UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FCF/FEA/FSP

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Nutrição

Humana Aplicada

Influência do ω -3 sobre a lipoproteína de baixa densidade eletronegativa [LDL(-)], anticorpos LDL(-) e tamanho das partículas de LDL em indivíduos com síndrome metabólica

Diana Gabriela Estevez Fernandez

Dissertação para obtenção de grau de MESTRE

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

E79i	<p>Estevez Fernandez, Diana Gabriela</p> <p>Influência do ω-3 sobre a lipoproteína de baixa densidade eletronegativa [LDL(-)], anticorpos ANTI-LDL(-) e tamanho das partículas de LDL em indivíduos com síndrome metabólica / Diana Gabriela Estevez Fernandez. -- São Paulo, 2015. 86p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade da USP. Faculdade de Saúde Pública da USP. Curso Interunidades em Nutrição Humana Aplicada.</p> <p>Orientador: Damasceno, Nágila Raquel Teixeira</p> <p>1. Obesidade: Nutrição: Doenças metabólicas 2. Oxidação I. T. II. Damasceno, Nágila Raquel Teixeira, orientador.</p> <p style="text-align: right;">616.398 CDD</p>
------	--

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 tese.

DEDICATÓRIA

À minha avó, meus pais, irmãos, esposo e filhas por serem exemplo e motor da minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradezco a mis padres, Justo y Bernarda por creer en mí.

A mi esposo, Jimmy, por apoyar mi crecimiento y acompañarme en el día a día.

A mis hijas, Gabi y Paclita, que me impulsan a ser mejor en todos los sentidos de la vida.

Gracias por su comprensión, amor y fuerza.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Nágila por me ensinar a insistir e persistir diante de qualquer dificuldade, e me lembrar que não é a meta, mas o caminho que nos faz crescer na vida.

A TODAS as alunas da Profa. Nágila: Patrícia, Camila, Thaís, Caroline, Marlene, Mariana, Alexandra, Flávia, Laura e Irene, pela sua amizade e por termos compartilhado esses anos de vida acadêmica, de aprendizado e descobertas.

À professora Denise Cyrillo, da Faculdade de Economia, que me acolheu no começo do mestrado.

À professora Sayuri Miyamoto, do Instituto de Química, aos seus alunos e à técnica Zilda, que souberam me receber desde o treinamento técnico até as análises do mestrado.

À professora Dulcineia Abdalla da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela doação dos anticorpos utilizados nas análises de LDL(-).

A Liania Luzia, da Faculdade de Saúde Pública, pela sua disposição e alegria.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa concedida para meu mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa – FAPESP, ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fluidos Complexos – INCT-FCx e ao Núcleo de Pesquisa em Fluidos Complexos – NAP-FCx, por todo o subsídio financeiro ao projeto do Cardionutri.

E a todos que de uma ou outra maneira estiveram ao meu lado me incentivando para concluir mais uma etapa da vida.

“¿Qué le puede pasar a un ser humano, que no le pueda pasar a un ser humano?”
Anaxágoras

RESUMO

ESTEVEZ, D **Influência do ω -3 sobre a lipoproteína de baixa densidade eletronegativa [LDL(-)], anticorpos LDL(-) e tamanho das partículas de LDL em indivíduos com síndrome metabólica.** [Defesa de Mestrado] Programa de Pós-graduação Interunidades em Nutrição Humana Aplicada PRONUT. Universidade de São Paulo. Brasil; 2015.

Introdução A Síndrome Metabólica (SM) representa um conjunto de fatores que determinam maior risco para Doença Cardiovascular (DCV), devido principalmente à Resistência à Insulina (RI) e ao estado inflamatório promovido pelo tecido adiposo branco hipertrofiado. Nesse contexto, a condição de dislipidemia favorece o desenvolvimento da aterosclerose, devido a que maiores concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no plasma podem propiciar modificações nessas partículas. Essas modificações podem ter origem oxidativa ou não oxidativa e impactar nas características aterogênicas da LDL. O ômega três tem mostrado efeitos hipolipemiantes e anti-inflamatórios, que podem reduzir o risco cardiovascular de indivíduos com SM. **Objetivo:** avaliar o efeito da suplementação de 3g de ω -3 por um período de oito semanas sobre a concentração plasmática das partículas de LDL eletronegativas [LDL(-)] e seus anticorpos, assim como monitorar possíveis mudanças nas concentrações das subfrações da LDL. **Metodologia:** Foram incluídos 115 participantes de ambos os sexos, entre 30 e 74 anos, com SM, separados nos grupos de intervenção com ω -3 (n=58) e controle com ω -9 (n=57). Foram realizadas análises de perfil lipídico e por meio de ELISA foram avaliadas a concentração de LDL(-) e de antiLDL(-) no plasma dos participantes. O tamanho das subfrações de LDL foi realizado no sistema Lipoprint. O efeito do tempo e das intervenções foi testado por meio do programa SPSS versão 20.0, adotando-se o concentração de significância de $p<0,05$. **Resultados:** A suplementação de ω -3 teve efeito significativo na redução do % de massa grassa (%MG) e na pressão arterial sistólica (4%) e diastólica (5%). Em relação ao perfil lipídico, ambas intervenções tiveram efeitos significativos de redução de colesterol total (CT), LDL-c, não HDL (nHDL) e triacilglicerois (TG). As concentrações plasmáticas de LDL(-) dos participantes que tomaram ômega 3 apresentaram redução de 21%, enquanto que os que tomaram ômega 9 tiveram redução de 1%. Tal redução foi significativa em relação ao tempo de intervenção ($p<0,05$), mas não quando o efeito da intervenção foi avaliado. Perfil semelhante foi observado para a razão LDL(-)/antiLDL(-), observou-se redução de 22% no grupo ômega 3 e redução de somente 3% no grupo ômega 9. **Conclusão:** A intervenção com ômega 3 promoveu redução na concentração plasmática de LDL(-), porém não modificou a concentração do anticorpo antiLDL(-) nem o tamanho das subfrações da LDL.

Palavras- chave: omega 3, omega 9, síndrome metabólica

ESTEVEZ, D.G. Influence of ω -3 over electronegative low density lipoprotein [LDL(-)] plasma concentrations, antiLDL(-) and LDL particles in individuals with metabolic syndrome [Master's Degree] Interdisciplinary Post-graduation Program PRONUT in Applied Human Nutrition. São Paulo University. Brazil; 2015

ABSTRACT

Introduction: The Metabolic Syndrome (MetS) is a combination of factors that determine increased risk for Cardiovascular Diseases (CVD), mainly because of Insulin Resistance (IR) and the inflammatory state promoted by the hypertrophied white adipose tissue. Under this background, the dyslipidemic condition goes together with the developing of atherosclerosis, meaning that higher concentrations of low density lipoprotein (LDL) in plasma promote modifications from different sources in these particles and may have an impact over LDL subfractions, turning them more atherogenic. Omega three has proved hypolipidemic and anti-inflammatory effects, which may reduce cardiovascular risk in MetS individuals. **Objective:** evaluate the effect of 3g of fish oil supplementation, 60% EPA and DHA for an eight week period over plasma concentrations of electronegative LDL particles [LDL(-)] and its antibodies, as well as monitoring possible changes in LDL subfractions. **Methods:** A total number of 115 participants, both sexes, between 30 and 74 years of age, with MetS, were included and separated in the intervention group receiving omega 3 (n=58) and the placebo group with omega 9 (n=57). Biochemical analyses were carried out using ELISA for LDL(-) and antiLDL(-) in plasma. Particle sizes were measured using the Lipoprint system. The effects of time and intervention were analyzed using the statistical program SPSS 20.0, assuming $p < 0.05$ as significant. **Results:** Omega 3 supplementation had a significant effect in the reduction of fat mass percentage (FM%) and blood pressure, showing a 4% decrease for systolic and 5% decrease for diastolic pressures respectively. Considering the lipid profile, both interventions had significant effects reducing total cholesterol (TC), LDL-c, not HDL (nHDL) and triacylglycerides (TG). LDL(-) plasma concentrations from the omega 3 group showed 21% reduction while the omega 9 group had only 1% reduction. Such difference was significant considering time ($p < 0.05$), but not while comparing the intervention effect. There was also a change in the antiLDL(-) antibodies; reducing 2% in the omega 3 group and increasing 1% in the omega 9 group. However, those differences were not significant. Similar effects were observed in LDL(-)/antiLDL(-) ratio, showing 22% decrease in the omega 3 group and only 3% in the omega 9 group. **Conclusion:** Omega 3 intervention promoted a significant reduction in plasmatic LDL(-), however, it didn't modify LDL subfraction distribution.

Keywords: omega 3, omega 9, metabolic syndrome

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Síndrome Metabólica e Doenças Cardiovasculares	1
1.2	Fisiopatologia da SM	4
1.3	Lipoproteínas.....	9
1.4	Metabolismo das lipoproteínas.....	11
1.5	Aterosclerose na SM.....	16
1.6	LDL modificadas.....	18
1.7	Ômega 3: (ω -3)	22
2	JUSTIFICATIVA	25
3	HIPOTESE	26
4	OBJETIVO	27
5	MÉTODOS.....	28
5.1	Casuística	28
5.2	Cálculo Amostral.....	28
5.3	Análise de riscos e benefícios.....	29
5.4	Delineamento Clínico do Estudo	29
5.5	Crterios de Inclusão	31
5.6	Crterios de Não Inclusão	32
5.7	Avaliação Socioeconômica e Clínica	32
5.8	Avaliação Antropométrica.....	32
5.9	Classificação de SM	34
5.10	Avaliação do Consumo Alimentar	35
5.11	Avaliação da Atividade Física Habitual	35
5.12	Estratificação do Risco Cardiovascular	36
5.13	Avaliação Bioquímica.....	36
5.13.1	Obtenção de sangue.....	36
5.13.2	Marcadores do metabolismo lipídico.....	36

5.13.3	Análise da concentração de ácidos graxos plasmáticos.....	37
5.13.4	Detecção de LDL(-) no plasma	38
5.13.5	Detecção anti LDL(-) no plasma.....	38
5.13.6	Tamanho das Lipoproteínas LDL	39
5.14	Análises Estatísticas.....	40
5.15	Aspectos éticos.....	40
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.1.1	Caracterização da amostra e perfil clínico	41
6.1.2	Características Antropométricas	44
6.1.3	Efeito da suplementação em parâmetros antropométricos e clínicos	45
6.1.4	Efeitos da suplementação na concentração plasmática da LDL e suas subfrações	48
6.1.5	Efeitos da suplementação na LDL(-) e no antiLDL(-)	51
6.1.6	Avaliação do consumo alimentar e de atividade física	53
7	CONCLUSÕES.....	56
8	BIBLIOGRAFIA	57
9	ANEXOS.....	69
9.1	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	69
9.2	Formulário de Identificação e Avaliação Sócio-Econômica, Cultural e de Saúde do Paciente 71	
9.3	Recordatório 24 horas.....	74
9.4	Modelo de Recordatório alimentar 24 horas.....	76
9.5	Questionário de Atividade Física Habitual	77
9.6	Escore de Risco de Framingham – ERF.....	80
9.7	Comité de Ética.....	86

Lista de figuras

Figura 1: Efeitos da SM em diferentes tecidos.....	5
Figura 2: Inflamação na Obesidade.....	7
Figura 3: Classificação e características das Lipoproteínas.....	10
Figura 4: Metabolismo das Lipoproteínas.....	12
Figura 5: Etiologia da Aterosclerose.....	17
Figura 6: Vias de modificação da LDL(-) no processo de aterosclerose.	19
Figura 7: Papel das Lipoproteínas com Imunocomplexos Circulantes na aterosclerose.	21
Figura 8: Efeitos do w-3 em vias moleculares.....	23
Figura 9: Delineamento clínico do estudo.....	30
Figura 11: Separação das Lipoproteínas por densidade através de eletroforese em gel (Lipoprint). ..	39
Figura 12: Fluxograma do número de participantes no presente estudo, segundo intervenção.....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1 Critérios para diagnóstico da SM em adultos	3
Tabela 2: Estudos de intervenção com ω -3 vs ω -9	31
Tabela 3: Valores de referência para IMC de adultos e idosos.	33
Tabela 4: Pontos de corte para classificação de CC.	33
Tabela 5: Critérios para classificação da Síndrome Metabólica.	34
Tabela 6: Caracterização dos participantes no estudo, segundo intervenção.	42
Tabela 7: Prevalência de doenças crônicas auto referidas, segundo intervenção.	42
Tabela 8: Prevalência de uso de medicamentos, segundo intervenção.	43
Tabela 9: Antecedentes familiares de doenças crônicas, segundo intervenção.....	43
Tabela 10: Classificação antropométrica e de composição corporal, segundo intervenção.	44
Tabela 11: Modificações em componentes antropométricos, de pressão arterial, controle glicêmico e perfil lipídico, segundo tempo e tipo de intervenção	47
Tabela 12: Distribuição de subfrações de LDL, segundo tempo e intervenção.	50
Tabela 13: Efeito da suplementação na LDL(-) e na LDL(-)/antiLDL(-), segundo tempo e intervenção.	51
Tabela 14: Consumo alimentar e atividade física segundo tempo e tipo de intervenção.....	54

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Prevalência de parâmetros para diagnóstico de SM na amostra total.	44
Gráfico 2: Valores de %MG após 8 semanas de suplementação, segundo intervenção.	45

Abreviaturas

%MG: Percentual de Massa Gorda	LDLox: LDL oxidada
ABCA1: <i>ATP Binding Cassete transporter A1</i>	sdLDL: LDL pequena e densa
ACAT: Acil CoA Colesterol Transferase	LH: Lipase Hepática
ALA: Ácido Alfa Linolênico	LOX-1: Receptor de LDLox semelhante à lectina 1
BHT: 2,6 di-tert-butil-p-hidroxitolueno	LPL: Lipase de Lipoproteína
CC: Circunferência de Cintura	Lp-PLA2: Fosfolipase A ₂ Associada à Lipoproteína
Células NK: Natural Killer	LT: Leucotrienos
Células NKT: Natural T Killer	MAB: Anticorpo Monoclonal
CETP: Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol	MCP-1: Proteína Quimiotática de Monócitos
COEP: Comitê de Ética em Pesquisa	MIF: Fator de Inibição para Migração
COX: Enzima cicloxigenase	mRNA: RNA mensageiro
cPLA2: Fosfolipase citosolica A ₂	FFAs: Ácidos graxos livres ou não esterificados
CT: Colesterol Total	NF-KB: Fator Nuclear kappa B
DCV: Doença Cardiovascular	nHDL: não HDL
DHA: Ácido Docosaexaenoico	NPC1L1: Proteína Niemann Pick C1 like
DLP: Dislipidemia	OMS: Organização Mundial da Saúde
DM: Diabetes Mellitus tipo 2	ONU: Organização das Nações Unidas
DNA: Ácido Desoxiribonucleico	PBS: Solução Salina de Fosfato
EDTA: Ácido Etileno diaminotetraacético	PCR: Proteína C Reativa
ELISA: Imunoensaio por adsorção de enzimas	PG: Prostaglandinas
EPA: Ácido Eicosapentaenoico	PLTP: Proteína de Transferência de Fosfolipídios
ERF: Escore de Risco de Framingham	PPAR: Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomo
FAD: Desaturase de Ácidos Graxos	PUFA: Ácidos Graxos Poli-insaturados
FCF: Faculdade de Ciências Farmacêuticas	R24h: Recordatório de 24 horas
FGF: Fator de crescimento de fibroblastos	RI: Resistência à Insulina
FPLC: Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas	RXR: Receptores X de Retinóides
FSP: Faculdade de Saúde Pública	SBC: Sociedade Brasileira de Cardiologia
HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica	SM: Síndrome Metabólica
HDL: Lipoproteína de Alta Densidade	SNC: Sistema Nervoso Central
HDL-c: HDL colesterol	SPSS: Programa Estatístico para Ciências Sociais
HIF: Fator Induzido por Hipóxia	SR: Receptor <i>Scavenger</i>
HNF: Fatores Nucleares Hepáticos	SREBP: Proteína Regulatória de Esterol
ICAM: Molécula de Adesão Intercelular	T0: Tempo Zero – estado basal
IDL: Lipoproteína de Densidade Intermediária	T8: Tempo Oito – após oito semanas de intervenção
IG: Intolerância à Glicose	TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
IL: Interleucinas	TLR4: Receptores Toll Like 4
JNK: C-Jun N terminal Quinase	TMB: Tetrametilbenzina
LA: Ácido Linoleico	TNF: Fator de Necrose Tumoral
LCAT: Lecitina Colesterol Acil Transferase	VCAM: Molécula de Adesão de Célula Vascular
LDL(-): LDL eletronegativa	VLDL: Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade	
LDL-CIC: Imunocomplexos com LDL Circulantes	

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Síndrome Metabólica e Doenças Cardiovasculares*

A Síndrome Metabólica (SM) constitui um conjunto de fatores que podem ser associados independentemente com risco aumentado para doença cardiovascular (DCV), destacando o acúmulo central de gordura, resistência à insulina (RI), intolerância à glicose (IG), hipertensão arterial sistêmica (HAS), elevadas concentrações plasmáticas de triacilgliceróis (TG) e baixas concentrações plasmáticas de lipoproteína de alta densidade (HDL) (GRUNDY, 2008; IDF, 2005; NHLBI-ATPIII, 2004). A Tabela 1 apresenta os critérios para diagnóstico da SM em adultos propostos por diferentes instituições (**Tabela 1**). Embora a literatura apresente diversas propostas de diagnóstico da SM, foi publicado um consenso que considera a presença de três desses fatores (ALBERTI et al., 2009).

A incidência da SM em diferentes populações é influenciada pela idade, o sexo, a etnia, variantes genéticas e programação intra-uterina. Adicionalmente, fatores ambientais tais como atividade física, estado nutricional ao longo da vida, (desnutrição ou excesso da oferta de nutrientes mediante ingestão que supera o gasto energético total do indivíduo), alto consumo de gorduras saturadas ou carboidratos simples, alcoolismo, tabagismo, estresse emocional, questões socioeconômicas e o próprio estilo de vida, terão impacto na prevalência da SM (NAJAFIAN et al., 2014; SYMONDS et al., 2009; SALAS-SALVADÓ et al., 2008; GALLOU-KABANI e JUNIEN, 2005; FORD et al., 2005; GAGLIARDI, 2004).

Historicamente, Reaven e Chen (1988) observaram que dislipidemia, hipertensão e hiperglicemia apresentavam-se simultaneamente, aumentando o risco para doença cardiovascular e propuseram o nome de Síndrome X para denominar esse conjunto de alterações. Posteriormente destacou-se a importância da resistência à insulina (RI) no desenvolvimento do Diabetes Mellitus (DM) tipo 2 e sua relação com o metabolismo lipídico e, particularmente o aumento das concentrações de ácidos graxos livres (FFA), nomeando então tal conjunto de fatores como Síndrome da Resistência à Insulina. Inclusive, houve a proposta de chamar à hipertensão junto com a resistência à insulina, a dislipidemia e a hiperglicemia como o Quarteto da morte. Finalmente, em 1998 a OMS propôs o nome de Síndrome Metabólica e estabeleceu parâmetros e alguns pontos de corte para padronização em estudos populacionais (CAMERON, 2004).

A partir do incremento na expectativa de vida ao nível mundial, a importância do estudo da SM adquiriu maior ênfase, destacando seu papel no contexto das DCV, devido a que duplica o risco de apresentar eventos cardiovasculares (REAVEN, 1988; CAMERON, 2004; OMS, 2011).

Dados epidemiológicos de alguns países confirmam que entre os Americanos, Europeus e Indianos, pelo menos um de cada quatro adultos apresenta SM (GRUNDY, 2008). Desta maneira, quanto maior a prevalência de SM em uma população, maior será a incidência de mortes provocadas por DCV, as quais foram responsáveis em 2005 por 30% do total das mortes no mundo e são a primeira causa de morte entre adultos e idosos (OMS, 2011).

No Brasil, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, as DCV foram responsáveis por 33% das mortes em 2011. Nesse ano, 4% das mortes no país foram provocadas por Hipertensão (HAS) e 4,8% por Diabetes Mellitus (DM) (OPAS, 2012). É importante salientar que muitos desses fatores de risco para DCV podem ser prevenidos com mudanças no estilo de vida (SALAS-SALVADÓ et al., 2008; FORD et al., 2005; GAGLIARDI, 2004)

Tabela 1 Critérios para diagnóstico da SM em adultos

Critérios	Descrições	Glicemia de jejum	Pressão arterial	Triacilglicerois	Obesidade central	Microalbuminúria	HDL-C
WHO	Intolerância à glicose; RI ou DM e dois fatores	Captação de glicose abaixo do menor quartil para a população em investigação	≥ 140/ 90 mmHg	≥ 150mg/dL	RCQ > 0,90 ♂ > 0,85 ♀ ou IMC ≥ 30 kg/m ²	Excreção urinária ≥ 20 µg/min ou albumina:creatinina ≥ 30 mg/g	< 35 mg/dL ♂ < 39 mg/dL ♀
EGIR	RI e dois fatores	≥ 110mg/dL e não DM	≥ 140/ 90 mmHg ou TM	> 178mg/dL ou em tratamento	CC ≥ 94cm ♂ ≥ 80cm ♀	-	< 39mg/dL
ATP III	Três fatores	> 110mg/dL	>130/ 85 mmHg	> 150 mg/dL	CA > 102cm ♂ > 88cm ♀	-	< 40 mg/dL ♂ < 50 mg/dL ♀
AHA e NHLBI	Três fatores	≥ 100mg/dL ou TM	≥ 130/ 85 mmHg ou TM	≥ 150 mg/dL ou TM	CA > 102cm ♂ > 88cm ♀	-	< 40 mg/dL ♂ < 50 mg/dL ♀
IDF	Obesidade central por CC e dois fatores	≥ 100mg/dL ou DM2	≥ 130/ 85 mmHg ou TM	≥ 150 mg/dL ou TM	CC ≥ 94cm ♂ ≥ 80cm ♀	-	< 40 mg/dL ♂ < 50 mg/dL ♀ ou TM

WHO: World Health Organization; EGIR: European Group for the Study of Insulin; ATP III Adult Treatment Panel III; AHA: American Heart Association; NHLBI: National Heart, Lung, and Blood Institute; IDF: International Diabetes Federation; RI: Resistência à insulina; DM: Diabetes melitus; RCQ: Relação Cintura/Quadril; CC: Circunferência da Cintura; CA: Circunferência Abdominal; TM: tratamento medicamentoso.

Fonte: SAMPAIO, H. A. C et al., Nutrição em Doenças Crônicas: Prevenção e Controle. 2013 p. 159

A Organização das Nações Unidas (ONU) projetou que para 2050 a população mundial poderá crescer em mais dois bilhões de pessoas (OMS, 2011). E algumas estimativas mostram que, para 2030, essas doenças permanecerão a principal causa de morte no mundo, estimando-se que 23,3 milhões de pessoas morrerão por esse motivo (MATHERS, 2006). Destaca-se que, atualmente, mais de 80% das mortes por DCV acontecem em países de baixa e média renda e afetam em igual proporção a homens e mulheres (ABEGUNDE, 2006), porém, dados representativos da população que descrevam a prevalência da SM são escassos (GRUNDY, 2008; ALWAN, 2010).

As DCV incluem as doenças relacionadas com o coração e os vasos sanguíneos, tais como a doença coronariana, doença vascular cerebral, doença arterial periférica, doença reumática do coração, cardiopatias congênitas e trombose pulmonar, e não afetam unicamente à saúde pública, mas também têm um inegável impacto na economia mundial, devido aos elevados custos de consultas, internações e tratamentos. No Brasil, as DCV representaram em 2004 um custo direto anual de 11 bilhões de reais, distribuídos entre os setores: público (48%), de saúde suplementar (19%) e desembolso direto (33%) (AZAMBUJA, 2008). Portanto, os investimentos em pesquisa para prevenir efetivamente os fatores que levam à SM, têm por objetivo evitar incrementos nas despesas nos orçamentos das famílias, das empresas e dos governos com gastos em longos tratamentos ou intervenções cirúrgicas invasivas e de alto risco.

Considerando esse cenário, diversos estudos têm buscado ampliar os atuais conhecimentos sobre a fisiopatologia da SM, avaliando o efeito metabólico dos estados de RI, hiperglicemia, dislipidemia, HAS e acúmulo de adiposidade abdominal nos mecanismos de regulação homeostática ao longo dos anos. Novas abordagens propõem estabelecer relações entre inflamação e estresse oxidativo, avaliar concentração das subfrações de lipoproteínas ou inclusive medir biomarcadores de resposta imune para propor alternativas de intervenção sendo a Nutrição uma importante ferramenta de prevenção (DUTHEIL et al., 2014; SIQUEIRA, 2006).

1.2 Fisiopatologia da SM

Os diversos componentes da SM exercem efeito negativo e isolado sobre o desenvolvimento das DCV. Entretanto, a incidência simultânea desses fatores aumenta o risco de eventos cardiovasculares, fatais ou não.

Os efeitos são sistêmicos, conforme apresentados de maneira resumida na **Figura 1**. De uma maneira geral, no cérebro e no tecido adiposo por exemplo, ocorre a desregulação das respostas fisiológicas que mantém a sensibilidade à insulina e à leptina. Em paralelo, o acúmulo de lipídios no tecido muscular contribui para o desenvolvimento de lipotoxicidade, que promove a manutenção da RI. Nas ilhotas pancreáticas, ocorre apoptose das células β devido à inflamação mediada pelo aumento de citocinas circulantes e proteínas de fase aguda como *Proteína C Reativa* (PCR), recrutamento de leucócitos para os tecidos, ativação de moléculas de adesão, estresse metabólico, RI e resposta de reparação seguida de fibrose (FERNANDEZ et al., 2013; LUMENG et SALTIEL, 2011).

Especificamente, no sistema nervoso central, metabólitos como diacilgliceróis ou ceramidas são acumulados no hipotálamo, induzindo resistência à leptina e RI, aumentando a sensação de fome, estimulando maior consumo de alimentos e armazenamento de nutrientes. Muitos desses efeitos são gerados pela ativação do sistema nervoso simpático, que provoca resposta inflamatória no tecido adiposo. As vias da JNK e do NF- κ B são ativadas modulando diretamente a transcrição de genes relacionados com a inflamação. Tal inflamação no hipotálamo afeta também a liberação de insulina pelas células β , reduz a ação periférica da insulina e estimula o aumento da pressão arterial (LUMENG et SALTIEL, 2011).

Figura 1: Efeitos da SM em diferentes tecidos.

RI: resistência à insulina; DLP: dislipidemia; HAS: hipertensão arterial sistêmica. Adaptado de LUMENG & SALTIEL, (2011).

O estado de hiperinsulinemia compensatória resultante da ativação das vias de sinalização citadas acima servirá de estímulo para maior produção de triacilglicerois (TG) no fígado e, conseqüentemente, hipertriacilgliceridemia, que pode ser relacionada com maior armazenamento de gorduras no tecido adiposo, hiperleptinemia e desenvolvimento de resistência à leptina. A resistência à insulina também se relaciona com a hipertensão essencial (REAVEN, 1988; BRAY 2004; FORD, 2005; ROSEN et SPIEGELMAN, 2013).

A importância de considerar a circunferência de cintura (CC) dentro da SM se deve ao fato do tecido adiposo é ser metabolicamente ativo que atua na termogênese metabolizando glicose e corticosteroides. O tecido adiposo está formado por pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, adipócitos e células imunes, e é reconhecido como um órgão endócrino que se comunica com o SNC e os tecidos periféricos ao secretar adipocitocinas que regulam o apetite e o metabolismo energético (LAZAR, 2005; ROSEN et SPIEGELMAN, 2013, McARDLE, 2013).

Porém, nesse estado de balanço energético positivo, o tecido adiposo passa por um remodelamento através do recrutamento de pré-adipócitos, hipertrofia de adipócitos e infiltração de macrófagos (LAZAR, 2005; SUGANAMI et OGAWA, 2010) (**Figura 2**). A demanda de oxigênio do tecido em expansão será maior do que a sua disponibilidade e por esse motivo a pressão de oxigênio se encontrará reduzida, estimulando a produção de *Fatores Induzidos por Hipóxia 1 alfa* (HIF-1 α). Esses estímulos favorecem o processo de angiogênese (McARDLE et al., 2013; LUMENG et SALTIEL, 2011), onde os pré-adipócitos passam a secretar o *Fibroblast growth factor beta e Fibroblast growth factor 2* (bFGF/FGF-2) que promove o crescimento de células vasculares (FERNANDEZ et al., 2013; McARDLE et al., 2013; GREGOR et HOTAMISLIGIL, 2011; SUGANAMI et OGAWA, 2010).

Figura 2: Inflamação na Obesidade.

TNF α : fator de necrose tumoral; IL: interleucina; FFAs: Ácidos graxos Livres; MCP-1: proteína quimiotática para monócitos; MIF: fator de inibição da migração; LPS: lipopolissacarídeos. Adaptado de Mc ARDLE et al. (2013).

Esses adipócitos hipertrofiados liberam ácidos graxos livres ou não esterificados (FFA), os quais têm ação parácrina nos receptores *Toll Like 4* (TLR4) dos macrófagos, estimulando a secreção de citocinas inflamatórias, incluindo interleucinas ($IL-6$ e $IL-1\beta$) e *Fator de Necrose Tumoral Alfa* ($TNF\alpha$). Esses eventos estimulam a infiltração exacerbada de leucócitos que favorecem o acúmulo de linfócitos T e a inibição de células T reguladoras. Ao mesmo tempo, os FFA vão inibir as vias de sinalização da insulina contribuindo ainda mais para a RI e retroalimentando as vias inflamatórias. Também estão envolvidas células *Natural Killer* (NK) e *Natural Killer T* (NKT), além de mastócitos (McARDLE et al., 2013; ROSEN et SPIEGELMAN, 2013; SUGANAMI et OGAWA, 2010). Os lipopolissacarídeos LPS produzidos pela microbiota intestinal, também são reconhecidos pelos TLR4 e retroalimentam a inflamação crônica nos pacientes obesos (JAYASHREE, 2013; CANI et al., 2007).

Os adipócitos têm seu próprio ciclo de vida, que termina por necrose ou apoptose. Os macrófagos do tipo M1 e M2 englobam esses adipócitos e secretam compostos quimiotáticos como a *Proteína Quimiotática para Monócitos* (MCP-1) e *Fator de Inibição da Migração* (MIF), indicando o local de lesão tecidual e estimulando o recrutamento de mais macrófagos (JAYASHREE et al., 2013; SUGANAMI et OGAWA, 2010; CANI, 2007).

As adipocitocinas produzidas pelo tecido adiposo também se encontram em desequilíbrio na SM onde haverá hiperleptinemia e hipoadiponectinemia (ROSEN et SPIEGELMAN, 2013).

Altas concentrações de leptina estão associadas positivamente com SM e DM. Essa proteína é produzida principalmente pelo tecido adiposo e tem várias funções tais como evitar o depósito de ácidos graxos em outros tecidos, regular a atividade de grupos de neurônios relacionadas com ingestão alimentar, promover a sensação de saciedade, estimular o crescimento, a fertilidade e a inflamação. Cabe ressaltar que em mulheres, a produção de leptina é três vezes maior que em homens (CAMPFIELD et al., 1996; FERNANDEZ et al, 2013).

Ao contrário, a adiponectina é uma proteína que melhora a sensibilidade à insulina e está inversamente relacionada com DM e SM; apresenta efeitos anti-inflamatórios e antiateroscleróticos, aumentando a oxidação de ácidos graxos e reduzindo a esteatose hepática (FERNANDEZ et al., 2013; et KWAK, 2014; FINELLI et TARANTINO, 2013)

Estudos mais recentes relacionam a SM e suas comorbidades com um estado pró-inflamatório e pró-trombótico que pode incluir concentrações plasmáticas elevadas de PCR, interleucinas e citocinas, além de disfunção endotelial, agregação plaquetária, elevadas concentrações de ácido úrico, microalbuminúria e maiores concentrações de lipoproteína de baixa densidade pequena e densa (sdLDL) (IDF, 2005; BRAY, 2005; SIQUEIRA, 2006; GREGOR et HOTAMISLIGIL, 2011)

1.3 Lipoproteínas

As lipoproteínas são partículas estrutural e funcionalmente complexas cujos componentes lipídicos e lipossolúveis permanecem em constante processo de transferência entre as diversas lipoproteínas e entre os tecidos, transportando componentes não polares, colesterol esterificado e triacilgliceróis de origem exógena e endógena (SIQUEIRA, 2006; CAMPOS, 2005; COX et GARCIA-PALMIERI, 1990). Geralmente sua estrutura é esférica; apresentam elevado peso molecular, sendo sua solubilidade dependente de seu componente apolipoproteico (FORTI, 2007; CAMPOS, 2005).

As primeiras descobertas em relação das lipoproteínas começaram entre 1930 -1950, quando *Gofman et al*, em 1949, estabeleceram a ultracentrifugação como método de detecção das lipoproteínas plasmáticas e as classificaram, segundo suas densidades desde 0,99 g/ml, a menos densa, o Quilomicron até 1,21 g/ml a mais densa, a *High Density Lipoprotein* – HDL. Em 1955, Havel, Eder e Bragdon implementaram uma técnica mais simples e melhor adaptada, que ainda hoje é referência no isolamento de lipoproteínas, e introduziram dentro da classificação a *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) (CAMPOS, 2005).

Sendo assim, as lipoproteínas do plasma são classificadas (**Figura 3**), segundo sua densidade, diâmetro, conteúdo relativo de colesterol e triacilgliceróis e suas proteínas estruturais (HUSSAIN, 2014; FORTI, 2007; SIQUEIRA, 2006). Na eletroforese, cada tipo de lipoproteínas tem diferente mobilidade eletroforética.

Lipoproteína	Densidade	Diâmetro	Lípidos prevalentes	Conteúdo		Apolipoproteínas	
Quilomicron	<0,950 g/mL	80-1000 nm	triacilgliceróis da dieta	Proteína	~1%	: B48, A1, A2, C, E
				Triacilgliceróis	~90%		
				Colesterol	~5%		
				Fosfolípidos	~4%		
VLDL	0,950-1,006 g/mL	30 - 80 nm	triacilgliceróis endógenos	Proteína	~10%	: B100, C, E
				Triacilgliceróis	~65%		
				Colesterol	~13%		
				Fosfolípidos	~13%		
IDL	1,006 - 1,018 g/mL	25 - 30 nm	triacilgliceróis endógenos e colesterol	Proteína	~18%	: B100, C, E
				Triacilgliceróis	~34%		
				Colesterol	~22%		
				Fosfolípidos	~22%		
LDL	1,019 - 1,063 g/mL	20 - 22 nm	colesterol e ésteres de colesterol	Proteína	~20%	: B100,
				Triacilgliceróis	~10%		
				Colesterol	~45%		
				Fosfolípidos	~25%		
HDL	1,063-1,090 g/mL	9 - 15 nm	ésteres de colesterol e fosfolípidos	Proteína	~50%	A1, A2, C, E
				Triacilgliceróis	~20%		
				Colesterol	~18%		
				Fosfolípidos	~30%		

Figura 3: Classificação e características das Lipoproteínas.

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; IDL: lipoproteína de densidade intermédia; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade. Adaptado de SIQUEIRA et al. (2006)

1.4 Metabolismo das lipoproteínas

As lipoproteínas estão envolvidas em um ciclo muito dinâmico e complexo que se inicia com a absorção intestinal dos lipídios provenientes da dieta: ésteres de colesterol, fosfolipídios e triacilgliceróis, os quais são emulsificados pela bile e hidrolisados por diferentes lipases presentes no lúmen intestinal produzindo ácidos graxos livres, colesterol, lisofosfolipídios, e monoacilgliceróis (HUSSAIN, 2014).

Na borda em escova do intestino delgado, essa absorção pode ocorrer por difusão ou ser mediada pela proteína *Niemann Pick C1 like 1* (NPC1L1), presente na membrana dos enterócitos e que atua como transportador para a absorção do colesterol (ALTMAN et al. 2004).

No retículo endoplasmático das células epiteliais do intestino delgado vão sendo sintetizados os quilomicrons, os quais são transportados dentro do sistema linfático e entram na circulação pela veia subclavicular esquerda. As apolipoproteínas do Quilomicron incluem apoB-48, que é exclusiva a este tipo de lipoproteína e adquirem a apoE, apoC-III e apoC-II das HDL, que também podem transferir aos quilomicrons os seus ésteres de colesterol e seus fosfolipídios (HUSSAIN, 2014; FORTI, 2007).

A apoC-II dos quilomicrons ativa a lipase de lipoproteína (LPL) nos capilares dos tecidos: adiposo, cardíaco, esquelético e mamário e permite a hidrólise de triacilgliceróis e a liberação de ácidos graxos livres para esses tecidos (MEAD, 2002).

Os remanescentes com grande conteúdo de colesterol, apoE e apoB-48 chegam ao fígado (**Figura 4**). Nos hepatócitos, os receptores de apoE se ligam aos quilomicrons mediando sua endocitose, para assim liberar o seu conteúdo de colesterol e ser degradados nos lisossomos (HUSSAIN, 2014; FORTI, 2007; ALDONS et PAIVI, 2008).

Desta maneira, no fígado, os ácidos graxos livres formam triacilgliceróis e são empacotados dentro das VLDL. Essa lipoproteína é composta por apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III e apoE, além de triacilgliceróis, colesterol e ésteres de colesterol e são transportadas desde o fígado até os tecidos periféricos, onde a ativação da LPL pela ação da apoC-II, promove a liberação dos ácidos graxos da VLDL para os adipócitos, que os reesterificam como triacilgliceróis e os armazenam sob a forma de

gotículas lipídicas ou serão substratos energéticos em outros tecidos (SHEARER, 2011; COX et GARCIA-PALMIERI, 1990).

Alguns dos remanescentes das VLDL retornam ao fígado, onde são reconhecidos pelo receptor B/E, que internaliza a partícula lipoproteica nos hepatócitos. A VLDL circulante é constantemente remodelada por meio da doação e captação de novos componentes lipídicos. Esse processo favorece a formação da lipoproteína de densidade intermediária (IDL). As partículas de IDL são convertidas rapidamente em lipoproteínas de baixa densidade (LDL).

Figura 4: Metabolismo das Lipoproteínas.

HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; IDL: Lipoproteína de densidade intermediária; VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade; Apolipoproteínas: A I, A II, A IV, A V, B 48, B 100, C, E. LCAT: Lecitina colesterol acil transferase; CETP: Proteína de transferência de ésteres de colesterol; PLTP: Proteína de transferência de fosfolípidios; LPL: Lipase de lipoproteína; LP(a): Lipoproteína A , TG: Triacilgliceróis; CE: Ésteres de colesterol; ABCA1: Proteína ligante transportadora de ATP, LE: Lipase endotelial, CD36: receptor tipo scavenger; B/E-R: receptor para apoB e apoE; PCSK9: Proteína conversora SK tipo 9. Adaptada de ALDONS e PAIVI (2008).

No endotélio encontra-se uma lipase específica, a lipase endotelial (LE) que tem a mesma função da LPL, permitindo a hidrólise de triacilgliceróis que são transportados nas partículas de LDL, muito ricas em colesterol e ésteres de colesterol, que contém predominantemente a apolipoproteína

ApoB-100. Sua função é o transporte do colesterol para os tecidos que possuem um receptor de membrana específico para apoB-100 e apoE (Receptor B/E). Quando as apolipoproteínas da LDL se ligam ao seu receptor, inicia-se a endocitose da partícula dentro de um endossomo, que pode se unir a um lisossomo com enzimas que hidrolisam os ésteres de colesterol, liberando colesterol, ácidos graxos e aminoácidos da apolipoproteína no citosol. Geralmente o receptor não é degradado e retorna à membrana celular para novamente reconhecer outra partícula de LDL (FORTI, 2007; PARADIS, 2006; MEAD, 2002).

O colesterol que entra na célula por esta via poderá ser incorporado nas membranas, utilizado na produção de hormônios esteroides, na síntese de ácidos graxos biliares ou reesterificado pela *Acyl-CoA:cholesterol Acyl transferase* (ACAT), seguido do armazenamento em gotículas lipídicas no citoplasma (HUSSAIN, 2014).

Por outro lado, a HDL é produzida no fígado e no intestino delgado. Suas apolipoproteínas são apoA-I, apoC-I, apoC-II e outras em menor proporção (HUSSAIN, 2014; FORTI, 2007). A HDL possui, em relação percentual, mais proteína do que as outras lipoproteínas, sendo a de menor tamanho.

A HDL apresenta a *Proteína de Transferência de Lipídios* (PLTP) que facilita a transferência dos fosfolipídios dos quilomicrons e das VLDL remanescentes e a enzima *Lecitina Colesterol Acil Transferase* (LCAT), que catalisa a formação de ésteres de colesterol a partir da lecitina e do colesterol. Desta maneira é formado seu envoltório, mudando a conformação discoide da HDL nascente em uma HDL madura, de forma redonda que retorna ao fígado para liberar o seu conteúdo de colesterol, que poderá ser convertido em ácidos biliares.

Existe no tecido hepático e nos tecidos esteroideogênicos, tais como as glândulas adrenais, um receptor chamado SR-BI, que pode ligar-se à HDL e mediar a transferência seletiva do colesterol e outros lipídios da HDL para o hepatócito. Essa HDL depletada se separa do receptor e retorna à circulação para captar mais lipídios dos tecidos periféricos pela interação da apoA-I da HDL com um transportador ativo, a proteína ABCA1, presente em células ricas em colesterol. Essa interação inicia a endocitose da HDL que é devolvida à circulação enriquecida de colesterol. A ativação da *Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol* (CETP) facilita a transferência de ésteres de colesterol das HDL para as lipoproteínas ricas em apolipoproteínas B100 circulantes no plasma em troca de triacilgliceróis.

Nos exames clínicos de rotina é analisado o perfil lipídico dos pacientes, incluindo as concentrações plasmáticas de HDL e LDL, onde são estabelecidos pontos de corte para determinar se tais parâmetros se encontram dentro de limites normais para a maioria da população ou se podem ser considerados fatores de risco para DCV e alvos de tratamento (BALK et al., 2008). No entanto, estudos recentes sobre a funcionalidade dessas partículas, considerando suas características químicas e físicas, demonstraram que o tamanho e a integridade dessas lipoproteínas também são fatores que podem determinar o papel dessas partículas no risco cardiovascular dos pacientes (NIKOLIC et al., 2013; HIRAYAMA e MIDA, 2013; BALK, 2008). Alguns estudos sugerem que partículas menores e mais densas possuem maior facilidade para migrar para o espaço subendotelial, maior capacidade ligante aos proteoglicanos presentes na parede das artérias e incrementada susceptibilidade para modificações oxidativas (LAMARCHE et al., 2002; LAMARCHE et al., 1999; DE GRAAF et al., 1991; NIGON et al., 1991). Porém, na revisão de BERNEIS e KRAUSS, 2002 foi descrita a associação positiva das partículas maiores de LDL com risco de doença coronariana. De acordo com esses autores, a LDL grande, assim como a LDL pequena, apresenta menor afinidade com seu receptor, quando comparadas com a LDL intermediária sob condições normais ou baixos de TG.

Em relação ao estado dislipidêmico nos pacientes com SM, principalmente aqueles com excesso de adiposidade abdominal, são observadas com frequência baixas concentrações plasmáticas de HDL e altas concentrações de TG, as quais têm sido associadas com maiores concentrações de partículas pequenas e densas de lipoproteína de baixa densidade (sdLDL) (RIZZO et al., 2011; MAGKOS et al., 2008; BERNEIS e KRAUSS, 2002). A lipoproteína de baixa densidade (LDL) pode variar em tamanho e compreende subfrações grandes, intermediárias e pequenas. Aparentemente, maiores concentrações de sdLDL estão relacionados com menor sensibilidade à insulina, maior acúmulo de gordura e maior risco CV (SIQUEIRA, 2006; LAMARCHE, 1999).

Geralmente são descritos dois fenótipos para a LDL: fenótipo A, com maior proporção de LDL maiores e médias e, Fenótipo B, predominantemente composta por sdLDL. As diferenças de tamanho e densidade entre as subfrações de LDL se devem a variações no conteúdo lipídico na superfície da partícula e mudanças na conformação da apoB100 (NIKOLICK, 2013; LAMARCHE, 1999).

O tamanho das partículas de LDL pode ser medido utilizando diferentes técnicas de laboratório, incluindo ultracentrifugação por gradiente de densidade, ressonância nuclear magnética, eletroforese em gel com gradiente não desnaturante, e o sistema Lipoprint® que é um sistema de eletroforese linear em gel de poliacrilamida. Segundo esse último método, a LDL pode ser dividida em 7 subfrações e a HDL em 10 subfrações, apresentando ordem decrescente de tamanho de

partículas. De modo pioneiro, McNAMARA (1987), baseando-se no estudo de Framingham, descreveu que alguns fatores genéticos e ambientais são responsáveis pela heterogeneidade nas subfrações de LDL. Sendo assim, ao falar de LDL, não pode considerar-se uma única população de partículas com uma variação constante de tamanho, mas sim um número de subclasses de partículas com diferenças discretas de tamanho e densidade, que podem indicar diferenças no conteúdo de lipídios e na conformação de sua apoB-100, incluindo maior exposição na superfície da lipoproteína e, conseqüentemente, no seu papel cardiometabólico.

1.5 Aterosclerose na SM

Na presente dissertação, dá-se especial atenção à aterosclerose pelo papel fundamental das LDL modificadas no processo aterogênico e sua forte associação com desfechos cardiovasculares, incluindo infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. Por esse motivo, é importante identificar os mecanismos que estão envolvidos no ciclo da doença para poder prevenir e controlar seu avanço silencioso que está relacionado com o estado inflamatório prevalente na SM.

A aterosclerose é uma doença vascular crônica de origem inflamatória, que resulta na formação de ateromas, também chamadas de placas ateroscleróticas, na camada íntima das artérias de grande e médio calibres (ROSS, 1999), em locais de maior agressão mecânica (STONE, 2003) e em indivíduos com elevadas concentrações de colesterol circulante (TONKIN, 2014).

As lesões ateroscleróticas se desenvolvem ao longo de décadas, contribuindo para alterações na arquitetura dos vasos sanguíneos os quais geralmente apresentam redução da luz arterial, que favorecem o desenvolvimento da hipertensão arterial sistêmica, o componente da SM mais prevalente na população.

Seu desenvolvimento é extremamente complexo e multifatorial (**Figura 5**), destacando-se inicialmente a retenção subendotelial de diversas formas de LDL modificadas oxidativamente ou não. Esse processo envolve a secreção de moléculas de adesão *Intra Cellular Adhesion Molecule* (ICAM) e *Vascular Cell Adhesion Molecule* (VCAM), com consequente infiltração e ativação do sistema imune, particularmente macrófagos, que passam a expressar diversos receptores *scavengers* (LOX-1 e 2, CD36, dentre outros). Esse processo favorece a captação de LDL modificadas, seguida da transformação dos macrófagos em células espumosas, que caracterizam a formação de estrias gordurosas, consideradas as primeiras lesões ateroscleróticas primárias (PIRILIO, 2013; HANSSON, 2002; SHERER e SHOENFELD, 2005).

Figura 5: Etiologia da Aterosclerose.

ICAM: molécula de adesão intracelular; VCAM: molécula de adesão de célula vascular. Adaptado de Sherer e Shoenfeld, (2005).

Neste processo, a resposta imunológica envolve a participação ativa dos linfócitos T, especialmente da classe *Helper*, dos autoanticorpos e autoantígenos presentes nas paredes arteriais e nas partículas de colesterol, e das citocinas secretadas pelas células na placa de ateroma que incluem as seguintes interleucinas: IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-10; além do $\text{TNF}\alpha$, Interferon- γ e o fator de crescimento plaquetário (SHERER e SHOENFELD, 2005). Ao mesmo tempo, ocorrerá a migração, proliferação e modificação fenotípica das células musculares lisas contribuindo para a expansão da placa aterosclerótica e consequente redução da luz arterial (HANSSON, 2002).

1.6 LDL modificadas

Além do papel do tamanho da LDL e seu conteúdo de colesterol sobre a fisiopatologia da aterosclerose, as modificações oxidativas da LDL são consideradas essenciais ao desenvolvimento das lesões ateroscleróticas (PIRILIO, 2013; SIQUEIRA et al., 2006).

Embora as LDL modificadas constituam uma população lipoproteica complexa e heterogênea quanto as suas características químicas e físicas, as LDL oxidadas (LDLox) têm sido associadas à iniciação e ao desenvolvimento das lesões ateroscleróticas em modelos animais (DAMASCENO, 2006; SEVANIAN et al., 1997;). Estudos clínicos têm sugerido que as altas concentrações de LDL circulando e sua pouca resistência à oxidação, propiciam o aparecimento de LDLox por alterações nos componentes proteicos e lipídicos da partícula induzidas pelas espécies reativa de oxigênio e nitrogênio (XAVIER, 2006; DEJAGER et al., 1993; CHANG et al., 1997).

As características de afinidade com os Receptores *Scavenger* (SR) dos macrófagos e com os Receptores de LDLox semelhantes à lectina 1 (LOX-1), os quais se encontram expressos também pelas células endoteliais e células musculares lisas, contribuem para o desenvolvimento e manutenção da aterosclerose. O LOX-1 também se liga a outros tipos de lipoproteínas modificadas, produtos de glicação avançada, plaquetas ativadas e células apoptóticas (XU, 2012).

A oxidação da LDL e a formação do complexo LOX-1/LDLox, induz a expressão de moléculas de adesão (ICAM e VCAM) na superfície endotelial, que mediam o rolamento e adesão de leucócitos. Em resposta às citocinas quimiotáticas, os monócitos migram para a camada íntima e se diferenciam em macrófagos, os quais internalizam fragmentos apoptóticos celulares, endotoxinas bacterianas e a LDLox, levando ao acúmulo de lipídios e a formação de células espumosas. Os macrófagos também liberam citocinas pro inflamatórias, além de citocinas quimiotáticas, espécies reativas de oxigênio (ROS), enzimas proteolíticas envolvidas na degradação da matriz celular, e, conseqüentemente, na desestabilização da placa (XU, 2012; HANSSON, 2006).

Por outro lado, em 1988, Avogaro et al., descreveram uma subfração de LDL minimamente oxidada, mais negativa, baseado nas suas características de mobilidade eletroforética. Essa partícula foi denominada de LDL minimamente oxidada. Atualmente é conhecida como LDL eletronegativa [LDL(-)] e é considerada como um novo preditor de risco cardiovascular (LEE, 2014; HSU, 2014; ESTRUCH, 2013).

As modificações às quais as partículas de LDL circulantes no plasma ou retidas na camada íntima das artérias ficam expostas aumentam sua carga negativa e modificam a estrutura da apoB, reduzindo sua afinidade ao receptor B/E (BLANCO, 2010), em detrimento da maior expressão de receptores *scavengers* e captação de LDL modificadas (SANCHEZ-QUESADA, 2002).

A LDL(-) constitui-se de um pool de partículas heterogêneas em tamanho e tende à agregação, contendo mais hidroperóxidos lipídicos, colesterol oxidado, dienos conjugados e a *Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico* (TBARS), enquanto que a concentração de fosfolipídios, alfa tocoferol e ácidos graxos poli-insaturados nesta partícula é mais baixa, quando comparada com a LDL nativa (SIQUEIRA, 2006; GOMES, 2004; MELLO, 2011). Existe correlação positiva entre idade e a concentração de partículas de LDL(-) (DEMUTH et al., 1996).

A concentração de LDL(-) em adultos saudáveis é menor a 5% do total da LDL plasmática (SANCHEZ-QUESADA, 2002; KE, 2014). Em pacientes hipercolesterolêmicos, diabéticos ou com SM a concentração de LDL(-) pode ser de duas a três vezes maior (KE, 2014).

A LDLox induz a formação de epítomos imunogênicos na molécula, estimulando a formação de autoanticorpos (MEDEIROS, 2010). Esses mesmos autores sugerem associação entre a LDLox com a instabilidade da placa aterosclerótica. Esses anticorpos antilipoproteínas, se encontram tanto em pacientes com doença cardiovascular, assim como também em pacientes saudáveis e aparecem naturalmente contra as LDLs modificadas (SZONDY et al., 1983; STEINBRECHER et al., 1984; WITZTUM et al., 1984); porém, as concentrações em pacientes com diabetes e aterosclerose são muito mais elevadas, sugerindo que esses autoanticorpos são produzidos como resposta contra a LDL modificada circulante no plasma (HANSSON, 2006; SALONEN, 2000).

Tanto os autoanticorpos antiLDL, como Imunocomplexos Circulantes de LDL (LDL-CIC), estão relacionados com a iniciação da aterosclerose e estão presentes no sangue e nas lesões ateroscleróticas de pacientes com diferentes doenças cardiovasculares, sugerindo que os LDL-CIC estão envolvidos na formação e evolução da lesão aterosclerótica (**Figura 7**).

Figura 7: Papel das Lipoproteínas com Imunocomplexos Circulantes na aterosclerose.
Adaptado de SOBENIN et al. (2014).

A ativação do sistema imunológico frente a inflamação crônica inicia-se como tentativa de controlar o avanço do processo aterosclerótico. Entretanto, em situações típicas da SM, tais como RI, DM e HAS, os estímulos proinflamatórios são mais intensos, determinando o agravamento das lesões ateroscleróticas (HANSSON, 20006). Diante desse quadro a prevenção e controle dos componentes da SM podem evitar que a aterosclerose se inicie ou avance. Considerando essa possibilidade, as modificações no estilo de vida e, particularmente, da dieta se apresentam como um cenário a ser explorado.

1.7 Ômega 3: (ω -3)

Uma das principais ferramentas para a prevenção de DCV e tratamento da SM se encontra na nutrição, através de várias abordagens de intervenção dietética ou por meio de suplementação alimentar ou farmacológica (LEE, 2008; WANG, 2012; HARRIS, 2013).

Vários estudos têm confirmado os efeitos benéficos do consumo de ω -3, particularmente EPA e DHA, dependendo da dose e do tempo de intervenção, sobre diversos componentes da SM. Esses propõem diversos mecanismos de ação do ω -3 que levam à redução do processo inflamatório, regulação do metabolismo lipídico pela diminuição das concentrações plasmáticas de triacilgliceróis e aumento da HDL, estabilização da placa de ateroma, menor formação de células espumosas, regulação da pressão sanguínea, diminuição da progressão da aterosclerose, menor agregação plaquetária, além de efeitos antiarrítmicos e, conseqüentemente, redução da sobrecarga cardíaca (LORENTE-CEBRIN, 2013; SHEARER et al., 2011; SCHACKY et al., 2007; WANG et al., 2012; MOZZAFFARIAN, 2011).

Os ácidos graxos pertencentes ao grupo dos ácidos graxos da série ω -3 são: Ácido Alfa Linolênico (ALA – C18:3), Ácido Eicosapentaenoico (EPA – C20:5) e Ácido Docosaexaenoico (DHA – C22:6), os quais pertencem à família dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), por possuírem duas ou mais duplas ligações nas suas cadeias carbônicas. Esta estrutura influencia algumas características químicas como ponto de fusão, propensão à oxidação, além da biodisponibilidade e seu papel metabólico dentro do organismo (LEE, 2008; HARRIS, 2013).

Embora pequenas quantidades de ALA possam ser convertidas em EPA (5%) e em DHA (0,5%), esses ácidos graxos são considerados essenciais devido ao fato do organismo humano não conseguir sintetizá-los em quantidades que garantam todas as suas funções biológicas (CHAN e CHO, 2009). Desse modo esses ácidos graxos devem ser ingeridos em uma dieta equilibrada que inclua alimentos fonte como linhaça, oleaginosas, peixes e frutos do mar (GRUNDT e NILSEN, 2008).

A **Figura 8** apresenta alguns efeitos do ω -3 em vias moleculares como por exemplo a incorporação de ω -3 nas membranas que altera seu perfil de ácidos graxos, deslocando o ácido araquidônico (AA) e melhorando sua fluidez. Também regula as interações iônicas nos canais de Na, canais de Ca do tipo L e canais de Na e Ca, contribuindo nos efeitos antiarrítmicos (GRUNDT e NILSEN, 2008).

O deslocamento do AA dos fosfolipídios de membrana e a ação da fosfolipase citosólica A₂ (cPLA₂) libera os fosfolipídios do ω -3 e permite sua participação na conversão dos ácidos graxos para eicosanoides com menor ação inflamatória como prostaglandinas E3, leucotrienos B5 e tromboxanos A3 devido a ação das enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) (MOZAFFARIAN e WU, 2011).

Figura 8: Efeitos do ω -3 em vias moleculares.

AA: ácido araquidônico; DHA: ácido docosahexaenoico; cPLA₂: fosfolipase citosólica A₂; DNA: ácido desoxirribonucleico; mRNA: RNA mensageiro; PGE₂: prostaglandinas E₂; LTB₄: leucotrienos B₄; LTB₅: leucotrienos B₅. Adaptado de MOZAFFARIAN e WU (2011).

O ω -3 também atua como regulador gênico, pois é ligante natural de vários receptores nucleares e fatores de transcrição em diferentes tipos de tecidos, incluindo os Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomos (PPAR alfa, beta, delta e gama); fatores nucleares hepáticos (HNF-4; alfa e gama); receptores X de retinóides (RXR) e receptores X no fígado (alfa e beta). No caso dos adipócitos, atua bloqueando a via do NF- κ B, reduzindo a produção de interleucinas inflamatórias e produzindo interleucinas anti-inflamatórias (PEREZ-MARTINEZ, 2011; HANSSON, 2002). Também tem

ação na Proteína Regulatória de Esterol (SREBP-1c), um fator de transcrição que, em condições de baixa concentração de esterol estimula a síntese de enzimas envolvidas na biossíntese de esteróis, participando ativamente na lipogênese (ROSEN, 2013).

Nos leucócitos, o ω -3 também participa de outros processos metabólicos através de enzimas que o transformam em metabólitos intermediários que serão utilizados na biossíntese transcelular. Nas plaquetas, esses metabólitos são utilizados na produção de mediadores bioativos tais como resolvinas e protectinas, que atuarão em eventos de inflamação aguda e na defesa do organismo (SPITE, 2013).

A literatura demonstra que a suplementação com ω -3 tem efeitos anti-inflamatórios, de redução de TG, (LOVEGROVE, 2004; OELRICH, 2011), redução da pressão arterial sistêmica (LEE, 2008); e modificações nos indicadores clássicos do risco cardiovascular (MOZAFFARIAN e WU, 2011; RIZZO, 2011). Porém, o efeito da suplementação do ω -3 na concentração plasmática de LDL(-) e consequentemente, a participação do sistema imune, integrando a produção de anticorpos contra partículas modificadas ainda é pouco estudado; por esse motivo, o presente estudo traz uma proposta inédita ao avaliar esses biomarcadores.

2 JUSTIFICATIVA

A suplementação com ω -3 tem demonstrado efeitos positivos nos principais fatores que determinam a SM, como redução de triacilgliceróis, regulação da pressão arterial, e aumento da concentração plasmática de HDL. Tais efeitos podem influenciar a redução do risco cardiovascular por meio da modificação das propriedades físicoquímicas das lipoproteínas, marcadores cardiometabólicos e oxidativos (LEE, 2009; HARRIS, 2013).

Não existem trabalhos que avaliem efeito do ω -3 na concentração plasmática da LDL(-) e seus autoanticorpos.

3 HIPOTESE

A suplementação com ω -3 durante 8 semanas reduz as concentrações plasmáticas de LDL(-), seus autoanticorpos anti-LDL(-) e aumenta o tamanho da LDL em pacientes com SM.

4 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de ω -3 em indivíduos com síndrome metabólica em relação às partículas de LDL(-), seus anticorpos e no tamanho das subfrações de LDL.

5 MÉTODOS

5.1 *Casuística*

Para o presente estudo foi selecionada uma subamostra do estudo CARDIONUTRI. Foram incluídos participantes de ambos os sexos, entre 30 e 74 anos de idade com Síndrome Metabólica (SM).

Para dar continuidade à coleta de dados, todos os participantes leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo 1**). Da mesma maneira, 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 (BRASIL, 1999).

5.2 *Cálculo Amostral*

O tamanho da amostra foi calculado utilizando como referência artigos científicos que descreveram intervenção clínica de suplementação com ω -3 e tamanho da LDL (TANI et al., 2013; VECKA et al., 2012; OELRICH et al., 2011; SATOH et al., 2007;), nos quais o tamanho amostral era próximo ao do nosso estudo. Com o auxílio de uma tabela para cálculo de tamanho de amostra necessária por grupo, elaborada por BROWNER et al., (2003), selecionaram-se como base para o cálculo os dados do estudo de SATOH et al., utilizando o teste t para comparar médias de variáveis contínuas, considerando α de 5% bilateral e poder estatístico de 90% (β de 10%), encontrou-se um número mínimo de 23 indivíduos por grupo. No presente estudo, temos dois grupos com 57 e 58 participantes respectivamente.

5.3 *Análise de riscos e benefícios*

A pesquisa teve caráter de intervenção devido a suplementação de ácidos graxos poli-insaturados. Entretanto, o risco considerado foi baixo, já que os ácidos graxos suplementados na intervenção faziam parte do hábito alimentar da população e são considerados GRAS (geralmente reconhecido como seguro), além de terem sido previamente aprovados pela FDA e pela ANVISA, na modalidade de suplemento alimentar.

De acordo com a literatura, eventuais efeitos adversos poderiam estar associados ao consumo do óleo de peixe (ω -3). Em raras situações, a literatura descreve aumento na eructação, hálito com odor a peixe, prurido e redução na ativação de plaquetas. Porém, essas reações adversas, na maioria das vezes, não foi fator indicativo de suspensão do consumo do ω -3. Esses efeitos adversos foram monitorados durante o estudo, seguindo padrões éticos, científicos e médicos.

Os benefícios para a população incluída no estudo foram experimentais, embora pudessem incluir efeitos neutros ou positivos pela melhora do perfil clínico.

5.4 *Delineamento Clínico do Estudo*

O protocolo adotado consistiu em um estudo clínico, randomizado, duplo cego, caso – controle, paralelo; baseado em intervenção nutricional usando suplementação de ω -3 e ω -9, com seguimento de oito semanas, conforme apresentado na **Figura 10**:

Figura 9: Delineamento clínico do estudo.

Os participantes receberam um frasco com suplemento codificado contendo 100 cápsulas de ÓLEO DE PEIXE (3,0 gramas/dia), ou 100 cápsulas de AZEITE DE OLIVA (3 gramas/dia), sendo esse último considerado placebo. Cada participante foi orientado a consumir 1 cápsula contendo 1g de óleo de peixe ou azeite de oliva junto com as principais refeições da seguinte maneira: 1 cápsula no café da manhã, 1 cápsula no almoço e 1 cápsula no jantar. No caso de esquecimento a cápsula podia ser consumida em outro horário no mesmo dia.

Foi escolhido óleo de oliva (ω -9) como placebo utilizando referências de outros estudos de intervenção que compararam ω -3 vs ω -9 (**Tabela 2**).

Tabela 2: Estudos de intervenção com ω -3 vs ω -9

Referência	Desenho do estudo	População incluída	Intervenção	Período
Lovegrove et al., 2004	Estudo de intervenção, randomizado duplo cego, caso – controle.	Homens e mulheres Idade (média) 47 anos	1,5 g EPA + 1 g DHA ou 4 g óleo de oliva	84 dias (12 semanas)
Kelley et al., 2007	Estudo de intervenção randomizado duplo cego, caso – controle.	Homens hipertrigliceridemicos	7,5g óleo de peixe (3g DHA) ou 7,5 g óleo de oliva (6g ácido oleico)	90 dias (12,8 semanas)

Foi fornecido um “Livro do paciente” onde o participante devia registrar o consumo diário das cápsulas. E, caso houver, alguma intercorrência como por exemplo esquecer de consumir o suplemento ou sinais e sintomas adversos associados à intervenção.

Os suplementos usados no protocolo de intervenção tiveram as seguintes características:

- Grupo ω -3 – Cápsulas de óleo de peixe contendo 60% de EPA+DHA
(37% EPA + 23% DHA) = 1,8g/d de EPA+DHA.
- Grupo ω -9 – Cápsulas de azeite de oliva contendo 72% de ácido oleico
= 0,72g/d de ácido oleico.

5.5 Critérios de Inclusão

Foram incluídos participantes de ambos os sexos, com idade entre 30 e 74 anos sem evento cardiovascular prévio, que receberam suplementação com ω -3 ou com ω -9 e que apresentavam SM, conforme classificação proposta por ALBERTI (2009).

5.6 Critérios de Não Inclusão

Foram considerados não aptos para o estudo participantes que preenchiam algum dos critérios a seguir:

- Participar de outro protocolo de intervenção;
- Desnutrição;
- Gravidez ou lactação;
- Portador de doença aguda ou crônica grave;
- Usuário de drogas ilícitas;
- Alcoolista;
- Alergia ou intolerância a algum componente da intervenção;
- Alteração psiquiátrica não controlada.

5.7 Avaliação Socioeconômica e Clínica

O perfil socioeconômico foi avaliado utilizando um questionário estruturado (**Anexo 2**), que abordava os itens sexo, idade e raça. Para a avaliação clínica coletamos informações sobre história clínica atual, antecedentes familiares de doenças crônicas (pai e mãe), uso regular de medicamentos e/ou vitaminas, além da aferição da pressão arterial sistêmica em duplicata por técnicos treinados seguindo o protocolo recomendado pela VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (SBH, 2010).

5.8 Avaliação Antropométrica

Para os parâmetros antropométricos foram coletados dados como peso (Kg), estatura (m), circunferência da cintura (cm) e dados de composição corporal (porcentuais de massa gorda e massa magra).

Para determinar o peso, os participantes não utilizavam sapatos e ficavam com roupas leves para subir na balança digital Modelo 2096PP (Toledo®, São Paulo, Brasil) com limite de capacidade de 200 Kg e precisão de 50 g. A medida da estatura foi determinada por meio do estadiômetro de parede Modelo 216 (Seca®, São Paulo, Brasil) com limite de 2,1 m e precisão de 1 mm, igualmente sem sapatos e em posição ereta, com os pés paralelos, calcanhares, panturrilha, glúteos, ombros e cabeça encostados no estadiômetro e com a cabeça sob o plano horizontal de Frankfurt (LOHMAN et al., 1988). Esses dados foram utilizados para cálculo do índice de massa corporal (IMC), definido como a massa corporal em quilogramas pela estatura em metros quadrados (Kg/m^2). A classificação do IMC foi realizada conforme apresentado na **Tabela 3**.

Tabela 3: Valores de referência para IMC de adultos e idosos.

Adultos (kg/m^2)	Idosos (kg/m^2)	Classificação
<18,5	$\leq 23,0$	Baixo peso
18,5-24,9	23,0-27,9	Eutrofia
25,0-29,9	28,0-29,9	Sobrepeso
$\geq 30,0$	$\geq 30,0$	Obesidade

Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS, 2000) e Organização Pan-americana da Saúde (OPAS, 2000).

Para a medida da circunferência da cintura (CC), utilizou-se uma fita inelástica, flexível, com precisão 1 mm (TBW, São Paulo, Brasil), adotando-se como referencial anatômico o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. O participante foi orientado a permanecer com o abdômen relaxado, ficar em pé, manter os braços paralelos ao corpo e pés unidos. Os valores de circunferência da cintura foram classificados considerando sexo e os pontos de corte apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Pontos de corte para classificação de CC.

Risco	Circunferência da Cintura (cm)	
	Homens	Mulheres
Elevado	≥ 94	≥ 80
Muito elevado	≥ 102	≥ 88

Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS, 2000).

Realizou-se bioimpedância bioelétrica para avaliação da composição corporal usando o aparelho tetrapolar RJL Systems®, modelo Quantum X – BIA Analyser (Detroit, USA), por meio do qual foi aplicada uma corrente de 800 μA e frequência de 50 KHz. As medidas de impedância bioelétrica

foram tomadas colocando-se os eletrodos do lado direito do participante, que foi orientado a ficar sem sapatos, sem meias, e a manter-se deitado em posição supina, com os braços em ângulo de 30° em relação ao seu corpo e as pernas sem contato entre si, permanecendo imóvel. O equipamento apresentou os valores brutos de resistência [®], reatância (Xc) e ângulo de fase (°) de cada participante.

Para determinação do percentual de gordura corporal (%) e do percentual de massa magra (%) utilizou-se o programa Cyprus, versão 2.5 – Body Composition Analysis System (RJL Systems[®], Detroit, USA), onde foram consideradas as variáveis: sexo, idade, peso, altura, resistência e reatância. Os valores normais de percentual de gordura corporal foram considerados 15-25% nos homens e 20-30% nas mulheres (ARMATRUDA, 2001).

5.9 Classificação de SM

Para a classificação dos participantes como tendo SM foram utilizados os critérios propostos no ano 2009, pela força tarefa da *International Diabetes Federation* (IDF), o *National Heart, Lung, and Blood Institute* (NHLBI), a *American Heart Association* (AHA), a *World Heart Federation* (WHF), a *International Atherosclerosis Society* (IAS), e a *International Association for the Study of Obesity* (IASO), que considera da presença de SM quando três dos seguintes componentes apresentar valores alterados:

Tabela 5: Critérios para classificação da Síndrome Metabólica.

	Obesidade central	HDL-c	Glicemia de jejum	Pressão arterial	Triacilglicerois
Homem	≥ 94 cm	< 40 mg/dL	≥ 100 mg/dL ou DM	≥ 130/85 mmHg ou em tratamento	≥ 150 mg/dL ou em tratamento
Mulher	≥ 80 cm	< 50 mg/dL			

Fonte: ALBERTI et al., 2009.

5.10 Avaliação do Consumo Alimentar

O consumo alimentar no momento basal e após 8 semanas de intervenção foi avaliado pela aplicação de 2 Recordatórios de 24 horas (R24h) (**Anexo 3**) em cada período do estudo. Os R24 foram aplicados em dias alternados (incluindo dias de semana e finais de semana), considerando variações no consumo diário, além de variações inter e intra-indivíduos. Os macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios) foram avaliados. Todos os pesquisadores foram treinados para a aplicação do inquérito alimentar baseando-se no método *multiplepass* (JOHNSON et al., 1996; GUENTHER et al., 1998), que consiste na listagem rápida dos alimentos, descrição detalhada e revisão, sendo possível definir e quantificar os alimentos e as bebidas consumidas durante as últimas 24 horas.

Todos os alimentos descritos nos R24h dos participantes foram listados e incluídos na base de dados. As receitas foram padronizadas para preparações que não se encontravam na base de dados e se estabeleceram porções de consumo.

Foi utilizado o Programa *Food Processor* (Version 10.11.0, 2012) para a análise da energia e os nutrientes brutos. Recordatórios com valores de ingestão energética menor que 500 ou superior a 5000 kcal/dia foram excluídos do estudo por representarem valores de consumo fora do esperado.

5.11 Avaliação da Atividade Física Habitual

Para avaliação da atividade física habitual foi utilizado um questionário padronizado (**Anexo 4**) e, de acordo com as respostas do participante, calculou-se o escore total de atividade física seguindo os padrões estabelecidos pelo estudo de Baecke, (1982) e validado no Brasil por Florindo e Latorre (2003).

O questionário foi estruturado em quatro partes, da seguinte maneira: 8 questões se referem à Atividade Física Ocupacional, 4 questões direcionadas ao Exercício de Lazer e 4 questões pertencentes à Atividade de Lazer e Locomoção. Após o cálculo, se estabelecem escores por áreas ou um escore total de Atividade Física.

5.12 Estratificação do Risco Cardiovascular

Com o intuito de classificar os participantes, segundo risco cardiovascular, utilizou-se parâmetros estabelecidos pelo o Escore de Risco de Framingham (ERF) (**Anexo 5**) que calcula o risco absoluto de apresentar eventos coronarianos em 10 anos, segundo sexo, atribuindo diferentes pontuações para idade, pressão arterial sistólica, concentração de CT e HDL-c, além da condição de fumante ou diabético. Adotaram-se critérios revisados como proposto por D'Agostino et al., (2008) para homens e Mosca e Benjamin, (2011) para mulheres.

5.13 Avaliação Bioquímica

5.13.1 Obtenção de sangue

Foram coletadas amostras de sangue no Tempo basal (T0) e após oito semanas de intervenção (T8), após jejum de 12 horas. As amostras foram coletadas em tubos vacutainer contendo 1 mg/mL de ácido etileno-diaminotetraacético (EDTA) (BD, Brasil), utilizado como anticoagulante e antioxidante, mantido em gelo e protegido da luz até a obtenção do plasma (3000 rpm, 10 min, a 4°C). Acrescentou-se inibidores de proteases: aprotinina (10 µg/mL), benzamidina (10 µM) e fluoreto de fenilmetilsulfonila-PMSF (5 µM), além do antioxidante 2,6-di-tert-butil-p-hidroxitolueno-BHT (100 µM). Todas as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento das análises.

5.13.2 Marcadores do metabolismo lipídico

Através da aplicação manual de reagentes enzimáticos, foram analisadas as concentrações de colesterol e TG no plasma e colesterol na HDL. Para a determinação das concentrações de CT e associado à HDL foram utilizados métodos padrões (Colesterol Liquiform Labtest, Minas Gerais, Brasil) e (Colesterol HDL® Labtest, Minas Gerais, Brasil), respectivamente. Para a determinação de TG plasmáticos utilizamos o Kit Triacilgliceróis Liquiform® (Labtest, Minas Gerais, Brasil). O conteúdo de

colesterol associado à LDL foi determinado por meio da fórmula de FRIEDEWALD (1972), onde: $LDL-C = CT - HDL-C - TG/5$. Essa fórmula só foi aplicada para os indivíduos com $TG < 400 \text{ mg/dL}$.

As apolipoproteínas Apo AI e Apo B foram determinadas por método padrão, através da utilização dos kits Autokit APO AI® e Autokit APO B® (RandoxChemicalsUSA Inc., Richmond, VA, EUA), respectivamente, pelo método imuno-turbidimétrico.

5.13.3 Análise da concentração de ácidos graxos plasmáticos

Para detecção dos ácidos graxos presentes no plasma, foi utilizado um método que incluía a derivatização da carboxila dos ácidos graxos esterificados com o composto fluorescente 9-Anthryl Diazomethane (ADAM), baseando-se no protocolo proposto por Nimura et al. (1980), formando assim o éster correspondente. Em 100 µL de amostra colocou-se 50µL de NaOH 10M, 350 µL de

ETOH c/BHT 150uM e 50 uL de H₂O milliQ c/100 uM DTPA. Adicionou-se, como padrão interno, 50uL de Ácido Margárico (C17) 10mM. A amostra assim preparada ficou em repouso por 90 minutos no escuro permitindo a reação. Depois adicionou-se 1 mL de NaCl 1% e 2mL de Acetato de Etila:Hexano (1:9 v/v) e foi vortexado por dois minutos.

O sobrenadante foi coletado (aprox 1mL) e colocado em vial apropriado e secado em N₂. Adicionou-se 100 uL de Adam 0,25mg/ml e ficou em repouso no ambiente escuro e no gelo por trinta minutos, facilitando a reação de derivatização. Se diluiu a amostra em mais 400 uL de ETOAC, completando assim 500 uL de solução. Foram injetados 5 uL para a leitura no HPLC.

A coluna utilizada foi uma coluna Kinetex 2.6 u C18 100 A de 50x3.0 mm com gradiente de ACN e H₂O milliQ, partindo de 79% e chegando até 93% de concentração da fase móvel, com fluxo de 1,45 mL/min, completando 12 minutos de análise.

5.13.4 Detecção de LDL(-) no plasma

A partir de um pool de LDL(-) utilizado como padrão, foi dosada a concentração plasmática da LDL(-) utilizando o método ELISA do tipo sanduiche seguindo protocolo estabelecido por DAMASCENO et al. (2006). Os resultados foram calculados a partir da média das absorbâncias das amostras menos o branco e aplicados à curva padrão e multiplicados pela respectiva diluição, sendo os resultados expressos em mg/ml. Os anticorpos 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).

5.13.5 Detecção anti LDL(-) no plasma

Para detecção da concentração de auto-anticorpos anti-LDL(-), utilizou-se método de ELISA de captura de anticorpo padronizado por FAULIN et al., em 2011. Os resultados foram determinados aplicando-se a média das absorbâncias das amostras menos o branco à equação da curva padrão. Os resultados foram apresentados em mg/ml.

5.13.6 Tamanho das Lipoproteínas LDL

O tamanho da LDL foi determinado através do sistema Lipoprint®: (*LIPOPRINT SYSTEM – HDL SUBFRACTIONS, Quantimetrix*), que se baseia na separação e quantificação de subfrações lipoproteicas por meio de um gel de poliacrilamida não desnaturante. O teste usa um corante lipofílico que se liga ao colesterol nas partículas de lipoproteínas antes da eletroforese. Após a eletroforese, os géis foram escaneados para determinar a área relativa de cada subfração de lipoproteína que é multiplicado pelo colesterol total da amostra para calcular a quantidade de colesterol em cada subfração.

Para esse procedimento os tubos de gel foram colocados dentro do rack, acrescentados de 25 µl do soro ou plasma no tubo, e adicionados 200 µl da solução gel. A tampa foi colocada sobre o gel, e a amostra homogeneizada. Em seguida os tubos contendo as amostras passaram por fotopolimerizados por trinta minutos. As lipoproteínas foram assim separadas no intervalo de 1h e 30m pelo processo de eletroforese através da densidade de cada uma, conforme figura abaixo (Figura 14):

Figura 10: Separação das Lipoproteínas por densidade através de eletroforese em gel (Lipoprint).

Figura 10: Separação das lipoproteínas por densidade através de eletroforese em gel (lipoprimy).
VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; IDL: lipoproteína de densidade intermediária; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade.

Em seguida, os tubos em gel foram escaneados e a imagem digitalizada, de modo a identificar cada subfração.

A partir dessas análises foram identificadas 7 subfrações de LDL, sendo classificadas, em partículas grandes (1-2) e pequenas (3-7). Foram identificadas também as partículas quanto ao fenótipo A (proaterogênica) e B (antiaterogênica) usando o ponto de corte de 25,5 nm.

5.14 Análises Estatísticas

Para as variáveis qualitativas, utilizou-se teste qui-quadrado (χ^2) e os resultados foram apresentados em valor absoluto seguido da sua respectiva porcentagem. Para a determinação dos testes utilizados, considerou-se o tipo de distribuição dessas variáveis. Todas as variáveis foram apresentadas sob a forma de média e desvio padrão. Para as variáveis com distribuição normal foram realizados os testes t-Student, já para as variáveis não paramétricas utilizaram-se os testes de *Mann-Whitney* e *Wilcoxon*.

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences*® (SPSS), versão 20.0 (SPSS Incorporation, 2011). O valor de significância considerado foi de $p < 0,05$.

5.15 Aspectos éticos

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública (COEP/FSP) e do Hospital Universitário (COEP/FSP) (**Anexo 6**).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o presente estudo foi selecionada uma subamostra do estudo CARDIONUTRI (n=374), formada por indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 30 a 74 anos, com Síndrome Metabólica, que receberam suplementação de ω -3 (n=71) e ω -9 (n=74) durante oito semanas. Ocorreram 30 desistências ao longo da intervenção, desse modo, 115 participantes concluíram todas as etapas do estudo. A média de idade da amostra foi de 54 (10) anos e não houve diferença entre os grupos, quanto a essa variável.

Figura 11: Fluxograma do número de participantes no presente estudo, segundo intervenção.

6.1.1 Caracterização da amostra e perfil clínico

A **Tabela 6** contém variáveis para a caracterização dos participantes, estratificados por tipo de intervenção. Observou-se que os grupos apresentaram perfis semelhantes no momento basal. A maioria foi do sexo feminino e de etnia branca. Somente 20 participantes (17% da amostra) eram tabagista. Segundo o ERF, 80% da amostra foi classificada em risco cardiovascular intermediário e alto.

Tabela 6: Caracterização dos participantes no estudo, segundo intervenção.

Características	ω-3		ω-9		p
	n = 58	(%)	n = 57	(%)	
Sexo					
Masculino	23	39,7	15	26,3	0,194
Feminino	35	60,3	42	73,7	0,425
Etnia					
Branca	39	67,2	38	66,7	0,909
Negra	6	10,3	5	8,8	0,763
Amarela	13	22,4	12	21,1	0,841
Indígena	---	---	2	3,5	---
Fumante					
Sim	11	19,0	9	15,8	0,655
Não	32	55,2	34	59,6	0,806
Ex-fumante	15	25,9	14	24,6	0,853
ERF					
Baixo	10	17,2	3	5,3	0,052
Intermediário	15	25,9	22	38,6	0,250
Alto	33	56,9	32	56,1	0,901

ERF: Escore de Risco de Framingham.

Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste χ^2 . Os resultados foram apresentados em tamanho de amostra (n), seguido do respectivo percentual (%). Significância adotada $p < 0,05$.

Em relação à prevalência de doenças prévias auto relatadas, 93% dos participantes referiram ter alguma doença crônica, sendo a HAS e DLP as mais frequentes em ambos os grupos (**Tabela 7**).

Tabela 7: Prevalência de doenças crônicas auto referidas, segundo intervenção.

Doenças prévias	ω-3		ω-9		p
	n = 58	(%)	n = 57	(%)	
Diabetes	12	20,7	16	28,1	0,450
HAS	40	69,0	37	64,9	0,732
DLP	30	51,7	35	61,4	0,535
Outras	16	27,6	18	31,6	0,732

DM: Diabetes Mellitus; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; DLP: Dislipidemia. Outras: Hipotireoidismo, Doenças hepáticas. Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste χ^2 . Os resultados foram apresentados em tamanho de amostra (n), seguido do respectivo percentual (%). Significância adotada $p < 0,05$.

Em relação à utilização de medicamentos, 84% dos participantes tomavam medicamentos de uso contínuo (**Tabela 8**). O uso de medicamentos anti-hipertensivos e estatina reforçou o auto relato de doenças entre os participantes.

Tabela 8: Prevalência de uso de medicamentos, segundo intervenção.

Variáveis	ω-3		ω-9		
	n = 58	(%)	n = 57	(%)	p
Medicamentos	49	84,5	48	84,2	0,919
Estatina	12	20,7	19	33,3	0,209
Anti-hipertensivo	35	60,3	32	56,1	0,714
Hipo-glicemiante	13	22,4	20	35,1	0,223

Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste χ^2 . Os resultados foram apresentados em tamanho de amostra (n), seguido do respectivo percentual (%). Significância adotada $p < 0,05$.

A descrição do histórico familiar para doenças crônicas foi semelhante em ambos grupos e apresenta-se na **Tabela 9**. Noventa por cento dos participantes relataram que o pai, mãe ou ambos tinham DCV. Adicionalmente, 66% tinham antecedentes de HAS no pai ou mãe, 41% tinham pais diabéticos.

Tabela 9: Antecedentes familiares de doenças crônicas, segundo intervenção.

Histórico familiar	ω-3		ω-9		
	n = 58	(%)	n = 57	(%)	p
DCV	52	89,7	52	91,2	1
Obesidade	13	22,4	8	14,0	0,275
Hipertensão	39	67,2	37	64,9	0,819
DM	23	39,7	25	43,9	0,773
Outros	18	31,0	27	47,4	0,18

DCV: Doenças Cardiovasculares; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; AVC: Acidente Vascular Cerebral; DM: Diabetes Mellitus; DVP: Doença Arterial Periférica. Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste χ^2 . Os resultados foram apresentados em tamanho de amostra (n), seguido do respectivo percentual (%). Significância adotada $p < 0,05$.

O **Gráfico 1** apresenta a frequência de componentes para classificação de SM. Observou-se que 97% dos participantes foram classificados com CC elevada ou muito elevada, 57% tinham DLP, 67% eram hipertensos e 25% tinham DM diagnosticada.

Gráfico 1: Prevalência de parâmetros para diagnóstico de SM na amostra total.

CC: Circunferência de Cintura DLP: Dislipidemia; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; DM: Diabetes Mellitus; SM: Síndrome Metabólica. Análise descritivo de frequências.

6.1.2 Características Antropométricas

Em relação aos parâmetros antropométricos, não houve diferença entre os grupos, sendo que 87% dos participantes encontravam-se com sobrepeso ou obesidade e 97% com Percentual de Massa Gorda (%MG) elevado ou muito elevado como mostrado na **Tabela 10**. Considerando a CC, 95% dos participantes no grupo ω -3 e 98% do grupo ω -9 foram classificados como tendo CC elevada ou muito elevada.

Tabela 10: Classificação antropométrica e de composição corporal, segundo intervenção.

Antropometria	ω -3		ω -9		P
	n = 58	(%)	n = 57	(%)	
IMC (kg/m²)					
Eutrofia	5	9	10	17	0,285
Sobrepeso	18	31	14	25	0,480
Obesidade	35	60	33	58	0,808
MG (%)					
Elevado	16	28	8	14	0,102
Muito elevado	41	71	46	81	0,592
CC (cm)					
Elevado	55	95	56	98	0,482
Muito elevado					

IMC: Índice de Massa Corporal; % MG: Percentual de Massa Gorda CC: Circunferência de Cintura. Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste χ^2 . Os resultados foram apresentados em tamanho de amostra (n), seguido do respectivo percentual (%). Significância adotada $p < 0,05$.

6.1.3 Efeito da suplementação em parâmetros antropométricos e clínicos

Embora existam vários estudos visando avaliar os efeitos da suplementação com ω -3 em parâmetros antropométricos, os resultados encontrados na literatura são controversos. Ensaio clínicos realizados com as mais diversas populações, por períodos diferentes e com doses variadas podem explicar tais divergências. Um estudo feito no Brasil por Crochemore (2012) avaliando suplementação de ω -3 em mulheres diabéticas e obesas, com idade média de 60 anos, mostrou não haver mudanças na CC, no IMC, nem no %MG após 30 dias de suplementação com 2,5g de óleo de peixe. Surpreendentemente, esse mesmo estudo, observou que a suplementação com 1,5g de óleo de peixe por 30 dias reduziu significativamente a CC e o IMC. Estudos experimentais realizados em camundongos demonstraram a capacidade do ω -3 de reduzir a captação de lipídios provavelmente pela regulação gênica no hipotálamo, com efeitos na redução da gordura corporal após suplementação de ω -3 (RUZICKOVA, 2005 e HUANG 2004).

Nossa intervenção de 3g de óleo de peixe durante oito semanas promoveu redução significativa na %MG ($p=0,016$) (**Gráfico 2**). Não houve mudanças significativas em relação ao peso ou CC.

Gráfico 2: Valores de %MG após 8 semanas de suplementação, segundo intervenção.

% MG: Percentual de Massa Gorda. Para análises de diferenças entre o T0 e o T8 utilizou-se o teste t-Student pareado para amostras paramétricas * $p < 0,05$.

Todavia, a meta-análise de BENDER et al., (2014), que incluiu 17 estudos de intervenção com ω -3, mostrou tendência de redução de IMC e perda de peso, porém sem mudanças na CC ou no %MG. Visto que não existe uma padronização de dose ou período para os ensaios clínicos com suplementação com ω -3, torna-se difícil a comparação das mudanças nos parâmetros antropométricos em grupos populacionais, sendo que variáveis como etnia, idade, sexo e hábitos de vida devem ser consideradas, além da quantidade e do tipo de ácido graxo suplementado, e adicionalmente, o período de intervenção.

Vários estudos mostram que a suplementação com ω -3 modifica positivamente alguns componentes da SM, tais como pressão arterial, redução de triacilgliceróis e aumento de HDL (HARRIS, 2013; LEE, 2008; EBRAHIMI, 2008).

Uma meta-análise realizada com 22 estudos sobre a resposta dose dependente de ω -3 sobre a redução da pressão arterial sistólica e diastólica, mostrou que a suplementação de 4,0g/dia de ω -3 estava associada significativamente com redução de 1,7 da PAS e 1,5 mmHg da PAD, tendo apresentado maior efeito em idosos (GELEIJNSE et al., 2002). Aparentemente, os efeitos hipotensivos do ω -3 são mediados pela capacidade do DHA de reduzir o espessamento das paredes arteriais, assim como de modular a liberação de cálcio das células musculares e regular o sistema renina-angiotensina-aldosterona (LORENTE-CEBRIAN et al, 2013).

No presente estudo, a suplementação com ω -3 apresentou redução na Pressão Arterial Sistólica (PAS) em 4%, redução na Pressão Arterial Diastólica (PAD) em 5%, conforme mostra a **Tabela 11**. A glicemia de jejum não foi modificada ao longo da intervenção.

Ambas as intervenções reduziram as concentrações plasmáticas de CT, TG e nHDL e aumentaram a concentração de HDL ao longo do tempo, conforme previamente descrito na literatura. Entretanto, esse efeito foi semelhante, quando os grupos ω -3 e ω -9 foram comparados.

Tabela 11: Modificações em componentes antropométricos, de pressão arterial, controle glicêmico e perfil lipídico, segundo tempo e tipo de intervenção

Variáveis	ω -3					ω -9					p^1	p^2	p^3
	T0		T8		$\Delta(T8-T0)$	T0		T8		$\Delta(T8-T0)$			
Peso (kg)	86	(18)	87	(19)	0,46	84	(17)	84	(17)	0,07	0,096	0,792	0,301
CC (cm)	104	(10)	105	(10)	0,96	104	(14)	105	(14)	1	0,073	0,133	0,965
PAS (mmHg)	138	(19)	133	(17)	-5	134	(15)	132	(19)	-2,09	0,002*	0,263	0,232
PAD (mmHg)	84	(11)	80	(10)	-3,67	81	(09)	79	(10)	-1,92	0,000*	0,095	0,258
GLI (mg/dL)	105	(29)	107	(38)	2,07	110	(43)	107	(37)	-2,88	0,406	0,112	0,108
CT (mg/dL)	204	(40)	187	(42)	-16,67	217	(46)	204	(51)	-12,82	0,000*	0,010*	0,548
HDL (mg/dL)	36	(08)	38	(09)	2,38	38	(10)	43	(13)	5	0,012*	0,000*	0,097
LDL (mg/dL)	139	(38)	125	(40)	-13,91	143	(41)	130	(46)	-12,65	0,001*	0,010*	0,838
TG (mg/dL)	152	(88)	119	(57)	-32,31	179	(98)	147	(87)	-32,28	0,000*	0,003*	0,998
nHDL (mg/dL)	168	(40)	149	(40)	-19,45	179	(46)	160	(52)	-19,27	0,000*	0,000*	0,978
NEFA (mEq/L)	0,69	(0,3)	0,64	(0,3)	-0,05	1	(0,2)	1	(0,2)	-0,02	0,142	0,676	0,434
APOAI (mg/dL)	128	(22)	128	(21)	-0,37	134	(23)	137	(26)	2,06	0,854	0,398	0,442
APOB (mg/dL)	105	(25)	108	(28)	3,31	109	(28)	113	(32)	3,93	0,288	0,182	0,882
PON1 (nmol/ml)	54	(30)	54	(33)	0,5	52	(34)	53	(34)	0,41	0,781	0,572	0,965

CC: Circunferência de Cintura; % MG: Percentual de Massa Gorda; PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica; GLI: glicemia; CT: Colesterol Total; HDL: Lipoproteína de Alta Densidade; LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade; TG: Triacilglicerois; nHDL: não HDL; FFA: Ácidos Graxos Livres; APOAI: Apolipoproteína AI; APOB: Apolipoproteína B; PON1: Paraoxonase 1; p^1 ω -3 no T0 vs T8; p^2 ω -9 no T0 vs T8; p^3 ω -3 vs ω -9. Valores apresentados em média (T0 e T8), seguido do desvio padrão. Para as análises do efeito do tempo dentro do mesmo grupo foi utilizado o teste-t Student pareado e para analisar a diferença entre as intervenções utilizou-se o teste-t para amostras independentes comparando a variação $\Delta T8-T0$ * Significância de $p < 0,05$.

Um estudo semelhante realizado por KELLEY et al., (2007) suplementou ω -3 (7,5g óleo de peixe/por dia = 3gDHA/d) e utilizou ω -9 (7,5g de óleo de oliva/por dia = 6g ácido oleico) durante 90 dias. Ambas as intervenções forneciam também palmitato de ascorbila e uma mistura de tocoferóis. Amostras de sangue foram coletadas no momento basal, aos 45 dias e aos 90 dias. A intervenção com ω -3 reduziu as concentrações de TG (24%), VLDL (92%), IDL (53%) e aumentou as concentrações de LDL-c (12,6%) e LDL_{GRANDE} (120%). Embora o grupo suplementado com ω -9 não modificou significativamente as concentrações de CT, LDL ou nHDL, houve redução de 9% na concentração de TG.

Um estudo realizado por REAVEN et al. em 1994 observando os efeitos de dietas ricas em ácido oleico e ácido linoleico com suplementação de alfa tocoferol, mostrou que a dieta enriquecida com ácido oleico reduziu significativamente o colesterol plasmático e o LDL-c. Nesse mesmo estudo houve redução de 21% de TG, porém essa redução não foi significativa.

É provável que os resultados observados como efeito da suplementação de ácido oleico estejam relacionados ao seu papel no metabolismo lipídico, visto que esse ácido graxo atua como um bom substrato para a Acil CoA Colesterol Transferase (ACAT) hepática. Dessa maneira, o excesso de colesterol livre é esterificado rapidamente e não é induzida supressão do receptor de LDL (LOTTENBERG, 2012; GRUNDY, 1991). Adicionalmente, o ácido oleico reduz a oxidação da LDL e a taxa de síntese endógena de colesterol (REAVEN, 1994; JONES, 1994).

Embora sejam escassos os ensaios clínicos que avaliem a suplementação de ácido oleico, são inúmeros os estudos sobre os benefícios da dieta mediterrânea, rica em azeite de oliva – uma rica fonte de ácido oleico. Nesses estudos o elevado consumo de azeite de oliva tem sido associado a menor prevalência de obesidade, DM tipo 2, eventos cardiovasculares e SM (GILLINGHAM, 2011; PEREZ-MARTINEZ, 2011).

6.1.4 Efeitos da suplementação na concentração plasmática da LDL e suas subfrações

Estudos realizados para avaliar os efeitos do ω -3 sobre as subfrações de LDL também apresentam resultados controversos. No caso do estudo de OELRICH et al., (2013), realizado nos Estados Unidos, com uma população de 42 adultos hipertrigliceridêmicos foi observado aumento na concentração de LDL-c distribuído de maneira homogênea entre as subfrações.

O estudo realizado por BAYS et al., em 2012, avaliando 229 participantes, com suplementação de IPE, um EPA altamente purificado, durante 12 semanas, teve como resultado redução na concentração de sdLDL, além de redução na LDL total, porém, nos participantes hipertrigliceridêmicos essa redução não foi significativa. Outro estudo realizado no Japão apresentado por TANI et al., em 2013, com 144 participantes avaliou o tamanho das subfrações de LDL utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida e observou aumento no tamanho das subfrações de LDL após 6 meses de suplementação com 1,800mg/dia de EPA. De maneira semelhante, no estudo de KELLEY (2007), observou-se aumento significativo na concentração das subfrações maiores de LDL e redução nas frações menores, sem mudanças na LDL total utilizando o método de ressonância magnética nuclear (NMR). O grupo controle que recebeu ω -9 não modificou o perfil do tamanho das subfrações de LDL.

Nossos resultados são apresentados na **Tabela 12**. Observa-se que as mudanças nas subfrações de LDL não foram significativas.

Por outro lado, a intervenção com 3g de óleo de peixe (ω -3) durante oito semanas promoveu redução significativa na concentração plasmática de LDL_{TOTAL}, fato que não ocorreu no grupo suplementado com ω -9.

O efeito de redução da concentração da LDL observado em nosso estudo, é contraditório com o pressuposto que a redução de TG nos pacientes suplementados com ω -3 esteja acompanhada de aumento nas concentrações de LDL, como proposto por OELRICH (2011).

Todavia, essa redução na concentração de LDL está de acordo com o estudo de EBRAHIMI que suplementou diariamente 180mg de EPA e 120mg de DHA em pacientes com SM durante 6 meses. Os resultados foram bastante similares aos nossos, com redução da pressão arterial sistólica e mudanças na concentração de colesterol total, reduzindo a LDL total.

Provavelmente, a redução de TG resultante da suplementação de ω -3, seja capaz de aumentar a eficiência da HDL em realizar o transporte reverso de colesterol, por meio da redução na atividade da CETP. A inibição desta proteína está diretamente associada ao menor conteúdo de colesterol na LDL e a maior remoção de colesterol dos tecidos periféricos (SIQUEIRA, 2006).

Tabela 12: Distribuição de subfrações de LDL, segundo tempo e intervenção.

Variáveis (mg/dL)	ω -3					ω -9					p^1	p^2	p^3
	T0		T8		$\Delta(T8-T0)$ %	T0		T8		$\Delta(T8-T0)$ %			
LDL ₁	34	(11)	33	(11)	-2	33	(12)	33	(11)	1	0,572	0,902	0,654
LDL ₂	21	(10)	20	(10)	-5	24	(12)	24	(12)	1	0,288	0,839	0,436
LDL ₃	5,6	(7)	5,8	(7)	4	8,2	(9)	7,4	(9)	-10	0,777	0,334	0,359
LDL ₄	1,2	(4)	1,1	(3)	-12	2,1	(5)	1,6	(4)	-23	0,674	0,152	0,468
LDL ₅	0,2	(1)	0,0	(0,3)	-85	0,3	(1)	0,1	(0,5)	-50	0,101	0,312	0,687
LDL _{GRANDE}	55	(17)	53	(17)	-3	57	(19)	57	(18)	1	0,306	0,838	0,440
LDL _{PEQUENA}	7,0	(11)	6,9	(9)	-2	10,5	(14)	9,1	(13)	-14	0,907	0,190	0,385
LDL _{TOTAL}	120	(32)	111	(31)	-7	130	(35)	123	(38)	-5	0,006	0,060	0,592

Valores apresentados em média (T0 e T8), seguido do desvio padrão. O Δ é a diferença entre T8-T0, sendo apresentado em % de modificação. Para as análises do efeito do tempo dentro do mesmo grupo foi utilizado o teste-t Student pareado e para analisar a diferença entre as intervenções utilizou-se o teste-t para amostras independentes comparando a variação $\Delta T8-T0$. Para as amostras não paramétricas, utilizou-se o teste Wilcoxon para avaliar o efeito do tempo e Mann-Whitney para comparar as duas intervenções. p^1 ω -3 no T0 vs T8; p^2 ω -9 no T0 vs T8; p^3 ω -3 vs ω -9. * Ssignificância de $p < 0,05$

Ao analisar a prevalência dos fenótipos A ou B, considerando a composição das subfrações de LDL, ambas as intervenções não modificaram o padrão dos participantes.

6.1.5 Efeitos da suplementação na LDL(-) e no antiLDL(-)

Considerando que a LDL(-) é um novo biomarcador que pode estar relacionado com risco cardiovascular, esse estudo procurou avaliar se a suplementação de óleo de peixe (60% ω -3) modificaria as concentrações plasmáticas da LDL(-) e seus anticorpos.

Após oito semanas de suplementação, os participantes que receberam ω -3 reduziram em média 21% a LDL(-) no plasma e em 22% a relação LDL(-)/antiLDL(-). Os participantes que receberam ω -9 reduziram em 1% as concentrações plasmáticas de LDL(-) e em 3% a relação LDL(-)/antiLDL(-).

Na **Tabela 13** apresentam-se as modificações observadas para ambas intervenções.

Tabela 13: Efeito da suplementação na LDL(-) e na LDL(-)/antiLDL(-), segundo tempo e intervenção.

Variáveis	ω -3					ω -9					p^1	p^2	p^3
	T0		T8		$\Delta(T8-T0)$ %	T0		T8		$\Delta(T8-T0)$ %			
LDL(-) (U/L)	20,97	(35)	16,64	(24)	-21	11,69	(15)	11,56	(17)	-1	0,002*	0,025*	0,187
antiLDL (mU/L)	7,29	(4)	7,14	(4)	-2	7,89	(4)	7,98	(4)	1	0,613	0,734	0,275
LDL(-) /antiLDL(-)	3,96	(7)	3,07	(5)	-22	2,69	(5)	2,62	(5)	-3	0,006*	0,051	0,116

LDL(-): Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa; antiLDL(-): anticorpo anti LDL(-). Valores apresentados em média e desvio padrão. O Δ é a diferença entre T8-T0, sendo apresentada a variação percentual. Para as análises do efeito do tempo dentro do mesmo grupo foi utilizado o teste t-Student pareado e para analisar a diferença entre as intervenções utilizou-se o teste-t para amostras independentes comparando a variação $\Delta T8-T0$. Para as amostras não paramétricas, utilizou-se o teste Wilcoxon para avaliar o efeito do tempo e Mann-Whitney para comparar as duas intervenções. p^1 ω -3 no T0 vs T8; p^2 ω -9 no T0 vs T8; p^3 ω -3 vs ω -9. * Significância de $p < 0,05$.

São poucos os estudos que avaliaram a concentração de LDL(-) no plasma em humanos. Alguns utilizam esse biomarcador em estudos transversais para verificar a relação com uso de estatinas ou fenofibratos e as modificações na LDL (MOREIRA, 2014; ZHANG, 2008; ROSENSEN,

2008); porém, até a presente data, nenhum estudo foi encontrado nas bases do Pubmed avaliando efeitos de suplementação de ω -3 nessa partícula modificada.

O alvo das terapias para prevenção de DCV tem sido a redução da LDL-c, porém, alguns ensaios clínicos não mostram relação entre essa redução e menor mortalidade (KJEKSHUS, 2007; GISSI, 2008). Nas últimas décadas têm surgido hipóteses indicando que as variações na conformação das subfrações da LDL pelo tamanho ou grau de oxidação podem estar associadas aos eventos cardiovasculares e a LDL(-) vem se tornando alvo de interesse de diversos grupos de pesquisa (SANCHEZ-QUESADA, 2008; DAMASCENO, 2011; BENITEZ, 2006). Considerando que as partículas de LDL modificadas, incluindo a LDL(-), são reconhecidas pelo sistema imune como estruturas non-self, anticorpos anti-LDL(-) têm sido identificados e associados com perfis cardiovasculares mais graves (MOREIRA, 2014; EBRAHIMI, 2009; FAULIN, 2012; LEE, 2012).

Considerando os fatores de risco presentes na SM, um estudo realizado por HSU e colaboradores com 57 pacientes de ambos os sexos, publicado em 2014, comparou pacientes com e sem SM. Nesse estudo, a concentração de LDL(-) no plasma mostrou correlação positiva com a presença de fatores para SM. Também concluiu que os pacientes com SM tinham maior concentração de LDL(-) do que os pacientes controle confirmando o postulado de SANCHEZ-QUESADA (2004), que vem relacionando maiores concentrações de LDL(-) plasmática em pacientes com hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes e doença arterial coronariana.

No presente trabalho, a LDL(-) foi correlacionada positivamente com peso, IMC e CC, além de APOA1, porém, não houve correlação com os biomarcadores de perfil lipídico, nem com a glicemia.

A revisão de KE et al., (2014), mostrou que a LDL(-) é o mais moderno biomarcador que pode estar relacionado com o desenvolvimento da aterosclerose, e que se encontra em maiores concentrações em pacientes com SM e DM. Dessa maneira sugere que são necessários estudos epidemiológicos a grande escala utilizando um método de análise padronizado para melhor entender a importância da LDL(-) no metabolismo lipídico e no desenvolvimento de doenças.

O presente estudo mostrou efeitos de redução na LDL(-) pela suplementação com ω -3 e ω -9, trazendo novas perspectivas de prevenção e terapias diante das DCV.

Adicionalmente, é importante avaliar os efeitos pró-inflamatórios da LDL(-). Segundo BENITEZ et al., 2006 a LDL(-) promove um fenótipo inflamatório onde células endoteliais produzem mais citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Os mecanismos envolvidos nessa resposta

produzem anticorpos contra as moléculas modificadas (FAULIN et al., 2011) e vários epítomos específicos para a LDL(-) já têm sido identificados. As reações inflamatórias e imunes são amplamente reconhecidas como parte integral nos processos ateroscleróticos e na cronicidade da SM (BERNEIS et KRAUSS, 2002; PEREZ-MARTINEZ, 2011).

Foi interessante observar os resultados do nosso estudo em relação à concentração plasmática de anticorpos anti-LDL(-), que reduziram em 2% com a suplementação de ω -3, e aumentou em 1% com a suplementação de ω -9. Embora essas mudanças percentuais não tenham sido significativas, sugerem que a suplementação alimentar pode alterar a geração de LDL modificada e conseqüentemente seus anticorpos.

6.1.6 Avaliação do consumo alimentar e de atividade física

No presente estudo, o monitoramento do consumo alimentar e da atividade física teve por objetivo avaliar se as mudanças observadas em longo do estudo tiveram efeito isolado das intervenções. Não houve variações significativas em relação ao consumo de energia ao longo da intervenção em ambos os grupos, assim como o consumo de proteínas não foi modificado durante o tempo de intervenção e entre os grupos (**Tabela 14**). Observou-se, porém, redução significativa no consumo de carboidratos no grupo ω -3 e redução significativa no consumo de lipídios no grupo ω -9. Apesar da redução do consumo de lipídios no grupo ω -9, esse permaneceu semelhante ao grupo ω -3.

Não houve diferença significativa, em ambas as intervenções, no consumo de gorduras saturadas, insaturadas ou *trans* ao longo da intervenção. Perfil semelhante foi observado no consumo de colesterol e fibras.

Tabela 14: Consumo alimentar e atividade física segundo tempo e tipo de intervenção.

Variáveis	ω-3				ω-9				p ¹	p ²	p ³
	T0		T8		T0		T8				
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP			
Energia (kcal)	1608	(622)	1508	(425)	1660	(643)	1510	(495)	0,229	0,071	0,666
Proteínas (g)	70,00	(38)	73,00	(31)	74,00	(31)	73,00	(28)	0,590	0,770	0,552
Carboidratos (g)	218,00	(88)	188,00	(46)	228,00	(109)	205,00	(68)	0,025	0,100	0,646
Lipídios (g)	51,00	(23)	51,00	(24)	55,00	(30)	47,00	(24)	0,993	0,047	0,140
Gordura Saturada (g)	18,00	(10)	17,00	(9)	18,00	(11)	15,00	(9)	0,649	0,038	0,243
Gordura Monoinsaturada (g)	13,00	(8)	14,00	(8)	13,00	(10)	13,00	(9)	0,556	0,582	0,420
Gordura Poli-insaturada (g)	5,00	(4)	6,00	(3)	6,00	(5)	6,00	(4)	0,532	0,583	0,405
Gordura <i>Trans</i> (g)	1,50	(1)	1,25	(1)	2,00	(2)	1,00	(1)	0,196	0,456	0,780
Colesterol (mg)	258,00	(326)	246,00	(293)	220,00	(306)	185,00	(105)	0,847	0,379	0,741
Fibras (g)	15,00	(8)	14,00	(6)	17,00	(13)	15,00	(8)	0,144	0,163	0,764
Atividade Física Total	7	(1,47)	7	(1,27)	7,16	(1,55)	6,85	(1,19)	0,098	0,068	0,947

Valores apresentados em média e (DP). Para avaliar o efeito do tempo dentro do mesmo grupo foi utilizado o teste-t Student pareado nas variáveis paramétricas.

p¹ ω -3 no T0 vs T8; p² ω -9 no T0 vs T8; p³ ω -3 vs ω -9. *Significância de p < 0,05.

Não foram observadas diferenças entre atividade física total ao compararmos o momento basal e após as oito semanas de suplementação.

Como indicadores de aderência à intervenção, utilizaram-se a contagem das cápsulas que sobravam, as quais eram devolvidas pelos participantes no centro de coleta ao final das oito semanas. Como biomarcadores utilizaram-se as concentrações plasmáticas de DHA, EPA e ácido oleico. Os participantes do grupo ω -3 apresentaram uma média de consumo de cápsulas de $81\% \pm 14$ das cápsulas e os participantes do grupo ω -9 mantiveram uma aderência média de $84\% \pm 9$.

Avaliando a concentração plasmática de DHA nos participantes que receberam ω -3, observou-se aumento significativo de após oito semanas de intervenção ($T_0=6,5\%$; $T_8=11,7\%$), enquanto que não houve variações para os participantes que receberam ω -9. Curiosamente, as concentrações plasmáticas de EPA nos participantes que receberam ω -3 mantiveram-se estáveis após a suplementação. Em relação ao ácido oleico, somente os participantes que receberam ω -9 aumentaram significativamente sua concentração plasmática em 6%.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a suplementação com ω -3 em indivíduos com síndrome metabólica promoveu redução da %MG, redução na pressão arterial sistólica (4%) e diastólica (5%). Também houve aumento significativo no percentual DHA no plasma.

Da mesma maneira, observamos redução significativa nos parâmetros de perfil lipídico como CT, LDL, nHDL, além do conhecido efeito de redução de TG pela suplementação com ω -3. Adicionalmente houve redução significativa na concentração de LDL(-), e na razão LDL(-)/antiLDL(-) nos participantes no grupo de intervenção, porém não foram observadas mudanças no tamanho das subfrações da LDL.

Portanto, os indivíduos com SM podem se beneficiar com a suplementação diária de cápsulas de óleo de peixe contendo elevado conteúdo de EPA e DHA (60%), principalmente pela redução de TG e da pressão arterial, estimulando o consumo de óleo de peixe como medida preventiva para adultos com esses fatores de risco cardiovascular, promovendo adicionalmente, uma importante redução de partículas de LDL(-) circulantes no plasma.

8 BIBLIOGRAFIA

1. ABEGUNDE, D., STANCIOLE, A., An estimation of the economic impact of chronic non communicable diseases in selected countries. WHO – CHP, 2006.
2. ALBERTI, K. et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009; 120:1640–1645.
3. ALDONS J. L. and PÄIVI P. A treasure trove for lipoprotein biology. *Nature Genetics* 40, 129-130 (2008). doi:10.1038/ng0208-129
4. ALTMANN S. W., DAVIS H. R. Jr., ZHU L. J., YAO X., et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*. 2004; 303(5661):1201-4
5. ALWAN, A., et al. Monitoring and surveillance of chronic noncommunicable diseases: progress and capacity in high-burden countries. *The Lancet*, 2010, 376:1861-1868.
6. ARMATRUDA, J. M., LINEMEYER, D. L. Obesity. In: Felig P. Frohmann LA. **Endocrinology Metabolism**. 4 ed. USA: Mc Graw Hill, 2001. p. 945-979
7. AVOGARRO P., BITTOLO-BON G., CAZZOLATO G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Atherosclerosis* 1988; 8:79–87
8. AZAMBUJA, M. I., R.; FOPPA, M.; MARANHÃO M., F., C.; ACHUTTI, A., C. Impacto Econômico dos casos de Doença Cardiovascular Grave no Brasil: Uma estimativa baseada em Dados Secundários, *Arq. Bra. Card. Sociedade Brasileira de Cardiologia*, 2008
9. BALK E, IP S, CHUNG M, LAU J, LICHTENSTEIN A H. Low density lipoprotein subfractions: Systematic Review of Measurement Methods and Association with Cardiovascular Outcomes. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2008 Jun 16.
10. BANCELLS C., CANALS F., BENITEZ S. et al. Proteomic analysis of electronegative low-density lipoprotein. *J Lipid Res* 2010; 51(12):3508–15.
11. BAYS HE, BRAECKMAN RA, et al. Icosapent ethyl, a pure omega-3 fatty acid: effects on lipoprotein particle concentration and size in patients with very high tryglyceride levels (the MARINE study). *Journal Clin. Lipidol*. 2012 Nov-Dec;6(6):565-72

12. BENDER N. et al. Fish or n3-PUFA intake and body composition: a systematic review and meta-analysis. *Obesity reviews* 2014 Aug; 15;657-665
13. BENITEZ S., CAMACHO M., BANCELLS C., et al. Wide proinflammatory effect of electronegative low-density lipoprotein on human endothelial cells assayed by a protein array. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761(9):1014–21.
14. BERNEIS, K.K.; KRAUSS, R.M. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J. Lipid Res.* 2002, 43, 1363–1379.
15. BLANCO F. J., VILLEGAS S., BENITEZ S., 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* 2010; 51(6):1560–5.
16. BRAY GA., CHAMPAGNE CM., Obesity and the Metabolic Syndrome: implications for dietetics practitioners. *J Am Diet Assoc.* 2004 Jan;104(1):86-9.
17. BROWNER, W.S.; NEWMAN, T.B.; CUMMUNHGS, S.R.; HULLEY, S.B. Estimando o tamanho de amostra e o poder estatístico: aplicações e exemplos. In: HULLEY, S.B.; CUMMUNHGS, S.R.; BROWNER, W.S.; GRANDY, D.G.; HEARTS, N.; NEWMAN, T.B. **Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2003. p. 83 a 110.
18. CALDER P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. *Braz. J. Med. Biol. Res*, April 2003, volume 36 (4) 433-446 (Review)
19. CAMERON, A., J., et al., The metabolic syndrome prevalence in worldwide populations, *Endocrinol. Metab. Clin.*, 2004.
20. CAMPFIELD et al. The ob protein (leptina) pathway – a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm. Metab. Res*, 1996
21. CAMPOS E. M., Da Classificação dos Fenótipos de Fredikcson – perfis de lipoproteínas – ao entendimento do genótipo. *Acta Médica Portuguesa*, 2005
22. CANI et al., Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance Diabetes 56:1761–1772, 2007
23. CHAN, E. J.; CHO, L. What can we expect from Omega-3 fatty acid? *Cleveland clinic Journal of Medicine*, v.76, n.4, p. 245-251, 2009.
24. CHANG Y.H., ABDALLA D.S., SEVANIAN A. Oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 23, No. 2, pp. 202–214, 1997

25. CHAPPEY B., MYARA I., BENOIT M. O., MAZIERE C., MAZIERE J. C. and MOATTI N. Characteristics of ten charge-differing subfractions isolated from human native low density lipoprotein (LDL). No evidence of peroxidative modifications. *Biochim. Biophys. 1995 Acta.* 1259: 261–270.
26. COUET C., DELARUE J., RITZ P., ANTOINE J. M., LAMISSE F. Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. 1997. *International Journal of Obesity.* 637-643.
27. COX R. A., GARCIA-PALMIERI M. R. Cholesterol, Triglycerides, and Associated Lipoproteins. 1990. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations.* 3rd edition. Chapter 31.
28. CROCHEMORE I. C. C. et al. Resistance, and Lipemia in Women With Type 2 Diabetes and Obesity -3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Does Not Influence Body Composition, Insulin. *Nutri Clin Prac.* 2012; 27:553
29. D'AGOSTINO, R.B.; VASAN, R.S.; PECINE, M.J., WOLF, P.A., COBAIN, M., MASSARO, J.M., KANEL, W.B. General cardiovascular risk profile for use in primary care: The Framingham Heart Study. **Circulation**, v.117, n.6, p. 743-753, 2008
30. DAMASCENO, N. R. T. ; ABDALLA, D. S. P. ; APOLINARIO, E. ; Fernandes I ; Oliveira J ; Sevanian A. Detection of electronegative low density (LDL-) in plasma and atherosclerosis lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. *Clinical Biochemistry*, v. 39, p. 28-38, 2006.
31. DAMASCENO, N. R. T.; CARIOCA, A. A. Nutrição e Síndrome Metabólica. In: Helena Alves de Carvalho Sampaio; Maria Olganê Dantas Sabry. (Org.). *Nutrição em Doenças Crônicas: Prevenção e Controle.* 2ed.Sao Paulo: Atheneu, 2013, v. 1, p. 157-172.
32. DE GRAAF J., et al., Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arteriosclerosis.* 1991. 11: 298–306.
33. DEJAGER S., Low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominance in combined hyperlipidemia. *J. Lip. Res.* 1993.
34. DEMUTH K., et al. A Cytotoxic Electronegative LDL Subfraction Is Present in Human Plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Jun;16(6):773-83.
35. DUTHEIL F. et al. Atherogenic subfractions of lipoproteins in the treatment of Metabolic Syndrome by physical activity and diet – the RESOLVE trial. *Lipids Health Dis.* 2014. Jul 11;13:112.
36. 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.* 2009; 64(3):321-327.

37. ESTRUCH M., SANCHEZ-QUESADA J. L., ORDOÑEZ-LLANOS J., BENITEZ S., Electronegative LDL: A Circulating Modified LDL with a Role in Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 181324.
38. FAULIN E., De SENA-EVANTELISTA K.C., PACHECO, D., B., AUGUSTO E., M., ABDALLA, D., S. Development of immunoassays for anti-electronegative LDL autoantibodies and immune complexes. *Clin Chim Acta.* 2012 Jan 18;413(1-2):291-7.
39. FERNANDEZ, D. et al. Perfil metabólico-inflamatorio en la transición obesidad, síndrome metabólico, diabetes mellitus en población mediterránea. Estudio DARIOS, 2013.
40. FINELLI C. and TARANTINO G. What is the role of adiponectin in obesity related non-alcoholic fatty liver disease? *World J Gastroenterol.* 2013 February 14; 19(6): 802-812.
41. FLORINDO, AA.; LATORRE, M.R.D.O. Validação e Reprodutibilidade do Questionário de Baecke de avaliação da atividade física habitual em homens adultos. **Rev Bras Med Esporte**, v. 9, n. 3, p. 121-128, mai/jun. 2003
42. FORD, EARL S., HAROLD W. KOHL III, ALI H. MOKDAD, AND UMED A. AJANI. Sedentary behavior, physical activity, and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Obes Res.* 2005;13:608–614.
43. FORTI N., DIAMENT J. Apolipoproteínas B e A1: fatores de risco cardiovascular? *Rev. Assoc. Méd. Bras.* Vol 53 no3. São Paulo Maio/Junho, 2007
44. FREIRE, R.,D.; CARDOSO, M., A.; GIMENO, S., G., A.; FERREIRA, S., R., G.; Dietary Fat Is Associated With Metabolic Syndrome in Japanese Brazilians, *Diabetes Care*, 2005 Jul;28(7):1779-85.
45. 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
46. GAGLIARDI, A. R. T. Obesidade central, bases hormonais e moleculares da síndrome metabólica. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*, São Paulo, v.14, n.4, p.557-564, jul./ago. 2004.
47. GALLOU-KABANI, C., JUNIEN, C., Nutritional Epigenomics of Metabolic Syndrome: New Perspective Against the Epidemic, *Diabetes*, 2005 Jul;54(7):1899-906.
48. GELEIJNSE JM, et al. Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *J. Hypertens.* 2002 Aug;20(8):1493-9.

49. GILLINGHAM LG, HARRIS-JANZ S, JONES PJ. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids*. 2011; Mar. 46(3):209-28
50. GISSI HFI, TAVAZZI L, MAGGIONI AP, et al. Effect of rosuvastatin in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008;372:1231–9.
51. GOFMAN JW, LINDGREN FT, ELLIOT H: Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J Biol Chem* 1949; 179:973-978 Treatment of dyslipidemia
52. GOMES L. F., ALVES A. F., SEVANIAN A., et al. Role of beta 2-glycoproteinI, LDL(-), and antioxidant levels in hypercholesterolemic elderly subjects. *Antioxid. Redox. Signal*. 2004; 6(2):237–44.
53. GREGOR, M., F.; HOTAMISLIGIL G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology*. 2011. Vol. 29: 415-445
54. GROEGER A. L., CIPOLLINA C., et al. Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids, *Nat Chem Biol*. 2010 Jun;6(6):433-41. doi: 10.1038/nchembio.367.
55. GRUNDT, H.; NILSEN, D. W. T. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Haematologica*, v. 93, n. 6, p. 807-812, 2008.
56. GRUNDY, S., M., Metabolic syndrome pandemic, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2008 Apr;28(4):629-36. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.151092. Epub 2008 Jan 3
57. GRUNDY S.M. Multifactorial etiology of hypercholesterolemia. Implications for prevention of coronary heart disease. *Atheroscl. Thromb*. 1991; 11: 1619-25.
58. 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**. U.S.: 1994-1996, chapter 4, p. 42-63
59. HANSSON G. K., et al. Innate and Adaptive Immunity in the Pathogenesis of Atherosclerosis, *Circulation Research*, *Circ. Res*. 2002;91;281-291
60. HANSSON G. K., LIBBY P., The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*. July, 2006 508-519 |doi:10.1038/nri1882
61. HANSSON G. K., ROBERTSON A. K., SODERBERG-NAUCLER S. "Inflammation and atherosclerosis" *Annual Review of Pathology*, vol. 1, pp. 297–329, 2006.

62. HARRIS W. S., DAYSPRING T. D., MORAN T. J., Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new developments and applications. *Postgrad Med.* 2013 Nov; 125(6):100-13. doi: 10.3810/pgm.2013.11.2717.
63. HIRAYAMA S., MIIDA T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta.* 2012 Dec 24;414:215-24. doi: 10.1016/j.cca.2012.09.010.
64. HOSOGAI N., FUKUHARA A., et al., Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Adipocytokine Dysregulation *DIABETES*, VOL. 56, APRIL 2007
65. HSU J-F, CHOU T-C, LU J, et al. Low-Density Lipoprotein Electronegativity Is a Novel Cardiometabolic Risk Factor. Kiechl S, ed. *PLoS ONE*2014;9(9):e107340.
66. HUANG X.F., XIN X., McLENNAN P., STORLEIN L., Role of fat amount and type in ameliorating diet-induced obesity: insights at the level of hypothalamic arcuate nucleus leptin receptor, neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA expression. *Diabetes Obes Metab.* 2004 Jan; 6(1):35-44.
67. HUSSAIN, M., Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Lipid metabolism*, 2014
68. IDF worldwide definition of the metabolic syndrome, 2005
69. JAYASHREE, B. et al. Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* 2014; 388(1-2):203-10. doi: 10.1007/s11010-013-1911-4.
70. JONES P.J. Dietary linoleic, alpha-linolenic and oleic acids are oxidized at similar rates in fats fed a diet containing these acids in equal proportions. *Lipids.* 1994, Jul;29(7):491-5
71. JOHNSON, R.K.; DRISCOLL, P.; GORAN, M.I. Comparison of multiple-apss 24-hour recall estimates of energy intake with total energy expenditure determined by doubly labeled water method in young children. *J Am Diet Assoc*, v. 96, n. 11, p. 1140-1144, nov. 1996.
72. KE LY, STANCEL N, BAIR H, CHEN CH., The underlying chemistry of electronegative LDL's atherogenicity. *Curr Atheroscler Rep.* 2014 Aug;16(8):428. doi: 10.1007/s11883-014-0428-y.
73. KELLEY D. S. et al. Docosahexaenoic acid supplementation improves fasting and postprandial lipid profiles in hypertriglyceridemic men. *Am J Clin Nutr* 2007;86:324–33
74. KJEKSHUS J, APETREI E, BARRIOS V, et al. Rosuvastatin in older patients with systolic heart failure. *N Engl J Med.* 2007;357: 2248–61. 5.

75. LAMARCHE B. et al. The small dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: epidemiology, patho-physiology and therapeutic aspects. *Diabetes Metabolism*, 1999, Sep;25(3):199-211.
76. LAMARCHE B., et al. Small, Dense Low-Density Lipoprotein Particles as a Predictor of the Risk of Ischemic Heart Disease in Men. Prospective Results From the Quebec Cardiovascular Study.
77. LAZAR M.A. How obesity causes diabetes: Not a tale. *Science* 2005, Jan 21; 307(5708):373-5
78. LEE AS, WANG GJ, CHAN HC, et al. Electronegative low-density lipoprotein induces cardiomyocyte apoptosis indirectly through endothelial cell-released chemokines. *Apoptosis*. 2012;17:1009– 18s.
79. LEE J.H., et al. Omega-3 Fatty Acids for Cardioprotection. *Mayo Clin Proc* . 2008;83(3):324-332.
80. LEE J. H., et al. Omega- 3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability. *Nat. Rev. Cardiol*. 2009; 6, 753–758.
81. LEE S., KWAK H. B. Role of adiponectin in metabolic and cardiovascular disease. *J Exerc Rehabil*. 2014 Apr 30;10(2):54-9. doi: 10.12965/jer.140100. eCollection 2014.
82. LOHMAN, T.G.; MARTORELL, R.; ROCHE A.F. Anthropometric standardization Reference Manual: The Airlie Consensus Report. **Champaign III: Human Kinetics**; 1988
83. LORENTE-CEBRIAN S, et al. Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *J Physiol Biochem* (2013) 69:633– 651
84. LOTTENBERG A. M. et al. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012; 23: 1027-1040.
85. LOVEGROVE J. et al. Moderate fish-oil supplementation reverses low-platelet, long-chain n3 polyunsaturated fatty acid status and reduces plasma triacylglycerol concentrations in British Indo-Asians. *Am J Clin Nutr* 2004;79:974–82
86. LUMENG C.N., SALTIEL, A., R., Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2011 Jun;121(6):2111-7.
87. MAGKOS, F.; MOHAMMED, B.S.; MITTENDORFER, B. Effect of obesity on the plasma lipoprotein subclass profile in normoglycemic and normolipidemic men and women. *Int. J. Obes. (Lond.)* 2008, 32, 1655–1664. 6.

88. MATHERS, C., D., LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, 2006, 3(11):e442.
89. McNAMARA J. R., CAMPOS H., ORDOVAS J. M., PETERSON J., WILSON P. W., SCHAEFER E., J. Effect of gender, age, and lipid status on low density lipoprotein subfraction distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis* 1987;7:483-490.
90. MEAD J. R., IRVINE S. A., RAMJI D. P., Lipoprotein Lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med (Berl)*. 2002 Dec;80(12):753-69.
91. MEDEIROS A. M. B. et al. Anticuerpos contra Ldl-Ox y síndrome coronario agudo. Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2009.
92. MELLO A.P.Q. et al. Electronegative LDL: origin and impact in health and disease. *Atherosclerosis* 215 (2011) 257–265
93. MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B.; Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. World Health Organization (in collaboration with the World Heart Federation and World Stroke Organization), Geneva 2011.
94. MOREIRA F. T., RAMOS S. C. MONTEIRO A. M. HELFENSTEIN T., GIDLUND M., DAMASCENO N. R. NETO A. M. IZAR M. C. FONSECA F. A. Effects of two lipid lowering therapies on immune responses in hyperlipidemic subjects.
95. MOSCA, L.; BENJAMIN E.J. Effectiveness-Based Guidelines for the Prevention of Cardiovascular Disease in Women 2011 Update: A Guideline From the American Heart Association. **Circulation**, v.123, n. 11, p. 1243-62, mar. 2011
96. MOZAFFARIAN D., and WU J.H. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Effects on Risk Factors, Molecular Pathways, and Clinical Events, *J Am Coll Cardiol*. 2011 Nov 8;58(20):2047-67. doi: 10.1016/j.jacc.2011.06.063
97. NAJAFIAN J., MOHAMMADIFARD, N., NAEINI, F.F., NOURI, F., Relation between usual daily walking time and metabolic syndrome, *Niger. Med. J.*, 20014 Jan;55(1):29-33. doi: 10.4103/0300-1652.128156.
98. NIGON F., LESNICK P., ROUIS M., CHAPMAN M. J. Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. *J. Lipid Res*. 1991. 32: 1741–1753.

99. NIKOLIC D., et al. Lipoprotein Subfractions in Metabolic Syndrome and Obesity: Clinical Significance and Therapeutic Approaches. *Nutrients*. 2013 Mar 18;5(3):928-48. doi: 10.3390/nu5030928
100. NIMURA, N., KINOSHITA, T. Fluorescent Labeling Of Fatty Acids With 9-Anthryldiazomethane (ADAM) For High-Performance Liquid -Chromatography. **Anal Lett**, v.13, n. 3, p. 191 - 202. 1980
101. OELRICH B., DEWEL A., GARDNER C. D. Effects of fish oil supplementation on tryglycerides, ldl cholestrol, and LDL subfracions in hypertryglyceridemic adults. *Nutrition, Metabolsim and Cardiovascular Diseases* 2011
102. OPAS, 2012 Health in the Americas, 2012 Edition: Country Volume N. Pan American Health Organization, 2012
103. OREKHOV N., TERTOV V. V., KUDRYASHOV S. A., and SMIRNOV V. N. "Triggerlike stimulation of cholesterol accumulation and DNA and extra cellular matrix synthesis induced by atherogenic serum or low density lipoprotein in cultured cells," *Circulation Research*. 1990. vol.66,no.2,pp.311–320.
104. PARADIS M. E., LAMARCHE B. Endothelial lipase: Its role in cardiovascular disease. *Can. J. Cardiol.* Feb 2006; 22(Suppl B): 31B–34B
105. PEREZ-MARTINEZ P., Glucokinase Regulatory Protein Genetic Variant Interacts with Omega-3 PUFA to Influence Insulin Resistance and Inflammation in Metabolic Syndrome. *Plos one*. June 2011 | Volume 6 | Issue 6 | e20555
106. PIRILLO A., NORATA G. D., CATAPANO A.L. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. 2013. doi: 10.1155/2013/152786.
107. REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease. Banting lecture 1988. *Diabetes*. 1988 Dec;37(12):1595-607.
108. REAVEN P. D., GRASSE B.J., TRIBBLE D.L., Effects of linoleate-enriched and oleate-enriched diets in combination with alpha-tocopherol on the susceptibility of LDL and LDL subfractions to oxidative modification inhumans. *Atheroscler Thromb*. 1994 Apr; 14(4):557-66
109. RIZZO, M.; MIKHAILIDIS, D.P. There is more to predicting vascular disease than just established risk factors. *Curr. Pharm. Des*. 2011, 17, 3608–3610.
110. ROSEN et SPIEGELMAN. What we talk about when we talk of fat. *Cell*, 2014 Jan 16;156(1-2):20-44

111. ROSENSON R. S. Fenofibrate reduces lipoprotein associated phospholipase A2 mass and oxidative lipids in hypertriglyceridemic subjects with metabolic syndrome. *Life Sci*, 2014. Mar 11; 98(2):83-7. doi: 10.1016/j.lfs.2014.01.001
112. ROSS R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999 Nov; 138 (5Pt2):S419-20
113. RUZICKOVA J. et al. Omega three PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids*. 2005 Jan; 40 (1):115.
114. SALAS-SALVADÓ, J., et al., Effect of a Mediterranean Diet Supplemented With Nuts on Metabolic Syndrome Status : One-Year Results of the PREDIMED Randomized Trial, *Arch. Intern. Med.*, 2008. Dec 8;168(22):2449-58. doi: 10.1001/archinte.168.22.2449.
115. SALONEN J. T. "Markers of oxidative damage and antioxidant protection: assessment of LDL oxidation," *Free Radical Research*. 2000 vol.33,pp.S41–S46.
116. SANCHEZ-QUESADA J. L., BENÍTEZ S., OTAL C., et al. Density distribution of LDL in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. *J Lipid Res* 2002; 43:699–705.
117. SANCHEZ-QUESADA J. L., CAMACHO M., ANTON R., et al., Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. *Atherosclerosis* 2003; 166:261–70.
118. SANCHEZ-QUESADA J.L. BENITEZ S., ORDOÑEZ-LLANOS J., Electronegative low-density lipoprotein. *Curr. Opin. Lipidol*. 2004;15:329–35.
119. SATOH N., et al. Purified eicosapentaenoic acid reduces small dense LDL, remnant lipoprotein particles, and C-reactive protein in metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2007. Jan; 30(1): 144-6
120. SEVANIAN A., et al. Electronegative LDL is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. *J. Lipid Res*. 1997. 38: 419–428.
121. SHEARER G. C., SAVINOVA O. V., HARRIS W. S. Fish oil, how does it reduce plasma triglycerides? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2011.
122. SHERER Y., SHOENFELD Y. Mechanisms of Disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2006, 99-106 doi:10.1038/ncprheum0092
123. SIQUEIRA A. F. A., ABDALLA D. S. P., FERREIRA S. R. G. LDL: da Síndrome Metabólica à Instabilização da Placa Aterosclerótica. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 50 nº 2 Abril 2006

124. SIQUEIRA Antolella F.A.; ABDALLA, Dulcinéia S.P.; FERREIRA, Sandra R.G.. LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* [online]. 2006, vol.50, n.2, pp. 334-343. ISSN 0004-2730.
125. SOBENIN et al., Low density lipoprotein – containing circulating immune complexes: role in atherosclerosis and diagnostic value. *Biomed Res. Int.* 2014; 2014:205697.
126. SPITE M. Deciphering the role of n-3 polyunsaturated fatty acid-derived lipid mediators in health and disease. *Proc Nutr Soc.* 2013 Nov;72(4):441-50. doi: 10.1017/S0029665113003030
127. STEINBRECHER U. P., FISHER M., WITZTUM J. L., and CURTISS L. K. "Immunogenicity of homologous low density lipoprotein after methylation, ethylation, acetylation, or carbamylation: generation of antibodies specific for derivatized lysine," *Journal of Lipid Research.* 1984. vol.25,no.10,pp.1109–1116.
128. STONE P., et al. Prediction of sites of coronary atherosclerosis progression: In vivo profiling of endothelial shear stress, lumen, and outer vessel wall characteristics to predict vascular behavior. *Current Opinion in Cardiology: November 2003 - Volume 18 - Issue 6 - pp 458-470 Ischemic heart disease*
129. SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *Journal of Leukocyte Biology*, 2010. vol. 88 no. 1 33-39
130. SYMONDS, M. E., SEBERT, S.P., HYATT, M. A, BUDGE, H., Nutritional Programming of the Metabolic Syndrome, *Nature Reviews Endocrinology* 5, 604-610 (November 2009) | doi:10.1038/nrendo.2009.195
131. SZONDY E., HORVATH M., MEZEY Z., et al. 'Free and complexed anti-lipoprotein antibodies in vascular diseases," *Atherosclerosis*, 1983. vol.49, no.1,pp.69–77.
132. TANI S., NAGAO K., MATSUMOTO M., HIRAYAMA A. Highly Purified Eicosapentaenoic Acid May Increase Low-Density Lipoprotein Particle Size by Improving Triglyceride Metabolism in Patients With Hypertriglyceridemia *Circ J* 2013; 77: 2349 – 2357
133. TONKIN A., BYRNES, A. Treatment of Dyslipidemia. *F1000Prime Rep.* 2014; 6: 17. Published online Mar 3, 2014. doi: 10.12703/P6-17 PMID: PMC3944745
134. VECKA M., et al., N-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of atherogenic dyslipidemia *Neuroendocrinol Lett* 2012; 33(Suppl.2):87–92 PMID: 23183517 NEL330812A17

135. WANG Q, et al. Effect of omega-3 fatty acids supplementation on endothelial function: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis*, 2012 v. 221, p. 536 – 543.
136. WITZTUM J. L., STEINBRECHER U. P., KESANIEMI Y. A., and FISHER M. "Autoantibodies to glucosylated proteins in the plasma of patients with diabetes mellitus," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984. vol.81,no. 10,pp.3204–3208.
137. WORLD HEALTH ORGANIZATION, Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, WHO, 2011.
138. XAVIER H. T., ABDALLA D. S. P., MARTINEZ T. L. R., RAMIRES A. F., GAGLIARDI A. R. T. Efeitos da Lipoproteína LDL-oxidada Sobre a Proliferação e a Motilidade Espontânea in Vitro de Células Endoteliais de Artérias Coronárias Humanas, *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* - Volume 83, Nº 6, Dezembro 2004
139. XAVIER H. T., et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol* 2013
140. XU S., OGURA S., CHEN J., LITTLE P. J., MOSS J., LIU P. "LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers," *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012.
141. ZHANG B., et al. Reduction of charge-modified LDL by statin therapy in patients with CHD or CHD risk factors and elevated LDL-c levels: the SPECIAL Study. *Atherosclerosis*, 2008. Dec, 201(2): 353-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.02.024

9.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo

Faculdade de Saúde Pública e Hospital Universitário

Av. Dr. Arnaldo, 715 – CEP 01246-904 – São Paulo – Brasil coep@fsp.usp.br

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 participantes 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 participantes 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 sua concentração socioeconômico, clínico, concentração 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 participante 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

9.2 Formulário de Identificação e Avaliação Sócio-Econômica, Cultural e de Saúde do Paciente

() HU		REG:
A0 Data: / /		A1Retorno: / /
		A1.1Retorno: / /
A2 Nome:		A3Data de Nasc.: / /
Endereço:		
Bairro:	CEP:	
Cidade:	Telefone Res:	
Telefone Recado:	Telefone Celular:	

A4 Sexo:1()M 2()F	A5 Idade:	A6 ERF:
A7 Raça:1() Branco 2() Negro 3() Pardo 4() Amarelo 5() Indígena		
A8 Estado Civil:1() Solteiro 2() Casado 3() Viúvo 4() Divorciado 5() Outros		
A9 Trabalha atualmente: 1() SIM 2() NÃO 3() Aposentado 4() Outros:_____		
A10 Profissão:_____		
A11 Escolaridade:1() Analfabeto 5() Ensino Médio Completo 2() Ensino Fundamental Incompleto 6() Ensino Superior Incompleto 3() Ensino Fundamental Completo 7() Ensino Superior Completo 4() Ensino Médio Incompleto 9() Outros:_____		
A12 Quantas pessoas moram na sua casa?_____A13 Quantas crianças?_____		
A14 Renda média mensal: 1() Menos que 1 SM 3() Entre 6 e 10 SM 2() Ente 1 e 5 SM 4() Mais que 10 SM		
A15 Fumante: 1() SIM 2() NÃO		
A16Consome bebida alcoólica:1() SIM 2() NÃO		
A17Tipos de bebidas alcoólicas mais consumidas: 1() Cerveja 3() Cachaça 5() Vinho tinto 2() Vinho branco 4() Outras:_____		
A18Frequência de Consumo:1() Diário 2() Semanal:_____ 3() Mensal:_____ 4() Menos de 1x/mês		
A19Quantidade de bebida alcoólica ingerida no intervalo acima? _____		
A20Consumo de outros tipos de drogas: 1() SIM 2() NÃO		
A21Qual (s):_____		
A22Possui alguma doença? 1() SIM 2() NÃO		
A23Qual doença: 1() Diabetes Mellitus 6() Insuficiência Renal Crônica 2() Hipertensão Arterial 7() Atresia Biliar 3() Hipotireoidismo 8() Doença Auto-Imune 4() Doença Hepática 9() Doença Coronariana 5() Outras Qual (s)?_____		

A24 Diagnóstico Clínico de DAC ou equivalente: 1() SIM 2() NÃO	
A25 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: _____	
A26 Fator de Risco para DAC: 1() SIM 2() NÃO	
A27 Qual fator de risco:	
1() HAS (140/90 mmHg ou uso de anti-hipertensivo)	
2() HDL baixo (< 40mg/ml)	
3() LDL alto (>160mg/ml)	
4() Colesterol Total (< 200mg/ml)	
5() Idade (45 anos, homens; 55 anos, mulheres)	
6() História Familiar de DAC em parente de 1º. Grau (<55 anos, homens ou <65 anos, mulheres)	

9.3 Recordatório 24 horas

Definição:

O Recordatório de 24 horas é um método de inquérito alimentar realizado mediante uma entrevista pessoal, na qual o entrevistado relata detalhadamente os alimentos consumidos no dia anterior, desde o primeiro alimento ingerido após acordar até a última refeição antes de dormir, incluindo os alimentos consumidos dentro e fora do domicílio.

Metodologia:

A aplicação do Recordatório de 24 horas deve obedecer a seguinte metodologia:

Passo 1: Pergunte ao participante:

“O Sr(a) pode, por favor, me dizer tudo o que comeu ou bebeu ontem, desde o momento que acordou até antes de dormir, começando pelo primeiro alimento ou bebida consumida?”.

Transcreva tudo o que for dito, sem preocupação com quantidade, por enquanto. Não interrompa a informante.

Passo 2: Pergunte o horário e local da refeição.

“O Sr(a) pode lembrar o horário (mais ou menos) e em que lugar?”

Anote os horários e o local referido.

Passo 3: Volte à descrição dos alimentos e pergunte as quantidades em medidas caseiras consumidas, de cada alimento ou preparação.

- a. No caso de alimentos como frutas, pães, biscoitos e ovos, pergunte quantas unidades foram consumidas. Exemplo: 1 fatia de pão de forma, 1 pão francês, 1 pão de queijo, 1 biscoito recheado, etc.
- b. Se possível, registre a marca comercial e variedade dos alimentos. Exemplo: banana nanica, prata, maçã.

- c. No caso de alimentos compostos, como por exemplo, café com leite, mingaus, vitaminas e sopas, pergunte os ingredientes, quantidades e medidas utilizadas na preparação.
- d. Para alimentos como carnes (vaca, frango, porco, peixe) utilize unidades como: fatia (pequena, média, grande), pedaço (pequeno, médio, grande), posta (pequena, média, grande).
- e. Registre se a preparação da carne foi frita, assada, à milanesa ou grelhada.
- f. No caso de verduras e legumes, pergunte os ingredientes da salada. Legumes (cenoura, abobrinha, berinjela, milho, etc): registre em colheres de sopa ou de servir e pergunte o tipo de preparação (cozidos ou refogados).
- g. Para preparações habituais como arroz, feijão e macarrão utilize as medidas caseiras de referência (colher de sopa, de servir, concha, pegador de macarrão).
- h. Certifique-se da presença ou não de temperos nas saladas, açúcar/adoçante nas bebidas, manteiga/requeijão/outras no pão/biscoito/ou torrada e suas quantidades.
- i. Não faça perguntas tendenciosas. Exemplo: “Você tomou café da manhã? Você come pouco?”.
- j. Ao longo da entrevista, lembre-se de perguntar se houve sobras e quantificá-las.

Revisão do recordatório:

Ao final da entrevista é importante que o entrevistador dê ao entrevistado a oportunidade para lembrar de algum alimento que porventura tenha consumido, mas esquecido de referir por ocasião da entrevista.

Por fim, é importante anotar o nome do entrevistador e quanto tempo durou a entrevista.

9.4 Modelo de Recordatório alimentar 24 horas

NOME: _____

TEL: _____

ENTREVISTA: __/__/__

DIA DA SEMANA:()dom ()seg ()ter ()qua ()qui ()sex ()sáb

Horário e Local	Alimentos ou Preparações	Quantidade	Marca Comercial	OBS

Entrevistador: _____

Tempo da entrevista: _____

9.5 Questionário de Atividade Física Habitual

Nome: _____ ID: _____ Data: __/__/__

Nos últimos doze meses:					
ATIVIDADE FÍSICA OCUPACIONAL					
Qual tem sido sua principal ocupação? _____	1		3		5
No trabalho o Sr(a) senta: nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / sempre	1	2	3	4	5
No trabalho o Sr(a) fica em pé: nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / sempre	1	2	3	4	5
No trabalho o Sr(a) anda: nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / sempre	1	2	3	4	5
No trabalho o Sr(a) carrega carga pesada: nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / sempre	1	2	3	4	5
Após o trabalho o Sr(a) carrega carga pesada: muitofreqüentemente / freqüent. / algumas vezes / raramente / nunca	5	4	3	2	1
No trabalho o Sr(a) sua: muitofreqüentemente / freqüent. / algumas vezes / raramente / nunca	5	4	3	2	1
Em comparação com outros da sua idade, o Sr(a) pensa que seu trabalho é fisicamente:	5	4	3	2	1

freqüentemente					
Escore de EFL					
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
Escore de ALL					
Somatória Total dos Pontos					
SCORE TOTAL					

9.6 Escore de Risco de Framingham – ERF

Cálculo de estimativa de risco de desenvolvimento de DAC em 10 anos para homens:

Pontos	Idade	HDL	Colesterol total	Pressão Sistólica não tratada	Pressão Sistólica tratada	Fumo	Diabetes
-2		60+		<120			
-1		50-59					
0	30-34	45-49	<160	120-129	<120	Não	Não
1		35-44	160-199	130-139			
2	35-39	<35	200-239	140-159	120-129		
3			240-279	160+	130-139		Sim
4			280+		140-159	Sim	
5	40-44				160+		
6	45-49						
7							
8	50-54						
9							
10	55-59						
11	60-64						
12	65-69						
13							
14	70-74						
15	75+						

ERF – pontuação homens:

Pontos	% risco
≤ -3 ou menos	<1
-2	1.1
-1	1.4
0	1.6
1	1.9
2	2.3
3	2.8
4	3.3
5	3.9
6	4.7
7	5.6
8	6.7
9	7.9
10	9.4
11	11.2
12	13.2
13	15.6
14	18.4
15	21.6
16	25.3
17	29.4
18 +	>30

Fonte: D'AGOSTINO R.B; VASAN R.S.; et al., General cardiovascular risk profile for use in primary care: The Framingham Heart Study. **Circulation**, v.117, p. 743-753, 2008.

Cálculo de estimativa de risco de desenvolvimento de DAC em 10 anos para mulheres:

Pontos	Idade	HDL	Colesterol total	Pressão Sistólica não tratada	Pressão Sistólica tratada	Fumo	Diabetes
< -3				<120			
-2		60+					
-1		50-59			<120		
0	30-34	45-49	<160	120-129		Não	Não
1		35-44	160-199	130-139			
2	35-39	<35		140-149	120-129		
3			200-239		130-139	Sim	
4	40-44		240-279	150-159			Sim
5	45-49		208+	160+	140-149		
6					150-159		
7	50-54				160+		
8	55-59						
9	60-64						
10	65-69						
11	70-74						
12	75+						

ERF – pontuação mulheres:

Pontos	% risco
-2 ou menos	Abaixo de 1
-1	1.00
0	1.10
1	1.50
2	1.80
3	2.10
4	2.50
5	2.90
6	3.40
7	3.90
8	4.60
9	5.40
10	6.30
11	7.40
12	8.60
13	10.00
14	11.60
15	13.50
16	15.60
17	18.10
18	20.90
19	24
20	27.50
21 +	Acima de 30

Fonte: MOSCA, L.; BENJAMIN E.J. Effectiveness-Based Guidelines for the Prevention of Cardiovascular Disease in Women 2011 Update: A Guideline From the American Heart Association. **Circulation**. v.123, n. 11, p. 1243-1262, 2011.

9.7 Comitê de Ética

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

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