticos, com obesidade ou sobrepeso, obtiveram melhora da resposta inflamatória com os ácidos graxos insaturados, nas doses oferecidas, reduzindo o risco cardiovascular.

Já em estudos que se propõem a fazer uma intervenção alimentar como o nosso, alguns avaliaram a relação entre marcadores inflamatórios e/ou reatividade endotelial e

a ingestão de PUFA, principalmente o ômega-3. Em geral, os trabalhos não focam no ALA, e talvez isto se deva à baixa conversão do metabolismo humano em EPA (<8%) e ainda menor em DHA (<0.5%)[64], como já descrito anteriormente. Neste aspecto, alguns pesquisadores comprovaram seus efeitos como nos trabalhos a seguir: *trial* de 1999 reportou o efeito protetor de uma dieta rica em ALA, onde foram mensurados AG plasmáticos e encontrados altos níveis de ALA, por sua vez significativamente e independentemente associados com melhor prognóstico pós infarto do miocárdio (IAM)[65]; estudo na India descreveu que o uso de óleo de mostarda, rico em ALA, esteve associado ao baixo risco de IAM comparado ao uso de óleo de girassol[66]; mais recentemente *Derbali A et al* demonstraram benefícios com ALA em ratos submetidos a IAM induzido por isoproterenol e observaram que o óleo de linhaça, com sua importante fração de ALA, preveniu quase todos os parâmetros de IAM induzidos pela droga[67]; e por último, *Barceló-Coblijn G et al* que usaram suplementos de óleo de peixe (doses 0,6g, 1,2g), óleo de linhaça (doses 1,2g, 2,4g e 3,6g) e óleo de girassol (1g) por 12 semanas em 62 homens saudáveis com o objetivo de avaliar não diretamente a função endotelial, mas sim o efeito da suplementação na dosagem sérica de EPA e DHA, concluiram que houve aumento nos eritrócitos dos indivíduos tratados com ALA e óleo de peixe, sem achados de modificação dos marcadores inflamatórios[64]. Portanto, todos eles demonstram que a conversão do ALA é eficaz em ratos e adultos jovens e produz níveis séricos de EPA e DHA suficientes para reproduzir seus efeitos benéficos, assim como os resultados encontrados com ômega-3, mais frequentes na literatura. No entanto, não encontramos nenhum dado na literatura descrevendo este efeito em idosos.

Grandes trials documentaram os efeitos do PUFA ômega-3 na prevenção primária e especialmente na prevenção secundária de doença coronariana. *DART* (*Diet and Reinfarction Trial*)[68], *GISSI* (*Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico*)[69] e *JELIS* (*Japan EPA Lipid Intervention Study*)[70], que em combinação indicam que o PUFA ômega-3 da dieta reduz o risco cardiovascular em ambos cenários de prevenção primária e secundária[71]. Neste sentido de prevenção secundária *Matsuzaki et al* demonstraram que a associação de 1,8g de EPA ao tratamento com estatina por 4,6 anos foi eficaz na prevenção de eventos maiores coronarianos[72]. Um recente trial indicou que o uso concomitante de ômega-3 derivado de peixe e de vegetais (ALA) promoveu ação sinérgica na redução da mortalidade em uma população de alto risco para DCV[73].

Voltando a falar sobre marcadores inflamatórios, o presente estudo demonstra uma redução dos níveis de PCRus mais acentuada com o óleo de linhaça em relação aos outros óleos. Dados semelhantes aos encontrados em nosso estudo estão listados na tabela 9, nos quais foi demonstrado que ALA pode exercer efeitos protetores antiinflamatórios diretos. Entre eles estão 1) estudos epidemiológicos: ingesta aumentada de ALA (5,2g por 6 semanas) esteve associada a redução da concentração plasmática de PCR e consequentemente do risco de DCV[74]; 2) estudos de intervenção: margarina enriquecida com 1,0g de ALA ofertado por 2 anos promoveu redução dos níveis plasmáticos de PCR[75]. O estudo de *Satoh et al* encontrou resultados semelhantes ao presente estudo, suplementando com 1,8g de EPA por 12 semanas a adultos obesos portadores de síndrome metabólica, e os autores evidenciaram a redução de índices para rigidez arterial, neste caso com CAVI (índice cardio-tornozelo - um índice de rigidez arterial menos influenciado pela pressão arterial), bem como a redução de marcadores inflamatórios como o PCR[76].

A dose de ALA ofertada em nosso estudo condiz com a maioria dos estudos que apresentaram resultados positivos na redução de risco CV. Estudos com doses menores como o realizado por *Mackay et al*, em que foi ofertado 882mg de EPA + DHA a pacientes com claudicação intermitente e média de idade de 68,5, não obtiveram resultados significativos na redução do PCR[42]. Outro estudo sobre o efeito da intervenção prolongada com óleos foi o *Alpha Omega Trial*, que avaliou pacientes idosos com história de infarto do miocárdio até 10 anos antes da avaliação: foram randomizados 4.837 pacientes dividos em 4 grupos para receber margarinas enriquecidas com 1) 400mg EPA/DHA, 2) 2g ALA, 3) 400mg EPA/DHA + 2g ALA e 4) ácido oléico (placebo) por 160 semanas. Os achados incluem redução de eventos CV maiores no grupo que usou EPA/DHA + ALA, porém não foi demonstrado efeito sobre os níveis de PCR[77,78,79]. A justificativa novamente recai sobre a dose utilizada, uma vez que outros trabalhos utilizam cerca de 1 a 2g de EPA/DHA, além de evidências de que a mistura de várias fontes de ácidos graxos não aumenta sua ação, já que há competição enzimática quando há ingestão concomitante[80,81].

Ainda sobre a ação positiva sobre marcadores inflamatórios ligados a DCV destacamos em nosso estudo que os óleos de oliva e de girassol (com sua fração de ácido oléico) reduziram a relação ApoB/ApoA. Encontramos achados semelhantes aos nossos no estudo de *Esposito K et al* que estudaram 180 pacientes com síndrome

metabólica, por um tempo maior (96 semanas) em uso de 2g de azeite de oliva, como parte da dieta Mediterrânea. Concluiram que o grupo intervenção apresentou redução dos níveis de PCR, bem como evidenciaram sua relação inversa com os escores de função endotelial, como pressão arterial, agregação plaquetária, parâmetros lipídico e glicêmico, entre outros[82]. Estudo de *Kouvari M et al* demonstrou que o uso de MUFA exclusivamente na dieta por 10 anos entre pacientes com media de idade acima de 64 anos que tiveram IAM, apresentou baixo risco de recorrência principalmente entre os obesos[83]. Recente revisão da literatura sobre estudos que substituiram a ingestão de gorduras e óleos ricos em ácidos graxos saturados ou gorduras trans por óleo de soja enriquecido com ácido oléico (70%) concluiu que a substituição teve efeito favorável sobre as lipoproteínas e consequentemente sobre o risco geral de DCV. Além disto, evidenciou que a troca de gorduras trans e gorduras saturadas por outros óleos vegetais ricos em PUFA ômega-6 como óleo de girassol, teve efeitos favoráveis e comparáveis nos fatores de risco e no risco geral de DCV[84]. Em um grande estudo prospectivo, o PREDIMED (PREvención con DIeta MEDiterránea), 7038 pacientes com alto risco para DCV foram acompanhados por 6 anos e avaliados quanto à sua ingestão de gordura e derivados e relacionada ao risco de DCV e risco de morte. Concluiu que o uso de MUFA e PUFA esteve associado ao baixo risco de DCV e morte, enquanto que o consumo de gordura saturada e gordura trans esteve associado ao alto risco de DCV. Portanto, a substituição de gordura saturada por MUFA e PUFA e de gordura trans por MUFA foi inversamente associada a DCV. No mesmo trial, os autores publicaram dados referentes ao consumo de óleo de oliva, em 7216 idosos com alto risco CV, por 4,8 anos e concluiram que nesta população houve redução do risco de DCV e morte com o aumento do seu consumo, principalmente do óleo de oliva extra-virgem. E ainda uma última publicação do PREDIMED onde os autores randomizaram 7447 pacientes com alto risco para DCV em três grupos: dieta mediterrânea com suplementação de óleo de oliva extra-virgem, dieta mediterrânea com suplementação de castanhas e dieta controle (aconselhamento para dieta com baixo teor de gordura). Concluiu que a modificação dos hábitos dietéticos para uma dieta rica em PUFA de fontes vegetais naturais é preferencial para a saúde CV do que uma dieta com redução da gordura total[85,86,87].

Sobre resultados da suplementação de óleo de girassol, rico em PUFA ômega-6, os dados da literatura confirmam que o uso de óleos compostos exclusivamente de LA

em substituição aos ácidos graxos saturados, como o utilizado no estudo SDHS (*Sydney Diet Heart Study*) e revisado por *Ramsden et al*, provocam o aumento dos riscos de morte por todas as causas e de doença coronariana e DCV[88]. Os metabólitos de LA oxidados são os mais abundantes no LDL oxidado, comprovando seu poder aterogênico e o aumento da mortalidade CV, vistos desde os primeiros resultados do estudo SDHS de 1978 por *Woodhill et al*[89]. Portanto, estes dados confirmam que as frações de LA, ALA e ácido oléico do óleo de girassol, podem ter agido sinergicamente para provocar os resultados positivos em nossa pesquisa.

Tabela 9: Artigos com intervenção ou avaliação da ingestão de AG e resposta inflamatória

Referência	Intervenção/controle	Duração /sem	Fonte do óleo	Dose diária	Participantes	Idade, Anos	Interv., n (M/F)	Resultados
Zhao G et al (74)	Dieta rica em ALA x dieta rica em LA x dieta padrão americana	6 sems (3 sems WO)	Óleo de linhaça	12,6% LA + 3,6% ALA x 10,5% LA + 6,5% ALA	Adultos obesos ou sobrepeso hipercolesterolêmicos sem tto	49,8 (±1,6)	20M/3F	Redução PCR no grupo ALA
Bemelmans WJE et al (75)	ALA x LA	2 anos	Margarina enriquecida	46% LA + 15% ALA x 58% LA + 0,3% ALA	Adultos hipercolesterolêmicos com 2 fatores de risco CV	55 (±10)	38M/65F	Redução de PCR; Sem efeito na CIMT
Esposito K et al (82)	Dieta do mediterrâneo/dieta prudente	96 sems	Azeite de oliva	8g azeite oliva/CHO 50%-60%; ptn 15%-20%; gordura 30%	Adultos com síndrome metabólica	44 anos (media)	99M/81F	Redução de PCR, IL-6 e resistência a insulina; melhora de função endotelial e relação inversa com níveis de PCR
***Alpha Omega Trial* (77,78,79)**	EPA + DHA/ALA/placebo	160 sems	Margarina enriquecida	400mg EPA+DHA/2g ALA/400mg EPA+DHA + 2g ALA/MUFA	Idosos infartados nos últimos 10 anos	69 anos (media)	3783M/1054F	EPA/DHA + ALA redução de eventos CV maiores//sem efeito sobre PCR
Satoh N et al (76)	EPA/placebo	12 sems	Capsula	1.8g EPA	Sindrome metabólica	51 anos (media)	39M/53F	EPA reduziu o CAVI ; redução da PCR, VOP e aumentou adiponectina
Mackay I et al (42)	EPA + DHA x óleo de palma + soja	12 sems (12 sem WO)	Cápsula	850-882mg EPA + DHA	Claudicação intermitente e DVP	68,5 media	46F/104M	Nenhum efeito na PCR ou na VOP braquial

WO, whash out; ALA; LA; DVP, doença vascular periférica; PCR, proteína C reativa; VOP, velocidade de onda de pulso da carótida; CV, cardiovascular; VFM, dilatação fluxo-mediada; IL-6, interleucina-6; CAVI, cardio-ankle vascular index (índice de rigidez arterial); CHO, carboidratos; ptn, proteínas; EPA, eicosapentaenóic acid; DHA, docosahexaenoic acid

Em relação a avaliação da função endotelial, utilizamos o ultrassom de alta resolução, método não-invasivo, através dos valores de VFM, bem descrito na literatura como marcador precoce da doença aterosclerótica, que quando aumentado, promove redução dos fatores de risco para DCV. Os resultados da tese de doutorado apresentados por Saleh MH em 2011, demonstram que a obesidade, fator predisponente para o comprometimento precoce da função endotelial, quando tratada sob a forma de cirurgia bariátrica, promove redução significativa tanto da VFM quando da CIMT[20]. Analisando os efeitos da presente intervenção sobre a disfunção arterial, identificamos melhora na relação entre os diâmetros diastólico e sistólico da carótida, bem como nos valores de VFM no grupo Girassol (p 0,006 e p 0,001 respectivamente), além de tendência de melhora nos valores de VFM no grupo Oliva (p 0,054). Resultados importantes, uma vez que não foi feito nenhum tratamento para redução de peso, e portanto pacientes ainda obesos ou com sobrepeso obtiveram melhora da função endotelial com a suplementação de PUFA e MUFA. Ação esta que pode prevenir o surgimento de alteração morfológica do vaso, já que esta disfunção precede os sinais da doença vascular instalada. Seu papel prognóstico foi confirmado por estudo de *Modena et al*, onde pacientes que não apresentaram melhora da VFM após controle da hipertensão arterial, tiveram maior incidência de complicações CV, sendo útil no acompanhamento do tratamento e análise das intervenções preventivas da DCV[90].

O presente estudo também demonstrou que a intervenção reduziu a CIMT, sinal de aterosclerose subclínica, apresentando valores significativamente reduzidos em todos os grupos, com valores mais favoráveis nos grupos da linhaça e oliva (p 0,028 em ambos)**,** comprovando o valor da suplementação na prevenção da DCV, antes mesmo de aparecerem sinais ou sintomas. Visto que os valores da CIMT nos grupos, já no início da intervenção, eram acima de 0,71mm (valor médio encontrado para idosos saudáveis em um estudo brasileiro[23]), a resposta aos óleos fica ainda mais significativa por demonstrar seu efeito sobre a modificação de um fator de risco precoce da DCV.

Ao analisarmos os dados da literatura, encontramos alguns estudos que descrevem o efeito dos ácidos graxos insaturados sobre a função endotelial, listados na tabela 10. *Esser D et al* avaliaram os efeitos agudos do consumo de uma dieta rica em gordura sobre a resposta vascular em idosos obesos e eutróficos. Demonstraram que, apesar do consumo de uma dieta de composição alta em gordura iniciar um estado de ativação de aderência celular na circulação, o que poderia iniciar o desenvolvimento da

aterosclerose, a dieta rica em MUFA teve mais pronunciada tendência a redução da pressão arterial e da rigidez arterial do que dietas contendo PUFA e AG saturados[91]. Como dito acima, o trabalho de *Esser D et al* avaliou apenas o efeito agudo, enquanto nossa intervenção demonstrou o efeito após 12 semanas de uso dos óleos, observando melhora da função endotelial com a suplementação de PUFAs e uma tendência a melhora com o uso de MUFAs. Outros resultados semelhantes aos nossos foram encontrados com a suplementação de ômega-3 por *Schiano V et al* que ofertaram cápsulas contendo 1g de ômega-3 por 3 meses a pacientes com claudicação intermitente, com melhora nos níveis de PCR e também nos valores de VFM[92]; *Tousoulis D et al* demonstraram que pacientes portadores de síndrome metabólica sem história prévia de DCV, utilizando 2g de ômega-3 versus placebo por 3 meses, apresentaram melhora nos valores de VFM progressivamente no grupo intervenção[93]; *Goodfellow J et al* avaliaram pacientes hipercolesterolêmicos, utilizando 4g de ômega-3 marinho com 85% de EPA/DHA e observaram melhora significativa dos níveis de VFM[94]; e *Siasos G et al* que avaliaram um grupo de fumantes e demonstraram que após 12 meses de uso de 2g de ômega-3 ao dia houve melhora da VFM no grupo intervenção mesmo em vigência do uso do cigarro[95.] Outros resultados positivos foram demonstrados por vários autores: *Din JN et al*[96], *Tomiyama H et al*[97], *Takaki A et al*[98] todos com suplementação de ômega-3 e melhora em diferentes parâmetros de função endotelial.

Em contrapartida, alguns estudos não encontraram resultado positivo da suplementação de PUFA sobre a disfunção endotelial. O *OMEGA*, um *trial* com 3851 pacientes com média de idade de 67 anos (amplitude inter-quartil de 54 a 72 anos) e média de IMC 27kg/cm^2 (sobrepeso) ofereceu cápsulas de 1g de ômega-3 (460 mg EPA, 380 mg DHA) e controle contendo 1g de azeite de oliva a pacientes internados por IAM nas 48 semanas subsequentes ao evento. Os pesquisadores não encontraram dados que comprovassem a redução de eventos CV maiores e cerebrovasculares para afirmar seu benefício e justificar seu uso[99]. *Lithander FE et al* testaram o efeito agudo de uma dieta rica em MUFA por 2 dias em 20 homens saudáveis e não encontraram evidências de efeito sobre a rigidez arterial[100]. Ambos os trabalhos podem ter falhado na ação sobre a disfunção endotelial pela dose e período de tratamento, respectivamente. *Angerer P et al* intervieram em 171 pacientes com doença arterial coronariana já estabelecida e comprovada pela angiografia. Suplementados por 96 meses, com EPA+DHA (3,3g) nas

primeiras 12 semanas, e depois um seguimento com 1,65g por 84 semanas. Os autores não conseguiram demonstrar redução da progressão da aterosclerose ao ultrassom de carótidas[101]. Talvez este resultado se justifique por se tratar de pacientes com doença coronariana estabelecida, diferente do nosso estudo com pacientes com fatores de risco presentes, mas sem doença expressa. *Augustine AH et al*, por sua vez, estudaram 75 adultos obesos ou com sobrepeso e dislipêmicos, ingerindo 4g de ômega-3 por 16 semanas e também não encontraram efeito sobre a função vascular através de marcadores de mudanças no volume arterial sanguíneo resultando em uma pontuação (EndoPat)[102]. Nenhum efeito na VOP braquial foi encontrado por *Mackay I et al* ao oferecerem 850-882mg de EPA+DHA por 12 semanas a idosos com claudicação intermitente e doença vascular periférica[42].

Alguns trabalhos não obtiveram resultados positivos na função endotelial em diferentes métodos diagnósticos do utilizado por nós. Além disto, o presente estudo foi de intervenção em pacientes idosos e obesos, diferentemente dos já publicados, o que nos leva a questionar se a possível justificativa dos resultados ainda não tão significativos em todos os parâmetros endoteliais, não pode ter sido pela menor conversão em EPA e DHA desta população, reduzindo a ação benéfica do ALA.

Tabela 10: Artigos com intervenção ou avaliação da ingestão de AG e a função endotelial

Referência	Intervenção /controle	Duração/sem	Fonte do óleo	Dose diária	Participantes	Idade, Anos	Interv., n (M/F)	Resultados
Esser D et al (91)	SFA/MUFA/ ômega-3	3 dias	Dieta rica em SFA/MUFA/ ômega-3	95g SFA (54%)/ MUFAs (83%)/ n-3(40%)	Magros e obesos sem diabetes	62 anos (media)	18M magros/ 18M obesos	MUFA redução da pressão arterial e rigidez arterial
Schiano V et al (92)	Ômega-3/ sem intervenção	12 sems	Cápsula	1g ômega-3	Pacientes com claudicação intermitente	66 anos (media)	29M/3F	Melhora da VFM/função endotelial
Tousoulis D et al (93)	Ômega-3 (46% EPA e 38% DHA) x placebo	12 sems	Cápsula	2g ômega-3	Sd metab. sem DCV/doenças crônicas	44.31 ±12.23	14F/15M	Melhora função endothelial (VFM e VOP)
Goodfellow J et al (94)	n-3 marinho com 85% EPA/DHA x placebo	12 sems	Cápsula	4g ômega-3	Hipercolesterolêmicos	50 e 56 (medias)	19M/10F	Melhora da VFM e dos níveis de triglicérides
Siasos G et al (95)	n-3 46% EPA e 38% DHA x placebo	12 sems	Cápsula	2g ômega-3	Fumantes	27.63 ±2.65	7F/13M	Melhora da VFM braquial, VOP
Din JN et al. (96)	Ômega-3 X placebo	6 sems	Cápsula	2g ômega-3	Fumantes	-	20M	Melhora função vasomotora endotelial
Tomiyama H et al (97)	EPA/ dieta	48 sems	Cápsula	1.8g EPA	Dislipêmicos	65 media	41M/43F	EPA atenuou a rigidez arterial
Takaki A et al (98)	Estatina/estatina +EPA	48 sems	Cápsula	1,8g EPA	Dislipêmicos e anteced. de DAC	53,9 - 67,1 media	41M/9F	EPA inibe progressão da rigidez arterial
***Omega* (99)**	EPA + DHA/óleo de oliva	48 sems	Cápsula	1g n-3 (460 mg EPA/380 mg DHA)/ 1 g MUFA	Pacientes internados por IAM	64 anos (media)	2841M/ 977F	Reduz eventos CV (não significativo para afirmar benefício
Angerer P et al (101)	EPA/placebo	96 meses	Cápsula	3,3g EPA+DHA (12sems)/1,65 g EPA+DHA (84 sems)	Alteração coronariana por angiografia	48.3 – 67.1 anos media	141M/30F	Não houve redução da progressão da aterosclerose
Lithander FE et al (100)	MUFA/SFA	2 dias	Dieta rica em MUFA/ rica em SFA	400ml com 36,4g MUFA e 33.8g SFA	Homens saudáveis não-fumantes	37.7 anos (media)	20	Não houve efeito das dietas sobre a rigidez arterial
Augustine AH et al. (102)	Ômega-3/ácido nicotínico LP/placebo	16 sems	Cápsula	4g ômega3, 2g ácido nicotínico	Adultos obesos ou sobrepeso com DLP	40 a 69	30F/45M	∅efeito análise vascular pelo EndoPAT
Mackay I et al. (42)	EPA + DHA x óleo de palma + soja	12 sems (12 sem WO)	Cápsula	850-882mg EPA + DHA	Claudicação intermitente e DVP	68,5 Media	46F/104M	Sem efeito na PCR ou na VOP braquial

WO, *whash out*; ALA, ácido α-linolênico; LA, ácido linoléico; DVP, doença vascular periférica; PCR, proteína C reativa; VOP, velocidade de onda de pulso da carótida; LP, liberação prolongada; P-OM3, ésteres etílicos do ômega-3; DLP, dislipidemia; DCV, doença cardiovascular; VFM, vasodilatação fluxo-mediada; IL-6, interleucina-6; DAC, doença arterial coronariana; IAM, infarto do miocárdio; AP, angina pectoris; EndoPAT, *peripheral arterial tone* (teste funcional de disfunção endotelial através da pressão arterial); CHO, carboidratos; ptn, proteínas; SFA: *sunflower oil* (óleo de girassol) MUFA: *monounsaturated fatty acid* (ácido graxo monoinsaturado); EPA, eicosapentaenóic acid; DHA, docosahexaenoic acid

Uma das limitações deste estudo foi a ausência de dosagem sérica dos componentes e metabólitos dos óleos suplementados. Por isto não foi possível confirmar a absorção e a metabolização em EPA e DHA na população idosa estudada. Estes valores seriam importantes para concluirmos se idosos têm uma boa conversão de PUFA em seus derivados e se a dose utilizada em nosso estudo foi suficiente para obtermos um nível sérico satisfatório e seus efeitos benéficos implicados. Esta pode ser a justificativa para os efeitos não terem sido ainda mais significativos no grupo da linhaça. Além disto, o uso de óleos com sua composição mista pode ter sido um fator confundidor dos resultados, uma vez que todos os óleos continham frações de ALA, LA e ácido oléico em diferentes proporções, podendo trazer benefícios, mesmo que em pequenas proporções, alterando os resultados finais tanto nos marcadores inflamatórios como na reatividade endotelial. Isto justifica a ação positiva dos três óleos suplementados, em pontos diferentes analisados como marcadores inflamatórios (PCRus, relação ApoB/ApoA1) e função endotelial (VFM e CIMT).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dieta ocidental é caracterizada por alta ingesta de ômega-6 e baixa de ômega-3, no entanto, no período Paleolítico, quando o perfil genético humano foi estabelecido, havia um balanço entre os dois ácidos graxos. Hoje, os humanos vivem num ambiente nutricional que difere daquele para o qual nossa constituição genética foi selecionada[4]. Neste cenário, o perfil lipídico sérico apresenta alterações que levam a outras doenças com morbi-mortalidade altas, todas relacionadas com inflamação e oxidação lipídica como aterosclerose, hipertensão, neoplasias, artrites, doenças neurodegenerativas e até déficit cognitivo. A terapia com estatina foi um recurso encontrado para reduzir mortalidade e morbidade em pacientes com DCV, no entanto vários *trials* têm reportado a significância do risco cardiovascular residual após o tratamento do LDL-colesterol até os níveis desejados, o que reflete a natureza complexa da doença[38,103]. A obesidade, principalmente quando está associada à obesidade visceral, prejudica a função endotelial, aumenta a relação intima-media (espessura) e a espessura vascular da media, assim como a rigidez arterial[104].

O presente estudo traz evidências para a natureza cardioprotetora da substituição das gorduras saturadas e gorduras trans por óleos vegetais contendo PUFA e MUFA. Sua ação sobre os biomarcadores inflamatórios e a disfunção endotelial indica que o seu uso, por ser acessível e com boa disponibilidade, é uma grande opção na prevenção secundária da doença arterial coronariana em populações com características tão marcantes de inflamação crônica como idosos obesos ou com sobrepeso. Por isto, a importância deste trabalho, pioneiro ao avaliar o efeito de intervenções alimentares sobre a inflamação presente nesta população de perfil cada vez mais frequente nos atendimentos de saúde, analisadas de forma não-invasiva e através de marcadores inflamatórios séricos e marcadores precoces de aterosclerose subclínica como VFM e CIMT, ambos de valor comprovado cientificamente.

Novos estudos são necessários para que o efeito benéfico sugerido por este trabalho seja confirmado e resulte em uma ferramenta útil no tratamento médico de doenças cada vez mais frequentes e causadoras de grandes complicações. A escolha correta dos alimentos e principalmente do tipo de gordura utilizada no dia a dia, com modificação dos hábitos alimentares em busca de alimentos funcionais, que no caso das gorduras insaturadas, são itens de baixo custo, fácil utilização, boa tolerabilidade e

acessível à população em geral, poderá ser positivamente afetada quando outros estudos confirmarem nossas conclusões.

9. CONCLUSÃO

A suplementação de ácidos graxos insaturados provenientes de óleos vegetais atenuou o quadro pró-inflamatório e pró-trombótico com resultados positivos sobre vários parâmentros bioquímicos como o PCRus, fibrinogênio, C3 e C4 com o óleo de linhaça, sobre a relação ApoB/ApoA1 com o óleo de oliva e sobre a relação ApoB/ApoA1 e a leptina com o óleo de girassol.

Os indicadores morfo-funcionais arteriais, interpretados pela redução da espessura da íntima da artéria carótida, tiveram resultados significativos estatisticamente com a suplementação dos três óleos, com melhores resultados para o óleo de linhaça (p 0,028) e o óleo de oliva (p 0,028). Já no que diz respeito reatividade endotelial ou funcionalidade, houve melhora da distensibilidade arterial com o óleo de girassol (p 0,001) e com o óleo de oliva, com resultados tendendo a positividade (p 0,054).

No conjunto, estes dados são compatíveis com a hipótese de que a introdução na dieta de ácidos graxos insaturados provenientes de óleos vegetais, inclusive em substituição às gorduras saturadas e às gorduras trans da alimentação, é benéfica para reduzir tanto marcadores bioquímicos como arteriais de risco cardiovascular, principalmente em idosos portadores de obesidade ou sobrepeso.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1- Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, et al. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N. Eng. J. Med*. 2006; 355:763-778.

2- Jazet IM, Pijl H, Meinders AE. Adipose tissue as an endocrine organ: impact on insulin resistance. *Neth J Med*. 2003; 61(6):194-212.

3- McGown C, Birerdinc A, Younossi ZM. Adipose tissue as an endocrine organ. *Clin Liver Dis*. 2014; 18(1):41-58.

4- Simopoulos AP. Evolutionary aspects of the dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratio: medical implications. In: Simopoulos AP, De Meester F (eds): A balanced omega-6/omega-3 fatty acid ratio, cholesterol, and coronary heart disease. World Rev Nutr Diet. Basel, Karger, 2009, vol 100, pp 1 – 21.

5- Eckel RH, Kahn R, Robertson R M, Rizza RA. Preventing cardiovascular disease and diabetes. A call to action from the American Diabetes Association and the American Heart Association. *Circulation*. 2006; 113:2943–2946.

6- Abdelmagid SM, Barbe MF, Safadi FF. Role of inflammation in the aging bones. *Life Sci*. 2015; 123:25-34.

7- Aharoni S, Lati Y, Aviram M, Fuhrman B. Pomegranate juice polyphenols induce a phenotypic switch in macrophage polarization favoring a M2 anti-inflammatory state. *Biofactors*. 2015; 41(1):44-51.

8- Wu J, Xia S, Kalionis B, et al. The role of oxidative stress and inflammation in cardiovascular aging. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:615312. doi: 10.1155/2014/615312.

9- Cinti S. Adipose tissues and obesity. *Ital J Anat Embryol*. 1999; 104(2):37-51.

10- Prado WL, Lofrano MC, Oyama LM, Dâmaso AR. *Rev Bras Med Esporte*. 2009; 15:(5)378-383.

11- Das UN. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition*. 2001;17(11-12):953-66.

12- Carvalho MHC, Colaço AL, Fortes ZB. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006; 50: 304-312.

13- Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature.* 2006; 444: 875-880.

14- Pontiroli AE, Pizzocri P, Koprivec D, et al. Body weight and glucose metabolism have a different effect on circulating levels of ICAM-1, E-selectin, and endothelin-1 in humans. *Eur. J. Endocrinol.* 2004; 150:195–200.

15- Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, et al. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation*. 2002; 105:804-9.

16- Hsueh WA, Quiñones MJ. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am J Cardiol*. 2003; 92(suppl):10J–17J.

17- Nigro J, Osman N, Dart AM, Little PJ. Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocrine Reviews.* 2006; 27(3):242-259.

18- Meyers MR, Gokce N. Endothelial disfunction in obesity: etiological role in atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2007; 14:365-369.

19- Gori T, Muxel S, Damaske A, et al. Endothelial function assessment: flow-mediated dilation and constriction provide different and complementary information on the presence of coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2012; 33,363–71.

20- Saleh, Mohamed Hassan. O impacto da cirurgia bariátrica na função endothelial, variáveis ecocardiográficas e perfil inflamatório. 2011. 125f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas – Área de concentração: Medicina, Tecnologia e Intervenção em Cardiologia) - Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, São Paulo

21- Neuteufl T, Heher T, Katzenschlager R, et al. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *Am J Cardiol.* 2000; 86:207-10.

22- Liao X, Norata GD, Polak JF, et al. Normative values for carotid intima media thickness and its progression: Are they transferrable outside of their cohort of origin? *Eur J Prev Cardiol*. 2016; 23(11):1165–1173.

23- Tolezani, Elaine C. Determinantes das propriedades funcionais e estruturais de grandes artérias em uma população de indivíduos adultos saudáveis. 2012. 75f.

Tese (Doutorado em Ciências Médicas -. Programa de Cardiologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo

24- Santo IFE, Faria EC. Valores de referência da espessura da camada íntima-média de artérias carótidas em adultos brasileiros. In: Congresso Interno de Iniciação Científica, 18., 2010, Campinas. Caderno de resumos. Campinas, SP : UNICAMP, 2010

25- Saleh MH, Bertolami MC, Assef JE, et al. Improvement of atherosclerotic markers in non-diabetic patients after bariatric surgery. *Obes Surg*. 2012; 22(11):1701-7.

26- Maher V, O'Dowd M, Carey M, et al. Association of central obesity with early Carotid intima-media thickening is independent of that from other risk factors. *Int J Obes*. 2009; 33(1):136–43.

27- Sala-Vila A, Cofán M, Pérez-Heras A, et al. Fatty acids in serum phospholipids and carotid intima-media thickness in Spanish subjects with primary dyslipidemia. *Am J Clin Nutr*. 2010; 92:186–93.

28- Polak JF, Pencina MJ, Pencina KM, O'Donnell CJ, Wolf PA, D'Agostino RB. Carotid-wall intima–media thickness and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2011; 365:213-21.

29- Calder PC. n–3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clinical Science*. 2004; 107:1-11.

30- Dittrich M, Jahreis G, Bothor K, et al. Benefits of foods supplemented with vegetable oils rich in α-linolenic, stearidonic or docosahexaenoic acid in hpertriglyceridemic subjects: a double-blind, randomized, controlled trail. *Eur J Nutr*. 2015; 54(6):881-93.

31- Burdge G, Calder PC. Dietary alpha-linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective. *Nutr Res Rev*. 2006; 19:26-52.

32- Barceló-Coblijn G, Murphy EJ. Alpha-linolenic acid and its conversion to long chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res*. 2009; 48:355-374.

33- Goyens PLL, Spilker ME, Zock PL, Katan MB, Mensink RP. Conversion of alpha-linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of alpha-linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio. *Am J Clin Nutr*. 2006; 84:44-53.

34- Wien M, Rajaram S, Oda K, Sabaté J. Decreasing the linoleic acid to alpha-linolenic acid diet ratio increases eicosapentaenoic acid in erythrocytes in adults. *Lipids*. 2010; 45:683-92.

35- Khalesi S, Irwin C, Schubert M. Flaxseed consumption may reduce blood pressure: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *J Nutr*. 2015; 145:758-65.

36- Hooper L, Summerbell CD, Higgins JP, et al. Reduced or modified dietary fat for preventing cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011; 7:CD002137.

37- Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med*. 2008; 233:674-688.

38- Lee JH, O'Keefe JH, Lavie CJ, Harris WS. Omega‑3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability. *Nat. Rev. Cardiol*. 2009; 6:753-758.

39- Lacerda LD, Malm O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. *Estud. av*. 2008; 22(63):173-90.

40- U.S. Department of Health and Human Services; U.S. Environmental Protection Agency. Mercury Levels in Commercial Fish and Shellfish. Available at: http://www.cfsan.fda.gov/frf/sea-mehg.html. Accessed November 9, 2010

41- Duda MK, O'Shea KM, Tintinu A, et al. Fish oil, but not flaxseed oil, decreases inflammation and prevents pressure overload-induced cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2009; 81(2):319-27.

42- Mackay I, Ford I, Thies F, Fielding S, Bachooa 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; 221:514-20.

43- Pan A, Chen M, Chowdhury R, et al. Alpha-linolenic acid and risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2012; 96:1262-73.

44- Shen J, Wilmot KA, Ghasemzadeh N, et al. Mediterranean dietary patterns and cardiovascular health. *Annu Rev Nutr*. 2015; 35:11.1-11.25.

45- Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nut Biochem*. 2006; 17(7):429-45.

46- http://www.cnpso.embrapa.br/download/publicacao/documento_237.pdf - acessado em 23/05/2015

47- Gebauer SK, Psota TL, Harris WS, Kris-Etherton PM. Omega-3 fatty acid dietary recommendations on food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83(6):1526S-1535S.

48- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation*. 2002;106(25):3143-421.

49- Correti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilatation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39:257–65.

50- Teixeira HNP, Mesquita ET, Ribeiro ML, et al. Estudo da reatividade vascular em portadores de HIV com e sem uso de inibidor de protease. *Arq. Bras. Cardiol*. 2009; 93(4):367-373

51- Scaglione R, Argano C, Di Chiara T, Licata G. Obesity and cardiovascular risk: the new public health problem of worldwide proportions. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2004; 2(2):203–12.

52- Safar ME, Thomas F, Blacher J, et al. Metabolic syndrome and age-related progression of aortic stiffness. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 47(1):72-75.

53- Kim OY, Paik JK, Lee JY, Lee SH, Lee JH. Follow-ups of metabolic, inflammatory and oxidative stress markers, and brachial-ankle pulse wave velocity in middle-aged subjects without metabolic syndrome. *Clin Exp Hypertens*. 2013; 35(5):382-88.

54- Carvalho APSO, Uehara SK, Netto JFN, Rosa G. Hypocaloric diet associated with the consumption of jam enriched with microencapsulated fish oil decreases insulin resistance. *Nutr Hosp*. 2014; 29(5):1103-1108.

55- He K, Liu K, Daviglus ML, et al. Intakes of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and fish in relation to measurements of subclinical atherosclerosis. *Am J Clin Nutr*. 2008; 88(4):1111-1118.

56- Sekikawa A, Curb JD, Ueshima H, et al. Marine-derived n-3 fatty acids and atherosclerosis in Japanese, Japanese Americans, and Whites: a cross-sectional study. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52(6):417-424.

57- Hino A, Adachi H, Toyomasu K, et al. Very long chain n-3 fatty acids intake and carotid atherosclerosis An epidemiological study evaluated by ultrasonography. *Atherosclerosis*. 2004; 176:145-149.

58- Chagas APRC. Associação do consumo de ácidos graxos ômega-3 com a resposta inflamatória sistêmica e função endotelial em pacientes com infarto do miocárdio. 2014. 74f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas -. Programa de pós-graduação em Ciências Médicas) - Universidade de Brasília, Brasília.

59- van Bussel BCT, Henry RMA, Schalkwijk CG, et al. Fish Consumption in Healthy Adults Is Associated with Decreased Circulating Biomarkers of Endothelial Dysfunction and Inflammation during a 6-Year Follow-Up. *J. Nutr*. 2011; 141:1719–1725.

60- Walldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *Lancet*. 2001; 358:2026–33.

61- Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004; 364:937-52.

62- Pan A, Yu D, Demark-Wahnefried W, Franco OH, Lin X. Meta-analysis of the effects of flaxseed interventions on blood lipids. *Am J Clin Nutr*. 2009; 90:288–97.

63- Michas G, Micha R, Zampelas A. Dietary fats and cardiovascular disease: Putting together the pieces of a complicated puzzle. *Atherosclerosis*. 2014; 234:320-328.

64- Barceló-Coblijn G, Murphy EJ, Othman R, Moghadasian MH, Kashour T, Friel JK. Flaxseed oil and fish-oil capsule consumption alters human red blood cell n–

3 fatty acid composition: a multiple-dosing trial comparing 2 sources of n–3 fatty acid. *Am J Clin Nutr*. 2008; 88:801-9.

65- de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*. 1999; 99:779 -785.

66- Rastogi T, Reddy KS, Vaz M, et al. Diet and risk of ischemic heart disease in India. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79:582–592.

67- Derbali A, Mnafgui K, Affes M, et al. Cardioprotective effect of linseed oil against isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats: a biochemical and electrocardiographic study. *J Physiol Biochem*. 2015; 71:281–288.

68- Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: Diet and reinfarction trial (DART). *Lancet*. 1989; 2:757-61.

69- Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI Prevenzione trial Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico [errata in Lancet 2001;357:642 and Lancet 2007;369:106]. *Lancet.* 1999; 354:447-55.

70- Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis [published correction appears in Lancet 2007; 370:220]. *Lancet.* 2007; 369:1090–8.

71- Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR, Ventura HO. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54(7):585-94.

72- Matsuzaki M, Yokoyama M, Saito Y, et al. Incremental effects of eicosapentaenoic acid on cardiovascular events in statin-treated patients with coronary artery disease - secondary prevention analysis from JELIS. *Circ J*. 2009; 73:1283–1290.

73- Sala-Vila A, Guasch-Ferré M, Hu FB, et al. Dietary alpha-linolenic acid, marine n-3 fatty acids, and mortality in a population with high fish consumption: findings from the PREvencion con DIeta MEDiterranea (PREDIMED) Study. *J Am Heart Assoc*. 2016; 5:e002543 doi: 10.1161/JAHA.115.002543.

74- Zhao G, Etherton TD, Martin KR, West SG, Gillies PJ, Kris-Etherton PM. Dietary alpha-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. *J Nutr*. 2004; 134:2991–2997.

75- Bemelmans WJ, Lefrandt JD, Feskens EJM, et al. Increased alphalinolenic acid intake lowers C-reactive protein, but has no effect on markers of atherosclerosis. *Eur J Clin Nutr*. 2004; 58:1083-1089.

76- Satoh N, Shimatsu A, Kotani K, et al. Highly purified eicosapentaenoic acid reduces cardio-ankle vascular index in association with decreased serum amyloid A-LDL in metabolic syndrome. *Hyperten Res*. 2009; 32:1004–1008.

77- Geleijnse JM, Giltay EJ, Schouten EG, et al. Effect of low doses of n-3 fatty acids on cardiovascular diseases in 4,837 post-myocardial infarction patients: Design and baseline characteristics of the Alpha Omega Trial. *Am Heart J*. 2010; 159:539-546.e2.

78- Eussen SRBM, Geleijnse JM, Giltay EJ, Rompelberg CJM, Klungel OH, Kromhout D. Effects of n-3 fatty acids on major cardiovascular events in statin users and non-users with a history of myocardial infarction. *Europ Heart Journ*. 2012; 33, 1582-1588.

79- Hoogeveen EK, Geleijnse JM, Kromhout D, Giltay EJ. No effect of n-3 fatty acids on high-sensitivity C-reactive protein after myocardial infarction: the Alpha Omega Trial. *Eur J Prev Cardiol*. 2014; 21(11):1429-36.

80- Hlais S, El-Bistami D, Rahi BE, Mattar MA, Obeid OA. Combined fish oil and high oleic sunflower oil supplements neutralize their individual effects on the lipid profile of healthy men. *Lipids*. 2013; 48:853-61.

81- Cleland LG, James MJ, Neumann MA, D'Angelo M, Gibson RA. Linoleate inhibits EPA incorporation from dietary fish-oil supplements in human subjects. *Am J Clin Nutr*; l992; 55:395-9.

82- Esposito K, Marfella R, Ciotola M, et al. Effect of a Mediterranean-Style Diet on Endothelial Dysfunction and Markers of Vascular Inflammation in the Metabolic Syndrome A Randomized Trial. *JAMA*. 2004; 292:1440-1446.

83- Kouvari M, Notara V, Panagiotakos DB, et al. Exclusive olive oil consumption and 10-year (2004-2014) acute coronary syndrome incidence among cardiac patients: the GREECS observational study. *J Hum Nutr Diet*. 2016; 29(3):354-62.

84- Huth PJ, Fulgoni VL, Larson BT, et al. 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*. 2015; 6(6):674-93.

85- Guasch-Ferré M, Babio N, Martínez-González MA, et al. Dietary fat intake and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality in a population at high risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2015; 102(6):1563-73.

86- Guasch-Ferré M, Hu FB, Martínez-González MA, et al. Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Med*. 2014; 12:78.

87- Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Estruch R, Corella D, Fitó M, Ros E. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. *Prog Cardiovasc Dis*. 2015; 58(1):50-60.

88- Ramsden CE, Zamora D, Leelarthaepin B, et al. Use of dietary linoleic acid for secondary prevention of coronary heart disease and death: evaluation of recovered data from the Sydney Diet Heart Study and updated meta-analysis. *BMJ*. 2013; 346:e8707.

89- Woodhill JM, Palmer AJ, Leelarthaepin B, McGilchrist C, Blacket RB. Low fat, low cholesterol diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Adv Exp Med Biol*. 1978; 109:317-30.

90- Modena MG, Bonetti L, Coppi F, Bursi F, Rossi R. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 40:505-10.

91- Esser D, van Dijk SJ, Oosterink E, Müller M, Afman LA. A High-Fat SFA, MUFA, or n3 PUFA challenge affects the vascular response and initiates an activated state of cellular adherence in lean and obese middle-aged men. *J. Nutr*. 2013; 143:843–851.

92- Schiano V, Laurenzano E, Brevetti G, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid in peripheral arterial disease: Effect on lipid pattern, disease severity, inflammation profile, and endothelial function. *Clin Nutr*. 2008; 27:241-47.

93- Tousoulis D, Plastiras A, Siasos G, et al. Omega-3 PUFAs improved endothelial function and arterial stiffness with a parallel antiinflammatory effect in adults with metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2014; 232:10-16.

94- Goodfellow J, Bellamy MF, Ramsey MW, Jones CJH, Lewis MJ. Dietary supplementation with marine omega-3 fatty acids improve systemic large artery endothelial function in subjects with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35:265e70.

95- 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; 166:340–346.

96- Din JN, Archer RM, 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*. 2013; 99(3):168-74.

97- Tomiyama H, Takazawa K, Osa S, et al. Do eicosapentaenoic acid supplements attenuate age-related increases in arterial stiffness in patients with dyslipidemia?: A preliminary study. *Hypertens Res*. 2005; 28:651–655.

98- Takaki A, Umemoto S, Ono K, et al. Add-on therapy of EPA reduces oxidative stress and inhibits the progression of aortic stiffness in patients with coronary artery disease and statin therapy: a randomized controlled study. *J Atheroscler Thromb*. 2011; 18(10):857-66.

99- Rauch B, Schiele R, Schneider S, et al. OMEGA, a randomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction. *Circulation*. 2010; 122:2152-2159.

100- Lithander FE, Herlihy LK, Walsh DM, Burke E, Crowley V, Mahmud A. Postprandial effect of dietary fat quantity and quality on arterial stiffness and wave reflection: a randomised controlled trial. *Nutr J*. 2013; 12:93.

101- Angerer P, Kothny W, Störk S, von Schacky C. Effect of dietary supplementation with v-3 fatty acids on progression of atherosclerosis in carotid arteries. *Cardiovasc Res*. 2002; 54:183–190.

102- Augustine AH, Lowenstein LM, Harris WS, Shearer GC, Block RC. Treatment with omega-3 fatty acid ethyl-ester alters fatty acid composition of lipoproteins in overweight or obese adults with insulin resistance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2014; 90(2-3):69–75.

103- Jacobson TA. Beyond lipids: the role of omega-3 fatty acids from fish oil in prevention of coronary heart disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2007; 9:145-53.

104- Briones AM, Aras-López R, Alonso MJ, Salaices M. Small artery remodeling in obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmac*. 2014; 12:427-37.