Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Impacto da incorporação de ômega 3 na funcionalidade
da lipoproteína de alta densidade: Ensaio clínico aleatorizado,
paralelo e controlado**

Flávia De Conti Cartolano

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

Área de Concentração: Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

São Paulo
2018

Impacto da incorporação de ômega 3 na funcionalidade da lipoproteína de alta densidade: Ensaio clínico aleatorizado, paralelo e controlado

Flávia De Conti Cartolano

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

Área de Concentração: Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Versão corrigida
São Paulo
2018

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

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

De Conti Cartolano, Flávia

Impacto da incorporação de ômega 3 na funcionalidade da lipoproteína de alta densidade: Ensaio clínico aleatorizado, paralelo e controlado / Flávia De Conti Cartolano; orientadora Nágila Raquel Teixeira Damasceno; coorientadora Marcelo Macedo Rogero. -- São Paulo, 2018.
129 p.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Lipoproteína de alta densidade. 2. Tamanho de partícula. 3. EPA. 4. DHA. 5. Capacidade antioxidante. I. Raquel Teixeira Damasceno, Nágila, orient. II. Macedo Rogero, Marcelo, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Renato De Conti** e **Ana Lúcia Gonçalves De Conti**, que muito se esforçaram pela minha educação, e por me ensinarem desde criança que o aprendizado está acima de tudo. Sem eles, minha formação na Universidade de São Paulo não seria possível.

Ao meu esposo **Etienne Américo Cartolano Júnior**, por seu companheirismo e apoio incondicional no meu crescimento profissional. Sua paciência e incentivo torna mais fácil o caminho a ser percorrido. Obrigada por me ensinar a sonhar.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Nágila, pela orientação e dedicação na condução deste trabalho e acima de tudo, por acreditar, confiar, ensinar, insistir e persistir sempre, dando o exemplo de amor à arte da pesquisa e da educação, além de todas as oportunidades concedidas;

Ao professor Marcelo Macedo Rogero, pela co-orientação;

À minha família, por serem responsáveis diretamente por cada conquista alcançada;

Aos companheiros de pesquisa do Laboratório de Nutrição Humana, pela contribuição na coleta e tabulação de dados, nas análises bioquímicas e discussões enriquecedoras, bem como pela amizade;

Aos queridos alunos Gabriela e Alexandre, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, e que de alunos, se transformaram em amigos para a vida;

Às colegas de pós-graduação e amigas Maria Camila e Mariana, por estarem comigo desde o início desta jornada;

Às funcionárias Geni, Rosana e Liânia pela ajuda valiosa durante os experimentos;

Às professoras Elisabeth Torres, Dulcinéia Saes Parra Abdala e Sayuri Miyamoto, pela disponibilização de seus respectivos laboratórios para a realização das análises;

Aos alunos do Laboratório de Pesquisa de Lipídeos Modificados, especialmente Maria Fernanda, Alex e Adriano, pela orientação e ajuda durante as análises;

Ao professor Antônio Martins Figueiredo Neto e sua equipe, pela colaboração e suporte em todos os projetos;

Aos profissionais do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário pela imensurável ajuda na coleta de dados;

Aos funcionários da Faculdade de Saúde Pública, e especialmente do Departamento de Nutrição, pela ajuda nas mais diversas situações;

Aos voluntários do projeto, que se disponibilizaram a participar desse estudo; sem eles, nada seria possível;

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida;

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fluidos Complexos (INCT-FCx) e ao Núcleo de Pesquisa em Fluidos Complexos – NAP-FCx, pelo subsídio financeiro.

À Faculdade de Saúde Pública que me acolheu desde a minha graduação e, definitivamente, transformou a minha vida.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”

(Albert Einstein)

Cartolano, FDC. Impacto da incorporação de ômega 3 na funcionalidade da lipoproteína de alta densidade: Ensaio clínico aleatorizado, paralelo e controlado [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Apesar de classicamente a lipoproteína de alta densidade (HDL) ser descrita como um fator de risco independente para as doenças cardiovasculares (DCV), devido ao seu papel no transporte reverso de colesterol (TRC), atualmente sabe-se que esta partícula exerce múltiplos mecanismos biológicos que podem contribuir para esta cardioproteção, com estudos indo além do conteúdo de colesterol associada à HDL (HDL-C). **OBJETIVO:** Avaliar o impacto da suplementação de ω -3 no perfil de ácidos graxos, tamanho e capacidade antioxidante da HDL. **MÉTODOS:** Estudo clínico, aleatorizado, controlado, duplo cego e paralelo, onde foram incluídos 147 indivíduos adultos, com fatores de risco cardiovascular, que foram alocados no grupo ω -3 (n=77 – 3,0 g/dia contendo 1,8 g de EPA+DHA) ou no grupo ω -6 (n=70 – 3,0 g/dia de óleo de girassol contendo 1,95 g de ácido linoleico). No início (T0) e após 8 semanas (T8) amostras de sangue foram coletadas e, a partir do plasma ou soro, foram analisados o perfil lipídico (CT, HDL-C, LDL-C, TG), as apolipoproteínas AI, CII e CIII, as subfrações da HDL (Lipoprint®), a atividade da paraoxonase (PON1) e da proteína transportadora de éster de colesterol (CETP), a capacidade antioxidante da HDL (método experimental) e o perfil de ácidos graxos e conteúdo de AGNEs da HDL. Os resultados do efeito do tempo, da intervenção e das interações entre os parâmetros monitorados e os desfechos foram realizados com o auxílio do programa SPSS® versão 20.0. O valor de significância considerado foi de $p < 0,05$. **RESULTADOS:** Os grupos ω -3 e ω -6 eram semelhantes entre si em relação a idade, sexo, tabagismo e uso de medicamentos, ambos apresentando alta prevalência de hipertensão e dislipidemia. Nos dois grupos, houve redução em todos os marcadores lipídicos, exceto a concentração de HDL-C, que aumentou. Observou-se o efeito do tempo no conteúdo de HDL_{AGNEs} ($\Delta = -16,2\%$), no percentual de HDL_{GRANDE} ($\Delta = 20,1\%$) e de HDL_{PEQUENA} ($\Delta = -5,0\%$). O aumento de EPA na HDL se associou à menor chance de ter elevação da atividade da PON1 (OR=0,446; IC=0,200-0,994), da concentração de HDL_{AGNEs} (OR=0,275; IC=0,113-0,660) e do percentual de HDL_{PEQUENA} (OR=0,337; IC=0,146-0,782). Observou-se ainda que o EPA se associou a, aproximadamente, 3,5 mais chances de aumento no percentual da HDL_{GRANDE} (OR=3,522; IC=1,652-7,507). Quanto ao aumento de DHA na HDL, este esteve associado de maneira significativa à diminuição da concentração de Apo AI (OR=0,351; IC=0,150-0,821), além da atividade da PON1 (OR=0,226; IC=0,110-0,639) e da concentração de HDL_{AGNEs} (OR=0,275; IC=0,113-0,668). Resultados similares aos obtidos com o EPA foram observados para o DHA e o tamanho da HDL. Não foi constatado efeito da incorporação de EPA e DHA na resistência à oxidação. **CONCLUSÃO:** A intervenção com ω -3 promoveu mudanças na composição da partícula de HDL, aumentando o percentual das subfrações maiores, sem, contudo, modificar sua capacidade antioxidante.

Descritores: Lipoproteína de alta densidade; Tamanho de partícula; EPA; DHA; *Lag time*.

Cartolano, FDC. Impact of omega 3 incorporation on the functionality of high-density lipoprotein: Randomized, parallel and controlled clinical trial [thesis]. São Paulo: School of Public Health of University of Sao Paulo; 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND: Although high-density lipoprotein (HDL) is classically described as an independent risk factor for cardiovascular disease (CVD), because of its role in reverse cholesterol transport (RCT), currently, it is known that this particle exerts multiple biological mechanisms that may contribute to this cardioprotection, with studies going beyond HDL cholesterol content (HDL-C). **OBJECTIVE:** To evaluate the impact of ω -3 supplementation on the fatty acid profile, size and antioxidant capacity of HDL. **METHODS:** A randomized, controlled, double-blind, parallel clinical study involving 147 adult subjects with cardiovascular risk factors, who were allocated into the ω -3 group (n=77 -3.0 g/day containing 1.8 g EPA + DHA) or the ω -6 group (n=70 -3.0 g/day of sunflower oil containing 1.95 g of linoleic acid). In the beginning (T0) and after 8 weeks (T8) blood samples were collected and, from plasma or serum, were analyzed lipid profile (TC, HDL-C, LDL-C, TG), apolipoproteins AI, CII and CIII, HDL subfractions (Lipoprint®), paraoxonase (PON1) and cholesterol ester carrier protein (CETP) activities, antioxidant capacity of HDL (experimental method), the fatty acid profile and NEFAs content HDL. Results of the effect of time, intervention and interactions between monitored parameters and outcomes were performed with the aid of SPSS® software version 20.0. The significance level considered was $p < 0.05$. **RESULTS:** The ω -3 and ω -6 groups were similar in relation to age, sex, smoking and medication use, both presenting high prevalence of hypertension and dyslipidemia. In both groups, there was a reduction in all lipid markers except HDL-C concentration, which increased. The effect of time on HDL_{NEFAs} content ($\Delta = -16.2\%$), and on the percentage of HDL_{LARGE} ($\Delta = 20.1\%$) and HDL_{SMALL} ($\Delta = -5.0\%$) were observed. Increasing EPA in HDL was associated with a lower chance of enhance PON1 activity (OR=0.446, CI=0.200-0.994), HDL_{NEFAs} concentration (OR=0.275, CI=0.113-0.660), and HDL_{SMALL} (OR=0.337, CI=0.146-0.782). It was also observed that EPA was associated with approximately 3.5 more chances of raising the percentage of HDL_{LARGE} (OR=3.522, CI=1.652-7.507). Increasing DHA in HDL was significantly associated with a decrease in Apo AI concentration (OR=0.351, CI=0.150-0.821), and also PON1 activity (OR=0.226, CI=0.110-0.639) and concentration of HDL_{NEFAs} (OR=0.275, CI=0.113-0.668). Similar results obtained with EPA were observed for DHA and HDL size. No effect of the incorporation of EPA and DHA on oxidation resistance was observed. **CONCLUSION:** The ω -3 intervention promoted changes in the composition of the HDL particle, increasing the percentage of the larger subfractions, without, however, modifying its antioxidant capacity.

Descriptors: High-density lipoprotein; Particle size; EPA; DHA; Lag time.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Aspectos epidemiológicos das doenças cardiovasculares e HDL-C	16
1.2 Metabolismo, capacidade antioxidante da HDL e saúde cardiovascular.....	18
1.3 Tamanho da HDL e saúde cardiovascular	21
1.4 Composição da HDL	22
1.5 Ácidos graxos ômega-3 e saúde cardiovascular	27
2. JUSTIFICATIVA	30
3. HIPÓTESE.....	32
4. OBJETIVO	33
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5.1 Delineamento do estudo.....	34
5.2 Cálculo amostral	34
5.3 Coleta de dados.....	36
5.4 Avaliação do perfil socioeconômico e história clínica	42
5.5 Antropometria, consumo alimentar e atividade física	42
5.6 Avaliação bioquímica	43
5.6.1 Obtenção de sangue	43
5.6.2 Marcadores do metabolismo lipídico.....	44
5.6.3 Concentração plasmática de glicose, insulina e hemoglobina glicada	44
5.6.4 Avaliação da atividade da paraoxonase 1	44
5.6.5 Tamanho da HDL e suas subfrações	45
5.6.6 Atividade da proteína transportadora de éster de colesterol.....	48
5.6.7 Obtenção da HDL	48
5.6.8 Capacidade antioxidante HDL.....	48
5.6.9 Análise de ácidos graxos na HDL	51
5.7 Análises Estatísticas.....	52
6. RESULTADOS	55
7. DISCUSSÃO	83
8. CONCLUSÃO.....	99
9. REFERÊNCIAS	100
10. ANEXOS.....	112
Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	113
Anexo 2: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário	115

Anexo 3: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública	116
Anexo 4: Livro do Paciente.....	117
Anexo 5: Questionário Socioeconômico e Clínico	122
Anexo 6: Composição Corporal, Eletrocardiograma e Pressão Arterial.....	124
Anexo 7: Parâmetros Antropométricos	125
Anexo 8: Recordatório Alimentar de 24h	126
Anexo 9: Questionário de Avaliação de Atividade Física Habitual.....	127

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. NÚMERO DE PUBLICAÇÕES RELACIONADAS AOS MECANISMOS SUBJACENTES ÀS PRINCIPAIS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA HDL.	19
FIGURA 2. FLUXOGRAMA DA COLETA DE DADOS.	38
FIGURA 3. FLUXOGRAMA DE TRIAGEM E INCLUSÃO DE INDIVÍDUOS.....	39
FIGURA 4. ANÁLISE DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS GRAXOS DAS CÁPSULAS	41
FIGURA 5. ETAPAS DA ANÁLISE DO SISTEMA LIOPRINT®	47
FIGURA 6. GRÁFICO GERADO NA ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA HDL	50
FIGURA 7. MODIFICAÇÕES NO TAMANHO DA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE, SEGUNDO TEMPO E INTERVENÇÃO.....	67
FIGURA 8. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE, SEGUNDO TEMPO E INTERVENÇÃO.....	69
FIGURA 9. RAZÕES DE CHANCES (OR) AJUSTADO DA VARIAÇÃO DE EPA, DHA E RAZÃO ÔMEGA-6 ÔMEGA-3 E VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS RELACIONADOS À FUNCIONALIDADE DA HDL.....	78

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. CÁLCULO AMOSTRAL.....	36
---------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO, SEGUNDO INTERVENÇÃO.	56
TABELA 2. AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR DA POPULAÇÃO DE ESTUDO, SEGUNDO TEMPO E INTERVENÇÃO.	58
TABELA 3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FÍSICA DA POPULAÇÃO DE ESTUDO, SEGUNDO TEMPO E INTERVENÇÃO. ..	59
TABELA 4. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA DA POPULAÇÃO DE ESTUDO SEGUNDO SEXO, TEMPO E INTERVENÇÃO.	60
TABELA 5. PERFIL BIOQUÍMICO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO, SEGUNDO TEMPO E INTERVENÇÃO.	61
TABELA 6. PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE, SEGUNDO TEMPO E INTERVENÇÃO.	63
TABELA 7. VARIÁVEIS RELACIONADAS AO METABOLISMO DA HDL, SEGUNDO TEMPO E INTERVENÇÃO.	65
TABELA 8. SUBFRAÇÕES DA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE, SEGUNDO TEMPO E INTERVENÇÃO.	66
TABELA 9. MAPA DE CORES REPRESENTANDO AS CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIAÇÕES DOS PARÂMETROS DE FUNCIONALIDADE DA HDL E AS MUDANÇAS DE EPA, DHA E NA RAZÃO ÔMEGA 6 / ÔMEGA 3 NA LIPOPROTEÍNA.	71
TABELA 10. ANÁLISE DE TENDÊNCIA LINEAR DA VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FUNCIONALIDADE DA HDL SEGUNDO TERCIL DE VARIAÇÃO DE EPA DA LIPOPROTEÍNA APÓS INTERVENÇÃO.	73
TABELA 11. ANÁLISE DE TENDÊNCIA LINEAR DA VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FUNCIONALIDADE DA HDL SEGUNDO TERCIL DE VARIAÇÃO DE DHA DA LIPOPROTEÍNA APÓS INTERVENÇÃO.	74
TABELA 12. ANÁLISE DE TENDÊNCIA LINEAR DA VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FUNCIONALIDADE DA HDL SEGUNDO TERCIL DE VARIAÇÃO DA RELAÇÃO ÔMEGA 6 / ÔMEGA 3 DA LIPOPROTEÍNA APÓS INTERVENÇÃO. ..	75
TABELA 13. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA): MODIFICAÇÕES DOS ÁCIDOS GRAXOS NA HDL.	80
TABELA 14. CORRELAÇÃO ENTRE AS COMPONENTES PRINCIPAIS (CP) E OS PARÂMETROS DE FUNCIONALIDADE DA HDL.	82

Siglas utilizadas

AA	Ácido araquidônico
ABCA-1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
AGNEs	Ácidos graxos não esterificados
ALA	Ácido α -linolênico
Apo AI	Apolipoproteína AI
Apo AII	Apolipoproteína AII
Apo B	Apolipoproteína B
Apo CII	Apolipoproteína CII
Apo CIII	Apolipoproteína CIII
AVE	Acidente vascular encefálico
CC	Circunferência da cintura
CE	Colesterol esterificado
CETP	Proteína de transferência de colesterol
CP	Componente Principal
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DHA	Ácido docosaexaenoico
DLP	Dislipidemia
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
D5D	Delta 5 desaturase
D6D	Delta 6 desaturase
EPA	Ácido eicosapentaenoico
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	Colesterol associado à lipoproteína de alta densidade
HNF	Fator nuclear hepático
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment for Insulin Resistance</i>
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IMC	Índice de massa corporal
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	Colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade
LisoPC	Lisofosfatidilcolina
LLE	Lipoproteína lipase endotelial
LLH	Lipoproteína lipase hepática
LPL	Lipoproteína lipase
LXR	Receptor X hepático
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Ácido fosfatídico

PC	Fosfatidilcolina
PCA	Análise de Componente Principal
PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
PLTP	Proteína transportadora de fosfolipídios
PON1	Paraoxonase 1
PPARs	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PS	Fosfatidilserina
PUFAs	Ácido graxo poli-insaturado
RXR	Receptor retinóide X
SCD-16	Steroyl-CoA desaturase 16
SCD-18	Steroyl-CoA desaturase 18
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SMet	Síndrome metabólica
SR-B1	Receptor scavenger classe B tipo 1
SREBP	Proteínas de ligação do elemento de regulação do esterol
TG	Triglicerídeos
TRC	Transporte reverso do colesterol
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
ω -3	Ácido graxo ômega-3
ω -6	Ácido graxo ômega-6

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos das doenças cardiovasculares e HDL-C

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem a principal causa de morte no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2012, as DCV foram a principal causa de mortalidade não só entre as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), mas também entre todas as causas de óbitos, totalizando 17,5 milhões de mortes naquele ano (OMS, 2014a). Estimativas para o ano 2030 são de 23,3 milhões de óbitos, representando um aumento de aproximadamente 33% (OMS, 2011).

No Brasil, no relatório de 2014 da OMS, 31% do total de mortes ocorridas em 2012 foram devido às DCV, representando 40% das mortes atribuídas às DCTN (OMS, 2014b). Logo, trata-se de um problema global, que impacta diretamente na expectativa de vida da população, no crescimento econômico e nos orçamentos destinados à saúde, acarretando significativo ônus ao sistema de saúde, bem como nos anos de produtividade. As DCV são ainda responsáveis pela aposentadoria precoce relativa à incapacidade laboral (BESSER et al., 2006).

Classicamente, as variáveis idade, hipertensão arterial sistêmica, (HAS), diabetes *mellitus* (DM), tabagismo, elevação do colesterol total (CT) e baixa concentração de colesterol associado à lipoproteína de alta densidade (HDL-C) estão relacionados com um maior risco cardiovascular (DAWBER et al., 1957; DAWBER et al., 1959; DOYLE et al., 1964; DAWBER & KANNEL, 1966; D'AGOSTINO et al., 2008; MOSCA et al., 2011).

Neste cenário, estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado há décadas que o baixo conteúdo de HDL-C está forte e, independentemente, associado com a doença arterial coronariana (DAC) (GOFMAN et al., 1966; GORDON et al., 1977; BARTER et al., 2007a; DI ANGELANTONI et al., 2009). Di Angelantonio et al. (2009) propuseram que a avaliação do

perfil lipídico poderia ser realizada somente por meio da mensuração do HDL-C e do CT, sem a necessidade de jejum e a mensuração da concentração de triglicerídeos (TG).

A prevenção primária de DCV visa, dentre outros objetivos, a melhora do perfil lipídico geral, onde a redução do colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), da concentração de TG e aumento do HDL-C constituem alvos essenciais nos programas de políticas públicas (KONES, 2011). Para tanto, as diretrizes recomendam a administração, nas prevenções primárias e secundárias, de estatinas, em razão do impacto positivo sobre o perfil. Fulcher et al. (2015) recentemente confirmaram novamente a eficácia desta classe de medicamento, tanto na redução do colesterol como na prevenção da mortalidade cardiovascular em uma metanálise que incluiu dados de 174.000 indivíduos de 27 ensaios clínicos. Estas drogas afetam principalmente as concentrações circulantes de LDL-C, todavia outros parâmetros do perfil lipídico e marcadores de inflamação afetam igualmente a progressão e os desfechos das DCV, tais como tamanho de partícula e a proteína C reativa (PEARSON et al., 2003; KRAUSS, 2010).

Embora o uso das estatinas tenha trazido inquestionáveis benefícios na prevenção primária e secundária de eventos cardiovasculares, o reduzido impacto desta classe de medicamentos no perfil da lipoproteína de alta densidade (HDL) tem estimulado o desenvolvimento de vários estudos baseados na resposta clínica à novas drogas. Dentre estes, destacam-se os insatisfatórios resultados observados com o uso de ezetimiba (ROSSEBØ et al., 2008), torcetrapibe com estatinas (BARTER et al., 2007b) e associações como laropiranto e niacina (BODEN, et al., 2011). Em uma recente meta-análise incluindo 39 ensaios clínicos, totalizando 117.411 pacientes em uso de niacina, fibrato ou inibidores da proteína de transferência de éster colesterol (CETP), demonstrou-se a ineficácia destas drogas na redução da mortalidade total ou por DAC, infarto agudo do miocárdio (IAM) ou acidente vascular encefálico (AVE) naqueles indivíduos em uso concomitante de estatinas (KEENE et al., 2014).

Sabendo-se que a HDL exerce um importante papel cardioprotetor, torna-se relevante avaliar estratégias pautadas nas modificações do estilo de vida e, particularmente, envolvendo a alimentação, pois esta apresenta múltiplos nutrientes e compostos bioativos potencialmente capazes de prevenir ou modular vários fatores de risco cardiovasculares envolvendo esta lipoproteína.

1.2 Metabolismo, capacidade antioxidante da HDL e saúde cardiovascular

Classicamente, a atividade antiaterogênica da HDL está relacionada ao transporte reverso de colesterol (TRC). Contudo, nas últimas décadas, a inibição da expressão das moléculas de adesão e o poder antioxidante, anti-inflamatório (EISENBERG, 1984; RYE et al., 1999; VAN HIMBERGEN et al., 2005) e antitrombótico (NOFER et al., 2010) têm sido associados à papeis cardioprotetores da HDL. Em adição, tem sido proposto que a capacidade de captação de lipídios e o tamanho da partícula de HDL estejam associados com o seu efeito cardioprotetor (ROLAND e MARANHÃO; 1993; EMERSON e MARANHÃO; 2004, YVAN-CHARVET et al., 2010; PIRILLO et al.; 2013). Esta heterogeneidade de funções biológicas, que não pode ser inferida somente a partir da análise das concentrações plasmáticas de HDL-C, levou ao crescente interesse em avaliar as principais atividades biológicas da HDL (**Figura 1**), com a finalidade de identificar o impacto da funcionalidade desta lipoproteína no risco cardiovascular e na incidência de eventos cardíacos fatais e não fatais.

FIGURA 1. Número de publicações relacionadas aos mecanismos subjacentes às principais atividades biológicas da HDL. Fonte: PubMed, 01/06/2018.

A primeira e mais estudada hipótese para o papel antiaterogênico da HDL baseia-se no TRC. O TRC envolve o metabolismo intravascular da HDL, no qual o colesterol dos tecidos periféricos é captado pela lipoproteína retornando ao fígado, onde é incorporado à bile para posterior excreção juntamente com as fezes (RYE e BARTER, 2014).

Os substratos que dão início ao TRC se originam no fígado e no intestino, locais de síntese da apolipoproteína AI (Apo AI), sendo a HDL secretada no formato de uma partícula discoide com baixo conteúdo de lipídios associados à Apo AI. Estas partículas passam a incorporar fosfolipídios e colesterol dos tecidos periféricos por meio da ação da proteína *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA-1), tornando-se partículas de HDL esféricas (JESSUP et al., 2006). O colesterol captado é subsequentemente esterificado pela enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT). Nesta etapa, a CETP passa a desempenhar papel essencial na transferência do colesterol esterificado (CE) da HDL por TG presentes nas partículas ricas em apolipoproteína B (Apo B) (FISHER et al., 2012). As enzimas lipolíticas, a lipoproteína lipase hepática (LLH) e a lipoproteína lipase endotelial (LLE), hidrolisam os TG e fosfolipídios de HDL, e a ação sinérgica da proteína de transferência de fosfolipídios (PLTP) sobre HDL gera partículas menores que serão capazes de reiniciar o ciclo de captação de colesterol dos tecidos periféricos (YAZDANYAR et al.; 2011). Estima-se que 66% do CE retornem ao fígado pela ação da CETP, sendo o restante pela ligação direta da HDL ao receptor scavenger classe B tipo I (SR-B1) (BARTER et al., 2003). Este processo dinâmico de transferência de lipídios entre as lipoproteínas é fundamental para a modulação do TRC.

Em relação as propriedades antioxidantes da partícula de HDL, a remoção de lipídios oxidados da lipoproteína de baixa intensidade (LDL) representa o primeiro passo de proteção do dano oxidativo mediada pela HDL (KONTUSH e CHAPMAN, 2010). Uma vez incorporados na HDL, os lipídios oxidados podem ser degradados por enzimas antioxidantes que são transportadas pela HDL ou participar de reações de oxirredução com a Apo AI (GARNER et al., 1998).

Mais especificamente em relação às enzimas antioxidantes transportadas pela HDL, a paraoxonase 1 (PON1) é uma importante enzima que tem sido monitorada devido sua capacidade de hidrolisar fosfolipídios oxidados na LDL (ASSMANN e GOTTO, 2004), reduzindo os seus produtos de oxidação (hidroperóxidos e lisofosfatidilcolina) (CHAPMAN, 2004). Desse modo, a PON1 associada à HDL apresenta-se como um antioxidante indireto da LDL (KABAROGLU et al., 2004), conferindo maior propriedade cardioprotetora à HDL e reduzindo a aterogenicidade da LDL (ASSMANN e GOTTO, 2004). A PON1 é uma esterase cálcio-dependente sintetizada e secretada pelo fígado e associa-se à Apo AI, o que indica interação específica com a partícula de HDL (COSTA et al., 2005). Destaca-se que a atividade enzimática da PON1 é modulada por fatores ambientais como a dieta, estilo de vida, fármacos, assim como pela idade, fatores genéticos e presença de doenças, tais como DM e insuficiência renal crônica (COSTA et al., 2005).

1.3 Tamanho da HDL e saúde cardiovascular

As lipoproteínas são estruturas heterogêneas compostas por múltiplos componentes e que variam quanto ao tamanho, densidade e composição química da partícula. Desta maneira, as propriedades físicas das lipoproteínas vêm sendo estudadas, e sua variação sugere que o tamanho das partículas pode fornecer mais detalhes sobre o risco cardiovascular, que a análise isolada do conteúdo de colesterol associado à HDL (PACKARD et al., 2000; BERNEIS et al., 2002; OTVOS et al., 2011; DIFFENDERFER e SCHAEFER 2014). Contudo, a relação do tamanho das partículas de HDL e o risco cardiovascular ainda apresentam controvérsias na literatura.

De acordo com YVAN-CHARVET et al. (2010) e PIRILLO et al., (2013), partículas grandes de HDL são mais competentes no TRC, sugerindo-se então maior cardioproteção. Entretanto, pesquisas têm demonstrado que as partículas pequenas de HDL apresentam maior propriedade antioxidante e anti-inflamatória, evitando a oxidação da LDL por meio do

sequestro de radicais livres e remoção de produtos de oxidação (KONTUSH e CHAPMAN, 2010; CAMONT et al., 2011).

De fato, tem sido descrito que as partículas pequenas de HDL são mais eficientes do que as subfrações maiores em quelar hidroperóxidos lipídicos, por causa do esgotamento de esfingomielina, enriquecimento de Apo AI ou mesmo devido a conformação distinta desta apolipoproteína (KONTUSH e CHAPMAN, 2010). Além disso, as partículas pequenas e densas também seriam mais resistentes às modificações oxidativas (SHUHEI et al., 2010).

Joshi et al. (2016) observaram em 4114 homens e mulheres americanos afro descendentes provenientes do *Jackson Heart Study* e em 818 homens e mulheres caucasianos provenientes do *Framingham Offspring Cohort Study*, duas coortes de prevenção primária, que o conteúdo das partículas pequenas e densas de HDL foi responsável pela relação inversa entre HDL-C e a incidência da DAC nesta população. Gao et al. (2016), no entanto, observaram diminuição significativa das subfrações maiores de HDL em 337 pacientes hospitalizados com doença coronariana. Parra et al. (2014) também descreveram que o aumento do tamanho da partícula de HDL (>8,22 nm) esteve associado com menor espessura da carótida.

Desta maneira, apesar do conhecimento vigente no coletivo científico propor que partículas grandes de HDL são mais eficientes no TRC e que as partículas pequenas têm maior propriedade antioxidante, as evidências sobre a superioridade de uma em detrimento da outra na capacidade cardioprotetora da partícula são menos claras, fato que motiva a realização de novos estudos envolvendo a HDL.

1.4 Composição da HDL

Apesar das fortes evidências descritas na literatura provenientes de estudos epidemiológicos de meados do século XX, mais recentemente o papel cardioprotetor da

partícula de HDL foi questionado em estudos de randomização mendeliana (VOIGHT et al., 2012; HAASE et al., 2012).

Levando-se em conta o potencial papel antiaterogênico dessa partícula, postula-se que indivíduos com baixos conteúdos de HDL-C seriam mais propensos em desenvolver DCV. No entanto, pacientes portadores de mutações na apo AI, tais como apo AI_{Milano} e apo AI_{Paris}, apesar de apresentarem níveis plasmáticos muito baixos de HDL-C, têm risco relativo semelhante, ou mesmo reduzido, quando comparados aos indivíduos sem essas mutações (PÉREZ-MÉNDEZ et al., 1995; PÉREZ-MÉNDEZ et al., 2000, SIRTORI et al., 2001). Além disso, o conteúdo plasmático de HDL-C dentro dos parâmetros de normalidade não justifica a ausência de eventos clínicos, pois até 44% dos casos de doença arterial coronariana ocorrem em homens cujos valores de HDL-C são iguais ou superiores a 40 mg/dL e em 43% em mulheres com HDL-C iguais ou superiores a 50 mg/dL, de acordo com o estudo de *Framingham* (NAVAB et al., 2011).

A quantificação direta do número de partículas das lipoproteínas não era possível até algumas décadas atrás, quando a contribuição destas para DAC começou a ser compreendida como parâmetro sinérgico ao tradicional monitoramento do perfil lipídico (MCNAMARA et al., 2006). Devido à estas limitações metodológicas, a concentração do HDL-C tornou-se o indicador mais aceito e utilizado em comparação ao número de partículas de HDL.

Todavia, em determinadas situações fisiopatológicas, como no DM ou na síndrome metabólica (SMet), ou em intervenções farmacológicas – uso fibratos, inibidores de CETP ou niacina – uma determinada concentração plasmática de HDL-C não representa necessariamente o número e/ou o tamanho de partículas de HDL (MACLEAN et al., 2000; SAKAI et al., 2001; FESTA et al., 2005; , PÉREZ-MÉNDEZ et al., 2005; HU et al., 2009; GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2011)

Uma possível explicação para a controvérsia entre tamanho da HDL, HDL-C e DCV baseia-se no fato que a simples quantificação de colesterol associado à partícula não refletiria a complexidade estrutural e funcional desta lipoproteína. Sabe-se também que o colesterol não é o componente ativo da HDL (apesar de ser o mais extensamente estudado) e existem evidência de que algumas das funções potencialmente cardioprotetora da HDL dependem de componentes específicos desta partícula, como as apolipoproteínas e enzimas antioxidantes associadas (NOFER et al., 2004; TABET e RYE, 2009). Sugere-se que as subfrações de HDL, independente do conteúdo de colesterol por partícula, possam exercer papel distinto e, possivelmente, complementar no que se refere ao risco cardiovascular do indivíduo (SIRTORI et al., 2001; RADER, 2009).

Com os avanços no campo da espectrometria de massas, estudos da última década permitiram identificar mais de 80 proteínas associadas à HDL humana (HEINECKE et al., 2009; HOOFNAGLE e HEINECKE, 2009; DAVIDSSON et al., 2010; SHAH et al., 2013), que incluem proteínas estruturais, enzimas, proteínas de transferência de lipídios, proteínas de fase aguda, componentes do sistema complemento, proteinases, transferrina, entre outras (KONTUSH et al., 2015), com distribuição diferenciada, conforme o tamanho da partícula (DAVIDSON et al., 2009).

Em contraste com o interesse nas proteínas das partículas da HDL, os componentes lipídicos têm recebido menor interesse, embora uma rica heterogeneidade química caracterize o perfil lipídico desta partícula (WIESNER et al., 2009; YETUKURI et al., 2010; QUEHENBERGER et al., 2010; TOTH et al., 2013).

Os fosfolipídios constituem a maior parte dos lipídios da HDL, representando de 20 a 30% de sua massa. A fosfatidilcolina (PC) é o principal fosfolipídio plasmático e um lipídio estrutural da HDL, o que é consistente com sua distribuição entre todas as subfrações desta partícula (KONTUSH et al., 2015). Já a lisofosfatidilcolina (LisoPC), uma importante subclasse

dos fosfolipídios presentes na HDL, encontra-se mais predominante nas partículas pequenas e densas de HDL (CAMONT et al., 2013). Fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG), ácido fosfatídico (PA) e cardiolipina são fosfolipídios carregados negativamente presentes na HDL, o que pode acarretar em impacto significativo sobre a carga de sua superfície e interação com receptores (ROSENSEN et al., 2011; CAMONT et al., 2013). Desta maneira, a composição desses lipídios pode modular as interações com lipases lipoproteicas, proteínas da membrana, matriz extracelular e outros componentes proteicos, visto que estas interações são altamente carga-dependente (KONTUSH et al., 2015).

Dentre a classe dos esfingolipídios, a esfingomielina é o principal componente presente na HDL (WIESNER et al., 2009; CAMONT et al., 2013), onde exerce papel estrutural e é responsável pela rigidez da camada lipídica superficial (RYE et al., 1996; SAITO et al., 2000). Outros esfingolipídios bioativos que também se encontram na HDL, incluem os liso esfingolipídios, como a esfingosina-1-fosfato (S1P) (KONTUSH et al., 2007; NOFER e ASSAMANN, 2005; SCHERER et al., 2011) e as ceramidas - um esfingolipídio intermediário relacionado com a sinalização celular, apoptose, respostas inflamatórias, função mitocondrial e a sensibilidade à insulina (LIPINA e HUNDAL, 2011). Os ésteres de colesterol são responsáveis por 14 a 18% da massa da HDL, seguido pelos de TG (3 a 6%) e o colesterol livre (3 a 5%).

Em relação aos ácidos graxos que constituem os lipídios da partícula de HDL, o mais abundante é o ácido palmítico (C16:0), seguido pelo ácido esteárico (C18:0), o ácido linoleico (C18:2n-6), ácido araquidônico (C20:4n-6) e ácido oleico (C18:1n-9). Os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenoico (DHA) representam menos de 5% (NOORI et al., 2009; HARRIS et al., 2013).

Ressalta-se, como brevemente pontuado, que o perfil lipídico da HDL impacta na funcionalidade desta lipoproteína e também pode ser modificado em determinadas condições, como a dislipidemia (DLP) e DM tipo 2, assim como, de acordo com a concentração de HDL-C.

Kostara et al. (2017) utilizando a técnica de ressonância magnética identificaram que indivíduos saudáveis com baixo níveis de HDL-C (< 40 ml/dL) apresentaram partículas com núcleos enriquecidos com TG, em detrimento aos ésteres de colesterol e maior presença de ácidos graxos saturados. Na monocamada lipídica, observou-se menores quantidades de colesterol livre e esfingomielina.

Em uma coorte sueca, Stahlman et al. (2013) documentaram que indivíduos com DLP apresentavam partículas pequenas de HDL enriquecidas com LisoPC e TG ricos em palmitato. Kotronen et al. (2009) descreveram associação entre os ácidos graxos monoinsaturados palmitoleico (16:1 n-7) e oleico (18:1 n-9) com resistência à insulina, quando as subfrações de HDL foram analisadas.

Entretanto, apesar da existência de estudos observacionais relacionando determinados perfis lipídicos plasmático ou de subfrações de lipoproteínas com a presença de doenças ou alteração metabólica, pouco encontra-se descrito sobre os efeitos dos ácidos graxos EPA e DHA nesse perfil lipídico, apesar dos seus potenciais efeitos benéficos na concentração de TG, HDL-C e LDL-C (MORI et al., 1999; MORI et al., 2000; BELALCAZAR et al., 2010).

Desta maneira, aventa-se dizer que o HDL-C é apenas um marcador substituto, não funcional e fraco para estimar o número e tamanho de partículas de HDL, sem decifrar a composição heterogênea – que pode ser maior ainda em condições patológicas. Esta complexidade estrutural e funcional impediu, até o momento, a atribuição clara dos seus componentes às muitas funções cardioprotetoras desta lipoproteína. Para isso, faz-se necessário o conhecimento detalhado da relação estrutura-função das moléculas associadas à HDL. A

identificação das atividades biológicas mais relevantes desta lipoproteína e de seus mediadores associados, bem como de seus moduladores, é fundamental para o desenvolvimento bem-sucedido de drogas antiaterogênicas, de biomarcadores para diagnóstico, monitoramento de tratamento e acompanhamento de pacientes com risco aumentado para DCV, tendo a funcionalidade da HDL como foco.

1.5 Ácidos graxos ômega-3 e saúde cardiovascular

Os ácidos graxos da família ômega-3 (ω -3) estão inseridos no grupo dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) essenciais, sendo assim considerados por não serem sintetizados *de novo* pelos tecidos de vertebrados. Portanto, é necessária a ingestão desses pela dieta e/ou da suplementação (HOLMAN, 1986). O ω -3 possui estrutura química cuja primeira insaturação ocorre na posição 3 da cadeia carbônica, tendo a unidade metil terminal como referência (ROTH e HARRIS, 2010). Os principais representantes deste grupo são o ácido α -linolênico (ALA), encontrado principalmente em óleos vegetais (soja, canola e linhaça), o EPA e o DHA, ambos com origem em peixes marinhos (anchova, arenque, cavala, sardinha e salmão) (RATNAYAKE e GALLI, 2009). Apesar de essenciais, estudos *in vivo* em humanos mostraram que aproximadamente 5% do ALA é convertido em EPA, mas apenas 0,5% é convertido em DHA (PLOURDE e CUNNANE, 2007; POUDYAL et al., 2011).

Progressos substanciais foram obtidos na última década para tentar compreender as vias metabólicas e de sinalização celular pelas quais o ω -3 pode prevenir ou modificar o desenvolvimento das DCV e fatores de risco associados (WEITZ et al., 2010). Com potencial efeito benéfico na prevenção primária e secundária das DCV (MASSARO et al., 2008), o ω -3 parece favorecer a hemodinâmica cardiovascular, reduzindo a pressão arterial (APPEL et al., 1993; MORRIS et al., 1993; BAO et al., 1998; GELEIJINSE et al., 2002; USHEMA et al., 2007; EBRAHIMI et al., 2009), modulando a expressão de lipases e favorecendo a redução de TG (DUDA et al., 2009; MOZAFFARIAN e WU, 2011). Adicionalmente, o ω -3 promove

melhora do perfil geral de lipoproteínas (PIRILLO e CATAPANO, 2013), onde se destacam a redução sérica do LDL-C, aumento do HDL-C (POUDYAL et al., 2011) e diminuição da síntese hepática de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (MOZAFFARIAN e WU, 2011).

Apesar de estudos clínicos de prevenção primária e secundária não descreverem benefícios da suplementação com ômega 3 (YOKOYAMA et al., 2007; RAUCH et al., 2010; GALAN et al., 2010; KROMHOUT et al., 2010; BOSCH et al., 2012; RIZOS et al., 2012) em estudos clássicos realizados com a população de esquimós, onde o consumo desse ácido graxo poli-insaturado é elevado, foram observadas menores taxas de mortalidade por DCV e melhor perfil lipídico nesses indivíduos quando comparado a outras populações (BANG e DYERBERG, 1972; DYERBERG et al., 1975; BANG et al., 1976; DYERBERG et al., 1977). Recentemente, foi descrito menor risco de eventos isquêmicos, incluindo morte cardiovascular, em mais de 8000 indivíduos com níveis elevados de TG em uso de estatinas, que receberam 2 g de EPA duas vezes ao dia, em comparação aos indivíduos que receberam apenas cápsulas de placebo (BHATT et al., 2018).

Nesse sentido, é provável que ω -3 presente na dieta ou sob a forma de suplementos alimentares possa aumentar o papel cardioprotetor da HDL. Apesar das recentes meta-análises e revisões sistemáticas não terem observado redução de eventos e da mortalidade por DCV associada ao uso de suplementação com ω -3 (RIZOS et al., 2013; WEN et al., 2014; ENNS et al., 2014; ABDELHAMID et al., 2018), estes estudos não são isentos de limitações. Questiona-se o tempo, a dosagem, o tipo e a fonte de ω -3 utilizado nos estudos selecionados, bem como, o tratamento dos dados mediante ao uso de outros medicamentos (VLACHOPOULOS et al., 2013; SETHI et al., 2013; GALLI et al., 2013; LEWIS, 2013). Além disso, os estudos de randomização mendeliana que questionam o papel cardioprotetor da partícula de HDL (VOIGHT et al., 2012; HAASE et al., 2012), limitaram a avaliação da partícula por meio do

conteúdo de colesterol associado, e não pela sua funcionalidade. Assim, investigações que avaliem o impacto deste ácido graxo especificamente nas características biológicas e físicas das partículas de HDL tornam-se particularmente atrativas. Soma-se a isso os insucessos de intervenções farmacológicas voltadas à HDL testadas até o momento.

Além dos aspectos descritos acima, os ácidos graxos ω -3 são ligantes naturais de diferentes receptores nucleares que regulam a expressão gênica, incluindo os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), o fator nuclear hepático (HNF), o receptor X hepático (LXR) e o receptor retinóide X (RXR), além de alterar a expressão de fatores de transcrição tais como as proteínas de ligação do elemento de regulação do esterol (SREBP), modulando, por conseguinte, o metabolismo lipídico (JUMP, 2008).

Especificamente na funcionalidade da HDL, a expressão de apo AI, principal apolipoproteína estrutural desta partícula, é regulada pelo HNF4 α , além da ativação de PPAR α por fibratos aumentar a concentração de apo AI e apo AII, e, assim, o número de partículas de HDL. Já o LXR α regula negativamente a síntese de apo AI. Por fim, PPAR α/γ e o RXR, bem como LXR aumentam a expressão de ABCA-1 em macrófagos, contribuindo com o efluxo de colesterol para HDL (WAGNER et al., 2011). Igualmente, a expressão da PON1 e da CETP também são moduladas por PPAR e SREBP (GUATHIER et al., 1999; CAMPS et al., 2012; FUHRMAN, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Em virtude da associação entre baixa concentração do HDL-C e aumento do risco cardiovascular, é indiscutível discutir o papel dessa lipoproteína na morbimortalidade mundial devido às DCV e, conseqüentemente, nos custos elevados com programas de políticas públicas voltados à prevenção e tratamento dessas doenças. Portanto, a modificação dos fatores de risco ambientais voltados, sobretudo à prevenção, torna-se relevante.

Enquanto estudos epidemiológicos descreverem a partícula de HDL como um fator de risco independente para a DCV, recentes estudos de randomização mendeliana questionaram tal associação, confirmando a hipótese que mais do que a simples mensuração do colesterol associado à HDL, é necessária uma análise mais detalhada dessa lipoproteína.

Para o entendimento da intrínseca relação entre o conteúdo proteico, composição lipídica, função e tamanho de partícula de HDL, as assinaturas composicionais das subfrações de HDL precisam ser definidas. Igualmente necessário, são os estudos que examinem seu remodelamento em resposta ao tratamento medicamentoso, dietético e às doenças, para identificar as subfrações, ou modificações, que podem ter um papel positivo, neutro ou mesmo negativo na saúde cardiovascular.

Além disso, alguns estudos falharam em demonstrar aumento do HDL-C após intervenções com ω -3; bem como, poucos são aqueles que se propuseram a investigar o papel desses ácidos graxos no tamanho das subfrações de HDL e na sua composição. Desta forma, as evidências sobre o efeito do consumo de ω -3 na estrutura, função, e metabolismo da HDL são limitadas e conflitantes.

Diversos estudos prospectivos analisaram o efeito da suplementação de ω -3 na saúde cardiovascular e perfil lipídico clássico, mas até o momento, não existe na literatura nenhum estudo que avaliou simultaneamente o impacto desses ácidos graxos no tamanho, capacidade antioxidante e perfil de ácidos graxos da HDL.

3. HIPÓTESE

Considerando os aspectos supracitados, este estudo tem como hipótese que a suplementação de ácidos graxos ω -3 acarretará na maior incorporação de EPA e DHA na lipoproteína de alta densidade, modificando suas características físicas e bioquímicas e, por conseguinte, modulando sua resistência à oxidação.

4. OBJETIVO

Avaliar o efeito da suplementação dos ácidos graxos ω -3 rica em EPA e DHA no perfil de ácidos graxos, composição, tamanho e capacidade antioxidante da lipoproteína de alta densidade em indivíduos com múltiplos fatores de risco para as doenças cardiovasculares.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo

Tratou-se de um estudo clínico, aleatorizado, controlado, duplo cego e paralelo inserido no estudo principal “Propriedades físico-químicas da LDL e da HDL, marcadores cardiometabólicos e oxidativos podem ser modulados pelo consumo de ômega-3, ômega-6 e ômega-9 em indivíduos com risco cardiovascular intermediário?”, nome fantasia CARDIONUTRI, financiado pela FAPESP (Processo 2011/12523-2, 2011/13616-4, 2016/24531-3), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluídos Completos (INCT-FCx 2010-2014) e do Núcleo de Apoio à Pesquisa de Fluídos Complexos (NAP-FCx 2011-2016).

5.2 Cálculo amostral

Apesar da literatura apresentar diversas estratégias para cálculo amostral, a variabilidade dos parâmetros (desvio padrão), poder estatístico, tempo e aspectos logísticos de cada estudo devem subsidiar a determinação do tamanho amostral final. No presente estudo, o cálculo amostral foi realizado pelo método proposto por Browner, Newman e Hulley (2008), por meio do teste *t-Student* para comparar médias de variáveis contínuas, valor de magnitude padronizada de efeito e os valores específicos de α bilateral de 0,05 e β de 0,10 (poder estatístico de 90%).

Visando melhor descrever a estratégia usada no cálculo amostral foi realizada uma pesquisa bibliográfica na plataforma online Pubmed. Selecionou-se alguns artigos baseados na suplementação de ω -3 e parâmetros bioquímicos relacionados aos desfechos aqui propostos (HDL-C e tamanho da HDL) (NEFF et al., 2010; KOH et al., 2012).

Não foram encontrados estudos com alterações do perfil ácidos graxos da HDL após uma intervenção com ω -3 até o início do desenvolvimento deste estudo. Desta maneira,

utilizou-se como referência a modificação da concentração plasmática de EPA e DHA associados à fosfatidilcolina (PC), pois esse é o fosfolípido mais abundante na HDL, e ao TG, devido ao papel do ω -3 no metabolismo de TG (NORDING et al., 2013). Para o desfecho de capacidade antioxidante, o número mínimo de indivíduos necessários para a intervenção aqui proposta foi calculado com base nos dados descritos por Cazzola et al. (2007) – *Lag time* de peroxidação lipídica plasmática após suplementação com ω -3 – e Zerrad-Saadi et al. (2009) – formação de hidroperóxidos de fosfatidilcolina na LDL isolada e incubada com a subfração HDL₃ (subfração pequena). O cálculo do tamanho amostral encontra-se descrito no **Quadro 1**.

Desse modo, a amostra total de 140 indivíduos (70 por grupo) proposta para esse estudo está acima do mínimo esperado nas condições testadas no cálculo amostral e contempla a maioria das variáveis aqui analisadas.

QUADRO 1. Cálculo amostral

Referência	Variável	Antes da intervenção	Após a intervenção	E	E/S	Tamanho da amostra total
Koh et al. (2012)	HDL (mg/dL)	43,0 (1,0)	42,0 (1,0)	1,0	1,0	23
Neff et al. (2010)	HDL intermediária	5,0 (3,0)	2,0 (2,0)	3,0	1,5	23
	HDL grande	5,0 (3,0)	7,0 (3,0)	2,0	0,6	60
Nording et al. (2013)	PC 20:5n-3 (nmol/g)	32,8 (19,9)	182,2 (53,9)	149,4	2,8	23
	PC 22:6n-3 (nmol/g)	127,0 (34,7)	215,0 (36,6)	88,0	2,4	23
	TG 20:5n-3 (nmol/g)	4,9 (3,5)	50,4 (21,0)	45,5	2,7	23
	TG 22:6n-3 (nmol/g)	13,5 (6,7)	69,6 (26,5)	56,4	2,1	23
Cazzola et al. (2007)	<i>Lag time</i> de peroxidação lipídica (min)	122,2 (9,0)	97,5 (8,7)	4,7	2,9	23
Zerrad-Saadi et al. (2009)	Consumo de PC (%)	12,3 (1,7)	5,5 (2,9)	6,8	2,3	23

Resultados apresentados em média (DP).

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

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

PC: fosfatidilcolina

5.3 Coleta de dados

A partir da definição do tamanho da amostra em cada grupo, utilizou-se o site www.randomization.com para aleatorizar a entrada de indivíduos em cada grupo de intervenção. A estratégia utilizada foi baseada na probabilidade de 50% consecutiva, ou seja, para cada indivíduo incluso no grupo ω -3, o próximo indivíduo deveria receber a intervenção do grupo placebo (ω -6), independente do sexo ou faixa etária.

A população do estudo foi composta por indivíduos de ambos os sexos sob atendimento ambulatorial no Hospital Universitário (HU) da Universidade de São Paulo (USP) e por indivíduos de procedência externa que demonstraram interesse em participar do estudo. Todos os voluntários passaram pelo processo de esclarecimento e, somente após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 1**), se realizou a coleta de dados. Os procedimentos de obtenção de amostras, análises, divulgação dos resultados e preservação do sigilo de identidade dos participantes seguiram as normas do Conselho Nacional de Saúde, no

que se refere à ética em pesquisa com seres humanos (BRASIL, 1999). O projeto principal foi aprovado pelos Comitês de Ética do HU (**Anexo 2**) e da Faculdade de Saúde Pública (FSP) (**Anexo 3**), ambos vinculados à USP. O estudo encontra-se registrado no REBEC (RBR-2vfhfvy).

O protocolo de pesquisa teve seguimento de 2 meses, conforme descrito no fluxograma de atividades (**Figura 2**). Neste protocolo, foram incluídos indivíduos entre 30 e 74 anos com pelo menos um dos seguintes fatores de risco cardiovascular: DLP, DM, HAS e tabagismo. Não foram incluídos indivíduos com história prévia de evento cardiovascular (avaliada por meio de história clínica e realização de eletrocardiograma), assim como indivíduos desnutridos, grávidas ou lactantes, participantes de outros protocolos de intervenção, portadores de doenças agudas ou crônicas graves e não controladas, usuários de drogas ilícitas, alcoolistas, pessoas alérgicas ou intolerantes a algum componente da intervenção e indivíduos com alterações psiquiátricas não controladas. Os indivíduos que não completaram o protocolo de intervenção foram excluídos das análises (**Figura 3**).

FIGURA 2. Fluxograma da coleta de dados.

ECG – Eletrocardiograma, HU – Hospital Universitário, R24h – Recordatório Alimentar de 24 horas, T0 – tempo 0 semanas de intervenção (momento basal), T8 – tempo 8 semanas de intervenção, TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ECG – Eletrocardiograma, PA – Pressão Arterial, FC – Frequência Cardíaca, BIA – Bioimpedância, Q. – Questionário.

FIGURA 3. Fluxograma de triagem e inclusão de indivíduos.

ECG – Eletrocardiograma, T0 – tempo 0 semanas de intervenção (momento basal); T8 – tempo 8 semanas de intervenção

As cápsulas fornecidas aos grupos ω -6 e ω -3 foram produzidas pela empresa Relthy Laboratórios (Indaiatuba, Brasil), que adquiriu as matérias-primas, encapsulou e cegou os produtos por meio de códigos contendo sete dígitos (intervenção: 01-02, indivíduo: 001-374, tempo: 00--08). A correta identificação consulta intervenções foi de conhecimento exclusivo da empresa até o término do estudo.

No período T0, após a entrevista, os participantes receberam o suplemento codificado (3 gramas/dia) e encapsulado, sendo fornecida a quantidade suficiente para consumo até a próxima consulta.

Cada participante foi orientado a consumir individualmente o suplemento (3 cápsulas/dia), distribuído do seguinte modo: 1 cápsula no desjejum, 1 cápsula no almoço e 1 cápsula no jantar. No caso da não ingestão por qualquer motivo, as cápsulas deveriam ser ingeridas a qualquer momento dentro do mesmo dia.

Foi fornecido também um diário onde cada participante registrou o horário de consumo do suplemento, assim como as intercorrências ocorridas durante o período: divisão do suplemento com outra pessoa, esquecimento e/ou sinais e sintomas adversos associados à intervenção (**Anexo 4**). Os sintomas avaliados foram: azia, vômitos, gases, diarreia, constipação, coceira e sangramentos. Os participantes foram orientados a retornarem na próxima consulta trazendo o frasco do suplemento, independentemente se vazio ou com cápsulas restantes. A aderência à intervenção foi realizada por meio da contagem de cápsulas que foram devolvidas.

Os suplementos utilizados no protocolo de intervenção apresentaram as seguintes características (**Figura 4**):

1. **Grupo ω -6** – Cápsula de óleo de girassol contendo 65% de ácido linoleico, utilizado como grupo controle.
2. **Grupo ω -3** – Cápsulas de óleo de peixe contendo 60% de EPA e DHA (37% e 23%, respectivamente).

A escolha da suplementação com ω -6 como grupo controle se deu pelo fato da necessidade do fornecimento de uma suplementação com mesmo teor calórico que o grupo intervenção (ω -3), além dos potenciais efeitos adversos que podem ocorrer com a ingestão de óleo mineral, como diarreia, interferência na absorção de nutrientes, entre outros.

FIGURA 4. Análise do conteúdo de ácidos graxos das cápsulas

A – Cápsula ω -3. B – Cápsula ω -6. Análise pelo método NIMURA e KINOSHITA, 1980.

5.4 Avaliação do perfil socioeconômico e história clínica

O perfil socioeconômico foi avaliado por meio de questionário previamente estruturado (**Anexo 5**) que abordou os itens sexo, idade, raça, renda familiar e número de indivíduos que moram na casa. A avaliação clínica foi constituída pelas informações sobre a história clínica atual, antecedentes familiares de doenças crônicas (pai e mãe), uso regular de medicamentos ou vitaminas, além da aferição da pressão arterial sistêmica com esfigmomanômetro (**Anexo 6**).

5.5 Antropometria, consumo alimentar e atividade física

A avaliação dos parâmetros antropométricos (**Anexo 7**) foi feita por meio da coleta de massa corporal (kg), estatura (m), circunferência da cintura (cm) e dados de gordura corporal. O percentual de gordura corporal foi estimado por meio de equação preditiva baseada nos valores de resistência (R) e reactância (Xc), obtidos na impedância bioelétrica (BIA), e das variáveis de sexo, idade, peso e altura.

A massa corporal foi determinada com os participantes utilizando o mínimo de roupas e descalços na balança digital da marca Toledo, modelo 2096PP/2® (Toledo, São Paulo, Brasil). A medida da estatura foi determinada com o estadiômetro fixo Seca® (TBW, São Paulo, Brasil), no qual os indivíduos estavam descalços, em posição ereta, com os pés paralelos, calcanhares, panturrilha, glúteos, ombros e cabeça encostados no estadiômetro e com a cabeça sob o plano horizontal de Frankfurt (LOHMAN et al., 1988). A medida da circunferência da cintura (CC), foi aferida adotando-se como referencial anatômico o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. O indivíduo foi orientado a ficar em pé, mantendo os braços paralelos ao corpo e pés unidos e permanecer com o abdômen relaxado.

A avaliação do consumo alimentar (**Anexo 8**) foi realizada por meio da aplicação de dois Recordatórios alimentar de 24 horas (R24h) em cada momento da intervenção. Os R24h

foram aplicados em dias alternados (um dia durante a semana e um dia no final de semana), sendo um aplicado via telefone, para contemplar variações diárias inter- e intra- indivíduos e melhor descrever o hábito alimentar dos participantes.

Após a análise crítica das informações o conteúdo de energia e os nutrientes brutos foram obtidos pelo programa *The Food Processor* versão 10.11.0 (COX et al., 2012). A partir do nutriente na sua forma bruta, realizou-se o ajuste quanto à variabilidade intrapessoal no programa *The Multiple Source Method* versão 1.0.1 (DifE, Nuthetal, Alemanha) e, posteriormente, realizou-se o ajuste dos nutrientes pela energia (MACKERRAS, 1996; WILLETT e STAMPFER, 1998).

A atividade física habitual foi avaliada por meio do questionário de Baecke traduzido e validado para a população brasileira (FLORINDO e LATORRE, 2003) (**Anexo 9**).

5.6 Avaliação bioquímica

5.6.1 Obtenção de sangue

Nos momentos basal e T8, após jejum de 12-15 horas, amostras de sangue foram coletadas (20 mL). O sangue foi coletado em tubos tipo *vacutainer* contendo ácido etileno-diaminotetraacético (EDTA) (1,0 mg/mL) (BD, Brasil), utilizado como anticoagulante e antioxidante (obtenção plasma) ou em tubos secos (obtenção soro), sendo ambos mantidos em gelo e protegido da luz até a centrifugação (3000 rpm, 15 min, a 5 °C). Foram acrescentados os seguintes inibidores de proteases: aprotinina (10 µg/mL), benzamidina (10 µM) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) (5 µM), além do antioxidante 2,6-di-tert-butil-p-hidroxitolueno (BHT) (100 µM). Todas as amostras permaneceram armazenadas a - 80 °C até o momento das análises.

5.6.2 Marcadores do metabolismo lipídico

Por meio de sistema semiautomático e reagentes enzimáticos, foram analisadas as concentrações plasmáticas de CT, TG e HDL-C (Labtest, Minas Gerais, Brasil). O LDL-C foi determinado por meio da fórmula de Friedewald (1972), onde: $LDL-C = CT - HDL-C - TG/5$. Essa fórmula só foi aplicada para os indivíduos com $TG < 400$ mg/dL. As concentrações das apolipoproteínas AI, B, CII e CIII (Randox Laboratories Ltd., UK) e a concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) (NEFA-HR(2), Wako Chemicals GmbH, DE) foram determinadas por meio de kits comerciais aplicados no analisador bioquímico Cobas Mira.

5.6.3 Concentração plasmática de glicose, insulina e hemoglobina glicada

As determinações da glicose plasmática e da hemoglobina glicada (HbA1c) foram realizadas com kits comerciais, enzimáticos e colorimétricos *Glicose PAP Liquiform®* e *HbA1c Turbiquet*, respectivamente (Labtest, Minas Gerais, Brasil). A detecção da insulina plasmática foi realizada por meio do kit comercial *Insulin Human Direct ELISA Kit®* (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). A partir dessas análises estimou-se a resistência à insulina por meio do cálculo do *homeostasis model assessment for insulin resistance* (HOMA-IR) (MATTHEWS et al., 1985) e classificado segundo Stern et al. (2005).

5.6.4 Avaliação da atividade da paraoxonase 1

A atividade da PON1 foi determinada pela adição de 500 µl de tampão Tris-HCl 0,1 M e pH 8,05, contendo 2 mmol/L de $CaCl_2$ e 1,1 mmol/L de paraoxon (Sigma Chemical Co) em 25 µL de soro. Em seguida, 200 µL da solução foi distribuída em placas de fundo plano contendo 96 poços. A leitura foi realizada em duplicata utilizando o leitor de microplacas (Microplate Reader, Benchmark, Bio-RAD) com comprimento de onda de 405 nm, a 37 °C. Para o cálculo da atividade, foram realizadas 6 leituras em intervalos de um minuto cada. Os

resultados foram expressos em $\text{nmol min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ (MACKNESS et al., 1991), sendo essa obtida multiplicando a média da variação das absorbâncias pelo fator descrito abaixo:

Cálculo do Fator:

$$FATOR = \frac{VTR(mL)}{\epsilon_{405} \times VA(mL) \times E(cm)}$$

onde,

- VTR (volume total da reação) = 525 μL (500 μL solução + 25 μL soro)
- $\epsilon_{450} = 18050 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (SENTI et al., 2003; AGACHAN et al., 2004)
- VA (volume da amostra) = 25 μL
- E (espessura do poço da placa) = 1 cm

Substituindo os valores e ajustando para as unidades internacionais temos:

- Fator = 1163,43 nmol mL^{-1}

Cálculo da Atividade:

- Atividade da Paraoxonase = Fator x $\Delta\text{abs}/\text{min}$ = 1163,43 x $\Delta\text{abs nmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$, onde Δabs = é média da variação das absorbâncias medidas a cada 1 minuto.

5.6.5 Tamanho da HDL e suas subfrações

As subfrações de HDL foram determinadas pelo sistema Lipoprint® (Quantimetrix Inc., USA) (**Figura 5**). Este método é baseado na separação e quantificação das subfracções de lipoproteínas por meio de gel de poliacrilamida não denaturante. O sistema utiliza um corante lipofílico, o qual se liga ao colesterol nas partículas da lipoproteína.

Aplicou-se 25 μL de plasma ao tubo com gel de poliacrilamida, com posterior adição de 300 μL do corante. Os tubos foram submetidos à fotopolimerização por 30 minutos em temperatura ambiente e, após essa etapa, submetidos à eletroforese durante 55 minutos com corrente de 36 mA. Ao final do processo, as diferentes frações foram identificadas pela área

relativa de cada subfração da lipoproteína. Posteriormente, multiplicou-se o percentual de cada área pela concentração de HDL-C total da amostra, com a finalidade de calcular a quantidade relativa de colesterol em cada uma das subfrações de HDL. Desse modo, os resultados foram apresentados em percentual de subfração bruto (%) e ajustado pela concentração de colesterol na HDL (mg/dL). Os resultados permitiram a identificação de 10 subfrações de HDL que foram classificadas em HDL_{GRANDE} (HDL1 a HDL3), HDL_{INTERMEDIARIA} (HDL4 a HDL7) ou HDL_{PEQUENA} (HDL8 a HDL10).

FIGURA 5. Etapas da análise do sistema Lipoprint®

A – Adição do plasma ao tubo com gel de poliácridamida; B – Adição do corante; C – Fotopolimerização; D – Alocação dos tubos para eletroforese; E – Eletroforese; F – Tubos ao final da eletroforese; G – Gráfico gerado a partir da leitura dos tubos.

5.6.6 Atividade da proteína transportadora de éster de colesterol

Para a determinação da atividade da CETP foi utilizado o kit comercial *CETP Activity Assay*[®] (BioVision Research Products, CA, EUA). O método é baseado na técnica de fluorescência (E_{xc} 465 nm e E_{em} 535 nm), onde uma molécula doadora contendo lipídio fluorescente é transferida para outra molécula de modo proporcional à atividade da CETP. Nesse sentido, o aumento da fluorescência mantém relação direta com a atividade da CETP presente no plasma. Os resultados foram expressos em pmol/μl/hora.

5.6.7 Obtenção da HDL

A HDL foi precipitada para análise da capacidade antioxidante (*Lag time*), determinação do perfil de ácidos graxos na HDL, AGNEs e Apo CII e CIII (WARNICK et al., 2001).

Para precipitação da HDL do plasma foi utilizado o ácido fosfotungstico e cloreto de magnésio, conforme as instruções do kit comercial de Colesterol HDL[®] (Labtest, Minas Gerais, Brasil). Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas (3.500 rpm, 15 min, 4° C) para precipitação das lipoproteínas contendo Apo B (VLDL, LDL e quilomícrons). A HDL presente no sobrenadante foi mantida na geladeira por até 24 h, seguida da realização das análises descritas acima.

Para a quantificação do total de proteínas da HDL foi utilizando o kit comercial *Pierce*[®] *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, OR, EUA).

5.6.8 Capacidade antioxidante HDL

O método para avaliar a capacidade antioxidante da HDL nos momentos basal e após 8 semanas de intervenção foi baseada no protocolo de *Lag time* proposto por Esterbauer et al. (1989). Esse método tem os seguintes pressupostos: LDL como substrato oxidável, CuSO₄

como agente oxidante e a HDL de cada paciente, em cada momento do estudo, como substrato antioxidante.

Inicialmente, foi obtido sangue de voluntários saudáveis coletados em tubos seco para a obtenção de soro (3000 rpm, 15 min, a 5° C), seguido da adição de inibidores de proteases: aprotinina (10 µg/mL), benzamidina (10 µM) e PMSF (5 µM). O *pool* de soro foi submetido à ultracentrifugação sequencial (56.000 rpm, 6 h e 4° C) após ajuste de densidade com solução salina a 1,019 g/mL. Ao final do processo, a fração VLDL foi removida. Em seguida, a densidade do soro remanescente foi ajustada para 1,063 g/mL com brometo de potássio (KBr), seguida de ultracentrifugação, conforme descrito a cima. A LDL obtida foi então submetida a diálise contra tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, por 4 horas com trocas a cada 1 hora, a 4° C. Para a quantificação do total de proteínas da LDL foi utilizando o kit comercial *Pierce® BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, OR, EUA).

A oxidabilidade de LDL foi monitorada em espectrofotômetro (ESTERBAUER et al., 1989). As amostras de LDL com concentração de proteína de 2,27 mg/mL foram diluídas em PBS sem EDTA (0,15 M / NaCl 0,14 M / pH 7,4) até a concentração de 0,083 mg/mL, seguida da distribuição em placas de fundo plano contendo 96 poços (150 µL/poço). Posteriormente, as amostras de HDL precipitadas a partir do soro de cada paciente foram adicionadas (100 µL/poço), ajustadas em PBS sem EDTA (0,15 M / NaCl 0,14 M / pH 7,4) para a concentração final de proteína (200 mg/mL). A peroxidação foi iniciada com adição de solução aquosa contendo 30 µM de CuSO₄ (50 µL/poço), após 15 minutos da mistura LDL + HDL ser previamente mantida em estufa à 37° C. A absorbância foi mensurada a 234 nm, durante 5 horas. Nesse intervalo, observou-se a fase de latência, que é propriamente a fase de resistência à oxidação (*Lag time*), a fase de propagação dos dienos conjugados (indicado pelo aumento da absorbância) e a fase de decomposição desses compostos (platô). As análises foram realizadas

com um único *pool* de LDL e em duplicatas, sendo os parâmetros avaliados, conforme proposto por Ramos et al., (1995) (**Figura 6**):

- *Lag time*: ponto de intersecção entre o declive linear máximo da curva e o eixo da abcissa, expresso em minutos.
- V_{max} : taxa máxima de peroxidação lipídica, obtida a partir do declive da curva de absorbância durante a fase de propagação expresso, isto é: Δ absorbância / Δ tempo (minutos).
- DO_{max} : produção máxima de dienos conjugados, em DO (densidade optica).
- T_{max} : tempo para produção máxima de dienos conjugados, em minutos.
- AUC: área sob a curva gerada.

Durante a etapa de validação do método, foram testados os possíveis efeitos diferenciais do uso da HDL obtida por precipitação e ultracentrifugação, bem como, o uso de plasma x soro. Devido à similaridade dos resultados obtidos, optou-se pelo método da precipitação, em virtude do menor tempo e custo.

FIGURA 6. Gráfico gerado na análise da capacidade antioxidante da HDL

5.6.9 Análise de ácidos graxos na HDL

Após a separação da HDL, conforme anteriormente descrito (item 5.6.7), os lipídios foram extraídos da lipoproteína utilizando-se 200 µL de HDL isolada, 1,75 mL de metanol, 100 µL de cloreto de acetila e 50 µL de padrão interno, contendo 1 mg/mL de ácido tridecano (C13) em hexano. Os tubos vedados foram aquecidos a 100 °C por 60 min. Após esta etapa, adicionou-se 1,5 mL de hexano e os tubos foram agitados em vórtex durante 1 min. As amostras foram centrifugadas a 3600 rpm por 2 min e a 4 °C, e a fase orgânica superior foi coletada. Este procedimento de extração foi repetido com 0,75 mL hexano para otimizar a extração lipídica.

A solução combinada de hexano foi evaporada em nitrogênio, e o resíduo seco foi então ressuspensão em 100 µL de hexano. O perfil de ácidos graxos de cada amostra foi analisado por cromatografia gasosa (CG) por detecção de ionização de chamas em duplicata. A análise GC foi realizada no Trace 1310 (Thermo Scientific) usando-se um DB-FFAP de 15 m x 0,1 mm DI x 0,1 µm de espessura de filme (J e W Scientific da Agilent Technologies). O programa de temperatura iniciou em 150 °C com 0,25 min de preensão, com aumento de 35 °C a cada minuto até 200 °C, com posterior aumento de 8 °C por minuto, até 245 °C, seguido por um período isotérmico de 4 min. Condições instrumentais adicionais foram: o hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão constante de 345 kPa, o FID foi ajustado a 250 °C, o fluxo de ar sintético e nitrogênio de 350 ml / min e 40 ml / min, respectivamente, a razão de divisão foi de 30:1 e auto-amostrador foi ajustado para volume de 1 µL. O tempo de execução de cada amostra foi de 14 min. Por comparação direta com uma mistura padrão FAME (Supelco 37 Component FAME Mix; Sigma-Aldrich), cada pico individual foi integrado e depois normalizado pelo padrão interno. A porcentagem de ácidos graxos de cada amostra foi calculada em relação à área total do cromatograma, sendo o resultado final obtido pela média das duplicatas de cada amostra.

A partir destes resultados, foram estimadas as atividades das seguintes enzimas desaturases:

- Delta 5 desaturase (D5D): ácido araquidônico/ácido dihomo- γ -linolênico
- Delta 6 desaturase (D6D): ácido dihomo- γ -linolênico /ácido linoleico
- Steroyl-CoA desaturase 16 (SCD-16): ácido palmitoléico/ácido palmítico
- Steroyl-CoA desaturase 18 (SCD-18): ácido oleico/ácido esteárico

A análise de ácidos graxos na HDL foi realizada no Laboratório de Pesquisa Lípidos Modificados do Instituto de Química da USP (IQ-USP), sob supervisão da Profa. Sayuri Miyamoto.

5.7 Análises Estatísticas

Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados estão apresentados sob a forma de tabelas e gráficos. Para as variáveis qualitativas, utilizou-se o teste qui-quadrado e os resultados foram apresentados na sua frequência absoluta (n) e em porcentagem (%). Para os dados quantitativos, assim como para a determinação dos testes utilizados, foi considerado o tipo de distribuição dessas variáveis (teste *Kolmogorov-Smirnov*; $p > 0,05$). Estas foram apresentadas sob a forma de média e desvio padrão. Foram realizados os testes *t-Student* (diferença entre os grupos) ou *t-Student* para amostras pareadas (diferença intragrupo) para as variáveis com distribuição normal. Para as variáveis com distribuição não paramétrica, foram utilizados testes não paramétricos como *Mann-Whitney* (diferença entre os grupos) e *Wilcoxon* (diferença intragrupo). As diferenças entre os grupos também foram avaliadas após o cálculo da magnitude de efeito da intervenção (Δ) e variação percentual ($\Delta\%$). O impacto do tabagismo (CRAIG et al., 1989; CAMPBELL et al., 2008) e da presença do DM (MORGANTINI et al., 2014) no metabolismo da HDL foi considerado.

Correlações entre as mudanças de EPA, DHA e razão ômega-6/ômega-3 (ω -6/ ω -3) incorporados e os parâmetros de funcionalidade da HDL foram avaliadas, utilizando-se os testes de correlação de *Pearson* ou *Spearman*. Analisou-se também o teste de tendência linear do efeito da intervenção nestas variáveis. Os parâmetros foram distribuídos em tercís da variação de EPA, DHA e razão ω -6/ ω -3, e as mudanças dos parâmetros de funcionalidade da HDL foram analisados segundo esses tercís. As comparações entre os tercís foram realizadas pela análise de variância ANOVA ou teste de *Kruskal-Wallis*, com comparações múltiplas pelo teste de *Tukey*.

Para ampliar a compreensão do efeito da incorporação de EPA e DHA na HDL, regressões logísticas univariadas foram testadas, tendo como variável independente EPA, DHA e razão ω -6/ ω -3. Variáveis que apresentaram correlações com EPA, DHA e razão ω -6/ ω -3 ($p < 0,20$) foram incluídas no modelo de regressão logística ajustado pelo sexo, tabagismo, doenças prévias (HAS, DLP, DM) e uso de medicamentos (estatina, hipoglicemiantes orais e fibratos). As razões de chances (OR) ajustadas e o intervalo de confiança de 95% (IC95%) foram determinados.

Considerando que a intervenção e incorporação de ômega-3 na HDL promoveu mudanças no perfil basal de ácidos graxos, foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA), que visa reduzir múltiplos parâmetros inter-relacionados, permitindo a aplicação de testes *a posteriori*. A PCA foi aplicada aos deltas de ácidos graxos incorporados à HDL para analisar a estrutura de covariância das variáveis e revelar um número restrito de padrão da amostra. Os dados originais foram autoescalados, recurso utilizado em análise estatística onde se centra os dados na média e divide-se cada um pelo desvio padrão, de forma que todas as variáveis passaram a ter o mesmo peso. Em seguida, os dados recalculados foram submetidos à PCA. Os resultados da PCA foram apresentados em *loading*. Utilizou-se o método *Eigenvalue* para a extração das Componentes Principais (CP) e os critérios de Kaiser (KAISER, 1960) para

considerar a medida de adequação da amostra. A PCA projetou 7 CP mais significativas (*Eigenvalue* > 1), que foram correlacionadas com os parâmetros de funcionalidade da HDL.

Todos os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences*® (SPSS), versão 20.0 (SPSS Incorporation, 2010). O valor de significância adotado para todos os testes foi de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

A população do presente estudo foi composta predominantemente por indivíduos do sexo feminino (ω -6=60,0%; ω -3=63,6%), sendo a média de idade de 51 anos nos dois grupos. A maioria dos participantes classificou-se como sendo da raça branca (ω -6=65,7%; ω -3=70,1%). Constatou-se maior frequência de indivíduos com ensino médio ou superior completo (ω -6=75,7%; ω -3=79,2%) e com renda familiar acima de 6 salários mínimos (ω -6=61,4%; ω -3=58,4%) em ambos os grupos.

Em relação às doenças autorrelatadas, 88,6% dos indivíduos do grupo ω -6 e 85,7% dos indivíduos do grupo ω -3 relataram a presença de alguma doença prévia, em ordem decrescente de frequência: HAS, DLP e DM. Em concordância com a alta frequência de doenças, mais de 70% dos indivíduos nos grupos ω -6 e ω -3 usavam algum tipo de medicamento no momento da inclusão no estudo, também em ordem decrescente de frequência: anti-hipertensivos, estatinas e hipoglicemiantes orais. Mais de 50% dos participantes em ambas as intervenções eram não tabagistas. Quanto ao histórico familiar de DCNT, 94,3% dos indivíduos do grupo ω -6 e 89,6% dos indivíduos do grupo ω -3 apresentaram pelo menos um antecedente paterno e/ou materno.

Quando comparados, os grupos não apresentaram diferenças significativas em relação ao perfil clínico e sociodemográfico no momento da inclusão no estudo (**Tabela 1**).

TABELA 1. Caracterização da população de estudo, segundo intervenção.

Variáveis	ω-6 (n=70)		ω-3 (n=77)		p
	n	%	n	%	
Idade, anos	51,7 (10,0)		51,6 (10,0)		0,950
Sexo					0,650
	<i>Feminino</i>	42 60,0	49 63,6		
	<i>Masculino</i>	28 40,0	28 36,4		
Raça					0,566
	<i>Branco</i>	46 65,7	54 70,1		
	<i>Não-branco</i>	24 34,3	23 29,9		
Escolaridade					0,611
	<i>Fundamental</i>	17 24,3	16 20,8		
	<i>Médio e Superior</i>	53 75,7	61 79,2		
Renda familiar					0,712
	<i>≤ 5 salários mínimos</i>	27 38,6	32 41,6		
	<i>≥ 6 salários mínimos</i>	43 61,4	45 58,4		
Tabagismo					0,309
	<i>Não</i>	41 58,6	40 51,9		
	<i>Sim</i>	08 11,4	16 20,8		
	<i>Ex-tabagista</i>	21 30,0	21 27,3		
Doenças atuais					0,606
	<i>Hipertensão arterial</i>	42 60,0	43 55,8		0,610
	<i>Dislipidemias</i>	37 52,9	38 49,4		0,671
	<i>Diabetes mellitus</i>	15 21,4	12 15,6		0,361
	<i>Outras</i>	26 37,1	24 31,2		0,445
Medicamentos					0,538
	<i>Anti-hipertensivos</i>	40 57,1	37 48,1		0,270
	<i>Estatinas</i>	15 21,4	16 20,8		0,923
	<i>Hipoglicemiantes</i>	16 22,9	13 16,9		0,363
	<i>Fibratos</i>	02 2,9	02 2,6		0,420
	<i>Outros</i>	41 58,6	40 51,9		0,923
Antecedentes familiares					0,301
	<i>Hipertensão arterial</i>	49 70,0	49 63,6		0,414
	<i>Diabetes mellitus</i>	31 44,3	29 37,7		0,414
	<i>Infarto agudo do miocárdio</i>	21 30,0	27 35,1		0,513
	<i>Obesidade</i>	15 21,4	15 19,5		0,770
	<i>Acidente vascular encefálico</i>	12 17,1	16 20,8		0,575
	<i>Doença vascular periférica</i>	07 10,0	06 7,8		0,638

Variáveis qualitativas analisadas pelo teste qui-quadrado. Variáveis quantitativa analisada pelo teste *t-Student*. Resultados expressos em valor absoluto e porcentagem; idade expressa em anos (média e desvio padrão).

Na avaliação do consumo alimentar (**Tabela 2**), embora os participantes do estudo tenham recebido a orientação para manter seus hábitos alimentares durante a intervenção, constatou-se que no grupo ω -6 houve diferenças ao longo do tempo no consumo de fibras totais. No grupo ω -3, além das fibras, observou-se diminuição no consumo de carboidratos. Para os demais nutrientes, não houve mudanças no padrão alimentar. Apesar das mudanças descritas acima, o consumo energético permaneceu sem alterações ao longo do estudo.

Além disso, a adesão à intervenção foi monitorada por meio do percentual de cápsulas ingeridas: ω -6=83,8% e ω -3=83,1%. Ressalta-se que a suplementação de ω -3 rica em EPA e DHA aumentou a ingestão destes nutrientes em aproximadamente 947% em relação ao ingerido por meio dos alimentos.

Destaca-se que nenhum indivíduo apresentou respostas adversas às intervenções que justificassem a interrupção do protocolo de intervenção.

TABELA 2. Avaliação do consumo alimentar da população de estudo, segundo tempo e intervenção.

Variáveis	ω -6 (n=70)			ω -3 (n=77)		
	T0	T8	p	T0	T8	p
Energia (kcal)	1641,58 (385,86)	1560,44 (413,37)	0,113	1660,14 (481,94)	1603,54 (417,45)	0,308
Proteínas (g)	75,25 (20,09)	76,25 (20,42)	0,726	73,00 (24,70)	74,02 (20,42)	0,727
Carboidratos (g)	217,39 (55,15)	207,44 (50,67)	0,157	224,73 (66,47)	207,60 (52,23)	0,037
Lipídios (g)	54,81 (17,37)	50,58 (17,43)	0,084	53,98 (17,42)	54,19 (17,58)	0,932
Colesterol (mg)	223,57 (99,83)	214,44 (79,13)	0,638	223,60 (121,51)	220,21 (64,57)	0,675
Fibras totais (g)	16,31 (4,29)	15,03 (4,31)	0,037	16,15 (5,18)	14,44 (4,54)	0,014
Sódio (g)	2,39 (0,78)	2,14 (0,53)	0,370	2,31 (0,75)	2,16 (0,59)	0,075
Ácidos graxos saturados (g)	17,86 (6,03)	16,68 (6,78)	0,106	18,11 (6,59)	18,06 (6,68)	0,739
<i>Ácido láurico (g)</i>	0,30 (0,22)	0,30 (0,26)	0,447	0,47 (0,76)	0,32 (0,21)	0,162
<i>Ácido mirístico (g)</i>	0,92 (0,53)	0,90 (0,61)	0,624	1,05 (0,55)	1,03 (0,56)	0,811
<i>Ácido palmítico (g)</i>	5,95 (2,56)	6,01 (2,57)	0,850	6,26 (2,56)	6,42 (2,33)	0,635
<i>Ácido esteárico (g)</i>	2,65 (1,25)	2,72 (1,24)	0,636	2,90 (1,39)	2,96 (1,17)	0,743
Ácidos graxos monoinsaturados (g)	14,22 (5,90)	12,73 (4,24)	0,132	14,19 (5,62)	13,67 (4,04)	0,639
<i>Ácido palmitoleico (g)</i>	0,72 (0,35)	0,70 (0,28)	0,998	0,71 (0,32)	0,79 (0,34)	0,175
<i>Ácido oleico (g)</i>	9,36 (4,13)	9,77 (3,58)	0,195	9,62 (4,31)	10,22 (3,45)	0,251
Ácidos graxos poli-insaturados (g)	6,53 (2,32)	5,90 (2,08)	0,051	6,03 (2,48)	6,06 (1,76)	0,931
<i>Ácido linoleico (g)</i>	4,33 (1,79)	4,15 (1,56)	0,451	4,07 (1,95)	4,10 (1,25)	0,917
<i>Ácido linolênico (g)</i>	0,53 (0,20)	0,51 (0,21)	0,404	0,50 (0,23)	0,51 (0,19)	0,690
<i>EPA (g)</i>	0,04 (0,08)	0,04 (0,04)	0,145	0,04 (0,05)	0,05 (0,05)	0,064
<i>DHA (g)</i>	0,10 (0,18)	0,12 (0,09)	0,423	0,10 (0,11)	0,14 (0,10)	0,220
<i>EPA + DHA (g)</i>	0,15 (0,26)	0,16 (0,13)	0,627	0,14 (0,16)	0,19 (0,15)	0,050
<i>EPA+DHA+suplemento (g)</i>	0,15 (0,26)	0,16 (0,13)	0,627	0,14 (0,16)	1,99 (0,15)	<0,001
Ácidos graxos trans (g)	1,51 (0,65)	1,56 (1,26)	0,735	1,52 (0,50)	1,60 (1,06)	0,493

Variáveis expressas em média e desvio padrão. Diferenças estatística analisadas pelo teste t-Student pareado ou Wilcoxon, conforme distribuição de normalidade. kcal – calorias, g – gramas, mg – miligramas, EPA – eicosapentaenoico, DHA – docosaexaenoico.

Os resultados da aplicação do questionário de Baecke encontram-se na **Tabela 3**. Constatou-se que, apesar das diferenças encontradas nos itens de atividade física ocupacional (AFO), exercício físico no lazer (EFL), e de locomoção (ALL), a pontuação total nos dois grupos não apresentou diferenças significativas em função do tempo.

TABELA 3. Avaliação da atividade física da população de estudo, segundo tempo e intervenção.

Variáveis	ω -6 (n=70)			ω -3 (n=77)		
	T0	T8	p	T0	T8	p
AFO	2,46 (0,58)	2,32 (0,57)	0,035	2,50 (0,61)	2,35 (0,52)	0,010
EFL	2,23 (0,78)	2,00 (0,65)	0,011	2,25 (0,88)	2,06 (0,79)	0,007
ALL	2,20 (0,67)	2,45 (0,69)	0,002	2,37 (0,64)	2,46 (0,54)	0,261
Total	6,89 (1,37)	6,78 (1,21)	0,416	7,13 (1,45)	6,87 (1,28)	0,117

Variáveis expressas em média e desvio padrão. Diferenças estatísticas analisadas pelo teste *t-Student* pareado ou *Wilcoxon*, conforme distribuição de normalidade. AFO – atividade física ocupacional, EFL – exercício físico no lazer, ALL – atividade física de lazer e locomoção.

Na **Tabela 4** encontram-se descritos os resultados de peso, IMC, CC e percentual de gordura corporal. Observou-se que nos dois grupos de estudo, os participantes apresentavam obesidade ($\text{IMC} > 30,0 \text{ kg/m}^2$) e CC elevada, assim como, alto percentual de gordura corporal.

Após 8 semanas de intervenção, os indivíduos suplementados com cápsulas de ω -6 não apresentaram nenhuma alteração destes parâmetros, independente do sexo. Já os indivíduos suplementados com cápsulas de ω -3 apresentaram discreto aumento do peso, do IMC e da CC nos indivíduos do sexo feminino, bem como, modesta redução do percentual de gordura corporal. Além disso, não se observou efeito da intervenção ω -6 *versus* ω -3, quando comparada a variação percentual pré e pós intervenção ($\Delta\%$).

TABELA 4. Avaliação antropométrica da população de estudo segundo sexo, tempo e intervenção.

Variáveis	ω -6 (n=70)			ω -3 (n=77)			p**
	T0	T8	$\Delta\%$	T0	T8	$\Delta\%$	
Peso (kg)	83,8 (20,0)	83,3 (19,0)	0,19	82,4 (18,7)	82,9 (18,7)*	0,69	0,260
IMC (kg/m ²)	31,4 (5,8)	31,3 (5,7)	0,19	30,7 (6,2)	30,9 (6,3)*	0,70	0,382
CC ♂ (cm)	105,7 (12,8)	106,1 (12,2)	0,97	105,0 (12,6)	105,2 (12,1)	0,41	0,829
CC ♀ (cm)	101,1 (14,3)	101,3 (14,2)	0,35	97,0 (12,5)	98,5 (13,0)*	1,72	0,308
MG ♂ (%)	24,4 (4,6)	24,0 (4,2)	0,43	23,6 (4,3)	23,6 (4,6)	-0,24	0,635
MG ♀ (%)	44,1 (7,8)	44,1 (8,0)	0,69	43,9 (8,0)	43,3 (7,7)*	- 1,50	0,060

Variáveis expressas em média e desvio padrão ou percentual de variação. Diferenças estatísticas analisadas pelo teste *t-Student* pareado ou *Wilcoxon* e *t-Student* ou *Mann-Whitney*, conforme distribuição de normalidade. IMC – Índice de Massa Corporal, CC – Circunferência da Cintura, %MG – percentual de massa gorda, ♂ - sexo masculino, ♀ - sexo feminino, $\Delta\%$ – ((T8-T0)/T0)*100. *p<0,05 versus T0. **comparação entre os $\Delta\%$.

O perfil bioquímico da população de estudo, segundo tempo e intervenção, encontra-se descrito na **Tabela 5**. Notou-se que, em ambos os grupos, houve diminuição significativa dos valores de CT, LDL-C, TG, que impactaram diretamente nas razões TG/HDL e LDL-C/Apo B e nos valores de não-HDL-C. Observou-se também aumento significativo do HDL-C nas duas intervenções e redução da glicemia de jejum nos indivíduos suplementados com ω -6. Apesar de não ter sido observada nenhuma diferença significativa ao longo do tempo, verificou-se o efeito da intervenção nos AGNEs plasmáticos, com aumento de 9,8% no grupo ω -6 e redução de 6,0% no grupo ω -3 (p=0,018). Não foram encontradas demais diferenças em relação ao efeito da intervenção. Ressalta-se que os grupos não diferiam no momento basal (T0).

TABELA 5. Perfil bioquímico da população de estudo, segundo tempo e intervenção.

Variáveis	ω -6 (n=70)			ω -3 (n=77)			p**
	T0	T8	$\Delta\%$	T0	T8	$\Delta\%$	
CT (mg/dL)	199,0 (43,0)	187,0 (47,0)*	-5,0	204,0 (37,0)	187,0 (38,0)*	-7,0	0,415
HDL-C (mg/dL)	35,0 (10,0)	40,0 (11,0)*	14,0	38,0 (10,0)	41,0 (11,0)*	12,0	0,805
LDL-C (mg/dL)	133,0 (40,0)	121,0 (44,0)*	-7,0	138,0 (36,0)	124,0 (36,0)*	-8,0	0,678
TG (mg/dL)	159,0 (90,0)	129,0 (69,0)*	-14,0	143,0 (81,0)	108,0 (54,0)*	-18,0	0,325
TG/HDL-C	5,2 (4,2)	3,8 (3,3)*	-19,4	4,4 (3,5)	2,9 (2,1)*	-23,3	0,401
não HDL-C (mg/dL)	165,0 (43,0)	147,0 (47,0)*	-9,0	167,0 (37,0)	146,0 (37,0)*	-11,0	0,579
Apo B (mg/dL)	103,3 (24,9)	105,6 (26,6)	3,5	103,2 (24,8)	106,7 (37,1)	6,0	0,822
LDL-C/Apo B	1,3 (0,2)	1,1 (0,2)*	-9,9	1,4 (0,3)	1,2 (0,3)*	-10,4	0,910
Apo CII (mg/dL)	5,1 (2,8)	6,4 (2,9)	26,2	4,7 (2,0)	4,7 (2,0)	13,5	0,262
Apo CIII (mg/dL)	9,0 (3,1)	10,6 (4,2)	3,2	9,0 (3,2)	8,8 (3,6)	-2,2	0,192
AGNEs (mEq/dL)	0,59 (0,27)	0,64 (0,26)	9,8	0,68 (0,32)	0,63 (0,31)	-6,0	0,018
Glicemia (mg/dL)	108,0 (35,0)	107,0 (37,0)*	-1,0	101,0 (26,0)	103,0 (33,0)	2,0	0,428
Insulina (μ U/ml)	17,6 (7,5)	18,0 (7,9)	0,0	18,7 (8,5)	18,4 (8,4)	-0,5	0,876
HOMA-IR	4,7 (2,6)	4,8 (2,9)	1,7	4,5 (2,1)	4,5 (2,0)	-0,6	0,836
HbA1c (%)	5,1 (0,6)	5,1 (0,6)	0,0	5,0 (0,5)	5,0 (0,5)	0,0	0,447

Variáveis expressas em média e desvio padrão ou percentual do delta (T8-T0). Diferenças estatísticas analisadas pelo teste *t-Student* pareado ou *Wilcoxon* e *t-Student* ou *Mann-Whitney*, conforme distribuição de normalidade. CT – colesterol total, HDL-C – colesterol associado à lipoproteína de alta densidade, LDL-C – colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade, TG – triglicerídeos, Apo – apolipoproteína, AGNEs – ácidos graxos não esterificados, HOMA-IR – índice de resistência à insulina, HbA1c – hemoglobina glicada, $\Delta\%$ – ((T8-T0)/T0)*100. *p<0,05 versus T0. **comparação entre os $\Delta\%$.

Considerando o impacto do tabagismo e da presença do DM no metabolismo da HDL, testou-se o efeito do ω -3 nos parâmetros bioquímicos após exclusão desses indivíduos. Observou-se que a redução da glicemia de jejum no grupo ω -6 e a redução do LDL-C em ambos os grupos perderam a significância após a exclusão dos indivíduos com DM. Verificou-se ainda que o efeito do ω -3 sobre os AGNEs plasmáticos foi fortemente influenciado pela presença do DM, ou seja, na ausência desses indivíduos os AGNEs não sofreram efeito da intervenção. A exclusão dos indivíduos fumantes não modificou os resultados observados na amostra total, exceto em relação à glicemia do grupo ω -6 que perdeu a significância. Desta maneira, optou-se por manter todos os indivíduos nas análises posteriores, ajustando pelo tabagismo e DM quando necessário.

Na **Tabela 6** encontra-se descrito o perfil de ácidos graxos na HDL, segundo tempo e intervenção. Observou-se que a suplementação durante 8 semanas com ω -3 foi efetiva na mudança do percentual de EPA ($T_0=0,74\%$, $T_8=2,40\%$; $p<0,001$) e DHA ($T_0=1,96\%$, $T_8=3,27\%$; $p<0,001$) nas partículas de HDL. Consequentemente, o percentual de ácidos graxos ω -3 totais na HDL aumentou também de maneira significativa ($T_0=3,84\%$, $T_8=6,84\%$; $p<0,001$). Inversamente, observou-se também neste grupo, redução significativa dos ácidos graxos ω -6 totais, como resultado da diminuição do ácido γ -linolênico ($C18:3n-6$), ácido dihomo- γ -linolênico ($C20:3n-6$) e do ácido araquidônico ($C20:4n-6$), e na relação ω -6/ ω -3. No grupo ω -6, houve um modesto aumento dos ácidos graxos ω -6 totais, do ácido linoleico ($C18:2n-6$) e da relação ω -6/ ω -3, bem como, uma pequena redução do ácido eicosadienóico ($C20:2n-6$) e do EPA. Além disso, verificou-se diferenças significativas na magnitude do efeito das intervenções nos ácidos graxos ω -6 e ω -3 e em diversos membros das famílias: ω -6 ($\Delta \omega$ -6=2,65% e $\Delta \omega$ -3=-6,04%; $p<0,001$), $C18:2n-6$ ($\Delta \omega$ -6=2,31% e $\Delta \omega$ -3=-3,96%; $p<0,001$), $C18:3n-6$ ($\Delta \omega$ -6=-1,81% e $\Delta \omega$ -3=-13,77%; $p=0,027$), $C20:3n-6$ ($\Delta \omega$ -6=-1,33% e $\Delta \omega$ -3=-17,96%; $p<0,001$), $C20:4n-6$ ($\Delta \omega$ -6=3,48% e $\Delta \omega$ -3=-9,93%; $p=0,003$), ω -3 ($\Delta \omega$ -6=-1,07% e $\Delta \omega$ -3=82,93%; $p<0,001$), EPA ($\Delta \omega$ -6=-11,93% e $\Delta \omega$ -3=220,26%; $p<0,001$), DHA ($\Delta \omega$ -6=-2,29% e $\Delta \omega$ -3=68,31%; $p<0,001$). Verificou-se também o efeito significativo da intervenção na relação ω -6/ ω -3 ($\Delta \omega$ -6=4,06% e $\Delta \omega$ -3=-48,26%; $p<0,001$). Quando se estimou a atividade das enzimas desaturases não foram observadas variações significativas em função da intervenção, embora o grupo ω -3 tenha apresentado aumento da D5D e redução da SCD18 ao longo do tempo.

TABELA 6. Perfil de ácidos graxos na lipoproteína de alta densidade, segundo tempo e intervenção.

Variáveis (%)	ω -6 (n=70)			ω -3 (n=77)			<i>p</i> **
	T0	T8	$\Delta\%$	T0	T8	$\Delta\%$	
Ácidos graxos saturados	37,26 (1,93)	37,20 (3,31)	-1,05	37,07 (2,14)	36,86 (1,69)	-0,48	0,344
Ác. mirístico (C14:0)	0,75 (0,16)	0,76 (0,19)	-0,60	0,75 (0,18)	0,73 (0,1)	-4,00	0,678
Ác. pentadecílico (C15:0)	0,51 (0,20)	0,49 (0,19)	-6,07	0,47 (0,18)	0,48 (0,22)	-1,43	0,792
Ác. palmítico (C16:0)	22,76 (1,90)	22,84 (3,03)	0,59	22,98 (2,17)	22,37 (1,93)*	-2,25	0,359
Ác. margárico (C17:0)	0,53 (0,29)	0,49 (0,18)	-4,18	0,46 (0,12)	0,48 (0,16)	1,79	0,134
Ác. esteárico (C18:0)	9,97 (0,89)	9,96 (1,16)	-0,60	9,91 (1,04)	10,02 (1,15)	0,79	0,443
Ác. araquídico (C20:0)	1,51 (0,70)	1,45 (0,67)	-9,03	1,35 (0,65)	1,46 (0,72)	10,42	0,464
Ác. heneicosílico (C21:0)	0,04 (0,07)	0,02 (0,05)*	-72,61	0,03 (0,06)	0,05 (0,10)	-50,97	0,452
Ác. behênico (C22:0)	0,46 (0,14)	0,49 (0,23)	5,66	0,45 (0,19)	0,50 (0,26)	7,69	0,298
Ác. tricosílico (C23:0)	0,25 (0,13)	0,23 (0,15)	-6,47	0,25 (0,18)	0,27 (0,22)	7,81	0,311
Ác. lignocérico (C24:0)	0,48 (0,18)	0,48 (0,22)	5,00	0,43 (0,21)	0,51 (0,26)*	15,18	0,060
Ácidos graxos monoinsaturados	23,25 (2,52)	22,59 (2,56)*	-3,23	22,98 (2,40)	21,95 (2,67)*	-3,72	0,312
Ác. miristoléico (C14:1n-5)	0,20 (0,13)	0,19 (0,13)	-5,41	0,17 (0,14)	0,18 (0,14)	-6,36	0,594
Ác. 10- pentadecenóico (C15:1n-5)	0,18 (0,13)	0,17 (0,12)	-2,04	0,14 (0,13)	0,17 (0,12)	-0,49	0,889
Ác. palmitoléico (C16:1n-7)	3,30 (0,98)	3,12 (0,79)	-7,74	3,23 (0,89)	3,12 (0,92)	-2,42	0,950
Ác. 10-heptadecenóico (C17:1n-7)	0,41 (0,13)	0,38 (0,11)	-1,22	0,37 (0,14)	0,36 (0,16)	-2,22	0,711
Ác. oleico (C18:1n-9)	18,32 (2,32)	17,91 (2,28)	-2,34	18,23 (2,10)	17,14 (2,28)*	-5,75	0,040
Ác. gadoléico (C20:1n-9)	0,28 (0,22)	0,25 (0,18)	-14,84	0,21 (0,14)	0,25 (0,17)*	10,53	0,091
Ác. docosenóico (C22:1n-9)	0,31 (0,22)	0,29 (0,24)	-2,93	0,30 (0,23)	0,30 (0,24)	1,44	0,897
Ác. nervônico (C24:1n-9)	0,66 (0,26)	0,66 (0,27)	-1,33	0,70 (0,43)	0,78 (0,37)*	5,48	0,046
Ômega 6	35,06 (3,52)	36,07 (4,27)*	2,65	35,73 (3,39)	33,98 (3,66)*	-6,04	<0,001
Ác. linoleico (C18:2n-6)	23,44 (3,18)	24,55 (3,71)*	2,31	24,44 (3,70)	23,75 (3,92)	-3,96	<0,001
Ác. γ - linolênico (C18:3n-6)	0,67 (0,39)	0,64 (0,26)	-1,81	0,58 (0,27)	0,51 (0,25)*	-13,77	0,027
Ác. eicosadienóico (C20:2n-6)	0,34 (0,14)	0,31 (0,12)*	-6,06	0,30 (0,13)	0,31 (0,14)	0,00	0,124
Ác. dihomo- γ -linolênico (C20:3n-6)	2,14 (0,46)	2,12 (0,43)	-1,33	2,08 (0,52)	1,72 (0,39)*	-17,96	<0,001
Ác. araquidônico (C20:4n-6)	8,22 (1,83)	8,18 (1,76)	3,48	8,11 (1,58)	7,42 (1,50)*	-9,93	0,003
Ác. docosadienóico (C22:2n-6)	0,25 (0,25)	0,26 (0,31)	2,38	0,23 (0,23)	0,27 (0,40)	6,57	0,649
Ômega 3	4,02 (0,90)	3,75 (0,85)	-1,07	3,84 (0,84)	6,84 (1,47)*	82,93	<0,001
Ác. α -linolênico (C18:3n-3)	1,07 (0,32)	1,05 (0,33)	1,24	0,96 (0,22)	0,99 (0,19)	4,94	0,139
Ác. eicosatrienóico (C20:3n-3)	0,20 (0,16)	0,19 (0,15)	-4,71	0,18 (0,15)	0,19 (0,18)	-3,56	0,972
Ác. eicosapentaenoico (C20:5n-3)	0,84 (0,36)	0,71 (0,25)*	-11,93	0,74 (0,31)	2,40 (0,92)*	220,26	<0,001
Ác. docosaexaenoico (C22:6n-3)	1,90 (0,55)	1,80 (0,47)	-2,29	1,96 (0,59)	3,27 (0,68)*	68,31	<0,001
EPA + DHA	2,74 (0,78)	2,51 (0,64)*	-5,39	2,70 (0,75)	5,66 (1,43)*	114,23	<0,001

(cont.)

TABELA 6. (cont) Perfil de ácidos graxos na lipoproteína de alta densidade, segundo tempo e intervenção.

Variáveis (%)	ω -6 (n=70)			ω -3 (n=77)			<i>p</i> **
	T0	T8	$\Delta\%$	T0	T8	$\Delta\%$	
ω -6/ ω -3	9,21 (2,46)	10,05 (2,25)*	4,06	9,77 (2,38)	5,27 (1,64)*	-48,26	<0,001
Ác. linoleico / ác. α -linolênico	23,76 (7,80)	25,46 (8,16)	7,50	26,87 (7,63)	25,02 (6,93)	-9,96	0,028
Ác. araquidônico / EPA	11,14 (4,65)	12,47 (4,45)*	16,01	12,11 (5,21)	3,90 (2,84)*	-72,78	<0,001
Ác. araquidônico / EPA + DHA	3,20 (1,05)	3,40 (0,95)*	5,62	3,19 (0,93)	1,44 (0,69)*	-58,92	<0,001
Ác. araquidônico / ác. linoleico	0,36 (0,09)	0,34 (0,08)*	-0,83	0,34 (0,10)	0,32 (0,09)*	-8,22	0,857
EPA / ác. α -linolênico	0,84 (0,47)	0,73 (0,29)*	-11,23	0,80 (0,36)	2,50 (1,06)*	210,48	<0,001
DHA / ác. α -linolênico	1,92 (0,80)	1,83 (0,57)	-6,47	2,16 (0,89)	3,45 (1,10)*	66,22	<0,001
D5D	4,02 (1,29)	4,03 (1,30)	3,32	4,10 (1,14)	4,50 (1,24)*	8,37	0,148
D6D	0,03 (0,02)	0,03 (0,01)	0,58	0,02 (0,01)	0,02 (0,01)	-15,22	0,256
SCD-16	0,15 (0,04)	0,14 (0,04)	-6,79	0,14 (0,04)	0,14 (0,04)	-0,27	0,409
SCD-18	1,85 (0,30)	1,82 (0,29)	-1,71	1,86 (0,33)	1,74 (0,33)*	-7,76	0,049

Variáveis expressas em média e desvio padrão ou percentual do delta (T8-T0). Diferenças estatísticas analisadas pelo teste *t-Student* pareado ou *Wilcoxon* e *t-Student* ou *Mann-Whitney*, conforme distribuição de normalidade. D5D: C20:4n-6/C20:3n-6; D6D: C20:3n-6/C18:2n-6 SCD-16: C16:1n-7/C16:0; SCD-18: C18:1n-9/C18:0, $\Delta\% = ((T8-T0)/T0)*100$. * $p < 0,05$ versus T0. **comparação entre os $\Delta\%$.

Na **Tabela 7**, encontram-se descritas as modificações em função do tempo e da intervenção da concentração de Apo AI, da atividade da PON1, e suas relações, da CETP e dos conteúdos de AGNEs, Apo CII e CIII na HDL. Após 8 semanas de intervenção, houve diminuição da relação PON1/HDL-C em ambos os grupos e diminuição da concentração de HDL_{AGNEs} no grupo ω -3. Houve também efeito ω -3 na redução de HDL_{AGNEs}, quando comparado ao ω -6 (Δ ω -6= -3,4% e Δ ω -3=-16,2%; $p=0,006$). Com exclusão dos indivíduos fumantes, observou-se o efeito da intervenção na atividade da CETP, quando analisado o Δ bruto (Δ ω -6= 3,60 e Δ ω -3=-1,99; $p=0,044$).

TABELA 7. Variáveis relacionadas ao metabolismo da HDL, segundo tempo e intervenção.

Variáveis	ω -6 (n=70)			ω -3 (n=77)			p**
	T0	T8	$\Delta\%$	T0	T8	$\Delta\%$	
Apo AI (mg/dL)	127,1 (25,3)	130,2 (22,4)	4,7	130,1 (25,4)	134,6 (33,2)	6,1	0,783
HDL-C / Apo AI	0,30 (0,1)	0,31 (0,1)*	11,0	0,28 (0,1)	0,30 (0,1)*	9,7	0,411
Apo B / Apo AI	0,8 (0,3)	0,8 (0,2)	0,4	0,8 (0,2)	0,8 (0,2)	3,4	0,543
PON1 (nmol min ⁻¹ . ml ⁻¹)	59,0 (32,5)	59,2 (32,6)	1,5	54,7 (29,7)	55,7 (31,8)	5,2	0,498
PON1 / HDL-C	1,8 (1,0)	1,6 (0,9)*	-9,3	1,5 (0,9)	1,4 (0,8)*	-1,7	0,886
PON1 / Apo AI	0,5 (0,3)	0,5 (0,3)	-0,9	0,4 (0,3)	0,4 (0,3)	4,3	0,209
CETP (pmol/ul/h)	50,3 (19,8)	53,7 (21,6)	14,9	49,0 (16,7)	49,1 (17,7)	4,6	0,112
HDL _{AGNEs} (mEq/dL)	0,29 (0,15)	0,29 (0,14)	-3,4	0,32 (0,14)	0,25 (0,12)*	-16,2	0,006
HDL _{Apo CII} (mg/dL)	3,1 (1,5)	3,2 (1,8)	-8,4	3,0 (1,0)	2,7 (1,0)	-10,0	0,549
HDL _{Apo CIII} (mg/dL)	5,2 (2,3)	5,6 (2,8)	-8,7	5,1 (1,7)	4,6 (2,2)	-16,9	0,322

Variáveis expressas em média e desvio padrão ou percentual do delta (T8-T0). Diferenças estatísticas analisadas pelo teste *t-Student* pareado ou *Wilcoxon* e *t-Student* ou *Mann-Whitney*, conforme distribuição de normalidade. HDL-C – colesterol associado à lipoproteína de alta densidade, Apo – apolipoproteína, PON1 – paraoxonase 1, CETP – proteína de transferência de colesterol esterificado, AGNEs – ácidos graxos não esterificados, $\Delta\%$ – ((T8-T0)/T0)*100. *p<0,05 versus T0. **comparação entre os $\Delta\%$.

O efeito do ω -3 no tamanho da partícula de HDL está apresentado na **Tabela 8** e na **Figura 7**. A intervenção rica em EPA e DHA resultou em um aumento significativo do percentual das partículas de HDL1 (28,7%), HDL2 (19,3%) e HDL3 (19,8%) (**Tabela 8**) e, consequentemente, do percentual de HDL_{GRANDE} (**Figura 7A e 7G**). Observou-se também redução do percentual de HDL_{PEQUENA} (**Figura 7E e 7G**) como resultado da redução das subfrações - HDL8 (-2,5%), HDL9 (-6,7%) e HDL10 (-10,6%) (**Tabela 8**). De modo contrário, ao longo do tempo o grupo ω -6 apresentou redução no percentual das partículas grandes (HDL1=-5% e HDL2=-2,1%), além do aumento do percentual das partículas pequenas (HDL8=13,0%, HDL9=7,8% e HDL10=26,9%).

TABELA 8. Subfrações da lipoproteína de alta densidade, segundo tempo e intervenção.

Variáveis	ω-6 (n=70)			ω-3 (n=77)			p**
	T0	T8	Δ%	T0	T8	Δ%	
Percentual (%)							
HDL 1	10,5 (3,9)	9,2 (3,0)*	-5,0	10,3 (4,0)	11,9 (3,2)*	28,7	<0,001
HDL 2	11,5 (4,2)	10,8 (3,5)*	-2,1	12,5 (4,4)	14,2 (4,6)*	19,3	<0,001
HDL 3	6,9 (2,1)	6,7 (2,1)	-1,2	7,2 (2,3)	8,2 (2,2)*	19,8	<0,001
HDL 4	8,9 (1,7)	8,6 (1,4)	-2,2	9,3 (1,8)	9,8 (1,2)*	8,3	0,001
HDL 5	10,9 (1,8)	10,5 (1,3)	-1,6	11,1 (1,6)	11,1 (1,4)	1,5	0,238
HDL 6	21,7 (2,8)	22,2 (2,5)	2,8	21,7 (3,4)	20,6 (3,1)*	-3,6	0,010
HDL 7	7,8 (1,5)	8,3 (1,2)*	8,4	7,6 (1,7)	7,0 (1,4)*	-2,4	<0,001
HDL 8	7,7 (1,9)	8,3 (1,6)*	13,0	7,6 (2,1)	6,8 (1,8)*	-2,5	<0,001
HDL 9	6,5 (1,8)	6,9 (1,7)*	7,8	6,1 (2,0)	5,4 (1,6)*	-6,7	<0,001
HDL 10	7,6 (4,1)	8,6 (3,8)*	26,9	6,6 (4,7)	4,9 (3,1)*	-10,6	<0,001
Concentração (mg/dL)							
HDL-C 1	3,7 (2,1)	3,6 (1,9)	9,1	4,0 (1,9)	5,0 (2,2)*	42,9	0,001
HDL-C 2	4,2 (2,4)	4,6 (2,5)*	11,3	4,8 (2,5)	6,2 (3,1)*	41,1	0,002
HDL-C 3	2,5 (1,4)	2,9 (1,7)*	21,5	2,8 (1,5)	3,6 (1,7)*	41,7	0,029
HDL-C 4	3,2 (1,2)	3,4 (1,6)*	10,4	3,5 (1,3)	4,1 (1,3)*	25,5	0,023
HDL-C 5	3,8 (1,2)	4,2 (1,2)*	13,3	4,1 (1,0)	4,5 (1,1)*	14,0	0,921
HDL-C 6	7,5 (1,8)	8,7 (1,9)*	18,7	8,1 (2,2)	8,4 (1,9)	8,8	0,001
HDL-C 7	2,7 (0,8)	3,3 (0,8)*	29,6	2,8 (1,1)	2,9 (0,8)	16,5	0,001
HDL-C 8	2,7 (0,9)	3,2 (0,8)*	33,1	2,8 (1,1)	2,7 (0,8)	9,1	<0,001
HDL-C 9	2,2 (0,8)	2,7 (0,8)*	29,0	2,3 (1,0)	2,1 (0,7)	-1,7	<0,001
HDL-C 10	2,6 (1,6)	3,4 (1,7)*	52,3	2,5 (1,9)	2,0 (1,1)*	-0,3	<0,001

Variáveis expressas em média e desvio padrão ou percentual do delta (T8-T0). Diferenças estatísticas analisadas pelo teste *t-Student* pareado ou *Wilcoxon* e *t-Student* ou *Mann-Whitney*, conforme distribuição de normalidade. HDL – lipoproteína de alta densidade. HDL-C – colesterol associado à lipoproteína de alta densidade, $\Delta\%$ – ((T8-T0)/T0)*100. *p<0,05 versus T0. **p<0,05 entre os $\Delta\%$.

O impacto do ω -3 sobre as subfrações da HDL foi reforçado após o ajuste do percentual de subfrações pela concentração de colesterol total nesta lipoproteína. Destacam-se o aumento de 42,9% na subfração HDL1 no grupo ω -3, enquanto o grupo ω -6 apresentou aumento de 52,3% na HDL10, a menor subfração da HDL.

FIGURA 7. Modificações no tamanho da lipoproteína de alta densidade, segundo tempo e intervenção.

Diferenças estatísticas analisadas pelo teste *t-Student* pareado ou *Wilcoxon* e *t-Student* ou *Mann-Whitney*, conforme distribuição e normalidade. HDL – lipoproteína de alta densidade, $\Delta\%$ – $((T8-T0)/T0)*100$. * $p<0,05$. A, C, E) Mudança % do percentual. B, D, F) Mudança % da concentração (mg/dL). G) $\Delta\%$ do percentual. H) $\Delta\%$ da concentração.

Com o objetivo de avaliar se mudanças na composição e tamanho da partícula de HDL induzidas pelo ω -3 acarretaria em alterações na funcionalidade desta lipoproteína, a **Figura 8** mostra os resultados referentes à capacidade antioxidante da HDL. Ao longo do período de intervenção, observou-se que no grupo ω -3 não houve mudanças significativas no tempo de *Lag time* e demais variáveis. Entretanto, observou-se que o grupo ω -6 apresentou aumento do tempo de resistência à oxidação ($T_0=72,6$ min e $T_8=75,0$ min; $p=0,005$) e no tempo (T_{max}) para produção máxima de dienos conjugados ($T_0=169,2$ min e $T_8=172,2$ min; $p=0,046$). Observou-se neste grupo também menor área sob a curva (AUC) gerada ($T_0=6533,4$ AUC e $T_8=6396,3$ AUC $p=0,006$). Entretanto, quando se comparou o efeito das intervenções, os grupos apresentaram perfis semelhantes. A exclusão dos indivíduos fumantes ou dos portadores de DM não levou a modificações dos resultados obtidos com a amostra total.

FIGURA 8. Capacidade antioxidante da lipoproteína de alta densidade, segundo tempo e intervenção.

Diferenças estatísticas analisadas pelo teste *t-Student* pareado ou *Wilcoxon* e *t-Student* ou *Mann-Whitney*, conforme distribuição de normalidade. A) *Lag time* – tempo de resistência à oxidação. B) V_{max} – taxa máxima de peroxidação lipídica. C) T_{max} – tempo para produção máxima de dienos conjugados. D) DO_{max} – produção máxima de dienos conjugados. E) AUC – área sob a curva gerada. F) Δ – delta T8-T0. * $p < 0,05$.

Visando refinar o impacto da variação na incorporação de ω -3 nas mudanças dos parâmetros de funcionalidade da HDL, correlações lineares foram testadas (**Tabela 9**). Verificou-se correlações positivas entre os deltas de EPA e DHA com o percentual de HDL_{GRANDE} ($r=0,427$ e $p<0,001$; $r=0,417$ e $p<0,001$, respectivamente) e negativas com o percentual de HDL_{PEQUENA} ($r=-0,304$ e $p<0,001$; $r=-0,356$ e $p<0,001$, respectivamente). Correlações moderadas também foram observadas entre EPA, DHA e razão ω -6/ ω -3 com o percentual de HDL1, HDL2 e HDL3.

TABELA 9. Mapa de cores representando as correlações entre as variações dos parâmetros de funcionalidade da HDL e as mudanças de EPA, DHA e na razão ω -6/ ω -3 na lipoproteína.

		Variáveis	Δ EPA	Δ DHA	Δ ω -6 / ω -3
	>0,5	Δ HDL-C (mg/dL)			
	0,4	Δ Apo A1 (mg/dL)			
	0,3	Δ HDL _{Apo CII} (mg/dL)			
	0,2	Δ HDL _{Apo CIII} (mg/dL)			
	0,1	Δ PON1 (nmol min ⁻¹ . ml ⁻¹)			
	0,0	Δ CETP (pmol/ul/h)			
	-0,1	Δ HDL _{AGNEs} (mEq/dL)			
	-0,2	Δ HDL 1 (%)			
	-0,3	Δ HDL 2 (%)			
	-0,4	Δ HDL 3 (%)			
	>-0,5	Δ HDL 4 (%)			
	p<0,05	Δ HDL 5 (%)			
		Δ HDL 6 (%)			
		Δ HDL 7 (%)			
		Δ HDL 8 (%)			
		Δ HDL 9 (%)			
		Δ HDL 10 (%)			
		Δ HDL _{GRANDE} (%)			
		Δ HDL _{INTERMEDIARIA} (%)			
		Δ HDL _{PEQUENA} (%)			
		Δ HDL-C 1 (mg/dL)			
		Δ HDL-C 2 (mg/dL)			
		Δ HDL-C 3 (mg/dL)			
		Δ HDL-C 4 (mg/dL)			
		Δ HDL-C 5 (mg/dL)			
		Δ HDL-C 6 (mg/dL)			
		Δ HDL-C 7 (mg/dL)			
		Δ HDL-C 8 (mg/dL)			
		Δ HDL-C 9 (mg/dL)			
		Δ HDL-C 10 (mg/dL)			
		Δ HDL-C _{GRANDE} (mg/dL)			
		Δ HDL-C _{INTERMEDIARIA} (mg/dL)			
		Δ HDL-C _{PEQUENA} (mg/dL)			
		Δ Lag time (min)			
		ΔV_{max} (mOD/min)			
		ΔT_{max} (min)			
		ΔDO_{max} (OD)			
		Δ Area (AUC)			

Análise pelo método de *Pearson* ou *Spearman*, conforme distribuição da variável. HDL – lipoproteína de alta densidade, HDL-C – colesterol associado à lipoproteína de alta densidade, Apo – apolipoproteína, PON1 – paraoxonase 1, CETP – proteína de transferência de colesterol esterificado, AGNEs – ácidos graxos não esterificados. Lag time – tempo de resistência à oxidação, V_{max} – taxa máxima de peroxidação lipídica, T_{max} – tempo para produção máxima de dienos conjugados, DO_{max} – produção máxima de dienos conjugados AUC – área sob a curva gerada, Δ – delta T8-T0. Significância estatística: p<0,05.

Ampliando a associação entre os ácidos graxos incorporados à HDL e seus parâmetros de funcionalidade, testou-se a análise de tendência linear, utilizando-se a variação dos parâmetros em função dos deltas de EPA, DHA e razão ω -6/ ω -3 distribuídos em tercís. Em linhas gerais, observou-se que indivíduos com maior incorporação de EPA ($\Delta \geq 1,41\%$) e DHA ($\Delta \geq 1,10\%$) e, conseqüentemente, menor razão ω -6/ ω -3 ($\Delta \leq -3,77\%$) apresentaram maiores mudanças em diversos parâmetros de funcionalidade. Observou-se que, com o aumento de EPA houve tendência à diminuição nos HDL_{AGNEs} e na HDL_{PEQUENA}, tanto em percentual quanto ajustada pelo conteúdo de colesterol; bem como no percentual e concentração das subfrações HDL6, HDL7, HDL8, HDL9 e HDL10. Em contrapartida, observou-se tendência linear ao aumento, no percentual e na subfração ajustada pelo conteúdo de colesterol, da HDL_{GRANDE} e suas subfrações (HDL1, HDL2 e HDL3) (**Tabela 10**). Padrão similar foi observado quando a análise de tendência linear foi testada com a variação da incorporação de DHA nas partículas de HDL (**Tabela 11**) e, conseqüentemente, na análise de tendência, segundo os tercís da razão ω -6/ ω -3 (**Tabela 12**). Estes resultados vão ao encontro dos resultados apresentado na **Tabela 9**.

TABELA 10. Análise de tendência linear da variação dos parâmetros de funcionalidade da HDL segundo tercil de variação de EPA da lipoproteína após intervenção.

Variáveis	Δ EPA			p
	1º tercil ($\Delta \leq 0,00$)	2º tercil ($0,04 \geq \Delta \leq 1,40$)	3º tercil ($\Delta \geq 1,41$)	
Δ HDL-C (mg/dL)	4,33	4,37	3,13	0,398
Δ Apo AI (mg/dL)	3,85	6,20	1,54	0,660
Δ HDL _{Apo CII} (mg/dL)	-0,03	0,58	-0,49	0,375
Δ HDL _{Apo CIII} (mg/dL)	-0,16	1,19	-0,67	0,539
Δ PON1 (nmol min ⁻¹ . ml ⁻¹)	0,01	0,69	1,23	0,567
Δ CETP (pmol/ul/h)	7,33	2,20	0,81	0,132
Δ HDL _{AGNEs} (mEq/dL)	0,03	-0,05*	-0,08*	<0,001
Δ HDL 1 (%)	-1,30	0,31	1,51*	0,001
Δ HDL 2 (%)	-0,47	-0,36	2,73*,**	<0,001
Δ HDL 3 (%)	-0,09	0,13	1,40*,**	<0,001
Δ HDL 4 (%)	-0,18	-0,12	0,56	0,042
Δ HDL 5 (%)	-0,25	-0,21	-0,01	0,477
Δ HDL 6 (%)	0,36	0,05	-1,60*,**	0,001
Δ HDL 7 (%)	0,38	0,07	-0,83*,**	<0,001
Δ HDL 8 (%)	0,52	0,06	-1,01*,**	<0,001
Δ HDL 9 (%)	0,32	-0,06	-0,72*	0,003
Δ HDL 10 (%)	0,71	0,13	-1,98*,**	0,001
Δ HDL _{GRANDE} (%)	-1,86	0,05	5,66*,**	<0,001
Δ HDL _{INTERMEDIARIA} (%)	0,32	-0,20	-1,86*	0,013
Δ HDL _{PEQUENA} (%)	1,54	0,12	-3,73*,**	<0,001
Δ HDL-C 1 (mg/dL)	-0,04	0,53	1,13*	0,020
Δ HDL-C 2 (mg/dL)	0,42	0,55	1,65*,**	<0,001
Δ HDL-C 3 (mg/dL)	0,40	0,55	0,85	0,020
Δ HDL-C 4 (mg/dL)	0,42	0,27	0,63	0,336
Δ HDL-C 5 (mg/dL)	0,31	0,55	0,31	1,000
Δ HDL-C 6 (mg/dL)	1,02	1,20	-0,08*,**	0,004
Δ HDL-C 7 (mg/dL)	0,44	0,47	0,00**	0,022
Δ HDL-C 8 (mg/dL)	0,35	0,45	-0,19*,**	0,012
Δ HDL-C 9 (mg/dL)	0,40	0,31	-0,23*,**	0,001
Δ HDL-C 10 (mg/dL)	0,58	0,37	-0,75*,**	<0,001
Δ HDL-C _{GRANDE} (mg/dL)	0,83	1,71	3,60*,**	<0,001
Δ HDL-C _{INTERMEDIARIA} (mg/dL)	2,23	2,53	0,92	0,099
Δ HDL-C _{PEQUENA} (mg/dL)	1,38	1,22	-1,15*,**	<0,001
Δ Lag time (min)	2,39	1,50	1,62	0,628
Δ V _{max} (mOD/min)	0,01	0,05	0,01	0,994
Δ T _{max} (min)	2,40	2,63	1,56	0,732
Δ DO _{max} (OD)	-0,01	0,00	-0,01	0,848
Δ Area (AUC)	-143,64	-37,33	-105,12	0,646

Variáveis expressas em média. Diferenças estatísticas analisadas pela análise de tendência linear. HDL – lipoproteína de alta densidade, HDL-C – colesterol associado à lipoproteína de alta densidade, Apo – apolipoproteína, PON1 – paraoxonase 1, CETP – proteína de transferência de colesterol esterificado, AGNEs – ácidos graxos não esterificados. Lag time – tempo de resistência à oxidação, V_{max} – taxa máxima de peroxidação lipídica, T_{max} – tempo para produção máxima de dienos conjugados, DO_{max} – produção máxima de dienos conjugados AUC – área sob a curva gerada, Δ – delta T8-T0 * p<0,05 versus 1º tercil. ** p<0,05 versus 2º tercil.

TABELA 11. Análise de tendência linear da variação dos parâmetros de funcionalidade da HDL segundo tercil de variação de DHA da lipoproteína após intervenção.

Variáveis	Δ DHA			p
	1º tercil ($\Delta \leq 0,04$)	2º tercil ($0,05 \geq \Delta \leq 1,00$)	3º tercil ($\Delta \geq 1,10$)	
Δ HDL-C (mg/dL)	5,08	3,57	3,20	0,184
Δ Apo AI (mg/dL)	4,10	9,12	-1,50	0,277
Δ HDL _{Apo CII} (mg/dL)	0,52	-0,28	-0,42	0,099
Δ HDL _{Apo CIII} (mg/dL)	1,19	-0,71	-0,57	0,052
Δ PON1 (nmol min ⁻¹ . ml ⁻¹)	1,94	0,00	-0,01	0,356
Δ CETP (pmol/ul/h)	4,00	5,19	1,18	0,514
Δ HDL _{AGNEs} (mEq/dL)	0,01	-0,03	-0,08*	0,001
Δ HDL 1 (%)	-1,40	-0,36	2,29*,**	<0,001
Δ HDL 2 (%)	-0,71	-0,22	2,78*,**	<0,001
Δ HDL 3 (%)	-0,16	0,01	1,58*,**	<0,001
Δ HDL 4 (%)	-0,35	-0,08	0,69*	0,003
Δ HDL 5 (%)	-0,36	-0,08	-0,04	0,340
Δ HDL 6 (%)	0,37	0,53	-2,08*,**	<0,001
Δ HDL 7 (%)	0,43	0,23	-1,03*,**	<0,001
Δ HDL 8 (%)	0,63	0,10	-1,15*,**	<0,001
Δ HDL 9 (%)	0,47	0,01	-0,94*,**	<0,001
Δ HDL 10 (%)	1,09	-0,15	-2,05*,**	<0,001
Δ HDL _{GRANDE} (%)	-2,29	-0,58	6,64*,**	<0,001
Δ HDL _{INTERMEDIARIA} (%)	0,09	0,62	-2,46*,**	0,003
Δ HDL _{PEQUENA} (%)	2,19	-0,05	-4,16*,**	<0,001
Δ HDL-C 1 (mg/dL)	-0,02	0,29	1,35*,**	<0,001
Δ HDL-C 2 (mg/dL)	0,43	0,55	1,61*,**	<0,001
Δ HDL-C 3 (mg/dL)	0,41	0,49	0,90*	0,012
Δ HDL-C 4 (mg/dL)	0,29	0,35	0,67	0,071
Δ HDL-C 5 (mg/dL)	0,41	0,47	0,31	0,635
Δ HDL-C 6 (mg/dL)	1,18	1,24	-0,27*,**	<0,001
Δ HDL-C 7 (mg/dL)	0,55	0,41	-0,04*,**	0,002
Δ HDL-C 8 (mg/dL)	0,51	0,35	-0,22*,**	0,001
Δ HDL-C 9 (mg/dL)	0,53	0,31	-0,35*,**	0,001
Δ HDL-C 10 (mg/dL)	0,78	0,16	-0,71*,**	0,001
Δ HDL-C _{GRANDE} (mg/dL)	0,88	1,29	3,96*,**	0,001
Δ HDL-C _{INTERMEDIARIA} (mg/dL)	2,59	2,47	0,65*	0,013
Δ HDL-C _{PEQUENA} (mg/dL)	1,80	0,86	-1,16*,**	<0,001
Δ Lag time (min)	1,94	1,58	1,96	0,998
Δ V _{max} (mOD/min)	-0,01	0,02	0,05	0,197
Δ T _{max} (min)	3,27	1,98	1,36	0,429
Δ DO _{max} (OD)	0,00	0,00	0,00	0,828
Δ Area (AUC)	-95,01	-108,18	-80,80	0,865

Variáveis expressas em média. Diferenças estatísticas analisadas pela análise de tendência linear. HDL – lipoproteína de alta densidade, HDL-C – colesterol associado à lipoproteína de alta densidade, Apo – apolipoproteína, PON1 – paraoxonase 1, CETP – proteína de transferência de colesterol esterificado, AGNEs – ácidos graxos não esterificados. Lag time – tempo de resistência à oxidação, V_{max} – taxa máxima de peroxidação lipídica, T_{max} – tempo para produção máxima de dienos conjugados, DO_{max} – produção máxima de dienos conjugados AUC – área sob a curva gerada, Δ – delta T8-T0 * p<0,05 versus 1º tercil. ** p<0,05 versus 2º tercil.

TABELA 12. Análise de tendência linear da variação dos parâmetros de funcionalidade da HDL segundo tercil de variação da relação ômega 6 / ômega 3 da lipoproteína após intervenção.

Variáveis	Δ Ômega 6 / ômega 3			p
	1º tercil (Δ ≤ -3,77)	2º tercil (-3,75 ≥ Δ ≤ -0,11)	3º tercil (Δ ≥ -0,04)	
Δ HDL-C (mg/dL)	2,65	4,24	4,96	0,102
Δ Apo A1 (mg/dL)	-1,29	6,50	6,52	0,132
Δ HDL _{Apo CII} (mg/dL)	-0,40	-0,26	0,30	0,192
Δ HDL _{Apo CIII} (mg/dL)	-0,50	-0,62	0,63	0,195
Δ PON1 (nmol min ⁻¹ . ml ⁻¹)	-0,31	2,10	0,15	0,829
Δ CETP (pmol/ul/h)	2,38	3,96	4,03	0,700
Δ HDL _{AGNEs} (mEq/dL)	-0,08	-0,04	0,01*	0,001
Δ HDL 1 (%)	1,95	-0,02*	-1,39*	<0,001
Δ HDL 2 (%)	2,33	0,07*	-0,56*	<0,001
Δ HDL 3 (%)	1,34	0,31*	-0,23*	<0,001
Δ HDL 4 (%)	0,71	-0,07	-0,38*	0,002
Δ HDL 5 (%)	0,10	-0,21	-0,36	0,170
Δ HDL 6 (%)	-1,81	0,34*	0,30*	<0,001
Δ HDL 7 (%)	-0,94	0,08*	0,50*	<0,001
Δ HDL 8 (%)	-1,00	-0,13	0,72*	<0,001
Δ HDL 9 (%)	-0,87	0,01*	0,39*	<0,001
Δ HDL 10 (%)	-1,79	-0,38	1,06*	0,001
Δ HDL _{GRANDE} (%)	5,63	0,33*	-2,19*	<0,001
Δ HDL _{INTERMEDIARIA} (%)	-1,95	0,16*	0,04	0,023
Δ HDL _{PEQUENA} (%)	-3,67	-0,51*	2,17*	<0,001
Δ HDL-C 1 (mg/dL)	1,20	0,37	0,04*	0,002
Δ HDL-C 2 (mg/dL)	1,49	0,71*	0,39*	0,001
Δ HDL-C 3 (mg/dL)	0,80	0,65	0,35	0,022
Δ HDL-C 4 (mg/dL)	0,61	0,35	0,35	0,217
Δ HDL-C 5 (mg/dL)	0,37	0,41	0,41	0,850
Δ HDL-C 6 (mg/dL)	-0,08	1,00*	1,24*	0,001
Δ HDL-C 7 (mg/dL)	0,02	0,33	0,57*	0,004
Δ HDL-C 8 (mg/dL)	-0,14	0,24	0,53*	0,002
Δ HDL-C 9 (mg/dL)	-0,27	0,31*	0,45*	<0,001
Δ HDL-C 10 (mg/dL)	-0,61	0,14	0,69*	<0,001
Δ HDL-C _{GRANDE} (mg/dL)	3,55	1,69*	0,88*	<0,001
Δ HDL-C _{INTERMEDIARIA} (mg/dL)	0,96	2,29	2,47	0,056
Δ HDL-C _{PEQUENA} (mg/dL)	-0,92	0,65*	1,76*	<0,001
Δ Lag time (min)	0,58	3,50	1,38	0,608
Δ V _{max} (mOD/min)	0,02	0,04	0,01	0,917
Δ T _{max} (min)	-0,80	5,51	1,84	0,266
Δ DO _{max} (OD)	0,00	0,00	0,00	0,883
Δ Area (AUC)	-52,78	-148,95	-81,13	0,734

Variáveis expressas em média. Diferenças estatísticas analisadas pela análise de tendência linear. HDL – lipoproteína de alta densidade, HDL-C – colesterol associado à lipoproteína de alta densidade, Apo – apolipoproteína, PON1 – paraoxonase 1, CETP – proteína de transferência de colesterol esterificado, AGNEs – ácidos graxos não esterificados. Lag time – tempo de resistência à oxidação, V_{max} – taxa máxima de peroxidação lipídica, T_{max} – tempo para produção máxima de dienos conjugados, DO_{max} – produção máxima de dienos conjugados AUC – área sob a curva gerada, Δ – delta T8-T0 * p<0,05 versus 1º tercil. ** p<0,05 versus 2º tercil.

Corroborando com esse perfil, a **Figura 9** demonstra as razões de chance (OR), ajustadas por potenciais confundidores (sexo, tabagismo, presença de doenças e uso de medicamentos), entre EPA, DHA e razão ω -6/ ω -3 na HDL e as variáveis relacionadas à funcionalidade da HDL. Reforçando o impacto da intervenção, foram utilizados os deltas das variações observadas nos parâmetros independentes (ácidos graxos) e nos desfechos (parâmetros de funcionalidade). Notou-se que, o aumento de EPA na HDL se associou à menor chance de ter elevação da atividade da PON1 (OR=0,446; IC=0,200-0,994) e da concentração de HDL_{AGNES} (OR=0,275; IC=0,113-0,660) (**Figura 9A**) e do percentual (OR=0,337; IC=0,146-0,782) e concentração (OR=0,306; IC=0,132-0,710) de HDL_{PEQUENA} (**Figura 9D e 9G**). Observou-se ainda que o EPA se associou a, aproximadamente, 3,5 mais chances de aumento no percentual (OR=3,522; IC=1,652-7,507) e na concentração (OR=3,826; IC=1,725-8,488) da HDL_{GRANDE} (**Figura 9D e 9G**). O aumento do EPA também esteve associado ao aumento do percentual e concentração da HDL1 e HDL2, percentual de HDL3 e HDL4, diminuição do percentual da HDL8 e HDL10 e da concentração de HDL8, HDL9 e HDL10 (**Figura 9D e 9G**).

Quanto ao aumento de DHA, observou-se que este esteve associado de maneira significativa à diminuição da concentração de Apo AI (OR=0,351; IC=0,150-0,821), além da diminuição da atividade da PON1 (OR=0,226; IC=0,110-0,639) e da concentração de HDL_{AGNES} (OR=0,275; IC=0,113-0,668) (**Figura 9B**). Resultados similares aos obtidos com o EPA foram observados para o DHA e o tamanho da HDL, destacando-se apenas o maior impacto da incorporação do DHA no percentual partículas HDL_{INTERMEDIARIA} (OR=0,339; IC=0,145-0,790), algo não observado com a maior incorporação de EPA (**Figura 9E**).

A diminuição da razão ω -6/ ω -3, além da associação com a redução da atividade da PON1 (OR=0,396; IC=0,175-0,889), da concentração de HDL_{AGNES} (OR=0,250; IC=0,102-0,617) (**Figura 9C**) e das partículas de HDL_{PEQUENA} – percentual (OR=0,319;

IC=0,136-0,748) concentração (OR=0,316, IC=0,136-0,733) (**Figura 9F e 9I**) – esteve também associado à diminuição do *Lag time* (OR=0,418; IC=0,180-0,969) (**Figura 9C**). Isto é, a diminuição da razão ω -6/ ω -3 reduziu em quase 60% as chances de ser observado um aumento no tempo de resistência à oxidação da HDL.

Destaca-se que estas análises também foram conduzidas para aumento isolado ω -6 e ácido araquidônico (AA), não tendo sido encontrada nenhuma OR significativa para estes ácidos graxos, mesmo após múltiplos ajustes.

FIGURA 9. Razões de chances (OR) ajustado da variação de EPA, DHA e razão ω -6/ ω -3 e variação dos parâmetros relacionados à funcionalidade da HDL.

Ajuste por sexo, tabagismo, doenças prévias e uso de medicamentos.

Os AG incorporados à HDL foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) para padronizar a amostra de acordo com as suas semelhanças ou diferenças, ou seja, de acordo com um perfil cardioprotetor ou aterogênico. Na **Tabela 13** estão apresentados os pesos dos coeficientes para as 7 componentes principais (CP) projetadas. Combinadas, estas componentes explicaram 78,16% da variação dos dados. A contribuição de cada CP na variabilidade dos dados variou entre 8,5 e 15,0%.

As CP1, CP2, CP4, CP5 e CP6 demonstraram um padrão de mudanças nos ácidos graxos da HDL mais cardioprotetor, com maiores pesos para os ácidos graxos insaturados, com exceção do ácido araquidônico, e do ácido esteárico. Em contrapartida, as CP3 e CP7 apresentaram um perfil mais aterogênico, devido aos maiores pesos dos coeficientes associados aos ácidos graxos saturados e ao ácido araquidônico.

TABELA 13. Análise de Componentes Principais (PCA): modificações dos ácidos graxos na HDL.

Δ AG (%)	COMPONENTES						
	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7
Δ Ác. mirístico (C14:0)	0,273	0,406	0,638	0,008	0,183	-0,209	-0,393
Δ Ác. pentadecílico (C15:0)	0,676	-0,161	-0,164	-0,584	0,126	-0,041	-0,030
Δ Ác. palmítico (C16:0)	-0,521	0,242	0,589	-0,162	0,250	0,094	0,191
Δ Ác. margárico (C17:0)	0,673	0,435	0,097	0,207	0,146	-0,364	0,029
Δ Ác. araquídico (C20:0)	0,611	-0,106	-0,347	-0,519	0,184	-0,139	0,320
Δ Ác. behênico (C22:0)	0,535	-0,003	-0,216	0,307	-0,162	0,285	-0,095
Δ Ác. lignocérico (C24:0)	0,399	-0,337	0,178	0,474	-0,240	0,045	0,312
Δ Ác. araquidônico (C20:4n-6)	-0,045	0,407	-0,567	0,182	-0,387	0,019	0,120
Δ Ác. esteárico (C18:0)	-0,027	0,613	-0,089	0,344	0,337	0,407	0,145
Δ Ác. miristoleico (C14:1n-5)	0,752	-0,095	-0,119	-0,380	0,128	0,156	-0,200
Δ Ác. 10- pentadecenóico (C15:1n-5)	0,739	-0,181	0,039	-0,284	0,094	0,253	-0,173
Δ Ác. 10-heptadecenóico (C17:1n-7)	0,614	0,026	0,405	0,172	-0,026	-0,304	-0,021
Δ Ác. oleico (C18:1n-9)	-0,382	0,183	0,542	-0,292	-0,239	0,145	0,308
Δ Ác. gadoleico (C20:1n-9)	0,838	-0,007	-0,028	0,009	0,054	-0,255	0,196
Δ Ác. docosenóico (C22:1n-9)	0,537	-0,404	0,227	0,028	-0,309	0,392	-0,070
Δ Ác. nervônico (C24:1n-9)	0,495	-0,299	0,134	0,508	-0,273	-0,071	0,206
Δ Ác. α -linolênico (C18:3n-3)	0,743	0,063	0,165	0,098	0,074	-0,400	0,064
Δ Ác. eicosatrienóico (C20:3n-3)	0,446	-0,311	0,238	-0,156	-0,282	0,321	-0,094
Δ Ác. eicosapentaenoico (C20:5n-3)	-0,016	-0,633	0,020	0,256	0,641	0,081	-0,108
Δ Ác. docosaexaenoico (C22:6n-3)	-0,031	-0,586	-0,186	0,482	0,544	0,028	-0,055
Δ Ác. linoleico (C18:2n-6)	-0,432	-0,168	-0,446	0,017	-0,371	-0,483	-0,348
Δ Ác. γ -linoleico (C18:3n-6)	0,684	0,556	0,057	0,196	0,080	0,054	-0,152
Δ Ác. eicosadienóico (C20:2n-6)	0,657	-0,134	0,188	0,053	-0,407	0,050	-0,113
Δ Ác. dihomog- γ -linolênico (C20:3n-6)	0,368	0,656	-0,269	0,161	0,010	0,318	-0,285
Δ Ác. docosadienóico (C22:2n-6)	0,659	0,234	-0,350	-0,076	0,181	0,064	0,382
% variância	15,04	13,19	12,45	10,35	9,42	9,14	8,59
% variância acumulada	15,04	28,23	40,67	51,02	60,44	69,57	78,16

Varáveis apresentadas em *loading*. Método de extração das componentes principais: *Eigenvalues*. Critério de Kaiser para medida de adequação da amostra = 0,657. Δ – delta T8-T0.

Na **Tabela 14** encontram-se as correlações da CP projetadas pela PCA com os parâmetros de funcionalidade da HDL. Observou-se que a CP2 apresentou correlação positiva com o $\Delta \text{HDL}_{\text{ApoCII}}$ ($r=0,448$; $p=0,042$) e ΔPON1 ($r=0,388$; $p=0,003$), enquanto a CP5 apresentou correlação negativa com $\Delta \text{HDL}_{\text{ApoCIII}}$ ($r=-0,638$; $p=0,002$) e ΔCETP ($r=-0,341$; $p=0,012$). A CP6 correlacionou-se positivamente com a variação do percentual da $\text{HDL}_{\text{GRANDE}}$ ($r=0,420$; $p=0,001$) e da $\text{HDL-C}_{\text{GRANDE}}$ ($r=0,270$; $p=0,042$) e negativamente com as frações pequenas – $\text{HDL}_{\text{PEQUENA}}$ ($r=-0,310$; $P=0,019$) e $\text{HDL-C}_{\text{PEQUENA}}$ ($r=-0,334$; $p=0,011$). Já a CP7, que teve um padrão mais aterogênico, se correlacionou positivamente com Δ da $\text{HDL}_{\text{PEQUENA}}$ ($r=0,312$; $p=0,018$) e $\text{HDL-C}_{\text{PEQUENA}}$ ($r=0,293$; $p=0,027$).

TABELA 14. Correlação entre as componentes principais (CP) e os parâmetros de funcionalidade da HDL

		Δ HDL _{Apo CII}	Δ HDL _{Apo CIII}	Δ PON1	Δ CETP	Δ HDL _{GRANDE}	Δ HDL _{PEQUENA}	Δ HDL-C _{GRANDE}	Δ HDL-C _{PEQUENA}	Δ Área
CP1 (15,04%)	r	-0,278	-0,208	0,154	-0,109	0,217	-0,248	0,203	-0,232	0,022
Padrão protetor	p	0,223	0,366	0,254	0,439	0,105	0,063	0,131	0,082	0,873
CP2 (13,19%)	r	0,448	0,086	0,388	-0,046	0,027	-0,058	-0,015	-0,078	0,073
Padrão protetor	p	0,042	0,712	0,003	0,744	0,840	0,666	0,911	0,566	0,590
CP3 (12,45%)	r	0,260	0,284	0,214	-0,004	0,098	-0,162	0,063	-0,074	-0,275
Padrão aterogênico	p	0,256	0,211	0,111	0,976	0,467	0,228	0,639	0,583	0,038
CP4 (10,35%)	r	0,161	0,368	0,032	0,009	-0,138	0,143	-0,138	0,107	-0,141
Padrão protetor	p	0,486	0,101	0,814	0,947	0,307	0,288	0,306	0,427	0,295
CP5 (9,42%)	r	-0,183	-0,638	-0,185	-0,341	0,147	-0,092	0,101	-0,169	-0,074
Padrão protetor	p	0,427	0,002	0,167	0,012	0,276	0,497	0,453	0,209	0,585
CP6 (9,14%)	r	0,048	0,168	0,122	-0,031	0,420	-0,310	0,270	-0,334	-0,037
Padrão protetor	p	0,836	0,468	0,365	0,823	0,001	0,019	0,042	0,011	0,786
CP7 (8,59%)	r	-0,197	-0,239	0,099	0,052	-0,110	0,312	-0,125	0,293	0,156
Padrão aterogênico	p	0,391	0,297	0,463	0,710	0,415	0,018	0,353	0,027	0,248

Resultados apresentados em coeficientes de correlação (r). Análise pelo método de *Pearson* ou *Spearman*, conforme distribuição da variável. HDL – lipoproteína de alta densidade, HDL-C – colesterol associado à lipoproteína de alta densidade, PON1 – paraoxonase 1, CETP – proteína de transferência de colesterol esterificado, AUC – área sob a curva gerada, Δ – delta T8-T0. Significância estatística: p<0,05.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a suplementação de ω -3, rica em EPA e DHA, promoveu modificações em diversos parâmetros relacionados à HDL, onde se destaca o aumento da concentração de HDL-C e das partículas grandes de HDL, seguido da redução das subfrações pequenas e AGNEs associados à HDL, sem, contudo, alterar a capacidade antioxidante da partícula.

Nas últimas décadas, o papel cardioprotetor da HDL tem sido extensivamente investigados e diretamente associado à capacidade desta lipoproteína em transportar colesterol, tornando o TRC a função mais estudada desta lipoproteína (KONTUSH, 2014). Desse modo, o baixo conteúdo de colesterol presente na HDL passou a ser aceito como fator de risco cardiovascular e foco para o desenvolvimento de fármacos que aumentem a sua concentração.

Gofman et al. (1966) foram os primeiros a reportarem a associação inversa entre o HDL-C e o risco de IAM. Apesar de estudos posteriores terem descrito resultados semelhantes em diferentes populações (RHOADS et al., 1976; GORDON et al., 1977; MILER et al., 1977; ASSMANN et al., 1996; GOLDBOURT et al., 1997; CHIROVSKY et al., 2009; BOEKHOLDT et al., 2010; TOUBOUL et al., 2014), nas últimas décadas a relação entre HDL-C e as DCV se tornou mais complexa. Isso porque, além dos estudos de revisões mendelianas não sustentarem esta relação causal (VOIGHT et al., 2012; HAASE et al., 2012), até o momento, nenhum medicamento desenvolvido para aumento do HDL-C foi bem-sucedido na prevenção de eventos cardiovasculares. O torcetrapibe (o primeiro inibidor de CETP estudado), apesar do aumento significativo de 72% na concentração de HDL-C, teve seu estudo interrompido precocemente pelo aumento de eventos e mortalidade cardiovascular (BARTER et al., 2007b; BARTER, 2009). Subsequentemente, o dalcetrapibe e o evacetrapibe falharam em demonstrar benefício clínico (SCHWARTZ et al., 2012; NICHOLLS et al., 2015; LINCOFF et al., 2017). Atualmente, o anacetrapibe é o único medicamento que permanece em avaliação, com

resultados iniciais de redução de eventos coronarianos após 4 anos de uso em associação com estatinas, em comparação ao grupo placebo (BOWMAN et al., 2017). Estes resultados evidenciam que o simples aumento do colesterol associado à HDL pode não ser o melhor marcador de risco cardiovascular. Corroborando com tal afirmação, Madsen et al. (2017) recentemente descreveram que homens e mulheres com HDL-C extremamente alto apresentaram alta mortalidade por doenças em geral. Essa controvérsia permitiu que um amplo campo de oportunidades fosse estabelecido, com o objetivo de investigar outros parâmetros quantitativos e qualitativos além do conteúdo de colesterol associado à essa lipoproteína. Desse modo, o conceito de funcionalidade da HDL tem ganho destaque (SVIRIDOV et al., 2008).

Considerando estes pressupostos, o presente estudo é uma das poucas investigações científicas que testou o efeito de uma suplementação com ω -3 sobre a incorporação de EPA e DHA na HDL e seu impacto nos parâmetros de funcionalidade desta lipoproteína.

Inicialmente, foram observados efeitos benéficos da suplementação de ω -3, rica em EPA e DHA, no perfil lipídico dos participantes, com redução na concentração do CT, LDL-C e TG. Um dos papéis mais estudados dos ácidos graxos da família ω -3 é a sua capacidade de reduzir TG plasmáticos, conforme vem sendo demonstrado há décadas em diversas revisões sistemáticas e meta-análises que englobam dezenas de ensaios clínicos (HARRIS, 1997; VON SCHACKY, 2006; BALK et al., 2006; MORI e WOODMAN, 2006; BAY, 2006; HARTWEG et al., 2007; ESLICK et al., 2009; MUSA-VELOSO et al., 2010; ASTALOS et al., 2016). Há fortes evidências de que o consumo de EPA e DHA diminui os níveis de TG de maneira dose-dependente, por meio da redução da síntese e do aumento do catabolismo de VLDL (MUSA-VELOSO et al., 2010). Doses de EPA+DHA entre 2 e 4 g podem levar a reduções de 12-30% nos TG plasmáticos (GRIMSGAARD et al., 1997; MORI et al., 2000; WOODMAN et al., 2002, POWNALL, et al., 1999; 2003; MAKI et al., 2011; ALLAIRE et al., 2016). Este benefício também tem sido observado em indivíduos com hipertrigliceridemia persistente

mesmo após início do tratamento com estatinas (BALLANTYNE et al., 2012) e naqueles com hipertrigliceridemia severa, onde a redução pode atingir 45% (HARRIS, 1997).

Em relação ao impacto do ω -3 nas concentrações de LDL-C, os resultados na literatura são mais inconclusivos, podendo haver aumento (HARRIS, 1997; POWNALL, et al., 1999; MORI et al., 2000; ALLAIRE et al., 2016) ou diminuição (BALLANTYNE et al., 2012) do conteúdo de colesterol associado à esta lipoproteína. Meta-análises sugerem efeitos diferenciais do EPA e do DHA no conteúdo de LDL-C, onde o DHA seria capaz de aumentar o LDL-C, enquanto o EPA levaria à redução ou menor aumento do LDL-C (WEI et al., 2011; JACOBSON et al., 2012).

Ressalta-se que, na presente investigação, a suplementação de ω -3 rica em EPA e DHA foi realizada de forma concomitante, visando fornecer 1,11 g de EPA e 0,69 g de DHA por dia. Desta forma, não foi possível avaliar os potenciais efeitos diferenciais destes dois ácidos graxos. Entretanto, destaca-se que esta suplementação representou um aumento de 947% em relação ao consumo habitual de EPA e DHA dos participantes do estudo, variável que na grande maioria dos estudos não é citada. O baixo consumo habitual de ω -3 observado corrobora com levantamentos prévios, que classificam o Brasil na categoria dos países com consumo destes ácidos graxos abaixo de 4% do valor calórico total diário (STARK, 2016).

O aumento no consumo de ω -3 por meio da intervenção foi eficaz também na incorporação do EPA e DHA nas partículas de HDL, com um aumento médio de 220% no conteúdo de EPA e de 68% no conteúdo de DHA. Dados na literatura sobre o perfil de ácidos graxos na HDL são escassos e menos ainda são os estudos que avaliaram esta mudança de perfil após suplementações com ω -3. Em um destes poucos estudos, Augustine et al. (2014) relataram aumento em mais de 200% em ambos ácidos graxos, contudo, em uma intervenção de 16 semanas com 3,6 g de EPA + DHA, o equivalente ao dobro da suplementação fornecida neste estudo. Em estudos transversais que descreveram o percentual de EPA e DHA na HDL

observou-se valores entre 0,49 e 0,80% para EPA e 0,93 e 4,50% de DHA, dependendo da população de estudo (NOORI, 2009; HARRIS, 2013). Os valores de 0,74% de EPA e 1,96% de DHA no momento basal deste trabalho são condizentes com tais achados.

Acrescenta-se que a suplementação durante 8 semanas com ω -3 levou ao aumento significativo de 12% no conteúdo de HDL-C, principalmente devido a elevação de 36% no colesterol associado às partículas maiores desta lipoproteína, enquanto as partículas menores apresentaram um aumento de somente 11%. Mori et al. (2000) também descreveram que o aumento do HDL-C observado em homens obesos que receberam 4 g de DHA durante 6 semanas foi devido a elevação de 29% no colesterol associado às partículas grandes de HDL. Além disso, tem sido sugerido que o HDL-C é mais fortemente influenciado pelos óleos de peixe enriquecidos com DHA do que aqueles enriquecidos com EPA (DAVIDSON, 1997). No presente estudo o aumento total de HDL-C não esteve associado ao aumento pelo EPA e DHA. Entretanto a variação de EPA ($r=0,276$; $p=0,001$) e DHA ($r=0,326$; $p<0,001$) na HDL correlacionou-se com o colesterol associado às partículas maiores desta lipoproteína. Esse perfil foi reforçado pela associação entre estes ácidos graxos e as partículas grandes de HDL, onde a incorporação de DHA aumentou a probabilidade em 6,7 vezes de se observar aumento no colesterol da HDL maiores, enquanto o EPA se associou 3,8 vezes. Destaca-se que, apesar do grupo ω -6 também ter apresentado aumento no HDL-C, esse ocorreu principalmente devido ao aumento de colesterol associado às partículas pequenas (38%), levando apenas à modesta elevação das partículas maiores (10%).

Maki et al. (2011) em um estudo duplo-cego, randomizado, com seguimento de 6 semanas incluindo indivíduos com hipercolesterolemia isolada que foram suplementados 3,6 g de EPA+DHA, descreveram um aumento de 1,5% na concentração de HDL-C ao longo tempo e de 3,3% quando comparado com grupo placebo. Além do impacto do EPA e do DHA isolados no metabolismo lipídico, outros fatores têm sido associados aos diferentes e controversos

resultados descritos na literatura, a saber: consumo de peixe, óleos de peixe ou preparações purificadas, dose e o perfil lipídico basal dos indivíduos estudados. A literatura mostra que intervenções com DHA promovem aumento do HDL-C variando de +2,9% a +18,3%, enquanto o EPA estaria associado com alterações variando entre +2,3% e +7,9% (GRIMSGAARD et al., 1997; MORI et al., 2000; NESTEL et al., 2002; JACOBSON et al., 2012). Contudo, ausência de efeitos da suplementação com óleo de peixe também foram descritas (BUCLEY et al., 2004; TANAKA et al., 2014). Assim, diferenças nos métodos empregados podem explicar os dissemelhantes resultados encontrados.

Considerando que a funcionalidade da HDL e, conseqüentemente, seu potencial cardioprotetor, é influenciado por múltiplos fatores além do conteúdo de colesterol associado à esta lipoproteína, alguns estudos têm investigado o papel do ω -3 em outros componentes da partícula. A Apo AI é a principal proteína estrutural e funcional da HDL e representa aproximadamente 70% da proteína total desta lipoproteína. Acredita-se que quase todas as partículas de HDL contenham ao menos uma proteína Apo AI (ASZTALOS e SCHAEFER 2003; SCHAEFER et al. 2010). As principais funções desta apoproteína incluem a interação com receptores celulares, ativação da LCAT, participação efluxo de colesterol e participação nas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes da HDL (GARNER et al., 1998; NAVAB, et al., 2000; TALL et al., 2008; KONTUSH et al., 2015).

De modo semelhante ao observado sobre o papel do EPA e DHA nas concentrações de HDL-C, o papel desses ácidos graxos nas concentrações de Apo AI não é totalmente estabelecido. Kuang et al. (2011), em um estudo experimental com células HepG2 observaram redução da expressão de Apo AI após incubação com DHA devido à inibição da ligação do HFN-3b à região promotora da Apo AI. Em contrapartida, Burilo et al. (2012), em seu estudo clínico, ao realizarem a análise proteômica em indivíduos sem doenças prévias, porém fumantes, observaram que a após intervenção com 1,8 g de EPA + DHA não houve

modificações das concentrações de Apo AI, embora a expressão da apolipoproteína encontrava-se aumentada nestes indivíduos. Previamente, Bonna et al. (1992) descreveram correlação positiva entre as variações de EPA e Apo AI e negativa entre as variações de DHA e Apo AI. Em 1997, Grimsgaard et al. relataram elevação da Apo AI em 224 homens saudáveis após a suplementação com 3,8 g de EPA, e não de DHA, durante 7 semanas. Apesar de não ter sido observada alteração da concentração de Apo AI ao longo do tempo no presente estudo, observou-se uma correlação negativa entre a variação de DHA na partícula de HDL e a variação de Apo AI. Além disso, após os ajustes por sexo, idade, doenças prévias e uso de medicamentos, confirmou-se que o aumento do DHA na HDL esteve associado com 65% menos chances do indivíduo apresentar aumento da Apo AI. Nenhum dos estudos anteriores avaliaram especificamente a influência da incorporação de EPA e DHA na HDL sobre a concentração de Apo AI. Desta maneira, pode-se inferir que provavelmente o aumento de HDL-C observado no grupo ω -3 não esteve associado ao aumento do número de partículas circulantes, mas ao enriquecimento com colesterol das partículas já existentes.

O conteúdo de colesterol na HDL é influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos à partícula, sendo a participação da CETP uma variável envolvida em controvérsias, segundo estudos experimentais e ensaios clínicos. A CETP desempenha importante papel no metabolismo da HDL, pois modula a transferência de ésteres de colesterol de partículas HDL esféricas maduras para lipoproteínas ricas em apolipoproteína B (VLDL, IDL e LDL) em troca de TG e sua atividade determina os níveis plasmáticos de HDL-C (VON ECKARDSTEIN et al. 2005; TALL et al. 2008). Estima-se que 66% dos ésteres de colesterol da HDL retornam ao fígado pela ação da CETP, confirmando a relevância desta proteína no TRC (BARTER et al., 2003), enquanto cerca de 33% dos ésteres de colesterol retornam pela via direta, por meio da interação HDL e SR-BI (FIELDING e FIELDING, 2007). A possível maior afinidade da CETP

pelas partículas de HDL pequenas e densas as tornaria mais ávidas ao TRC (MARCEL et al., 1990).

Até o momento, poucos são os estudos em humanos que avaliaram modificações na atividade da CETP mediada pela suplementação de ω -3. Enquanto Abbey et al. (1990) descreveram diminuição da atividade da CETP em 33 homens hipercolesterolêmicos após a suplementação com 3,8 g de EPA + DHA, Calabresi et al. (2004) não observaram alterações na concentração da CETP após suplementação de 3,6 g de EPA + DHA durante 8 semanas. Em contraposição, estudos experimentais descreveram aumento da expressão, concentração e atividade da CETP em camundongos normolipidêmicos transgênicos para CETP tratados com óleo de peixe (RAPOSO et al., 2014).

No presente estudo não foram observados efeitos da suplementação com ω -3 rico em EPA e DHA na atividade da CETP. Entretanto, baseando-se em estudos que descreveram que o tabagismo é um fator importante na modulação da atividade CETP (HE et al., 2013), o presente estudo também avaliou o possível efeito do ω -3 após a exclusão dos indivíduos tabagistas. Apesar dos resultados mostraram perfil semelhante à amostra total após 8 semanas de intervenção, foi observado o efeito significativo da intervenção nesta variável. Isto é, enquanto a suplementação com ω -3 promoveu redução média de 1,99 pmol/ul/h na atividade CETP, no grupo ω -6 houve um aumento de 3,60 pmol/ul/h. Embora a incorporação de EPA e DHA na HDL não tenha influenciado a atividade da CETP, é importante destacar que as mudanças globais no conteúdo de ácidos graxos induzidas pela intervenção se correlacionaram negativamente com a CP5 (componente com perfil cardioprotetor), sugerindo um papel modulador do conjunto de ácidos graxos modificados após a intervenção com ω -3 sobre a CETP.

O papel antioxidante da HDL tem sido relacionado à diversos componentes desta lipoproteína, a saber: Apo AI, Lp-PLA₂ e PON1. A atividade da PON1 tem sido amplamente

utilizada para a avaliação da propriedade antioxidante da HDL (MACKNESS et al., 2003; BARTER et al., 2004). Na circulação, a PON1 está associada quase que exclusivamente à HDL (KONTUSH et al., 2015), e de modo semelhante à CETP, está mais presente nas partículas pequena e densas desta lipoproteína (KONTUSH et al., 2003; KONTUSH e CHAMPMAN et al., 2010). Sua síntese ocorre predominantemente no fígado, e em menor proporção nos rins e no cólon (MACKNESS et al., 2010). Estudos prospectivos descreveram a atividade da PON1 como fator de risco independente para eventos coronarianos (MACKNESS et al., 2003; BHATTACHARYYA et al., 2008; TANG et al., 2012). Portanto, parte do papel cardioprotetor da HDL estaria relacionada ao poder antioxidante desta enzima (MACKNESS et al., 2003), cuja atividade parece estar negativamente correlacionada com a idade (JAOUAD, 2006; HOLZER et al., 2013).

Poucos estudos até o momento avaliaram o impacto da suplementação de ω -3 na atividade da PON1. Mulheres com artrite reumatoide que receberam 1 g de óleo de peixe durante 3 meses apresentaram aumento significativo da atividade desta enzima (GHORBANIHAGHJO et al., 2012). Golzari et al. (2017) também descreveram aumento da atividade da PON1 em indivíduos com DM2 após a suplementação durante 8 semanas com 2 g de EPA, sendo que o aumento de atividade esteve associado à elevação da concentração plasmática da PON1. Todavia, Tanaka et al. (2014) não observaram modificação na atividade da PON1 após suplementação de 1,8 g de EPA durante 4 semanas em indivíduos japoneses. No presente estudo, também não foi constatada nenhuma alteração na atividade da PON1 após 8 semanas de intervenção. Contudo, quando avaliada sob a ótica da incorporação de EPA e DHA na HDL, observou-se que a variação da atividade da enzima correlacionou-se negativamente com a variação de DHA. Além disto, a incorporação de EPA e DHA esteve associada a 35 e 75% menos chances, respectivamente, de ser observado aumento na atividade da PON1. Esse perfil é coerente com o aumento de partículas de HDL grandes no grupo ω -3, onde o conteúdo

de Apo AI e PON1 é menor, conforme descrito na literatura (KONTUSH et al., 2003; CAMONT et al., 2013). Reforçando o impacto da intervenção com ω -3, a PCA mostrou que a PON1 esteve correlacionada com o CP2, uma componente com características cardioprotetoras. Desse modo, aventa-se inferir que a incorporação de ω -3 na HDL promoveu o reequilíbrio de ácidos graxos nesta lipoproteína, modulando direta e indiretamente na funcionalidade da HDL no que se refere ao papel antioxidante.

Diferenças na distribuição de subclasses de HDL foram descritas pela primeira vez no início da década de 1950, utilizando-se a ultracentrifugação analítica (DE LALLA e GOFMAN, 1954). Após pouco mais de 60 anos, sabe-se que as partículas de HDL compreendem uma fração heterogênea de lipoproteína que varia de acordo com o conteúdo de apolipoproteínas e lipídios que, conseqüentemente, influenciam sua densidade, forma, tamanho e carga. Segundo Pirillo et al. (2013) partículas de HDL grandes seriam mais competentes no TRC

, a primeira função biológica descrita da HDL (GLOMSET, 1968). No entanto, estudos mais recentes mostraram que partículas de HDL pequenas e densas têm propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias mais expressivas que as partículas grandes, minimizando a oxidação da LDL na camada subendotelial (KONTUSH e CHAPAMAN, 2010). Mais recentemente, Du et al. (2015) mostraram que as partículas menores de HDL são mais eficientes no efluxo de colesterol em macrófagos, via receptores do tipo ABCA1. Desse modo, são crescentes as controvérsias sobre qual subfração teria maior função antiaterogênica e qual é a importância relativa do colesterol em cada destas subfrações.

O presente estudo reafirma que a incorporação de EPA e DHA à partícula de HDL promove mudanças significativas na distribuição das subfrações desta lipoproteína, tanto quando expressas em percentual, quanto após ajuste pelo conteúdo de colesterol em cada subfração. Esse perfil se traduziu em um aumento de 20% no percentual das HDL maiores no grupo ω -3, associado à tendência linear significativa do aumento de EPA e DHA induzir, de

modo proporcional, aumento do percentual de HDL grandes e, finalmente, a probabilidade da incorporação do EPA e do DHA em aumentar 3,5 e 10,0 vezes, respectivamente, as chances da HDL se tornar maior. As subfrações de HDL pequenas estiverem fortemente associadas ao aumento destes ácidos graxos, porém de modo negativo. No estudo *Kupio Study* (SALONEN et al., 1991) e *Quebec City Suburbs Study* (LAMARCHE et al., 1997), que avaliaram mais de 1000 homens, as partículas maiores de HDL foram inversamente associadas com a doença coronariana. Ao contrário, foram as subfrações menores que apresentaram essa forte associação inversa com DCV no *Physician's Health Study* (STAMPER et al., 1991), no acompanhamento de 5 anos no estudo *CAE Philly e Speedwell* (SWEETNAM et al., 1994) e no seguimento de 9 anos do estudo de *Caerphilly* (YU et al., 2003). Por outro lado, o estudo *Gofman Livermore Cohort* mostrou que concentrações menores de ambas as subfrações foram correlacionadas ao maior risco de incidência da doença coronariana em um seguimento prospectivo de 29,1 anos com 1905 homens (WILLIAMS et al., 2011). Estes resultados reforçam o vasto campo de conhecimento ainda a ser explorado.

Os resultados obtidos no presente estudo vão ao encontro de diversos estudos na literatura que também avaliaram os desfechos no tamanho da HDL em função de intervenções com o ω -3. Relatos de aumento de 3,3 a 63,0% nas partículas grandes e redução de 4,4 a 60,0% nas partículas pequenas têm sido descritos, após intervenções que variaram de 0,7 a 4 g de EPA e/ou DHA em diferentes populações, o que explica em parte a grande amplitude de efeito (MORI et al., 2000; WOODMAN et al., 2002; THOLSTRUP et al., 2004; WILKINSON et al., 2005; KELLEY et al., 2007; CASLAKE et al., 2008; WOOTEN et al., 2009; NEFF et al., 2011). Contrário à estas evidências, Maki et al. (2005) não observaram alterações nas subfrações de HDL em 57 indivíduos com baixa concentração de HDL-C após 6 semanas de intervenção com 1,25 g de DHA proveniente de algas, que pode ser considerada uma baixa dosagem em relação às demais investigações.

Apesar da suplementação com ácidos graxos da família ω -3 a HDL ter suscitado modulações em diversos parâmetros relacionados à HDL no presente estudo, sabe-se que a HDL está inserida em um dinâmico metabolismo lipídico. Portanto, propõe-se que os resultados aqui observados tenham a HDL como agente ativo, mas também como substrato para este equilíbrio que há entre as diversas lipoproteínas. Em sintonia com esse pressuposto, Newnham et al. (1992) demonstraram que em um sistema *in vitro* contendo partículas de HDL, lipoproteína lipase (LPL), VLDL e CETP houve geração de HDL menores de modo dose-dependente da concentração de VLDL. Isto é, quando menos VLDL estava disponível para receber CE da HDL em troca de TG, menos HDL pequenas foi formada, além de menos TG disponível na HDL para a ação da LPL. Sabe-se que a enzima LPL é estimulada por ω -3 (HARRIS et al. 1997, SHEARER et al., 2012). Tal mecanismo poderia explicar parte dos resultados observados no grupo ω -3. Apesar de não ter sido avaliada diretamente a concentração de VLDL, sabe-se que 95% do TG circulante, após jejum de 12 h, encontra-se associado à VLDL (HARRIS, 2009). No estudo em tela, observou-se que o ω -3 promoveu a redução de 18% do TG plasmáticos, e mesmo não tendo sido observada diferença em relação ao grupo ω -6, a menor disponibilidade de substrato (TG), após a suplementação com EPA e DHA durante 8 semanas, pode estar relacionado ao aumento no percentual e na concentração de colesterol associado às partículas maiores de HDL, mesmo na ausência da diminuição da atividade da CETP.

Um resultado que suporta tal afirmação é a diminuição dos AGNEs associados à HDL. Essa redução pode ser consequência da menor hidrólise das ligações ésteres do colesterol e dos TG, levando à redução de substratos livres para manter a transferência entre as lipoproteínas. Anteriormente ao estudo realizado por Newnham et al. (1992), Barter et al., (1990), também *in vitro*, demonstraram que a adição de AGNEs ao sistema contendo VLDL/LDL, HDL e CETP aumentou a capacidade de redução do tamanho da HDL em comparação ao sistema sem

AGNEs. Esse perfil sugere a possível retroalimentação positiva da atividade da CETP na presença de AGNEs, além deste ser resultante da própria ação da CETP. Aliado a este fato, estudos em animais verificaram redução na liberação de AGNEs a partir de adipócitos, mediante a redução da atividade da lipase hormônio sensível, decorrente da ingestão de óleo de peixe (RUSTAN et al., 1993).

De maneira interessante, Barter et al., (1990) Newnham et al. (1992) demonstraram que a redução no tamanho da partícula de HDL pela ação da CETP na presença de VLDL foi abolida quando adicionada albumina ao sistema, levantando a hipótese de que a albumina inibiria as alterações no tamanho HDL como resultado da remoção de AGNEs das lipoproteínas e/ou da CETP, retirando-se um estímulo positivo do sistema. É importante notar que alguns estudos descreveram aumento das concentrações de albumina após suplementação com ω -3 (DAUD et al., 2012), que pode ser decorrente da atenuação da inflamação quando na maior ingestão de ω -3 (CALDER, 2015). Destarte, a diminuição de AGNEs, poderia ser explicado em parte também devido à menor quantidade de substrato para a sua produção (VLDL), assim como, menor geração no tecido adiposo e ainda decorrente do aumento de albumina sérica e modulação da inflamação, parâmetros estes não avaliados no presente estudo.

Cabe destacar que os resultados aqui observados sugerem ainda que foi necessário atingir um limiar de incorporação de EPA ($\Delta \geq 1,41\%$) e DHA ($\Delta \geq 1,10\%$) na HDL para que esses ácidos graxos modulassem a distribuição das subfrações de HDL e o conteúdo de AGNEs nesta lipoproteína.

Apesar de não ter sido constatado efeito do tempo nas concentrações de AGNEs no plasma e na HDL, observou-se aumento significativo das concentrações plasmáticas de AGNEs (+9,8%) no grupo ω -6 quando comparado ao grupo intervenção ω -3. Essa mudança que pode ter interferido na atividade da CETP, que mesmo na ausência de diferença significativas após 8 semanas, houve um aumento média de 15% na sua atividade, fato que biologicamente pode

ser expressivo. Se realmente assim o for, o aumento no percentual de partículas pequenas de HDL observado poderia ser decorrente desta modulação.

Ressalta-se que a suplementação com ω -6 (1,95 g de ácido linoleico) foi utilizada como controle pelo fato de ser o ácido graxo poli-insaturado mais comum na dieta do brasileiro (POF, 2008-2009). Apesar de, aparentemente, essa quantidade ser pequena frente ao consumo habitual de uma população ocidental e em relação aos demais ácidos graxos da dieta, na população deste estudo, a suplementação representou um acréscimo diário de quase 47% de ácido linoleico. Não obstante, sabe-se das limitações existentes na avaliação do consumo alimentar (FISBERG et al., 2005).

Os ácidos graxos da família ω -6 são precursores de eicosanoides da série par, que possuem ação pro-inflamatória (INNES e CALDER, 2018). Estados pró-inflamatórios podem interferir na resistência à insulina e, conseqüentemente, na ação das lipoproteínas lipases (LEE e LEE, 2014), ocasionando maior liberação de AGNEs. Além disso, estudos experimentais descreveram aumento na atividade da CETP em estados inflamatórios agudos (CAZITA et al., 2008), bem como, correlação positiva entre a atividade desta enzima e o percentual de ácido araquidônico na LDL (CHANG et al., 2002).

Visando ampliar o perfil de funcionalidade da HDL, o presente estudo avaliou a capacidade antioxidante da HDL tendo como substrato oxidativo a LDL; de fato, acredita-se que a LDL represente o principal alvo fisiológico da ação antioxidante da HDL (NAVAB et al., 2004). A estratégia de utilizar o clássico modelo do Esterbauer et al (1989) para avaliar a capacidade antioxidante da HDL apresenta inúmeras vantagens, destacando-se o uso de um único método para estimar o papel antioxidante de componentes da HDL. As proteínas e enzimas que possuem atividade antioxidante são distribuídas de maneira não uniforme nas subfrações de HDL, embora as maiores concentrações estejam associadas às partículas menores de HDL (KONTUSH et al., 2003). Além disso, tem-se descrito que a partícula pequena e densa

de HDL adquire lipídios oxidados com mais eficiência do que as subfrações maiores (ASZTALOS et al., 1997). Esta atividade antioxidante estaria relacionada à inativação de lipídios oxidados originários da LDL, principalmente hidroperóxidos lipídicos, resultantes de mecanismos não enzimáticos e enzimáticos (KONTUSH et al., 2003).

Os dados obtidos neste estudo mostram ausência de efeito da suplementação de ω -3 no aumento do tempo de resistência à oxidação (*lag time*), assim como dos demais parâmetros relacionados à capacidade antioxidante da HDL. Entretanto, no grupo ω -6 foi observado aumento no tempo de *lag time* (3,6%), no $T_{\max}$ (1,9%) e diminuição na AUC gerada (+1,8%). Isto é, houve maior resistência à oxidação, bem como menor produção de dienos conjugados. Estes resultados podem ser explicados pelo aumento das partículas pequenas de HDL, que classicamente estão relacionadas ao papel antioxidante da HDL. Destaca-se que este grupo não apresentou mudanças significativas na Apo AI e PON1 e, portanto, a otimização na capacidade antioxidante no grupo ω -6 pode ser resultado do efeito sinérgico de vários componentes antioxidantes de natureza proteica (Apo AII, Apo AIV, Apo E, Apo J) e enzimática (PAF-AH, LCAT), bem como antioxidantes lipofílicos (principalmente tocoferóis) oriundos da dieta (KONTUSH et al., 2010).

De modo consistente aos resultados deste estudo, observou-se que a redução na relação ω -6/ ω -3 esteve associada com 60% menor chance de haver aumento no *lag time*. Quando as mudanças globais de ácidos graxos incorporados à HDL foram avaliadas por meio da análise de componentes principais (PCA), observou-se que a geração de dienos conjugados, estimada pela AUC, esteve correlacionada a um perfil aterogênico (CP3).

Estudos que avaliaram a capacidade antioxidante da HDL em humanos após intervenções com ω -3 rica em EPA e DHA são bem escassos. Contrário aos resultados obtidos no presente estudo, Park et al. (2015), em um estudo *in vitro*, com HDL reconstituída demonstraram que partículas contendo ω -6 apresentaram menor poder antioxidante quando

comparadas às partículas enriquecidas com ω -3. Recentemente, Sherratt et al. (2018) ao avaliarem a oxidação da partícula de HDL mediante indução pelo cobre e na ausência de LDL, observaram maior poder do EPA, em relação ao DHA, em retardar o início da oxidação. Ressalta-se que estes dois estudos foram desenvolvidos *in vitro*, limitando a extrapolação de seus resultados para sistemas *in vivo*. Já em humanos, Wurm et al. (2018) demonstraram que após 12 semanas, a função antioxidante da HDL, medida pelo índice inflamatório do HDL, foi significativamente prejudicada no grupo suplementado com ω -3 de forma dose-dependente.

Atualmente, em virtude da relação bem estabelecida entre LDL e DCV e o fracasso no uso de fármacos voltados ao manejo da HDL-C, pouca atenção tem sido dada às estratégias que visam otimizar a funcionalidade da HDL. As estatinas, que agem eficientemente na redução de 20 a 50% do LDL, de maneira dose-dependente e do da estatina utilizada, também apresentam efeito modesto nas concentrações plasmáticas de HDL-C (2-10%), aumentando o conteúdo de partículas grandes de HDL e a atividade da PON1 (GOMARASCHI et al., 20015). Os fibratos, usados principalmente para reduzir os TG plasmáticos, igualmente atuam moderadamente no aumento do HDL-C (5 a 15%) e na atividade da PON1, contudo, levam à redução das subfrações maiores de HDL (GOMARASCHI et al., 20015). A niacina é atualmente o fármaco mais potente disponível no aumento das concentrações de HDL-C (até 30%) (GOMARASCHI et al., 20015), mas seu uso é limitado pelos efeitos colaterais, especialmente o rubor intenso. Estatinas e fibratos também não são isentos de efeitos colaterais. Além disso, todos os efeitos no HDL-C, aumento de PON1 e aumento de HDL grandes que são descritos em intervenções com ω -3 apresentam perfil semelhante ou maior a estes medicamentos.

Considerando as limitações farmacológicas atuais, os resultados obtidos no presente estudo agregam mais evidências o atual estado da arte no que se refere ao papel do ω -3 no manejo dos fatores de risco cardiovascular, com ênfase na HDL. É importante pontuar que, assim como as estatinas, o uso do ω -3 não é livre de risco e deve ser planejado na rotina diária,

segundo estratégias de prevenção primária e secundária. Os efeitos adversos gastrointestinais, principalmente na eructação e hálito podem ser minimizados por meio do uso de formulações altamente purificadas, do uso de ácidos graxos isolados e também da posologia utilizada, além de ser recomendado que seja administrado sempre em associação às grandes refeições. Merece atenção também a interação com fármacos antiagregantes plaquetários e em indivíduos com problemas de coagulação.

Portanto, além do efeito bem estabelecido do ω -3 na redução dos TG, conforme aceito por diretrizes nacionais e internacionais (FALUDI et al. 2017; SISCOVICK et al., 2017), estas mesmas diretrizes também trazem recomendações (nível de evidência B) do consumo dos ácidos graxos ω -3 na prevenção secundária da DCV (SISCOVICK et al., 2017). Contudo, a recomendação na prevenção primária para indivíduos de alto risco cardiovascular ainda é contraditória e não há recomendações para a população geral sem risco cardiovascular, pelo fato da inexistência de ensaios clínicos.

Tal fato abre perspectivas para novos estudos que visem avaliar o efeito da suplementação ácidos graxos ω -3 na prevenção cardiovascular primária - particularmente visando avaliar e otimizar a funcionalidade da HDL. Destaca-se ainda que concomitantemente ao uso de formulações a base de ω -3, deve haver o estímulo constante da adoção de hábitos alimentares saudáveis que incluam alimentos fontes de ω -3.

8. CONCLUSÃO

No presente ensaio clínico, duplo-cego, aleatorizado, paralelo e controlado, a suplementação de ômega 3 ao longo de 8 semanas promoveu uma incorporação significativa de EPA e DHA na lipoproteína de alta densidade, elevando em 220,3% o percentual de EPA e 68,3% o percentual de DHA. Esta suplementação também promoveu aumento em 20% no percentual de partículas grande de HDL e redução em 5,0% e 16,2%, respectivamente, no percentual de partículas menores e na concentração de AGNEs na lipoproteína. Todavia, não houve modificação na sua capacidade antioxidante.

Considerando o objetivo da presente investigação, foi possível também observar que a incorporação de EPA e DHA se correlacionou negativamente com os AGNEs na HDL e suas subfrações menores, e positivamente com as suas subfrações maiores. Efeitos mais proeminentes foram constatados conforme o aumento desta incorporação. O aumento de EPA e DHA também se associou a menor chance de os indivíduos terem mais partículas pequenas de HDL, maior conteúdo AGNEs na HDL, maior atividade da PON1, e no caso do DHA, maior concentração de Apo AI.

Além disso, as componentes principais projetadas pela PCA com padrão mais cardioprotetor apresentaram uma correlação positiva com a variação de Apo CII da HDL, a atividade da PON1 e com as partículas grandes, além de correlação negativa com a variação de Apo CIII da HDL, a atividade da CETP e com as partículas pequenas. A componente principal 7, que teve um padrão mais aterogênico, correlacionou-se positivamente com a variação das partículas pequenas de HDL.

9. REFERÊNCIAS

1. ABBEY, M. et al. Effect of fish oil on lipoproteins, lecithin:cholesterol acyltransferase, and lipid transfer protein activity in humans. **Arteriosclerosis**, v. 10, n. 1, p. 85-94, 1990.
2. ABDELHAMID, A.S. et al. Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 7, Art. No.: CD003177, 2018.
1. ALLAIRE, J. et al. A randomized, crossover, head-to-head comparison of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid supplementation to reduce inflammation markers in men and women: The Comparing EPA to DHA (ComparED) Study. **Am J Clin Nutr**, v. 104, n. 2, p. 280-287, 2016.
2. APPEL, L. J. et al. Does supplementation of diet with 'fish oil' reduce blood pressure? A meta-analysis of controlled clinical trials. **Arch Intern Med**, v. 153, n. 12, p. 1429-38, 1993.
3. ASSMANN, G. et al. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. **Atherosclerosis**, v. 124, p. S11-S20, 1996. Suplemento.
4. ASSMANN, G.; GOTTO, A. M. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. **Circulation**, v. 109, n. 23 Suppl 1, p. III8-14, 2004.
5. ASZTALOS, B. et al. Role of free apolipoprotein A-I in cholesterol efflux: formation of pre-alpha-migrating high-density lipoprotein particles. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 17, n. 9, p. 1630-1636, 1997.
6. ASZTALOS, B. F.; SCHAEFER E.J. High-density lipoprotein subpopulations in pathologic conditions. **Am J Cardiol**, v. 91, n. 7A, p. 12E-17E, 2003.
7. ASZTALOS, I.B. et al. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular disease risk factors: a randomized clinical trial. **Metabolism**, v. 65, n. 11, p. 1636-1645, 2016.
8. AUGUSTINE, A.H. et al. 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*, v. 90, n. 2-3, p. 69-75, 2014.
9. BALLANTYNE, C.M. et al. Efficacy and safety of eicosapentaenoic acid ethyl ester (AMR101) therapy in statin- treated patients with persistent high triglycerides (from the ANCHOR study). **Am J Cardiol**, v. 110, n. 7, p. 984-992, 2012.
10. BALK, E.M. et al. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. **Atherosclerosis**, v. 189, n. 1, p. 19-30, 2006.
11. BANG, H. O.; DYERBERG, J. Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic west coast Eskimos. **Acta Med Scand**, v. 192, n. 1-2, p. 85-94, 1972.
12. BANG, H. O.; DYERBERG, J.; HJØRNE, N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. **Acta Med Scand**, v. 200, n. 1-2, p. 69-73, 1976.
13. BAO, D. Q. ET AL. Effects of dietary fish and weight reduction on ambulatory blood pressure in overweight hypertensives. **Hypertension**, v. 32, n. 4, p. 710-717, 1998.
14. BARTER, P.J. et al. The interaction of cholesteryl ester transfer protein and unesterified fatty acids promotes a reduction in the particle size of high-density lipoproteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1045, n. 1, p. 81-89, 1990.
15. BARTER, P.J. et al. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 2, p. 160-167, 2003.
16. BARTER P.J. et al. Antiinflammatory properties of HDL. *Cir Res*, v. 95, n. 8, p. 764-772, 2004.
17. BARTER, P. J.; PURANIK, R.; RYE, K. A. New insights into the role of HDL as an anti-inflammatory agent in the prevention of cardiovascular disease. **Curr Cardiol Rep**, v. 9, n. 6, p. 493-498, 2007a.
18. BARTER, P. J. et al. ILLUMINATE Investigators. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. **N Engl J Med**, v. 357, n. 21, p.2109-2122, 2007b.
19. BARTER, P. J. Lessons learned from the Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events (ILLUMINATE) trial. **Am J Cardiol**, v. 104,

- n. 10, p. 10E-5E, 2009. Suplemento.
20. BHATT, D.L. et al. Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med*, nov 10, 2018.
 21. BHATTACHARYYA, T. et al. Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. **JAMA**, v. 299, n. 11, p. 1265-1276, 2008BAYS, H. Clinical overview of Omacor: a concentrated formulation of omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Am J Cardiol**, v. 98, n. 4A, p. 71i-76i, 2006. Suplemento.
 22. BELALCAZAR, L. M. et al. Marine omega-3 fatty acid intake: associations with
 23. cardiometabolic risk and response to weight loss intervention in the Look AHEAD (Action for Health in Diabetes) study. **Diabetes Care**, v. 33, n. 1, p. 197-199, 2010.
 24. BERNEIS, K. K.; KRAUSS, R. M. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. **J Lipid Res**, v. 43, n. 9, p. 1363-1379, 2002.
 25. BESSER, H. W.; Silva, N. A. S.; Oliveira, G. M. M. A Epidemiologia Clínica das Doenças Cardiovasculares Incapacitantes do Ponto de Vista Laborativo. **Rev SOCERJ**, v. 19, n. 4, p. 318-325, 2006.
 26. BODEN, W. E. et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. **N Engl J Med**, v. 365, n. 24, p. 2255-67, 2011.
 27. BOEKHOLDT, S.M. et al. Levels and changes of HDL cholesterol and apolipoprotein A-I in relation to risk of cardiovascular events among statin-treated patients: a meta-analysis. **Circulation**, v. 128, n. 14, p. 1504-1512, 2013.
 28. BØNAA, K.H.; BJERVE K.S.; NORDØY, A. Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Acids in Plasma Phospholipids Are Divergently Associated With High Density Lipoprotein in Humans. **Atheroscler Thromb**, v. 12, n. 6, p. 675-681, 1992.
 1. BOSH, J. et al. n-3 Fatty acids and cardiovascular outcomes in patients with dysglycemia. **N Engl J Med**. V. 367, p. 309–318, 2012.
 2. BOWMAN, L. et al. Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease. *N Engl J Med*, v. 377, n. 13, p. 1217-1227, 2017.
 3. BRASIL. Resolução nº 292 de 08 de julho de 1999. Regulamenta as pesquisas coordenadas do exterior ou com participação estrangeira e pesquisas que envolvam remessa de material biológico para o exterior. **Brasília**, CNS: 1999.
 4. BROWNER, W.S.; NEWMAN, T.B.; CUMMUNHGS, S.R.; HULLEY, S.B. Estimando o tamanho de amostra e o poder estatístico: aplicações e exemplos. In: HULLEY, S.B.; CUMMUNHGS, S.R.; BROWNER, W.S.; GRANDY, D.G.; HEARTS, N.; NEWMAN, T.B. **Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2003. p. 83 a 110.
 5. BUCKLEY, R. et al. Circulating triacylglycerol and apoE levels in response to EPA and docosahexaenoic acid supplementation in adult human subjects. *Br J Nutr*, v. 92, n. 3, p. 477-483, 2004.
 6. BURILLO, E. et al. Beneficial effects of omega-3 fatty acids in the proteome of high-density lipoprotein proteome. **Lipids Health Dis**, v. 11, n. 116, 2012. doi: 10.1186/1476-511X-11-116
 7. CALABRESI, L. et al. An omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate increases plasma high-density lipoprotein 2 cholesterol and paraoxonase levels in patients with familial combined hyperlipidemia. **Metabolism**, v. 53, n. 2, p. 153-158, 2004.
 8. CALDER, P.C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, n. 4, p. 469-484, 2014.
 9. CAMONT, L.; CHAPMAN, M. J.; KONTUSH, A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. **Trends Mol Med**, v. 17, n. 10, p. 594-603, 2011.
 10. CAMONT, L. et al. Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 33, n. 12, p. 2715-2723, 2013.
 11. CAMPBELL, C.S.; MOFFATT, R.J.; STAMFORD, B.A. Smoking and smoking cessation - the relationship between cardiovascular disease and lipoprotein metabolism: a review. *Atherosclerosis*, v. 201, n. 2, p.225-235, 2008.
 12. CAMPS, J. et al. PPARs in regulation of paraoxonase: control of oxidative stress and

- inflammation pathways. **PPAR Research**, v. 2012, doi:10.1155/2012/616371.
13. CASLAKE, M.J. et al. Effect of sex and genotype on cardiovascular biomarker response to fish oils: the FINGE. Study. **Am J Clin Nutr**, v. 88, n. 3, p. 618-629, 2008.
 14. CAZITA, P.M. et al. Human cholesteryl ester transfer protein expression enhances the mouse survival rate in an experimental systemic inflammation model; a novel role for CETP. **Shock**, v. 30, n. 5, p. 590-595, 2008.
 15. CAZZOLA, R. et al. Age- and dose-dependent effects of an eicosapentaenoic acid-rich oil on cardiovascular risk factors in healthy male subjects. **Atherosclerosis**, v. 193, n. 1, p. 159-167, 2007.
 16. CHAPMAN, M. J. Are the effects of statins on HDL-cholesterol clinically relevant? **Eur Heart J Suppl**, v. 6, n. Supplement C, p. C58-C63, 2004.
 17. CHANG, C. et al. Does increased leukotriene B4 in type 1 diabetes result from elevated cholesteryl ester transfer protein activity? **Med Hypotheses**, v. 59, n. 5, p. 607-610, 2002.
 18. CHIROVSKY, D.R. et al. Prospective studies on the relationship between high-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular risk: a systematic review. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, v. 16, n. 4, p.404-423, 2009.
 19. CRAIG, W.Y.; PALOMAKI, G.E.; HADDOW, J.E. Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentration: an analysis of published data. **BMJ**, v. 298, n. 6676, p. 748-788, 1989.
 20. COSTA, L. G. et al. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. **Biochem Pharmacol**, v. 69, n. 4, p. 541-550, 2005.
 21. COX, K.; GOLDEN, J.; HOHNSTEIN, J.; KING, M.; LUTH, J.; MANDIBLE, D.; MURPHY, P. The Food Processor Software. Version 10.11.0. ESHA Research, Salem, Oregon; 2012.
 22. D'AGOSTINO, R. B. et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 117, n. 6, p. 743-753, 2008.
 23. DAUD, Z.A. et al. Effects of protein and omega-3 supplementation, provided during regular dialysis sessions, on nutritional and inflammatory indices in hemodialysis patients. **Vasc Health Risk Manag**, v. 8, p. 157-195, 2012
 24. DAVIDSON, M.H.; et al. Effects of docosahexaenoic acid on serum lipoproteins in patients with combined hyperlipidemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J Am Coll Nutr**, v. 16, n. 3, p. 236-243, 1997.
 25. DAVIDSSON, P. et al. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. **Atheroscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 6, p. 870-876, 2009.
 26. DAVIDSSON, P. et al. Proteomics of apolipoproteins and associated proteins from plasma high-density lipoproteins. **Atheroscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 2, p. 156-163, 2010.
 27. DAWBER, T. R.; MOORE, F. E.; MANN, G. V. Coronary heart disease in the Framingham study. **Am J Public Health Nations Health**, v. 47, n. 4, p. 4-24, 1957.
 28. DAWBER, T. R. et al. Some factors associated with the development of coronary heart disease: six years' follow-up experience in the Framingham study. **Am J Public Health Nations Health**, v. 49, p. 1349-1356, 1959.
 29. DAWBER, T. R.; KANNEL, W. B. The Framingham study. An epidemiological approach to coronary heart disease. **Circulation**, v. 34, n. 4, p. 553-555, 1966.
 30. DE LALLA, O.F.; GOFMAN, J.W. Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins. **Methods Biochem Anal**, v. 1, p.459-478, 1954.
 31. DI ANGELANTONIO, E. et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. **JAMA**, v. 302, n. 18, p. 1993-2000, 2009.
 32. DIFFENDERFER, M. R.; SCHAEFER, E. J. The composition and metabolism of large and small LDL. **Curr Opin Lipidol**, v. 25, n. 3, p. 221-226, 2014.
 33. DOYLE, J. T. et al. The relationship of cigarette smoking to coronary heart disease; The second report of the combined experience of the Albany, NY. and Framingham, Mass. Studies. **JAMA**, v. 190, p. 886-890, 1964.
 34. DU, X.M. et al. HDL Particle Size Is a Critical Determinant of ABCA1- Mediated Macrophage Cellular Cholesterol Export. **Circ Res**, v. 116, n. 7, p. 1133-1142, 2015.
 35. DUDA, M. K.; O'Shea, K. M.; Stanley, W. C. omega-3 polyunsaturated fatty acid

- supplementation for the treatment of heart failure: mechanisms and clinical potential. **Cardiovasc Res**, v. 84, n. 1, p. 33-41, 2009.
36. DYERBERG, J.; BANG, H. O.; HJORNE, N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. **Am J Clin Nutr**, v. 28, n. 9, p. 958-66, 1975.
 37. DYERBERG, J.; BANG, H. O.; HJORNE, N. Plasma cholesterol concentration in Caucasian Danes and Greenland West-coast Eskimos. **Dan Med Bull**, v. 24, n. 2, p. 52-5, 1977.
 38. EBRAHIMI, M. et al. Omega-3 fatty acid supplements improve the cardiovascular risk profile of subjects with metabolic syndrome, including markers of inflammation and auto-immunity. **Acta Cardiol**, v. 64, n. 3, p. 321-7, 2009.
 39. EISENBERG, S. High density lipoprotein metabolism. **J Lipid Res**, v. 25, n. 10, p. 1017-1058, 1984.
 40. EMERSON, S.; MARANHÃO, R. C. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. **Clin Chem**, v. 50, n. 6, p. 1086-1088, 2004.
 41. ENNS J.E. et al. The impact of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the incidence of cardiovascular events and complications in peripheral arterial disease: a systematic review and meta-analysis. **BMC Cardiovasc Disord**, v. 14, n. 70, 2014. doi: 10.1186/1471-2261-14-70.
 42. ESLICK, G.D. et al. Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. **Int J Cardiol**, v. 136, n. 1, p. 4-16, 2009.
 43. ESTERBAUER, H. et al. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. **Free Radic Res Commun**, v. 6, n. 1, p. 67-75, 1989.
 44. FALUDI, A.A. et al. Atualização ds Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**, v. 109, n. S1, p. 1-176, 2017. Suplemento.
 45. FESTA, A. et al. Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in prediabetic subjects in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. **Circulation**, v. 111, n. 25, p. 3465-3472, 2005.
 46. FIELDING, C.J.; FIELDING, P.E. Reverse cholesterol transport – new roles for preb1-HDL and lecithin: cholesterol acyltransferase. In: FIELDING, C.J. (Coord.) **High-density lipoproteins: from basic biology to clinical aspects**. Wiley, Weinheim, 2007, pp 143–162.
 47. FISBERG, R.M. et al. Inquéritos alimentares: métodos e bases científicas. Barueri, SP: Manole, 2005.
 48. FISHER, E. A. et al. High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 12, p. 2813-2820, 2012.
 49. FLORINDO, A. A.; LATORRE, M. R. D. O. Validação e reprodutibilidade do questionário de Baecke de avaliação da atividade física habitaul em homens adultos. **Rev Bras Med Esportiva**, v. 9, n. 3, p. 121-128, 2003.
 50. FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.
 51. FUHRMAN, B. Regulation of hepatic paraoxonase-1 expression. **J Lip**, v. 2012, doi:10.1155/2012/684010.
 52. FULCHER, J. et al. Efficacy and safety of LDL-lowering therapy among men and women: meta-analysis of individual data from 174,000 participants in 27 randomised trials. **Lancet**, v. 385, n. 9976, p. 1397-1405, 2015.
 53. GALAN, P. et al. Collaborative Group. Effects of B vitamins and omega 3 fatty acids on cardiovascular diseases: a randomised placebo controlled trial. **BMJ**. v. 341, p. c6273, 2010.
 54. GALLI, C., BRENNAN, T. Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Cardiovascular Disease Events. **JAMA**, v. 309, n. 1, p. 27. doi:10.1001/jama.2012.116648.
 55. GARCÍA-SÁNCHEZ, C. et al. Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome. **Clin Chim Acta**, v. 412, n. 3-4, p. 292-298, 2011.
 56. GAO, F. et al. Correlation between the High-Density Lipoprotein and its Subtypes in Coronary Heart Disease. **Cell Physiol Biochem**, v. 38, n. 5, p. 1906-1914, 2016.
 57. GARNER, B. et al. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. **J Biol Chem**, v. 273, n. 11, p. 6088-6095, 1998.
 58. GELEIJNSE, J. M. et al. Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression

- analysis of randomized trials. **J Hypertens**, v. 20, n. 8, p. 1493-9, 2002.
59. GHORBANIHAGHJO, A. et al. Effect of Fish Oil Supplements on Serum Paraoxonase Activity in Female Patients with Rheumatoid Arthritis: A Double-blind Randomized Controlled Trial. *Ach Iran Med*, v. 15, n. 9, p. 549-552, 2012.
 60. GOFMAN, J.W.; YOUNG, W.; TANDY R. Ischemic heart disease, atherosclerosis, and longevity. **Circulation**, v. 34, n. 4, p. 679-697, 1966.
 61. GORDON, T. et al. High-density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham study. **Am J Med**, v. 62, n. 5, p.707-714, 1977.
 62. GOLDBOURT, U.; YAARI, S.; MEDALIE, J.H. Isolated low HDL cholesterol as a risk factor for coronary heart disease mortality. A 21-year follow-up of 8000 men. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 17, n. 1, p. 107-113, 1997.
 63. GOLZARI, M.H. et al. The Effect of Eicosapentaenoic Acid on the Serum Levels and Enzymatic Activity of Paraoxonase 1 in the Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Acta Med Iran*, v. 55, n. 8, p. 486-495, 2017.
 64. GOMARASCHI, M. et al. Effects of established hypolipidemic drugs on HDL concentration, subclass distribution, and function. **Handb Exp Pharmacol**, p. 293-615, 2015. doi:10.1007/978-3-319-09665-0_19.
 65. GLOMSET, J.A. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*, v. 9, n. 2, p. 155-167, 1968.
 66. GRIMSGAARD, S. et al. A. Highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in humans have similar triacylglycerol-lowering effects but divergent effects on serum fatty acids. **Am J Clin Nutr**, v. 66, n. 3, p. 649–659,1997.
 67. GUATHIER, B. et al. Characterization of a cholesterol response element (CRE) in the promoter of the cholesteryl ester transfer protein gene: functional role of the transcription factors SREBP-1a, -2, and YY1. **J Lipid Res**, v. 40, n. 7, p. 1284-1293, 1999.
 68. HAASE, C. L. et al. LCAT, HDL cholesterol and ischemic cardiovascular disease: a Mendelian randomization study of HDL cholesterol in 54,500 individuals. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 2, p. E248-E256, 2012.
 69. HARRIS, W.S. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. **Am J Clin Nutr**, v. 65., n. 5, p. 1645S-1654S, 1997. Suplemento.
 70. HARRIS, W.S.; JACOBSON, T.A. Omega-3 Fatty Acids. In: BALLANTYNE, C.M. *Clinical Lipodology*. WB Saunders, 2009, p. 326-338.
 71. HARRIS, W.S. et al. Erythrocyte omega-3 fatty acids increase and linoleic acid decreases with age: Observations from 160,000 patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 88, n. 4, p. 257-263, 2013.
 72. HARTWEG, J. et al. Meta-analysis of the effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on lipoproteins and other emerging lipid cardiovascular risk markers in patients with type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, n. 8, p. 1593-1602, 2007.
 73. HE, B.M.; ZHAO, S.P.; PENG Z.Y. Effects of cigarette smoking on HDL quantify and function: implications for atherosclerosis. **J Cell Biochem**, v. 114, n. 11, p. 2431-2436, 2013.
 74. HEINECKE, J.W. The HDL proteome: a marker – and perhaps mediator – of coronary artery disease. **J Lipid Res**, v. 50, p. S167-171, 2009. Suplemento.
 75. HOOFNAGLE, A.N.; HEINECKE, J.W. Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins. **J Lipid Res**, v. 50, n. 10, p. 1967-1975, 2009.
 76. HOLMAN, R. T. Control of polyunsaturated acids in tissue lipids. **J Am Coll Nutr**, v. 5, n. 2, p. 183-211, 1986.
 77. HOLZER, M. et al. Aging affects high-density lipoprotein composition and function. *Biochim Biophys Acta*, v. 183, n. 9, p. 1442-1448, 2013.
 78. HU, X. et al. Torcetrapib induces aldosterone and cortisol production by an intracellular calcium-mediated mechanism independently of cholesteryl ester transfer protein inhibition. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2211-2219, 2009.
 79. INNES, J.K.; CALDER, P.C. Omega-6 fatty acids and inflammation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 132, p. 41-48, 2018.
 80. JACOBSON, T.A. et al. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on low-density lipoprotein cholesterol and other lipids: a review. **J Clin Lipidol**, v. 6, n. 1, p. 5-18,

- 2012.
81. JAOUAD, L. et al. Age-related decrease in high-density lipoproteins antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups. *Atherosclerosis*, v. 185, n. 1, p. 191-200, 2006.
 82. JESSUP, W. et al. Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages. *Curr Opin Lipidol*, v. 17, n. 3, p. 247-2457, 2006.
 83. JOSHI, P.H. et al. Association of high-density lipoprotein subclasses and incident coronary heart disease: The Jackson Heart and Framingham Offspring Cohort Studies. *Eur J Prev Cardiol*, v. 23, n. 1, p. 41-49, 2014.
 84. JUMP, D. B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol*, v. 19, n. 3, p. 242-247, 2008.
 85. KABAROGLU, C. et al. Association between serum paraoxonase activity and oxidative stress in acute coronary syndromes. *Acta Cardiol*, v. 59, n. 6, p. 606-611, 2004.
 86. KAISER, H.F. The application of electronic computer to factor analysis. *Educational and Psychological Measurement*, v. 20, p. 141-151, 1960.
 87. KELLEY, D.S. et al. Docosahexaenoic acid supplementation improves fasting and postprandial lipid profiles in hypertriglyceridemic men. *Am J Clin Nutr*, v. 86, n. 2, p. 324-333, 2007.
 88. KEENE, D. et al. Effect on cardiovascular risk of high density lipoprotein targeted drug treatments niacin, fibrates, and CETP inhibitors: meta-analysis of randomised controlled trials including 117,411 patients. *BMJ*, v. 349, p. g4379, 2014.
 89. KOH, K. K. et al. Significant differential effects of omega-3 fatty acids and fenofibrate in patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*, v. 220, n. 2, p. 537-544, 2012.
 90. KONES, R. Primary prevention of coronary heart disease: integration of new data, evolving views, revised goals, and role of rosuvastatin in management. A comprehensive survey. *Drug Des Devel Ther*, v. 5, p. 325-380, 2011.
 91. KONTUSH, A.; CHANTEPLE S.; CHAPMAN, M.J. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 23, n. 10, p. 1881-1888, 2003.
 92. KONTUSH, A. et al. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 27, n. 8, p. 1843-1849, 2007.
 93. KONTUSH, A.; CHAPMAN, M. J. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol*, v. 21, n. 4, p. 312-318, 2010.
 94. KONTUSH, A. HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, v. 103, n. 3, p. 341-349, 2014.
 95. KONTUSH, A. et al. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb Exp Pharmacol*, v. 224, p. 3-51, 2015.
 96. KOTRONEN, A. et al. Serum saturated fatty acids containing triacylglycerols are better markers of insulin resistance than total serum triacylglycerol concentrations. *Diabetologia*, v. 52, n. 4, p. 684-690, 2009.
 97. KOSTARA, C.E. et al. NMR-Based Lipid Profiling of High Density Lipoprotein Particles in Healthy Subjects with Low, Normal, and Elevated HDL-Cholesterol. *J Proteome Res*, v. 16, n. 4, p. 1605-1616, 2017.
 98. KRAUSS, R.M. Lipoprotein subfractions and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Lipidol*, v. 21, n. 4, p. 305-311, 2010.
 99. KUANG, Y. et al. Docosahexaenoic acid suppresses apolipoprotein A-I gene expression. through hepatocyte nuclear factor-3b. *Am J Clin Nutr*, v. 94, p. 594-600, 2011.
 100. KROMHOUT, D.; GILTAY, E.J.; GELEIJNSE, J.M.; ALPHA OMEGA TRIAL GROUP. n-3 Fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. *N Engl J Med*, v. 363, p. 2015-2026, 2010.
 101. LAMARCHE, B. et al. Associations of HDL2 and HDL3 subfractions with ischemic heart disease in men: prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 17, n. 1, p. 1098-1105, 1997.

102. LEE, B.C.; LEE, J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 3, p. 446-462, 2014.
103. LEWIS E.J.H. Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Cardiovascular Disease Events. **JAMA**, v. 309, n. 1, p. 27. doi:10.1001/jama.2012.116654.
104. LINCOFF, A.M. et al. Evacetrapib and cardiovascular outcomes in high-risk vascular disease. **N Engl J Med**, v. 376, n. 20, p. 1933-1942, 2017.
105. LIPINA, C.; HUNDAL, H. S. Sphingolipids: agents provocateurs in the pathogenesis of insulin resistance. **Diabetologia**, v. 54, n. 7, p. 1596-1607, 2011.
106. MACKERRAS, D. Energy adjustment: the concepts underlying the debate. **J Clin Epidemiol**, v. 49, n. 9, p. 957-962, 1996.
107. LOHMAN, T.G.; MARTORELL, R.; ROCHE A.F. Anthropometric standardization Reference Manual: The Airlie Consensus Report. **Champaign III: Human Kinetics**; 1988.
108. MACKNESS, M. I. et al. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 86, n. 2-3, p. 193-199, 1991.
109. MACKNESS, B. et al. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. **Circulation**, v. 107, n. 22, p. 2775-2779, 2003.
110. MACKNESS, B. et al. Human tissue distribution of paraoxonases 1 and 2 mRNA. **IUBMB Life**, v. 62, n. 6, p. 480-482, 2010.
111. MACLEAN, P. S. et al. Lipoprotein subpopulation distributions in lean, obese, and type 2 diabetic women: a comparison of African and white Americans. **Obes Res**, v. 8, n. 1, p. 62-70, 2000.
112. MADSEN, C.M.; VARBO, A.; NORDESTGAARD, B.G. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies. **Eur Heart J**, v. 38, n. 32, p. 2478-2486, 2017.
113. MAKI, K.C. et al. Lipid responses to a dietary docosahexaenoic acid supplement in men and women with below average levels of high density lipoprotein cholesterol. **J Am Coll Nutr**, v. 24, n. 3, p. 189-199, 2005.
114. MAKI K.C. et al. Effects of prescription omega-3-acid ethyl esters on fasting lipid profile in subjects with primary hypercholesterolemia. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 57, n. 5, p. 489-494, 2011.
115. MARCEL, Y.L. et al. Distribution and concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma of normolipemic subjects. **J Clin Invest**, v. 85, n. 1, p. 10-17, 1990.
116. MASSARO, M. et al. Basic mechanisms behind the effects of n-3 fatty acids on cardiovascular disease. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 79, n. 3-5, p. 109-115, 2008.
117. MATTHEWS, D.R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 411-419, 1985.
118. MCNAMARA, J. R.; WARNICK, G. R.; COOPER, G. R. A brief history of lipid and lipoprotein measurements and their contribution to clinical chemistry. **Clin Chim Acta**, v. 369, n. 2, p. 158-167, 2006.
119. MILLER, N.E. et al. The Tromsø heart-study. High-density lipoprotein and coronary heart-disease: a prospective case-control study. **Lancet**, v. 1, n. 8019, p. 965-968, 1977.
120. MORGANTINI, C. et al. HDL lipid composition is profoundly altered in patients with type 2 diabetes and atherosclerotic vascular disease. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 24, n. 6, p. 594-599, 2014.
121. MORI, T. A. et al. Dietary fish as a major component of a weight-loss diet: effect on serum lipids, glucose, and insulin metabolism in overweight hypertensive subjects. **Am J Clin Nutr**, v. 70, n. 5, p. 817-825, 1999.
122. MORI, T. A. et al. Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 5, p. 1085-1094, 2000.

123. MORI, T.A.; WOODMAN, R.J. The independent effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular risk factors in humans. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 9, n. 2, p. 95-104, 2006.
124. MORRIS, M. C.; SACKS, F.; ROSNER, B. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. **Circulation**, v. 88, n. 2, p. 523-533, 1993.
125. MOSCA, L. et al. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women--2011 update: a guideline from the american heart association. **Circulation**, v. 123, n. 11, p. 1243-1262, 2011.
126. MOZAFFARIAN, D.; WU, J. H. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. **J Am Coll Cardiol**, v. 58, n. 20, p. 2047-2067, 2011.
127. MSM - The Multiple Source Method [software disponível na internet]. Version 1.0.1. Potsdam: Department of Epidemiology of the German Institute of Human Nutrition; 2008-2011 [atualizado em 20 fev 2012; acesso em 07 jan 2013]. Disponível em <https://msm.dife.de/>.
128. MUSA-VELOSO, K. et al. Long-chain omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid dose-dependently reduce fasting serum triglycerides. **Nutr Rev**, v. 68, n. 3, p. 155-167, 2010.
129. NAVAB, M. et al. Normal high-density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low-density lipoprotein: steps 2 and 3. **J Lipid Res**, v. 41, n. 9, p. 1495-1508, 2000.
130. NAVAB, M. et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. **J Lipid Res**, v. 45, n. 6, p. 993-1007, 2004.
131. NAVAB, M. et al. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. **Nat Rev Cardiol**, v. 8, n. 4, p. 222-32, 2011.
132. NEFF, L. M. et al. Algal docosahexaenoic acid affects plasma lipoprotein particle size distribution in overweight and obese adults. **J Nutr**, v. 141, n. 2, p. 207-213, 2011.
133. NESTEL, P. et al. The n-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid increase systemic arterial compliance in humans. **Am J Clin Nutr**, v. 76, n. 2, p. 326-330, 2002.
134. NEWNHAM, H.H.; BARTER, P. Changes in particle size of high-density lipoproteins during incubation with very low-density lipoproteins, cholesteryl ester transfer protein and lipoprotein lipase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1125, n. 3, p. 297-304, 1992.
135. NICHOLSS, S.J. et al. Assessment of the clinical effects of cholesteryl ester transfer protein inhibition with evacetrapib in patients at high-risk for vascular outcomes: Rationale and design of the ACCELERATE trial. **Am Heart J**, v. 170, n. 6, p. 1061-1069, 2015.
136. NIMURA, N.; KINOSHITA, T. Fluorescent Labeling Of Fatty Acids With 9-Anthryldiazomethane (ADAM) for High-Performance Liquid -Chromatography. **Anal Lett**, v. 13, n. 3, p. 191-202, 1980.
137. NOFER, J. R. et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. **J Clin Invest**, v. 113, n. 4, p. 569-581, 2004.
138. NOFER, J. R.; ASSMANN, G. Atheroprotective effects of high-density lipoprotein-associated lysosphingolipids. **Trends Cardiovasc Med**, v. 15, n. 7, p. 265-271, 2005.
139. NOFER, J. R.; BRODDE, M. F.; KEHREL, B. E. High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 37, n. 7, p. 726-735, 2010.
140. NOORI, M. et al. Fatty acid composition of HDL phospholipids and coronary artery disease. **J Clin Lipidol**, v. 3, n. 1, p. 39-44, 2009.
141. NORDING, M. L. et al. Individual variation in lipidomic profiles of healthy subjects in response to omega-3 Fatty acids. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76575, 2013.
142. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global Atlas on Cardiovascular Disease, Prevention and Control. **Série de Relatos Técnicos**. Genebra, 2011. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global status report on noncommunicable diseases. **Série de Relatos Técnicos**. Genebra, 2014a.
143. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Noncommunicable disease country profiles 2014. **Série de Relatos Técnicos**. Genebra, 2014b.
144. OTVOS, J. D. et al. Clinical implications of discordance between low-density

- lipoprotein cholesterol and particle number. **J Clin Lipidol**, v. 5, n. 2, p. 105-13, 2011.
145. PACKARD, C.; CASLAKE, M.; SHEPHERD, J. The role of small, dense low density lipoprotein (LDL): a new look. **Int J Cardiol**, v. 74 Suppl 1, p. S17-S22, 2000.
 146. PARK, K.H. et al. ω -6 (18:2) and ω -3 (18:3) fatty acids in reconstituted high-density lipoproteins show different functionality of anti-atherosclerotic properties and embryo toxicity. **J Nutr Biochem**, v. 26, n. 12, p. 1613-1621, 2015.
 147. PARRA, E.S. et al. HDL Size is More Accurate than HDL Cholesterol to Predict Carotid Subclinical Atherosclerosis in Individuals Classified as Low Cardiovascular Risk. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114212, 2014.
 148. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. - Rio de Janeiro : IBGE, 2011
 149. Rendimento. - Rio de Janeiro : IBGE, 2011.
 150. PEARSON, T.A. et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health: A statement for healthcare professionals from the Center for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. **Circulation**, v. 107, n. 3, p. 499-511, 2003.
 151. PÉREZ-MENDES, O. et al. Kinetic and metabolic studies of apo A-I and apo A-II in an hypoalphalipoproteinemic patient. **Eur J Neurology**, v. (Suppl 2), p. 77, 1995.
 152. PÉREZ-MENDES, O. et al. Metabolism of apolipoproteins AI and AII in subjects carrying similar apoAI mutations, apoAI Milano and apoAI Paris. **Atherosclerosis**, v. 148, n. 2, p. 317-325, 2000.
 153. PÉREZ-MÉNDEZ, A.; MENDOZA-MONTES, C. Ciprofibrate enhances cholesterol efflux and paroxonase-1 association with HDL in hypertriglyceridemic patients. **Atheroscler Suppl** v. 6, n. 1, p. 54, 2005.
 154. PIRILLO, A.; NORATA, G. D.; CATAPANO, A. L. High-density lipoprotein subfractions--what the clinicians need to know. **Cardiology**, v. 124, n. 2, p. 116-25, 2013.
 155. PLOURDE, M.; CUNNANE, S. C. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 32, n. 4, p. 619-34, 2007.
 156. POUDYAL, H. et al. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action. **Prog Lipid Res**, v. 50, n. 4, p. 372-87, 2011.
 157. POWNALL, H.J. et al. Correlation of serum triglyceride and its reduction by omega-3 fatty acids with lipid transfer activity and the neutral lipid compositions of high-density and low-density lipoproteins. **Atherosclerosis**, v. 143, n. 2, p. 285-297, 1999.
 158. QUEHENBERGER, O. et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. **J Lipid Res**, v. 51, n. 11, p. 3299-3305, 2010.
 159. RADER, D. J. Lecithin: cholesterol acyltransferase and atherosclerosis: another high-density lipoprotein story that doesn't quite follow the script. **Circulation**, v. 120, n. 7, p. 549-552, 2009.
 160. RAMOS, P. et al. Effect of temperature and phase transition on oxidation resistance of low density lipoprotein. **J Lipid Res**, v. 36, n. 10, p. 2113-2128, 1995.
 161. RAPOSO, H.F. et al. Fibrates and fish oil, but not corn oil, up-regulate the expression of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene. **J Nutr Biochem**, v. 25, n. 6, p. 669-674, 2014.
 162. RATNAYAKE, W. M.; GALLI, C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. **Ann Nutr Metab**, v. 55, n. 1-3, p. 8-43, 2009.
 163. RAUCH, B. 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**, v. 122, p. 2152-2159, 2010.
 164. RHOADS, G.G.; GULBRANDSEN, C.L.; KAGAN, A. Serum lipoproteins and coronary heart disease in a population study of Hawaii Japanese men. **N Engl J Med**, v. 294, n. 6, p. 293-298, 1976.
 165. RIZOS, E. C. et al. Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis. **JAMA**, v. 308, n. 10, p. 1024-1033, 2012.

166. ROLAND, I. A.; MARANHÃO, R. C. Transfer of phospholipids and cholesterol from triglyceride-rich emulsions to HDL in rats treated with alloxan, propylthiouracil or ethanol. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, n. 1, p. 109-18, 1993.
167. ROSENSON, R. S. et al. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. **Clin Chem**, v. 57, n. 3, p. 392-410, 2011.
168. ROSSEBØ, A. B. et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. **N Engl J Med**, v. 359, n. 13, p. 1343-1356, 2008.
169. ROTH, E. M.; HARRIS, W. S. Fish oil for primary and secondary prevention of coronary heart disease. **Curr Atheroscler Rep**, v. 12, n. 1, p. 66-72, 2010.
170. RUSTAN, A.C.; HUSTVEDT, B.E.; DREVON, C.A. Dietary supplementation of very long-chain n-3 fatty acids decrease whole body lipid utilization in the rat. **J Lipid Res**, v. 34, n. 8, p. 1299-1309, 1993.
171. RYE, K. A.; HIME, N. J.; BARTER, P. J. The influence of sphingomyelin on the structure and function of reconstituted high-density lipoproteins. **J Biol Chem**, v. 271, n. 8, p. 4243-4250, 1996.
172. RYE, K. A.; CLAY, M. A.; BARTER, P. J. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. **Atherosclerosis**, v. 145, n. 2, p. 227-238, 1999.
173. RYE, K. A.; BARTER, P. J. Cardioprotective functions of HDLs. **J Lipid Res**, v. 55, n. 2, p. 168-179, 2014.
174. SAITO, H. et al. Inhibition of lipoprotein lipase activity by sphingomyelin: role of membrane surface structure. **Biochim Biophys Acta**, v. 1486, n. 2-3, p. 312-20, 2000.
175. SAKAI, T.; KAMANNA, V. S.; KASHYAP, M. L. Niacin, but not gemfibrozil, selectively increases LP-AI, a cardioprotective subfraction of HDL, in patients with low HDL cholesterol. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, n. 11, p. 1783-1789, 2001.
176. SALONEN, J.T. et al. HDL, HDL2, and HDL3 subfractions, and the risk of acute myocardial infarction. A prospective population study in eastern Finnish men. **Circulation**, v. 84, n. 1, p. 129-139, 1991.
177. SCHAEFER, E.J.; SANTOS, R.D.; ASZTALOS, B.F. Marked HDL deficiency and premature coronary heart disease. **Curr Opin Lipidol**, v. 21, n. 4, p. 289-297, 2010.
178. SCHERER, M. et al. Sphingolipid profiling of human plasma and FPLC-separated lipoprotein fractions by hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry. **Biochim Biophys Acta**, v. 1811, n. 2, p. 68-75, 2011.
179. SCHWARTZ, G.G. et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. **N Engl J Med**, v. 367, n. 22, p. 2089-2099, 2012.
180. SETHI, A.; SINGH, M.; ARORA, R. Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Cardiovascular Disease Events. **JAMA**, v. 309, n. 1, p. 27. doi:10.1001/jama.2012.116644.
181. SHAH, A.S. et al. Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. **J Lipid Res**, v. 54, n. 10, p. 2575-2585, 2013.
182. SHEARER, G.C.; SAVINOVA, O.V.; HARRIS W.S. Fish oil – how does it reduce plasma triglycerides? **Biochim Biophys Acta**, v. 1821, n. 5, p. 843-851, 2012.
183. SHERRAT, S.C.R.; MASON, R.P. Eicosapentaenoic acid inhibits oxidation of high density lipoprotein particles in a manner distinct from docosahexaenoic acid. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 496, n. 2, p. 335-338, 2018.
184. SHUHEI, N. et al. Effect of HDL composition and particle size on the resistance of HDL to the oxidation. **Lipids Health Dis**, v. 9, p. 104, 2010.
185. SIRTORI, C. R. et al. Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I(Milano) mutant: the Limone sul Garda study. **Circulation**, v. 103, n. 15, p. 1949-1954, 2001.
186. SISCOVICJ, D.D. et al. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid (Fish Oil) Supplementation and the Prevention of Clinical Cardiovascular Disease: A Science Advisory From the American Heart Association. **Circulation**, v. 135, n. 15, p. e867-884, 2017.
187. STARK, K.D. et al. Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. **Prog Lipid Res**, v. 63, p. 132-152, 2016.
188. STÅHLMAN, M. et al. Dyslipidemia, but not hyperglycemia and insulin resistance, is

- associated with marked alterations in the HDL lipidome in type 2 diabetic subjects in the DIWA cohort: impact on small HDL particles. **Biochim Biophys Acta**, v. 1831, n. 11, p. 1609-1617, 2013.
189. STERN, S. E. et al. Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements. **Diabetes**, v. 54, n. 2, p. 333-339, 2005.
 190. STAMPFER, M.J. et al. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. **N Engl J Med**, v. 325, n. 6, p. 373-381, 1991.
 191. SVIRIDOV, D. et al. Antiatherogenic functionality of high density lipoprotein: how much versus how good. **J Atheroscler Thromb**, v. 15, n. 2, p. 52-62, 2008.
 192. SWEETNAM, P.M. et al. Associations of the HDL2 and HDL3 cholesterol subfractions with the development of ischemic heart disease in British men: the Caerphilly and Speedwell Collaborative Heart Disease Studies. **Circulation**, v. 90, n. 2, p. 769-774, 1994.
 193. TABET, F.; RYE, K. A. High-density lipoproteins, inflammation and oxidative stress. **Clin Sci (Lond)**, v. 116, n. 2, p. 87-98, 2009.
 194. TALL, A.R. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. **J Intern Med**, v. 263, n. 3, p. 256-273, 2008.
 195. TANAKA, N. et al. Administration of high dose eicosapentaenoic acid enhances anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein in Japanese patients with dyslipidemia. **Atherosclerosis**, v. 237, n. 2, p. 577-583, 2014.
 196. TANG, W.H. et al. Clinical and genetic association of serum paraoxonase and arylesterase activities with cardiovascular risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 11, p. 2803-2812, 2012.
 197. THOLSTRUP, T. et al. A solid dietary fat containing fish oil redistributes lipoprotein subclasses without increasing oxidative stress in men. **J Nutr**, v. 134, n. 5, p. 1051-1057, 2004.
 198. TOTH, P. P. et al. High-density lipoproteins: a consensus statement from the National Lipid Association. **J Clin Lipidol**, v. 7, n. 5, p. 484-525, 2013.
 199. TOUBOUL, P.J. et al. HDL-C, triglycerides and carotid IMT: a meta-analysis of 21,000 patients with automated edge detection IMT measurement. **Atherosclerosis**, v. 232, n. 1, p. 65-71, 2014.
 200. UESHIMA, H. et al. Food omega-3 fatty acid intake of individuals (total, linolenic acid, long-chain) and their blood pressure: INTERMAP study. **Hypertension**, v. 50, n. 2, p. 313-9, 2007.
 201. VAN HIMBERGEN, T. M. et al. Indications that paraoxonase-1 contributes to plasma high density lipoprotein levels in familial hypercholesterolemia. **J Lipid Res**, v. 46, n. 3, p. 445-451, 2005.
 202. VLACHOPOULOS, C.; DIMITRIOS, R.; STEFANADIS, C. Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Cardiovascular Disease Events. **JAMA**, v. 309, n. 1, p. 27. doi:10.1001/jama.2012.116651
 203. VOIGHT, B. F. et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. **Lancet**, v. 380, n. 9841, p. 572-580, 2012.
 204. VON ECKARDSTEIN, A.; HERSBERGER, M.; ROHRER, L. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 8, n. 2, p. 147-152, 2005.
 205. VON SCHACKY, C. A review of omega-3 ethyl esters for cardiovascular prevention and treatment of increased blood triglyceride levels. **Vasc Health Risk Manag**, v. 2, n. 3, p. 251-262, 2006.
 206. WAGNER, M.; ZOLLNER, G.; TRAUNER, M. Nuclear receptors in liver disease. **Hepatology**, v. 53, n. 3, p. 1023-34, 2011.
 207. WARNICK, G. R.; NAUCK, M.; RIFAI, N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. **Clin Chem**, v. 47, n. 9, p. 1579-1596, 2001.
 208. WEI, M.Y.; JACOBSON, T.A. Effects of eicosapentaenoic acid versus docosahexaenoic acid on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. **Curr**

- Atheroscler Rep**, v. 13, n. 6, p. 474-483, 2011.
209. WEITZ, D. et al. Fish oil for the treatment of cardiovascular disease. **Cardiol Rev**, v. 18, n. 5, p. 258-263, 2010.
 210. WEN, Y.T.; DAI, J.H.; GAO, Q. Effects of Omega-3 fatty acid on major cardiovascular events and mortality in patients with coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 24, n. 5, p. 470-475, 2014.
 211. WIESNER, P. et al. Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J Lipid Res**, v. 50, n. 3, p. 574-585, 2009.
 212. WILLETT, W.; STAMPFER, M. J. Total energy intake: implications for epidemiologic analyses. **Am J Epidemiol**, v. 124, n. 1, p. 17-27, 1986.
 213. WILLIAMS, P.T.; FELDMAN, D.E. Prospective study of coronary heart disease vs. HDL2, HDL3, and other lipoproteins in Gofman's Livermore Cohort. **Atherosclerosis**, v. 214, n. 1, p. 196-202, 2011.
 214. WILKINSON, P. et al. Influence of alfa-linolenic acid and fish-oil on markers of cardiovascular risk in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. **Atherosclerosis**, v. 181, n. 1, p. 115-124, 2005.
 215. WOODMAN, R.J. et al. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients with treated hypertension. **Am J Clin Nutr**, v. 76, n. 5, p. 1007-1015, 2002.
 216. WOOTEN, J.S.; BIGGERSTAFF, K.D.; BEN-EZRA, V. Responses of LDL and HDL particle size and distribution to omega-3 fatty acid supplementation and aerobic exercise. **J Appl Physiol**, v. 107, n. 3, p. 794-800, 2009.
 217. WURM, R. et al. Polyunsaturated fatty acids supplementation impairs anti-oxidant high-density lipoprotein function in heart failure. **Eur J Clin Invest**, v. 48, n. 9, p. e12998, 2018.
 218. YAZDANYAR, A.; YEANG, C.; JIANG, X. C. Role of phospholipid transfer protein in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. **Curr Atheroscler Rep**, v. 13, n. 3, p. 242-248, 2011.
 219. YETUKURI, L. et al. Composition and lipid spatial distribution of HDL particles in subjects with low and high HDL-cholesterol. **J Lipid Res**, v. 51, n. 8, p. 2341-51, 2010.
 220. YOKOYAMA, M. et al. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. **Lancet**, v. 369, p. 1090-1098, 2007.
 221. YVAN-CHARVET, L.; WANG, N.; TALL, A. R. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 2, p. 139-43, 2010.
 222. YU, S. et al. High-density lipoprotein subfractions and the risk of coronary heart disease: 9-years follow-up in the Caerphilly Study. **Atherosclerosis**, v. 166, n. 2, p. 331-338, 2003.
 223. ZERRAD-SAAD, A. et al. HDL3-mediated inactivation of LDL-associated phospholipid hydroperoxides is determined by the redox status of apolipoprotein A-I and HDL particle surface lipid rigidity: relevance to inflammation and atherogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 12, p. 2169-2175, 2009.

10.ANEXOS

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

O motivo que nos leva a estudar esses pacientes é o fato de que as doenças do coração e das veias são um dos principais problemas de Saúde Pública no mundo, sendo provável que os hábitos alimentares mudem a ocorrência dessas doenças. A pesquisa se justifica pela necessidade de avaliar o efeito do consumo de diferentes tipos de gordura sobre os fatores de risco (colesterol alto, pressão e outros parâmetros clínicos e laboratoriais). Portanto, o objetivo desse projeto é avaliar o efeito do consumo de cápsulas de ômega-3, ômega-6 ou ômega-9 sobre fatores de risco cardíacos de indivíduos sob atendimento ambulatorial. O procedimento de coleta de material será da seguinte forma: será coletada uma amostra de sangue e também serão aplicados questionários para avaliar seu nível socioeconômico, clínico, nível de atividade física habitual e sua dieta. Esses questionários serão aplicados em três momentos (Basal, 4 semanas e 8 semanas). Após a coleta dos dados basais, cada indivíduo será incluído aleatoriamente num dos quatro grupos de intervenção (Ômega-3, Ômega-6, Ômega-9, Placebo).

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS: Existem desconfortos e riscos mínimos que envolvem mudanças no hálito, coceira e eventualmente pequeno aumento no tempo necessário para parar um sangramento. Além disso, pequenas manchas no local de punção, relacionada a coleta de sangue. Entretanto, esses desconfortos se justificam pelo benefício que essa pesquisa trará se identificarmos o papel desses ácidos graxos nos fatores de risco para doença do coração. O risco com a intervenção é considerado mínimo, pois as gorduras a serem fornecidas já fazem parte do hábito alimentar da população brasileira. Além da disponibilização de meios de contato 24h com a equipe de pesquisadores, ao término do estudo, você receberá os resultados de todos os exames, assim como será oferecida orientação nutricional verbal e documentada de modo a permitir que você incorpore a melhor intervenção ao seu hábito alimentar.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: Em caso de algum efeito adverso a sua saúde, os pesquisadores devem ser avisados imediatamente e esses darão orientação e assistência clínica e nutricional a você.

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

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

RESSARCIMENTO: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será oferecida nenhuma compensação financeira adicional. Os eventuais gastos com transporte serão ressarcidos a você e ao término de cada etapa será oferecido gratuitamente um lanche, pois em todos os dias de coleta você precisará vir ao hospital em jejum.

DECLARAÇÃO DA(O) PARTICIPANTE: Eu, _____, sexo _____, residente à rua _____, tel.: _____, data de nascimento ____/____/____, CPF nº _____, fui informada(o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações ou desistir de participar desta pesquisa se assim o desejar. A professora coordenadora do estudo Profa. Dra. Nagila Raquel Teixeira Damasceno ou um dos membros da equipe certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais. Em caso de dúvidas, intercorrências clínicas ou reações adversas poderei chamar qualquer membro da equipe ou a coordenadora do estudo Profa. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno nos telefones (11) 3061-7865, 3091 9538, 2369 8581 (disponível 24h) ou pelo email cardionutri@gmail.com, localizada na Faculdade de Saúde Pública, Av. Dr. Arnaldo, 715, Cerqueira Cesar, CEP 01246-904, São Paulo. Declaro ainda que fui informado(a) que esse protocolo de pesquisa esta de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública (CEP FSP, tel.: 3061 7779 ou 3061 7742) e do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário (CEP HU, tel: 30919457).

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

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

Anexo 2: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário

Fis. nº 109 4
CEP/HU-USP

São Paulo, 6 de agosto de 2011.

Ilmo(a) Sr(a),

Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno
Serviço de Nutrição e Dietética do Hospital Universitário
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Prezado(a) Senhor(a)

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

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

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

Atenciosamente,

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

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

Anexo 3: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP
Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo

OF.COEP/208/12

27 de novembro de 2012.

Prezada pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, em sua 10.ª/12 Sessão Extraordinária, realizada em 23/11/2012, analisou de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, o protocolo de pesquisa n.º 2264, intitulado "PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA LDL E DA HDL, MARCADORES CARDIOMETABÓLICOS E OXIDATIVOS PODEM SER MODULADOS PELO CONSUMO DE ÔMEGA-3, ÔMEGA-6 E ÔMEGA-9 EM INDIVÍDUOS COM RISCO CARDIOVASCULAR INTERMEDIÁRIO?", do grupo III, sob responsabilidade da pesquisadora Nágila Raquel Teixeira Damasceno, considerando APROVADO a inclusão de novas análises no projeto.

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

Atenciosamente,

Prof. Tit. Cláudio Leone

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - FSP/USP

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

Av. Dr. Arnaldo, 715 – Cerqueira César – CEP 01246-904 – São Paulo – SP
Contato: (55 11) 3061 7779 | coep@fsp.usp.br | www.fsp.usp.br

Anexo 4: Livro do Paciente

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Saúde Pública

Hospital Universitário

Departamento de Nutrição

Serviço de Nutrição e Dietética

Nome: _____

ID: _____

Pesquisador: _____

DIÁRIO DO PARTICIPANTE

Prezado Sr(a).,

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

Data início: _____ / _____ / _____

Data final: _____ / _____ / _____

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

CONTATOS: Faculdade de Saúde Pública da USP – 3061 7865

Hospital Universitário da USP – 3091 9538

Pesquisadora Profa. Dra. Nágila Damasceno – 2369 8581

E-mail: cardionutri@gmail.com

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

1. O Sr.(a) dividiu o suplemento com outra pessoa? () Sim () Não

Se sim, com quem? _____

Por qual motivo? _____

2. O Sr.(a) consumiu a cápsula de qual forma?

() Puro

() Adicionado em _____

3. Preencha a tabela abaixo:

DIA / DATA	CÁPSULA 1	CAPSULA 2	CAPSULA 3
1 __ / __	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____
2 __ / __	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____
3 __ / __	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____
4 __ / __	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____
5 __ / __	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____
6 __ / __	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____
7 __ / __	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____	Sr.(a) tomou? () S () N Se sim, horário _____ Se não, motivo _____

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

DIA	AZIA	VÔMITO	GASES	DIARRÉIA
1	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N
2	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N
3	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N
4	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N
5	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N
6	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N
7	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N

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

Como esteve sua saúde no último mês?

Você sentiu/apresentou?

☐ febre

☐ dor de cabeça

☐ tontura

☐ desmaio

☐ mais fome

☐ maior disposição para realizar tarefas do dia-a-dia

☐ maior apetite sexual

() outros _____

Você fez alguma cirurgia?

() Sim () Não

Quando? _____

Qual(is): _____

Está tomando/ tomou algum medicamento, além do habitual?

() Sim () Não

Qual(is):

Por quê?

Quando?

Quanto?

Anexo 5: Questionário Socioeconômico e Clínico

QUESTIONÁRIO SÓCIO-ECONÔMICO E CLÍNICO

A00 () Nº Cardionutri:	
A0 Data: / /	
A1 Nome:	A2 Data de nascimento: / /
Endereço:	
Bairro:	CEP:
Cidade:	Telefone Res:
Telefone Recado:	Telefone Celular:
A3 Sexo: 1() M 2() F	A4 Idade:
A9 Escolaridade: 1() Analfabeto 2() Ensino Fundamental Incompleto 3() Ensino Fundamental Completo 4() Ensino Médio Incompleto	5() Ensino Médio Completo 6() Ensino Superior Incompleto 7() Ensino Superior Completo 9() Outros: _____
A6 Estado Civil: 1() Solteiro 2() Casado 3() Viúvo 4() Divorciado 5() Outros	
A7 Trabalha atualmente: 1() SIM 2() NÃO 3() Aposentado 4() Outros: _____	
A8 Profissão:	
A9 Escolaridade: 1() Analfabeto 2() Ensino Fundamental Incompleto 3() Ensino Fundamental Completo 4() Ensino Médio Incompleto	5() Ensino Médio Completo 6() Ensino Superior Incompleto 7() Ensino Superior Completo 9() Outros: _____
A10 Quantas pessoas moram na sua casa? A11 Quantas crianças?	
A12 Renda familiar mensal: 1() Menos que 1 SM 3() Entre 6 e 10 SM 2() Entre 1 e 5 SM 4() Mais que 10 SM	
A13 Fumante: 1() SIM 2() NÃO 3() EX-FUMANTE	
A14 Consome bebida alcoólica: 1() SIM 2() NÃO	
A15 Tipos de bebidas alcoólicas mais consumidas: 1() Cerveja 2() Vinho 3() Vodka 4() Cachaça 5() Outras: _____	
A16 Frequência de Consumo: 1() Diário 2() Semanal: _____ 3() Mensal: _____	
A17 Quantidade de bebida alcoólica ingerida no intervalo acima?	
A18 Consumo de outros tipos de drogas: 1() SIM 2() NÃO	
A19 Qual (s):	
A20 Possui alguma doença? 1() SIM 2() NÃO	
A21 Qual doença: 1() Diabetes Mellitus 6() Insuficiência Renal Crônica 2() Hipertensão Arterial 7() Dislipidemia 3() Hipotireoidismo 8() Doença Auto-Imune 4() Doença Hepática 9() Doença Coronariana 5() Outras Qual (is)? _____	
A22 Diagnóstico Clínico de DAC ou equivalente: 1() SIM 2() NÃO	
A23 Qual diagnóstico: 1() História de Infarto do Miocárdio 7() Revascularização do Miocárdio 2() Angina 8() Angioplastia 3() Alterações eletrocardiográficas isquêmicas 9() Aterosclerose 4() Doença Arterial Periférica 10() Aneurisma de Aorta Abdominal 5() Doença Arterial Carotídea (ataque isquêmico transitório ou Acidente Vascular Cerebral de origem carotídea ou obstrução da carótida >50%) 6() Diabetes Mellitus 11() Outros: _____	
A24 Fez algum tipo de cirurgia? 1() SIM 2() NÃO	
A25 Qual (is)? _____	
A26 Quando? _____	
A27 Está usando algum Medicamento e/ou Suplemento? 1() SIM 2() NÃO	
A28 Qual: 1() Estatinas 4() Ferro/Zinco	

<u>2</u> () Anti-hipertensivo	<u>5</u> () Vitamina
<u>3</u> () Hipoglicemiante	<u>6</u> () Fibrato
<u>7</u> () Outro: _____	
A29 Qual(is)? _____	
A30 Posologia: _____	
A31 Indicação: _____	
A32 Você tem alguma alergia ou intolerância alimentar? <u>1</u> () SIM <u>2</u> () NÃO	
A33 Qual (is): _____	
A34 Antecedentes familiares de doenças crônicas? <u>1</u> () SIM <u>2</u> () NÃO	
1 () Pai	
<u>1</u> () Obesidade	<u>4</u> () AVC
<u>2</u> () Hipertensão	<u>5</u> () Diabetes
<u>3</u> () Infarto	<u>6</u> () Doença vascular periférica
<u>7</u> () Outro: _____	
2 () Mãe	
<u>1</u> () Obesidade	<u>4</u> () AVC
<u>2</u> () Hipertensão	<u>5</u> () Diabetes
<u>3</u> () Infarto	<u>6</u> () Doença vascular periférica
<u>7</u> () Outro: _____	
A35 Gestante ou Lactante? <u>1</u> () SIM <u>2</u> () NÃO	
A36 Está recendo algum tipo de orientação Nutricional? <u>1</u> () SIM <u>2</u> () NÃO	
A37 Qual frequência? <u>1</u> () Esporádica <u>2</u> () Mensal <u>3</u> () Trimestral <u>4</u> () Semestral <u>5</u> () Outras	

Entrevistador: _____

Anexo 6: Composição Corporal, Eletrocardiograma e Pressão Arterial

COMPOSIÇÃO CORPORAL, ELETROCARDIOGRAMA E PRESSÃO ARTERIAL

NOME: _____ Nº CARDIONUTRI: _____

DATA: ____/____/____

Composição corporal:

	T0		T8	
Resistência	<u>A52</u>		<u>A60</u>	
Reactância	<u>A53</u>		<u>A61</u>	
% MG (BIA)	<u>A54</u>		<u>A62</u>	
%MM (BIA)	<u>A55</u>		<u>A63</u>	

Eletrocardiograma:

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

A65 Valor de V4 no HeartSquare: _____, _____ cm

A66 Tempo (mm:ss): _____: _____

A67 Qualidade do traçado (1 – péssimo a 5 – excelente): [] 1 [] 2 [] 3 [] 4 [] 5

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

Pressão arterial:

	T0		T8	
PAD1 x PAS 1	<u>A69</u>		<u>A81</u>	
PAD2 x PAS 2	<u>A70</u>		<u>A82</u>	
PAD3 x PAD3	<u>A71</u>		<u>A83</u>	
FC1	<u>A72</u>		<u>A84</u>	
FC2	<u>A73</u>		<u>A85</u>	
FC3	<u>A74</u>		<u>A86</u>	

Entrevistador (T0): _____

Entrevistador (T8): _____

Anexo 7: Parâmetros Antropométricos

PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS

NOME: _____ Nº CARDIONUTRI: _____

DATA: ____/____/____

	T0		T8	
Altura (m)	<u>A40</u>			
Peso (kg)	<u>A41</u>		<u>A49</u>	
IMC (kg/m²)	<u>A42</u>		<u>A50</u>	
CC (cm)	<u>A43</u>		<u>A51</u>	

Entrevistador (T0): _____

Entrevistador (T8): _____

Anexo 8: Recordatório Alimentar de 24h

RECORDATÓRIO ALIMENTAR DE 24H

NOME: _____ Nº CARDIONUTRI: _____

RECORDATÓRIO: 1 () 2 ()

DATA: ____/____/____ DIA DA SEMANA: ()dom ()seg ()ter ()qua ()qui ()sex ()sab

Refeição/Horário	Alimentos ou Preparações	Quantidade (g,mL)	Medida Caseira	Marca Comercial

Entrevistador: _____

Tempo da entrevista: _____

Anexo 9: Questionário de Avaliação de Atividade Física Habitual

QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE FÍSICA HABITUAL

NOME: _____ Nº CARDIONUTRI: _____

ENTREVISTADOR: _____

DATA: ____/____/____

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

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