Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Papel do ômega-3 nas características físico-químicas da
HDL e LDL e possível associação com medidas *Z-scan* em
indivíduos adultos**

Maria Camila Pruper de Freitas

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Nutrição em Saúde Pública para
obtenção do título de Mestre em Ciências**

Área de Concentração: Nutrição em Saúde Pública

**Orientadora: Profa. Dra. Nágila Raquel Teixeira
Damasceno**

São Paulo

2015

**Papel do ômega-3 nas características físico-químicas da
HDL e LDL e possível associação com medidas *Z-scan* em
indivíduos adultos**

Maria Camila Pruper de Freitas

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Nutrição em Saúde Pública para
obtenção do título de Mestre em Ciências**

Área de Concentração: Nutrição em Saúde Pública

**Orientadora: Profa. Dra. Nágila Raquel Teixeira
Damasceno**

Versão corrigida

São Paulo

2015

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

Dedicatória

À minha família por sua capacidade de acreditar e investir em mim. A presença de cada um significou segurança e certeza de que nunca estive sozinha em minha caminhada.

Agradecimentos

A Deus, por ter iluminado meu caminho e por ter me proporcionado o doce sabor desta vitória.

À minha orientadora Profa. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno, pela oportunidade única, pela paciência e tempo dedicados e pela competência em compartilhar seus conhecimentos e sabedoria.

Muito obrigada professora, por ter apostado em mim e ter me mostrado que tudo é possível.

À minha querida professora da época da graduação, Mariana Del Ben Mayer, por ter me observado com carinho e enxergado em mim algum potencial, me incentivando a dar o primeiro passo.

A todos os professores que participaram de minha história e que de alguma maneira contribuíram para meu sucesso, pois quem compartilha o conhecimento merece agradecimentos todos os dias.

Aos amigos e grandes companheiros de Mestrado, com quem pude compartilhar as dificuldades, alegrias, descobertas e confidências.

Aos funcionários da Faculdade de Saúde Pública em especial ao pessoal do Departamento de Nutrição, seção de pós-graduação e técnicas dos laboratórios de Nutrição Humana e Nutrição Experimental.

Ao professor Dr. Antonio Martins Figueiredo Neto, Priscila Ribeiro dos Santos e Daniel Humberto Garcia Espinosa do Instituto de Fluidos Complexos do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, pela colaboração nas análises com o Z-scan.

À professora Dra. Dulcineia Saes Parra Abdala e técnicas do laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo, pela colaboração na separação da LDL.

Aos participantes do estudo, pelo tempo dedicado e contribuição para o desenvolvimento desta pesquisa e para a ciência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos (INCT-FCx) do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Fluidos Complexos (NAP-FCx) pelo auxílio financeiro ao projeto e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado concedida.

Muito obrigada!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

Freitas, MCP. **Papel do ômega-3 nas características físico-químicas da HDL e LDL e possível associação com medidas Z-Scan em indivíduos adultos.** [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: O aumento na prevalência das doenças cardiovasculares alerta para a necessidade de estratégias eficazes e de baixo custo como medidas preventivas na redução dos fatores de risco, morbidades e óbitos decorrentes de eventos coronarianos. As modificações no estilo de vida são as primeiras alternativas a serem adotadas. Nesse contexto, a dieta ocupa lugar de destaque e os benefícios dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 na saúde cardiovascular são amplamente reconhecidos. As doenças cardiovasculares são influenciadas por diversos fatores de risco e o desequilíbrio na concentração plasmática das lipoproteínas é um fator de risco independente no desenvolvimento da doença cardiovascular aterosclerótica. Entretanto, há evidências de que as subfrações lipoproteicas podem influenciar o risco cardiovascular de maneira diferenciada, dependendo das características físico-químicas e funcionalidade de cada partícula. O desenvolvimento de novas técnicas, capazes de identificar esses parâmetros, tem sido foco de grande interesse científico. **Objetivo:** Avaliar o papel do ômega-3 sobre as características físico-químicas da LDL e HDL e possível associação entre medidas *Z-scan* e marcadores cardiometabólicos em indivíduos adultos. **Metodologia:** A partir de uma subamostra do estudo CARDIONUTRI (estudo clínico, randomizado, controlado e duplo cego com seguimento de 8 semanas) foram selecionados 36 indivíduos do Grupo Ômega-3 (3,0g/dia de óleo de peixe - 1,11g de EPA + 0,69g de DHA) e 27 do Grupo Placebo (3,0g/dia de óleo mineral). Foram monitorados o perfil clínico, antecedentes familiares, consumo alimentar, atividade física e antropometria. Amostras de sangue foram coletadas após 12 horas de jejum para avaliação das concentrações plasmáticas de CT, TAG, HDL-C, LDL-C, APOAI, APOB, PON1 e glicose. O tamanho da HDL e LDL foi analisado pelo método padronizado Lipoprint®. O conteúdo de LDL(-) foi determinado por ELISA. As medidas *Z-scan* foram determinadas por meio da difusividade térmica e absorção linear da LDL (1,0 mg/dL de proteína), isolada por ultracentrifugação. Todos as variáveis do estudo foram avaliadas no momento basal e após 8 semanas de intervenção. A adesão à intervenção foi monitorada pela contagem de cápsulas e percentual dos ácidos graxos plasmáticos. Para avaliar a associação das medidas *Z-Scan* aos marcadores cardiometabólicos, os dados obtidos no momento basal foram submetidos à Análise de Componentes Principais. **Resultados:** A idade média dos participantes do estudo foi de 51,5 (10,5) anos. A suplementação com ômega-3 promoveu redução significativa de CT, TAG, não-HDL, HDL_{PEQUENA} e LDL(-), além de aumento significativo de HDL-C e HDL_{GRANDE}. O ômega-3 foi mais eficaz na redução dos TAG (-24,9%) quando comparado ao placebo (-3,4%). O Grupo Ômega-3 apresentou aumento de HDL_{GRANDE} (22,5%) e redução de HDL_{PEQUENA} (-18,5%) ao final da intervenção, com diferença significativa quando comparado ao Grupo Placebo que apresentou redução de HDL_{GRANDE} (-1,2%) e aumento de HDL_{PEQUENA} (17,7%). Não foram observadas diferenças nas medidas *Z-scan* após a intervenção, porém as medidas se associaram positivamente a Componentes Principais com padrões cardioprotetores da amostra e negativamente a padrões aterogênicos. **Conclusão:** O ômega-3 demonstrou efeito positivo no perfil lipídico e propriedades aterogênicas das subfrações lipoproteicas. A suplementação com ômega-3 não modificou as medidas *Z-scan*, no entanto, a técnica demonstrou ser uma ferramenta capaz de se associar a padrões aterogênicos e antiaterogênicos monitorados no presente estudo.

Descritores: ômega-3; lipoproteínas, HDL; LDL; doença cardiovascular; *Z-scan*.

ABSTRACT

Freitas, MCP. **Role of omega-3 on HDL and LDL physicochemical characteristics and possible association with Z-scan measurements in adults.** [Dissertation]. Sao Paulo: School of Public Health of University of Sao Paulo; 2015.

Introduction: The increased of cardiovascular disease prevalence alert to the need to adopt effective and inexpensive strategies as preventive measures to reduce risk factors, morbidity and deaths from coronary events. Lifestyle modification is indicated as first alternative to be adopted. In this context the diet stands out and omega-3 polyunsaturated fatty acids benefits on cardiovascular health are largely recognized. Cardiovascular diseases are influenced by several risk factors and the plasma imbalance lipoprotein is considered a crucial independent risk factor. However, there is evidence of the influence of lipoprotein subfractions in cardiovascular risk, based on the physicochemical characteristics of these particles. The development of new techniques able to identify those parameters has been the focus of great scientific interest. **Objective:** To evaluate the role of omega-3 on HDL and LDL physicochemical characteristics and possible association between Z-scan measurements and cardiometabolic markers in adults. **Methods:** From a subsample of the study CARDIONUTRI (clinical, randomized, controlled, double blind study with 8-week follow-up) were selected 36 individuals from the Omega-3 Group (3.0g/day of fish oil - 1,11g EPA + 0.69g DHA) and 27 individuals from the Placebo Group (3.0g/day of mineral oil). The clinical profile, family history, dietary intake, physical activity and anthropometry were monitored. Blood samples were collected after 12 hours of fasting to evaluate plasma concentrations of TC, TAG, HDL-C, LDL-C, APOAI, APOB, PON1 and glucose. The HDL and LDL size was analyzed by the standard method Lipoprint®. The levels of LDL (-) was determined by ELISA. The Z-scan measurements were determined by thermal diffusivity and linear absorption of LDL (1.0 mg / dL protein) isolated by ultracentrifugation. All study variables were evaluated at baseline and after 8 weeks of intervention. The intervention accession was monitored by capsule count and percentage of plasma fatty acids. To evaluate the association of the Z-Scan measurements to cardiometabolic markers, the data collected at baseline were subjected to Principal Component Analysis. **Results:** The average age of individuals were 51.5 (10.5) years. The omega-3 supplementation promoted a significant decreased of TC, TAG, non-HDL, small HDL and LDL(-), and significantly increased HDL-C and large HDL. The omega-3 was more effective in reducing the TAG (-24.9%) when compared to placebo (-3.4%). The Omega-3 Group increased large HDL (22.5%) and decreased small HDL (-18.5%) after the intervention, with significant difference when compared to the Placebo Group that decreased large HDL (-1.2%) and increased small HDL (17.7%). There were no differences in Z-scan measurements with the interventions, but were observed positively associated the Z-scan measurements with the anti-atherogenic sample patterns and negatively associated with atherogenic sample patterns when the sample was standardized from the Principal Components Analysis. **Conclusion:** The omega-3 demonstrated positive effect on the lipid profile and atherogenic lipoprotein subfractions. Supplementation with omega-3 did not modify the Z-scan measurements, however, the technique proved to be a tool that can be associated with atherogenic and anti-atherogenic sample patterns monitored in this study.

Keywords: omega-3; lipoproteins; HDL; LDL; cardiovascular disease; Z-Scan.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Aspectos epidemiológicos das doenças cardiovasculares	19
1.2. Lipoproteínas no risco cardiovascular	19
1.3. Tamanho e funcionalidade da LDL	20
1.4. Tamanho e funcionalidade da HDL	23
1.5. Estatinas na modulação do LDL-C e HDL-C	27
1.6. Potenciais efeitos cardioprotetores do ômega-3	27
1.7. Técnica <i>Z-scan</i> na caracterização óptica e estrutural da LDL	30
2. OBJETIVOS	32
3. METODOLOGIA	33
3.1. Casuística	33
3.2. Cálculo amostral	33
3.3. Análise de risco e benefícios	34
3.4. Delineamento clínico do estudo	34
3.5. Critérios de inclusão	35
3.6. Critérios de não inclusão	36
3.7. Avaliação socioeconômica, cultural e clínica	37
3.8. Avaliação antropométrica	37
3.9. Avaliação do consumo alimentar	38
3.10. Avaliação da atividade física habitual	39
3.11. Avaliação bioquímica	39
3.11.1. Obtenção de sangue	39
3.11.2. Determinação do perfil lipídico e apolipoproteínas	39
3.11.3. Adesão à intervenção: contagem das cápsulas e análise do perfil de ácidos graxos no plasma	40
3.11.4. Tamanho das lipoproteínas LDL e HDL	41
3.11.5. Detecção da LDL(-)	42
3.11.6. Determinação da atividade da Paroxonase (PON1)	43
3.11.7. Determinação da glicose plasmática	43
3.11.8. Processo de separação da LDL para análise <i>Z-scan</i>	43
3.11.9. Descrição do arranjo experimental <i>Z-scan</i>	44
3.12. Análise estatística	46

4. RESULTADOS	47
4.1. Caracterização da amostra	47
4.2. Adesão à intervenção	49
4.3. Caracterização clínica da amostra	51
4.4. Avaliação antropométrica, composição corporal e pressão arterial	53
4.5. Avaliação da atividade física habitual	54
4.6. Avaliação do consumo alimentar	55
4.7. Avaliação do perfil bioquímico	56
4.8. Avaliação do tamanho das lipoproteínas	58
4.9. Medidas <i>Z-scan</i>	60
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
8. ANEXOS	100
Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	100
Anexo 2. Aprovação do Comitê de Ética do Hospital Universitário	102
Anexo 3. Aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Saúde Pública	103
Anexo 4. Diário do participante	104
Anexo 5. Questionário Socioeconômico e Clínico	110
Anexo 6. Composição Corporal, Eletrocardiograma e Pressão Arterial	112
Anexo 7. Parâmetros Antropométricos	113
Anexo 8. Recordatório Alimentar de 24h	114
Anexo 9. Questionário de Avaliação de Atividade Física Habitual	115
CURRÍCULO LATTES	117
ARTIGO	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principal mecanismo de formação da LDL _{PEQUENA}	21
Figura 2. Alterações na LDL nativa e maior potencial aterogênico das partículas de LDL modificadas.....	22
Figura 3. Propriedades antiaterogênicas da HDL.....	24
Figura 4. Efeitos cardioprotetores do ômega-3.....	29
Figura 5. Fluxograma de seleção de indivíduos e coleta de dados.....	36
Figura 6. Separação das lipoproteínas por eletroforese em gel - Lipoprint®.....	41
Figura 7. Fluxograma para purificação da LDL e obtenção da LDL(-).....	42
Figura 8. Fluxograma de ultracentrifugação do plasma para separação LDL.....	44
Figura 9. Figura esquemática do arranjo experimental <i>Z-scan</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização socioeconômica e demográfica da amostra, segundo tipo de intervenção.....	48
Tabela 2. Percentual de ácidos graxos plasmáticos na amostra segundo tempo e tipo de intervenção.....	50
Tabela 3. Relato de doenças crônicas na amostra, segundo tipo de intervenção.....	52
Tabela 4. Relato de uso e tipo de medicamentos, segundo tipo de intervenção.....	52
Tabela 5. Relato de antecedentes familiares para doenças crônicas na amostra, segundo tipo de intervenção.....	53
Tabela 6. Perfil antropométrico, composição corporal e pressão arterial da amostra, segundo tempo e tipo de intervenção.....	54
Tabela 7. Atividade física na amostra, segundo tempo e intervenção.....	54
Tabela 8. Perfil do consumo alimentar na amostra, segundo tempo e tipo de intervenção.....	55
Tabela 9. Perfil bioquímico da amostra, segundo tempo e tipo de intervenção.....	57
Tabela 10. Tamanho das lipoproteínas LDL e HDL na amostra, segundo tempo e tipo de intervenção.....	59
Tabela 11. Análise de Componentes Principais (PCA): padronização da amostra no tempo basal, segundo parâmetros bioquímicos e tamanho das lipoproteínas LDL e HDL.....	62
Tabela 12. Correlação entre as medidas <i>Z-scan</i> e as Componentes Principais (CP).....	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Percentual de ingestão de cápsulas na amostra, segundo tipo de intervenção.....	49
Gráfico 2. Magnitude do efeito da intervenção ($\Delta=T8-T0$) em relação ao percentual de ácidos plasmáticos na amostra, segundo tipo de intervenção.....	51
Gráfico 3. Variação no consumo de macronutrientes, açúcar e sódio ($\Delta=T8-T0$) na amostra, segundo tipo de intervenção.....	56
Gráfico 4. Magnitude do efeito da intervenção ($\Delta=T8-T0$) em relação ao perfil bioquímico da amostra, segundo tipo de intervenção.....	58
Gráfico 5. Magnitude do efeito da intervenção ($\Delta=T8-T0$) em relação às subfrações lipoproteicas plasmáticas, segundo tipo de intervenção.....	60
Gráfico 6. Medidas <i>Z-scan</i> , segundo tempo e tipo de intervenção.....	60

SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AA+PAL	Ácido araquidônico+ácido palmitoleico
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
ABCG1	<i>ATP-binding cassette transporter G1</i>
ACN	Acetonitrila
ADAM	<i>Anthryl diazomethane</i>
AEST	Ácido esteárico
AF	Atividade física
AFO	Atividade física ocupacional
AG	Ácidos graxos
AGNE	Ácidos graxos não esterificados
ALA	Ácido linolênico
ALIN	Ácido linoleico
ALL	Atividade de lazer e locomoção
AOL	Ácido oleico
APAL	Ácido palmitoleico
APOAI	Apolipoproteína AI
APOB	Apolipoproteína B
AVC	Acidente vascular cerebral
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene</i>
BIA	Impedância bioelétrica
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CC	Circunferência da cintura
CETP	Proteína de transferência de ésteres de colesterol
CHO	Carboidratos
CP	Componente Principal
CT	Colesterol total
CuSO ₄	Sulfato de cobre II
DCV	Doenças cardiovasculares
DHA	Ácido docosahexaenoico
DLP	Dislipidemia

DM	Diabetes Mellitus
DNCT	Doenças crônicas não transmissíveis
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EEL	Exercício físico de lazer
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	Colesterol associado à HDL
HDL _{GRANDE}	Partículas grandes da HDL
HDL _{PEQUENA}	Partículas pequenas da HDL
HMG-CoA redutase	hidroxi-metil-glutaril coenzima A redutase
HPLC	<i>High Performance Liquide Chromatography</i>
ICAM	<i>Intercellular adesion molecules</i>
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
INCT-FCx	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluídos Complexos
LCAT	Enzima lecitina colesterol acil transferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL(-)	LDL eletronegativa
LDL-C	Colesterol associado à LDL
LDL _{GRANDE}	Partículas grandes da LDL
LDLox	LDL oxidada
LDL _{PEQUENA}	Partículas pequenas da LDL
LIP	Lipídeos
Lp- PLA2	Lipoproteína associada à fosfolipase A2
LTB4	Leucotrienos da série 4
LTB5	Leucotrienos da série 5
MG	Massa gorda
MM	Massa magra

não-HDL-C	Colesterol não associado à HDL
NAP-FCx	Núcleo de Apoio à Pesquisa em Fluidos Complexos
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAD	Pressão arterial diastólica
PAF-AH	Fator ativador plaquetário acetil hidrolase
PAS	Pressão arterial sistólica
PCA	Análise de Componentes Principais
PGE2	Prostaglandinas da série 2
PGE3	Prostaglandinas da série 3
PLTP	Proteína de transferência de fosfolipídeos
PMSF	<i>Phenylmethysulfonyl fluoride</i>
PON1	Paraoxonase 1
PON3	Paraoxonase 3
PPAR- γ	Receptores ativados pelos proliferadores de peroxissoma- γ
PPARs	Receptores ativados pelos proliferadores de peroxissoma
PPAR- α	Receptores ativados pelos proliferadores de peroxissoma- α
R24h	Recordatório alimentar de 24 horas
RPM	Rotação por minuto
SDA	Ácido estearidônico
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i> [®]
SR-BI	<i>Scavenger receptor BI</i>
SREBP	<i>Sterol regulatory element binding proteins</i>
T=0	Período basal do estudo
T=8	Período após 8 semanas de intervenção
TAG	Triacilgliceróis
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
Tris-HCL	<i>Hydroxymethyl aminomethane-hydrochloride</i>
TXA2	Tromboxanos da série 2
TXA3	Tromboxanos da série 3
VCAM	<i>Vascular cell adesion molecules</i>
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

1. INTROUÇÃO

1.1. Aspectos epidemiológicos das doenças cardiovasculares

Dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) destacam que as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são fortemente influenciadas por fatores de risco comportamentais da população (TEAM et al., 2012). Segundo a OMS, 14,1% da população é tabagista e fuma todos os dias e 48,6% não praticam nenhum tipo de exercício físico, além disso, 40% têm pressão arterial elevada e 51,7% estão acima do peso ideal, fatores que contribuem com o aumento da prevalência das DCNT e altos índices de mortalidade (TEAM et al., 2012). STRONG et al. (2005) estimaram que se a incidência anual de mortalidade por esse conjunto de doenças fosse reduzida em 2%, seriam evitadas 36 milhões de mortes até o ano de 2015.

No Brasil, 74% de todas as mortes são decorrentes das DCNT e dentre elas, as doenças cardiovasculares (DCV) ocasionam 33% das mortes, tornando-as a principal causa de morbidade e óbito no país, além de contribuírem de maneira significativa com o aumento de recursos destinados à saúde pública (TEAM et al., 2012).

Nesse contexto, os programas de políticas públicas têm proposto maior enfoque na prevenção e na modificação de fatores de risco tradicionais para DCV, incluindo idade, antecedente familiar, hipertensão, dislipidemia, tabagismo, diabetes e obesidade (PEARSON et al., 2002; WANG, 2008).

A primeira manifestação das DCV, na maioria dos casos é o evento coronariano e a base fisiopatológica para os eventos clínicos primários e secundários é a aterosclerose, que pode se desenvolver de maneira insidiosa ao longo de décadas (MOSCA, 2007).

1.2. Lipoproteínas no risco cardiovascular

A formação das placas ateroscleróticas se inicia com a agressão ao endotélio vascular e consequente disfunção endotelial (ROSS et al., 1976; ROSS et al., 1977). A disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas, principalmente à lipoproteína de baixa densidade (LDL), favorecendo o seu depósito no espaço subendotelial e a progressão da aterosclerose (WILLIAMS e TABAS, 1998; HANSSON et al., 2006).

O acúmulo de LDL nas artérias ocorre de maneira proporcional ao aumento da concentração de colesterol associado à LDL (LDL-C) no plasma (HANSSON, 2005).

Em contrapartida baixas concentrações de colesterol associado à lipoproteína de alta densidade (HDL-C) estão associadas a menor eficácia no transporte reverso do colesterol e aumento da vulnerabilidade ao estresse oxidativo, fatores que contribuem com a disfunção endotelial (GORDON et al., 1989; BARTER et al., 2007).

Segundo a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, a avaliação adequada do risco cardiovascular, no que diz respeito à quantidade de colesterol associado às lipoproteínas, compreende as análises do LDL-C e HDL-C, onde o aumento do risco cardiovascular está associado à elevação do LDL-C (≥ 160 mg/dL) e redução do HDL-C (homens < 40 mg/dL e mulheres < 50 mg/dL) (XAVIER et al., 2013).

Apesar da importância do monitoramento do conteúdo de LDL-C e HDL-C no risco cardiovascular, nas últimas décadas diversos pesquisadores têm estudado as características físico-químicas dessas lipoproteínas e demonstram que alterações oxidativas e o tamanho das subfrações influenciam a funcionalidade das partículas e podem modular o risco cardiovascular de maneira diferenciada (STEINBERG et al., 1989; SEVANIAN et al., 1999; TOSHIMA et al., 2000; HULTHE e FAGERBERG, 2002; SVIRIDOV e NESTEL, 2002; RADER, 2002; MELLO et al., 2011; HIRAYAMA e MIDA, 2012; NIKOLIC et al., 2013).

1.3. Tamanho e funcionalidade da LDL

Independente do conteúdo de LDL-C, as LDL modificadas são amplamente citadas na literatura por seu maior potencial aterogênico e inflamatório (STEINBERG et al., 1989; SEVANIAN et al., 1999; ITABE et al., 2011; HIRAYAMA e MIDA, 2012; NIKOLIC et al., 2013).

As partículas pequenas e mais densas da LDL (LDL_{PEQUENA}) são associadas ao maior risco cardiovascular, devido à facilidade com que migram para o espaço subendotelial e maior afinidade aos proteoglicanos, o que favorece a permanência dessas lipoproteínas na parede arterial, além de apresentarem baixa afinidade aos receptores de LDL (receptor B/E), o que as torna mais susceptíveis à oxidação e glicação (BROWN e GOLDSTEIN, 1983).

O principal mecanismo de formação de LDL_{PEQUENA} é fortemente associado ao aumento de triacilgliceróis (TAG) na circulação (BARTER, 2000; CARR e BRUNZELL, 2004) (**Figura 1**).

Figura 1. Principal mecanismo de formação de LDL_{PEQUENA}.

*Elaborada pela autora. TAG: triacilgliceróis; CETP: proteína de transferência de ésteres de colesterol; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade.

O aumento de partículas ricas em TAG na circulação estimula a atividade da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP). Esse estímulo favorece a interação dos TAG com a HDL, em troca de ésteres de colesterol. Os ésteres de colesterol são transferidos para outras lipoproteínas ricas em apolipoproteína B (APOB), que incluem a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e LDL. A intensa transferência de lipídeos entre as lipoproteínas ainda estimula a atividade da lipase hepática que promove aumento da hidrólise de LDL no fígado e também contribui para o aumento da geração de LDL_{PEQUENA} (TALL et al., 1987; CHAIT, 1993; ITABE et al., 2011).

A LDL_{PEQUENA} migra com maior facilidade para o espaço subendotelial, favorecendo seu depósito na parede das artérias, formação de células espumosas e placa aterosclerótica (ROSS, 1993).

As alterações na estrutura nativa da LDL podem ocorrer em função de diversos fatores, resultando em partículas de LDL modificadas, com propriedades físico-químicas distintas e maior potencial aterogênico (FOGELMAN et al., 1980; JÜRGENS et al., 1987) (**Figura 2**).

Figura 2. Alterações na LDL nativa e maior potencial aterogênico das partículas de LDL modificadas.

*Elaborada pela autora. LDL: lipoproteína de baixa densidade; APOCIII: apolipoproteína CIII; APOE: apolipoproteína E; LDL(-): LDL eletronegativa; LDLox: LDL oxidada; AGNE: ácidos graxos não esterificados.

De acordo com STEINBERG et al. (1989), após migrar para o espaço subendotelial, a LDL_{PEQUENA} sofre modificações oxidativas devido à ausência de antioxidantes, dando origem a LDL oxidada (LDL_{ox}) que pode retornar à circulação ou permanecer no microambiente da parede arterial. A LDL_{ox} que permanece no espaço subendotelial passa a ser reconhecida como *non self*, atuando como estímulo para a migração de monócitos, diferenciação em macrófagos e formação de células espumosas, que em conjunto contribuem de modo essencial para o desenvolvimento das placas ateroscleróticas.

Atualmente, se aceita que uma pequena proporção de partículas seja modificada ainda na circulação, por meio da ação de metais de transição, e que a oxidação seja intensificada após a migração da LDL para o espaço subendotelial, onde o ambiente é mais pró-oxidante (KOVANEN et al., 2003).

Dentre as diversas formas de LDL modificada, a LDL eletronegativa [LDL(-)] tem sido foco de diversos estudos.

AVOGARO et al., (1988), isolaram, por cromatografia de troca aniônica, uma fração da LDL do plasma de indivíduos normolipidêmicos com maior carga negativa, denominando-a de LDL(-) ou LDL “minimamente oxidada”, cujas características eram semelhantes à LDLox. Posteriormente, SÁNCHEZ-QUESADA et al. (2004) mostraram que o *pool* de LDL(-) não é formado exclusivamente por LDLox. Estas partículas também podem se originar de outros processos que favorecem o aumento da carga negativa, como a glicação não enzimática, enriquecimento em ácidos graxos não esterificados (AGNE), modificações enzimáticas por fosfolipase A₂ associada à LDL (Lp-PLA₂) (anteriormente chamada de fator ativador plaquetário acetil hidrolase – PAF-AH), reação cruzada com a hemoglobina e, possivelmente, outros mecanismos ainda não identificados.

A subfração de LDL(-) é constituída por partículas heterogêneas em tamanho e com tendência a agregação, com conteúdo diminuído de lipídeos, fosfolipídeos e α -tocoferol, e aumento de colesterol livre e proteínas, quando comparada à LDL nativa (AVOGARO et al., 1988). Diferente da LDL oxidada *in vitro*, a LDL(-) não apresenta fragmentação da APOB e outras alterações decorrentes de uma oxidação excessiva. Esta observação deu origem ao termo “LDL minimamente modificada”, empregado por alguns grupos ao se referirem à LDL identificada por AVOGARO (BERLINER et al., 1990).

Independente da via de geração, as frações modificadas da LDL [LDLox e LDL(-)] são citadas em diversos estudos por sua maior atividade pró-inflamatória e pró-aterogênica (SEVANI et al., 1997; CARMENA, et al., 2004; HOLVOET, 2004; BANCELLS et al., 2009; BANCELLS et al., 2010; ESTRUCH, et al., 2013).

Estudos clínicos citam o aumento da concentração de LDLox na circulação de indivíduos com síndrome metabólica e obesidade, reforçando a ideia de que as LDL modificadas apresentam maior potencial aterogênico (HOLVOET et al., 2008; PORRECA et al., 2004). Esses resultados tornam-se particularmente relevantes quando se observa que um considerável percentual de indivíduos com síndrome metabólica apresenta concentração normal LDL-C (DESPRÉS, 2009, e ST-PIERRE et al., 2005).

1.4. Tamanho e funcionalidade da HDL

Estudos epidemiológicos demonstram que o aumento da concentração de HDL-C é inversamente relacionada à incidência de doença aterosclerótica coronariana (WILSON et al., 1988; ASSMANN et al., 1996).

A lipoproteína de alta densidade (HDL) exerce diversas atividades cardioprotetoras importantes como o transporte reverso do colesterol, inibição da oxidação da LDL no espaço subendotelial, ação anti-inflamatória, antitrombótica e vasodilatadora (BARTER et al., 2004; LEWIS e RADER, 2005, KONTUSH et al., 2006; MINEO et al., 2006; MINEO e SHAUL, 2012; VAN DER STOEP et al., 2014). As propriedades cardioprotetoras da HDL são ilustradas na **Figura 3**:

Figura 3. Propriedades antiaterogênicas da HDL.

***Elaborada pela autora.** HDL: lipoproteína de alta densidade; APOA1: apolipoproteína AI; PON1: paraoxonase 1; Lp-PLA2: fosfolipase A₂ associada à lipoproteínas; LCAT: enzima lecitina colesterol acil transferase; TRC: transporte reverso do colesterol; LDL: lipoproteína de baixa densidade; SR-BI: *scavenger receptor BI*; S1P3: receptor *sphingosine 1-phosphate 3*; eNOS: enzima endotélio óxido nítrico sintase; NO: óxido nítrico.

Os mecanismos biológicos distintos da HDL ocorrem em função da heterogeneidade na atividade de suas subfrações, provavelmente pela distribuição não uniforme das apolipoproteínas, enzimas e lipídeos associados (BISGAIER et al., 1985; LIBBY, 2002; XU et al., 2003; ROSENSEN et al., 2011).

As duas principais subfrações da HDL são: HDL2 – partículas de HDL grandes e menos densas (HDL_{GRANDE}) e HDL3 – partículas de HDL pequenas e mais densas (HDL_{PEQUENA}). A associação de cada subfração ao risco cardiovascular e as diferenças na atividade cardioprotetora dessas partículas ainda seguem sendo foco de pesquisas e apresentam resultados controversos (CAMONT et al., 2011, PIRILLO et al., 2013).

O transporte reverso do colesterol é classicamente descrito como a principal função fisiológica da HDL (GLOMSET, 1968), que consiste na remoção do excesso de colesterol dos tecidos periféricos e transporte para o fígado onde é metabolizado e excretado (JOHNSON et al., 1991). O processo de efluxo do colesterol é mediado pela apolipoproteína AI (APOAI), molécula mais abundante da HDL, uma vez que esta promove a interação com os receptores *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1), receptores *ATP-binding cassette transporter G1* (ABCG1) e *scavenger receptor BI* (SR-BI) (TALL, 1993; RYE e BARTER, 2004, ADORNI et al., 2007).

A HDL_{GRANDE} é citada pela maior eficácia no transporte reverso do colesterol, pois confere melhor captação do colesterol proveniente de tecidos periféricos, via receptor ABCG1, além da transferência facilitada de éster de colesterol hepático, via SR-BI (ASZTALOS et al., 2005).

A capacidade de efluxo do colesterol da HDL_{PEQUENA} em macrófagos, mediada pelos receptores ABCA1 e ABCG1, pode ser clinicamente relevante, independentemente dos níveis de HDL-C, pois diminui o acúmulo de lipídeos nos macrófagos da íntima arterial prevenindo a formação de células espumosas (FAVARI et al., 2009; TALL, 2008).

O sinergismo na inativação de lipídeos oxidados por meio da ação das enzimas paraoxonase (PON1 e PON3), Lp-PLA₂ e a enzima lecitina colesterol acil transferase (LCAT) e a maior facilidade com que a HDL_{PEQUENA} migra para o espaço subendotelial, protegendo as partículas de LDL da oxidação e prevenindo a formação de placas ateroscleróticas, reflete as propriedades antioxidantes desta subfração (BARTER et al., 2007; RIBAS et al., 2004).

A HDL possui propriedades anti-inflamatórias entre as quais se encontra a inibição da expressão das moléculas de adesão na superfície das membranas celulares endoteliais, *intercellular adhesion molecules* (ICAM) e *vascular cell adhesion molecules* (VCAM), responsáveis pelo recrutamento monocitário plasmático para o interior da parede vascular (BLANKENBERG et al., 2003). Em experimentos com culturas celulares o acréscimo de HDL no meio celular contendo LDL-C produziu importante redução da transmigração monocitária (NAVAB et al., 1991).

Algumas propriedades cardioprotetoras da HDL, como a ação antitrombótica e vasodilatadora, ainda não são totalmente compreendidas, porém são citadas por alguns autores.

OSLAKOVIC et al. (2009) descrevem a ação antitrombótica da HDL e sugerem que a proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) pode mediar a transferência de fosfolípidos aniônicos para a HDL a partir da APOAI, que atuaria neutralizando o efeito pró-coagulante dos fosfolípidos aniônicos, reduzindo o estímulo inadequado da coagulação sanguínea. Os fosfolípidos aniônicos estão presentes na superfície de membranas e contribuem com reações proteolíticas, formação de coágulo e fibrina.

Os efeitos vasoativos da HDL foram abordados após um experimento realizado em cultura de células endoteliais. YUHANNA et al. (2001) estudaram os efeitos da HDL na enzima endotelial óxido nítrico sintase (eNOS), onde a exposição da lipoproteína (10µg /mL) à células endoteliais durante 15 minutos aumentou em 5 vezes a atividade da enzima.

Evidências comprovam que a HDL atua significativamente na redução das modificações oxidativas da LDL (FREDENRICH e BAYER, 2003; KONTUSH et al., 2003; MACKNESS, et al., 2000; MACKNESS et al., 1993; MACKNESS e DURRINGTON, 1193). A HDL pode inibir a oxidação da LDL e prevenir a formação de peróxidos lipídicos (SINGH et al., 1997; HUANG et al., 1998; SAKUMA et al., 2002), diminuindo os efeitos adversos na síntese de eNOS, ocasionado pela LDLox, com consequente contribuição no aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), que por sua vez exerce atividade cardioprotetora, principalmente por sua ação vasodilatadora (EVERSON e SMART 2001, UITTENBOGAARD et al. 2000).

Segundo alguns autores, a HDL também participa da sinalização que estimula a liberação de NO nas células endoteliais. A sinalização induzida pela HDL pode ser mediada pela ligação ao SR-BI através da APOAI e também pode ser mediada, parcialmente, pelos lisofosfolípidos carregados pela partícula que se ligam ao receptor *sphingosine 1-phosphate 3* (S1P3) acoplado a proteína G da membrana. As duas vias de sinalização induzem a vasodilatação, pois aumentam a expressão da proteína quinase B e da eNOS, além de promoverem o aumento da concentração de cálcio intracelular, fatores que contribuem com o aumento da síntese de NO (NOFER et al., 2004; SHAUL e MINEO, 2004).

No estudo de NOFER et al. (2004) a HDL induziu a vasodilatação na aorta de ratos e os efeitos vasodilatadores foram atribuídos aos lisofosfolípidos presentes na HDL, os quais foram isolados previamente para realização do experimento.

1.5. Estatinas na modulação do LDL-C e HDL-C

A modulação no conteúdo de LDL-C e HDL-C ainda é o principal alvo de intervenção medicamentosa e avanços notáveis foram obtidos com o desenvolvimento de hipolipemiantes, permitindo a obtenção de metas terapêuticas, especialmente direcionadas à redução do LDL-C, foco principal dos programas e diretrizes de tratamento da hipercolesterolemia. Estudos clínicos demonstram que a diminuição do LDL-C se associa a redução da mortalidade por doenças cardiovasculares, porém um número significativo ainda não pode ser evitado e o aumento do HDL-C não amplia sua eficácia na prevenção de eventos coronarianos (INEU et al., 2006; CZIRAKY et al., 2008; GRANT e MEIGS, 2007; DEEG et al., 2007).

Em adição, o uso das estatinas segue sendo o principal método na prevenção primária e secundária das DCV. As estatinas são medicamentos que agem através da inibição da hidroximetil-glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), principal enzima envolvida na síntese de colesterol, reduzindo o LDL-C entre 18-60%. Sua ação no metabolismo do HDL-C não é bem definida, mas sabe-se que elas podem aumentar o conteúdo sérico do colesterol associado a essa lipoproteína entre 5 a 15% (INEU et al., 2006).

Mesmo diante dos inquestionáveis benefícios associados ao uso das estatinas, as limitações no manejo do baixo HDL-C e o fato de que cerca de 5% dos pacientes apresentam intensos efeitos adversos, torna a identificação de novas ferramentas de intervenção importante. Destaca-se ainda, que mesmo naqueles indivíduos mais bem controlados, cerca de 30% dos fatores de risco permanecem sem melhora.

1.6. Potenciais efeitos cardioprotetores do ômega-3

Associada as intervenções farmacológicas, a alimentação constitui importante ferramenta na redução do risco cardiovascular e possivelmente na prevenção de eventos clínicos. A importância do consumo de ácidos graxos, principalmente os ácidos graxos mono e poli-insaturados é amplamente documentada na literatura desde as décadas de 70 e 80 (BANG e DYERBERG, 1972; DYERBERG et al., 1975; DYERBERG et al., 1978; DYERBERG e BANG, 1979; ACKMAN et al., 1980; BANG et al., 1980).

O consumo de ácidos graxos poli-insaturados, em particular o ômega-3, constitui papel potencialmente interessante na prevenção primária e secundária das DCV, visto que

desempenha importantes funções na estrutura das membranas celulares, nas vias metabólicas e na sinalização celular (DIN et al., 2013).

Dentre os ácidos graxos da família ômega-3, o ácido α -linolênico (ALA) está presente em óleos vegetais (em pequena quantidade no óleo de soja e de canola e em maior quantidade no óleo de linhaça), peixes e crustáceos, óleo de fígado de bacalhau, nozes e soja; enquanto que o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA) são derivados, quase que exclusivamente, de fontes marinhas, como peixes e algas (DIN et al., 2004; CHAN e CHO, 2009). Embora esses ácidos graxos sejam considerados essenciais ao homem, pequenas quantidades de ALA podem ser convertidas em EPA (5%) e DHA (0,5%) (CHAN e CHO, 2009).

Na década de 70 foram publicados os primeiros estudos mostrando a relação inversa entre o consumo de ômega-3 e a prevalência de dislipidemias em esquimós (BANG et al., 1970). Desde então, vários estudos confirmaram os efeitos benéficos da suplementação de ômega-3, particularmente, do EPA e DHA, sobre diversos fatores de risco cardiovascular (GRUNDT e NILSEN, 2008). Embora o ômega-3 de origem animal tenha grande participação nos efeitos acima descritos, estudos têm demonstrado que o ômega-3 de origem vegetal também exerce ação cardioprotetora (ROS e MATAIX, 2006; DIN et al., 2004).

Apesar dos resultados inconsistentes observados por HOOPER et al., (2006), ao avaliarem o efeito do consumo de ômega-3 sobre as DCV, evidências epidemiológicas demonstram que o alto consumo de ômega-3 promove proteção cardiovascular (BROWNING et al., 2007). Resultados de diversos estudos suportam a ideia de uma relação inversa entre o consumo de ômega-3 e a taxa de mortalidade por DCV (MOZAFFARIAN e RIMM, 2006).

A suplementação com ômega-3 (EPA+DHA) por 2 anos em indivíduos com DCV diminuiu a progressão da aterosclerose quando comparado ao placebo. Esses efeitos podem ser decorrentes da redução da dislipidemia, da resposta inflamatória e da formação de células espumosas (DIN et al., 2004).

Os efeitos cardioprotetores do ômega-3 estão associados à síntese de eicosanoides (séries 3 e 5) que exercem ação anti-inflamatória, pois inibem a síntese de eicosanoides pró-inflamatórios derivados do ácido araquidônico (séries 2 e 4) (HARRIS, 2004; RUSSO, 2009). Além disso, o ômega-3 promove o aumento da expressão dos receptores ativados pelos proliferadores de peroxissoma- γ (PPAR- γ) e dos receptores ativados pelos proliferadores de peroxissoma- α (PPAR- α) que atuam diminuindo a síntese de citocinas inflamatórias e

lipoproteínas pró-aterogênicas (JIANG et al., 1998; KERSTEN et al., 2000; HARRIS et al., 2008) (**Figura 4**).

Figura 4. Efeitos cardioprotetores do ômega-3.

***Elaborada pela autora.** AA: ácido araquidônico; ALA: ácido linolênico; SDA: ácido estearidônico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; PGE3 e PGE2: prostaglandinas das séries 3 e 2; TXA3 e TXA2: tromboxanos das séries 2 e 3; LTB5 e LTB4: leucotrienos das séries 5 e 4; PPAR-γ e PPAR-α: receptores ativados pelos proliferadores de peroxissoma γ e α; TNF-α: fator de necrose tumoral-α; IL-6: interleucina-6; AGNE: ácidos graxos não esterificados; TAG: triacilgliceróis; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade e LDL-C: colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade.

O PPAR-γ inibe a liberação do fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e interleucina-6 (IL-6) pelos macrófagos, diminuindo a formação de células espumosas, promovendo a modulação da resposta inflamatória e estabilização da placa aterosclerótica. O PPAR-α contribui com a redução de TAG, VLDL e LDL-C a partir do aumento da β-oxidação e redução do transporte dos ácidos graxos livres dos tecidos periféricos para o fígado. O aumento da remoção de LDL dos tecidos periféricos também é observado, possivelmente por ação dos PPARs que aumentam a expressão da lipase lipoproteica (HARRIS et al., 2008).

1.7. Técnica *Z-scan* na caracterização óptica e estrutural da LDL

A modificação de fatores de risco comportamentais, com destaque para a alimentação, é essencial na prevenção de eventos coronarianos e manutenção da saúde cardiovascular. Em adição, existe substancial interesse em fatores de risco emergentes, visando a melhor compreensão das DCV e dos casos que não podem ser explicados pelos fatores de risco clássicos. Os fatores de risco emergentes podem conferir informação adicional nas equações preditivas, particularmente fatores associadas à modificação das partículas de LDL, descritas por seu maior potencial aterogênico. A identificação das partículas modificadas de LDL é foco de diversas pesquisas científicas.

A técnica experimental *Z-scan*, que caracteriza a LDL a partir de suas propriedades ópticas e estruturais, demonstrou sensibilidade bastante interessante ao identificar a LDL na fase inicial de oxidação, o que a diferencia de muitos testes bioquímicos que não são capazes de detectar tais diferenças em amostras de lipoproteínas oxidadas. Visto que a oxidação da LDL é evento chave na progressão da aterosclerose, a detecção de partículas oxidadas, ainda em fase inicial, pode conferir informação complementar na classificação precoce do risco cardiovascular.

A técnica *Z-scan* permite a medição de efeitos não lineares na transmitância da luz através de um material, utilizando uma fonte de luz laser com um perfil gaussiano, enquanto a intensidade da luz é aumentada até valores onde ocorrem efeitos ópticos não lineares no material (SHEIK-BAHAE et al., 1989), possibilitando a caracterização óptica e estrutural da LDL a partir da absorção não linear e difusividade térmica da amostra.

Segundo BOYD (1992), “Óptica não linear é o estudo da interação de luz laser intensa com a matéria”. Alguns materiais têm a capacidade de absorver parte da luz sobre eles incidente onde valores elevados de intensidade luminosa podem alterar sua temperatura, resultando em uma variação do seu índice de refração. Esse fenômeno é denominado de não linearidade óptica de origem térmica.

A técnica *Z-scan* foi descrita por GÓMEZ et al. (1999) em cristais líquidos liotrópicos, e segundo os autores esse material apresentou comportamento óptico não linear de origem térmica pela sua capacidade de absorver a luz. Por serem partículas anfipáticas, com uma superfície hidrofílica e um núcleo hidrofóbico, as partículas de LDL se assemelham aos agregados micelares que constituem os cristais líquidos liotrópicos e apresentam organização estrutural de acordo com a concentração relativa anfifílico/solvente, determinando

comportamentos ópticos não lineares semelhantes (KIMURA et al., 2006; ALVES et al., 2006).

O primeiro trabalho científico sobre a não linearidade óptica da LDL foi publicado por GÓMEZ et al. (2004) que iniciaram os experimentos pois acreditavam que a análise das características físicas da LDL seria fundamental na compreensão da predisposição da partícula à modificação oxidativa. Os pesquisadores avaliaram o sinal da LDL nativa e da LDLox pela técnica *Z-scan* e também a contribuição das frações da LDL na resposta óptica não linear, onde a partícula foi separada em três frações: ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos. A LDLox não apresentou sinal, quanto às frações, todas contribuíram com o sinal, porém a fração de fosfolipídeos foi a que apresentou a maior intensidade.

SANTOS et al. (2012) também realizaram experimentos com amostras de LDL nativa e LDLox e os resultados foram semelhantes aos resultados de GOMEZ et al. (2004), onde a LDL nativa apresentou sinal óptico não linear pela técnica *Z-scan*, diferente da LDLox, que não apresentou sinal nas mesmas condições experimentais. Entretanto, SANTOS et al. (2012) também analisaram a contribuição dos hidroperóxidos e dos antioxidantes, isolados por *High Performance Liquide Chromatography* (HPLC), no sinal óptico não linear da LDL.

As análises para observar a contribuição dos antioxidantes na resposta óptica não linear da LDL foram realizadas a partir de uma mesma amostra que foi dividida em duas partes, onde uma parte foi composta pelos antioxidantes extraídos da LDL e a outra permaneceu intacta, sendo utilizada como controle. As duas amostras foram medidas utilizando a técnica *Z-scan* nas mesmas condições e o sinal foi determinado a partir da amplitude pico-vale transmitida pelas amostras. Foi possível observar que o sinal dos antioxidantes isolados apresentou quase a mesma amplitude pico-vale que a amostra de LDL total. Estes resultados sustentam a hipótese de que os antioxidantes são relevantes no sinal óptico não linear da LDL, pois determinam a sua capacidade de reter o calor, ou seja, a absorção linear das amostras.

A contribuição dos hidroperóxidos foi analisada a partir do comportamento óptico não linear da LDLox em função do tempo de oxidação, após a oxidação seriada *in vitro* da LDL. As oxidações foram realizadas em uma amostra de LDL nativa, para aumentar o controle sobre o processo. Essa amostra foi dividida em alíquotas que foram incubadas por tempos pré-determinados. As oxidações *in vitro* da LDL foram realizadas adicionando-se 20 µM de sulfato de cobre II (CuSO₄) por mg de proteína à solução para diferentes intervalos de tempo (de 0 até 90 minutos). A difusividade térmica da amostra foi observada apenas até 70 minutos

de oxidação. As amostras oxidadas por 80 e 90 minutos tiveram valores baixos de absorção linear e transmitância não linear, portanto os resultados não foram confiáveis.

Os resultados demonstraram que a difusividade térmica das amostras apresenta um comportamento crescente em função do tempo de oxidação, ou seja, quando mais oxidada a amostra, mais eficientemente o calor absorvido se dissipa através do meio. Após 40 minutos de oxidação ocorreu aumento mais pronunciado da difusividade térmica, e comparando esses resultados com os resultados das medidas de hidroperóxidos foi possível observar um comportamento similar onde o aumento pronunciado da produção de hidroperóxidos se iniciou após 40 minutos de oxidação. Essa semelhança no comportamento deu ênfase à correlação importante entre a produção de hidroperóxidos e a difusividade térmica das amostras. Outra comparação interessante refere-se ao consumo de carotenoides e o sinal da absorção linear das amostras. A quantidade relativa de carotenoides chega a praticamente zero após 90 minutos de oxidação, enquanto a absorção linear diminui 50% neste mesmo tempo. Diante desses resultados foi possível concluir que o consumo dos carotenoides é o responsável por parte da redução na absorção linear das amostras.

Em função dos resultados dos experimentos os pesquisadores concluíram que o sinal óptico não linear da LDL depende principalmente do conteúdo de antioxidantes e concentração de hidroperóxidos presentes na amostra, visto que a fase de oxidação da LDL determinou a amplitude pico vale pela técnica *Z-scan* (SANTOS et al. 2012). A LDL oxidada (menor conteúdo de antioxidantes/maior concentração de hidroperóxidos) apresentou menor amplitude pico-vale e maior difusividade térmica que a LDL nativa.

Diante dessa perspectiva, a hipótese que características físicas da LDL são importantes na determinação da oxidação da partícula foi confirmada e a técnica *Z-scan* foi capaz de identificar as modificações decorrentes desse processo, portanto avaliar a incorporação da técnica dentro de uma perspectiva clínica torna-se relevante.

2. OBJETIVOS

Avaliar o papel do ômega-3 nas características físico-químicas da LDL e HDL e a possível associação entre as medidas *Z-Scan* e marcadores cardiometabólicos monitorados em indivíduos adultos.

3. METODOLOGIA

3.1. Casuística

Os participantes foram recrutados por meio de cartazes de divulgação fixados na Cidade Universitária, sites da Universidade de São Paulo, FAPESP e outros veículos de comunicação em massa. Todos os participantes passaram pelo processo de esclarecimento, e somente após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 1**) iniciou-se a coleta de dados. Todos os procedimentos de obtenção de amostras, análises, divulgação dos resultados e preservação da identidade dos participantes seguiram as normas do Conselho Nacional de Saúde, no que se refere à ética em pesquisa com seres humanos. O projeto foi submetido aos Comitês de Ética do Hospital Universitário (**Anexo 2**) e Faculdade de Saúde Pública (**Anexo 3**), ambos vinculados à Universidade de São Paulo. O presente estudo foi realizado a partir de uma subamostra do estudo “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?”, siglado como CARDIONUTRI e coordenado pela Prof^a. Dr^a. Nágila Raquel Teixeira Damasceno com apoio financeiro parcial do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos (INCT-FCx, 2010-2014), do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Fluidos Complexos – USP (NAP-FCx, 2011) e FAPESP (Proc 2011/12523-2).

3.2. Cálculo Amostral

O cálculo do tamanho da amostra considerou a magnitude do efeito da intervenção com ômega-3 na concentração de LDL_{PEQUENA} observada no estudo de SATOH et al. (2007). Com o auxílio de uma tabela para cálculo de tamanho de amostra necessária por grupo (utilizando-se o teste t para comparar médias de variáveis contínuas), considerando α de 5% bilateral, poder estatístico de 90% (β de 10%), o tamanho mínimo da amostra determinado após o cálculo foi de 23 indivíduos por grupo (HULLEY et al., 2003).

3.3. Análise de risco e benefícios

A pesquisa teve caráter de intervenção. Entretanto, o risco considerado foi mínimo, pois os produtos utilizados na composição das capsulas, além de fazerem parte do hábito alimentar da população brasileira, são considerados geralmente aceitos como seguros à saúde. Os produtos foram previamente aprovados pelo *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (FDA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) na modalidade de suplemento alimentar. De acordo com a literatura, eventuais efeitos adversos poderiam estar associados ao consumo do óleo de peixe (ômega-3). Em raras situações, alguns pacientes relatam aumento na eructação, hálito com odor a peixe, prurido e redução na ativação de plaquetas. Destaca-se que essas reações adversas, na maioria das vezes, não foram consideradas indicativas de suspensão do consumo do ômega-3. Esses efeitos adversos foram rigorosamente monitorados durante o estudo, seguindo padrões éticos, científicos e médicos.

Os benefícios resultantes da realização deste estudo basearam-se na avaliação do potencial efeito cardioprotetor do ácido graxo testado e sua capacidade de reduzir o risco cardiometabólico por meio da melhora do perfil lipídico e modificação das propriedades físico-químicas das lipoproteínas. Neste contexto, os benefícios para a população incluída no estudo foram experimentais, embora pudessem ser observados desde efeitos neutros até positivos (melhora do perfil clínico).

Além da disponibilização de meios de contato 24h com a equipe de pesquisadores, os participantes receberam os resultados de todos os exames realizados.

3.4. Delineamento clínico do estudo

A partir de uma subamostra do estudo CARDIONUTRI (estudo clínico, randomizado, controlado e duplo cego com seguimento de 8 semanas) foram selecionados 36 indivíduos suplementados com ômega-3 (Grupo Ômega-3) e 27 indivíduos suplementados com placebo (Grupo Placebo) que concluíram todas as etapas do estudo, descritas a seguir:

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

Período basal (T=0): Realização de eletrocardiograma para verificar a presença de evento cardiovascular prévio. Aplicação dos questionários clínico, socioeconômico, atividade física e consumo alimentar, antropometria, coleta de sangue e entrega das cápsulas.

Período após 8 semanas (T=8): Aplicação dos questionários clínico, atividade física e consumo alimentar, antropometria e coleta de sangue.

No período T=0 os participantes do estudo receberam após a entrevista o suplemento codificado. Os indivíduos do Grupo Ômega-3 receberam 100 cápsulas, cada uma contendo 1g de óleo de peixe, equivalente a 37% de EPA (0,37g) + 23% de DHA (0,23g), e os indivíduos do Grupo Placebo receberam 100 cápsulas cada uma contendo 1g de óleo mineral.

As cápsulas foram manipuladas e codificadas pela empresa Relthy (Indaiatuba, São Paulo, Brasil). Visando manter a randomização do estudo, optou-se pelo uso de cápsulas aromatizadas com essência de limão. Essa estratégia teve por objetivo “mascarar” o aroma dos óleos.

Os participantes foram orientados a consumir individualmente o suplemento, distribuídos do seguinte modo: 1 cápsula no desjejum, 1 cápsula no almoço e 1 cápsula no jantar, totalizando 1,1g de EPA + 0,69g de DHA ao dia. Em caso de esquecimento ou ausência de alguma refeição, os participantes foram orientados a ingerir as cápsulas a qualquer hora dentro do mesmo dia.

Foi fornecido um diário (**Anexo 4**) onde os participantes registraram as intercorrências durante o estudo, tais como:

1. Compartilhar o suplemento com outra pessoa;
2. Não ingerir;
3. Sinais e sintomas adversos associados à suplementação;
4. Número de cápsulas que sobraram até a próxima entrevista;
5. Formas de consumo (p. ex. puro ou adicionado a alimentos).

Destaca-se que o uso de suplementos encapsulados foi escolhido devido à facilidade no controle e individualização da intervenção ao longo do estudo. O fornecimento de alimentos fonte foi excluído porque poderia favorecer as seguintes condutas: divisão do alimento em preparações familiares, difícil controle do consumo individual, respostas atribuídas ao alimento e não ao conteúdo de ácido graxo presente, dentre outros.

3.5. Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo indivíduos de ambos os sexos com idades de 30 a 74 anos que apresentassem pelo menos um dos fatores de risco para doença cardiovascular: diabetes, hipertensão, dislipidemia ou tabagismo.

3.6. Critérios de não inclusão

Os indivíduos que preencheram algum dos critérios abaixo não foram incluídos: pacientes desnutridos; grávidas ou lactantes; indivíduos inseridos em outros protocolos de intervenção; portadores de doenças agudas ou crônicas graves; usuários de drogas ilícitas; alcoolistas; pessoas alérgicas ou intolerantes a algum componente da intervenção e pacientes com alterações psiquiátricas não controladas, além de evento cardiovascular prévio. As informações foram obtidas por meio de entrevista com os participantes, avaliação clínica, análise dos prontuários e eletrocardiograma. As etapas de seleção de indivíduos e coleta de dados são apresentadas no fluxograma a seguir (**Figura 5**):

Figura 5. Fluxograma de seleção, distribuição e coleta de dados dos participantes.

*Elaborada pela autora. Tempo=0: período basal; Tempo=8: período após 8 semanas; n: frequência absoluta.

3.7. Avaliação socioeconômica e clínica

O perfil socioeconômico foi avaliado a partir de questionário previamente estruturado que abordou os itens sexo, idade, raça, renda familiar e número de indivíduos que moravam na casa. A avaliação clínica foi constituída pelas informações sobre história clínica atual, antecedentes familiares de doenças crônicas (pai e mãe) e uso regular de medicamentos e/ou vitaminas (**Anexo 5**). A pressão arterial foi aferida por profissional capacitado, assim como a realização e avaliação do eletrocardiograma para verificar a presença de evento cardiovascular (**Anexo 6**).

3.8. Avaliação antropométrica

A avaliação nutricional dos indivíduos foi feita por meio de indicadores antropométricos como peso (kg), estatura (m), circunferência da cintura (CC) (cm) e avaliação da composição corporal, percentuais de massa gorda (%MG) e massa magra (%MM) e índice de massa corporal (IMC) (kg/m^2) (**Anexo 7**).

O peso foi mensurado com os participantes utilizando o mínimo de roupas e descalços, em uma balança da marca Toledo, modelo 2096PP/2[®] (Toledo, São Paulo, Brasil) com limite de capacidade de 200,0 kg e precisão de 50,0 g. A medida da estatura foi determinada com o estadiômetro fixo Seca[®] (TBW, São Paulo, Brasil), limite de 2,1 m e precisão de 1 mm. Os indivíduos foram orientados a permanecerem descalços, em posição ereta, com os pés paralelos, calcanhares, panturrilha, glúteos e ombros encostados na parede e com a cabeça sob o plano horizontal de Frankfurt (LOHMAN et al., 1988). As medidas de peso e estatura foram utilizadas para cálculo do IMC, definido como a massa corporal em quilogramas dividido pela estatura em metros quadrados (kg/m^2).

A circunferência da cintura foi aferida com uma fita inelástica, flexível, precisão 1 mm (TBW, São Paulo, Brasil), adotando-se como referencial anatômico o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. Os indivíduos foram orientados a permanecerem com o abdômen relaxado, ficar em pé, manter os braços paralelos ao corpo e pés unidos.

O %MG e %MM foram determinados com base nos valores obtidos por impedância bioelétrica (BIA) tetrapolar Biodynamics[®], modelo 450 (TBW, São Paulo, Brasil), com corrente elétrica de baixa amplitude (800 μA) e frequência de 50 KHz (**Anexo 6**). A corrente elétrica passa pelo corpo do indivíduo através de dois pares de eletrodos adesivos

posicionados na mão e no pé direito, deitado em posição supina, com os braços em ângulo de 30° em relação ao seu corpo e as pernas sem contato entre si. Calçados e meias foram retirados e durante o teste o indivíduo foi orientado a permanecer imóvel. O cálculo do %MG e %MM foi determinado com o auxílio do programa Biodynamics® (TBW, São Paulo, Brasil), onde foram considerados sexo, idade, peso, altura, nível de atividade física, valores de resistência e reactância.

3.9. Avaliação do consumo alimentar

A avaliação do consumo alimentar foi realizada por meio da aplicação de dois Recordatórios Alimentares 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.

Utilizou-se um formulário padrão para a aplicação dos 2 R24h (**Anexo 8**), e o seu preenchimento foi baseado no método *multiple pass* (JOHNSON et al., 1996; GUENTHER et al., 1996). Este método consiste em três etapas: listagem rápida dos alimentos, descrição detalhada e revisão. Com base nessa técnica foi possível definir e quantificar todos os alimentos e as bebidas consumidos nas últimas 24 horas, em cada R24h. A energia (Kcal) e os seguintes nutrientes foram calculados: carboidratos, lipídeos, proteínas, açúcar, sódio, ácidos graxos saturados, mono e poli-insaturados, ômega-3, ômega-6, fibras totais, solúveis e insolúveis.

A energia e os nutrientes brutos foram analisados no Programa *The Food Processor* versão 10.11.0 (COX et al., 2012). Os recordatórios que apresentaram valores de ingestão energética menor que 500 ou superior a 5000 kcal/dia foram excluídos do estudo por falta de sensibilidade do método de inquérito nutricional ou por representarem valores de consumo considerados extraordinários. A partir do nutriente na sua forma bruta, realizou-se o ajuste quanto à variabilidade intrapessoal. Nesse sentido, os resultados obtidos nos 2 R24h foram processados por meio do programa *The Multiple Source Method* versão 1.0.1 (DIFE, Nuthetal, Alemanha), que corrige essa variabilidade. Posteriormente, realizou-se o ajuste dos nutrientes pela energia. Nesse ajuste, o total de calorias ingeridas foi considerado variável independente e o valor absoluto do nutriente variável dependente em um modelo de regressão linear. Todos os nutrientes que apresentaram coeficiente de correlação (r) próximo de um e

significância de $p < 0,05$ foram ajustados pelo método residual, proposto por WILLETT e STAMPFER (1986) e MACKERRAS (1996).

Portanto, os resultados finais referentes ao consumo alimentar apresentados estão sob a forma ajustada pela variabilidade intrapessoal e pela energia.

3.10. Avaliação da atividade física habitual

Foi aplicado um questionário para avaliar a atividade física habitual no período basal e após a intervenção (**Anexo 9**) e de acordo com as respostas foi calculado o escore total de atividade física seguindo protocolo padronizado a partir do questionário de BAECKE (1982) validado por FLORINDO e LATORRE (2003).

3.11. Avaliação bioquímica

3.11.1. Obtenção de sangue

Após um jejum de 12 horas foram coletadas amostras de sangue (20 mL) em tubos *vacutainer* contendo *ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) (1 mg/mL) (BD, Brasil), utilizado como anticoagulante e antioxidante. Aproximadamente 4 mL de sangue foi coletado em tubo seco, para a extração de soro. O sangue usado para determinar o conteúdo de glicose foi coletado em tubos com fluoreto. Todos os tubos foram mantidos sob refrigeração (8°C) até o processamento das amostras. O sangue foi centrifugado (3000 rpm/10 min/4°C) e ao plasma acrescentaram-se os seguintes inibidores de proteases: aprotinina (10 µg/mL), benzamidina (10 µM) e *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF) (5 µM), além do antioxidante *butylated hydroxytoluene* (BHT) (100 µM). Todas as amostras permaneceram armazenadas a -80°C até o momento das análises.

3.11.2. Determinação do perfil lipídico e apolipoproteínas

A determinação das concentrações de colesterol total (CT) e HDL-C foram realizadas por métodos padrões (Colesterol Liquiform® Labtest, Minas Gerais, Brasil) e (Colesterol HDL® Labtest, Minas Gerais, Brasil), respectivamente. Para a determinação de TAG plasmáticos utilizou-se o Kit Triglicérides Liquiform® (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 TAG < 400 mg/dL.

As apolipoproteínas APOAI e APOB foram determinadas por método padrão, por meio da utilização dos kits Autokit APO AI® e Autokit APO B® (Randox Chemicals USA Inc., Richmond, VA, EUA), respectivamente, pelo método imuno-turbidimétrico. As análises foram realizadas em duplicata, utilizando o sistema semiautomático COBAS.

3.11.3. Adesão à intervenção: contagem das cápsulas e análise do perfil de ácidos graxos no plasma

A adesão de cada participante ao estudo foi avaliada por meio da contagem das cápsulas restantes em cada momento da intervenção, o que refletiu indiretamente o número de vezes que o paciente deixou de ingerir o suplemento.

A análise do perfil de ácidos graxos (AG) no plasma também foi realizada visando avaliar a adesão dos indivíduos a intervenção. A determinação do perfil de ácidos graxos no plasma foi baseada no método de derivatização da carboxila dos AG esterificados com o composto fluorescente *anthryl diazomethane* (ADAM), conforme proposto por NIMURA et al., (1980). Os AG derivatizados foram analisados por HPLC utilizando uma coluna Kinetex C18 (50 x 3,0 mm com 2,6 µm de tamanho de partícula) e pré-coluna de C18. Para cada corrida de amostras do plasma no HPLC, analisou-se também uma amostra de branco apenas com padrão interno (ácido heptadecanoico, C17), uma amostra de ADAM puro e uma amostra de padrão externo [mix de ácidos graxos separados – EPA, DHA, araquidônico, palmitoleico, palmítico, linoleico, linolênico, esteárico) que determinou o tempo de retenção dos ácidos graxos em cada corrida e permitiu a integração dos mesmos de acordo com este tempo. Para a separação dos AG utilizou-se um gradiente de acetonitrila (ACN) e água, partindo de um gradiente de 79 % de ACN, chegando a 93 %, com fluxo de 1,45 mL/min e 12 min para cada análise. A fluorescência foi monitorada em 350 nm e analisada sua emissão em 450 nm. Após integração dos picos obtidos em cada corrida, calculou-se o percentual de área de cada pico.

As cápsulas de ômega-3, após finalização da coleta de dados, também foram analisadas em HPLC para certificação do conteúdo das mesmas.

3.11.4. Tamanho das lipoproteínas LDL e HDL

O tamanho das lipoproteínas foi determinado pelo sistema Lipoprint® da Quantimetrix, que se baseia na separação e quantificação das subfrações das lipoproteínas por eletroforese em gel de poliácridamida não desnaturante.

A separação das subfrações da LDL foi realizada utilizando-se o kit *LIPOPRINT SYSTEM – LDL SUBFRACTIONS*. Para realizar esse procedimento, foram acrescentados 25 µL do soro ou plasma ao tubo com gel de poliácridamida e 200 µL da solução gel corante. A amostra foi homogeneizada. Em seguida os tubos contendo as amostras foram fotopolimerizados e submetidos ao processo de eletroforese. Após a separação das subfrações, os tubos foram scaneados e a imagem digitalizada, de modo a identificar cada subfração.

A separação das subfrações da HDL foi realizada utilizando-se o kit *LIPOPRINT SYSTEM – HDL SUBFRACTIONS*. Para realizar o procedimento foi utilizada a mesma técnica, porém a quantidade de solução gel corante foi de 300 µL.

As subfrações das lipoproteínas foram separadas no intervalo de 1 hora e 30 minutos pelo processo de eletroforese a partir da densidade de cada uma. O processo de separação das lipoproteínas por eletroforese em gel é ilustrado na **Figura 6**.

Figura 6. Separação das lipoproteínas por eletroforese em gel (Lipoprint®).

Fonte: Adaptada de Lipoprint® - Quantimetrix: *Subfraction Testing Services*.

3.11.5. Detecção da LDL(-)

A LDL(-) foi detectada através de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) sanduíche, seguindo protocolo padronizado (FAULIN et al., 2012). O processo de purificação da LDL(-) para a sensibilização das placas de ELISA é ilustrado na **Figura 7**.

Figura 7. Fluxograma para purificação da LDL e obtenção da LDL(-).

*Elaborada pela autora. LDL(-): LDL eletronegativa; EDTA: *ethylenediamine tetraacetic acid*; rpm: rotação por minuto; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; Tris-HCL: *hydroxymethyl aminomethane-hydrochloride*; FPLC: *Fast Protein Liquid Chromatography*

Os resultados foram expressos a partir da média das absorbâncias das amostras menos o background e, posteriormente, aplicados à curva padrão e multiplicados pela respectiva diluição, sendo os resultados expressos em mg/mL. Os anticorpos que foram utilizados nessa análise foram gentilmente doados pela Prof^a. Dr^a. Dulcineia Saes Parra Abdalla, do Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

3.11.6. Determinação da atividade da PON1

As alíquotas de sangue coletadas em tubo seco foram centrifugadas (3.000 rpm/10 min/4°C) e após a completa retração do coágulo (≈ 30 min) foram obtidas amostras de soro. A atividade da PON1 foi determinada pela adição de 500 μ L de tampão Tris-HCL (0.1M e pH 8,05), contendo 2 mmol/L de cloreto de cálcio (CaCl_2) e 1,1 mmol/L de substrato paraoxon (*Sigma Chemical CO – St. Louis - USA*) em 25 μ L de soro. Em seguida, se distribuiu 200 μ L da solução em placas de fundo plano contendo 96 poços. A leitura da absorbância foi feita em duplicata utilizando o leitor de microplacas (Microplate Reader, Benchmark, Bio-RAD) com comprimento de onda de 405 nm, a 37°C. Para o cálculo da atividade, foram feitas 6 leituras em intervalos de um minuto cada. Os resultados foram expressos em $\text{nmol min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ (MACKNESS et al., 1991).

3.11.7. Determinação da glicose plasmática

A determinação da glicose plasmática foi feita com kit comercial, enzimático e colorimétrico Glicose PAP Liquiform[®] (Labtest, Minas Gerais, Brasil).

3.11.8. Processo de separação da LDL para análise Z-scan

A separação da LDL do plasma para análise Z-scan foi feita por diferença de densidade, por processos de ultracentrifugação. Na primeira ultracentrifugação (56.000 rpm/7h/4°C) a VLDL foi separada do plasma após ajuste de densidade ($d < 1,019 \text{ mg/dL}$). O sobrenadante com a VLDL foi retirado e descartado. Na segunda ultracentrifugação (56.000 rpm/6h/4°C) a LDL foi separada do infranadante restante da primeira ultracentrifugação após ajuste de densidade ($1,019 \text{ mg/dL} < d < 1,063 \text{ mg/dL}$) (**Figura 8**).

Figura 8. Fluxograma de ultracentrifugação do plasma para separação LDL.

*Elaborada pela autora. Kbr: brometo de potássio; rpm: rotação por minuto; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; BCA: *Protein Assay Kit*; PTN: proteína.

O método Pierce® *Protein Assay Kit* (BCA) (Thermo Scientific, USA, 2010), foi utilizado para quantificação das proteínas totais presentes nas amostras de LDL. A concentração da LDL foi determinada após a leitura da absorbância por emissão de luz. Foi utilizada uma curva de calibração que relacionou a concentração de proteínas na solução com a intensidade de luz transmitida. Todas as amostras de LDL foram diluídas para 1,0 mg de proteína por mL e foram utilizadas posteriormente para análises no arranjo experimental *Z-scan*.

3.11.9. Descrição do arranjo experimental *Z-scan*

O arranjo experimental utilizado nas medidas *Z-scan* descritas neste trabalho foi composto por um laser contínuo de luz verde com perfil gaussiano (532 nm) da Coherent modelo Verdi V10. Foram usadas duas lentes convergentes, L1 e L2, da Newport. No ponto entre L1 e L2 onde o feixe atinge seu raio mínimo, foi posicionado um obturador mecânico

(chopper) da Stanford Research Systems, modelo SR540, que bloqueia o feixe periodicamente, proporcionando pulsos quadrados. A posição do chopper no foco faz com que o tempo de subida e descida dos pulsos seja o menor possível. Para as medidas com a LDL o chopper proporcionou pulsos de aproximadamente 40 ms. Após passar por L2 o feixe atinge dois espelhos, E1 e E2 (Newport). Os espelhos são utilizados para mudar a direção do feixe de forma que haja espaço para que o detector seja posicionado no campo distante. Próximo a E2 é posicionada outra lente convergente, L3 (Newport), chamada de lente de *Z-scan*. Em seguida é posicionado o microdeslocador (modelo M-UTM 150PP.1, Newport), que movimenta a amostra no eixo z. No final do microdeslocador há um divisor de feixe (Newport) que desvia metade da luz para um segundo detector, utilizado para fazer medidas de absorção não linear. A 1270 mm do divisor de feixe é posicionada uma íris e logo atrás um fotodetector (D1) (THORLABS, modelo PDA50). O detector é conectado a um osciloscópio da Tektronix, modelo TDS1002B, que envia o sinal recebido para o microcomputador de aquisição. A figura esquemática do arranjo experimental utilizado nas medidas *Z-scan* é ilustrada a seguir (**Figura 9**).

Figura 9. Figura esquemática do arranjo experimental *Z-scan*.

Fonte: Laboratório de Óptica do Grupo de Flúídos Complexos - Instituto de Física - Universidade de São Paulo.

A técnica *Z-scan* foi utilizada para investigar as características da LDL com base na sua capacidade em absorver e aumentar (ligeiramente) a temperatura da amostra, quando iluminada por um feixe de laser, formando então uma lente térmica que induz a modificação no índice de refração da amostra. A curva típica da transmitância da luz medida em função da posição da amostra ao longo do ponto de focagem do feixe apresenta um pico e o parâmetro medido é a amplitude pico vale (um parâmetro adimensional) (SANTOS et al., 2012).

3.12. Análise Estatística

Todas as análises foram conduzidas em duplicata e os resultados foram apresentados sob a forma de tabelas e gráficos. Para as variáveis qualitativas, utilizou-se o teste χ^2 e os resultados foram apresentados em frequência absoluta (n) e percentual (%). Considerou-se o tipo de distribuição das variáveis quantitativas (teste *Kolmogorov-Smirnov*; $p > 0,05$) para determinação dos testes estatísticos. Foram realizados testes *t-Student* (diferenças entre os grupos) e *t-Student* pareado (diferenças intragrupos) quando as variáveis apresentaram distribuição normal e os valores foram apresentados em média e desvio padrão. Para as demais variáveis utilizaram-se testes não paramétricos, *Mann Whitney* (diferenças entre os grupos) e *Wilcoxon* (diferenças intragrupos) e os resultados foram apresentados em mediana e intervalo interquartil. As diferenças intragrupos também foram avaliadas após cálculo da magnitude do efeito da intervenção (Δ) e variação percentual ($\Delta\%$).

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada às seguintes variáveis da amostra: CT, HDL-C, LDL-C, TAG, glicemia, colesterol não associado à HDL (não-HDL-C), APOAI, APOB, PON1, HDL_{GRANDE}, HDL_{PEQUENA}, LDL_{PEQUENA}, LDL_{GRANDE}, tamanho da LDL e LDL(-) para analisar a estrutura de covariação das variáveis e revelar um número restrito de padrões da amostra. Primeiramente construiu-se uma matriz de dados (63 x 15), na qual as amostras foram dispostas em linhas e as variáveis em colunas.

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 variáveis passam a ter a mesma importância, ou seja, 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, 1969) para considerar a medida de adequação da amostra.

A PCA projetou 5 CP que foram correlacionadas (correlação de *Spearman*) com as medidas *Z-scan*.

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 considerado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da amostra

A partir da triagem inicial foram selecionados 36 participantes para o Grupo Ômega-3 e 27 para o Grupo Placebo, totalizando 63 indivíduos com idade média de 51,5 (10,5) anos.

As médias de idade entre os indivíduos dos dois grupos não foram diferentes. No Grupo Ômega-3 a média foi de 50,1 (9,3) anos e no Grupo Placebo a média foi de 53,4 (11,8) anos.

As diferenças com relação ao sexo, etnia, estado civil, trabalho, escolaridade, renda, uso de tabaco ou álcool não foram significativas entre os grupos, porém a maior parte da amostra foi composta por participantes do sexo feminino, de etnia branca, casados e ativos profissionalmente.

A caracterização socioeconômica e demográfica dos participantes, de acordo com o tipo de intervenção, é ilustrada na **Tabela 1**.

Tabela 1. Caracterização socioeconômica e demográfica da amostra, segundo tipo de intervenção.

	Grupo Ômega-3 (n=36)		Grupo Placebo (n=27)		P
	n	%	n	%	
Sexo					0,44
Masculino	10	27,8	10	37,0	
Feminino	26	72,2	17	63,0	
Etnia					0,43
Branca	27	75,0	20	74,1	
Negra	4	11,1	1	3,7	
Pardo	5	13,9	6	22,2	
Estado civil					0,80
Solteiro	4	11,1	5	18,5	
Casado	25	69,4	19	70,4	
Viúvo	3	8,3	1	3,7	
Divorciado	3	8,3	1	3,7	
Outros	1	2,8	1	3,7	
Trabalho					0,30
Sim	20	55,6	20	74,1	
Não	10	27,8	5	18,5	
Aposentado	6	16,7	2	7,4	
Escolaridade					0,49
Fundamental incompleto	4	11,1	4	14,8	
Fundamental completo	2	5,6	2	7,4	
Médio completo	12	33,3	6	22,2	
Superior incompleto	5	13,9	3	11,1	
Superior completo	8	22,2	8	29,6	
Outros	5	13,9	4	14,8	
Renda					0,28
1-5 salários mínimos	11	30,6	14	51,9	
6-10 salários mínimos	12	33,3	8	29,6	
>10 salários mínimos	12	33,3	5	18,5	
Tabaco					0,72
Sim	6	16,7	6	22,2	
Não	21	58,3	13	48,1	
Ex-tabagista	9	25,0	8	29,6	
Álcool*					0,94
Sim	17	47,2	13	48,1	
Não	19	52,8	14	51,9	

Resultados apresentados em frequência absoluta (n) e percentual (%). Diferenças entre os grupos analisadas pelo teste χ^2 . Significância estatística $p < 0,05$. *O relato de consumo de álcool considerou o consumo ou não, independente da quantidade.

4.2. Adesão à intervenção

A adesão à intervenção foi avaliada a partir da contagem das cápsulas ao final de cada etapa do estudo. A adesão foi superior a 80% tanto no Grupo Ômega-3 como no Grupo Placebo (**Gráfico 1**). Ao comparar os dois grupos não se identificou diferença significativa quanto à adesão calculada pelo percentual de cápsulas ingeridas.

Gráfico 1. Percentual de ingestão de cápsulas na amostra, segundo tipo de intervenção. Resultados apresentados em percentual (%). Diferença entre o Grupo Ômega-3 (n=36) e o Grupo Placebo (n=27) analisada pelo teste χ^2 . Significância estatística $p < 0,05$.

A adesão à intervenção também foi monitorada por meio da análise do percentual de ácidos graxos plasmáticos, visando identificar marcadores associados à suplementação de ômega-3. No grupo suplementado com ômega-3, houve diminuição significativa no percentual plasmático de ácido linoleico e ácido araquidônico + ácido palmitoleico (quantificados simultaneamente, pois o pico de retenção para ambos foi o mesmo) e aumento significativo de DHA ao longo do tempo, porém, sem variações significativas em relação aos outros ácidos graxos.

No grupo suplementado com placebo, nenhum dos ácidos graxos apresentou variação no percentual plasmático após a suplementação.

Os resultados da análise do percentual de ácidos graxos no plasma, segundo tempo e tipo de intervenção, ilustram a adesão à intervenção e são apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Percentual de ácidos graxos plasmáticos na amostra, segundo tempo e tipo de intervenção.

Grupo Ômega-3 (n=36)			
Ácidos graxos (%)	T=0	T=8	p
*Araquidônico + Palmitoleico	20,0 (15,9-26,3)	16,1 (14,2-19,6)	0,003
Docosahexaenoico	7,7 (4,3-9,9)	11,2 (8,8-14,9)	<0,001
Eicosapentaenoico	3,7 (0-6,9)	2,8 (0-5,8)	0,52
Linoleico	29,1 (25,2-36,5)	25,4 (22,8-31,5)	0,04
Linolênico	1,2 (0,6-1,7)	2,4 (1,0-3,0)	0,04
Oleico	28,7 (23,5-35,1)	32,2 (25,1-35,6)	0,19
Palmítico	6,7 (5,7)	7,7 (3,8)	0,43
Esteárico	3,4 (0-6,5)	4,8 (0,8-7,0)	0,25
Grupo Placebo (n=27)			
	T=0	T=8	p
*Araquidônico + Palmitoleico	20,1 (15,2-27,2)	17,4 (14,1-19,3)	0,10
Docosahexaenoico	7,1 (4,4-9,4)	5,6 (4,6-8,0)	0,30
Eicosapentaenoico	2,1 (0-7,9)	2,6 (0-5,3)	0,55
Linoleico	30,8 (19,3-38,4)	27,0 (19,3-29,1)	0,14
Linolênico	1,2 (0,8-1,8)	2,2 (1,2-3,1)	0,12
Oleico	28,4 (22,4-32,8)	29,9 (22,5-34,4)	0,22
Palmítico	6,8 (5,6)	8,6 (5,7)	0,11
Esteárico	2,9 (0-4,8)	4,3 (2,6-8,2)	0,56

Resultados apresentados em média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil. Diferenças intragrupos analisadas pelos testes *t-Student* (pareado) ou *Wilcoxon*. Significância estatística $p < 0,05$. *Araquidônico + palmitoleico: quantificados simultaneamente, ambos com o mesmo pico de retenção.

As diferenças entre a magnitude do efeito da intervenção no Grupo Ômega-3 e no Grupo Placebo, em relação ao percentual de ácidos graxos plasmáticos são ilustradas no **Gráfico 2**. O percentual de DHA no plasma aumentou de maneira significativa no Grupo Ômega-3 quando comparado ao Grupo Placebo.

Gráfico 2. Magnitude do efeito da intervenção ($\Delta=T8-T0$) em relação ao percentual de ácidos graxos plasmáticos na amostra, segundo tipo de intervenção. Resultados apresentados em média ou #mediana. Diferenças entre o Grupo Ômega-3 (n=36) e o Grupo Placebo (n=27) analisadas pelos testes *t-Student* ou *Mann Whitney*. *Significância estatística $p<0,05$. AA+PAL: araquidônico + palmitoleico (quantificados simultaneamente, ambos com o mesmo pico de retenção); DHA: docosapentaenoico; EPA: eicosapentaenoico; ALIN: linoleico; ALA: linolênico; AOL: oleico; APAL: palmítico; AEST: esteárico.

4.3. Caracterização clínica da amostra

Na **Tabela 3** são apresentas as frequências de ocorrência de doenças crônicas, relatadas pelos participantes do estudo.

No Grupo Ômega-3 e no Grupo Placebo, mais de 90% dos participantes relataram apresentar algum tipo de doença crônica na época do estudo. A frequência de doenças entre os grupos não apresentou diferenças significativas, segundo resultados apurados a partir do relato dos participantes.

As doenças mais relatadas foram HAS e DLP. No Grupo Ômega-3, 58,3% dos participantes relataram apresentar HAS e 52,8% relataram apresentar DLP. No Grupo Placebo o relato de ambas foi de 63%. Foram relatados ainda, 1 caso de hepatopatia no Grupo Placebo e 2 casos de doença auto imune no Grupo Ômega-3, não apresentados na tabela.

Tabela 3. Relato de doenças crônicas na amostra, segundo tipo de intervenção.

	Grupo Ômega-3 (n=36)		Grupo Placebo (n=27)		p
	n	%	n	%	
Doenças					0,9
Sim	33	91,7	25	92,6	
Não	3	8,3	2	7,4	
Tipos de doenças					
DM	7	19,4	6	22,2	0,79
HAS	21	58,3	17	63,0	0,71
DLP	19	52,8	17	63,0	0,42
Hipotireoidismo	3	8,3	5	18,5	0,23

Resultados apresentados em frequência absoluta (n) e percentual (%). Diferenças entre os grupos analisadas pelo teste χ^2 . Significância estatística $p < 0,05$. DM: diabetes mellitus; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DLP: dislipidemia.

A frequência de participantes que relataram o uso de medicamentos não foi diferente entre os grupos, assim como os tipos de medicamentos relatados (**Tabela 4**). Nos dois grupos, mais de 80% da amostra referiu utilizar algum tipo de medicamento. O uso de anti-hipertensivos foi citado por 50% dos participantes do Grupo Ômega-3 e por 63% dos participantes do Grupo Placebo, reforçando o auto relato de hipertensão arterial sistêmica (HAS).

Tabela 4. Frequência de relato de uso de medicamentos na amostra, segundo tipo de intervenção.

	Grupo Ômega-3 (n=36)		Grupo Placebo (n=27)		p
	n	%	N	%	
Uso de medicamentos					0,93
Sim	29	80,6	22	81,5	
Não	7	19,4	5	18,5	
Tipo de medicamentos					
Estatinas	6	16,7	6	22,2	0,58
Fibratos	8	22,2	6	22,2	1,00
Anti-hipertensivos	18	50,0	17	63,0	0,31
Hipoglicemiantes	8	22,2	6	22,2	1,00
Tireoidianos	3	8,3	7	25,9	0,60

Resultados apresentados em frequência absoluta (n) e percentual (%). Diferenças entre os grupos analisadas pelo teste χ^2 . Significância estatística $p < 0,05$.

A ocorrência de antecedentes familiares para doenças crônicas foi elevada nos dois grupos, segundo relato dos participantes. A frequência de relato de doenças crônicas na mãe, pai ou ambos, correspondeu a 88,9%, em ambos os grupos. A doença mais relatada entre os familiares, segundo o relato dos participantes do estudo foi a HAS (**Tabela 5**).

Tabela 5. Frequência de relato de antecedentes familiares para doenças crônicas na amostra, segundo tipo de intervenção.

	Grupo Ômega-3(n=36)		Grupo Placebo (n=27)		P
	n	%	N	%	
Antecedentes de doenças					
Sim	32	88,9	24	88,9	1,0
Não	4	11,1	3	11,1	
Tipos de doenças					
DM	18	50,0	10	37,0	0,31
HAS	24	66,7	15	55,6	0,37
AVC	10	27,8	6	22,2	0,62
Infarto	14	38,9	11	40,7	0,88
Obesidade	12	33,3	5	18,5	0,19

Resultados apresentados em frequência absoluta (n) e percentual (%). Diferenças entre os grupos analisadas pelo teste χ^2 . Significância estatística $p < 0,05$. DM: diabetes mellitus; HAS: hipertensão arterial sistêmica; AVC: acidente vascular cerebral.

4.4. Avaliação antropométrica, composição corporal e pressão arterial

A **Tabela 6** apresenta o perfil antropométrico dos participantes nos dois grupos, com valores médios de peso, IMC, CC, %MG, além dos valores médios de pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial sistólica (PAS), no período basal e após a intervenção. Observou-se que tanto os participantes do Grupo Ômega-3 como os participantes do Grupo Placebo apresentaram excesso de peso ($IMC > 25 \text{ kg/m}^2$). A PAD diminuiu significativamente nos indivíduos do Grupo Ômega-3 após a intervenção, entretanto para todas as outras variáveis as diferenças não foram significativas.

Os grupos não apresentaram diferenças significativas quanto à magnitude do efeito das intervenções em relação ao perfil antropométrico, composição corporal e pressão arterial.

Tabela 6. Perfil antropométrico, composição corporal e pressão arterial da amostra, segundo tempo e tipo de intervenção.

	Grupo Ômega-3 (n=36)			Grupo Placebo (n=27)		
	T=0	T=8	p	T=0	T=8	P
Peso (kg)	84,9 (20,6)	85,0 (20,9)	0,75	74,2 (8,9)	74,0 (9,1)	0,50
IMC (kg/m ²)	32,0 (6,3)	32,1 (6,5)	0,34	29,2 (3,8)	29,1 (3,9)	0,47
CC (cm)	102,0 (13,6)	103,0 (12,9)	0,25	96,0 (9,1)	96,8 (9,2)	0,27
MG (%)	39,2 (11,1)	38,9 (10,4)	0,43	34,9 (12,3)	34,6 (112,5)	0,50
PAD (mm/Hg)	79,2 (9,1)	76,8 (8,5)	0,04	79,2 (9,0)	78,9 (8,4)	0,81
PAS (mm/Hg)	131,6 (18,4)	129,2 (17,8)	0,15	130,6 (17,5)	129,0 (14,5)	0,47

Resultados apresentados em média e desvio padrão. Diferenças intragrupos analisadas pelo teste *t-Student* (pareado). Significância estatística $p < 0,05$. IMC: índice de massa corporal; CC: circunferência da cintura; MG: massa gorda; PAD: pressão arterial diastólica e PAS: pressão arterial sistólica.

4.5. Avaliação da atividade física

Na **Tabela 7** são apresentados os resultados da avaliação da atividade física ocupacional (AFO), exercício físico de lazer (EFL), atividade de lazer e locomoção (ALL) e atividade física total (AF total). Após a intervenção, observou-se diminuição significativa na AFO entre os indivíduos do Grupo Placebo e aumento significativo na ALL.

Não houve diferença significativa entre o Grupo Ômega-3 e o Grupo Placebo em relação à variação na atividade física ao longo da intervenção.

Tabela 7. Atividade física na amostra, segundo tempo e tipo de intervenção.

	Grupo Ômega-3 (n=36)			Grupo Placebo (n=27)		
	T=0	T=8	P	T=0	T=8	P
AFO	2,6 (0,6)	2,4 (0,5)	0,12	2,6 (0,6)	2,4 (0,6)	0,03
EFL	2,4 (0,9)	2,2 (0,9)	0,12	2,5 (0,7)	2,3 (0,7)	0,10
ALL	2,6 (0,7)	2,5 (0,7)	0,73	2,3 (0,6)	2,5 (0,5)	0,03
AF total	7,5 (1,4)	7,2 (1,3)	0,14	7,4 (1,0)	7,2 (1,1)	0,26

Resultados apresentados em média e desvio padrão. Diferenças intragrupos analisadas pelo teste *t-Student* (pareado). Significância estatística $p < 0,05$. AFO: atividade física ocupacional; EFL: exercício físico de lazer; ALL: atividade de lazer e locomoção; AF total: atividade física total.

4.6. Avaliação do consumo alimentar

Os participantes do Grupo Placebo apresentaram diferenças no perfil de consumo ao longo do tempo. O consumo de lipídeos, ácidos graxos saturados, ômega-6 e fibras solúveis diminuiu de maneira significativa, quando comparado ao consumo no momento basal. No Grupo Ômega-3, observou-se diminuição apenas em relação ao consumo de fibras solúveis após a intervenção. O consumo dos demais nutrientes não variou em relação ao tempo em ambos os grupos (**Tabela 8**).

Tabela 8. Perfil do consumo alimentar na amostra, segundo tempo e tipo de intervenção.

Consumo (g)	Grupo ômega-3 (n=36)			Grupo placebo (n=27)		
	T=0	T=8	p	T=0	T=8	P
Proteínas	72,5 (17,9)	76,5 (16,6)	0,27	73,1 (8,4)	68,2 (13,1)	0,10
Carboidratos	214,3 (31,3)	223,2 (31,8)	0,27	217,6 (29,2)	205,3 (31,7)	0,05
Lipídeos	53,8 (11,8)	52,8 (8,0)	0,68	57,3 (14,5)	48,7 (11,5)	0,02
Açúcar	78,5 (21,6)	73,4 (22,9)	0,20	77,1 (23,5)	81,1 (19,5)	0,44
Sódio	2,1 (0,5)	2,1 (0,4)	0,92	2,2 (0,5)	2,1 (0,5)	0,55
Ácidos graxos						
SAT	17,9 (4,5)	16,6 (3,8)	0,20	19,0 (5,0)	15,5 (5,0)	0,003
MUFA	13,3 (4,3)	14,1 (3,3)	0,40	13,4 (3,7)	12,9 (3,6)	0,64
PUFA	5,5 (2,2)	5,8 (1,6)	0,58	6,5 (2,1)	5,6 (1,5)	0,10
Ômega-3	0,6 (0,3)	0,6 (0,2)	0,40	0,6 (0,3)	0,5 (0,1)	0,05
Ômega-6	3,6 (1,7)	3,3 (1,0)	0,33	3,9 (1,2)	2,8 (1,0)	0,003
Fibras						
Totais	15,3 (4,3)	14,5 (4,2)	0,36	15,9 (3,4)	15,6 (4,9)	0,67
Solúveis	1,5 (0,8)	0,8 (0,6)	<0,001	1,5 (3,4)	0,9 (0,7)	<0,001
Insolúveis	4,1 (2,2)	3,8 (1,40)	0,45	4,0 (1,6)	3,9 (1,4)	0,72

Resultados apresentados em média e desvio padrão. Diferenças intragrupos analisadas pelo teste *t-Student* (pareado). Significância estatística $p < 0,05$. SAT: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados.

As diferenças na variação do consumo de macronutrientes, açúcar e sódio ao longo do tempo entre o Grupo Ômega-3 e o Grupo Placebo são apresentadas no **Gráfico 3**.

Observou-se que houve diferença significativa no consumo de carboidratos entre os grupos. Os participantes do Grupo Placebo reduziram o consumo de carboidratos em 12,3g ao longo do tempo quando comparado ao Grupo Ômega-3.

O consumo de ácidos graxos, fibras totais, solúveis e insolúveis manteve-se sem diferenças significativas entre os grupos ao longo do período da intervenção.

Gráfico 3. Variação no consumo de macronutrientes, açúcar e sódio ($\Delta=T8-T0$) na amostra, segundo tipo de intervenção. Resultados apresentados em média. Diferenças entre o Grupo Ômega-3 (n=36) e o Grupo Placebo (n=27) analisadas pelo teste *t-Student*. *Significância estatística $p<0,05$. PTN: proteínas; CHO: carboidratos e LIP: lipídeos.

4.7. Avaliação do perfil bioquímico

O perfil bioquímico dos participantes do Grupo Ômega-3 melhorou após a intervenção. Observou-se diminuição significativa nas concentrações plasmáticas de CT, TAG e não-HDL-C, além de aumento nos níveis de HDL-C. No Grupo Placebo observou-se aumento significativo nas concentrações plasmáticas de HDL-C, APOAI e APOB após o período de intervenção. As outras variáveis bioquímicas não apresentaram diferenças significativas como demonstrado na **Tabela 9**.

Tabela 9. Perfil bioquímico da amostra, segundo tempo e tipo de intervenção.

Grupo ômega-3 (n=36)			
	T=0	T=8	p
CT (mg/dL)	204,0 (44,6)	194,3 (41,9)	0,03
HDL-C (mg/dL)	37,7 (9,6)	40,4 (11,1)	0,03
LDL-C (mg/dL)	138,6 (40,3)	132,4 (38,9)	0,13
TAG (mg/dL)	117,0 (91,8-166,8)	96,0 (71,3-125,8)	<0,001
Não-HDL-C (mg/dL)	166,7 (46,0)	154,1 (40,1)	0,01
Glicemia (mg/dL)	92,5 (86,0-106,5)	94,0 (88,0-103,0)	0,87
APOAI (mg/dL)	130,6 (26,8)	138,1 (42,2)	0,33
APOB (mg/dL)	105,6 (28,4)	108,4 (33,6)	0,55
PON1 (nmol min ⁻¹ . ml ⁻¹)	56,6 (28,9)	57,5 (30,7)	0,53
Grupo placebo (n=27)			
	T=0	T=8	p
CT (mg/dL)	201,9 (41,8)	201,2 (46,5)	0,9
HDL-C (mg/dL)	36,5 (8,2)	42,7 (9,9)	<0,001
LDL-C (mg/dL)	137,4 (35,5)	130,2 (42,0)	0,17
TAG (mg/dL)	117,0 (90,0-208,0)	12,0 (77,0-201,0)	0,46
não-HDL-C (mg/dL)	165,8 (40,0)	157,9 (46,5)	0,18
Glicemia (mg/dL)	100,0 (91,0-118,0)	98,0 (88,0-109,0)	0,9
APOAI (mg/dL)	130,4 (25,3)	139,6 (29,0)	0,01
APOB (mg/dL)	105,2 (22,5)	113,7 (27,4)	0,03
PON1 (nmol min ⁻¹ . ml ⁻¹)	51,2 (30,9)	51,0 (31,9)	0,91

Resultados apresentados em média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil. Diferenças intragrupos analisadas pelos testes *t-Student* (pareado) ou *Wilcoxon*. Significância estatística $p < 0,05$. CT: colesterol total; HDL-C: colesterol associado à lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade; TAG: triacilgliceróis; não-HDL-C: colesterol não associado à lipoproteína de alta densidade; APOAI: apolipoproteína A-I; APOB: apolipoproteína B-100; PON1: paraoxonase-1.

As diferenças na magnitude do efeito da intervenção entre os grupos, em relação ao perfil bioquímico, são apresentadas no **Gráfico 4**. O Grupo Ômega-3 foi mais eficaz na redução do conteúdo de TAG plasmático. Enquanto o Grupo Ômega-3 reduziu em média 31,7 mg/dL de TAG o Grupo Placebo reduziu apenas 4 mg/dL. A APOAI apresentou aumento significativo de 4,5 mg/dL no Grupo Placebo quando comparado ao Grupo Ômega-3 que diminui em 0,9 mg/dL.

O percentual de variação de TAG plasmático foi de -24,9% no Grupo Ômega-3, enquanto que no Grupo Placebo foi de apenas -3,4%. Entretanto observou-se percentual de variação de 4,2% na concentração de APOAI no Grupo Placebo e -0,7% no Grupo Ômega-3.

Gráfico 4. Magnitude do efeito da intervenção ($\Delta=T8-T0$) em relação ao perfil bioquímico da amostra, segundo tipo de intervenção. Resultados apresentados em média ou #mediana. Diferenças entre os grupos analisadas pelos testes *t-Student* ou *Mann Whitney*. *Significância estatística $p<0,05$. CT: colesterol total (md/dL); HDL-C: colesterol associado à lipoproteína de alta densidade (mg/dL); LDL-C: colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); TAG: triacilgliceróis (mg/dL); não-HDL-C: colesterol não associado à lipoproteína de alta densidade (mg/dL); GLI: glicemia; APOAI: apolipoproteína A-I (mg/dL); APOB: apolipoproteína B-100 (mg/dL); PON1: paraoxonase-1 ($\text{nmol min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$).

4.8. Avaliação do tamanho das lipoproteínas

No grupo ômega-3 os participantes apresentaram diferenças no percentual plasmático das subfrações lipoproteicas após a intervenção. O percentual de HDL_{PEQUENA} diminuiu, enquanto que o percentual HDL_{GRANDE} aumentou de maneira significativa. O percentual de LDL_{PEQUENA} e LDL_{GRANDE} não apresentou variações após a intervenção nos dois grupos. Entretanto a concentração de LDL(-) diminuiu após a intervenção com ômega-3. No Grupo Placebo não foram observadas diferenças significativas no percentual plasmático das subfrações lipoproteicas. Os dados são apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Tamanho das lipoproteínas LDL e HDL na amostra, segundo tempo e tipo de intervenção.

Grupo Ômega-3 (n=36)			
	T=0	T=8	p
LDL _{PEQUENA} (%)	1,5 (0,7-3,5)	1,75 (0,8-4,3)	0,36
LDL _{GRANDE} (%)	25,9 (6,7)	27,3 (5,5)	0,06
HDL _{PEQUENA} (%)	20,2 (7,9)	16,9 (6,3)	0,01
HDL _{GRANDE} (%)	29,67 (8,8)	34,7 (9,0)	<0,001
LDL (nm)	27,0 (26,7-27,3)	27,0 (26,7-27,3)	0,66
LDL(-) (U/L)	10,0 (3,9-49,6)	9,5 (2,8-39,5)	0,03
Grupo Placebo (n=27)			
	T=0	T=8	p
LDL _{PEQUENA} (%)	1,9 (0,9-4,5)	1,7 (0,6-4,5)	0,74
LDL _{GRANDE} (%)	27,0 (4,2)	27,3 (4,9)	0,71
HDL _{PEQUENA} (%)	18,1 (7,0)	21,3 (11,0)	0,26
HDL _{GRANDE} (%)	31,5 (7,1)	30,0 (10,5)	0,51
LDL (nm)	27,0 (26,5-27,2)	27,0 (26,7-27,2)	0,53
LDL(-) (U/L)	5,4 (1,3-23,3)	6,2 (1,1-15,5)	0,15

Resultados apresentados em média e desvio ou mediana e intervalo interquartil. Diferenças intragrupos analisadas pelo teste *t-Student* (pareado) ou *Wilcoxon*. Significância estatística $p < 0,05$. LDL (nm): tamanho da LDL; LDL(-): LDL eletronegativa.

As diferenças na magnitude do efeito da intervenção em relação ao tamanho das lipoproteínas entre os dois grupos é ilustrada no **Gráfico 5**. Observou-se diminuição significativa no percentual de HDL_{PEQUENA} no plasma (-3,4%) após a intervenção com ômega-3 quando comparado à intervenção com placebo (3,2%). Em relação ao percentual de HDL_{GRANDE} no plasma, as diferenças também foram significativas, observou-se aumento (5,1%) após a intervenção com ômega-3 e redução após a suplementação com placebo (-1,6%).

O percentual de variação da HDL_{PEQUENA} em relação ao período basal foi de -18,5% no Grupo Ômega-3 e +17,7% no Grupo Placebo, em contrapartida o percentual de variação da HDL_{GRANDE} foi de +22,5% no Grupo Ômega-3 e -1,2% no Grupo Placebo.

Gráfico 5. Magnitude do efeito da intervenção ($\Delta = T8 - T0$) em relação às subfrações lipoproteicas plasmáticas, segundo tipo de intervenção. Resultados apresentados em média ou [#]mediana. Diferenças entre o Grupo Ômega-3 (n=36) e o Grupo Placebo (n=27) analisadas pelos testes *t-Student* ou *Mann Whitney*. *Significância estatística $p < 0,05$. LDL (nm): tamanho da LDL; LDL(-): LDL eletronegativa.

4.9. Medidas Z-scan

As medidas *Z-scan* não apresentaram variações significativas entre o Grupo Ômega-3 e o Grupo Placebo em relação ao tempo ou intervenção (**Gráfico 6**).

Gráfico 6. Medidas *Z-scan*, segundo tempo e tipo de intervenção. Resultados apresentados em média. Diferenças intragrupos em relação ao tempo de intervenção analisadas pelo teste *t-Student* (pareado) e diferenças na magnitude do efeito da intervenção ($\Delta = T0 - T8$) entre o Grupo Ômega-3 (n=36) e o Grupo Placebo (n=27) analisadas pelo teste *t-Student*. Significância estatística $p < 0,05$.

As variáveis CT, HDL-C, LDL-C, TAG, glicemia, não-HDL-C, APOAI, APOB, PON1, HDL_{GRANDE}, HDL_{PEQUENA}, LDL_{PEQUENA}, LDL_{GRANDE}, tamanho da LDL e LDL(-), do período basal, foram submetidas à PCA para padronizar a amostra de acordo suas semelhanças ou diferenças, ou seja, de acordo com um perfil cardioprotetor ou aterogênico. As Componentes Principais (CP), projetadas pela PCA, foram correlacionadas com as medidas *Z-scan*.

A PCA projetou os dados em um espaço com 15 dimensões no plano (15 componentes principais), sendo que de acordo com o critério de KAISER (1969), somente as cinco primeiras CP foram mais significativas para a variância explicada dos dados, pois cada componente apresentou autovalores > 1 , sendo que, combinadas, explicaram 81,93 % da variância total dos dados originais. Os pesos dos coeficientes para as cinco CP mais significativas são apresentados na **Tabela 11**.

A primeira componente principal (CP1) foi a maior contribuinte para a separação da amostra e explicou 29,4% da variância dos dados. Demonstrou um padrão mais aterogênico, onde as variáveis CT, LDL-C, TAG, APOB, não-HDL-C, LDL_{PEQUENA} e LDL(-) apresentaram maior peso e coeficientes positivos, bem como o tamanho da LDL, que também apresentou maior peso, porém coeficiente negativo.

A segunda componente principal (CP2) explicou 15,4% da variância dos dados e padrão aterogênico, com coeficientes negativos para HDL-C e HDL_{GRANDE} e positivos para TAG, LDL_{PEQUENA} e HDL_{PEQUENA}, sendo essas variáveis as que apresentaram maior peso na componente.

A terceira componente principal (CP3), que correspondeu a 13,3% da variância, mostrou um perfil mais cardioprotetor. As variáveis com maior peso foram APOA, HDL-C e PON1 e todas apresentaram coeficientes positivos.

A quarta componente principal (CP4), com 13% de variância, mostrou um perfil cardioprotetor, as variáveis com maior peso e coeficientes negativos foram TAG e LDL_{PEQUENA}, já as variáveis com maior peso, porém com coeficientes positivos foram LDL_{GRANDE} e tamanho da LDL (nm).

A quinta componente principal (CP5), com 10,8% de variância, mostrou perfil mais aterogênico, apesar do coeficiente negativo e peso da variável LDL(-), observou-se que as variáveis glicose e TAG apresentaram maior peso e coeficientes positivos, além da HDL-C com maior peso e coeficiente negativo.

Tabela 11. Análise de Componentes Principais (PCA): padronização da amostra no tempo basal, segundo parâmetros bioquímicos e tamanho das lipoproteínas LDL e HDL.

	Componentes				
	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
CT (mg/dL)	0,949	0,098	0,208	-0,124	0,035
HDL-C (mg/dL)	-0,048	-0,323	0,780	0,003	-0,410
LDL-C (mg/dL)	0,957	0,036	0,065	0,056	-0,074
TAG (mg/dL)	0,341	0,389	-0,034	-0,506	0,544
Glicemia (mg/dL)	0,147	-0,139	0,159	0,052	0,863
não-HDL-C (mg/dL)	0,956	0,164	0,046	-0,123	0,121
APOAI (mg/dL)	0,065	-0,018	0,868	0,003	0,077
APOB (mg/dL)	0,928	0,211	0,012	-0,128	0,013
PON1 (nmol min ⁻¹ . ml ⁻¹)	0,192	0,233	0,598	-0,021	0,128
HDL _{GRANDE} (%)	-0,148	-0,942	0,138	0,003	-0,045
HDL _{PEQUENA} (%)	0,145	0,890	0,171	-0,151	-0,063
LDL _{PEQUENA} (%)	0,480	0,353	-0,197	-0,630	0,184
LDL _{GRANDE} (%)	0,293	0,193	-0,260	0,781	0,106
LDL (nm)	-0,388	-0,232	0,122	0,761	-0,150
LDL(-) (U/L)	0,350	-0,091	0,180	0,178	-0,545
% de variância	29,36	15,44	13,31	13	10,82
% de variância acumulada	29,36	44,8	58,11	71,1	81,93

Variáveis apresentadas em *loading*. Método de extração das componentes principais: Eigenvalues. Critério de Kaiser para medida de adequação da amostra = 0,660. CT: colesterol total; HDL-C: colesterol associado à lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade; TAG: triacilgliceróis; não-HDL-C: colesterol não associado à lipoproteína de alta densidade; APOAI: apolipoproteína A-I; APOB: apolipoproteína B-100; PON1: paraoxonase-1.

As correlações entre as CP que padronizaram a amostra de acordo com o perfil cardiometabólico e as medidas *Z-scan* são apresentadas na **Tabela 12**. As CP3 e CP4, com padrões mais cardioprotetores, apresentaram correlações positivas com as medidas *Z-scan* (CP3; $p=0,02$ e CP4; $p=0,001$). Em contrapartida, a CP4, com padrão mais aterogênico, apresentou correlação negativa com as medidas *Z-scan* (CP5; $p=0,002$). A CP1 e a CP2 não apresentaram correlações significativas.

Tabela 12. Correlação entre as medidas *Z-scan* e as Componentes Principais (CP).

CPs versus medidas <i>Z-scan</i>	r	p
CP1 - padrão aterogênico	0,033	0,799
CP2 - padrão aterogênico	0,019	0,883
CP3 - padrão cardioprotetor	0,295	0,019
CP4 - padrão cardioprotetor	0,413	0,001
CP5 - padrão aterogênico	-0,378	0,002

Resultados apresentados em coeficientes de correlação (r). Correlações de *Spearrman*. Significância estatística $p<0,05$.

5. DISCUSSÃO

As principais causas de morbidade e óbito no Brasil e no mundo são decorrentes das DCV e mais de 80% das mortes ocorrem em países de média e de baixas rendas, tornando-as um grave problema de saúde (TEAM et al., 2012).

O acelerado aumento na prevalência das DCV alerta para a necessidade de estratégias eficazes e de baixo custo como medidas preventivas na redução dos fatores de risco, eventos clínicos e mortes decorrentes de eventos coronarianos, sendo as modificações no estilo de vida as primeiras alternativas a serem adotadas.

Nesse contexto a dieta ocupa lugar de destaque e diversos autores têm pesquisado a relevância de alguns alimentos na modulação do risco cardiovascular.

O consumo de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 é reconhecido por sua associação à proteção cardiovascular (CONNOR, 2000; SIMOPOULOS, 2001; SIMOPOULOS, 2002; HARRIS, 2004; SINGH et al., 2015). Os efeitos benéficos do ômega-3 sobre as DCV estão relacionados principalmente a ação do EPA e DHA, encontrados em alguns peixes, algas ou suplementos (WANG, 2006, BRESLOW, 2006). A *American Heart Association* (KRIS-ETHERTON et al., 2002) recomenda o consumo de peixes, pelo menos duas vezes por semana, para prevenção primária de DCV e o consumo de 1g/dia de EPA+DHA para indivíduos em prevenção secundária.

No presente estudo, a suplementação com ômega-3, rica em EPA e DHA (60%), foi realizada de forma concomitante, fornecendo 1,11g de EPA e 0,69g de DHA por dia. A adesão à intervenção foi maior que 80% em ambos os grupos, comprovada a partir da contagem das cápsulas. Os resultados da análise do percentual de ácidos graxos plasmáticos comprovaram a adesão à intervenção a partir do aumento significativo de DHA no grupo suplementado com ômega-3 quando comparado ao grupo suplementado com placebo que apresentou redução no percentual de DHA plasmático após a intervenção.

A suplementação com EPA e DHA foi equivalente ou maior quando comparada a outros estudos clínicos com desfechos semelhantes (COUET et al., 1997; KREBS et al., 2006; KUNESOVÁ et al., 2006; THORSDOTTIR et al., 2007; KABIR et al., 2007; HILL et al., 2007; EBRAHIMI et al., 2009; DEFINA et al., 2011) e demonstrou efeitos benéficos no perfil lipídico dos participantes após a intervenção, com redução significativa de CT, TAG e não HDL, além do aumento significativo na concentração plasmática de HDL-C. Os resultados corroboram com a maioria dos estudos já realizados.

No estudo de EBRAHIMI et al. (2009) os pesquisadores relataram redução significativa nas concentrações de CT, LDL-C e TG, após 6 meses de suplementação com 180mg de EPA + 120mg de DHA/dia, entretanto, não foram observadas modificações significativas no HDL-C.

DAWCZYNSKI et al., (2013) realizaram um estudo para avaliar o efeito da suplementação com doses diferentes de EPA e DHA durante 10 semanas em indivíduos com hipertrigliceridemia. Os participantes foram alocados em três grupos, o grupo controle, o grupo que foi suplementado com 0,44g EPA+0,31g DHA ao dia e o grupo suplementado com 1,59g EPA+ 1,12g DHA ao dia. Ao final do estudo, os pesquisadores concluíram que ambas as suplementações com EPA+DHA foram eficazes na redução da razão LDL-C/HDL-C e TAG e aumento do conteúdo de HDL-C.

Existem fortes evidências científicas sobre os benefícios da suplementação com EPA e DHA na redução do conteúdo de TAG e aumento modesto no HDL-C, porém estudos clínicos sugerem o aumento indireto na concentração de LDL-C (HARRIS et al., 1997; BALK et al., 2006; HARTWEG et al., 2009).

A partir da hipótese de que a suplementação com ômega-3 aumenta o LDL-C, diversos pesquisadores investigaram os efeitos isolados do EPA e do DHA, na tentativa de explicar como cada um atua nos parâmetros lipoproteicos. Os resultados descritos em diversas revisões sugerem que a suplementação com EPA não contribui com a elevação significativa do conteúdo de LDL-C, enquanto que o DHA é o responsável pela maior elevação das concentrações de HDL-C e que ambos (EPA ou DHA) reduzem significativamente o TAG plasmático (WEI et al., 2011; JACOBSON et al., 2012, SING et al., 2015).

De acordo com a *Europe Food Safety Authority* (EFSA, 2012) o aumento nas concentrações de LDL-C, associado à suplementação com EPA+DHA em quantidades que variam entre 2 a 6g/dia, não pode ser associado a efeitos adversos sobre o risco cardiovascular, pois o aumento de LDL-C é de aproximadamente 3%, porém é acompanhado da redução de TAG, que pode variar de 10 a 30%, segundo diversos resultados de estudos clínicos, sem alterar as concentrações plasmáticas de CT ou não HDL.

No presente estudo não foi possível avaliar a ação independente do EPA e do DHA no perfil lipídico, entretanto não houve modificações significativas no LDL-C, contudo observou-se redução significativa no conteúdo de não-HDL-C após a intervenção. Segundo a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, a fração não-HDL-C

pode fornecer melhor estimativa da concentração de partículas aterogênicas no plasma (XAVIER, 2013).

O ômega-3 foi significativamente mais eficaz na redução do TAG quando comparado ao placebo neste estudo. A suplementação com ômega-3 foi capaz de reduzir em 24,9% as concentrações de TAG, enquanto a redução após a suplementação com placebo foi de apenas 3,4%. Os resultados são consistentes com a literatura científica.

O ômega-3, com elevada concentração de EPA e DHA reduz os TAG pós-prandiais ou em jejum (15% a 30%) de modo dependente à duração da suplementação ou gravidade da hipertrigliceridemia. Um estudo recente comparou os efeitos da suplementação com 0,85g/dia ou 3,4g/d de EPA+DHA no perfil lipídico de indivíduos com hipertrigliceridemia moderada. As concentrações de TAG diminuíram significativamente com a dose mais alta (27%) e apenas 10% com a dose menor, embora, sem significância estatística (SKULAS-RAY et al., 2011).

Alguns estudos sugerem que são necessárias doses diárias maiores que 3g/dia da combinação de EPA+DHA para a redução de TAG (MCKENNEY e SICA, 2007; SKULAS-RAY et al., 2008; DAVIDSON, 2006). Entretanto, KABIR et al. (2007) observaram redução de 12% dos TAG em mulheres diabéticas com suplementação de 1,08g EPA + 0,72g DHA/dia durante 8 semanas. SIMÃO et al. (2010) descreveram redução significativa no TAG após suplementar indivíduos adultos com síndrome metabólica por 90 dias com cápsulas de óleo de peixe contendo 1,80g de EPA e 1,20g de DHA. No presente estudo, a suplementação com 1,8g/dia de EPA+DHA foi suficiente para promover redução significativa de TAG quando comparado ao grupo Placebo.

Baseada em evidências científicas e em diversas diretrizes internacionais (KRIS-ETHERTON et al., 2002, 2002; ISSA, 2004; EFSA, 2012; GRUNDY et al., 2005), a I Diretriz sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular (SANTOS et al., 2013), com ênfase no efeito positivo do EPA e DHA na redução de TAG, recomenda a suplementação de 2-4 g/dia para indivíduos com hipertrigliceridemia grave (>500 mg/dL) refratária a medidas não farmacológicas.

Segundo diversos autores, a redução na síntese de VLDL é atividade mais importante exercida pelo ômega-3 no metabolismo do TAG em humanos (NESTEL et al., 1984; SANDERS et al., 1985; HARRIS et al., 1990; FISHER et al., 1998; BORDIN et al., 1998; CHAN et al., 2002).

Os potenciais mecanismos moleculares que o ômega-3 exerce no metabolismo lipídico e na adipogênese são relacionados à sua capacidade de modular a expressão de fatores de transcrição, incluindo os PPARs e os SREBP (*sterol regulatory element-binding proteins*) (HANNAH et al., 2001; HARRIS et al., 2008).

O EPA e DHA são ligantes dos PPARs e a interação entre eles promove aumento da síntese da lipase lipoproteica (JUMP, 2008) e aumento da β -oxidação, diminuindo o transporte para o fígado e reduzindo a produção de partículas ricas em TAG (HARRIS e BULCHANDANI, 2006).

A suplementação com 4g/dia de EPA ou DHA por 4 semanas em indivíduos saudáveis foi igualmente eficaz na redução do TAG pós prandial. A meia vida do TAG no plasma foi reduzida e a atividade da lipase lipoproteica aumentou significativamente. Os pesquisadores concluíram que possivelmente o EPA e o DHA aceleram o *clearance* dos quilomícrons plasmáticos por estimular a atividade da lipase lipoproteica (PARK et al., 2003).

Os SREBP são fatores de transcrição ligados às membranas celulares que regulam a síntese de ácidos graxos e colesterol. O efeito mais conhecido do ômega-3 nos SREBP é a inibição da expressão de SREBP-1a e SREBP-1c (HARRIS e BULCHANDANI, 2006).

O ômega-3 diminui a atividade do SREBP-1 nos hepatócitos, que controla a expressão de genes e enzimas responsáveis pela síntese de ácidos graxos e TAG, porém existem evidências que os ácidos graxos ômega-3 podem atuar aumentando a expressão do SREBP-2, que modula as enzimas envolvidas na síntese de colesterol (XU et al., 2001; LE JOSSIC-CORCOS et al., 2005; HARRIS e BULCHANDANI, 2006; ARAI et al., 2009). Em modelos animais e *in vitro*, tanto EPA quanto o DHA diminuíram a atividade do SREBP-1, com consequente diminuição da expressão de enzimas lipogênicas (CAPUTO et al., 2011; HOWELL et al. 2009; KAJIKAWA et al., 2009).

A melhora no perfil lipídico observada após a suplementação com ômega-3, com destaque para a redução significativas dos TAG foi um resultado importante neste estudo, embora não tenha sido inédito.

Apesar do consenso sobre a relevância das alterações nas concentrações de lipídeos plasmáticos sobre o risco cardiovascular e da recomendação do monitoramento desses parâmetros pelas diretrizes nacionais e internacionais (XAVIER, 2013, STONE et al., 2014), as diferentes atividades biológicas das subfrações lipoproteicas parecem também modular o risco cardiovascular e a caracterização das propriedades físico-químicas dessas partículas,

possivelmente, podem ser utilizadas como marcadores cardiometabólicos emergentes, coadjuvantes na estimativa do risco.

No presente estudo a suplementação com ômega-3 não modificou o perfil das subfrações de LDL, porém promoveu aumento (22,5%) no percentual de HDL_{GRANDE} e redução no percentual de HDL_{PEQUENA} (-18,5%), quando comparado ao placebo que reduziu o percentual de HDL_{GRANDE} (-1,2%) e aumentou o percentual de HDL_{PEQUENA} (17,7%).

Nas últimas décadas, grande atenção tem sido dada ao papel cardioprotetor da HDL, com ênfase na heterogeneidade da ação de suas subfrações, e apesar da literatura científica apresentar resultados controversos, a maioria dos estudos associam menores concentrações de HDL_{GRANDE} a eventos cardiovasculares, dislipidemias, obesidade, síndrome metabólica e diabetes (DREXEL et al., 1992; YANG et al., 2005; XIAN et al., 2009; LAGOS et al., 2009; TIAN et al., 2006; TIAN et al., 2011).

A HDL_{GRANDE} é composta por maior concentração de éster de colesterol, possui maior afinidade com os receptores ABCG1 de tecidos periféricos, além de facilitar a transferência de éster de colesterol hepático, via SR-BI (ASZTALOS et al., 2005). Sendo assim, existem evidências de que essas subfrações da HDL são mais eficazes no transporte reverso do colesterol (SVIRIDOV e NESTEL, 2002; RADER, 2002; MEYERS e KASHYAP, 2004).

O ômega-3 é descrito em diversos estudos pela capacidade de modificar o perfil aterogênico das subfrações lipoproteicas (CALABRESI, 2004; MOSTAD et al., 2008; AGOURIDIS et al. 2012).

No estudo de CALABRESI et al., (2004) após a suplementação por 8 semanas com EPA (1,88g/dia) + DHA (1,48g/dia) observou-se aumento de 40% na concentração plasmática HDL_{GRANDE} e diminuição de 4% na concentração HDL_{PEQUENA} em pacientes com hiperlipidemia familiar combinada.

MOSTAD et al., (2008) avaliaram homens e mulheres com diabetes tipo II após a suplementação com 1,8g EPA+3,0g DHA por 9 semanas e observaram redução significativa na concentração de HDL_{PEQUENA}.

Posteriormente, no estudo de AGOURIDIS et al. (2012), os pesquisadores avaliaram o impacto de tratamentos com estatina, estatina combinada com fibrato ou ômega-3 em marcadores cardiometabólicos e tamanho das lipoproteínas em indivíduos com síndrome metabólica por 12 semanas. Os resultados demonstraram que a suplementação com 465mg de EPA + 375 mg de DHA foi tão eficaz em aumentar a concentração de HDL_{GRANDE} quanto a suplementação com estatina.

Além dos estudos que avaliam os efeitos da suplementação de ômega-3, em um estudo publicado recentemente por ANNUZZI et al., (2012), os pesquisadores avaliaram a dieta de esquimós nativos do Alasca e a associação com marcadores de risco cardiovascular e tamanho das lipoproteínas. Os indivíduos com maior consumo de ômega-3 apresentaram concentrações maiores de HDL_{GRANDE}.

SALA-VILA et al., (2013) também avaliaram o perfil das lipoproteínas em indivíduos com hipercolesterolemia familiar tratados em Hospitais do Norte da Espanha, onde o consumo de peixe é alto, a partir da avaliação da dieta e das concentrações plasmáticas de EPA e DHA, utilizadas como biomarcadores da ingestão de peixe. O consumo médio de alimentos de origem marinha foi de 76g/dia, que se traduz em um consumo médio de 1,01 g/dia de EPA+DHA, com média de cinco porções de frutos do mar por semana. Ao final do estudo, os pesquisadores concluíram que o aumento do conteúdo de EPA foi associado ao perfil menos aterogênico em relação ao tamanho das lipoproteínas, com redução LDL_{PEQUENA}, além do aumento de HDL_{GRANDE}.

A ação independente do EPA e DHA no tamanho das lipoproteínas é apresentada em diversos estudos e seguem sendo alvo de pesquisas.

No estudo de NEFF et al., (2011) foi observado o efeito da suplementação com DHA 2g/dia no perfil lipídico e tamanho das lipoproteínas de indivíduos com sobrepeso por um período de 21 dias. A suplementação com DHA aumentou as concentrações de LDL_{GRANDE} e HDL_{GRANDE} e diminuiu as concentrações de LDL_{PEQUENA}, quando comparado ao placebo.

Diversos estudos clínicos que investigaram os efeitos da suplementação de DHA no tamanho das lipoproteínas relataram aumento no tamanho da LDL e HDL, além de diminuição no tamanho da VLDL (WOODMAN et al., 2003; THEOBALD et al., 2004; ENGLER et al., 2005; KELLEY et al., 2007).

A ação do EPA parece estar relacionada à diminuição da concentração de partículas pequenas das lipoproteínas, que são descritas, na maioria dos estudos, por seu maior potencial aterogênico.

No estudo Marine (BAYS, 2012), foi avaliada a ação do IPE (suplemento contendo apenas EPA, altamente purificado) em doses de 2g/dia ou 4g/dia no perfil lipídico e tamanho das lipoproteínas de 5229 participantes por 12 semanas. Ao final do estudo, observou-se redução de LDL_{PEQUENA} no grupo que recebeu 4g/dia de IPE, porém não houve mudanças no tamanho das partículas de HDL.

SATOH et al., (2007) observaram redução de 27,1% na concentração de LDL_{PEQUENA} em indivíduos diabéticos suplementados com 1,8g/dia de EPA por 3 meses e MORI et al., (2000) relataram redução na concentração de HDL_{PEQUENA} após suplementar indivíduos com sobrepeso com 4g/dia de EPA por 6 semanas.

A ação do EPA e DHA no tamanho da HDL parece estar associada principalmente à redução no conteúdo de TAG. A menor interação da HDL com as partículas ricas em TAG preserva o tamanho da HDL, pois a torna menos suscetível a hidrólise e a catalisação da fusão de HDL_{GRANDE} em HDL_{PEQUENA}, além de diminuir a produção de LDL_{PEQUENA} (BARTER, 2000; CHEUNG et al., 2002, RYE e BARTER, 2004; JI et al., 2014).

Entretanto, alguns pesquisadores propõem que a regulação do metabolismo do colesterol é outra atividade importante promovida pelo EPA e o DHA que também parece contribuir com a melhora do perfil aterogênico das lipoproteínas. Embora a ação do ômega-3 na regulação da concentração de colesterol ainda apresente resultados inconscientes, é provável que o EPA e o DHA atuem inibindo a enzima HMG-CoA-redutase em hepatócitos, pois induzem o aumento da expressão de SREBP-2, e com isso parecem contribuir com a regulação do colesterol (ARAI et al., 2009; LE JOSSIC-CORCOS et al., 2005).

O mecanismo de ação do EPA e do DHA na regulação do colesterol parece ser o mesmo observado entre estatinas e pode estar relacionado ao aumento de LDL_{GRANDE} e HDL_{GRANDE} (SONE et al. 2002; IKEWAKI et al., 2009). Provavelmente, o EPA e DHA modulam o tamanho das partículas por um mecanismo análogo ao dos inibidores da HMG-CoA-redutase (DAS, 2008), e segundo NORDOY (2002), o uso combinado de ômega-3 e estatinas pode exercer um efeito sinérgico benéfico sobre o metabolismo do colesterol.

Em resumo, tanto o EPA como o DHA reduzem as concentrações de TAG, provavelmente por redução da síntese de VLDL pelos hepatócitos e aumento do *clearance* de TAG, o que reflete diretamente no tamanho das partículas de HDL e LDL, sendo cogitada também a possibilidade da contribuição desses ácidos graxos na regulação da síntese de colesterol e na transferência de lipídeos entre as lipoproteínas.

O aumento da concentração de APOAI no Grupo Placebo, quando comparado ao Grupo Ômega-3 após a intervenção foi observado no presente estudo. O resultado foi inesperado e, provavelmente, não pode ser atribuído à intervenção, visto que o óleo mineral, na quantidade suplementada, não exerce qualquer atividade no metabolismo das lipoproteínas. Entretanto, os indivíduos do Grupo Placebo diminuíram significativamente o consumo de

carboidratos quando comparado ao Grupo Ômega-3. Observou-se também diminuição do consumo de lipídeos totais e ácidos graxos saturados durante o período da intervenção.

Assim como o EPA e o DHA atuam no metabolismo do TAG, o conteúdo de TAG plasmático também pode ser influenciado pelo consumo de nutrientes, e dietas ricas em carboidratos ou lipídeos podem aumentar a trigliceridemia. O aumento do consumo de carboidratos diminui o *clearance* das partículas ricas em TAG do plasma, enquanto o aumento no consumo de lipídeos estimula a síntese de TAG pela consequente produção e liberação de VLDL pelo fígado. Esses mecanismos são classicamente conhecidos por contribuem com o aumento no *turnover* de lipídeos entre as lipoproteínas, favorecendo a redução no conteúdo de HDL-C (REAVEN et al., 1967; NESTEL et al., 1970; AUSTIN, 1998).

Vale ressaltar que todos os participantes foram orientados, ao início do estudo, a manter inalterado o estilo de vida e hábito alimentar, pois alterações no período da intervenção poderiam refletir nos resultados finais e gerar confusão na interpretação dos dados.

Diante dos resultados positivos encontrados, é possível afirmar que os efeitos cardioprotetores do ômega-3 são parcialmente atribuídos à redução de TAG e a melhora no perfil aterogênico das subfrações das lipoproteínas.

Apesar dos aspectos descritos acima sobre os benefícios do ômega-3 no risco cardiometabólico, esse ácido graxo, suplementado nas condições testadas neste ensaio clínico, não promoveu alterações nas medidas *Z-scan*. Entretanto, as análises dos componentes principais mostrou que a técnica *Z-scan* foi capaz de identificar perfis aterogênicos e cardioprotetores padronizados a partir das variáveis cardiometabólicas clássicas e emergentes monitoradas no presente estudo quando as variáveis foram submetidas à PCA.

De acordo com BLALOCK (1984), o maior desafio enfrentado pelos pesquisadores é operacionalizar conceitos abstratos em variáveis empiricamente observáveis. Diante desta observação, e considerando que a amostra do presente estudo foi selecionada a partir de pelo menos um fator de risco para doença cardiovascular, decidiu-se padronizá-la a partir de suas diferenças e semelhanças, ou seja, a partir de um perfil mais aterogênico ou um perfil mais cardioprotetor, por um processo alternativo de mensuração que é capaz de identificar variáveis que apresentam a mesma estrutura subjacente. Em termos técnicos, isso é possível pela análise fatorial. A principal função das diferentes técnicas de análise fatorial é reduzir uma grande quantidade de variáveis observadas a um número reduzido de fatores. Ao resumir

dados, a análise fatorial obtém dimensões latentes que descrevem os dados em um número menor de conceitos do que as variáveis individuais originais, tornando os dados observados mais facilmente interpretáveis (HAIR et al, 2006).

Ao identificar agrupamentos na amostra a partir das componentes geradas pela PCA, foi possível detectar tendências nos dados e padronizar a amostra de acordo com o perfil aterogênico dos participantes. No presente estudo observaram-se componentes com padrões mais ou menos aterogênicos, de acordo com o peso e a variância que cada variável expressou.

As componentes com características cardioprotetoras se correlacionaram de maneira positiva com as medidas *Z-scan* e a componente com características mais aterogênicas se correlacionou de maneira negativa.

A técnica *Z-scan* já demonstrou sensibilidade em caracterizar partículas de LDL, sendo descrita em outros estudos por sua capacidade em identificar partículas oxidadas de LDL (GÓMEZ et al., 2004; SANTOS et al., 2012).

As medidas *Z-scan* são observadas através da amplitude pico-vale, transmitida pelas amostras. Quanto maior a capacidade da amostra de reter o calor, maior a amplitude pico vale.

SANTOS et al., (2012) realizaram experimentos para determinar a contribuição dos antioxidantes e hidroperóxidos no sinal óptico não linear da LDL pela técnica *Z-scan*. Foi possível observar que o sinal dos antioxidantes isolados apresentou quase a mesma amplitude pico-vale que a amostra de LDL total, indicando que os antioxidantes têm a capacidade de reter o calor e aumentar o sinal da amostra. Esses mesmos autores realizaram experimentos com amostras de LDL nativa e LDLox, onde observou-se que a LDL nativa apresentou sinal óptico não linear, perfil não observado na LDLox. Este estudo permitiu concluir que o sinal óptico não linear da LDL depende principalmente dos antioxidantes das partículas e da produção de hidroperóxidos devido à oxidação.

Em um estudo de MONTEIRO et al (2012), pacientes com periodontite apresentaram maior amplitude pico-vale após o tratamento com antibióticos. No início do estudo os pacientes apresentavam perfil lipídico alterado e maior risco cardiometabólico e após o tratamento de 12 meses os parâmetros melhoraram e a amplitude pico-vale da LDL monitorada pelo *Z-scan* aumentou, mostrando que o aumento do sinal se correlaciona positivamente com a maior proteção cardiovascular.

No presente estudo, a CP3, com padrão cardioprotetor, apresentou correlação positiva com as medidas *Z-scan*, tendo as variáveis HDL-C, APOAI e PON1 coeficientes positivos e maiores pesos. Na CP4, observaram-se coeficientes negativos para TAG e

LDL_{PEQUENA}, além de coeficientes positivos para tamanho da LDL e LDL_{GRANDE}, demonstrando padrão cardioprotetor da componente que também se correlacionou de maneira positiva com as medidas *Z-scan*.

Destaca-se a provável atividade cardioprotetora das variáveis que apresentaram maior peso na CP3 e CP4. A PON1 é uma enzima antioxidante presente na HDL e é responsável pela hidrólise de produtos oxidativos na LDL (BARTER et al., 2004). Além disso, o aumento do conteúdo de colesterol na HDL e APOA1 é um indicativo da eficiência de HDL no transporte reverso de colesterol para o fígado (VON ECKARDSTEIN et al., 2001; BARTER e RYE, 2006), contribuindo para a redução de LDL_{PEQUENA} e aumento de LDL_{GRANDE}, fatores associados a redução do risco cardiovascular (BARTER, 2000).

O coeficiente negativo do HDL-C e coeficiente positivo do TAG e glicose refletem o perfil aterogênico da CP5 que apresentou correlação negativa com as medidas *Z-scan*.

A presença de hipertrigliceridemia contribui para o maior fornecimento de AGNE para o fígado e produção de LDL_{PEQUENA}. Indivíduos com elevadas concentrações plasmáticas de LDL_{PEQUENA} apresentam risco 3 a 7 vezes maior de desenvolver doença arterial coronariana, independente das concentrações de LDL-C no plasma (NIKOLIC *et al.*, 2013).

A LDL_{PEQUENA} migra para o espaço subendotelial com maior facilidade, onde fica mais suscetíveis ao processo de oxidação, devido à ausência de antioxidantes plasmáticos. Uma vez oxidadas, as partículas agem como agentes quimiotáticos para monócitos circulantes, estimulando a diferenciação em macrófagos com consequente formação de células espumosas, o que caracteriza o início da aterosclerose (STEINBERG *et al.*, 1989).

A ação aterogênica das partículas modificadas também foi associada à elevada presença de LDLox na circulação e nas lesões ateroscleróticas de indivíduos com síndrome metabólica e com obesidade (HOLVOET et al., 2008; PORRECA et al., 2004).

No presente estudo a LDL(-) apresentou resultados controversos às evidências científicas quando a amostra foi padronizada a partir do perfil das variáveis pela PCA. A subfração da LDL apresentou peso e coeficiente positivo na CP4 com padrão cardioprotetor e peso e coeficiente negativo na CP5 com padrão aterogênico, porém a partícula é citada em diversos estudos por suas propriedades pró-aterogênica e pró-inflamatória (LOBO et al., 2008; MELLO, 2010; MELLO et al., 2011; BLANCO 2010; BANCELLS et al., 2010).

No estudo de MELLO et al., 2010 a LDL(-) apresentou associação positiva com o conteúdo de LDL-C e negativa com o conteúdo de HDL-C, portanto essa partícula modificada

de LDL tem potenciais características para ser um biomarcador de DCV (LOBO et al., 2008; MELLO et al., 2011).

A subfração de LDL(-) constitui-se em um *pool* de partículas heterogêneas em tamanho e com tendência a agregação, com conteúdo diminuído de fosfolipídios e vitamina E e maior conteúdo de TAG e AGNE quando comparado a LDL nativa o que aumenta a aterogenicidade da partícula (BLANCO et al., 2010). Os AGNE participam da produção de citocinas, fatores de crescimento e ativação de células relacionadas a aterogênese que podem estar envolvidos na atividade pró-inflamatória da LDL(-) (BENÍTEZ et al., 2004; BANCELLS et al., 2010). O acúmulo de AGNE na LDL(-) pode ocorrer devido a hidrólise enzimática de TAG, colesterol esterificado ou fosfolipídeos (BICKERTON et al., 2007), diminuindo a resistência a oxidação e aumentando a carga negativa (BENÍTEZ et al., 2002).

Diferente da LDL oxidada *in vitro*, a LDL(-) não apresenta fragmentação da Apo B e outras alterações decorrentes de uma oxidação excessiva (PARASASSI et al., 2001; HULTHE e FAGERBERG, 2002). Neste estudo, não analisamos o conteúdo de LDLox no plasma, portanto não é possível estabelecer uma relação entre as concentrações das duas subfrações da LDL.

6. CONCLUSÕES

A suplementação com ômega-3 promoveu melhora no perfil lipídico dos participantes, com redução do conteúdo de CT e não-HDL-C e aumento no conteúdo de HDL-C, sem alterações significativas no LDL-C, além da maior eficácia na redução do conteúdo de TAG, quando comparado ao placebo. Os ácidos graxos EPA e DHA demonstraram atuar de maneira positiva no perfil das subfrações lipoproteicas, aumentando o percentual de HDL_{GRANDE} e diminuindo o percentual de HDL_{PEQUENA}. Portanto, o presente estudo agrega evidências que a suplementação de ômega-3 contribui com a proteção cardiovascular e pode estar associada à diminuição do risco de eventos coronarianos, fortalecendo a hipótese de que estratégias práticas e de baixo custo, como a modificação do padrão alimentar podem ser eficazes na prevenção de doenças cardiovasculares.

A suplementação com ômega-3 não alterou as características da LDL quando analisada pela técnica *Z-scan*, no entanto, o arranjo experimental demonstrou ser uma ferramenta capaz de associar-se a padrões aterogênicos e antiaterogênicos monitorados no presente estudo. A técnica *Z-scan* demonstrou sensibilidade em identificar partículas de LDL em fase inicial de oxidação, o que pode ser um achado interessante, visto que o diagnóstico precoce de fatores aterogênicos pode ser útil no planejamento de estratégias terapêuticas individuais. Portanto, medidas adicionais que avaliam propriedades funcionais de lipoproteínas devem ser avaliadas em futuros estudos sobre saúde cardiovascular.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKMAN, R. G.; EATON, C. A.; DYERBERG, J. Marine docosenoic acid isomer distribution in the plasma of Greenland Eskimos. **Am J Clin Nutr**, v. 33, n. 8, p. 1814-7, Aug 1980.

ADORNI, M. P. et al. The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. **J Lipid Res**, v. 48, n. 11, p. 2453-62, Nov 2007.

AGOURIDIS, A. P. et al. Effect of rosuvastatin monotherapy or in combination with fenofibrate or ω -3 fatty acids on lipoprotein subfraction profile in patients with mixed dyslipidaemia and metabolic syndrome. **Int J Clin Pract**, v. 66, n. 9, p. 843-53, Sep 2012.

ALVES, S.; CUPPO, F.; FIGUEIREDO NETO, A. Determination of the nonlinear refractive index of lyotropic mixtures with and without ferrofluid doping: a time-resolved Z-scan experiment in millisecond time scales. **JOSA B**, v. 23, n. 1, p. 67-74, 2006.

ANNUZZI, G. et al. Lipoprotein subfractions and dietary intake of n-3 fatty acid: the Genetics of Coronary Artery Disease in Alaska Natives study. **Am J Clin Nutr**, v. 95, n. 6, p. 1315-22, Jun 2012.

ARAI, T. et al. Interaction of fenofibrate and fish oil in relation to lipid metabolism in mice. **J Atheroscler Thromb**, v. 16, n. 3, p. 283-91, Jun 2009.

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 Suppl, p. S11-20, Jul 1996.

ASZTALOS, B. F. et al. Differential effects of HDL subpopulations on cellular ABCA1- and SR-BI-mediated cholesterol efflux. **J Lipid Res**, v. 46, n. 10, p. 2246-53, Oct 2005.

AUSTIN, M. A.; HOKANSON, J. E.; EDWARDS, K. L. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. **Am J Cardiol**, v. 81, n. 4A, p. 7B-12B, Feb 1998.

AVOGARO, P.; BON, G. B.; CAZZOLATO, G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. **Arteriosclerosis**, v. 8, n. 1, p. 79-87, 1988 Jan-Feb 1988.

BAECKE, J. A.; BUREMA, J.; FRIJTERS, J. E. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. **Am J Clin Nutr**, v. 36, n. 5, p. 936-42, Nov 1982.

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, Nov 2006.

BANCELLS, C. et al. Aggregated electronegative low density lipoprotein in human plasma shows a high tendency toward phospholipolysis and particle fusion. **J Biol Chem**, v. 285, n. 42, p. 32425-35, Oct 2010.

BANCELLS, C. et al. High binding affinity of electronegative LDL to human aortic proteoglycans depends on its aggregation level. **J Lipid Res**, v. 50, n. 3, p. 446-55, Mar 2009.

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 Jul-Aug 1972.

BANG, H. O.; DYERBERG, J.; NIELSEN, J. A. [Lipoprotein pattern in patients with coronary occlusion]. **Nord Med**, v. 84, n. 31, p. 998, Jul 1970.

BANG, H. O.; DYERBERG, J.; SINCLAIR, H. M. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. **Am J Clin Nutr**, v. 33, n. 12, p. 2657-61, Dec 1980.

BARTER, P. et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. **N Engl J Med**, v. 357, n. 13, p. 1301-10, Sep 2007.

BARTER, P. CETP and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, n. 9, p. 2029-31, Sep 2000.

BARTER, P. J. et al. Antiinflammatory properties of HDL. **Circ Res**, v. 95, n. 8, p. 764-72, Oct 2004.

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. 493-8, Nov 2007.

BARTER, P. J.; RYE, K. A. The rationale for using apoA-I as a clinical marker of cardiovascular risk. **J Intern Med**, v. 259, n. 5, p. 447-54, May 2006.

BAYS, H. E. et al. Icosapent ethyl, a pure EPA omega-3 fatty acid: effects on lipoprotein particle concentration and size in patients with very high triglyceride levels (the MARINE study). **J Clin Lipidol**, v. 6, n. 6, p. 565-72, 2012 Nov-Dec 2012.

BENÍTEZ, S. et al. Impaired binding affinity of electronegative low-density lipoprotein (LDL) to the LDL receptor is related to nonesterified fatty acids and lysophosphatidylcholine content. **Biochemistry**, v. 43, n. 50, p. 15863-72, Dec 2004.

BENÍTEZ, S. et al. Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. **Atherosclerosis**, v. 160, n. 1, p. 223-32, Jan 2002.

BERLINER, J. A. et al. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. **J Clin Invest**, v. 85, n. 4, p. 1260-6, Apr 1990.

BICKERTON, A. S. et al. Preferential uptake of dietary Fatty acids in adipose tissue and muscle in the postprandial period. **Diabetes**, v. 56, n. 1, p. 168-76, Jan 2007.

BISGAIER, C. L. et al. Distribution of apolipoprotein A-IV in human plasma. **J Lipid Res**, v. 26, n. 1, p. 11-25, Jan 1985.

BLALOCK. **Basic Dilemmas in the Social Sciences**. Beverly Hills, CA: Sage, 1984.

BLANCO, F. J. et al. 2D-NMR reveals different populations of exposed lysine residues in the apoB-100 protein of electronegative and electropositive fractions of LDL particles. **J Lipid Res**, v. 51, n. 6, p. 1560-5, Jun 2010.

BLANKENBERG, S.; BARBAUX, S.; TIRET, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 170, n. 2, p. 191-203, Oct 2003.

BORDIN, P. et al. Effects of fish oil supplementation on apolipoprotein B100 production and lipoprotein metabolism in normolipidaemic males. **Eur J Clin Nutr**, v. 52, n. 2, p. 104-9, Feb 1998.

BOYD, R. W. **Nonlinear Optics**. 3 ed. Boston: Academic Press Inc, 1992.

BRESLOW, J. L. n-3 fatty acids and cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 6 Suppl, p. 1477S-1482S, Jun 2006.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. **J Clin Invest**, v. 72, n. 3, p. 743-7, Sep 1983.

BROWNING, L. M. ET AL. The impact of long chain n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on inflammation, insulin sensitivity and CVD risk in a group of overweight women with an inflammatory phenotype. **Diabetes Obes Metab**, v. 9, n. 1, p. 70-80, Jan 2007.

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. 153-8, Feb 2004.

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, Oct 2011.

CAPUTO, M. et al. Selective regulation of UGT1A1 and SREBP-1c mRNA expression by docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids. **J Cell Physiol**, v. 226, n. 1, p. 187-93, Jan 2011.

CARMENA, R.; DURIEZ, P.; FRUCHART, J. C. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. **Circulation**, v. 109, n. 23 Suppl 1, p. III2-7, Jun 2004.

CARR, M. C.; BRUNZELL, J. D. Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 6, p. 2601-7, Jun 2004.

CHAIT, A. et al. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. **Am J Med**, v. 94, n. 4, p. 350-6, Apr 1993.

CHAN, D. C. et al. Regulatory effects of HMG CoA reductase inhibitor and fish oils on apolipoprotein B-100 kinetics in insulin-resistant obese male subjects with dyslipidemia. **Diabetes**, v. 51, n. 8, p. 2377-86, Aug 2002.

CHAN, E. J.; CHO, L. What can we expect from omega-3 fatty acids? **Cleve Clin J Med**, v. 76, n. 4, p. 245-51, Apr 2009.

CHEUNG, M. C. et al. Association of plasma phospholipid transfer protein activity with IDL and buoyant LDL: impact of gender and adiposity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1587, n. 1, p. 53-9, May 2002.

CONNOR, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 1 Suppl, p. 171S-5S, Jan 2000.

COUET, C. et al. Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 21, n. 8, p. 637-43, Aug 1997.

COX, K. et al. The Food Processor Software. Version 10.11.0. ESHA Research, Salem, Oregon; 2012.

CZIRAKY, M. J.; WATSON, K. E.; TALBERT, R. L. Targeting low HDL-cholesterol to decrease residual cardiovascular risk in the managed care setting. **J Manag Care Pharm**, v. 14, n. 8 Suppl, p. S3-28; quiz S30-1, Oct 2008.

DAS, U. N. Essential fatty acids and their metabolites could function as endogenous HMG-CoA reductase and ACE enzyme inhibitors, anti-arrhythmic, anti-hypertensive, anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, cytoprotective, and cardioprotective molecules. **Lipids Health Dis**, v. 7, p. 37, 2008.

DAVIDSON, M. H. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. **Am J Cardiol**, v. 98, n. 4, p. 27-33, Aug 2006.

DAWCZYNSKI, C. et al. Randomized placebo-controlled intervention with n-3 LC-PUFA-supplemented yoghurt: effects on circulating eicosanoids and cardiovascular risk factors. **Clin Nutr**, v. 32, n. 5, p. 686-96, Oct 2013.

DEEG, M. A. et al. Primary care physician treatment of low HDL: Rational approach or Pandora's Box? **J Clin Lipidol**, v. 1, n. 3, p. 198-202, Jul 2007.

DEFINA, L. F. et al. Effects of omega-3 supplementation in combination with diet and exercise on weight loss and body composition. **Am J Clin Nutr**, v. 93, n. 2, p. 455-62, Feb 2011.

DESPRÉS, J. P. Bringing JUPITER down to earth. **Lancet**, v. 373, n. 9670, p. 1147-8, Apr 2009.

DIN, J. N. et al. Effect of ω -3 fatty acid supplementation on endothelial function, endogenous fibrinolysis and platelet activation in patients with a previous myocardial infarction: a randomised controlled trial. **BMJ Open**, v. 3, n. 9, p. e003054, 2013.

DIN, J. N.; NEWBY, D. E.; FLAPAN, A. D. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease fishing for a natural treatment. **BMJ**, v. 328, n. 7430, p. 30-5, Jan 2004.

DREXEL, H. et al. Relation of the level of high-density lipoprotein subfractions to the presence and extent of coronary artery disease. **Am J Cardiol**, v. 70, n. 4, p. 436-40, Aug 1992.

DYERBERG, J. et al. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? **Lancet**, v. 2, n. 8081, p. 117-9, Jul 1978.

DYERBERG, J.; BANG, H. O. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. **Lancet**, v. 2, n. 8140, p. 433-5, Sep 1979.

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, Sep 1975.

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, Jun 2009.

European Food Safety Authority (EFSA). Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion related to the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA). **EFSA Journal**, v. 10, n.7, p. 2815, 2012. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

ENGLER, M. M. et al. Effect of docosahexaenoic acid on lipoprotein subclasses in hyperlipidemic children (the EARLY study). **Am J Cardiol**, v. 95, n. 7, p. 869-71, Apr 2005.

ESTRUCH, M. et al. Electronegative LDL: a circulating modified LDL with a role in inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 181324, 2013.

EVERSON, W. V.; SMART, E. J. Influence of caveolin, cholesterol, and lipoproteins on nitric oxide synthase: implications for vascular disease. **Trends Cardiovasc Med**, v. 11, n. 6, p. 246-50, Aug 2001.

FAULIN, T. O. E. et al. Development of immunoassays for anti-electronegative LDL autoantibodies and immune complexes. **Clin Chim Acta**, v. 413, n. 1-2, p. 291-7, Jan 2012.

FAVARI, E. et al. Small discoidal pre-beta1 HDL particles are efficient acceptors of cell cholesterol via ABCA1 and ABCG1. **Biochemistry**, v. 48, n. 46, p. 11067-74, Nov 2009.

FISHER, W. R.; ZECH, L. A.; STACPOOLE, P. W. Apolipoprotein B metabolism in hypertriglyceridemic diabetic patients administered either a fish oil- or vegetable oil-enriched diet. **J Lipid Res**, v. 39, n. 2, p. 388-401, Feb 1998.

FLORINDO, A. A.; LATORRE, M. R. D. Validation and reliability of the Baecke questionnaire for the evaluation of habitual physical activity in adult men. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 9, n. 3, p. 129-135, 2003.

FOGELMAN, A. M. et al. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 77, n. 4, p. 2214-8, Apr 1980.

FREDENRICH, A.; BAYER, P. Reverse cholesterol transport, high density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. **Diabetes Metab**, v. 29, n. 3, p. 201-5, Jun 2003.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, n. 6, p. 499-502, Jun 1972.

GLOMSET, J. A. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. **J Lipid Res**, v. 9, n. 2, p. 155-67, Mar 1968.

GÓMEZ S.L., et al. Z-scan measurement of the nonlinear refractive indices of micellar lyotropic liquid crystals with and without the ferrofluid doping. **Rev Phys**, n.59, p. 3059-3063, 1999.

GÓMEZ, S. L. et al. Characterization of native and oxidized human low-density lipoproteins by the Z-scan technique. **Chem Phys Lipids**, v. 132, n. 2, p. 185-95, Dec 2004.

GORDON, D. J. et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. **Circulation**, v. 79, n. 1, p. 8-15, Jan 1989.

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

GRUNDT, H.; NILSEN, D. W. n-3 fatty acids and cardiovascular disease. **Haematologica**, v. 93, n. 6, p. 807-12, Jun 2008.

GRUNDY, S. M. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive summary. **Cardiol Rev**, v. 13, n. 6, p. 322-7, 2005 Nov-Dec 2005.

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

HAIR, J. et al. **Multivariate Data Analysis**. 6. ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 2006.

HANNAH, V. C. et al. Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 6, p. 4365-72, Feb 2001.

HANSSON, G. K. et al. Immune mechanisms in atherosclerosis. **Arteriosclerosis**, v. 9, n. 5, p. 567-78, 1989 Sep-Oct 1989.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med**, v. 352, n. 16, p. 1685-95, Apr 2005.

HANSSON, G. K.; ROBERTSON, A. K.; SÖDERBERG-NAUCLÉR, C. Inflammation and atherosclerosis. **Annu Rev Pathol**, v. 1, p. 297-329, 2006.

HARRIS, W. S. et al. Effects of fish oil on VLDL triglyceride kinetics in humans. **J Lipid Res**, v. 31, n. 9, p. 1549-58, Sep 1990.

HARRIS, W. S. et al. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. **Atherosclerosis**, v. 197, n. 1, p. 12-24, Mar 2008.

HARRIS, W. S. et al. Safety and efficacy of Omacor in severe hypertriglyceridemia. **J Cardiovasc Risk**, v. 4, n. 5-6, p. 385-91, 1997 Oct-Dec 1997.

HARRIS, W. S. Fish oil supplementation: evidence for health benefits. **Cleve Clin J Med**, v. 71, n. 3, p. 208-10, 212, 215-8 passim, Mar 2004.

HARRIS, W. S.; BULCHANDANI, D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? **Curr Opin Lipidol**, v. 17, n. 4, p. 387-93, Aug 2006.

HARTWEG, J. et al. Potential impact of omega-3 treatment on cardiovascular disease in type 2 diabetes. **Curr Opin Lipidol**, v. 20, n. 1, p. 30-8, Feb 2009.

HILL, A. M. et al. Combining fish-oil supplements with regular aerobic exercise improves body composition and cardiovascular disease risk factors. **Am J Clin Nutr**, v. 85, n. 5, p. 1267-74, May 2007.

HIRAYAMA, S.; MIIDA, T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. **Clin Chim Acta**, v. 414, p. 215-24, Dec 2012.

HOLVOET, P. et al. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. **JAMA**, v. 299, n. 19, p. 2287-93, May 2008.

HOLVOET, P. Oxidized LDL and coronary heart disease. **Acta Cardiol**, v. 59, n. 5, p. 479-84, Oct 2004.

HOOPER, L. et al. Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review. **BMJ**, v. 332, n. 7544, p. 752-60, Apr 2006.

HOWELL, G. et al. N-3 polyunsaturated fatty acids suppress insulin-induced SREBP-1c transcription via reduced trans-activating capacity of LXRA. **Biochim Biophys Acta**, v. 1791, n. 12, p. 1190-6, Dec 2009.

HUANG, J. M.; HUANG, Z. X.; ZHU, W. Mechanism of high-density lipoprotein subfractions inhibiting copper-catalyzed oxidation of low-density lipoprotein. **Clin Biochem**, v. 31, n. 7, p. 537-43, Oct 1998.

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

HULTHE, J.; FAGERBERG, B. Circulating oxidized LDL is associated with increased levels of cell-adhesion molecules in clinically healthy 58-year old men (AIR study). **Med Sci Monit**, v. 8, n. 3, p. CR148-52, Mar 2002.

IKEWAKI, K. et al. Effects of atorvastatin on nuclear magnetic resonance-defined lipoprotein subclasses and inflammatory markers in patients with hypercholesterolemia. **J Atheroscler Thromb**, v. 16, n. 1, p. 51-6, Mar 2009.

INEU, M. L. et al. HDL management: recent advances and perspectives beyond LDL reduction. **Arq Bras Cardiol**, v. 87, n. 6, p. 788-94, Dec 2006.

International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSA). Recommendations for Dietary Intake of Polyunsaturated Fatty Acids in Healthy Adults. p. 1-22. jun-2004. Available online: <http://www.efsa.europa.eu/de/search/doc/2815.pdf>

ITABE, H.; OBAMA, T.; KATO, R. The Dynamics of Oxidized LDL during Atherogenesis. **J Lipids**, v. 2011, p. 418313, 2011.

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 Jan-Feb 2012.

Jl, A. et al. Impact of phospholipid transfer protein on nascent high-density lipoprotein formation and remodeling. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 34, n. 9, p. 1910-6, Sep 2014.

JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 82-6, Jan 1998.

JOHNSON, R. K.; DRISCOLL, P.; GORAN, M. I. Comparison of multiple-pass 24-hour recall estimates of energy intake with total energy expenditure determined by the doubly labeled water method in young children. **J Am Diet Assoc**, v. 96, n. 11, p. 1140-4, Nov 1996.

JOHNSON, W. J. et al. Cholesterol efflux from cells to immunopurified subfractions of human high density lipoprotein: LP-AI and LP-AI/AII. **J Lipid Res**, v. 32, n. 12, p. 1993-2000, Dec 1991.

JUMP, D. B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Curr Opin Lipidol**, v. 19, n. 3, p. 242-7, Jun 2008.

JÜRGENS, G. et al. Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation--characterization and pathophysiological implications. **Chem Phys Lipids**, v. 45, n. 2-4, p. 315-36, 1987 Nov-Dec 1987.

KABIR, M. et al. Treatment for 2 mo with n 3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: a randomized controlled study. **Am J Clin Nutr**, v. 86, n. 6, p. 1670-9, Dec 2007.

KAISER, H. F. **The application of electronic computers to factor analysis**. Educational and Psychological Measurement, 20, 141-151, 1969.

KAJIKAWA, S. et al. Highly purified eicosapentaenoic acid prevents the progression of hepatic steatosis by repressing monounsaturated fatty acid synthesis in high-fat/high-sucrose diet-fed mice. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 80, n. 4, p. 229-38, Apr 2009.

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. 324-33, Aug 2007.

KERSTEN, S.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Roles of PPARs in health and disease. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 421-4, May 2000.

KIMURA, N. M. et al. Nonlinear refractive index measurements of discotic and calamitic nematic lyotropic phases. **Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys**, v. 74, n. 6 Pt 1, p. 062701, Dec 2006.

KONTUSH, A.; CHANTEPIE, 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. 1881-8, Oct 2003.

KONTUSH, A.; CHAPMAN, M. J. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 3, p. 342-74, Sep 2006.

KOVANEN, P. T.; PENTIKÄINEN, M. O. Circulating lipoproteins as proinflammatory and anti-inflammatory particles in atherogenesis. **Curr Opin Lipidol**, v. 14, n. 5, p. 411-9, Oct 2003.

KREBS, J. D. et al. Additive benefits of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and weight-loss in the management of cardiovascular disease risk in overweight hyperinsulinaemic women. **Int J Obes (Lond)**, v. 30, n. 10, p. 1535-44, Oct 2006.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 106, n. 21, p. 2747-57, Nov 2002.

KUNESOVÁ, M. et al. The influence of n-3 polyunsaturated fatty acids and very low calorie diet during a short-term weight reducing regimen on weight loss and serum fatty acid composition in severely obese women. **Physiol Res**, v. 55, n. 1, p. 63-72, 2006.

LAGOS, K. G. et al. Alterations in the high density lipoprotein phenotype and HDL-associated enzymes in subjects with metabolic syndrome. **Lipids**, v. 44, n. 1, p. 9-16, Jan 2009.

LE JOSSIC-CORCOS, C. et al. Hepatic farnesyl diphosphate synthase expression is suppressed by polyunsaturated fatty acids. **Biochem J**, v. 385, n. Pt 3, p. 787-94, Feb 2005.

LEWIS, G. F.; RADER, D. J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. **Circ Res**, v. 96, n. 12, p. 1221-32, Jun 2005.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, n. 9, p. 1135-43, Mar 2002.

LOBO, J. et al. Electronegative LDL and lipid abnormalities in patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis. **Nephron Clin Pract**, v. 108, n. 4, p. c298-304, 2008.

LOHMAN, T.; GOINS, S. **Assesment of body composition and energy balance**. In: LAMB, D.; MURRAY, R. Perspective in exercise science and sports medicine. Cooper Publishing Group: Carmel, 1998.

MACKERRAS, D. Energy adjustment: the concepts underlying the debate. **J Clin Epidemiol**, v. 49, n. 9, p. 957-62, Sep 1996.

MACKNESS, M. I. et al. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. **Biochem J**, v. 294 (Pt 3), p. 829-34, Sep 1993.

MACKNESS, M. I.; ARROL, S.; DURRINGTON, P. N. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. **FEBS Lett**, v. 286, n. 1-2, p. 152-4, Jul 1991.

MACKNESS, M. I.; DURRINGTON, P. N. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. **Atherosclerosis**, v. 115, n. 2, p. 243-53, Jun 1995.

MACKNESS, M. I.; DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, B. How high-density lipoprotein protects against the effects of lipid peroxidation. **Curr Opin Lipidol**, v. 11, n. 4, p. 383-8, Aug 2000.

MCKENNEY, J. M.; SICA, D. Role of prescription omega-3 fatty acids in the treatment of hypertriglyceridemia. **Pharmacotherapy**, v. 27, n. 5, p. 715-28, May 2007.

MELLO, A. P. et al. Electronegative low-density lipoprotein: origin and impact on health and disease. **Atherosclerosis**, v. 215, n. 2, p. 257-65, Apr 2011.

MELLO, A. P. Q. et al. Electronegative low-density lipoprotein is associated with dense low-density lipoprotein in subjects with different levels of cardiovascular risk. **Lipids**, v. 45, n. 7, p. 619-25, Jul 2010.

MEYERS, C. D.; KASHYAP, M. L. Pharmacologic elevation of high-density lipoproteins: recent insights on mechanism of action and atherosclerosis protection. **Curr Opin Cardiol**, v. 19, n. 4, p. 366-73, Jul 2004.

MINEO, C. et al. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. **Circ Res**, v. 98, n. 11, p. 1352-64, Jun 2006.

MINEO, C.; SHAUL, P. W. Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol. **Circ Res**, v. 111, n. 8, p. 1079-90, Sep 2012.

MONTEIRO, A. M. et al. Measurement of the nonlinear optical response of low-density lipoprotein solutions from patients with periodontitis before and after periodontal treatment: evaluation of cardiovascular risk markers. **J Biomed Opt**, v. 17, n. 11, p. 115004, Nov 2012.

MORI, T. A. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: epidemiology and effects on cardiometabolic risk factors. **Food Funct**, v. 5, n. 9, p. 2004-19, Sep 2014.

MOSCA, L. Guidelines for prevention of cardiovascular disease in women: a summary of recommendations. **Prev Cardiol**, v. 10 Suppl 4, p. 19-25, 2007.

MOSTAD, I. L. et al. Effects of marine n-3 fatty acid supplementation on lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance in subjects with type II diabetes. **Eur J Clin Nutr**, v. 62, n. 3, p. 419-29, Mar 2008.

MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E. B. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. **JAMA**, v. 296, n. 15, p. 1885-99, Oct 2006.

NAVAB, M. et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. **J Clin Invest**, v. 88, n. 6, p. 2039-46, Dec 1991.

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. 207-13, Feb 2011.

NESTEL, P. J. et al. Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. **J Clin Invest**, v. 74, n. 1, p. 82-9, Jul 1984.

NESTEL, P. J.; CARROLL, K. F.; HAVENSTEIN, N. Plasma triglyceride response to carbohydrates, fats and caloric intake. **Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 1-18, Jan 1970.

NIKOLIC, D. et al. Lipoprotein subfractions in metabolic syndrome and obesity: clinical significance and therapeutic approaches. **Nutrients**, v. 5, n. 3, p. 928-48, Mar 2013.

NIMURA, L.; KINOSHITA, T. Fluorescent Labeling Of Fatty Acids With 9-Anthryldiazomethane (ADAM) For High-Performance Liquid –Chromatography. **Anal Lett**, v. 13, p. 191-202, 1980.

NOFER, J. R. et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. **J Clin Invest**, v. 113, n. 4, p. 569-81, Feb 2004.

NORDOY, A. Statins and omega-3 fatty acids in the treatment of dyslipidemia and coronary heart disease. **Minerva Med**, v. 93, n. 5, p. 357-63, Oct 2002.

OSLAKOVIC, C. et al. Anionic phospholipids lose their procoagulant properties when incorporated into high density lipoproteins. **J Biol Chem**, v. 284, n. 9, p. 5896-904, Feb 2009.

PARASASSI, T. et al. Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL(-). **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 1, p. 82-9, Jul 2001.

PARK, Y.; HARRIS, W. S. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. **J Lipid Res**, v. 44, n. 3, p. 455-63, Mar 2003.

PEARSON, T. A. et al. AHA Guidelines for Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Stroke: 2002 Update Consensus Panel Guide to Comprehensive Risk Reduction for Adult Patients Without Coronary or Other Atherosclerotic Vascular Diseases. **Circulation**, v. 16, n. 3, p. 388-91, Jul 2002.

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.

PORRECA, E. et al. Circulating leptin is associated with oxidized LDL in postmenopausal women. **Atherosclerosis**, v. 175, n. 1, p. 139-43, Jul 2004.

RADER, D. J. High-density lipoproteins and atherosclerosis. **Am J Cardiol**, v. 90, n. 8A, p. 62i-70i, Oct 2002.

REAVEN, G. M. et al. Role of insulin in endogenous hypertriglyceridemia. **J Clin Invest**, v. 46, n. 11, p. 1756-67, Nov 1967.

RIBAS, V. et al. Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. **Circ Res**, v. 95, n. 8, p. 789-97, Oct 2004.

ROS, E.; MATAIX, J. Fatty acid composition of nuts implications for cardiovascular health. **Br J Nutr**, v. 96 Suppl 2, p. S29-35, Nov 2006.

ROSENSON, R. S. et al. Randomized trial of an inhibitor of secretory phospholipase A2 on atherogenic lipoprotein subclasses in statin-treated patients with coronary heart disease. **Eur Heart J**, v. 32, n. 8, p. 999-1005, Apr 2011.

ROSS, R. Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. **Am J Pathol**, v. 143, n. 4, p. 987-1002, Oct 1993.

ROSS, R.; GLOMSET, J. A. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). **N Engl J Med**, v. 295, n. 7, p. 369-77, Aug 1976.

ROSS, R.; GLOMSET, J.; HARKER, L. Response to injury and atherogenesis. **Am J Pathol**, v. 86, n. 3, p. 675-84, Mar 1977.

RUSSO, G. L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochem Pharmacol**, v. 77, n. 6, p. 937-46, Mar 2009.

RYE, K. A.; BARTER, P. J. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 3, p. 421-8, Mar 2004.

SAKUMA, N. et al. HDL3 exerts a more powerful antiperoxidative and protective effect against peroxidative modification of LDL than HDL2 does. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 48, n. 4, p. 278-82, Aug 2002.

SALA-VILA, A. et al. Eicosapentaenoic acid in serum phospholipids relates to a less atherogenic lipoprotein profile in subjects with familial hypercholesterolemia. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 9, p. 1604-8, Sep 2013.

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L.; BENÍTEZ, S.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Electronegative low-density lipoprotein. **Curr Opin Lipidol**, v. 15, n. 3, p. 329-35, Jun 2004.

SANDERS, T. A. et al. Triglyceride-lowering effect of marine polyunsaturates in patients with hypertriglyceridemia. **Arteriosclerosis**, v. 5, n. 5, p. 459-65, 1985 Sep-Oct 1985.

SANTOS, P. R. et al. Behavior of the thermal diffusivity of native and oxidized human low-density lipoprotein solutions studied by the Z-scan technique. **J Biomed Opt**, v. 17, n. 10, p. 105003, Oct 2012.

SANTOS, R. D. et al. [First guidelines on fat consumption and cardiovascular health]. **Arq Bras Cardiol**, v. 100, n. 1 Suppl 3, p. 1-40, Jan 2013.

SATOH, N. et al. Purified eicosapentaenoic acid reduces small dense LDL, remnant lipoprotein particles, and C-reactive protein in metabolic syndrome. **Diabetes Care**, v. 30, n. 1, p. 144-6, Jan 2007.

SEVANIAN, A. et al. LDL- is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. **J Lipid Res**, v. 38, n. 3, p. 419-28, Mar 1997.

SEVANIAN, A.; ASATRYAN, L.; ZIOUZENKOVA, O. Low density lipoprotein (LDL) modification: basic concepts and relationship to atherosclerosis. **Blood Purif**, v. 17, n. 2-3, p. 66-78, 1999.

SHAUL, P. W.; MINEO, C. HDL action on the vascular wall: is the answer NO? **J Clin Invest**, v. 113, n. 4, p. 509-13, Feb 2004.

SHEIK-BAHAE, M.; SAID, A. A.; VAN STRYLAND, E. W. High-sensitivity, single-beam n(2) measurements. **Opt Lett**, v. 14, n. 17, p. 955-7, Sep 1989.

SIMÃO, A. N. et al. [Effect of n-3 fatty acids in glycemic and lipid profiles, oxidative stress and total antioxidant capacity in patients with the metabolic syndrome]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 54, n. 5, p. 463-9, 2010.

SIMOPOULOS, A. P. n-3 fatty acids and human health: defining strategies for public policy. **Lipids**, v. 36 Suppl, p. S83-9, 2001.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: The epidemiological evidence. **Environ Health Prev Med**, v. 6, n. 4, p. 203-9, Jan 2002.

SINGH, K.; Chander, R.; Kapoor, N. K. High density lipoprotein subclasses inhibit low density lipoprotein oxidation. **Indian J Biochem Biophys**, v. 34, n. 3, p. 313-8, Jun 1997.

SINGH, S. et al. Eicosapentaenoic Acid Versus Docosahexaenoic Acid as Options for Vascular Risk Prevention: A Fish Story. **Am J Ther**, Mar 2015.

SKULAS-RAY, A. C. et al. Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. **Am J Clin Nutr**, v. 93, n. 2, p. 243-52, Feb 2011.

SKULAS-RAY, A. C. et al. Omega-3 fatty acid concentrates in the treatment of moderate hypertriglyceridemia. **Expert Opin Pharmacother**, v. 9, n. 7, p. 1237-48, May 2008.

SONE, H. et al. HMG-CoA reductase inhibitor decreases small dense low-density lipoprotein and remnant-like particle cholesterol in patients with type-2 diabetes. **Life Sci**, v. 71, n. 20, p. 2403-12, Oct 2002.

SPSS INCORPORATION. Statistical Package for the Social Sciences for Windows Student Version/ SPSS [computer program]. Release 20.0. Chicago: Marketing Department; 2011.

STEINBERG, D. et al. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N Engl J Med**, v. 320, n. 14, p. 915-24, Apr 1989.

STEINBERG, D. Oxidative Modification of LDL in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Am J Geriatr Cardiol**, v. 2, n. 5, p. 38-41, Oct 1993.

STEINBERG, D. Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. **J Intern Med**, v. 233, n. 3, p. 227-32, Mar 1993.

STONE, N. J. et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **Circulation**, v. 129, n. 25 Suppl 2, p. S1-45, Jun 2014.

ST-PIERRE, A. C. et al. Insulin resistance syndrome, body mass index and the risk of ischemic heart disease. **CMAJ**, v. 172, n. 10, p. 1301-5, May 2005.

STRONG, K. et al. Preventing chronic diseases: how many lives can we save? **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1578-82, 2005 Oct 29-Nov 4 2005.

SVIRIDOV, D.; NESTEL, P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 161, n. 2, p. 245-54, Apr 2002.

TALL, A. et al. Accelerated transfer of cholesteryl esters in dyslipidemic plasma. Role of cholesteryl ester transfer protein. **J Clin Invest**, v. 79, n. 4, p. 1217-25, Apr 1987.

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. 256-73, Mar 2008.

TALL, A. R. Plasma cholesteryl ester transfer protein. **J Lipid Res**, v. 34, n. 8, p. 1255-74, Aug 1993.

TEAM, E. E. et al. WHO launches the World Health Statistics 2012. **Euro Surveill**, v. 17, n. 20, 2012.

THEOBALD, H. E. et al. LDL cholesterol-raising effect of low-dose docosahexaenoic acid in middle-aged men and women. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 4, p. 558-63, Apr 2004.

THORSDOTTIR, I. et al. Fish consumption among young overweight European adults and compliance to varying seafood content in four weight loss intervention diets. **Public Health Nutr**, v. 12, n. 5, p. 592-8, May 2009.

THORSDOTTIR, I. et al. Randomized trial of weight-loss-diets for young adults varying in fish and fish oil content. **Int J Obes (Lond)**, v. 31, n. 10, p. 1560-6, Oct 2007.

TIAN, L. et al. Alterations of high density lipoprotein subclasses in obese subjects. **Lipids**, v. 41, n. 8, p. 789-96, Aug 2006.

TIAN, L. et al. The impact of plasma triglyceride and apolipoproteins concentrations on high-density lipoprotein subclasses distribution. **Lipids Health Dis**, v. 10, p. 17, 2011.

TOSHIMA, S. et al. Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, n. 10, p. 2243-7, Oct 2000.

UITTENBOGAARD, A. et al. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. **J Biol Chem**, v. 275, n. 15, p. 11278-83, Apr 2000.

VAN DER STOEP, M.; KORPORAAL, S. J.; VAN ECK, M. High-density lipoprotein as a modulator of platelet and coagulation responses. **Cardiovasc Res**, v. 103, n. 3, p. 362-71, Aug 2014.

VON ECKARDSTEIN, A.; NOFER, J. R.; ASSMANN, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, n. 1, p. 13-27, Jan 2001.

WANG, C. et al. n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. **Am J Clin Nutr**, v. 84, n. 1, p. 5-17, Jul 2006.

WANG, Y. et al. Will all Americans become overweight or obese? estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 10, p. 2323-30, Oct 2008.

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. 474-83, Dec 2011.

WESTHUYZEN, J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update. **Ann Clin Lab Sci**, v. 27, n. 1, p. 1-10, 1997 Jan-Feb 1997.

WILLETT, W.; STAMPFER, M. J. Total energy intake: implications for epidemiologic analyses. **Am J Epidemiol**, v. 124, n. 1, p. 17-27, Jul 1986.

WILLIAMS, K. J.; TABAS, I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. **Curr Opin Lipidol**, v. 9, n. 5, p. 471-4, Oct 1998.

WILSON, P. W.; ABBOTT, R. D.; CASTELLI, W. P. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. **Arteriosclerosis**, v. 8, n. 6, p. 737-41, 1988 Nov-Dec 1988.

WOODMAN, R. J. et al. Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid increases LDL particle size in treated hypertensive type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 26, n. 1, p. 253, Jan 2003.

XAVIER, H. T. et al. [V Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis]. **Arq Bras Cardiol**, v. 101, n. 4 Suppl 1, p. 1-20, Oct 2013.

XIAN, X. et al. Reduced high-density lipoprotein 2b in non-obese type 2 diabetic patients analysed by a microfluidic chip method in a case-control study. **Biomarkers**, v. 14, n. 8, p. 619-23, Dec 2009.

XU, J. et al. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. **J Biol Chem**, v. 276, n. 13, p. 9800-7, Mar 2001.

XU, Y.; FU, M. Alterations of HDL subclasses in hyperlipidemia. **Clin Chim Acta**, v. 332, n. 1-2, p. 95-102, Jun 2003.

YANG, Y. et al. Relationship between plasma lipid concentrations and HDL subclasses. **Clin Chim Acta**, v. 354, n. 1-2, p. 49-58, Apr 2005.

YUHANNA, I. S. et al. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. **Nat Med**, v. 7, n. 7, p. 853-7, Jul 2001.

8. ANEXOS

Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo - Faculdade de Saúde Pública

Av. Dr. Arnaldo, 715 – CEP 01246-904 – São Paulo- Brasil

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, _____, 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 poderei chamar qualquer membro da equipe ou a coordenadora do estudo Profa. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno nos telefones (11) 3061-7865, 3091 9538, ou entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública (telefones 3061 7779 ou 3061 7742) ou o Comitê de Ética do Hospital Universitário (telefones 3091 9457 3091 9479) da Universidade de São Paulo.

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 do Hospital Universitário

Fls. nº 109
CEP/HU-USP

São Paulo, 6 de agosto de 2011.

Ilmo(a) Sr(a)

Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

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

REFERENTE: Projeto de Pesquisa "Propriedade físico-químicas da LDL e da HDL, marcadores cardiometabólicos e oxidativos podem ser modulados pelo consumo de ômega-3, ômega-6 e ômega-9 em indivíduos com risco cardiovascular intermediário?" - **Pesquisador(a) responsável:** Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno - **Co-Autor(es):** Dr. Antonio Figueiredo, Dr. Magnus Ake Gidlund, Dra. Sayuri Miyamoto, Dr. Raul Cavalcante Maranhão, Dra. 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 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. Claudio Leone

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - FSP/USP

Ilm.ª Sr.ª

Prof.ª Dr.ª Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Departamento de Nutrição

Faculdade de Saúde Pública/USP

Anexo 4. Diário do participante

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 sobrareem.

CONTATOS: Faculdade de Saúde Pública da USP – 3061 7865

Hospital Universitário da USP – 3091 9538

Pesquisadora Profa. Dra. Nágila Damasceno – 2369 8581

E-mail: cardionutri@gmail.com

SEMANA ____

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?

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
2() Anti-hipertensivo 5() Vitamina
3() Hipoglicemiante 6() Fibrato
7() Outro: _____

A29 Qual(is)? _____

A30 Posologia: _____

A31 Indicação: _____

A32 Você tem alguma alergia ou intolerância alimentar? 1() SIM 2() NÃO

A33 Qual (is): _____

A34 Antecedentes familiares de doenças crônicas? 1() SIM 2() NÃO

1 () Pai
1() Obesidade 4() AVC
2() Hipertensão 5() Diabetes
3() Infarto 6() Doença vascular periférica 7() Outro: _____

2 () Mãe
1() Obesidade 4() AVC
2() Hipertensão 5() Diabetes
3() Infarto 6() Doença vascular periférica 7() Outro: _____

A35 Gestante ou Lactante? 1() SIM 2() NÃO

A36 Está recendo algum tipo de orientação Nutricional? 1() SIM 2() NÃO

A37 Qual frequência? 1() Esporádica 2() Mensal 3() Trimestral 4() Semestral 5() Outras

Entrevistador: _____

Anexo 6. Composição Corporal, Eletrocardiograma e Pressão Arterial

COMPOSIÇÃO CORPORAL, ELETROCARDIOGRAMA E PRESSÃO ARTERIAL

NOME: _____ N° CARDIONUTRI: _____

DATA: ____/____/____

Composição corporal:

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

Eletrocardiograma:

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

A65 Valor de V4 no HeartSquare: _____, _____ cm

A66 Tempo (mm:ss): _____: _____

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

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

Pressão arterial:

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

Entrevistador (T=0): _____

Entrevistador (T=8S): _____

Anexo 7. Parâmetros Antropométricos

PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS

NOME: _____ N° CARDIONUTRI: _____

DATA: ____/____/____

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

Entrevistador (T=0): _____

Entrevistador (T=8S): _____

Anexo 8. Recordatório Alimentar de 24h

RECORDATÓRIO ALIMENTAR DE 24H

NOME: _____ N° 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>Escore 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:	1	2	3	4	5

nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / muito freqüentemente					
<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>					

CURRICULO LATTES

21/06/2015

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Maria Camila Pruper de Freitas)

Maria Camila Pruper de Freitas

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6846197955440121>

Última atualização do currículo em 25/03/2015

Graduada em Nutrição pela Universidade Nove de Julho (2012). Atualmente é aluna de Mestrado no Programa de Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP - USP). Possui experiência na área de pesquisa científica com ênfase em metabolismo de lipídios. Os projetos dos quais participa tem como objetivo avaliar os efeitos dos componentes nutricionais sobre as doenças crônicas não transmissíveis (aterosclerose, obesidade, câncer, etc) e sua relação com variáveis lipídicas, oxidativas, inflamatórias e imunológicas. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Maria Camila Pruper de Freitas
Nome em citações bibliográficas FREITAS, M. C. P.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

- 2013** Mestrado em andamento em Nutrição em Saúde Pública.
Faculdade de Saúde Pública de São Paulo.
Título: Impacto da suplementação do ômega 3 no tamanho das lipoproteínas e na caracterização da LDL pela técnica Z-scan em adultos, Ano de Obtenção: 2015.
Orientador: Nagila Raquel Teixeira Damasceno.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
Palavras-chave: ômega 3; lipoproteínas; doença cardiovascular.
Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Bioquímica da Nutrição.
Setores de atividade: Outras atividades profissionais, científicas e técnicas.
- 2009 - 2012** Graduação em Nutrição.
Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Brasil.
Título: TAMANHO DAS LIPOPROTEÍNAS E MOBILIDADE Z-SCAN DA LDL EM ADOLESCENTES OBESOS.
Orientador: Nágila Raquel Teixeira Damasceno.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Formação Complementar

- 2015 - 2015** Análise de Regressão Múltipla. (Carga horária: 40h).
Faculdade de Saúde Pública de São Paulo.
- 2014 - 2014** IX Simpósio de Lipídeos e Saúde. (Carga horária: 9h).

Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8729581028091781>
Última atualização do currículo em 26/04/2015

Possui Graduação em Nutrição pela Universidade Estadual do Ceará (1995), Mestrado (1997) e Doutorado (2001) em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo. Realizou estágios de Pós-doutoramento em Imunologia (USP, 2004) e Nutrição e Endocrinologia (Universidade de Barcelona, Espanha, 2010). Atualmente é professora associada da Universidade de São Paulo, vinculada ao Depto de Nutrição e diretora da Divisão de Nutrição e Dietética do Hospital Universitário da mesma universidade. Mantém colaboração com grupos e universidades nacionais e internacionais, visando à excelência na formação de mestres, doutores e pós-doutores na área de Nutrição. É membro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos (INCT-FCx), membro do conselho deliberativo do Núcleo de Apoio à Pesquisa de Fluidos Complexos (NAP-FCx), coordenadora do Programa de Cooperação Internacional Brasil - Suécia (STINT-CAESP) e conselheira científica do Conselho Regional de Nutrição (CRN-3). Nos últimos anos tem coordenado pesquisas na área de Nutrição e Doenças Crônicas (DCV, Obesidade, Câncer), com ênfase em aspectos lipídicos, oxidativos e inflamatórios. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Nágila Raquel Teixeira Damasceno
Nome em citações bibliográficas	DAMASCENO, N. R. T.; DAMASCENO, NAGILA RAQUEL TEIXEIRA

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. Av. Dr. Arnaldo, 715 Pacaembu 01246-904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (011) 30617865 Fax: (011) 30617701 URL da Homepage: http://www.usp.br
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

1997 - 2001	Doutorado em Ciências dos Alimentos. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Influência das Isoflavonas Extraídas da Soja na Hipercolesterolemia e na Aterosclerose Experimental Induzida pela Caseína, Ano de obtenção: 2001. Orientador: Dulcineia Saes Parra Abdalla. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: Isoflavonas; Caseína; Oxidação; Lipoproteínas; Anticorpos; Aterosclerose. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica / Especialidade: Cardiologia. Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica / Especialidade: Alergologia e Imunologia Clínica. Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica / Especialidade: Endocrinologia. Setores de atividade: Fabricação de Produtos Químicos; Fabricação de Produtos Farmacêuticos; Desenvolvimento de Produtos Tecnológicos Voltados Para A Saúde Humana.
--------------------	---

ARTIGO

Z-SCAN ANALYSIS: A NEW METHOD TO MEASURE LDL OXIDATION AND ITS ASSOCIATION WITH MULTIPLE CARDIOMETABOLIC BIOMARKERS

Author names and affiliations: Maria C. P. Freitas^a, Antonio M. Figueiredo Neto^b, Viviane Giampaoli^c, Elisete C. Q. Aubin^c, Milena M. Araújo^a, Nágila R. T. Damasceno^a

^aDepartment of Nutrition, School of Public Health, University of Sao Paulo. Sao Paulo – Brazil. ^bExperimental Physics Department, Institute of Physics, University of Sao Paulo. Sao Paulo – Brazil. ^cDepartment of Statistics, Institute of Mathematics and Statistics, University of Sao Paulo. Sao Paulo – Brazil.

Corresponding author:

Professor Dr. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Phone number: +55-11-30617865

Fax number: +55-11-30617130

Department of Nutrition

School of Public Health University of Sao Paulo

Av. Dr. Arnaldo, 715; 01246-904, Sao Paulo, SP, Brazil

E-mail: nagila@usp.br

KEYWORDS: Cardiovascular Diseases; Lipoproteins; Low-Density Lipoprotein; Biological Markers; Risk Factors; Z-scan Technique.

Previous presentation of the manuscript

The purpose of this study was to investigate whether the Z-scan technique to measure oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) through in the nonlinear optical response of LDL solution in human plasma is associated with multiple cardiometabolic biomarkers assessed by Principal Component Analysis (PCA).

We performed a cross-sectional study and a total of 63 individuals, both sexes, with mean age 52 (11) years old, excess weight, high levels TC and low levels of HDL-C were enrolled. The PCA was performed according to cardiometabolic biomarkers to standardize the sample and to analyze the association of the Principal Components (PC) and Z-scan measurements of LDL solution from plasma of participants.

In the last 20 years our group has focused this investigation in the effect of oxidative reactions in chronic diseases and now, we evaluated the association between the Z-scan measurements and multiple cardiometabolic biomarkers. Our group decided to work in partnership with the researchers from Institute of Physics - University of Sao Paulo, as they began their experiments with LDL by Z-scan technique, because they believed that the analysis of the physical characteristics of LDL would be fundamental in understanding predisposing particle to oxidative modification.

Z-scan technique is an experimental arrangement that showed very interesting sensitivity to identify the oxidation of LDL in the initial state, which sets it apart from many biochemical tests that are not able of detecting such differences in samples of oxidized lipoproteins. Since LDL oxidation is a key event in the progression of atherosclerosis, detection of oxidized particles, still in the initial state, may give further information on the early classification of cardiovascular risk.

It is important to emphasize the contribution that these results represent for our research group, as well as for other professionals dedicated to cardiovascular health, even in early years of life.

These results are still unpublished, and we present for the first time an innovative alternative for detection oxLDL in human plasma, in initial state of oxidation, and sowed association with multiple cardiometabolic biomarkers.

List of abbreviations

CVD	cardiovascular diseases
WHO	World Health Organization
oxLDL	oxidized low-density lipoprotein
LDL(-)	electronegative low-density lipoprotein
APOAI	apolipoprotein A-I
APOB	apolipoprotein B
LDL	low-density lipoprotein
LDL _{SMALL}	small and dense LDL
NEFAs	non-esterified fatty acids
APOCIII	apolipoprotein C-III
APOE	apolipoprotein E
PCA	Principal Component Analysis
WC	waist circumference
BMI	body mass index
TC	total cholesterol
HDL-C	high-density lipoprotein cholesterol
TAG	triacylglycerols
LDL-C	low-density lipoprotein cholesterol
PON1	paraoxonase 1
HDL	high-density lipoprotein
PC	Principal Component
Non-HDL-C	non high-density lipoprotein cholesterol
HDL _{LARGE}	large particles of HDL
HDL _{SMALL}	small particles of HDL
LDL _{LARGE}	large particles of LDL
LDL _{SMALL}	small particles of LDL
PC1	first Principal Component
PC2	second Principal Component
PC3	third Principal Component
PC4	fourth Principal Component
PC5	fifth Principal Component
CETP	cholesterol-ester transfer protein

ABSTRACT

BACKGROUND: The greatest atherogenic potential of oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) has been widely described in the literature. The objective of this study was to investigate whether the Z-scan technique to measure oxLDL in human plasma is associated with multiple cardiometabolic biomarkers. **METHODS:** Total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triacylglycerols (TAG), apolipoproteins A-I (APOAI) and B (APOB), paraoxonase-1 (PON1), and glucose were analyzed using standard kits. Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was estimated using the Friedewald equation and electronegative low-density lipoprotein [LDL(-)] was detected using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). LDL and HDL size were determined by Lipoprint® system. The Z-scan technique was used to measure the nonlinear optical response of LDL solution. The Principal Component Analysis (PCA) was used to reduce the data from sample. Correlations were used to test association between the q parameter, measured with the Z-scan technique, and Principal Component (PC) projected by PCA. **RESULTS:** A total of 63 individuals, both sexes, with mean age 52 (11) years old, excess weight, high levels TC and low levels of HDL-C were enrolled in this study. Positive correlations between the q parameter and more anti-atherogenic pattern for cardiometabolic biomarkers were found (PC3; $r=0.30$, $p=0.02$ and PC4; $r=0.41$, $p<0.01$) and negative correlation for atherogenic pattern (PC5; $r=-0.40$, $p<0.01$). Regarding the parameters related with atherogenic LDL profile, the q parameter was negatively correlated with more atherogenic pattern (PC2; $r=-0.40$, $p<0.01$). **CONCLUSION:** The Z-scan measurement was able to associate with multiple cardiometabolic biomarkers in a sample of individuals with different cardiovascular risk factors.

INTRODUCTION

Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of premature morbidity and mortality worldwide. Statistical data from the World Health Organization (WHO) showed that CVD is responsible for 48% of deaths in the world and Brazil, representing 33% of all deaths and 78% of deaths from chronic diseases (1). Although CVD include complex mechanisms, atherosclerosis is the physiopathological basis of its primary and secondary clinical events (2).

Classical cardiovascular risk factors, such as age, hypertension, smoking, high levels of glucose, dyslipidemia, physical inactivity, and overweight and obesity are the focus for primary prevention of CVD (3). However, these factors fail to explain all types of cardiovascular events. According to Toshima et al., lack of association with hypertension, serum cholesterol, smoking and sex suggested that oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) is an independent risk factor for CVD (4).

Regarding this point, new biomarkers, associated with atherogenic characteristics, such as oxLDL (4), electronegative low-density lipoprotein [LDL(-)] (5) and apolipoprotein B (APOB) (6), our anti-atherogenic characteristics, such as apolipoprotein A-I (APOAI) (7), have been related to cardiovascular risk, emphasizing the greatest atherogenic potential and crucial role of modified low-density lipoprotein (LDL) in the atherosclerotic process (8-10).

Changes in low-density lipoprotein (LDL) composition generate LDL particles that contribute to the atherosclerotic process by: I - increasing the content of small and dense LDL (LDL_{SMALL}) (8,9); II - releasing oxidative products (11); III - retaining LDL by interaction with proteoglycans (12); VI - increasing cross-reaction with glucose (13) and V - enriching the content of non-esterified fatty acids (NEFAs), apolipoprotein C-III (APOCIII) and apolipoprotein E (APOE) in LDL(-) (13,14).

In 1999, GÓMEZ et al. used the Z-scan technique as an experimental method to evaluate the nonlinear refractive indices of micellar lyotropic liquid crystals (15). The physical principle of the Z-scan technique is based on the fact that some materials can absorb part of the high-intensity light (from a laser) incident on them, and that light increases their temperature, resulting in a variation of their refractive index (16). LDL particles have an amphipathic structure, with a hydrophilic shell and a hydrophobic core, which resembles a micellar aggregate of liquid crystals and the number of components this particle that may contribute differently to the nonlinear optical response depending on the particular oxidation state and its structure. (17).

Regarding this possibility, GÓMEZ et al. (19) investigated the nonlinear optical response of native LDL and LDL oxidized in vitro, with copper ions, by the Z-scan technique as a function of temperature and concentration of LDL particles and published the pioneer study showing that Z-scan signals increase linearly with concentration of native LDL and the oxLDL do not show nonlinear optical response.

In the process of LDL oxidation particles in vitro, significant changes occurred in their structures as in the electrical density profile, in size polydispersity, and in the degree of flexibility of the APO-B protein on the particle (18).

Recently, SANTOS et al. (20) also measured the nonlinear optical response of native and oxLDL solutions, from human plasma, by Z-scan technique, and showed that it depends on a balance involving antioxidants and oxidative products in the sample. The linear optical absorption decreases, as a function of the oxidation time, and is related to the production of lipid hydroperoxides and consumption of LDL's carotenoids, which is a consequence of lipid peroxidation processes. In this sense, the Z-scan technique could be a complementary tool to estimate the level of oxLDL in human plasma and, consequently, evaluate the CVD risk of a patient.

Since the presence of modified LDL particles in the plasma is a key event in the progression of atherosclerosis, it is reasonable to expect that the results obtained with the Z-scan technique can be associated with other cardiometabolic biomarkers and give complementary information about the CVD risk.

Therefore, this study aimed to investigate whether the recently proposed Z-scan technique to measure the oxLDL state through of the nonlinear optical response of LDL solutions from human plasma samples is associated with multiple cardiometabolic biomarkers assessed by Principal Component Analysis (PCA).

METHODS

Patients and study design

This cross-sectional study included individuals of both sexes (ages: 30-74 y), who were free from CVD as evaluated by both electrocardiogram and clinical history. All participants signed an informed consent form. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital and Ethics Committee of the Scholl Public Health (University of Sao Paulo, SP, Brazil).

Individuals who were undernourished, pregnant or lactating, illicit-drug users, or alcoholics and those who presented previous cardiovascular events, uncontrolled acute or severe chronic illness, or uncontrolled psychiatric disorders were excluded.

Demographic, clinical, and anthropometric features

Demographic (sex and age) and clinical profiles were assessed using a structured questionnaire. Clinical evaluation consisted of current information on drugs, smoke, blood pressure and actual chronic diseases, and familial history of chronic disease.

For anthropometric evaluation, we considered the following items: weight (kg) was measured using a digital scale II[®] Control (Plenna; São Paulo, SP, Brazil); height (m) was measured using a portable stadiometer Altura exata[®] (TBW; São Paulo, SP, Brazil); and waist circumference (WC) (cm) was measured using a 1.0-mm precision inelastic and flexible tape (TBW; São Paulo, SP, Brazil), using the anatomical midpoint between the lowest rib and the iliac crest as reference. The weight and height measures were used to calculate the body mass index (BMI) (kg/m^2), which was defined as body mass (kg) divided by height (m) squared.

Biochemical analysis

Blood samples were collected after 12-h fasting. For analysis of total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and triacylglycerols (TAG), we used standard methods (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil). The content of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was estimated using the FRIEDEWALD equation (21).

The APOAI and APOB were determined by a standard protocol based on an immunoturbidimetric method, and using commercially available kits (Autokits APOAI[®] and APOB[®]; Randox Chemicals USA Inc.; Richmond, VA, USA).

Paraoxonase 1 (PON1) activity was determined according to MACKNESS et al. (22), and was expressed as $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$.

Plasma glucose was determined using the commercial, enzymatic-colorimetric kit Glucose PAP Liquiform[®] (Labtest; Lagoa Santa, MG, Brazil).

The LDL(-) was detected by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using monoclonal antibodies to LDL(-) (23). Sizes of the LDL and high-density lipoprotein (HDL) sub-fractions were determined by using the Lipoprint[®] system

(Quantimetrix®; Redondo Beach, California, USA), which is based on the separation and quantitation of lipoprotein sub-fractions through a non-denaturing polyacrylamide gel. All analyses were performed in duplicate, and the intra- and inter-analyst variability coefficients were less than 10%.

Z-Scan technique

LDL particles ($1.019 \leq \text{density} < 1.063$ g/mL) were separated from plasma samples by ultracentrifugation (56.000 rpm; 4 °C; 18 h; fixed-angle rotor). The LDL particles were desalted and their total protein content was determined by using the BCA Protein Assay method (Pierce® Kit; Thermo Scientific; Waltham, MA, USA) for later adjustment to 1.0 mg/mL.

The Z-scan set-up is composed of a continuous-wave Nd:YVO₄ ($\lambda = 532$ nm) laser, with a Gaussian profile beam. The laser beam was chopped (frequency = 17 Hz) and focused by using a lens (diameter = 25.4 mm; focal distance, $f = 150$ mm). The Rayleigh length z_0 was 3.84 (0.20) mm. The transmitted light was collected by a silicon photodetector placed at the far field. The distance between the beam waist and detector was about 150 cm. Samples were placed in sample holders with 200- μm optical path. The incident power of the laser on the samples varied in the range 121.9-153.1 (1.0) mW. Additional details about the set-up may be found in refs (20,21,24).

The Z-Scan technique used to investigate characteristics of the native and modified LDL is based on a property of the absorbing sample to locally increase (slightly) its temperature when illuminated by a laser beam. A thermal lens is formed in the sample, inducing a change in its refractive index. The typical shape of the light transmittance curve as a function of sample position along the beam focus axis has a peak-to-valley inflection. The peak-to-valley amplitude in the normalized light transmittance as a function of the sample position (along the focused laser beam) curve is a dimensionless parameter named q (24). It was previously established that in more oxidized (modified) LDL particles, the q parameter is smaller than that obtained in native (non modified) LDL.

Statistical analysis

Results of descriptive analyzes were presented in standard deviation or median and interquartile range, depending on the variable distribution. The *t-Student* and *Mann-Whitney* tests were used to analyze the differences between genders.

The PCA was used to resize the data of sample and standardize according cardiometabolic biomarkers and parameters related with atherogenic LDL profile and results presented in loading coefficients. The PCA consists in rewriting the original variables into new variables called Principal Components (PC) obtained from a coordinate transformation, in order to simplify the variations existing in multivariate data. Thus, the multivariate nature of data can be projected on a reduced number of dimensions while preserving as much information as possible. This is done by calculating linear combinations of the original variables and the results are presented as loadings. In this study was used the eigenvalue-greater-than-one rule, proposed by KAISER (26) for extraction of most significant PC, to explain the variance of the data and to consider the measure of sampling adequacy.

First, a PCA was performed to standardize the sample data according to the cardiometabolic biomarkers. One array of data was constructed (63 individuals; 15 variables), in which the sample data were arranged in rows and the columns were ordinate by variables. In addition other PCA was performed to standardize the sample data according to parameters related with atherogenic LDL profile (array of data: 63 individuals; 7 variables), in which the samples were arranged in rows and the columns were ordinate by variables.

Spearman correlations were used to analyze the association between the q parameter, from the Z-scan measurement, and the PC projected by PCA.

All statistical tests were performed using the Statistical Package for the Social Sciences® (IBM SPSS Statistics to Windows, version 20.0 - Armonk, NY: IBM Corp) (27), with a 5% significance level.

RESULTS

The total set analyzed consisted of 63 individuals, mean age 52 (11), and women represented 68% of the sample. Self-report about actual chronic diseases shows high prevalence of diseases (92%). This status was confirmed by current drugs used (81%) and familial history of chronic disease (89%). In total sample 19% of individuals were smokers.

These clinical parameters were similar for both sexes. The mean values for BMI showed that the total sample has excess weight, and men had greater WC, as expected. Regarding the biochemical profile, high TC and low HDL-C plasma levels were observed. Women showed higher HDL-C and APOAI levels, and men showed higher percentage of LDL_{SMALL} and LDL size was smaller. The values of the q parameter were lower in women, but in comparison to men, both groups did not show significant differences (**Table 1**).

The PCA was applied in order to summarize similarities or differences between individuals. Thus, the PCA allowed projecting the data in a planar space with 15 dimensions (15 principal components), and according to the eigenvalue-greater-than-one rule, proposed by KAISER (26), the first five components were most significant for the explained 81,9% of the total variance of original data. **Table 2** shows the loadings coefficients of the five most significant PC for cardiometabolic biomarkers by PCA.

The first Principal Component (PC1) was the main contributor to explain 29.4% of the data variance. This PC showed a more atherogenic pattern, concentrating positive loading coefficients respect for TC, LDL-C, TAG, non-HDL-C, APOB, LDL_{SMALL}, and LDL(-), as well as a negative loading coefficient for LDL size.

The second Principal Component (PC2) contributed to separate the sample that explain 15.4% of the data variance and also showed an atherogenic pattern, with negative loading coefficients for HDL-C and HDL_{LARGE} as soon positive loading coefficients for TAG, LDL_{SMALL} and HDL_{SMALL}.

The third Principal Component (PC3) accounted for 13.3% of the variance and showed an anti-atherogenic pattern. Positive loading coefficients for HDL-C, APOAI and PON1 were also observed.

The fourth Principal Component (PC4) was responsible for 13% of the variance and also showed an anti-atherogenic pattern, with negative loading coefficients for TAG and LDL_{SMALL}, and positive loading coefficients for LDL_{LARGE} and LDL size.

The fifth Principal Component (PC5), and last, with 10.8% of the variance, showed a more atherogenic pattern with negative loading coefficients for HDL-C as well as opposite loading coefficients for glucose and TAG, despite the negative loading coefficients for LDL(-).

Table 3 shows loadings coefficients of the two most significant PC for parameters related with atherogenic LDL profile. The PCA allowed projecting the data in a planar space with 7 dimensions (7 principal components), and according to the eigenvalue-greater-than-one

rule, proposed by KAISER (26), the first two components were most significant for the explained 80.2% of the total variance of original data.

The first principal component (PC1) explained 51% of the variance in sample and the second component (PC2) explained 29%, both presented atherogenic pattern. In the PC1 was observed positive loading coefficients for the majority atherogenic variables [TC, LDL-C, APOB, LDL_{SMALL}, LDL_{LARGE} and LDL(-)] as well as PC2 (TC, TAG, APOB and LDL_{SMALL}) and negative for LDL(-).

Table 4 shows correlations between PCA data and the q parameter, as measured with the Z-scan technique. Positive correlations between q parameter and cardiometabolic biomarkers were obtained for PC with more anti-atherogenic patterns (PC3; $r=0.30$; $p=0.02$; and PC4; $r=0.41$; $p<0.01$), and a negative correlation between PC with a more atherogenic pattern (PC5; $r=-0.40$; $p<0.01$). Regarding the parameters related with atherogenic LDL profile, the q parameter was negatively correlated with the PC2 ($r=-0.40$; $p<0.01$).

DISCUSSION

The Z-scan technique is an alternative tool, which measures a parameter associated to the presence of modified LDL particles in the plasma of individuals with multiple cardiometabolic risk factors. The q parameter can be used as a measurement of the LDL oxidation state in human plasma on experimental and clinical setting, to understand changes associated with increased CVD risk.

The results of this study showed for the first time the association between cardiometabolic biomarkers and parameters related with atherogenic LDL profile, summarized by PCA, and q parameter.

LDL deposits in the artery wall shows a pivotal role in the initiation and development of atherosclerosis and its chemical and structural modification is essential for its atherogenic profile (8). Therefore, modified LDL can exhibit changes in APOB, its major protein, lipids (phospholipids, non-esterified cholesterol, and free triglycerides), and minor components (phenolic substances and liposoluble antioxidants), which gives a heterogeneous three-dimensional shape for this lipoprotein (28). Despite this complex composition, cholesterol content in LDL particle is the most common parameter monitored in clinical practice and present in any predictive equation to estimate cardiovascular risk (29).

In addition, high levels of TAG have been associated with increased risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death (30) and can stimulate the cholesterol-ester transfer protein (CETP) activity, which promotes cholesterol transfer from HDL to rich-APOB particles, contributing to decrease of HDL-C and generation of LDL_{SMALL} (31). The LDL_{SMALL} are associated with increased of CVD risk, due to ease with which migrate into the subendothelial space, and higher affinity for proteoglycans, that favors the permanence of these lipoprotein in the arterial wall, besides presenting low affinity the LDL receptor (B/E-receptor), making them more susceptible to oxidation and glycation (8,9,12). According to NIKOLIC et al. (32), individuals with high levels of small and dense LDL have 3 to 7 times higher risk to develop cardiovascular diseases, independently of their levels of LDL-C.

Regarding the dynamic interaction among the atherogenic LDL profile and high levels of TC, TAG, APOB and LDL_{SMALL} during the development of atherosclerosis, the association between these parameters and the Z-scan measurements acquires a stronger relevance.

As stressed before, the Z-scan optical signal (the q parameter) was determined by measuring the amplitude of peak-to-valley optical response to light absorption by samples and its amplitude depends on the sample capacity to conduct heat. Recently, SANTOS et al., (20) assessed the influence of antioxidants on the amplitude of q parameter, which depends on the α -tocopherol amount in LDL. Furthermore, APOB is modified in the oxidation process and oxidative products (such as lipid hydroperoxides) are formed. These results suggest that both antioxidants in LDL and the oxidative products formed influence the total capacity of this lipoprotein in solution to absorb and conduct heat. These authors also showed that, in vitro, completely oxidized LDL does not show nonlinear optical signal (i.e., $q = 0$), suggesting that oxidation increases thermal diffusivity.

Regarding the inflammatory and oxidative basis of atherosclerosis, modified LDL has been associated with other diseases (cancer, rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus) (33-35). MONTEIRO et al. found that patients with periodontitis show reduced values of q parameter. This result reinforce the fact that periodontitis increases the risk of CVD. However, the intensity of Z-scan signal showed significant increase after 12-week odontological treatment (36).

Interestingly, in the present study LDL(-) content showed a bimodal contribution to the PCA results, in which LDL(-) cited as an early oxidative biomarker, presented positive loading coefficient in a more atherogenic pattern (PC1 for parameters related with atherogenic

LDL profile) despite negative loading coefficient in others (PC2 for atherogenic LDL profile and PC5 for cardiometabolic biomarkers). The LDL(-) is a modified LDL that has been described in the literature as a potential biomarker for cardiovascular disease, obesity and diabetes (37). The result observed in PC2 for atherogenic LDL profile reinforced the importance of LDL(-) as oxidative biomarker and the sensitivity of Z-scan technique to detect distinct LDL oxidation state in human plasma. Sanchez-Quesada et al. described other ways of generating LDL(-), such as enrichment with non-esterified fatty acids (NEFA), lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂), APOCIII, and non-enzymatic glycosylation (13,14).

The ability of the Z-scan technique to associate with atherogenic and anti-atherogenic patterns for multiple cardiometabolic biomarkers reinforce the sensitivity of this tool in identifying multiple changes in atherogenic components present in plasma. The q parameter was positively correlated with PC3 that presented positive loading coefficient of PON1, an antioxidant enzyme present in HDL and responsible for hydrolysis of oxidative products in LDL (38). In addition, positive loading coefficients levels to HDL-C and APOAI represented the protective pattern of PC3 since are a hallmark of HDL efficiency in transporting cholesterol to the liver and contributing to decrease the number of small and dense LDL (39). In summary, this profile shows characteristics in the functionality of HDL particles. The complex composition of HDL (lipids, enzymes, and proteins) directly influences the traditional (reverse transport of cholesterol) and new functions (anti-inflammatory, antithrombotic, antioxidant) of this lipoprotein (40).

In the literature, the influence of cholesterol content in the lipoproteins and its relation to atherosclerosis is widely accepted. To expand this discussion, in this study we investigated the relevance of new and potential biomarkers, as the size of lipoproteins, on the atherogenic and anti-atherogenic patterns analyzed by PCA. Regarding this point, the PC4 for cardiometabolic biomarkers (anti-atherogenic pattern) showed positive loading coefficients for LDL_{SMALL}. In opposite, this same PC showed negative loading coefficient for LDL_{LARGE} and positive loading coefficient for TAG. Moreover, PC4 was correlated positively with q parameter.

Furthermore, the negative association between the q parameter and PC5 for cardiometabolic biomarkers (negative loading coefficients for HDL-C and positive loading coefficient for TAG and glucose), indicate the reliability of this technique to detect a more atherogenic pattern in a sample.

In conclusion, the Z-scan technique is a tool able to identify the atherogenic and anti-atherogenic patterns in sample of individuals with some cardiovascular risk. Hereafter is possible that the Z-scan technique can be used as a measurement of LDL oxidation state in human plasma. Therefore, the Z-scan technique can be used such a complementary tool able to summarize multiple changes in cardiometabolic biomarkers in plasma and in the LDL.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the National Institute of Science and Technology Complex Fluids (INCT-FCx, 2010-2014), Research Nucleus Support in Complex Fluids at the University of Sao Paulo (NAP-FCx, 2011) and Support Foundation Research of Sao Paulo State (FAPESP - 2011/12523-2).

Statement of Authorship

Maria C. P. Freitas participated in data collection, performed the statistical analyses, summarized the results, wrote and formatted the manuscript; Antonio M. Figueiredo Neto participated in Z-scan analyses, revised the manuscript and gave important considerations; Viviane Giampaoli performed the statistical analyses and revised the manuscript; Elisete C. Q. Aubin performed the statistical analyses and revised the manuscript; Milena M. Araújo participated in data collection, separated and prepared the LDL samples for the Z-scan analyses, and revised the manuscript; Nágila R. T. Damasceno critically revised the manuscript.

Disclosure

The authors declared no conflict of interest.

REFERENCES

1. World Health Organization. World Health Statistics 2012. Geneva; 2012. (accessed on Feb 6, 2015). Available from:
http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en/
2. World Health Organization. Prevention of Cardiovascular Disease. Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk. Geneva; 2007. (accessed on Feb 6, 2015). Available from:
http://www.who.int/cardiovascular_diseases/guidelines/PocketGL.ENGLISH.AFR-D-E.rev1.pdf
3. Pearson TA, Blair SN, Daniels SR, Eckel RH, Fair JM, Fortmann SP, Franklin BA, et al. AHA Guidelines for Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Stroke: 2002 Update Consensus Panel Guide to Comprehensive Risk Reduction for Adult Patients Without Coronary or Other Atherosclerotic Vascular Diseases. *Circulation* 2002;16:388–91.
4. Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H, Takano T, Sugano J, Shimamura K, et al. Circulation oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2243–7.
5. Oliveira JA, Sevanian A, Rodrigues RJ, Apolinário E, Abdalla DS. Minimally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes. *Clin Biochem* 2006;39:708–14.
6. Sniderman AD, Williams K, Contois JH, Monroe HM, McQueen MJ, de Graaf J, Furberg CD. A meta-analysis of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B as markers of cardiovascular risk. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2011;4:337–45.
7. Barter PJ, Rye KA. The rationale for using apoA-I as a clinical marker of cardiovascular risk. *J Intern Med* 2006;259:447–54.
8. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915–24.
9. Sevanian A, Asatryan L, Ziozenkova O. Low Density Lipoprotein (LDL) modification: basic concepts and relationship to atherosclerosis. *Blood Purif* 1999;17:66–78.

10. Avogaro P, Bon GB, Cazzolato G. Presence of a modified low-density lipoprotein in humans. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1988;8:79–87.
11. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992;13:341–90.
12. Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance. *Atherosclerosis* 1998;139:205–22.
13. Sánchez-Quesada JL, Benítez S, Ordóñez-Llanos J. Electronegative low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:329–35.
14. Sánchez-Quesada JL, Camacho M, Antón R, Benítez S, Vila S, Ordóñez-Llanos J. Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. *Atherosclerosis* 2003;166:261–70.
15. Gómez SL, Cuppo FLS, Figueiredo Neto AM, Kosa T, Muramatsu M, Horowicz RJ. Z-scan measurement of the nonlinear refractive indices of micellar lyotropic liquid crystals with and without the ferrofluid doping. *Phys Rev* 1999;59:3059–63.
16. Braslavsky SE, Heibel GE. Time-resolved photothermal and photoacoustic methods applied to photoinduced processes in solution. *Chem Rev* 1992;92:1381–1410.
17. Cuppo FLS, Figueiredo Neto AM, Gómez SL, Palffy-Muhoray P. Thermal-lens model compared with the Sheik–Bahae formalism in interpreting Z-scan experiments on lyotropic liquid crystals. *J Opt Soc Am* 2002;19:1342–8.
18. Oliveira CL, Santos PR, Monteiro AM, Figueiredo Neto AM. Effect of Oxidation on the Structure of Human Low and High-Density Lipoproteins. *Biophys J* 2014;106:2595–605.
19. Gómez SL, Turchiello RF, Jurado MC, Boschcov P, Gidlund M, Figueiredo Neto AM. Characterization of native and oxidized human low-density lipoproteins by the Z-scan technique. *Chem Phys Lipids* 2004;132:185–195.
20. Santos PR, Genaro-Mattos TC, Monteiro AM, Miyamoto S, Figueiredo Neto AM. Behavior of the thermal diffusivity of native and oxidized human low-density lipoprotein solutions studied by the Z-scan technique. *J Biomed Opt* 2012;17:105003.
21. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
22. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS let* 1991;286:152–154.

23. Faulin TE, Sena-Evangelista KC, Pacheco DB, Augusto EM, Abdalla DS. Development of immunoassays for anti-electronegative LDL autoantibodies and immune complexes. *Clin Chim Acta* 2012;413:291–297.
24. Alves S, Figueiredo Neto AM. Advances in the non-linear optical investigation of lyotropic-like low-density human lipoproteins in the native and oxidized states. *Liq Cryst* 2014;41:465–70.
25. Hair Jr JF, Black WC, Babin BJ, Anderson RE, Tatham RL. *Multivariate Data Analysis*. Upper Saddle River (NJ); 2006.
26. Kaiser HF. The application of electronic computers to factor analysis. *Educ Psychol Meas* 1960; 20:141–51.
27. IBM Corp. *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0*. Armonk, NY: IBM Corp released 2011.
28. Hevonoja T, Pentikäinen MO, Hyvönen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta* 2000;1488:189–210.
29. Stone NJ, Robinson J, Lichtenstein AH, Merz CNB, Blum CB, Eckel RH, Goldberg AC, et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2013; 129:S1–45.
30. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* 2006;115:450–8.
31. Barter P. CETP and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc* 2000;20:2029–31.
32. Nikolic D, Katsiki N, Montalto G, Isenovic ER, Mikhailidis DP, Rizzo M. Lipoprotein Subfractions in Metabolic Syndrome and Obesity: Clinical Significance and Therapeutic Approaches. *Nutrients* 2013;5: 928–948.
33. Wan F, Qin X, Zhang G, Lu X, Zhu Y, Zhang H, Dai B, et al. Oxidized low-density lipoprotein is associated with advanced-stage prostate cancer. *Tumour Biol* 2015;36:3573–82.

34. Javadi F, Egtesadi S, Ahmadzadeh A, Aryaeian N, Zabihiyeganeh M, Foroushani AR, Jazayeri S. The effect of quercetin on plasma oxidative status, C-reactive protein and blood pressure in women with rheumatoid arthritis. *Int J Prev Med* 2014;5:293–301.
35. Ahmad HM, Sarhan EM, Komber U. Higher circulating levels of OxLDL % of LDL are associated with subclinical atherosclerosis in female patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2014;34:617–23.
36. Monteiro AM, Jardini MA, Giampaoli V, Alves S, Figueiredo Neto AM, Gidlund M. Measurement of the nonlinear optical response of low-density lipoprotein solutions from patients with periodontitis before and after periodontal treatment: evaluation of cardiovascular risk markers. *J Biomed Opt* 2012;17:115004.
37. Mello APQ, Silva IT, Abdalla DSP, Damasceno NRT. Electronegative low-density lipoprotein: Origin and impact on health and disease. *Atherosclerosis* 2011;215:257–65.
38. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004;95:764–772.
39. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:13–27.
40. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med* 2011;17:594–603.

Table 1. Demographic, anthropometric and biochemical subjects characteristics, according to gender.

Variables	Total (n=63)	Men (n=20)	Women (n=43)	P
BMI (kg/m ²)	31(6)	30(5)	31(6)	0.70
WC (cm)	99 (12)	105 (13)	97 (11)	0.02
TC (mg/dL)	203 (43)	199 (36)	205 (46)	0.68
HDL-C (mg/dL)	37 (9)	32 (8)	40 (8)	<0.01
LDL-C (mg/dL)	138 (38)	136 (27)	139 (42)	0.74
TAG (mg/dL)	117 (91;175)	124 (99;220)	116 (89;160)	0.16
Glucose (mg/dL)	96 (86;107)	99 (91;110)	96 (86;105)	0.48
Non-HDL-C (mg/dL)	166 (43)	168 (36)	166 (46)	0.82
APOB (mg/dL)	105 (26)	105 (20)	106 (28)	0.98
APOAI (mg/dL)	130 (26)	120 (19)	135 (27)	0.03
PON1 (nmol min ⁻¹ . mL ⁻¹)	54 (30)	58 (34)	52 (28)	0.46
HDL _{LARGE} (%)	31 (8)	28 (8)	32 (8)	0.15
HDL _{SMALL} (%)	19 (8)	21 (8)	19 (8)	0.29
LDL _{LARGE} (%)	26 (6)	27 (4)	26 (6)	0.47
LDL _{SMALL} (%)	2 (1;4)	3 (1;6)	1 (1;3)	0.05
LDL size (Å)	270 (266;272)	268 (264;271)	271 (268;273)	0.04
LDL(-) (U/L)	10 (3;37)	5 (2;13)	12 (4;47)	0.08
Z-Scan (<i>q</i> parameter)	8.5E-04 (5.2E-04)	7.5E-04 (4.7E-04)	9.0E-04 (5.3E-04)	0.29

Results are reported as mean (standard deviation) and median (interquartile range). Tests: *t-Student* and *Mann Whitney*. Statistical significance: $p < 0.05$. BMI: body index mass; WC: waist circumference; TC: total cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; TAG: triacylglycerols; Non-HDL-C: non high-density lipoprotein cholesterol; APOB: apolipoprotein B; APOAI: apolipoprotein AI; PON1: paraoxonase 1; LDL(-): electronegative low-density lipoprotein.

Table 2. Principal Component Analysis (PCA) for cardiometabolic biomarkers.

Variables n = 63	Principal Component (PC)				
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
TC (mg/dL)	0.949	0.098	0.208	-0.124	0.035
HDL-C (mg/dL)	-0.048	-0.323	0.780	0.003	-0.410
LDL-C (mg/dL)	0.957	0.036	0.065	0.056	-0.074
TAG (mg/dL)	0.341	0.389	-0.034	-0.506	0.544
Glucose (mg/dL)	0.147	-0.139	0.159	0.052	0.863
Non-HDL-C (mg/dL)	0.956	0.164	0.046	-0.123	0.121
APOAI (mg/dL)	0.065	-0.018	0.868	0.003	0.077
APOB (mg/dL)	0.928	0.211	0.012	-0.128	0.013
PON1 (nmol min ⁻¹ . mL ⁻¹)	0.192	0.233	0.598	-0.021	0.128
HDL _{LARGE} (%)	-0.148	-0.942	0.138	0.003	-0.045
HDL _{SMALL} (%)	0.145	0.890	0.171	-0.151	-0.063
LDL _{LARGE} (%)	0.293	0.193	-0.260	0.781	0.106
LDL _{SMALL} (%)	0.480	0.353	-0.197	-0.630	0.184
LDL size (Å)	-0.388	-0.232	0.122	0.761	-0.150
LDL(-) (U/L)	0.350	-0.091	0.180	0.178	-0.545
% variance	29.4	15.4	13.3	13.0	10.8
% cumulative variance	29.4	44.8	58.1	71.1	81.9

Results are reported as loadings and most significant are in bold. Eigenvalue-greater-than-one rule was used for extraction of most significant PC and to explain the variance (%). TC: total cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; TAG: triacylglycerols; Non-HDL-C: non high-density lipoprotein cholesterol; APOB: apolipoprotein B; APOAI: apolipoprotein A-I; PON1: paraoxonase 1; LDL(-): electronegative low-density lipoprotein.

Table 4. Correlations between Q parameter, as measured with the Z-scan technique, and Principal Component (PC) by PCA for cardiometabolic biomarkers and for parameters related with atherogenic LDL profile.

Z-scan measures		
<i>versus</i>		
Principal components (PC)	r	p
PCA for cardiometabolic biomarkers		
PC1 – atherogenic pattern	0.03	0.80
PC2 – atherogenic pattern	0.02	0.88
PC3 – anti-atherogenic pattern	0.30	0.02
PC4 – anti-atherogenic pattern	0.41	<0.01
PC5 – atherogenic pattern	-0.40	<0.01
PCA for parameters related with atherogenic LDL profile		
PC1 – atherogenic pattern	0.19	0.13
PC2 – atherogenic pattern	-0.40	<0.01

Spearman correlations. Statistical significance $p < 0.05$.