UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INTERUNIDADES (FCF-FSP-FEA)

Programa de Pós Graduação em Nutrição Humana Aplicada

Área de Nutrição

**Efeito do ômega-3 sobre biomarcadores
cardiometabólicos clássicos e emergentes em
indivíduos com diferentes níveis de risco
cardiovascular**

Marlene Nuñez Aldin

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas pelo Programa
de Interunidades FCF-FSP-FEA-USP
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Nutrição

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

São Paulo

2014

Efeito do ômega-3 sobre biomarcadores cardiometabólicos clássicos e emergentes em indivíduos com diferentes níveis de risco cardiovascular

Marlene Nuñez Aldin

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas pelo Programa
de Interunidades FCF-FSP-FEA-USP
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Nutrição

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

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

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

Aldin, Marlene Nuñez
A363e Efeito do ômega-3 sobre biomarcadores cardiometabólicos
clássicos e emergentes em indivíduos com diferentes níveis de risco
cardiovascular / Marlene Nuñez Aldin. -- São Paulo, 2014.
115p.

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.

Orientador: Damasceno, Nágila Raquel Teixeira

1. Nutrição clínica : Ciência dos alimentos 2. Doenças
cardiovasculares 3. Ácido graxo : Metabolismo I. T. II. Damasceno,
Nágila Raquel Teixeira, orientador.

641.1 CDD

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/dissertação.

Dedicatória

*Dedico esta dissertação aos meus pais que
nunca mediram esforços para eu chegar até
aqui.*

Agradecimentos especiais

Agradeço sem dúvida, à Deus por ter guiado meus passos durante toda minha trajetória e ao meu mentor espiritual que sempre está ao meu lado, orientando e ajudando.

Aos meu pais, Maria e Arturo, pela formação de caráter, acima de tudo, pelo amor incondicional, dedicação e esforço ao longo de uma vida inteira. Sem eles eu não seria quem sou.

Ao meu marido, Fabio, pela paciência, incentivo e amor.

Aos meus amigos pelas vezes que me consolaram e me incentivaram. Em especial à Juliana Shibao que foi a grande incentivadora desse momento.

Agradecimentos

Sem dúvida, agradeço de forma especial, à Prof^ª. Nágila pela dedicação, pelos ensinamentos com tanta sabedoria e doçura. Agradeço por ser uma pessoa ímpar e por ter me acolhido como sua aluna e me transformado em uma pessoa e uma profissional melhor.

Agradeço a TODOS os alunos da Prof^ª. Nágila. Eu seria injusta se descrevesse o nome de alguns e talvez não citasse todos. Alguns estiverem mais próximos do que outros, mas todos sem exceção, são responsáveis por este momento, pois sem ajuda de vocês eu não teria concluído esta etapa.

À Prof^ª. Sayuri Miyamoto, todos os seus alunos e técnica de laboratório do Instituto de Química da USP, pelos ensinamentos, paciência e por ter sido tão bem recebida.

À Prof^ª. Dulcineia Saes Parra Abdalla, do Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela doação dos anticorpos utilizados nas análises de LDL(-).

Aos alunos e técnicas do laboratório de Nutrição Humana e Nutrição Experimental da Faculdade de Saúde Pública pela ajuda e momentos juntos.

Ao Centro de Pesquisas Clínicas e funcionários do Hospital Universitário da USP por proporcionarem condições necessárias para a coleta de dados.

Aos voluntários, que sem eles não seria possível a realização deste estudo.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluídos Complexos – INCT-FCx e ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Fluídos Complexos da USP (NAP-FCx-USP) pelo apoio financeiro.

“É mais importante aprender a pensar do que acumular conceitos”

(Mathew Lippman)

RESUMO

Aldin MN. Efeito do ômega-3 sobre biomarcadores cardiometabólicos clássicos e emergentes em indivíduos com diferentes níveis de risco cardiovascular [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Pronut / USP; 2014.

Introdução: As doenças cardiovasculares são a principal causa de morbimortalidade mundial, tendo o Brasil um perfil semelhante. Embora diversos fatores de risco sejam associados com os eventos cardiovasculares, esses não conseguem justificar a manifestação de todos os eventos clínicos, indicando que outros componentes estão envolvidos. Diante desse cenário, a dieta ocupa papel de destaque na modulação dos fatores de risco modificáveis e por isso tem sido foco de inúmeros programas de políticas públicas.

Objetivo: Avaliar o efeito da suplementação de ômega-3 sobre os fatores de risco cardiometabólicos clássicos e emergentes em indivíduos com diferentes níveis de risco cardiovascular. **Métodos:** Este estudo foi do tipo clínico baseado em intervenção nutricional, prospectivo, randomizado, duplo cego e placebo controlado. Foram selecionados indivíduos adultos e idosos ($n=146$), de ambos os sexos, dentre os quais 77 faziam parte do grupo intervenção w-3 e 69 eram do grupo placebo. O risco cardiovascular foi estimado por meio do escore de risco de Framingham (ERF), os grupos foram subdivididos em escore de risco baixo, intermediário e alto. Nos tempos basal e após 4 e 8 semanas de intervenção [3,0 g/dia w-3, contendo 60% de ácido eicosapentaenoico-docosahexaenoico (EPA-DHA) ou placebo] foram coletadas informações socioeconômicas e clínicas, antropométricas, consumo alimentar, nível de atividade física e coleta de sangue após jejum de 12-14h. A partir do plasma foram analisadas as concentrações dos marcadores lipídicos [Colesterol Total, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e alta densidade (HDL), Triacilglicerol (TG), Apolipoproteínas AI e B, ácidos graxos não esterificados (NEFAs) e LDL eletronegativa (-)], ácidos graxos plasmático e aspectos físicoquímicos de lipopartículas (tamanho e concentração). Os resultados foram analisados por meio do programa SPSS 16.0, sendo adotado o nível de significância de $p < 0,05$. **Resultados:** Houve incorporação de 4% do DHA plasmático e consequente redução de 34% do TG em indivíduos com ERF intermediário e de 0,2% da APO AI, 20% de NEFAs e de 0,6% de HDL_{INTERMEDIÁRIA} em indivíduos com alto ERF. Ao longo da intervenção, houve diminuição do CT ($p = 0,002$), da LDL ($p = 0,003$), do TG ($p < 0,001$), do colesterol não HDL ($p < 0,001$), da HDL_{PEQUENA} ($p = 0,011$) e da LDL (-) ($p < 0,001$). Houve aumento da HDL-c ($p = 0,003$), das partículas de HDL_{GRANDE} ($p < 0,001$) e HDL_{INTERMEDIÁRIA} ($p < 0,001$). **Conclusão:** A suplementação com w-3 promoveu redução dos biomarcadores de risco cardiovascular clássicos e emergentes. Esse conjunto de resultados amplia o papel cardioprotetor do w-3.

Descritores: ômega-3; ácido graxo poli-insaturado; doença cardiovascular; aterosclerose; risco cardiometabólico.

ABSTRACT

Aldin MN. Effect of omega-3 on classic and emergent cardiometabolic biomarkers in individuals with different levels of cardiovascular risk [Dissertation]. São Paulo: PRONUT / USP; 2014.

Introduction: Cardiovascular diseases are the leading cause of morbidity and mortality worldwide, with Brazil a similar profile. Although many risk factors are associated with cardiovascular events, these can not justify the manifestation of all clinical events, indicating that other components are involved. Given this scenario, the diet takes prominent role in the modulation of modifiable risk factors and so has been the focus of numerous programs of public policies **Objective:** To evaluate the effect of supplementation of omega-3 (n-3) on cardiometabolic risk factors and emerging classics in individuals with different levels cardiovascular risk. **Methods:** This study was based on clinical type of nutrition intervention, prospective, randomized, double-blind and placebo controlled. We selected adult and elderly subjects (n=146), both sexes, among which 77 were in the intervention group n - 3 and 69 were in the placebo group. Cardiovascular risk was estimated using the Framingham risk score (FRS), the groups were divided into low-risk score, intermediate and high. At baseline and after 4 and 8 weeks of intervention [3.0 g/ day n-3 containing 60% eicosapentaenoic + docosahexaenoic acid (EPA + DHA) or placebo] socioeconomic and clinical, anthropometric data, dietary intake, physical activity level and blood samples were collected after fasting for 12 -14h. Were analyzed from the plasma concentrations [total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), triglycerides (TG), apolipoprotein (Apo) AI and B, non-esterified fatty acids (NEFAs) and electronegative LDL (-)], plasma fatty acids and physicochemical aspects of lipoparticles (size and concentration). The results were analyzed using the SPSS 16.0 program, adopting the level significance $p < 0.05$. **Results:** There was increased of 4 % of plasma DHA and consequent 34% reduction of TG in individuals with intermediate FRS and 0.2% of the APO AI, 20 % of NEFAs and 0.6 % HDL_{INTERMEDIATE} in subjects with high FRS. During the intervention, CT decreased ($p = 0.002$), LDL ($p = 0.003$), TG ($p < 0.001$), non-HDL cholesterol ($p < 0.001$) of the HDL_{SMALL} ($p = 0.011$) and LDL (-) ($p < 0.001$). There was an increase in HDL-c ($p = 0.003$), HDL_{LARGE} particles ($p < 0.001$) and HDL_{INTERMEDIATE} ($p < 0.001$). **Conclusion:** Supplementation with n-3 promoted reduction of classic and emerging biomarkers on cardiovascular risk. This set of results extends the cardioprotective role of n-3.

Keywords: omega-3, polyunsaturated fatty acid, cardiovascular disease, atherosclerosis, cardiometabolic risk.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 DOENÇA CARDIOVASCULAR	17
1.1.1 Aspectos epidemiológicos e impacto econômico	17
1.1.2 Impacto do ômega-3 sobre a saúde cardiovascular	20
1.2 BIOMARCADORES DO CONSUMO DE ÔMEGA-3	27
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. MÉTODOS	33
4.1 CASUÍSTICA	33
4.2 CÁLCULO AMOSTRAL	33
4.3 DELINEAMENTO CLÍNICO DO ESTUDO	34
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	37
4.5 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO	37
4.6 ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS	38
4.7 AVALIAÇÃO SOCIOECONÔMICA E CLÍNICA	38
4.8 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA	39
4.9 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR	40
4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FÍSICA HABITUAL	41
4.11 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	42
4.11.1 Obtenção de sangue e lipoproteínas	42
4.11.2 Marcadores do metabolismo lipídico	43
4.11.3 Quantificação do tamanho das lipoproteínas LDL e HDL	44
4.11.4 Determinação da concentração de LDL (-)	45
4.11.5 Análise da composição de ácidos graxos no plasma	46
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
4.13 ASPECTOS ÉTICOS	48
5. RESULTADOS	49
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	49
5.2 CARACTERIZAÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA	50
5.3 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA	53
5.4 ESCORE DE RISCO DE FRAMINGHAM	56
5.5 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA	57
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FÍSICA HABITUAL	58
5.7 CONSUMO ALIMENTAR	59
5.8 MARCADORES DO METABOLISMO LIPÍDICO	61
5.9 AVALIAÇÃO DA ADERÊNCIA À INTERVENÇÃO	68
5.10 COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS NO PLASMA	68
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÃO	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

9. ANEXOS	92
ANEXO 1: ESCORE DE RISCO DE FRAMINGHAM.....	92
ANEXO 2: QUESTIONÁRIO DE ATIVIDADE FÍSICA	96
ANEXO 3: PROTOCOLO DE SUBMISSÃO AOS COMITÊS DE ÉTICA.....	100
10. APÊNDICES	102
APÊNDICE 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	102
APÊNDICE 2: LIVRO CONTROLE	104
APÊNDICE 3: QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA E CLÍNICO	108
APÊNDICE 4: RECORDATÓRIO 24 HORAS	111
APÊNDICE 5: MANUAL DO ENTREVISTADOR	113
CURRÍCULO LATTES.....	114
ARTIGO	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mecanismos de ação do w-3 sobre o metabolismo de ácidos graxos	22
Figura 2.	Hipótese oxidativa para formação inicial da aterosclerose.....	23
Figura 3.	Síntese de eicosanóides derivados de ácidos graxos w-3	24
Figura 4.	Fluxograma de coleta de dados	36
Figura 5.	Protocolo de derivatização e análise dos ácidos graxos plasmáticos	47
Figura 6.	Análise do conteúdo de ácidos graxos das cápsulas	48
Figura 7.	Fluxograma de seleção dos indivíduos incluídos no estudo ao longo do período de intervenção.....	50

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Variação de triacilglicerois nos grupos w-3 vs placebo ($\Delta T=8 - T=0$), segundo Escore de Risco de Framingham 63
- Gráfico 2.** Variação de HDL-c nos grupos w-3 vs placebo ($\Delta T=8 - T=0$), segundo Escore de Risco de Framingham 64
- Gráfico 3.** Variação de APO AI nos grupos w-3 vs placebo ($\Delta T=8 - T=0$), segundo Escore de Risco de Framingham 65
- Gráfico 4.** Variação de NEFAs nos grupos w-3 e vs placebo ($\Delta T=8 - T=0$), segundo Escore de Risco de Framingham 66
- Gráfico 5.** Variação de HDL_{INTERMEDIÁRIA} nos grupos w-3 vs placebo ($\Delta T=8 - T=0$), segundo Escore de Risco de Framingham 67
- Gráfico 6.** Porcentual de ácidos graxos plasmático nos grupos w-3 vs placebo com baixo Escore de Risco de Framingham 70
- Gráfico 7.** Porcentual de ácidos graxos plasmático nos grupos w-3 vs placebo com Escore de Risco de Framingham intermediário 71
- Gráfico 8.** Porcentual de ácidos graxos plasmático nos grupos w-3 vs placebo com alto Escore de Risco de Framingham..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos indivíduos incluídos no estudo, segundo grupo de intervenção.....	52
Tabela 2. Caracterização da amostra, segundo prevalência de doenças crônicas auto-relatadas, segundo grupos de intervenção	53
Tabela 3. Frequência do uso de medicamentos da amostra, segundo grupos de intervenção.....	54
Tabela 4. Caracterização da amostra, segundo antecedentes familiares de doença crônicas, segundo grupos de intervenção.....	55
Tabela 5. Distribuição de risco cardiovascular, segundo tempo, grupo de intervenção e ERF.....	56
Tabela 6. Caracterização antropométrica, composição corporal e pressão arterial dos indivíduos incluídos, segundo tipo e tempo de intervenção.....	57
Tabela 7. Caracterização de Atividade Física dos indivíduos incluídos no estudo, segundo tipo e tempo de intervenção	58
Tabela 8. Avaliação do consumo alimentar, segundo tipo e tempo de intervenção	59
Tabela 9. Avaliação dos parâmetros bioquímicos, segundo tipo e tempo de intervenção	61
Tabela 10. Avaliação da aderência à intervenção a partir do percentual de cápsulas consumidas, segundo tipo e tempo de intervenção e escore de risco de Framingham	68
Tabela 11. Avaliação da composição de ácidos graxos plasmáticos, segundo tipo e tempo de intervenção.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

Δ	Delta
AA	Ácido Araquidônico
ACC1	Acetil - CoA Carboxilase 1
ACN	Acetonitrila
ADAM	9-Anthryl Diazomethane
AF°	Ângulo de fase
AFO	Atividade Física Ocupacional
AFT	Atividade Física Total
AG	Ácido Graxo
AGMI	Ácidos graxos Mono-insaturados
AGPI	Ácido Graxo Poli-insaturado
AGS	Ácido graxo saturado
AL	Ácido Graxo Linoleico
ALA	Ácido Graxo α -linolênico
ALL	Atividade de Lazer e Locomoção
AVE	Acidente Vascular Encefálico
BIA	Impedância Bioelétrica
CC	Circunferência de Cintura
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
COX	Enzima Cicloxigenase
CT	Colesterol Total
CYP450	Citocromo P450
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
DAC	Doença Arterial Coronariana
DANT'S	Doenças e Agravos não Transmissíveis
DART	<i>The Diet and Reinfarction Trial</i>
DC	Doença Coronária
DCV	Doença Cardiovascular
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
DHA	Ácido Docosahexaenoico
DLP	Dislipidemia
DP	Desvio Padrão
DVP	Doença Vascular Periférica
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECG	Eletrcardiograma
EDTA	Ácido etileno-diaminotetraacético
EFL	Exercício Físico de Lazer
EPA	Ácido eicosapentaenóico

ERF	Escore de Risco de Framingham
FAS	Ácido graxo sintetase
GISSI	<i>Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico</i>
GRAS	Geralmente Aceito Como Seguro à Saúde
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IMC	Índice de Massa Corporal
JELIS	<i>Japan EPA Lipid Intervention Study</i>
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL(-)	Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa
LHS	Lipase Hormônio Sensível
LLP	Lipase Lipoproteica
LOX	Enzima Lipoxigenase
LP-PLA ₂	Lipoproteína Associada à Fosfolipase A ₂
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTB ₅	Leucotrieno B ₅
LXR	Alpha Receptor X Hepático
MG	Massa Gorda
NEFAS	Ácidos Graxos Não Esterificados
OMS	Organização Mundial de Saúde
O ₂ ^{•-}	Ânion Superóxido
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAP	Ácido Fosfatídico Fosfatase
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Proteína C Reativa
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGE ₃	Prostaglandina E ₃
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator - Activated Receptor</i>
PURE	<i>Prospective Urban Rural Epidemiology</i>
R	Resistência
R24	Recordatório 24h
RVD	Resolvinas da Série D
RVE	Resolvinas da Série E
RXR	Alpha Receptor X Retinoide
SM	Síndrome Metabólica
SREBP - 1	<i>Sterol Regulatory Element - Binding Protein - 1</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Triacilgliceróis
TMB	Tetrametilbenzina
TXA ₂	Tromboxano A ₂

TXA3	Tromboxano A3
vs	versus
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
W-3	Ômega 3
W-6	Ômega 6
W-9	Ômega 9
Xc	Reactância
χ^2	Chi Quadrado

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA CARDIOVASCULAR

1.1.1 Aspectos Epidemiológicos e Impacto Econômico

A prevalência de doenças crônicas não transmissíveis tem crescido em todo o mundo. Em 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS), reforçou a importância dessas doenças como um problema de saúde que tem sido negligenciado de forma global. As doenças coronárias (DC) representaram 12,2 % das mortes mundiais e a projeção para 2030 é que este valor chegue a 14,2 % (OMS, 2008).

Esse mesmo documento descreveu que a proporção de mortes por Doenças e Agravos não Transmissíveis (DANT's) no Brasil em 2008, no sexo masculino correspondeu a 601-700 mortes e no sexo feminino a 401-500 mortes por 100.000 habitantes.

Das 57 milhões de mortes globais em 2008, 36 milhões foram referentes às DANT's, sendo que 29 % destas mortes (em países de baixa e média renda) ocorreram antes dos 60 anos e 80 % das doenças cardíacas, acidente vascular encefálico (AVE) e diabetes poderiam ser prevenidos (OMS, 2008).

Dentre as doenças crônicas, destacam-se principalmente, as doenças cardiovasculares (DCV), câncer, doenças respiratórias e diabetes. Em relação à DCV, essa inclui a doença arterial coronariana (DAC), o AVE e a doença vascular periférica (DVP). As DACs e o AVE são responsáveis por grande proporção de mortes em homens e mulheres na maioria dos países industrializados e sua incidência é crescente em países em desenvolvimento (OMS, 2004).

As DCV são a maior causa de morte prematura na maioria da população europeia e estão associadas a altos custos com a Saúde Pública. Geralmente desenvolve-se a partir da aterosclerose ao longo de anos e desfechos clínicos como o infarto, o AVE e até a morte, frequentemente, ocorrem de maneira súbita e antes de um diagnóstico preciso e intervenção adequada (BACKER et al., 2003). Os fatores de risco clássicos como tabagismo, excesso de peso e inatividade física (LANAS et al., 2007), têm-se mostrado fortemente associados mas outros fatores de risco emergentes como conteúdo de APO AI, APO B, NEFAs, LDL (-) e tamanho de LDL e HDL têm sido descritos (TOSHIMA et al., 2000).

No estudo realizado por Abegunde et al. (2007) foram avaliados 23 países de baixa e média renda, dentre esses o Brasil. Os resultados mostraram que as doenças crônicas foram responsáveis por 50 % do total de doenças em 2005. Em 15 países, observou-se que a estimativa de idade para desenvolvimento das doenças foi 54 % maior para homens e 86 % maior para mulheres residentes em países de média renda, quando comparados àqueles de países de baixa renda. Nesse contexto, estima-se que 84 bilhões de dólares serão necessários para custear a acelerada prevalência de doenças nesses países entre 2006 e 2015. Somado ao perfil negativo descrito acima, estima-se que a maior parte das mortes ocorrerá em países de baixa e média renda e pouco menos da metade da população atingida terá menos de 70 anos. Portanto, os autores propuseram que uma redução anual em 2 % da mortalidade proveniente das doenças crônicas, evitaria 24 milhões de mortes.

O estudo INTERHEART avaliou, em 313 casos e 364 controles da América Latina, incluindo o Brasil, os riscos associados ao infarto agudo do miocárdio (IAM). A análise dos resultados mostrou que a presença de fatores como estresse psicológico persistente, história de hipertensão, diabetes mellitus, tabagismo e aumento da relação cintura-quadril, estavam associados ao maior risco de IAM e que o consumo regular de frutas ou vegetais e a prática regular de atividade física estavam associados com a redução do risco de IAM (LANAS et al., 2007)

O estudo *Prospective Urban Rural Epidemiology* (PURE) identificou mudanças epidemiológicas como crescente prevalência de obesidade, doenças coronárias e diabetes desencadeando aumento as DANT's em países de baixa e média rendas, incluindo o Brasil (KOON et al., 2009).

Segundo Strong et al. (2005) de um total de 58 milhões de mortes em 2005, 30 % foram referente às DCV e 2 % referente ao diabetes. As doenças crônicas representavam 72% do total de doenças na população com menos de 30 anos. Esse valor ao ser projetado para 2015 pode representar o equivalente a 64 milhões de mortes por doenças crônicas, sendo que 17 milhões ocorrerão em pessoas com menos de 70 anos e metade será em mulheres.

Em relação ao Brasil, Abegunde et al. (2007) descreveram que as doenças crônicas representaram 70,5 % do total de mortes em 2005, sendo 20 % em decorrência de hipertensão, 11 % da hipercolesterolemia, 7,6 % do tabaco e 6,5 % do sobrepeso e obesidade.

Segundo a *American College of Cardiology/American Heart Association Task Force e European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines* (ACC/AHA/ESC) (ZIPES et al., 2006) nos Estados Unidos, anualmente, entre 300 a 350 mil pessoas têm ataque cardíaco, seguido de morte súbita. O impacto negativo das doenças crônicas e, sobretudo, das DCV sobre os anos perdidos em termos de qualidade de vida e de produtividade atinge, principalmente, a faixa etária de 30 a 59 anos. As DCV, isoladamente, atingiram 20 % dos indivíduos com mais de 30 anos de idade (STRONG et al., 2005).

Em uma projeção de morte por doenças crônicas para 2030 realizada por Abegunde et al. (2007), estimou-se prevalência de 36 % para DCV e diabetes em todas as faixas etárias e de 23 % quando avaliou-se apenas indivíduos com menos de 70 anos.

A experiência de países com alta renda per capita mostra que podem ser feitas intervenções primárias e secundárias bem sucedidas. O número de mortes por DC diminuiu nas últimas três décadas na Austrália, Canadá, Japão, Inglaterra e Estados Unidos, tendo sido observadas reduções de 1-

3% por ano. Fatores de risco como o tabagismo, sedentarismo e alimentação inadequada, indicam que mais de 30 % das doenças crônicas e mais de 50 % das mortes são atribuídas a fatores modificáveis (STRONG et al., 2005).

Dentre estes fatores, a dieta vem sendo considerada um dos principais fatores de risco modificáveis, tanto na prevenção primária, quanto na prevenção secundária (GERSH et al., 2010).

1.1. 2 Impacto do Ômega-3 sobre a Saúde Cardiovascular

O ômega-3 (w-3) é um ácido graxo poli-insaturado (AGPI). Esses possuem duas ou mais duplas ligações na molécula e de acordo com a posição da dupla ligação na cadeia podem ser classificados como ômega (ω), onde essa dupla ligação é contada a partir do carbono metil terminal (CH₃). No caso do w-3, a dupla ligação se localiza no terceiro carbono (HARRIS et al., 2007).

De acordo com o tamanho da cadeia de carbonos, número e posição das duplas ligações e isomeria de um ácido graxo (AG), se altera o ponto de fusão, solubilidade, digestibilidade e suas propriedades metabólicas (GRUNDT e NILSEN, 2008).

O organismo humano é capaz de produzir ácidos graxos saturados e insaturados a partir de carboidratos e proteínas. Entretanto, dois ácidos graxos insaturados não podem ser sintetizados ou são sintetizados em quantidades insuficientes e são, portanto, considerados nutricionalmente essenciais: o ácido linoleico - AL (C 18:2, w-6) e o ácido α -linolênico - ALA (C 18:3, w-3) (GRUNDT e NILSEN, 2008). Estes são substratos para a produção de outros ácidos graxos insaturados das séries ômega-6 (w-6) e 3. Através das bioreações de alongamento da cadeia de carbono e

dessaturação, o ALA produz o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosaheptaenoico (DHA) (DIN et al., 2004).

O ALA está presente no óleo de soja, canola e linhaça, peixes e crustáceos, óleos de fígado de bacalhau, nozes e soja; enquanto o EPA e o DHA podem ser encontrados nos óleos de peixes de origem marinha e peixes marinhos (DIN et al., 2004; CHAN e CHO, 2009). Ao contrário do w-3 com 20 ou mais unidades de carbono, o w-3 com 18 carbonos é encontrado nos alimentos vegetais (GRUNDT e NILSEN, 2008). Embora esses ácidos graxos sejam considerados essenciais ao homem, pequenas quantidades de ALA podem ser convertidas endogenamente em EPA (5 %) e DHA (0,5 %) (CHAN e CHO, 2009).

Os ácidos graxos w-3 têm mostrado efeitos cardioprotetores na prevenção de DCV primárias e secundárias. Os mecanismos propostos incluem redução das concentrações de triacilgliceróis (TG), efeitos antiarritmicos, diminuição da agregação plaquetária, estabilização da placa de ateroma, redução da pressão sanguínea e redução da sobrecarga cardíaca. Efeitos estes relacionados à ação anti-inflamatória (DIN et al., 2004).

Em uma meta-análise com 17 estudos populacionais (n > 56.000), demonstrou-se que a hipertrigliceridemia é um fator de risco independente para DCV. A redução de cada 88 mg/dL de TG associou-se com a diminuição de 14 % e 37 % do risco de DCV em homens e mulheres, respectivamente (HARRIS et al., 2007).

O w-3 tem demonstrado efeito em diminuir o TG plasmático quando administrado em doses de 3 a 4 g/dia, contendo 1860 mg de EPA e 1500 mg de DHA. As causas mais comuns de hipertrigliceridemia são o aumento da produção das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). De modo geral, os estudos demonstraram redução em torno de 30 % dos TG produzidos e, secundariamente, ocorre aumento no *clearance* de AG quando os indivíduos são suplementados com w-3 (HARRIS et al., 2008).

Fisiologicamente, o fígado produz VLDL e secreta na circulação. Os adipócitos contribuem para o pool de ácidos graxos não esterificados

(NEFAs) pela liberação de lipídeos via lipólise - lipase hormônio sensível (LHS) e os macrófagos regulam a lipólise intracelular nos adipócitos pela secreção de citocinas inflamatórias. Os músculos cardíaco e esquelético captam AG da VLDL via lipólise – lipase lipoproteica (LLP). Quando consumido, o w-3 diminui a produção de VLDL pelo tecido hepático e estimula a β -oxidação. **(Figura 1).**

Figura 1 - Mecanismos de ação do w-3 sobre o metabolismo de ácidos graxos (Adaptado de SHEARER et al., 2011).

Em uma meta-análise, analisou-se 16 estudos envolvendo 901 participantes que receberam suplementação com doses de 0,45 a 4,5 g/dia de w-3 e placebo por um período médio de 56 dias. Os resultados demonstraram que, comparado com o placebo, a suplementação de w-3 aumentou, de modo robusto, o relaxamento endotelial (WANG et al., 2012).

A injúria endotelial, também produz moléculas vasoativas, citocinas e fatores de crescimento. Algumas dessas moléculas atraem monócitos, macrófagos e células T para o espaço sub-endotelial, o que aumenta a migração e proliferação de células inflamatórias no sítio da lesão endotelial. Durante esse processo as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) migram para o espaço sub-endotelial, onde sofrem modificações oxidativas,

originando partículas consideradas “antígenos”, que atuam modulando positivamente a resposta imune celular e humoral. A continuidade desse processo favorece a migração e diferenciação dos monócitos em macrófagos no espaço sub-endorfelial. Posteriormente, a captação de LDL oxidada via receptores *scavenger* leva à formação de células espumosas e estrias gordurosas (GLASS e WITZTUM, 2001) (**Figura 2**).

Figura 2. Hipótese oxidativa para formação inicial da aterosclerose (Adaptado de GLASS e WITZTUM, 2001).

Alguns estudos relacionaram a suplementação de w-3 com o tamanho das lipopartículas. Para os autores Annuzzi et al. (2012), a alimentação com alto teor de w-3 demonstrou aumento do tamanho de partículas LDL e da concentração de LDL e de lipoproteína de alta densidade (HDL) grandes. O catabolismo de VLDL e a diminuição da atividade da Proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) promoveriam redução da incorporação de TG nas lipoproteínas, favorecendo a geração de partículas

de LDL e HDL ricas em colesterol e, conseqüentemente, maiores (POWNALL et al., 1999).

Este processo favorece a manutenção da inflamação e contribui para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica. A suplementação de w-3 atuaria inibindo o processo inflamatório, uma vez que o w-3 compete com o w-6 - ácido araquidônico (AA) - na via de formação e liberação dos eicosanóides pró inflamatórios. Os eicosanóides derivados do EPA e do DHA atuam como competidores antagônicos dos metabólitos do AA, via enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) (MOLENDI-COSTE et al., 2011) (**Figura 3**).

Figura 3. Síntese de eicosanóides derivados de ácidos graxos w-3. O ácido eicosapentaenóico é convertido em eicosanóides através das enzimas cicloxigenase e lipoxigenase. Os derivados do w-3 são anti-inflamatórios e inibem a agregação plaquetária (Adaptado de MOLENDI-COSTE et al., 2011).

No final da década de 70 foram publicados os primeiros estudos mostrando a relação inversa entre o consumo de w-3 pelos esquimós e a

prevalência de dislipidemias (BANG et al., 1980). Desde então, vários estudos confirmaram os efeitos benéficos da suplementação de w-3 e, particularmente do EPA e DHA, sobre diversos fatores de risco cardiovascular (GRUNDT e NILSEN, 2008).

Embora o w-3 de origem animal tenha grande participação nos efeitos biológicos descritos anteriormente, estudos têm mostrado que o w-3 de origem vegetal também tem ação cardioprotetora (ROS e MATAIX, 2006; DIN et al., 2004).

No Nurses' Health Study monitorou-se 1513 mulheres durante 16 anos. O consumo de peixe foi avaliado e de acordo com este consumo, as mulheres foram distribuídas em 5 grupos (< 1 x/mês, de 1-3 x/mês, 1 x/semana, 2-4 x/semana, ≥ 5 x/semana). Os autores concluíram que o grupo que consumia mais peixe estava associado com menor risco de DC (HU et al., 2002).

Schacky e Harris (2007) em sua revisão destacaram alguns estudos randomizados com humanos que utilizaram suplementação com w-3. O estudo de DART (*The Diet and Reinfarction Trial*) selecionou 2033 homens, 42 dias após seu primeiro IAM para receber suplementação de óleo de peixe contendo 357 mg/dia de EPA e 543 mg/dia de DHA. Após dois anos de seguimento, a intervenção foi associada à redução de 29 % na mortalidade total e, aproximadamente, 32% do segundo IAM (BURR et al., 1989).

O estudo GISSI (*Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico*) – *Prevenzione* incluiu 11.323 italianos que haviam sofrido um IAM e teve seguimento de 3,5 anos. Esses indivíduos foram suplementados com 850 mg/dia de EPA e DHA e 300 mg/dia de vitamina E. A análise preliminar avaliou uma combinação de mortes, IAM não fatal e AVE, tendo estes reduzido entre 10 a 15 %. Os resultados finais desse estudo mostraram redução de 20 % no risco de morte por todas as causas, redução de 30 % no risco de morte cardiovascular e de 45 % no risco de morte súbita no grupo suplementado (GISSI *Prevenzione Investigators*, 1999).

O *Japan EPA Lipid Intervention Study* (JELIS) avaliou o efeito de doses diárias de EPA (1800mg) associada com estatina contra um grupo sob uso exclusivo de estatinas. Foram incluídos 18.645 pacientes (5.859 homens e 12.786 mulheres na pós-menopausa) com colesterol total ≥ 251 mg/dL (20 % com DCV). Após 4,6 anos de intervenção foi verificada diminuição de 19 % nos desfechos primários (morte súbita, infarto fatal e não fatal e outros eventos fatais ou não como angina pectoris, angioplastia e colocação de *stent*) no grupo suplementado com w-3 ($p = 0,011$). Desses resultados, a angina instável foi o que apresentou o maior percentual de redução do risco relativo (RR = 28 %) (YOKOYAMA et al., 2007).

Na revisão de Wang et al. (2008), avaliou-se os efeitos do w-3 ingerido sob a forma de peixe (1 a 5 x/semana) ou sob a forma de óleo de peixe (EPA + DHA de 0,27 a 4,8 g/dia), sobre a saúde cardiovascular. Foram selecionados 14 estudos controlados, randomizados e 1 estudo de coorte de prevenção secundária. A maioria dos estudos mostrou significativa redução de todas as causas de morte, IAM, morte súbita por infarto e AVE após suplementação com óleo de peixe.

Esses mesmos autores avaliaram também, 1 estudo controlado e randomizado, 25 estudos de coorte e 7 casos controle em prevenção primária de DCV dos quais a maior parte dos estudos de coorte mostrou que o consumo de peixe estava associado com baixa mortalidade por todas as causas e desfechos cardíacos negativos. Os efeitos sobre o AVE foram inconsistentes. Diante desses resultados os autores propuseram que o aumento do consumo de w-3 proveniente do peixe e do óleo de peixe como suplemento (EPA e DHA), reduz todas as causas de morte, morte súbita por IAM e, possivelmente, o AVE. Há evidências de que os benefícios do óleo de peixe sejam mais robustos na prevenção secundária do que na prevenção primária (WANG et al., 2008).

Embora o consumo de w-3 seja seguro, conforme descrito na maioria dos estudos, o estudo DART demonstrou que o aumento na ingestão de w-3 através da suplementação pode agravar arritmias por meio do bloqueio dos canais de sódio (RUIJTER et al., 2007).

Gruenwald et al. (2009), avaliaram pacientes com osteoartrite distribuídos em dois grupos. O primeiro com suplementação de w-3 com 1 cápsula contendo 500 mg de sulfato de glucosamina 2 KCl, 444 mg de óleo de peixe, 120 µg de vitamina A, 0,75 µg de vitamina D, 1,5 mg de vitamina E. O segundo recebeu 1 cápsula com sulfato de glucosamina 2 KCl somente. Após 26 semanas de estudo, observou-se diminuição na dor referida pelos pacientes decorrente da osteoartrite. Apenas dois pacientes referiram coceira e vermelhidão.

Kepler et al. (2012), avaliaram 16 pacientes que usavam suplementação de w-3 e pararam o uso 2 dias antes de serem submetidos a cirurgia de descompressão de coluna vertebral. Os autores identificaram que não houve aumento na perda de sangue e em relação às complicações pós-operatórias decorrentes de sangramento.

Villani et al. (2013), analisaram 398 citações de um total de 10 estudos envolvendo 994 idosos com mais de 60 anos, suplementados com cápsulas de w-3 contendo 0,03 a 1,86 g de EPA e/ou DHA em estudos com duração de 6 a 52 semanas. Não foram encontrados efeitos adversos severos e o efeito colateral mais comum relatado foi o desconforto gástrico, porém sem aumento significativo em relação aos distúrbios gastrointestinais.

1. 2 BIOMARCADORES DO CONSUMO DE W-3

Sabe-se que a avaliação da dieta é complexa devido a fatores controláveis e não controláveis, desta forma a análise de biomarcadores pode auxiliar (FISBERG et al., 2009).

Considerando sua essencialidade, a concentração plasmática e celular de AGPI é forte indicador da sua ingestão diária (MILES et al., 2001).

Em estudo randomizado, duplo-cego, Thies et al. (2003) avaliaram a estabilidade de placas de ateroma após a suplementação com w-3 (1,4 g/dia), associado à incorporação dos AGPI. A proporção de EPA foi maior

nos fosfolipídeos, ésteres de colesterol e TG; e a incorporação do DHA nos ésteres de colesterol e TG das placas de carótida dos pacientes suplementados foi maior do que no grupo controle que consumiu cápsula contendo uma mistura 80:20 de óleo de palma e de soja, respectivamente. A incorporação dos AGPI w-3 nas placas ateroscleróticas aumentou a estabilidade das lesões, o que poderia explicar a redução de eventos cardíacos fatais e não fatais associados ao aumento da ingestão de w-3.

Nos últimos anos, tem sido proposto que o melhor biomarcador de consumo de w-3 é o índice w-3 (somatório de EPA+DHA incorporado em membranas celulares), além de ser indicador de risco para doenças coronarianas e, especialmente, para morte súbita por IAM. Ele é mensurado nas membranas de células plasmáticas e é expresso com um percentual de EPA+DHA em relação ao total de ácidos graxos. Um índice w-3 > 8 % está associado com 90 % menos mortes súbitas por ataques cardíacos, quando comparado com um índice w-3 < 4 % (SCHACKY e HARRIS, 2007).

Os primeiros estudos surgiram em 2004, com o grupo de Harris et al., que investigaram os efeitos significativos com a suplementação de w-3 mesmo em quantidades pequenas. Em estudo prospectivo, duplo-cego, randomizado, foram avaliados 57 indivíduos por 6 meses com ingestões que variavam de zero (placebo) ou 0,5 g, 1 g, 2 g/dia de w-3 (intervenção). Verificou-se que o índice w-3 aumentou proporcionalmente à ingestão (4,7 % no grupo placebo para 7,9 %; 9,9 % e 11,6 %). Observou-se também que valores de índice w-3 superiores a 8% foram inversamente associados ao risco de mortalidade por DC (HARRIS e SCHACKY, 2004).

A recomendação do consumo de w-3 varia de acordo com o grau de prevenção da DCV. De acordo com as recomendações da *American Heart Association*, indivíduos sem histórico de doenças coronarianas, devem consumir uma variedade de peixes marinhos como arenque, atum, salmão, sardinha e truta, no mínimo duas vezes por semana. Incluindo óleos e alimentos ricos em AG ALA como tofu e outras formas da soja, nozes e linhaça, assim como seus óleos e óleo de canola ou outros que contenha ALA (DIN et al., 2004). Pacientes com histórico de doença coronária

(prevenção secundária) devem consumir 1 g de EPA e DHA diariamente. Além disso, pacientes com hipertrigliceridemia (500 mg/dL) devem consumir uma fórmula com 465 mg de EPA e 375 mg de DHA (HARRIS et al., 2007; CHAN e CHO, 2009).

Porém, não só a quantidade adequada, mas também a razão de w6/w3 parece exercer papel cardioprotetor tanto na prevenção primária, quanto secundária. Estabelecer a proporção mais adequada depende da severidade da doença e da predisposição genética, uma vez que as doenças crônicas são multigênicas e multifatoriais (SIMOPOULOS, 2006). Diante disso, diversos autores têm testado distintas relações w6/w3 visando obter um maior efeito cardioprotetor. Na prevenção secundária de DCV, uma proporção de 4:1 está associada com diminuição de 70 % da mortalidade. Já a proporção de 2-3:1 pode diminuir a inflamação em pacientes com artrite reumatóide, enquanto que proporção de 5:1 beneficiaria pacientes com asma (SIMOPOULOS, 2008).

Entretanto, Hooper et al. (2006), avaliando o efeito do consumo de w-3 sobre as DCV publicados em 15.159 títulos e resumos, 48 estudos randomizados (36.913 participantes) e 41 estudos de coorte concluíram que os resultados são inconsistentes.

No Brasil, são limitados os estudos com suplementação de w-3 em indivíduos adultos e idosos em distintos estratos de risco cardiovascular. Um estudo realizado com 24 dislipidêmicos demonstrou que a suplementação com 350 mg de EPA e 50 mg de DHA mais dieta de 1200 kcal, promoveu perda de peso, diminuição do colesterol total (CT), LDL-C, TG e manteve a concentração de HDL-C após 30 dias de intervenção. Entretanto, esses resultados não tiveram significância estatística, quando comparados com o grupo placebo que ingeriu 1 cápsula/dia contendo 125 mg de amido de milho cada cápsula (DENARDI et al., 2009).

No Rio de Janeiro, foi conduzida uma pesquisa com 14 atletas masculinos de natação. Esses foram distribuídos em dois grupos, sendo um placebo que recebeu óleo mineral e o outro suplementado com cápsulas de óleo de peixe contendo 950 mg de EPA e 500 mg de DHA/dia por 45 dias.

Ao término do período, constatou-se redução no LDL-C, TG e CT. Os valores de HDL-C não apresentaram diferença significativa (ANDRADE et al., 2006).

Embora o efeito do consumo de w-3 sobre os fatores de risco cardiovascular tradicionais mostre benefícios importantes sobre os desfechos primários e secundários; o impacto do consumo de w-3 sobre a modulação de fatores de risco emergentes (LDL oxidada, anticorpos anti-LDL oxidada, Proteína C Reativa - PCR, Lipoproteína associada à Fosfolipase A₂- Lp-PLA₂, tamanho de LDL e HDL, dentre outros) ainda é pouco descrita na literatura. Quando avaliamos essa lacuna na população brasileira verificamos que não há nenhum estudo de intervenção focado nessa temática.

2 JUSTIFICATIVA

Devido ao impacto social e econômico das DCV é importante que pesquisas, sobretudo baseadas na prevenção, se desenvolvam para minimizar os eventos clínicos.

Essa temática torna-se mais relevante quando verificamos que vários fatores de risco são modificáveis e diretamente associados ao estilo de vida. Nesse contexto, a dieta ocupa posição de destaque e entre seus diversos componentes, o consumo de w-3 parece ter efeito cardioprotetor modulando diversos fatores de risco tradicionais. Portanto, é provável que indivíduos com risco cardiovascular se beneficiem com a suplementação de w-3 por múltiplos mecanismos.

Apesar desses aspectos, poucos estudos de intervenção têm avaliado o efeito do w-3 sobre fatores de risco emergentes, tais como oxidabilidade da LDL e propriedades físicas de lipoproteínas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de w-3 sobre os fatores de risco cardiovascular tradicionais e emergentes em indivíduos com diferentes níveis de risco cardiovascular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil socioeconômico e clínico da população estudada;
- Avaliar o nível de atividade física;
- Analisar o consumo alimentar;
- Avaliar o perfil antropométrico e composição corporal;
- Avaliar biomarcadores clássicos:
 - perfil lipídico (CT, LDL-C, HDL-C) e TG;
- Avaliar biomarcadores emergentes:
 - conteúdo de Apo A1 e Apo B;
 - tamanho da LDL e da HDL;
 - conteúdo de NEFAs;
 - conteúdo de LDL(-).

4 MÉTODOS

O presente estudo baseou-se numa sub-amostra do estudo CARDIONUTRI, que contou com apoio financeiro do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia de Fluídos Complexos (INCT-FCx), Núcleo de Apoio à Pesquisa em Fluídos Complexos da USP (NAP-FCx-USP) e FAPESP (Proc. 2011/12523-2).

4.1 CASUÍSTICA

A população do estudo foi composta por participantes elegíveis adultos e idosos, de ambos os sexos, selecionados do Hospital Universitário vinculado à Universidade de São Paulo e da comunidade local. Todos os indivíduos incluídos passaram pelo processo de esclarecimento, e após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Apêndice 1**), foi realizada a coleta de dados. Todos os procedimentos de obtenção de amostras, análises e divulgação dos resultados seguiram as normas do Conselho Nacional de Saúde, no que se refere à ética em pesquisa com seres humanos (Brasil, 1996).

4.2 CÁLCULO AMOSTRAL

Para cálculo do tamanho amostral foram considerados dados de estudos prévios que também consideraram a suplementação de w-3. O estudo de Wilkinson et al. (2005) foi adotado para calcular o tamanho de partículas HDL, o estudo de Skulas-Ray et al. (2011) para avaliar a variância

na concentração de TG e o estudo de Suzukawa et al., 1995 para as variáveis relacionadas à oxidabilidade da partícula LDL, com magnitudes de redução de 21,21 %, 26,80 % e 25,5 %, respectivamente. Para o estudo atual, considerou-se a mesma magnitude de efeito e o mesmo desvio padrão (DP) dos estudos acima citados. Com o auxílio de uma tabela para cálculo de tamanho de amostra necessária por grupo (utilizando-se o teste t para comparar médias de variáveis contínuas), considerando α de 5% bilateral e poder estatístico de 80% (β de 20%), encontrou-se um número médio de 70 indivíduos (HULLEY et al., 2003).

4.3 DELINEAMENTO CLÍNICO DO ESTUDO E PROTOCOLO DE INTERVENÇÃO

Este estudo foi do tipo clínico baseado em intervenção nutricional, prospectivo, randomizado e duplo cego. Os pacientes foram recrutados a partir de cartazes de divulgação do projeto fixados na Cidade Universitária-USP e em sites da Universidade, FAPESP e outros veículos de comunicação de massa. Este estudo esteve inserido em um projeto maior intitulado CARDIONUTRI, o qual randomizou 374 pacientes entre os grupos placebo, w-3, w-6 e ômega-9 (w-9). A randomização ocorreu por ordem de chegada dos pacientes no Centro de Pesquisa do Hospital Universitário. Os mesmos receberam uma numeração que os identificou até o final do estudo. A numeração consistia dos 2 primeiros números da intervenção (ex.: 01, 02, 03 ou 04), seguidos por um número de três dígitos que indicava a ordem de inclusão do paciente (ex.: 001 a 374) e os dois últimos números correspondiam ao tempo de intervenção (ex.: 00, 04 ou 08). As etapas de colheita de dados compreendiam as seguintes fases:

Triagem - Identificação de indivíduos com características de interesse para o presente estudo (fumantes, diabéticos, obesos, dislipidêmicos, hipertensos). Entrega e assinatura do TCLE. Aplicação dos questionários socioeconômico, clínico, antropométrico, realização de eletrocardiograma (ECG) e coleta de sangue.

Período Basal (T=0S) – Aplicação dos questionários, antropométrico, atividade física, consumo alimentar e entrega do frasco contendo 100 cápsulas e de livro de controle (1) para registro de consumo das cápsulas, descrição de sintomas adversos e registro de modificações nos medicamentos ou outras ocorrência como cirurgias.

Período 4 semanas (T=4S) – Aplicação dos questionários, clínico, antropométrico, atividade física, consumo alimentar e coleta de sangue. Devolução do frasco vazio ou com cápsulas restantes e do livro controle (1). Entrega do frasco contendo 100 cápsulas e de livro de controle (2) para registro de consumo das cápsulas, descrição de sintomas adversos e registro de modificações nos medicamentos ou outras ocorrência como cirurgias.

Período 8 semanas (T=8S) – Aplicação dos questionários, clínico, antropométrico, atividade física, consumo alimentar e coleta de sangue. Devolução do frasco vazio ou com cápsulas restantes e do livro de controle (2).

Nos períodos T=0S e T=4S os participantes do estudo receberam após a entrevista o suplemento de w-3 encapsulado (1g/cápsula, sendo composto por 37% de EPA e 23% de DHA). As cápsulas foram produzidas pela indústria farmacêutica Realthy® Industries (Indaiatuba, Brasil) e os produtos finais envasados, lacrados e etiquetados de modo a garantir a não identificação das intervenções. Cada frasco continha 100 cápsulas, sendo que cada indivíduo deveria consumir 90 unidades no intervalo de 4 semanas. As 10 cápsulas excedentes tinham por objetivo garantir a continuidade da intervenção caso o indivíduo faltasse na data da consulta, houvesse algum feriado ou final de semana que exigisse o agendamento de retorno em mais de 30 dias. Cada participante foi orientado a consumir

individualmente 1 cápsula 3 x/dia, sendo 1 cápsula no desjejum; 1 cápsula no almoço e 1 cápsula juntamente com o jantar. Caso o paciente esquecesse de consumir em um desses horários, foi orientado a consumir ao lembrar-se, mesmo que fora do horário de refeição. Foi fornecido um livro de controle onde o participante deveria anotar a rotina de consumo das cápsulas e as intercorrências (**Apêndice 2**).

A aderência do consumo por parte dos pacientes foi controlada através de três estratégias: contagem das cápsulas que retornaram no frasco nos tempos T=4S e T=8S; verificação do consumo referido no livro de controle e perfil de ácidos graxos plasmático.

Além do grupo que recebeu as cápsulas contendo w-3, houve um grupo placebo. Este recebeu cápsulas contendo óleo mineral (1 g/cápsula, 3 x/dia). As etapas de colheita de dados e entrega das cápsulas ocorreram de modo semelhante para os dois grupos e em todos os momentos de intervenção, conforme descrito na **Figura 4**.

Nos períodos T=0S, T=4S e T=8S, os pacientes realizaram 2 R24h, sendo um presencial e um através de contato telefônico, posterior a data do encontro e agendado previamente.

Figura 4. Fluxograma de coleta de dados.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo indivíduos de ambos os sexos, que apresentaram o TCLE devidamente preenchido e assinado, e com as seguintes características:

- Indivíduos de 30 a 74 anos, segundo faixa etária usada na estratificação do Escore de Risco de Framingham (ERF).
- Indivíduos com risco cardiovascular baixo, intermediário e alto.

Para classificação do risco cardiovascular, foram utilizados os componentes propostos pelo ERF (**Anexo 1**), que calcula o risco absoluto de eventos coronarianos em 10 anos, segundo sexo. Foram atribuídos pontos para idade, pressão arterial sistólica, CT, HDL-C e estado de tabagismo e diabetes. Foram adotados os critérios revisados, conforme proposto por D'Agostino et al. (2008) para homens e Mosca e Benjamin (2011) para mulheres.

4.5 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

Foram considerado não elegíveis para esse protocolo de intervenção os indivíduos que apresentaram as seguintes características: evento cardiovascular prévio, portadores de doenças agudas ou crônicas graves, usuários de drogas ilícitas, alcoolistas e pessoas que fossem alérgicas ou demonstraram restrição ao consumo de w-3. Não puderam participar do estudo indivíduos desnutridos, grávidas, lactantes ou participantes de outros protocolos de pesquisa. A presença de eventos cardiovasculares prévios foi

monitorada pela avaliação clínica, pesquisa em prontuário e realização de um ECG realizado no momento da triagem.

4.6 ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS

A pesquisa teve caráter de intervenção, entretanto, o risco considerado é mínimo, pois o produto usado além de fazer parte do hábito alimentar da população brasileira, é considerado GRAS (Geralmente Aceito como Seguro à Saúde). Os benefícios resultantes da realização deste estudo basearam-se na avaliação do potencial efeito cardioprotetor do w-3 e sua capacidade de modificar a prevalência de DCV em indivíduos com risco cardiovascular. Neste contexto, os benefícios para a população inclusa no estudo ainda são experimentais, embora possam variar de neutros a significativos.

Todos os resultados foram entregues aos participantes do estudo, sendo que orientações específicas (sugestão para procurar um profissional médico e/ou nutricionista) foram dadas quando estes resultados indicaram risco à saúde destes indivíduos.

4.7 AVALIAÇÃO SOCIOECONÔMICA, DEMOGRÁFICA E CLÍNICA

O perfil socioeconômico dos indivíduos foi avaliado através de um questionário estruturado (**Apêndice 3**), com itens sobre sexo, idade, raça, renda familiar e número de indivíduos que moram na casa. Para a avaliação social, foi levado em consideração o nível de escolaridade do indivíduo. A avaliação clínica foi constituída pelas informações sobre história clínica

atual, antecedentes familiares de doenças crônicas (pai e mãe), uso regular de medicamentos e/ou vitaminas, prática de atividade física.

Para a aferição da pressão arterial sistêmica se utilizou o protocolo recomendado pela VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (SBH, 2010).

4.8 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

A avaliação dos parâmetros antropométricos foi feita através da aferição de peso (em quilos, Kg), altura (em metros, m), circunferência da cintura (CC, cm) e dados de composição corporal (porcentual de massa gorda - % MG). O peso foi aferido com os indivíduos utilizando o mínimo de roupas e descalços, através da balança digital Modelo 2096PP (Toledo®, São Paulo, Brasil) com limite de capacidade de 200 Kg e precisão de 50 g. A medida de altura foi aferida através do estadiômetro de parede com plataforma e coluna, Modelo 216, (Seca®, São Paulo, Brasil) com limite de 2,1 m e precisão de 1 mm, onde os indivíduos ficaram descalços, em posição ereta, com os pés paralelos, calcanhares, panturrilha, glúteos, ombros e cabeça encostados no estadiômetro, 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 peso em quilos dividido pela estatura em metros quadrados (Kg/m^2).

Utilizando uma fita inelástica, flexível, com precisão 1 mm (TBW, São Paulo, Brasil), a medida da CC foi aferida, adotando-se como referencial anatômico o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. O indivíduo foi orientado a permanecer com o abdômen relaxado, ficar em pé, manter os braços paralelos ao corpo e pés unidos.

Para a realização da impedância bioelétrica (BIA), utilizamos o aparelho tetrapolar RJL Systems® (Detroit, USA), modelo Quantum X – BIA Analyser, através do qual foi aplicada uma corrente de 800 μA a uma

freqüência de 50 KHz. As medidas de impedância bioelétrica foram tomadas do lado direito do indivíduo, que foi orientado 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. Calçados e meias foram retirados e durante o teste o indivíduo permaneceu imóvel. O equipamento apresentou os valores brutos de resistência (R), reactância (Xc) e ângulo de fase (AF°) de cada indivíduo.

O cálculo do % MG foi realizado através do programa *Cyprus*, versão 2.5 - *Body Composition Analysis System* (RJL Systems®, Detroit, USA), onde consideramos sexo, idade, peso, altura, R, Xc.

4.9 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

A avaliação do consumo alimentar foi realizada por meio da aplicação de dois Recordatórios de 24 horas (R24h) (**Apêndice 4**) em dias alternados (um dia durante a semana e um dia no final de semana), para contemplar variações diárias inter e intra-indivíduos e melhor descrever o hábito alimentar dos indivíduos. Foram avaliados quantitativamente os macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídeos). A partir dos lipídeos totais foram avaliados os AGPI: w-3 e seus derivados (DHA, EPA); w-6 e AL, os ácidos graxos mono-insaturados (AGMI): ácido oleico e os ácidos graxos saturados (AGS). Avaliou-se também o consumo de fibras, colesterol e sódio. Foi utilizado um formulário padrão para a aplicação dos 2 R24h, e o seu preenchimento foi baseado no método *multiple pass* (JOHNSON et al., 1996; GUENTHER et al., 1998). Esse método consiste em três elementos: listagem rápida dos alimentos, descrição detalhada e revisão. Baseada nessa técnica foi possível definir e quantificar todos os alimentos e as bebidas consumidos nas últimas 24 horas. Para esta etapa, todos os

pesquisadores de campo receberam treinamento para aplicação desse inquérito alimentar com base no Manual do entrevistador (**Apêndice 5**).

Todos os alimentos descritos nos R24h foram listados e tabulados. Aqueles alimentos que faziam parte de preparações foram padronizados de acordo com as receitas e suas porções foram estabelecidas.

A energia e os nutrientes brutos foram analisados através do Programa *Food Processor* (Version 10.11.0, 2012). Os alimentos que não faziam parte do banco de dados do *Food Processor*, foram inseridos com base nas tabelas de composição: TACO, 2011; PHILIPPI et al., 2012. Para os alimentos industrializados que não podiam ser contemplados pelas tabelas de composição citadas, utilizou-se os rótulos dos mesmos. Os recordatórios que apresentaram valores de ingestão energética menor que 500 ou superior a 5000 kcal/dia foram excluídos do estudo por falta de sensibilidade do método de inquérito nutricional ou por representarem valores de consumo considerados *outliers*.

A partir dos nutrientes brutos, a variabilidade intra-pessoal e inter-pessoal foi corrigida por meio do programa *Multiple Source Method* (versão 1.0.1, 2012). Em seguida, os resultados foram ajustados pela energia, seguindo o método proposto por WILLETT e STAMPFER (1998) e MACKERRAS (1996). Os resultados finais referentes ao consumo alimentar foram apresentados sob a forma ajustada pela variabilidade intrapessoal e pela energia.

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FÍSICA

Foi aplicado um questionário para avaliar a atividade física habitual (**Anexo 2**) e de acordo com as respostas foi calculado o escore total de atividade física como o preconizado pelo estudo de Baecke (1982), validado por Florindo e Latorre (2003).

O questionário é composto por 3 categorias de Atividade Física, sendo 8 perguntas referentes à Atividade Física Ocupacional (AFO), 4 questões relacionadas ao Exercício Físico de Lazer (EFL) e 4 direcionadas à Atividade de Lazer e Locomoção (ALL). Há um escore individual para cada área e um escore total para Atividade Física Total (AFT).

4.11 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

4.11.1 Coleta de Sangue

Após um jejum de 12-14 horas foi coletada uma amostra de sangue (20 ml). O sangue foi coletado em tubos *vacutainer* contendo ácido etileno-diaminotetraacético (EDTA) (1 mg/ml) (BD, Brasil), utilizado como anticoagulante e antioxidante. Aproximadamente 4 ml de sangue foram coletados em tubo seco, visando a posterior obtenção de soro. O sangue usado para determinar o conteúdo de glicose foi colhido em tubos com fluoreto de sódio. Todos os tubos foram mantidos sob refrigeração (8 °C) até o processamento das amostras. Ao plasma (3000 rpm, 10 min, a 4 °C) acrescentou-se os seguintes inibidores de proteases: aprotinina (10 µg/ml de plasma), benzamidina (10 µM/ml de plasma) e fluoreto de fenilmetilsulfonila-PMSF (5 µM/ml de plasma), além do antioxidante 2,6-di-tert-butil-p-hidroxitolueno-BHT (100 µM/ml de plasma). Todas as amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento das análises.

4.11.2 Marcadores do Metabolismo Lipídico

Por meio 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 Triglicérides Liquiform® (Labtest, Minas Gerais, Brasil). O conteúdo de colesterol associado à LDL foi calculado 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® (Randox Chemicals USA Inc., Richmond, VA, EUA), respectivamente, pelo método imuno-turbidimétrico.

A partir dos resultados acima foram calculados as razões TG/HDL-C, CT/HDL-C, LDL-C/HDL-C, CT não HDL-C, Apo B/Apo AI, Apo AI/HDL-C, Apo B/LDL-C.

Todas as análises foram feitas em duplicata e o coeficiente de variação intra ensaio foi de 2,2 % e inter ensaio foi de 3,7 % para Apo AI e para Apo B o coeficiente de variação intra e inter ensaio foi de 3,7 % e 8,8 %, respectivamente.

Os coeficientes de variação intra ensaio e inter ensaio para CT foram 1 % e 0,5 %, respectivamente; para TG, foram 2 % e 1 %, respectivamente e para HDL foram 3,5 % e 1,5 %, respectivamente.

Os NEFAs foram determinados por reação colorimétrica realizada a partir do soro (Wako NEFA® Série HR). As análises foram feitas no sistema semi-automático Cobas Mira e o coeficiente de variação intra ensaio foi de 5,4 % e inter ensaio de 3,8 %.

4.11.3 Quantificação do Tamanho das Lipoproteínas LDL e HDL

O tamanho das partículas de LDL e HDL foi determinado pelo sistema Lipoprint® System (Quantimetrix Corporation). Para a preparação das amostras foi pipetado 25 µl de plasma e 200 µl para análises de LDL ou 300 µl para análises de HDL de gel contendo corante lipofílico. Após homogeneização (7x) a amostra aplicada ao gel de poliacrilamida passou pelo processo de fotopolimerização (30 min), seguida de corrida em tampão de eletroforese. As bandas mostravam a quantidade relativa de partículas lipoproteicas por amostra, seguindo ordem decrescente de tamanho de partículas. O kit de LDL e subfrações consistia de 1 banda de VLDL, as subfrações de LDL 1 e 2 correspondiam ao Fenótipo “A” (partículas maiores e menos densas). As subfrações de LDL 3 a 7 correspondiam ao Fenótipo “B” (partículas menores e mais densas) e a última banda correspondia a uma banda de HDL. As subfrações designadas como fenótipo “A” eram $\geq 26,51$ nm), enquanto o Fenótipo “B” eram $\leq 26,5$ nm). A área relativa de cada subfração LDL foi determinada pela concentração de CT da amostra. Desse modo, os resultados foram expressos em tamanho e porcentual de LDL em relação ao CT.

O kit de HDL identificou 1 banda de VLDL + LDL e 10 subfrações de HDL, sendo as bandas 1 a 3 consideradas as partículas grandes, as bandas 4 a 7 classificadas como intermediárias e as bandas 8 a 10 consideradas como partículas pequenas. A última banda expressa na eletroforese era formada pela albumina. A área relativa para cada subfração de HDL foi determinada pela concentração de colesterol associado à HDL em cada amostra.

O coeficiente de variação inter ensaio para as sub-frações de LDL pequenas foi de 5,3 % e para as sub-frações de LDL grandes foi de 5,0 %.

4.11.4 Determinação da concentração de LDL(-)

A LDL(-) foi detectada através de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) sanduíche, seguindo protocolo padronizado por nosso grupo de pesquisa. A sensibilização das placas (Costar®, modelo 3690, Corning, USA) foi feita com Anticorpo Monoclonal Anti-LDL (-) (MAb-1A3) (0,5 µg/ml, 50 µL/poço), diluído em tampão Carbonato-Bicarbonato, (0,25 M, pH 9,6), sendo as placas incubadas *overnight* a 4 °C. Após esse período, os sítios livres foram bloqueados com leite desnatado (Molico®, Nestlé, São Paulo, Brasil), diluído a 5 % em tampão Fosfato Salina (PBS) 0,01mol/L - pH 7,4 e incubados a 37 °C por 2 horas. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS-Tween (0,05 %). Foram adicionados 50 µL/poço de plasma diluído 1:1600 em tampão PBS, sendo a placa incubada por 2 horas em temperatura ambiente (24 °C). Após essa etapa, a placa foi lavada, conforme descrito anteriormente, e foram adicionados 50 µL/poço de anticorpo monoclonal anti-LDL(-) biotilado (MAb-2C7) (0,5 µg/ml). As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 2 horas, em seguida, lavadas conforme descrito acima. Após essa etapa, foram adicionados 50 µL/poço de estreptoavidina-peroxidase (1:80.000) diluída em PBS. As placas foram incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente e novamente lavadas, conforme descrito anteriormente. A reação de cor foi desenvolvida através da adição de substrato composto por 3,3',5,5'-tetrametilbenzina (TMB), tampão citrato-fosfato (0,1 M, pH 4,2) e H₂O₂ (30 %) (250/12/10, µL/ml/µL). As placas foram incubadas por 15 minutos em

temperatura ambiente, protegidas da luz. A reação foi bloqueada com 50 μL /poço de H_2SO_4 (2 M) e a absorbância monitorada em 450 nm. Os resultados foram expressos a partir da média das absorbâncias das amostras menos o *background* e, posteriormente, aplicados à curva padrão e multiplicados pela respectiva diluição, sendo os resultados expressos em mg/ml. Os coeficientes de variação intra ensaio e inter ensaio foram de 5,84 % e 15,0 %, respectivamente.

4.11.5 Análise da Composição de Ácidos Graxos no Plasma

Visando avaliar a aderência dos indivíduos ao protocolo de intervenção, determinamos o perfil de AG no plasma. Foi utilizado um método que incluía a derivatização da carboxila dos AG esterificados com o composto fluorescente 9-Anthryl Diazomethane (ADAM), baseando-se no protocolo proposto por Nimura and Kinoshita (1980), formando assim o éster correspondente, conforme ilustrado na **Figura 5**.

100µl amostra
50µl NaOH 10M
50µl C17 10mM
350µl ETOH com BHT (150µM)

47

↪ 90 minutos/Ambiente

↪ 1ml NaCl 1% com 100µM DTPA

↪ 2ml ETOAC 1mM BHT:hex (1:9)

↪ Vórtex/2 minutos

↪ Gelo/5 minutos

↪ Retirar sobrenadante

↪ Secar em N₂

↪ 100µl ADAM 0,25mg/ml

↪ Gelo/30 minutos

↪ HPLC

Figura 5. Protocolo de derivatização e análise dos ácidos graxos plasmáticos.

Os AG derivatizados foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando uma coluna Kinetex C18 (50x3 mm com 2,6 µm de tamanho de partícula) e pré-coluna de C18. Para cada corrida de amostras do plasma no HPLC, correu-se também uma amostra de branco contendo o padrão interno (ácido heptadecanoico – ácido margárico), uma amostra de ADAM puro e uma amostra de padrão externo (mix de AG separados – EPA, DHA, AA, palmitoleico, palmítico, AL, ALA, esteárico). Para a separação dos AG utilizamos fase móvel formada por acetonitrila (ACN) e água (H₂O) destilada, partindo de gradiente de 79 % de ACN, chegando a 93 %, com fluxo de 1,45 ml/min e 12 min de corrida para cada análise. A fluorescência foi monitorada em excitação de 365 nm e emissão em 412 nm. Após integração dos picos obtidos em cada corrida, calculou-se o percentual de área de cada pico (% de AG em relação a todos os AGs detectados). Optou-se por utilizar a técnica em HPLC pela maior sensibilidade em comparação à Cromatografia Gasosa. As cápsulas de w-3

e placebo após finalização da coleta de dados foram analisadas em HPLC para certificação do conteúdo das mesmas.

Figura 6. Análise do conteúdo de ácidos graxos das cápsulas.

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os resultados foram apresentados sob a forma de tabelas e gráficos. Para as variáveis qualitativas, utilizou-se teste chi-quadrado (χ^2) e McNemar e apresentamos os resultados em valor absoluto seguido da sua respectiva porcentagem. Para a determinação dos testes utilizados, considerou-se o tipo de distribuição dessas variáveis (teste *Kolmogorov-Smirnov*; $p > 0,05$). As variáveis quantitativas foram apresentadas sob a forma de média e DP. Para as variáveis normais ou paramétricas foram realizados testes t-Student e MANOVA. Para as demais variáveis, foram utilizados testes não paramétricos, Mann-Whitney, Wilcoxon e Friedman.

Todos os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences*® (SPSS), versão 16.0 (SPSS Incorporation, 2007). O valor de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4.13 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública (COEP/FSP) e Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário - USP (**Anexo 3**).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A partir da triagem inicial, foram selecionados 186 indivíduos para o presente estudo. Destes, 3 indivíduos (1,6 %) foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão estabelecidos para este estudo, devido a alterações no ECG sugestivas de evento cardiovascular prévio.

Dos 183 indivíduos elegíveis, 92 foram randomizados no grupo w-3 e 91 indivíduos no grupo placebo. No grupo w-3, houveram 14 desistências no T=0S e 1, no T=4S, permanecendo sob intervenção 77 indivíduos. No grupo placebo, 15 e 7 indivíduos desistiram do protocolo nos tempos T=0S e T=4S respectivamente, sendo que 69 indivíduos finalizaram o protocolo (**Figura 6**).

Figura 7. Fluxograma de seleção dos indivíduos incluídos no estudo ao longo do período de intervenção.

5.2 CARACTERIZAÇÃO SOCIOECONÔMICA

A **Tabela 1** apresenta a análise descritiva da distribuição de sexo, raça, estado civil, atividade ocupacional, escolaridade, renda, uso de tabaco e álcool segundo os grupos w-3 e placebo. Dos 146 indivíduos que completaram o estudo, 56 eram do sexo masculino e 90 eram do sexo feminino, com idade média geral de 53 (10,2) anos. O grupo intervenção foi

composto por 28 (36 %) indivíduos do sexo masculino e 49 (63 %) do sexo feminino. O grupo placebo foi composto por 28 (41 %) indivíduos do sexo masculino e 41 (59 %) do sexo feminino. A comparação da distribuição de sexo entre os grupos não apresentou diferença significativa. As idades médias do grupo w-3 e placebo foram 52 (10) e 54 (10,3) anos, respectivamente. Essas foram semelhantes entre os grupos. Perfil semelhante foi observado para as demais variáveis, exceto em relação à renda, onde os indivíduos do grupo w-3 declararam ter uma renda superior ao grupo placebo.

Tabela 1. Caracterização dos indivíduos incluídos no estudo, segundo grupo de intervenção.

Características	W-3	Placebo	p		
	(n=77)	(%)	(n=69)	(%)	
Sexo					
Masculino	28	36	28	41	1,000
Feminino	49	63	41	59	0,399
Etnia					
Branca	54	70	45	65	0,366
Negra	23	30	21	30	0,724
Amarela	0	0	3	4	----
Estado Civil					
Solteiro	12	15,6	10	15	0,670
Casado	51	66	47	68	0,686
Viúvo	5	7	3	4	0,480
Divorciado	8	10	7	10	0,796
Outros	1	1	2	3	0,564
Trabalha					
Sim	44	57	46	67	0,833
Não	19	25	13	19	0,289
Aposentado	14	18	10	15	0,414
Escolaridade					
Fundamental incompleto	11	14	11	16	1,000
Fundamental completo	5	7	5	7	1,000
Médio incompleto	0	0	3	4	----
Médio completo	24	31	18	26	0,355
Superior incompleto	8	10	7	10	0,796
Superior completo	19	25	19	28	1,000
Outros	10	13	6	9	0,317
Renda					
<1 SM	1	1,3	0	0	----
1-5 SM	31	40	43	62	0,163
6-10 SM	24	31	17	25	0,274
>10SM	21	27	9	13	0,028
Tabaco					
Sim	16	21	11	16	0,336
Não	40	52	35	51	0,564
Ex-tabagista	21	27	23	33	0,763
Álcool*					
Sim	36	47	30	44	0,460
Não	41	53	39	57	0,823

Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste χ^2 . Resultados apresentados em tamanho da amostra (n), seguido do respectivo percentual (%) em cada grupo de intervenção. Nível de significância adotado ($p < 0,05$). * O auto relato de consumo de álcool foi considerado positivo (sim) independente da quantidade e frequência de ingestão.

5.3 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA

A **Tabela 2** apresenta a análise descritiva da presença de doenças crônicas auto-relatadas pelos indivíduos inclusos no estudo. Observa-se que no grupo w-3, 66 (85,7 %) indivíduos referiram ter algum tipo de doença. No grupo placebo, 64 (92,8 %) indivíduos referiram ter alguma doença crônica. Não houve diferença entre os grupos quando avaliamos a prevalência total de doenças, assim como quando avaliadas as doenças estratificadas separadamente. Hipertensão arterial sistêmica (HAS) e dislipidemias (DLP) foram as doenças mais frequentes nos dois grupos de intervenção.

Tabela 2. Caracterização da amostra, segundo prevalência de doenças crônicas auto-relatadas, segundo grupos de intervenção.

Doenças prévias	W-3		Placebo		p
	(n=77)	(%)	(n=69)	(%)	
Doença					
Sim	66	85,7	64	92,8	0,86
Não	11	14,3	5	7,2	0,13
Tipos de doenças					
Pré DM	5	6,5	4	5,8	0,71
DM	12	15,6	14	20,3	0,70
HAS	43	55,8	40	58	0,74
DLP	38	49,4	39	56,5	0,91
Hipotireoidismo	7	9,1	11	15,9	0,35
Hepáticas	5	6,5	8	11,6	0,41
Psiquiátricas	1	1,3	1	1,4	1,00
Respiratórias	1	1,3	2	2,9	0,45
Oftalmo/Otorrino	1	1,3	3	4,3	0,41
Gástricas	4	5,2	3	4,3	0,66
Vascular/Hemato	4	5,2	3	4,3	0,66
Reumatológicas	1	1,3	6	8,7	0,27
Renais	3	3,9	5	7,2	0,48
Auto-imunes	2	2,6	0	0	----

Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste χ^2 . Resultados apresentados em tamanho da amostra (n), seguido do respectivo percentual (%) em cada grupo de intervenção. Nível de significância adotado ($p < 0,05$). Pré DM, Pré Diabetes Mellitus; DM, Diabetes Mellitus; HAS, Hipertensão Arterial Sistêmica; DLP, Dislipidemia.

A **Tabela 3** apresenta a análise descritiva da distribuição de medicamentos de uso contínuo. No grupo w-3, 56 (72,7 %) indivíduos referiram fazer uso contínuo de medicamentos, enquanto que 56 (81,2 %) dos indivíduos do grupo placebo fizeram relato semelhante. Entretanto, essa variável foi semelhante entre os grupos, assim como não apresentaram diferença quando os medicamentos foram estratificados. Os indivíduos nos dois grupos de intervenção usavam principalmente drogas anti-hipertensivas e hipolipidêmicas. Esses resultados reforçam as informações apresentadas na **Tabela 2**.

Tabela 3. Frequência do uso de medicamentos da amostra, segundo grupos de intervenção.

Medicamento	W-3		Placebo		p
	(n=77)	(%)	(n=69)	(%)	
Sim	56	72,7	56	81,2	0,86
Não	21	27,3	13	18,8	0,13
Tipos de medicamento					
Estatina	16	20,8	19	27,5	0,61
Anti-hipertensivo	37	48,1	38	55,1	0,90
Hipoglicemiante	13	16,9	13	18,8	1,00
Fibrato	2	2,6	2	2,9	1,00
Tireoidianos	7	9,1	11	15,9	0,35

Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste χ^2 . Resultados apresentados em tamanho da amostra (n), seguido do respectivo percentual (%) em cada grupo de intervenção. Nível de significância adotado ($p < 0,05$).

A **Tabela 4** apresenta a análise descritiva da distribuição de antecedentes familiares para doenças crônicas relatadas pelos indivíduos inclusos no estudo. No grupo w-3, 69 (89,6 %) referiram ter mãe, pai ou ambos com histórico de doença crônica. No grupo placebo, este valor correspondeu a 62 (89,9 %) dos indivíduos. Não houve diferença entre os grupos quando as prevalências total e estratificada por doenças foram avaliadas.

Tabela 4. Caracterização da amostra, segundo antecedentes familiares de doença crônicas, segundo grupos de intervenção.

Doenças familiares	W-3		Placebo		<i>p</i>
	(n=77)	(%)	(n=69)	(%)	
Antecedentes					
Sim	69	89,6	62	89,9	0,54
Não	8	10,4	7	10,1	0,80
Doenças					
Obesidade	15	19,5	10	14,5	0,32
HAS	48	62,3	36	52,2	0,19
Infarto	26	33,8	17	24,6	0,17
AVE	16	20,8	16	23,2	1,00
DM	29	37,7	20	29	0,20
DVP	6	7,8	2	2,9	0,16
Osteoporose	27	35,1	33	47,8	0,44

Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste χ^2 . Resultados apresentados em tamanho da amostra (n), seguido do respectivo percentual (%) em cada grupo de intervenção. Nível de significância adotado ($p < 0,05$). HAS, Hipertensão Arterial Sistêmica; AVE, Acidente Vascular Encefálico; DM, Diabetes Mellitus; DVP, Doença Vascular Periférica.

5.4 ESCORE DE RISCO DE FRAMINGHAM

A **Tabela 5** apresenta a distribuição dos indivíduos quanto ao ERF. Não houve diferença em função da intervenção e do tempo. Entretanto os indivíduos do grupo placebo apresentaram maior ERF em todos os intervalos de tempo.

Tabela 5. Distribuição de risco cardiovascular, segundo tempo, grupo de intervenção e ERF.

Tempo/semanas	Baixo	Intermediário	Alto	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	n (%)	
	w-3			
T=0S	22 (28,6)	29 (37,7)	26 (33,8)	0,476 [*]
T=4S	24 (31,2) [*]	24 (31,2)	29 (37,7)	0,931 ^{**}
T=8S	23 (29,9)	25 (32,5)	29 (37,7)	0,618 ^{***}
	placebo			
T=0S	15 (21,7)	20 (29,0)	34 (49,3)	0,044[*]
T=4S	8 (11,6)	30 (43,5)	31 (44,9)	0,086 ^{**}
T=8S	13(18,8)	21 (30,4)	35 (50,7)	0,689 ^{***}

Valores apresentados em número absoluto e prevalência. Análise por teste McNemar. ^{*} *p* = ERF T=0S vs T=4S. ^{**} *p* = ERF T=4S vs T=8S. ^{***} *p* = ERF T=0S vs T=8S. Valor de significância *p* < 0,05.

5.5 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

A **Tabela 6** apresenta os valores médios e os DPs das variáveis peso, altura, IMC, CC, porcentagem de MG e pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), distribuídos, segundo grupos de intervenção (w-3 e placebo) e período de intervenção. Observou-se que todos os indivíduos apresentaram excesso de peso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$). A análise do efeito do tempo e da intervenção não demonstrou diferença significativa entre os indivíduos. Quando se avaliou as variáveis antropométricas e a pressão arterial, segundo ERF não se observou diferença significativa entre os grupos.

Tabela 6. Caracterização antropométrica, composição corporal e pressão arterial dos indivíduos incluídos no estudo, segundo tipo e tempo de intervenção.

variáveis	w-3			p
	T=0S	T=4S	T=8S	
Peso (kg)	82,4 (18,7)	82,9 (18,8)	82,9 (18,9)	1,0
Altura (m)	1,64 (0,1)	1,64 (0,1)	1,64 (0,1)	1,0
IMC (kg/m^2)	30,7 (6,2)	31 (6,1)	31 (6,3)	0,9
CC (cm)	99,9 (1,3)	99,9 (1,2)	99,8 (1,3)	0,9
MG (%)	36,4 (12,0)	36,4 (12,0)	36,3 (11,7)	1,0
PAS (mm/Hg)	134,3 (19,6)	135,9 (20,8)	129,2 (17,9)	0,1
PAD (mm/Hg)	81,5 (10,7)	81,6 (10,9)	77,6 (9,7)	0,1
	Placebo			p
	T=0S	T=4S	T=8S	
Peso (kg)	78,5 (15,3)	78,5 (15,2)	78,3 (15,3)	1,0
Altura (m)	1,61 (0,1)	1,61 (0,1)	1,61 (0,1)	1,0
IMC (kg/m^2)	30,3 (5,2)	30,3 (5,4)	30,2 (5,3)	1,0
CC (cm)	98,9 (12,7)	98,9 (11,8)	99,9 (11,8)	0,8
MG (%)	35,1 (11,8)	34,4 (12,2)	34,0 (12,1)	0,9
PAS (mm/Hg)	136,4 (19,7)	138,9 (19,3)	131,7 (15,3)	0,1
PAD (mm/Hg)	82,9 (9,5)	82,9 (9,5)	80,2 (8,6)	0,2

IMC, Índice de Massa Corporal; CC, Circunferência de Cintura; MG, Massa Gorda. Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste *t*-Student ($\Delta \text{T=8S-T=0S}$ no grupo w-3 vs $\Delta \text{T=8S-T=0S}$ no grupo placebo) e por MANOVA para avaliar o efeito do tempo. Valores apresentados em Média e Desvio Padrão. Nível de significância adotado ($p < 0,05$).

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FÍSICA

A **Tabela 7** apresenta os resultados da avaliação da atividade física, segundo tempo e intervenção. Não foi observado efeito da intervenção. Entretanto, verificou-se que no período T=8S os indivíduos do grupo w-3 apresentaram menor escore para EFL e os indivíduos do grupo placebo no período T=8S apresentaram menor escore para AFO. Quando se avaliou as variáveis de atividade física, segundo ERF não se observou diferença significativa entre os grupos.

Tabela 7. Caracterização de Atividade Física dos indivíduos incluídos no estudo, segundo tipo e tempo de intervenção.

Atividade física	w-3			p
	T=0S	T=4S	T=8S	
AFO	2,5 (0,7)	2,4 (0,6)	2,4 (0,5)	0,23
EFL	2,3 (0,9)	2,2 (0,8)	2,1 (0,8) ^{*,**}	0,01
ALL	2,4 (0,6)	2,4 (0,6)	2,5 (0,5)	0,41
AF total	7,1 (1,5)	7,0 (1,3)	6,9 (1,3)	0,52
	Placebo			p
	T=0S	T=4S	T=8S	
AFO	2,6 (0,6)	2,5 (0,6)	2,4 (0,5) [*]	0,02
EFL	2,5 (0,7)	2,5 (0,7)	2,2 (0,7)	0,06
ALL	2,4 (0,6)	2,4 (0,6)	2,5 (0,6)	0,53
AF total	7,5 (1,2)	7,4 (1,3)	7,1 (1,3)	0,14

AFO, Atividade Física Ocupacional; EFL, Exercício Físico de Lazer; ALL, Atividade de Lazer e Locomoção; AF total, Atividade física total. Valores apresentados em Média e Desvio Padrão. Análises para efeito do tempo dentro do mesmo grupo de intervenção: Manova para as variáveis paramétricas e Friedman com post hoc Wilcoxon para as variáveis não paramétricas. Análises para efeito da intervenção entre os grupos w-3 vs placebo através de Δ T=8S – T=0S: *t*-Student para as variáveis paramétricas e Mann-Whitney para as variáveis não paramétricas. ^{*}T=8S vs T=0S $p < 0,05$; ^{**} T=8S vs T=4S $p < 0,05$.

5.7 CONSUMO ALIMENTAR

A **Tabela 8**, apresenta os valores médios e os DP's das variáveis de consumo alimentar.

Ao longo do tempo de intervenção, no grupo w-3, houve diminuição significativa do consumo de carboidratos, de AGS e AGMI, w-6, fibras e sódio e aumento significativo para os AGPI após 4 semanas de intervenção. Observou-se ainda aumento significativo do consumo de EPA e DHA no intervalo de tempo T=8S e T=4S.

Ao longo do tempo de intervenção, no grupo placebo, houve diminuição significativa do consumo de lipídeos, de AGS e AGMI, ácido graxo oleico, AGPI e w-6. Houve aumento do consumo de DHA para o grupo placebo, ao longo do período T=0S até T=8S.

Em relação ao Δ T=8S - T=0S w-3 *versus* (vs) placebo, houve consumo significativamente menor de lipídeos no grupo placebo e consumo significativamente menor de carboidratos no grupo w-3.

Tabela 8. Avaliação do consumo alimentar, segundo tipo e tempo de intervenção.

Nutrientes	w-3			P
	T=0S	T=4S	T=8S	
Proteínas (g)	72,56 (14,88)	73,82 (12,29)	73,43 (14,03)	0,845
Carboidratos (g)	222,50 (27,51)	217,26 (29,34)	204,27 (32,17) ^{*,**;b}	0,001
Lipídeos (g)	52,68 (11,26)	49,65 (15,44)	53,40 (8,87) ^a	0,130
Colesterol (mg)	214,35 (110,75)	225,78 (85,69)	217,94 (57,70)	0,299
AGS (g)	53,40 (8,87)	16,60 (4,48) [*]	15,54 (3,90) ^{*,a}	<0,001
AGMI (g)	16,60 (4,48)	13,65 (3,62) [*]	14,21 (3,08) [*]	<0,001
Ácido graxo oleico (g)	9,22 (3,40)	9,51 (2,51)	9,76 (2,41)	0,489

CONTINUAÇÃO

Nutrientes	w-3			P
	T=0S	T=4S	T=8S	
AGPI (g)	5,78 (1,98)	7,07 (2,34)*	5,89 (1,51)**	<0,001
Ácidos graxos w-6 (g)	3,85 (1,5)	4,16 (1,54)	3,32 (0,90)*,**	0,001
LA (g)	3,89 (1,60)	4,16 (1,54)	4,11 (1,11)	0,464
Ácidos graxos w-3 (g)	0,59 (0,26)	0,64 (0,39)	0,63 (0,24)	0,345
EPA (g)	0,04 (0,05)	0,03 (0,06)	0,05 (0,05)**	0,003
DHA (g)	0,10 (0,11)	0,09 (0,09)	0,14 (0,10)*,**	0,002
Fibras (g)	15,77 (4,54)	15,95 (3,63)	14,14 (3,86)*,**	0,010
Sódio (mg)	2232,20 (511,54)	2309,62 (325,98)	2136,11 (446,03)**	0,048
Nutrientes	Placebo			P
	T=0S	T=4S	T=8S	
Proteínas (g)	72,45 (12,04)	73,09 (9,33)	68,89 (13,76)	0,083
Carboidratos (g)	220,00 (26,95)	220,94 (28,21)	228,92 (48,03)	0,275
Lípídeos (g)	54,70 (12,46)	48,19 (14,34)*	48,86 (10,37)*	0,004
Colesterol (mg)	209,31 (101,33)	220,77 (85,62)	185,68 (65,43)	0,225
AGS (g)	48,86 (10,37)	16,58 (4,36)*	16,36 (4,30)*	<0,001
AGMI (g)	16,58 (4,36)	13,93 (3,91)*	13,01 (3,20)*	<0,001
Ácido graxo oleico (g)	8,60 (3,04)	9,71 (2,47)*	8,38 (2,53)**	0,008
AGPI (g)	6,18 (2,85)	6,96 (1,87)	5,71 (1,46)**	0,003
Ácidos graxos w-6 (g)	4,03 (2,22)	4,16 (1,24)	3,12 (1,09)*,**	<0,001
LA (g)	4,02 (2,26)	4,22 (1,26)	3,89 (1,30)	0,318
Ácidos graxos w-3 (g)	0,61 (0,36)	0,60 (0,24)	0,54 (0,17)	0,450
EPA (g)	0,04 (0,06)	0,03 (0,04)	0,04 (0,04)	0,613
DHA (g)	0,09 (0,10)	0,08 (0,07)	0,11(0,08)*,**	0,005
Fibras (g)	15,30 (3,81)	15,34 (3,06)	14,86 (3,85)	0,685
Sódio (mg)	2329,79 (509,84)	2317,97 (297,37)	2187,35 (474,05)	0,107

AGS. ácido graxo saturado; AGMI. ácido graxo mono-insaturado; AGPI. ácido graxo poli-insaturado; EPA. ácido eicosapentaenoico; DHA. ácido docosahexaenoico; LA. ácido graxo linoleico. Valores apresentados em Média e Desvio Padrão após ajuste por energia e ajuste intrapessoal. Análises para efeito do tempo dentro do mesmo grupo de intervenção: Manova para as variáveis paramétricas e Friedman com post hoc Wilcoxon para as variáveis não paramétricas. Análises para efeito da intervenção entre os grupos w-3 vs placebo através de Δ T=8S – T=0S: *t*-Student para as variáveis paramétricas e Mann-Whitney para as variáveis não paramétricas. *T=8S vs T=0S ou T=4S vs T=0S $p < 0,05$; ** T=8S vs T=4S $p < 0,05$; ^a Δ T=8S - T=0S w-3 vs placebo $p < 0,05$; ^b Δ T=8S - T=0S w-3 vs placebo $p = 0,001$.

5.8 MARCADORES DO METABOLISMO LIPÍDICO

A **Tabela 9**, apresenta os valores médios e os DPs das variáveis CT, TG, LDL, HDL e as relações TG/HDL, CT/HDL, LDL/HDL e colesterol não HDL, NEFAs, apoliproteínas AI e B e suas relações APO B/APO AI, HDL-C/APO AI, LDL-C/APO B, assim como tamanho de partículas da LDL e HDL, fenótipo de LDL e Lipoproteína de baixa densidade eletronegativa [LDL (-)] distribuídos, segundo grupos de intervenção (w-3 e placebo) e período de intervenção.

Ao longo do tempo de intervenção, no grupo w-3, houve diminuição significativa da concentração de TG, CT, LDL, das relações TG/HDL, CT/HDL, LDL/HDL, LDL/APO B, do colesterol não HDL, da LDL (-) e da HDL_{PEQUENA}. Ainda no grupo w-3, houve aumento da concentração de HDL, da razão HDL/APOA AI, da HDL_{GRANDE} e da HDL_{INTERMEDIÁRIA}.

Ao longo do tempo de intervenção, no grupo placebo, houve diminuição significativa da concentração de LDL, das relações TG/HDL, CT/HDL, LDL/HDL, LDL/APO B, do colesterol não HDL e da LDL (-). Ainda no grupo placebo, houve aumento da concentração da HDL, da razão HDL/APO AI, da HDL_{INTERMEDIÁRIA} e da HDL_{PEQUENA}.

Tabela 9. Avaliação dos parâmetros bioquímicos, segundo tipo e tempo de intervenção.

Marcadores	w-3			p
	T=0S	T=4S	T=8S	
TG (mg/dL)	143 (81)	106 (54)*	108 (54)*;	<0,001
CT (mg/dL)	204 (37)	186 (39)*	187 (38)*;	0,002
LDL (mg/dL)	138 (36)	120 (36)*	124 (36)*	0,003
HDL (mg/dL)	38 (11)	45 (11)*	41 (11)	0,003
TG/HDL	4,4 (3,5)	2,7 (1,9)*	2,9 (2,1)*	<0,001
CT/HDL	5,8 (1,9)	4,4 (1,3)*	4,7 (1,4)*,**	<0,001
LDL/HDL	4,0 (1,5)	2,9 (1,1)*	3,2 (1,2)*,**	<0,001
CT-HDL (mg/dL)	167 (37)	141 (38)*	146 (37)*	<0,001
NEFA(mEq/L)	0,69 (0,32)	0,62 (0,31)	0,63 (0,31)	0,362
APO AI (mmol/L)	131,2(26,1)	137,5 (27,0)	139,0 (28,1)	0,109
APO B (mmol/L)	103,9 (22,3)	110,3 (27,5)	109,7 (25,8)	0,157

CONTINUAÇÃO

Marcadores	w-3			p
	T=0S	T=4S	T=8S	
HDL-C/APOAI	0,29 (0,07)	0,32 (0,07)*	0,31 (0,06)	<0,001
LDL-C/APOB	1,4 (0,3)	1,1 (0,2)*	1,2 (0,3)*	<0,001
APOB/APOAI	0,81 (0,22)	0,82 (0,21)	0,82(0,24)	0,861
LDL _{GRANDE} (mg/dL)	54,2 (16,6)	53,3 (15,8)	53,3 (16,3)	0,829
LDL _{PEQUENA} (mg/dL)	5,9 (9,9)	4,8 (5,3)*	6,4 (9,0)**	0,731
Tamanho de LDL (nm)	26,9 (0,6)	27,0 (0,4)	26,9 (0,5)	0,308
Fenótipo A (n/%)	20 (26)	21 (27)	26 (34)	0,630
Fenótipo B (n/%)	57 (74)	56 (73)	51 (66)	0,828
HDL _{GRANDE} (mg/dL)	11,5 (5,5)	15,6 (7,2)*	14,8 (6,7)*	<0,001
HDL _{INTERMEDIÁRIA} (mg/dL)	18,5 (4,6)	21,2 (4,2)*	19,8 (4,5)**	<0,001
HDL _{PEQUENA} (mg/dL)	7,5 (3,3)	8,1 (2,9)	6,9 (2,2)**	0,011
LDL(-) (U/L)	6,6 (7,88)	5,0 (6,06)*	5,1 (4,97)*	<0,001
	Placebo			p
	T=0S	T=4S	T=8S	
TG (mg/dL)	159 (101)	146 (81)	140 (84)	0,059
CT (mg/dL)	204 (42)	192 (43)	198 (41)	0,352
LDL (mg/dL)	135 (37)	117 (40)*	125 (38)	0,030
HDL (mg/dL)	38 (10)	46 (11)*	44 (10)*	<0,001
TG/HDL	4,7 (3,7)	3,6 (2,7)*	3,5 (2,6)*	<0,001
CT/HDL	5,7 (1,6)	4,4 (1,5)*	4,8 (1,4)**	<0,001
LDL/HDL	3,8 (1,4)	2,7 (1,2)*	3,1 (1,2)**	<0,001
CT- HDL (mg/dL)	167 (40)	146 (44)*	153 (41)	0,031
NEFA(mEq/L)	0,6 (0,3)	0,7 (0,3)	0,6 (0,3)	0,703
APO AI (mmol/L)	130,1 (25,4)	140,3 (24,5)	134,6 (33,2)	0,102
APO B (mmol/L)	103,2 (24,8)	108,4 (23,7)	106,7 (27,1)	0,302
HDL-C/APOAI	0,29 (0,1)	0,31 (0,1)*	0,32 (0,1)*	<0,001
LDL-C/APOB	1,3 (0,3)	1,1 (0,3)*	1,1 (0,2)*	<0,001
APOB/APOAI	0,81 (0,2)	0,82 (0,2)	0,82 (0,3)	0,888
LDL _{GRANDE} (mg/dL)	53,5 (15,3)	51,6 (15,7)	54,2 (15,2)	0,705
LDL _{PEQUENA} (mg/dL)	8,5 (10,3)	8,7 (13,1)*	8,4 (11,3)**	0,696
Tamanho de LDL (nm)	26,8 (0,5)	26,8 (0,7)	26,8 (0,6)	0,763
Fenótipo A (n/%)	28 (41)	24 (35)	28 (41)	0,857
Fenótipo B (n/%)	41 (59)	45 (65)	41 (59)	0,882
HDL _{GRANDE} (mg/dL)	11,9 (5,0)	14,3 (6,6)	14,1 (6,8)	0,060
HDL _{INTERMEDIÁRIA} (mg/dL)	18,8 (4,1)	22,9 (5,2)*	21,6 (4,1)*	<0,001
HDL _{PEQUENA} (mg/dL)	6,8 (3,0)	8,4 (3,1)*	7,8 (3,3)*	<0,001
LDL(-) (U/L)	5,8 (6,8)	5,0 (6,7)*	5,3 (6,9)*	0,001

TG, Triacilgliceróis; CT, Colesterol total; LDL, Lipoproteína de baixa densidade; HDL, Lipoproteína de alta densidade. Valores apresentados em Média e Desvio Padrão (exceto Fenótipo A e Fenótipo B). Análises para efeito do tempo dentro do mesmo grupo de intervenção: MANOVA para as variáveis paramétricas e Friedman com post hoc Wilcoxon para as variáveis não paramétricas. *T=8S vs T=0S ou T=4S vs T=0S $p < 0,05$; ** T=8S vs T=4S $p < 0,05$;

Os **gráficos 1 e 2** mostram o perfil lipídico estratificado, segundo tempo ($\Delta T=8S - T=0S$), intervenção e ERF. Não houve diferença significativa para LDL-C e colesterol total. O perfil de triacilglicerois mostrou que a suplementação de w-3 promoveu redução de 45,24 mg/dL (34 %) nos indivíduos com ERF intermediário (**Gráfico 1**).

Gráfico 1. Variação de triacilglicerois nos grupos w-3 vs placebo ($\Delta T=8S - T=0S$), segundo Escore de Risco de Framingham F. Valores apresentados em mediana. Diferença entre os grupos foi analisada pelo teste Mann-Whitney. (* $p < 0,05$).

As análises da concentração de colesterol associado à HDL (HDL-C) (**Gráfico 2**) mostraram aumento da HDL-C nos dois grupos de intervenção. Entretanto, os indivíduos com alto ERF do grupo placebo apresentaram aumento (6,17 mg/dL, 15 %) superior ao observado no grupo w-3.

Gráfico 2. Variação de HDL-c nos grupos w-3 vs placebo ($\Delta T=8S - T=0S$), segundo Escore de Risco de Framingham. Valores em média de mg/dL. Diferença entre os grupos foi analisada pelo teste t-Student (* $p < 0,05$).

Para as relações TG/HDL, CT/HDL, LDL/HDL e o colesterol não HDL, estratificadas segundo tempo ($\Delta T=8S - T=0S$), intervenção e ERF não houve diferença significativa.

Quanto às análises de apolipoproteínas, para APO AI (**Gráfico 3**) houve diminuição significativa da APO AI no escore alto risco em 0,27 mg/dL (0,2 %). Não houve diferença significativa para a APO B.

Não houve diferença significativa para as relações HDL/APO AI, LDL/APO B, APO B/APO AI, estratificadas, segundo tempo ($\Delta T=8S - T=0S$), intervenção e ERF.

Gráfico3. Variação de APO AI nos grupos w-3 vs placebo ($\Delta T=8S - T=0S$), segundo Escore de Risco de Framingham. Diferença entre os grupos foi analisada pelo teste Mann Whitney (* $p < 0,05$).

As análises de NEFAs (**Gráfico 4**), mostraram diminuição significativa nos indivíduos com alto ERF do grupo w-3 em 0,13 mg/dL (20 %) quando comparado ao grupo placebo.

Gráfico 4. Variação de NEFAs nos grupos w-3 e vs placebo ($\Delta T=8S - T=0S$), segundo Escore de Risco de Framingham. Valores em média de mEq/L. Diferença entre os grupos foi analisada pelo teste *t*-Student (* $p < 0,05$).

O **Gráfico 5** mostra a concentração das partículas intermediárias da HDL. Houve diminuição significativa da HDL_{INTERMEDIÁRIA} no escore de alto risco em 0,12 mg/dL (0,6 %). Não houve diferença significativa da HDL_{GRANDE}, e da HDL_{PEQUENA} segundo tempo ($\Delta T=8S - T=0S$), intervenção e ERF.

Gráfico 5. Variação de HDL_{INTERMEDIÁRIA} nos grupos w-3 vs placebo ($\Delta T=8S - T=0S$), segundo Escore de Risco de Framingham. Valores apresentados em média. Diferença entre os grupos foi analisada pelo teste *t*-Student (* $p < 0,05$).

Não houve diferença significativa das concentrações das partículas LDL_{PEQUENA} e LDL_{GRANDE}, tamanho da LDL-C e da concentração de LDL (-), segundo tempo ($\Delta T=8S - T=0S$) e ERF entre os grupos w-3 e placebo.

5.9 AVALIAÇÃO DA ADERÊNCIA À INTERVENÇÃO

A **Tabela 10** apresenta os valores em média e DP referentes ao percentual de cápsulas consumidas pelos pacientes. Não houve diferença significativa no consumo de cápsulas entre os grupos w-3 e placebo. Perfil semelhante foi observado em relação ao tempo e o ERF.

Tabela 10. Avaliação da aderência à intervenção a partir do percentual de cápsulas consumidas, segundo tipo e tempo de intervenção e escore de risco de Framingham.

Cápsulas	Baixo			Intermediário			Alto		
	T=4S	T=8S	p	T=4S	T=8S	p	T=4S	T=8S	p*
w-3									
(%)	91	89	0,3	92	93	0,1	92	90	0,7
placebo									
(%)	93	97	0,8	92	92	0,9	90	89	0,9
p**	0,8	0,5		0,7	0,5		0,5	0,8	

Valores apresentados em percentual. Análise feita com a média do consumo de cápsulas por teste Mann-Whitney para grupos w-3 vs placebo e teste Wilcoxon entre tempos T=4S vs T=8S no mesmo ERF e grupo de intervenção. Nível de significância de $p < 0,05$. * - T=4S vs T=8S intra grupo, ** - T=4S ou T=8S w-3 vs T=4S ou T=8S placebo.

5.10 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NO PLASMA

Além do controle do número de cápsulas feito nos tempos T=4S e T=8S, foram realizadas análises do perfil plasmático de AG visando identificar marcadores bioquímicos que se associem ao consumo do w-3.

A **Tabela 11**, apresenta os valores em média e DP referentes à composição de AG plasmáticos.

Ao longo do tempo, no grupo w-3, houve aumento significativo da incorporação de DHA, ALA e ácido palmítico.

A quantificação de AA foi feita juntamente com o ácido palmitoléico pois a identificação de ambos os ácidos graxos coincidiam no mesmo tempo de

retenção na análise de HPLC. Houve diminuição significativa de AL, AA com palmitoléico e ácido oleico.

No grupo placebo, ao longo do tempo, houve aumento significativo da incorporação do ALA. Houve também diminuição significativa de DHA, AL, AA com palmitoléico e ácido oleico.

Tabela 11. Avaliação da composição de ácidos graxos plasmáticos, segundo tipo e tempo de intervenção.

Ácidos graxos	w-3			p
	T=0S	T=4S	T=8S	
22:6	6,9 (3,8)	10,4 (4,7)	11,6 (6,0) ^{*,**;a}	<0,001
20:5	3,1 (3,9)	5,4 (8,6)	4,4 (8,6)	0,161
18:2	32,6 (10,6)	28,9 (10,5)	29,7 (13,1) ^{*,**;}	<0,001
18:3	1,3 (1,8)	2,0 (2,3)	1,9 (1,8) ^{*,**}	<0,001
16:0	6,7 (5,6)	7,6 (9,2)	7,1 (4,0) ^{*,***}	0,048
20:4 + 16:1	21,4 (9,9)	16,2 (5,5)	17,2 (7,7) ^{*,**}	0,001
18:1	22,3 (13,6)	16,6 (9,4)	13,8 (6,9) ^{*,**}	<0,001
18:0	4,0 (7,2)	5,4 (10,6)	4,6 (5,6)	0,989
22:6 + 20:5	10,0 (5,1)	15,8 (8,3)	15,9 (9,3) ^a	0,720
22:6 + 20:5 + 18:3	11,3 (6,0)	17,9 (9,6)	17,9 (10,2) ^a	0,623
	Placebo			p
	T=0S	T=4S	T=8S	
22:6	5,6 (5,7)	3,2 (3,1)	3,7 (5,2) ^{*,**}	0,019
20:5	2,4 (3,9)	2,4 (2,8)	2,0 (2,3)	0,303
18:2	32,7 (14,0)	29,5 (10,2)	28,5 (9,5) ^{*,**}	<0,001
18:3	1,7 (1,5)	1,7 (1,6)	1,9 (1,1) ^{*,**}	<0,001
16:0	7,0 (7,6)	9,0 (6,3)	8,2 (5,6) ^{*,**}	0,008
20:4 + 16:1	21,2 (11,7)	17,6 (5,6)	18,5 (11,0) ^{*,**}	0,022
18:1	24,4 (15,9)	16,8 (10,9)	16,4 (11,9) ^{*,**}	0,014
18:0	2,3 (2,5)	1,9 (1,6)	2,1 (1,6)	0,133
22:6 + 20:5	9,6 (5,3)	10,6 (10,0)	10,0 (4,7)	0,109
22:6 + 20:5 + 18:3	11,3 (7,9)	12,4 (11,3)	11,9 (5,3)	0,193

20:5. ácido eicosapentaenoico; 22:6. ácido docosahexaenoico; 18:2. ácido linoleico; 18:3. ácido alfa-linolênico; 16:0. ácido palmítico; 20:4 + 16:1. ácido araquidônico + ácido palmitoleico; 18:1. ácido oleico; 18:0. ácido esteárico. Valores apresentados em média e desvio padrão. Variáveis paramétricas analisadas por teste t-Student e não paramétricas por teste Wilcoxon and Mann-Whitney. Análises por Friedman e Wilcoxon entre tempos de intervenção. *T=8S vs T=0S $p < 0,05$; ** T=4S vs T=0S $p < 0,05$; *** T=8S vs T=4S $p < 0,05$. ^a comparação entre $\Delta T=8S - T=0S$ placebo vs w-3.

O **Gráfico 6** mostra que houve aumento significativo da concentração de DHA plasmático no grupo de baixo risco por ERF.

Gráfico 6. Porcentual de ácidos graxos plasmático nos grupos w-3 vs placebo com baixo Escore de Risco de Framingham. EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; AL, ácido linoleico; ALA, ácido alfa-linolênico; PALM, ácido palmítico. Análises por teste *t*-Student e Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

O **Gráfico 7** mostra que também houve um aumento significativo da concentração de DHA plasmático no grupo de risco intermediário por ERF.

Gráfico 7. Porcentual de ácidos graxos plasmático nos grupos w-3 vs placebo com Escore de Risco de Framingham intermediário. EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; AL, ácido linoleico; ALA, ácido alfa-linolênico; PALM, ácido palmítico. Análise por teste t-Student e Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

O **Gráfico 8** ilustra que assim como nos outros escores de risco, houve um aumento significativo da concentração de DHA plasmático para o grupo de alto risco por ERF.

Gráfico 8. Porcentual de ácidos graxos plasmático nos grupos w-3 vs placebo com alto Escore de Risco de Framingham. EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; AL, ácido linoleico; ALA, ácido alfa-linolênico; PALM, ácido palmítico. Análise por teste t-Student e Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

As DCVs e, particularmente, a aterosclerose representam um grave problema de Saúde Pública, pois sua prevalência e incidência vêm aumentando mundialmente (OMS, 2008). Neste contexto, alguns autores têm pesquisando formas de intervir precocemente nos fatores modificáveis que expõe os indivíduos a um maior risco cardiovascular.

Nossos resultados corroboram com essas pesquisas. Após análise bioquímica do perfil lipídico, observou-se que o TG diminuiu em todos os estratos de ERF. O efeito hipotriacilgliceridêmico do w-3 foi particularmente importante nos indivíduos com risco intermediário. Resultado semelhante foi descrito por Simão et al. (2010) após suplementar indivíduos adultos com Síndrome Metabólica (SM) com cápsulas de óleo de peixe contendo 180 mg de EPA e 120 mg de DHA, totalizando 3 g/dia. Após o período de 90 dias, observou-se que houve diminuição significativa dos TG dos indivíduos com suplementação de óleo de peixe.

A quantidade e o tipo gordura consumida podem influenciar o perfil de lipoproteínas plasmáticas. Os AGPI influenciam a composição das membranas, o metabolismo celular, sinais de tradução e modulam a expressão de genes, regulando a atividade e produção de alguns fatores de transcrição (LOTTENBERG, 2009).

Além dos AG w-3 serem reguladores da expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e na adipogênese, a sua administração reduz o conteúdo de mRNA hepático da *sterol regulatory element-binding protein-1* (SREBP-1) que também controla a expressão de genes lipogênicos (CLARKE, 2001).

Os mecanismos pelos quais o w-3 reduz o TG não são totalmente claros, embora exista consenso de que o w-3 reduz a secreção hepática das lipoproteínas ricas em TG em humanos (HARRIS e BULCHANDANI, 2006).

Existem vários estudos, desde a década de 80, que identificaram o efeito benéfico do w-3 na diminuição do TG. Dentre esses, 6 estudos descreveram o

efeito do w-3 sobre o metabolismo do TG em humanos, relacionado à diminuição na produção de VLDL (NESTEL et al., 1984; SANDERS et al., 1985; HARRIS et al., 1990; FISCHER et al., 1998; BORDIN et al., 1998; CHAN et al., 2002). Alguns estudos também associaram a LLP com a diminuição do TG (PARK et al., 2004).

Segundo Harris e Bulchandani (2006), o consumo de w-3 pode promover a redução dos TG por três mecanismos: (1) menor disponibilidade de AG que poderia ser secundária a um aumento da beta-oxidação ou à diminuição na disponibilidade de NEFA para o fígado ou inibição na lipogênese (2) diminuição da atividade de enzimas sintetizadoras de TG tais como diacilglicerol aciltransferase (DGAT) ou ácido fosfatídico fosfatase (PAP) e (3) aumento da síntese fosfolipídica, que poderia desviar ácido fosfatídico a partir da via da DGAT.

Os mecanismos regulatórios do w-3 sobre a diminuição da síntese de VLDL parecem estar associados com a diminuição dos fatores de transcrição como as SREBPs que controlam a expressão das enzimas responsáveis pela esterificação de TG dentro do hepatócito e oxidação dos AG (HARRIS et al., 2008). As SREBPs regulam a síntese de colesterol, AG e TG, uma vez que estimulam a síntese das enzimas lipogênicas, Acetil-CoA carboxilase-1 (ACC1) e Ácido Graxo Sintase (FAS) (HORTON et al., 1998). Os AG dietéticos modulam a transcrição genética via fatores de transcrição, tais como o *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR- α , β , γ). O PPAR- α está envolvido na síntese de LLP (JUMP, 2008) e a sua interação com w-3 poderia modular a β -oxidação (HARRIS et al., 2007).

O Alpha Receptor X Hepático (LXR α) e o Alpha Receptor X Retinoide (RXR α) regulam a expressão do gene SREBP-1c. De acordo com o estudo realizado por Yoshikawa et al. (2002), o consumo de óleo de peixe em camundongos está associado à diminuição de TG e dos níveis de SREBP-1c mRNA. Isto pode ser devido ao efeito inibitório do EPA e do DHA nos LXR e RXR, reduzindo a expressão gênica de SREBP-1c.

Sendo assim, o w-3 aumenta a oxidação de AG por meio da ativação do PPAR- α ou γ e reduz a atividade do SREBP (RODRIGUES-CRUZ et al., 2005).

Nesse contexto, o aumento da degradação intracelular da ApoB no hepatócito levando à redução na produção de VLDL (FISCHER et al., 2001) e diminuição na concentração de NEFAs na circulação também têm sido investigados (HARRIS e BULCHANDANI, 2006).

Além dos pontos destacados anteriormente, o w-3 pode melhorar o *clearance* do TG. Sabe-se que os quilomicrons, ricos em TG pós prandial e as VLDL competem pela LLP – enzima responsável pela hidrólise dos TG, presentes no endotélio capilar de vários tecidos. De acordo com Park e Harris (2003), o EPA e DHA (4 g/dia) aumentaram a taxa de *clearance* dos quilomicrons. Após 4 semanas de intervenção com 4 g de EPA a taxa de *clearance* diminuiu de $6,1 \pm 0,8$ minutos para $5,2 \pm 0,7$ minutos e após 4 semanas de intervenção com 4 g de DHA a taxa de *clearance* diminuiu de $5,9 \pm 0,7$ minutos para $4,9 \pm 0,5$ minutos (PARK e HARRIS, 2003).

Alguns estudos associam a diminuição de TG com a redução de NEFAs. Em nosso estudo, houve diminuição da concentração de NEFAs quando o grupo com alto risco cardiovascular foi avaliado. Na revisão de Shearer et al. (2011), foi identificado apenas um estudo randomizado controlado examinando o efeito do óleo de peixe em relação os NEFAs sobre desfechos primários. Nesse estudo, indivíduos saudáveis apresentaram diminuição de 36 % do TG e 37 % dos NEFAs após 7 dias com intervenção de óleo de peixe (30 g/dia, contendo 9 g de w-3 dos quais 5,5 g de EPA e 3,6 g de DHA) (DAGNELIE et al., 1994).

Shearer et al. (2011) estimaram que 37 % na redução de NEFAs corresponderia a diminuição de 31 % do TG em indivíduos saudáveis. Já em indivíduos obesos ou com resistência insulínica, a diminuição seria de 13 % e 20 %, respectivamente.

O estudo OPTILIP (*Optimal n6/n3 ratio in the UK Diet Study*) foi desenhado para avaliar o efeito de distintas proporções de w-6:w-3 associadas a uma dose sub-farmacológica de EPA e DHA (1,6 g/dia). Neste estudo foi observado redução de 15 % do TG e não houve mudança nos NEFAs (GRIFFIN et al., 2006).

Associado ao efeito hipotriacilgliceridêmico do w-3 observado no presente estudo, verificou-se ação hipocolesterolêmica relacionada ao colesterol total e diminuição do LDL-C ao longo do período de intervenção para

o grupo w-3. Contrário ao presente estudo, Simão et al. (2010) descreveram aumento da LDL após 45 dias de intervenção com 3 g/dia de EPA e DHA. Este aumento pode ter sido decorrente da maior conversão de VLDL em LDL. Este aumento do *clearance* da VLDL pode ser associado a maior expressão gênica de PPAR - γ e/ou PPAR - α , com consequente aumento da atividade da LLP (HARRIS et al., 2007). Nestel et al. (1984) propuseram que o aumento na LDL-C após intervenção com w-3 poderia estar associado a um melhor perfil nas partículas lipoproteicas, onde ocorreria um aumento nas LDL maiores e menos aterogênicas.

Essa possibilidade foi posteriormente confirmada no estudo realizado por Suzukawa et al. (1995). De acordo com esses autores o consumo de w-3 (3,4 g/d) por 6 semanas promoveu redução de TG, aumento no tamanho e no conteúdo de colesterol associado à LDL.

O tamanho da LDL tem influência direta no equilíbrio entre TG e HDL plasmáticos. A razão para esta associação pode ser explicada, em parte, pela transferência de TG provenientes da HDL para LDL, os quais são mediados pela CETP (BARTER et al., 2003). No presente estudo, observou-se diminuição significativa nas razões TG/HDL, CT/HDL e LDL/HDL.

O enriquecimento da LDL com TG estimula a atividade da LLP, resultando na formação de partículas de LDL menores. Assim, a redução no TG plasmático, como resultado da suplementação de w-3, poderia diminuir o conteúdo de TG da LDL, levando a um aumento de seu tamanho (SUZUKAWA et al., 1995). Essa ação cardioprotetora do w-3 é reforçada pelo papel inibitório que este AG tem sobre a atividade da CETP, que também pode contribuir para o aumento no tamanho da partícula de LDL (ABBEY et al., 1990). As partículas de LDL menores são mais susceptíveis à oxidação do que as maiores e o aumento do tamanho da LDL após a suplementação com w-3 pode contribuir na redução do risco aterogênico além da ação hipotriacilgliceridêmica (de GRAAF et al., 1991). Apesar desse cenário, a suplementação com w-3 no presente estudo não promoveu modificações no tamanho das partículas de LDL.

Além do impacto negativo dos lipídeos associados às lipoproteínas no desenvolvimento das DCV, as modificações oxidativas da LDL são consideradas essenciais ao desenvolvimento da aterosclerose

(HERMANSSON et al., 2010). Nossos resultados demonstraram diminuição significativa da LDL (-) ao longo do tempo de intervenção após suplementação com w-3. A LDL oxidada resulta da exposição desta lipoproteína a agentes oxidativos, como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) presentes nos macrófagos e parede arterial. Esta exposição pode levar à oxidação dos lipídeos e proteínas presentes na partícula de LDL, tornando-as mais aterogênicas (MELLO et al., 2011).

A LDL (-) é uma subfração, modificada, de LDL presente *in vivo*. Normalmente, sua concentração no plasma é menor do que 10% da LDL total em indivíduos saudáveis e maior do que 10% do total da LDL em indivíduos com risco cardiovascular (SÁNCHEZ-QUESADA et al., 2002, 2003).

Toshima et al. (2000), demonstraram que as concentrações de LDL (-) foram mais específicas e mais sensíveis como marcadores do risco cardiovascular do que as concentrações de CT, TG, APO B e colesterol não HDL em pacientes com risco cardiovascular (TOSHIMA et al., 2000).

Suzukawa et al. (1995) avaliaram o tamanho e a oxidabilidade da LDL em um estudo com suplementação de 4 g/dia de óleo de peixe por 6 semanas em homens hipertensos. Os autores observaram redução significativa no TG e aumento na LDL. Entretanto, houve aumento significativo na LDL_{GRANDE} e esta foi inversamente associada com o conteúdo de TG após a suplementação. Esse mesmo estudo descreveu aumento da oxidabilidade da LDL induzida por sulfato de cobre ($CuSO_4$). Apesar deste último resultado, os autores concluíram que o aumento da concentração de LDL_{GRANDE} compensaria e se tornaria favorável ao processo anti-aterogênico.

Resultado semelhante foi descrito por Lussier et al. (1993), após suplementarem pacientes hipertriacilgliceridêmicos por 6 semanas com 12 g/dia de óleo de peixe. Esses autores observaram maior susceptibilidade à oxidação da LDL após incubação com $CuSO_4$ (LUSSIER-CACAN et al., 1993).

Nossos resultados mostraram que o w-3 promoveu aumento da concentração de HDL-C total e da concentração de partículas de HDL_{INTERMEDIÁRIAS} e HDL_{GRANDES} ao longo do período de intervenção com w-3. De acordo com Yvan-Charvet et al. (2010), partículas de HDL_{GRANDES} são melhores transportadores de colesterol, provavelmente porque são

preferencialmente ligadas ao colesterol provenientes de macrófagos via ATP-transportadores ABCG1.

Para Wilkinson et al. (2005), o óleo de peixe produziu mudanças no lipídio plasmático e nas LDL pequenas e densas e estes resultados foram associados à incorporação de DHA após suplementação por 12 semanas em homens com fenótipo aterogênico, ou seja, que apresentavam LDL-3 (pequena e densa) > 40%, classificados como Fenótipo “B”. Houve também aumento na concentração das partículas de HDL_{GRANDES}.

Nestel et al. (1984), suplementaram 7 indivíduos normo e hipertrigliceridêmicos com óleo contendo EPA e DHA equivalente a 30 % das suas necessidades diárias por 3 semanas. Após este período, identificaram diminuição da concentração da VLDL, Apo B associada à VLDL, HDL, Apo AI e CT. O mecanismo para a redução da HDL, foi atribuído a menor síntese de lipoproteínas ricas em Apo B. Quanto ao CT, o estudo atribuiu as modificações a menor ingestão de lipídeos e colesterol dietéticos que foram monitorados ao longo da intervenção.

Quanto às apolipoproteínas, os resultados observados no presente estudo não encontraram variações significativas ao longo do tempo. Quando comparou-se o efeito do w-3 vs placebo, segundo estrato de ERF, houve diminuição da APO AI nos indivíduos com alto risco cardiovascular. Identificou-se também diminuição da razão LDL/APO B e aumento da razão HDL/APO AI, ambos significativos, ao longo do período de intervenção no grupo w-3.

Algumas condições podem reduzir a concentração de APO B como deficiências severas de colina, estímulos com insulina e administração de w-3 ou óleo de peixe. O w-3 estimula a expressão de receptores de LDL o que pode aumentar a captação de colesterol. A degradação de APO B induzida por w-3 é mais efetiva para as lipoproteínas mais dinâmicas, as quais possuem maior difusão e concentração de APO E, uma importante apolipoproteína ligante a receptores B/E (WANG et al., 1993).

Os resultados obtidos tornam-se particularmente relevantes quanto se destaca as estratégias de adesão utilizadas. Identificou-se que houve aumento do DHA plasmático em todos os grupos de ERF, quando comparados ao placebo, destacando-se aumento de 4% de DHA no grupo w-3. Associado a

esse percentual, observou-se que mais de 90% dos indivíduos relataram ter consumido todas as cápsulas de w-3.

Miles et al. (2001), após suplementação com 1,2 g/dia de EPA e DHA por 12 semanas com indivíduos adultos e idosos, observaram aumento significativo de EPA nos fosfolípidos plasmáticos.

Desde a década de 80, estudos têm descrito maior incorporação de w-3 plasmático após suplementação sendo a redução dos TG e CT as principais modificações (BRONGEEST-SCHOUTE et al., 1981).

O presente estudo confirma essas observações ao mostrar a incorporação dos derivados do w-3 no plasma, em detrimento do w-6.

O registro do consumo alimentar, neste estudo, também identificou aumento de alimentos fonte de EPA e DHA ao longo do tempo de intervenção, porém sem diferença significativa quando comparado ao grupo placebo. Entretanto o grupo w-3 apresentou aumento significativo no consumo de alimentos ricos em lipídeos quando comparado ao grupo placebo. Apesar do grupo w-3 ter consumido mais lipídios a suplementação com w-3 mostrou-se relevante visto a incorporação significativamente maior de DHA plasmático ao longo do período de intervenção.

O w-3 e w-6 utilizam a mesma via enzimática (dessaturases e elongases; especialmente D6-dessaturase) para conversão de ALA em EPA e DHA (no caso do w-3) e conversão de AL em AA (no caso do w-6) e seus respectivos mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios (LOTTENBERG et al., 2009). Por esta razão, o aumento na conversão de um dos AGPI inibe a conversão do outro, fator pelo qual os mediadores inflamatórios também são influenciados.

Harnack et al. (2009), estudaram a conversão de ALA em EPA e DHA em células de hepatócitos humanos incubadas com uma mistura de AL/ALA na proporção de 1:1. Eles demonstraram que 0,7 % do ALA foi convertido em DHA e 17 % em EPA e que a expressão gênica de PPAR e SREBP-1c são determinantes no processo. Quando comparada com a conversão de AL em AA, a conversão de ALA em EPA e DHA foi maior. Este efeito pode ser atribuído aos diferentes efeitos do w-6 e do w-3 sobre a atividade das enzimas dessaturases e/ou sobre a expressão gênica das mesmas. Dietas ricas em ácidos graxos insaturados estão associadas com a diminuição dos níveis de

mRNA da D5-desaturase e D6-desaturase. CHO et al. (1999), demonstraram que a atividade da D6-desaturase aumenta quando animais são alimentados com dieta deficiente em ácidos graxos essenciais e diminui quando os AGPI são ingeridos. Neste estudo, observou-se diminuição do consumo de AGMI e aumento no consumo de AGPI, ambos significativos, ao longo do período de intervenção no grupo w-3.

O w-3 e w-6 são precursores da síntese de prostaglandinas e leucotrienos, envolvidos nos processos de coagulação e inflamação. O AA é precursor de eicosanoides pró-inflamatórios como leucotrienos B4 (LTB4) e de prostaglandinas E2 (PGE2) e tromboxana A2 (TXA2). Já o EPA produz eicosanoides anti-inflamatórios e antitrombóticos como prostaglandinas E3 (PGE3), leucotrieno B5 (LTB5) e tromboxana A3 (TXA3) (LOTTENBERG et al., 2009). Alguns desses metabólitos do w-3, as prostaglandinas e prostaciclina, atuam como inibidores endógenos da enzima conversora de angiotensina (ECA) e HMG-CoA redutase e como estimulador do óxido nítrico, produzindo efeito anti-hipertensivo, hipocolesterolêmico e anti-aterosclerótico (MOLENDI-COSTE et al., 2011).

O EPA compete com o AA através das vias da COX e da LOX, desencadeando os mediadores que favorecem a vasodilatação e diminuem a inflamação e a agregação plaquetária (COTTIN et al., 2011). Através destas vias e da ativação da aspirina, o EPA pode ser convertido em resolvinas da série E (RVE) e D (RVD) – da classe dos autacoides. Além disso, tanto EPA quanto DHA competem com o AA pela enzima citocromo P450 (CYP450), levando a formação de mediadores vasodilatadores (BURDGE e CALDER, 2005). Estes eicosanoides derivados do EPA e do DHA têm efeitos importantes sobre o sistema cardiovascular.

A classe dos autacoides inclui não somente as RVE (derivados do EPA) e as RVD (derivados do DHA) como as protectinas e maresina 1 derivadas do w-3 e as lipoxinas derivadas do w-6 (MOLENDI-COSTE et al., 2011; COTTIN et al., 2011).

As vias de ação da COX, LOX e CYP450 também produzem oxilipinas e estes, são importantes ativadores da PPAR, envolvida no metabolismo lipídico (SHEARER et al., 2011).

Em conjunto, o w-3 parece exercer por múltiplas vias efeitos diretos e indiretos no controle dos fatores de risco cardiovascular clássicos e emergentes.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados identificou-se aumento significativo (média de 4%) dos níveis de DHA plasmáticos nos indivíduos suplementados com w-3. Essa elevação teve impacto direto na redução, ao longo do tempo, da concentração de TG, CT, LDL-C, colesterol não HDL, LDL (-) e das partículas de HDL_{PEQUENAS}, assim como nas razões TG/HDL, CT/HDL, LDL/HDL e LDL/APO B. A suplementação com w-3 promoveu também, aumento, ao longo do tempo, da concentração de HDL-C total e das partículas de HDL_{GRANDES} e _{INTERMEDIÁRIAS} e da razão de HDL/APO AI. Segundo o ERF, a suplementação com w-3, promoveu diminuição do TG no grupo de risco intermediário. Em relação ao grupo de alto risco, houve diminuição do NEFA e da HDL_{INTERMEDIÁRIA}. Desta forma, os pacientes com risco cardiovascular intermediário e alto obtiveram maior benefício com a suplementação.

Portanto, este resultado corrobora com a literatura ao mostrar o papel positivo do w-3 sobre os marcadores de riscos clássicos. Nossos resultados, ampliam o atual estado da arte sobre w-3 e risco cardiovascular ao mostrar que indivíduos suplementados com esse ácido graxo apresentaram redução na LDL (-) e aumento no tamanho das partículas HDL_{GRANDES} e _{INTERMEDIÁRIAS}.

8 REFERÊNCIAS

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão da Sociedade Brasileira de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, supl. 1, p. 1-51, 2010.

ABBEY, M. et al. Effect of fish oil on lipoproteins, lecithin: cholesterol acyltransferase, and lipid transfer protein activity in humans. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 10, n. 1, p. 85-94, 1990. ISSN 1079-5642.

ABEGUNDE, D. O. et al. The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. **Lancet**, v. 370, p. 1929-1938, Dec. 2007.

ANDRADE, P. M. M.; RIBEIRO, B. G.; CARMO, M. G. T. Suplementação de ácidos graxos ômega 3 em atletas de competição: impacto nos mediadores bioquímicos relacionados com o metabolismo lipídico. **Rev Bras Med Esporte**, v. 12, n. 6, p. 339-44, 2006.

ANNUZZI, G. et al. Lipoprotein subfractions and dietary intake of n- 3 fatty acid: the Genetics of Coronary Artery Disease in Alaska Natives study. **The American journal of clinical nutrition**, v. 95, n. 6, p. 1315-1322, 2012. ISSN 0002-9165.

BACKER, G. D. et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. **European Heart Journal**, v. 24, p. 1601-1610, 2003.

BAECKE et al. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. **American journal of clinical nutrition**, v. 36, p. 936-942, 1982.

BARTER, P. J. et al. Cholesteryl Ester Transfer Protein: A Novel Target for Raising HDL and Inhibiting Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, p. 160-167, 2003.

BORDIN, P. et al. Effects of fish oil supplementation on apolipoprotein B100 production and lipoprotein metabolism in normolipidaemic males. **European journal of clinical nutrition**, v. 52, n. 2, p. 104, 1998. ISSN 0954-3007.

BRONGEEST-SCHOUTE, H. et al. The effect of various intakes of omega 3 fatty acids on the blood lipid composition in healthy human subjects. **The American journal of clinical nutrition**, v. 34, n. 9, p. 1752-1757, 1981. ISSN 0002-9165.

BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 5, p. 581-598, 2005. ISSN 0926-5287.

BURR, M. et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). **Lancet**, v. 2, n. 8666, p. 757, 1989. ISSN 0140-6736.

CHAN, D. C. et al. Effect of atorvastatin and fish oil on plasma high-sensitivity C-reactive protein concentrations in individuals with visceral obesity. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 877-883, 2002. ISSN 0009-9147.

CHAN, E. J.; CHO, L. What can we expect from omega-3 fatty acids? **Cleveland Clinic journal of medicine**, v. 76, n. 4, p. 245-251, 2009. ISSN 0891-1150.

CHO, H. P.; NAKAMURA, M. T.; CLARKE, S. D. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Δ -6 desaturase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 1, p. 471-477, 1999. ISSN 0021-9258.

CLARKE, S. D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 4, p. 1129-1132, 2001. ISSN 0022-3166.

COTTIN, S.; SANDERS, T.; HALL, W. Postgraduate Symposium The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 70, n. 2, p. 215-231, 2011. ISSN 0029-6651.

D'AGOSTINO SR, R. B. et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care. **Circulation**, v. 117, n. 6, p. 743-753, 2008. ISSN 0009-7322.

DAGNELIE, P. C. et al. Effect of dietary fish oil on blood levels of free fatty acids, ketone bodies and triacylglycerol in humans. **Lipids**, v. 29, n. 1, p. 41-45, 1994. ISSN 0024-4201.

DE GRAAF, J. et al. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 11, n. 2, p. 298-306, 1991. ISSN 1079-5642.

DENARDI, D. C. F.; SALGADO, J. M.; MOREIRA, R. Efeito da dieta, estatina e ácidos graxos ômega-3 sobre a pressão arterial ea lipidemia em humanos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 863-867, 2009. ISSN 0101-2061.

DIN, J. N.; NEWBY, D. E.; FLAPAN, A. D. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. **Bmj**, v. 328, n. 7430, p. 30-35, 2004. ISSN 0959-8138.

EndNote [software disponível na internet] Versão X7 Windows: PICinformática; 2013 [acesso em 25 abr 2013]. Disponível em <https://www.picinfo.com.br/EndNote>

FISBERG, R. M.; MARCHIONI, D. M. L.; COLUCCI, A. C. A. Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 5, p. 617-24, 2009.

FISHER, W. R.; ZECH, L. A.; STACPOOLE, P. W. Apolipoprotein B metabolism in hypertriglyceridemic diabetic patients administered either a fish oil-or vegetable oil-enriched diet. **Journal of lipid research**, v. 39, n. 2, p. 388-401, 1998. ISSN 0022-2275.

FISHER, E. A. et al. The triple threat to nascent apolipoprotein B Evidence for multiple, distinct degradative pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 30, p. 27855-27863, 2001. ISSN 0021-9258.

FLORINDO, A. A.; LATORRE, M. R. D. Validation and reliability of the Baecke questionnaire for the evaluation of habitual physical activity in adult men. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 9, n. 3, p. 129-135, 2003. ISSN 1517-8692.

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, p. 499-502, 1972.

GLASS, C. K.; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis: The Road Ahead Review. **Cell**, v. 104, p. 503-516, 2001.

GERSH, B. J. et al. Novel therapeutic concepts. The epidemic of cardiovascular disease in the developing world: global implications. **European heart journal**, v. 31, n. 6, p. 642-648, 2010. ISSN 0195-668X.

GISSI - Prevenzione Investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-prevenzione trial. **Lancet**, v. 354, p. 447-455, 1999.

GLASS, C. K.; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis: the road ahead. **Cell**, v. 104, p. 503-5016, 2001.

GRUENWALD, J. et al. Effect of glucosamine sulfate with or without omega-3 fatty acids in patients with osteoarthritis. **Advances in therapy**, v. 26, n. 9, p. 858-871, 2009. ISSN 0741-238X.

GRUNDT, H.; NILSEN, D. W. n-3 fatty acids and cardiovascular disease. **haematologica**, v. 93, n. 6, p. 807-812, 2008. ISSN 0390-6078.

GRIFFIN, M. D. et al. Effects of altering the ratio of dietary n- 6 to n- 3 fatty acids on insulin sensitivity, lipoprotein size, and postprandial lipemia in men and postmenopausal women aged 45–70 y: the OPTILIP Study. **The American journal of clinical nutrition**, v. 84, n. 6, p. 1290-1298, 2006. ISSN 0002-9165.

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. Department of Agriculture Research Service Nationwide Food Surveys Report no. 96-1. Beltsville, MD: United States Department of Agriculture, 1998.

HARNACK, K.; ANDERSEN, G.; SOMOZA, V. Quantitation of alpha-linolenic acid elongation to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as affected by the ratio of n6/n3 fatty acids. **Nutrition & metabolism**, v. 6, n. 1, p. 8, 2009. ISSN 1743-7075.

HARRIS, W. S. et al. Effects of fish oil on VLDL triglyceride kinetics in humans. **Journal of lipid research**, v. 31, n. 9, p. 1549-1558, 1990. ISSN 0022-2275.

HARRIS, W. S.; VON SCHACKY, C. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? **Preventive medicine**, v. 39, n. 1, p. 212-220, 2004. ISSN 0091-7435.

HARRIS, W. S.; BULCHANDANI, D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? **Current opinion in lipidology**, v. 17, n. 4, p. 387-393, 2006. ISSN 0957-9672.

HARRIS, W. S. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: A Case for Omega-3 Index as a New Risk Factor. **Pharmacol Res.**, v. 55, n. 3, p. 217-223, 2007.

HARRIS, W. S. et al. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. **Atherosclerosis**, v. 197, n. 1, p. 12, 2008. ISSN 0021-9150.

HERMANSSON, A. et al. Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 5, p. 1081-1093, 2010. ISSN 0022-1007.

HOOVER, L. et al. Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review. **Bmj**, v. 332, n. 7544, p. 752-760, 2006. ISSN 0959-8138.

HORTON, J. D. et al. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 5987-5992, 1998. ISSN 0027-8424.

HU, F. B. et al. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 287, n. 14, p. 1815-1821, 2002. ISSN 0098-7484.

HULLEY, S. B. et al. **Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica**. Capítulo 6. Pg. 83 a 104. 2ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

JOHNSON, R. K. et al. Comparison of multiple-pass 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, p. 1140-1144, 1996.

JUMP, D. B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Current opinion in lipidology**, v. 19, n. 3, p. 242, 2008.

KEPLER, C. K. et al. Omega-3 and fish oil supplements do not cause increased bleeding during spinal decompression surgery. **Journal of spinal disorders & techniques**, v. 25, n. 3, p. 129-132, 2012. ISSN 1536-0652.

KOON, T. et al. The Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) study: examining the impact of societal influences on chronic noncommunicable diseases in low-, middle-, and high-income countries. **American heart journal**, v. 158, n. 1, p. 1-7. e1, 2009. ISSN 0002-8703.

LANAS, F. et al. Risk factors for acute myocardial infarction in Latin America. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1067-1074, 2007. ISSN 0009-7322.

LOHMAN, T. G.; ROCHE, A. F. & MARTORELL, R. **Anthropometric Standardization Reference Manual**. Champaign: Human Kinetics Books, 1998.

LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 5, p. 595-607, 2009.

LUSSIER-CACAN, S. et al. Influence of probucol on enhanced LDL oxidation after fish oil treatment of hypertriglyceridemic patients. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 13, n. 12, p. 1790-1797, 1993. ISSN 1079-5642.

MACKERRAS, D. Energy adjustment: the concepts underlying the debate. **Journal of clinical epidemiology**, v. 49, n. 9, p. 957-962, 1996. ISSN 0895-4356.

MELLO, A. P. Q. et al. Electronegative low-density lipoprotein: origin and impact on health and disease. **Atherosclerosis**, v. 215, n. 2, p. 257-265, 2011. ISSN 0021-9150.

MILES, E. A. et al. Influence of age and dietary fish oil on plasma soluble adhesion molecule concentrations. **Clinical Science**, v. 100, n. 1, p. 91-100, 2001. ISSN 0143-5221.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996 - Conselho Nacional de Saúde. Brasil, 1996. <conselho.saude.gov.br/resolucoes/1996/reso196.doc> Acesso em: 10 jun. 2013.

MOLENDI-COSTE, O.; LEGRY, V.; LECLERCQ, I. A. Why and How Meet n-3 PUFA Dietary Recommendations? **Gastroenterology research and practice**, v. 2011, 2010. ISSN 1687-6121.

MOSCA, L. et al. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women—2011 update: a guideline from the American Heart Association. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 57, n. 12, p. 1404-1423, 2011. ISSN 0735-1097.

NESTEL, P. et al. Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. **Journal of clinical investigation**, v. 74, n. 1, p. 82, 1984.

NIMURA, N.; KINOSHITA, T. Fluorescent labeling of fatty acids with 9-anthryldiazomethane (ADAM) for high performance liquid chromatography. **Analytical Letters**, v. 13, n. 3, p. 191-202, 1980. ISSN 0003-2719.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Obesidade: Prevenindo e controlando a Epidemia Global**. São Paulo: Roca, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. World Health Statistics. 2008. ISBN 978 92 4 0682740 (versão eletrônica). Disponível em: <http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Full.pdf> Acesso em: 20 abr. 2013.

PARK, Y.; JONES, P. G.; HARRIS, W. S. Triacylglycerol-rich lipoprotein margination: a potential surrogate for whole-body lipoprotein lipase activity and effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 1, p. 45-50, 2004. ISSN 0002-9165.

PARK, Y.; HARRIS, W. S. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 455-463, 2003.

PHILIPPI, S. T. Tabela de Composição de Alimentos - Suporte para decisão nutricional. 3. ed. Barueri: Manole, 2012. 174 p.

POWNALL, H. J. et al. Correlation of serum triglyceride and its reduction by ω -3 fatty acids with lipid transfer activity and the neutral lipid compositions of high-density and low-density lipoproteins. **Atherosclerosis**, v. 143, n. 2, p. 285-297, 1999. ISSN 0021-9150.

RODRIGUEZ-CRUZ, M. et al. [Molecular mechanisms of action and health benefits of polyunsaturated fatty acids]. **Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion**, v. 57, n. 3, p. 457, 2005. ISSN 0034-8376.

ROS, E.; MATAIX, J. Fatty acid composition of nuts-implications for cardiovascular health. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. 1, p. 29-35, 2006. ISSN 0007-1145.

RUIJTER, H. M. D. et al. Pro- and antiarrhythmic properties of a diet rich in fish oil. **Cardiovascular Research**, v. 73, p. 316-325, 2007.

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L. et al. Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. **Journal of lipid research**, v. 43, n. 5, p. 699-705, 2002. ISSN 0022-2275.

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L. et al. Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 166, n. 2, p. 261-270, 2003. ISSN 0021-9150.

SANDERS, T. et al. Triglyceride-lowering effect of marine polyunsaturates in patients with hypertriglyceridemia. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 5, n. 5, p. 459-465, 1985. ISSN 1079-5642.

SCHACKY, C. V.; HARRIS, W.S. Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. **Cardiovascular Research**, v. 73, p. 310-315, 2007.

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. ISSN 1388-1981.

SIMÃO, A. N. C. et al. Efeito dos ácidos graxos n-3 no perfil glicêmico e lipídico, no estresse oxidativo e na capacidade antioxidante total de pacientes com síndrome metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 54, n. 5, p. 463-469, 2010.

SIMOPOULOS, A. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 60, n. 9, p. 502-507, 2006. ISSN 0753-3322.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 6, p. 674-688, 2008. ISSN 1535-3702.

SKULAS-RAY, A. C. et al. Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. **American journal of clinical nutrition**, v. 93, p. 243-252, 2011.

STRONG, K. et al. Preventing chronic disease: how many lives can we save? **Lancet**, v. 366, p. 1578-82, Oct. 2005.

SPSS INCORPORATION. Statistical Package for the Social Sciences for Windows Student Version/ SPSS [computer program]. Release 16.0. Chicago: Marketing Department; 2007.

SUZUKAWA, M. et al. Effects of fish oil fatty acids on low density lipoprotein size, oxidizability, and uptake by macrophages. **Journal of lipid research**, v. 36, n. 3, p. 473-484, 1995. ISSN 0022-2275.

TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos/NEPA** - UNICAMP. 4. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. 161 p.

The Food Processor Software [software em CD-ROM]. Version 10.11.0. Salem (OR): ESHA Research, 2012.

The Multiple Source Method (MSM) [software disponível na internet]. Version 1.0.1. Potsdam: Department of Epidemiology of the German Institute of Human Nutrition; 2008-2011 [atualizado em 20 fev 2012; acesso em 07 jan 2013]. Disponível em <https://msm.dife.de/>.

THIES, F. et al. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 361, n. 9356, p. 477, 2003. ISSN 0140-6736.

TOSHIMA, S. I. et al. Circulating oxidized low density lipoprotein levels a biochemical risk marker for coronary heart disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, p. 2243-2247, 2000.

VILLANI, A. M. et al. Fish oil administration in older adults: is there potential for adverse events? A systematic review of the literature. **BMC geriatrics**, v. 13, n. 1, p. 41, 2013. ISSN 1471-2318.

ZIPES, D. P. et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death). **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, n. 5, p. e247-e346, 2006. ISSN 0735-1097.

WANG, H.; CHEN, X.; FISHER, E. A. N-3 fatty acids stimulate intracellular degradation of apoprotein B in rat hepatocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 4, p. 1380, 1993.

WANG, C. et al. N-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary – and secondary – prevention studies: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 5-17, 2006.

WANG, Y. et al. Will all Americans become overweight or obese? Estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. **Obesity**, v. 16, n. 10, p. 2323-2330, 2008. ISSN 1930-7381.

WANG, Q. et al. Effect of omega-3 fatty acids supplementation on endothelial function: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Atherosclerosis**, v. 221, p. 536-543, 2012.

WILLET, W.; STAMPFER, M. Implications of total energy intake for epidemiologic analyses. **Nutritional epidemiology**. 2 ed. New York: Oxford University Press, 1998.

WILKINSON, P. et al. Influence of α -linolenic acid and fish-oil on markers of cardiovascular risk in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. **Atherosclerosis**, v. 181, n. 1, p. 115-124, 2005. ISSN 0021-9150.

YVAN-CHARVET, L.; WANG N.; TALL, A.R. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 Transporters in Cholesterol Efflux and Immune Responses. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, p. 139-143, 2010.

YOKOYAMA, M. et al. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. **The Lancet**, v. 369, n. 9567, p. 1090-1098, 2007. ISSN 0140-6736.

YOSHIKAWA, T. et al. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 3, p. 1705-1711, 2002. ISSN 0021-9258.

9 ANEXOS

ANEXO 1

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+						

Escore de Risco de *Framingham* – ERF

Pontos	% risco
<u>≤</u> -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

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+						

Escore de Risco de *Framingham* – ERF

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

ANEXO 2

QUESTIONÁRIO DE ATIVIDADE FÍSICA HABITUAL

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

	1	2	3	4	5
	1	2	3	4	5
10. Em comparação com outros da sua idade o Sr(a) pensa que sua atividade física durante as horas de lazer é:	5	4	3	2	1
muito maior / maior / a mesma / menor / muito menor					
11. Durante a horas de lazer o Sr(a) sua:	5	4	3	2	1
muito freqüentemente / freqüentemente / algumas vezes / raramente / nunca					
12. Durante as horas de lazer o Sr(a) pratica esporte ou exercício físico:	1	2	3	4	5
nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / muito freqüentemente					
Escore de EFL					
ATIVIDADE FÍSICA DE LAZER E LOCOMOÇÃO					
13. Durante as horas de lazer o Sr(a) vê televisão:	1	2	3	4	5
nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / muito freqüentemente					
14. Durante as horas de lazer o Sr(a) anda:	1	2	3	4	5
nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / muito freqüentemente					
15. Durante as horas de lazer o Sr(a) anda de bicicleta:	1	2	3	4	5
nunca / raramente / algumas vezes / freqüentemente / muito freqüentemente					
16. Durante quantos minutos por dia o Sr(a) anda a pé ou de bicicleta indo e voltando do trabalho, escola ou compras?	1	2	3	4	5
<5 / 5-15 / 16-30 / 31-45 / >45					
Escore de ALL					
17. Somatória Total dos Pontos					
18. ESCORE TOTAL					

Fórmula para cálculo dos escores do questionário Baecke de Atividade Física Habitual (AFH)

O Escore Total de Atividade Física será calculado como o preconizado pelo estudo de Baecke, 1982¹.

- **Atividade Física Ocupacional (AFO)**

Cálculo da primeira questão referente ao tipo de ocupação: Intensidade (tipo de ocupação) = 1 para profissões com gasto energético leve, 3 para profissões com gasto energético moderado ou 5 para profissões com gasto energético vigoroso (determinada pela resposta do tipo de ocupação, o gasto energético da profissão deve ser conferido no compêndio de atividades físicas de Ainsworth, 2000).

$$\text{Escore de AFO} = \frac{Q1 + (6 - Q2) + Q3 + Q4 + Q5 + Q6 + Q7 + Q8}{8}$$

8

- **Exercício Físico no Lazer (EFL)**

Cálculo da questão 9 referente à prática de esporte/exercício físicos:

- Intensidade (tipo de modalidade) = 0,76 para modalidades com gasto energético leve, 1,26 para modalidades com gasto energético moderado ou 1,76 para modalidades com gasto energético vigoroso (determinado pela resposta do tipo de modalidade, deve ser conferido no compêndio de atividades físicas de Ainsworth, 2000).

- Tempo (hora por semana) = 0,5 para menos de uma hora por semana, 1,5 entre maior que uma hora e menor que duas horas por semana, 2,5 para maior que duas horas e menor que três horas por semana, 3,5 para maior que três e até quatro horas por semana ou 4,5 para maior que quatro horas por semana (determinado pela resposta das horas por semana de prática).

- Proporção (meses por ano) = 0,04 para menor que um mês, 0,17 entre um a três meses, 0,42 entre quatro a seis meses, 0,67 entre sete e nove meses ou 0,92 para maior que nove meses (determinado pela resposta dos meses por ano de prática).

Para cálculo desta questão, os valores devem ser multiplicados e somados:

Mod. 1 (intensidade x tempo x proporção) + Mod. 2 (intensidade x tempo x proporção)

Após o resultado deste cálculo, para o valor final, deverá ser estipulado um escore de 1 a 5 de acordo com critérios especificados abaixo:

0 (sem exercício físico) = 1 / entre 0,01 até < 4=2 / entre 4 até < 8=3 / entre 8 até < 12=4 / ≥12,00 = 5

O escore final de EFL deverá ser obtido de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Escore de EFL} = \frac{Q9 + Q10 + Q11 + Q12}{4}$$

4

- **Atividade Física de Lazer e Locomoção (ALL)**

O escore final de ALL deverá ser obtido de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Escore de ALL} = \frac{(6 - Q13) + Q14 + Q15 + Q16}{4}$$

$$\text{Escore total de atividade física (ET)} = \text{AFO} + \text{EFL} + \text{ALL}$$

ANEXO 3

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

Fls. nº 109
CEP/HU-USP

hospital universitário
universidade de são paulo

São Paulo, 6 de agosto de 2011.

Ilmo(a), Sr(a).

Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Serviço de Nutrição e Dietética do Hospital Universitário

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Propriedade físico-químicas da LDL e da HDL, marcadores cardiometabólicos e oxidativos podem ser modulados pelo consumo de ômega-3, ômega-6 e ômega-9 em indivíduos com risco cardiovascular intermediário?" -

Pesquisador(a) responsável: Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno – **Co-Autor(es):**

Dr. Antonio Figueiredo, Dr. Magnus Ake Gidlund, Dra. Sayuri Miyamoto, Dr. Raul Cavalcante Maranhão, Dra. Dulcineia S. P. Abdalla, Dr. Rodrigo Diaz Olmos, Marlene Nuñez Aldin, Adriane Bueno Marangoni, Caroline Pappiane, Claudia Assef Sanibal -

Registro CEP-HU/USP: 1126/11 – **SISNEP CAAE:** 0063.0.207.198-11.

Prezado(a) Senhor(a)

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

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

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

Atenciosamente,

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

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

10 APÊNDICE

APÊNDICE 1

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública
Av. Dr. Arnaldo, 715 – CEP 01246-904 – São Paulo- Brasil

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

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

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

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

DECLARAÇÃO DA(O) PARTICIPANTE: Eu, _____, CPF nº _____, fui informada(o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações ou desistir de participar desta pesquisa se assim o desejar. A professora coordenadora do estudo Profa. Dra. Nágila 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

APÊNDICE 2

DIÁRIO DO PARTICIPANTE

Prezado Sr(a),

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

Período: 1º mês do estudo

Data início: ____/____/____

Data final: ____/____/____

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

CONTATOS: Faculdade de Saúde Pública da USP – 3061 7865

Hospital Universitário da USP – 3091 9538

Pesquisadora Profa. Dra. Nágila Damasceno – 2369 8581

E-mail: cardionutri@gmail.com

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Saúde Pública

Hospital Universitário

Departamento de Nutrição

Serviço de Nutrição e Dietética

Nome: _____

ID: _____

Pesquisador: _____

SEMANA 1

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

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

() Sim () Não

Se sim, com quem?

Por qual motivo?

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

() Puro

() Adicionado em

3. Preencha a tabela:

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

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

DIA	AZIA	VOMITO	GASES	DIARREIA
1	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N
2	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N
3	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N
4	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N
5	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N
6	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N
7	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N	☐ S ☐ N

Como esteve sua saúde no último mês?

Você sentiu/apresentou?

☐) febre

☐) dor de cabeça

☐) tontura

☐) desmaio

☐) mais fome

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

☐) outros _____

Você fez alguma cirurgia?

☐) Sim ☐) Não

Quando? _____

Qual(is): _____

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

Está tomando/ tomou algum medicamento, além do habitual?

() Sim () Não

Qual(is): _____

Por quê? _____

Quando? _____

Quanto? _____

APÊNDICE 3

QUESTIONÁRIO SÓCIO-ECONÔMICO E CLÍNICO

A00 () N° Cardionutri:	
A0 Data: / /	
A1 Nome:	A2 Data de nascimento: / /
Endereço:	
Bairro:	CEP:
Cidade:	Telefone Res:
Telefone Recado:	Telefone Celular:
A3 Sexo: 1()M 2()F	A4 Idade:
A5 Raça: 1() Branco 2() Negro 3() Pardo 4() Amarelo 5() Indígena	
A6 Estado Civil: 1() Solteiro 2() Casado 3() Viúvo 4() Divorciado 5() Outros	
A7 Trabalha atualmente: 1() SIM 2() NÃO 3() Aposentado 4() Outros: _____	
A8 Profissão: _____	
A9 Escolaridade: 1() Analfabeto 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: _____	
A10 Quantas pessoas moram na sua casa? _____ A11 Quantas crianças? _____	
A12 Renda familiar mensal: 1() Menos que 1 SM 3() Entre 6 e 10 SM 2() Entre 1 e 5 SM 4() Mais que 10 SM	
A13 Fumante: 1() SIM 2() NÃO 3() EX-FUMANTE	
A14 Consome bebida alcoólica: 1() SIM 2() NÃO	
A15 Tipos de bebidas alcoólicas mais consumidas: 1() Cerveja 2() Vinho 3() Vodka 4() Cachaça 5() Outras: _____	
A16 Frequência de Consumo: 1() Diário 2() Semanal: _____ 3() Mensal: _____	
A17 Quantidade de bebida alcoólica ingerida no intervalo acima?	
A18 Consumo de outros tipos de drogas: 1() SIM 2() NÃO	
A19 Qual (s): _____	

A20 Possui alguma doença? 1() SIM 2() NÃO	
A21 Qual doença: 1() Diabetes Mellitus 6() Insuficiência Renal Crônica 2() Hipertensão Arterial 7() Dislipidemia 3() Hipotireoidismo 8() Doença Auto-Imune 4() Doença Hepática 9() Doença Coronariana 5() Outras Qual (is)? _____	
A22 Diagnóstico Clínico de DAC ou equivalente: 1() SIM 2() NÃO	
A23 Qual diagnóstico: 1() História de Infarto do Miocárdio 7() Revascularização do Miocárdio 2() Angina 8() Angioplastia 3() Alterações eletrocardiográficas isquêmicas 9() Aterosclerose 4() Doença Arterial Periférica 10() Aneurisma de Aorta Abdominal 5() Doença Arterial Carotídea (ataque isquêmico transitório ou Acidente Vascular Cerebral de origem carotídea ou obstrução da carótida >50%) 6() Diabetes Mellitus 11() Outros: _____	
A24 Fez algum tipo de cirurgia? 1() SIM 2() NÃO	
A25 Qual (is)? _____	
A26 Quando? _____	
A27 Está usando algum Medicamento e/ou Suplemento? 1() SIM 2() NÃO	
A28 Qual: 1() Estatinas 4() Ferro/Zinco 2() Anti-hipertensivo 5() Vitamina 3() Hipoglicemiante 6() Fibrato 7() Outro: _____	
A29 Qual(is)? _____	
A30 Posologia: _____	
A31 Indicação: _____	
A32 Você tem alguma alergia ou intolerância alimentar? 1() SIM 2() NÃO	
A33 Qual (is): _____	
A34 Antecedentes familiares de doenças crônicas? () SIM () NÃO 1() Pai 4() AVC 2() Obesidade 5() Diabetes 3() Hipertensão 6() Doença vascular periférica 7() Outro: _____ 2() Mãe 1() Obesidade 4() AVC 2() Hipertensão 5() Diabetes 3() Infarto 6() Doença vascular periférica 7() Outro: _____	
A35 Gestante ou Lactante? 1() SIM 2() NÃO	
A36 Está recendo algum tipo de orientação Nutricional? 1() SIM 2() NÃO	
A37 Qual frequência? 1() Esporádica 2() Mensal 3() Trimestral 4() Semestral 5() Outras	

APÊNDICE 4

Recordatório de 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 indivíduo:

“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/outros 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.

Recordatório Alimentar de 24h

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: _____

APÊNDICE 5

MANUAL DO ENTREVISTADOR

Para o sucesso da aplicação do método de inquérito alimentar escolhido, é preciso que o entrevistador atente-se a algumas questões, que serão descritas ao longo deste manual.

Apresentação inicial do entrevistador:

- É de extrema importância, antes da aplicação do inquérito alimentar, que o entrevistador se apresente, explicando os objetivos da entrevista e informando ao entrevistado a duração média da mesma.
- Esclarecer que todos os dados coletados são de ordem confidencial.
- Expor ao entrevistado o direito à não participação, sem qualquer prejuízo.

Considerações importantes:

- Os entrevistadores deverão estar treinados e com amplo conhecimento dos hábitos e costumes da comunidade em estudo, assim como dos alimentos e modo de prepará-los.
- Para auxiliar na quantificação do tamanho e volume das porções consumidas, será utilizado material de suporte com registros fotográficos.
- O entrevistador deverá estabelecer um canal de comunicação em que se obtenha a informação por meio de um diálogo agradável, uma vez que a qualidade da informação dependerá da memória e da cooperação do entrevistado.
- Respostas precisas e não tendenciosas exigem respeito e atitude neutra diante de hábitos e consumo de alimentos do entrevistado. Para tanto, o entrevistador deverá evitar expressar sentimentos de surpresa, tristeza ou decepção, o que poderia induzir o entrevistado a subestimar ou superestimar a quantidade de alimentos, dependendo da reação que ele observe.

CURRÍCULO LATTES

02/12/13

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Nágila Raquel Teixeira Damasceno)

Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8729581028091781>
Última atualização do currículo em 14/08/2013

Graduada em Nutrição pela Universidade Estadual do Ceará (1995). Fez Mestrado (1997) e Doutorado (2001) em Ciências dos Alimentos na Universidade de São Paulo. Realizou estágios de Pós-doutoramento em Imunologia (2005) na Universidade de São Paulo e em Nutrição e Endocrinologia na Universidade de Barcelona (2010). Recebeu prêmios nacionais e internacionais, além de ser co-autora de uma patente. Atualmente é professora doutora de Nutrição junto ao Depto. de Nutrição (FSP-USP). Nos últimos anos tem dedicado suas pesquisas aos efeitos dos componentes nutricionais sobre as doenças crônicas não transmissíveis (aterosclerose, obesidade, câncer, etc) com ênfase nas variáveis lipídicas, oxidativas, inflamatórias e imunológicas. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Nágila Raquel Teixeira Damasceno
Nome em citações bibliográficas DAMASCENO, N. R. T.

Endereço

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

Formação acadêmica/titulação

2013 Livre-docência.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Excesso de Peso na Adolescência: Uma Abordagem Nutricional e Metabólica de um Problema de Saúde Pública, Ano de obtenção: 2013.

2009 - 2010 Pós-Doutorado.
Universidade de Barcelona.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Bioquímica da Nutrição.

2003 - 2004 Pós-Doutorado.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Bolsista do(a): Instituto Danone.
Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Bioquímica da Nutrição.

1997 - 2001 Doutorado em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Influência das Isoflavonas Extraídas da Soja na Hipercolesterolemia e na Aterosclerose Experimental Induzida pela Caseína, Ano de obtenção: 2001.
Orientador: 🌟 Dulcinea Saes Parra Abdalla.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo,

buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4799337E3

Marlene Nuñez Aldin

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3989371909969316>

Última atualização do currículo em 18/02/2013

Possui graduação em Publicidade e Propaganda pela Universidade Metodista de São Paulo (1997) e graduação em Nutrição pela União Social Camiliana (2000). Pós graduação na UNIFESP e mestranda pela Faculdade de Saúde Pública USP. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Marlene Nuñez Aldin
Nome em citações bibliográficas ALDIN, M. N.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2011 Mestrado em andamento em Nutrição Humana Aplicada (Conceito CAPES 3), Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
 Título: Efeito da suplementação de ômega-3 sobre os fatores de risco cardiovascular clássicos e emergentes em indivíduos com alto risco cardiovascular., Ano de Obtenção: 2013.
 Orientador: Nágila Raquel Teixeira Damasceno.
 Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição.
 Setores de atividade: Alimentação; Atividades de atenção à saúde humana.

2000 - 2001 Especialização em Nutrição em Saúde Pública, (Carga Horária: 744h), Universidade Federal de São Paulo.
 Título: Avaliação nutricional de Ginastas Olímpicas de SP.
 Orientador: Dr. Mauro Fisberg.

1997 - 2000 Graduação em Nutrição.
 Centro Universitário São Camilo, CUSC, Brasil.

1994 - 1997 Graduação em Publicidade e Propaganda.
 Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade Bandeirante de São Paulo, UNIBAN, Brasil.

Vínculo institucional

2009 - 2012 Vínculo: Professor visitante, Enquadramento Funcional: docente, Carga horária: 8

Outras informações Docente na graduação de nutrição

Total Care - Amil.

Vínculo institucional

2006 - 2009 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: nutricionista, Carga horária:

Supplementation of Omega-3 Fatty Acid Changes the Biochemical, Oxidative, and Physical Properties of Lipoproteins in Adults and the Elderly¹

Marlene N. Aldin,² Sayuri Miyamoto,³ Emílio Ros,⁴ Patrícia A. Lima,² Antonio A. F. Carioca,⁵ and Nágila R. T. Damasceno^{6*}

² Interunit Postgraduate Program in Applied Human Nutrition, PRONUT, University of São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brazil; ³ Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, IQ, USP, São Paulo, SP, Brazil; ⁴ Lipid Clinic, Endocrinology and Nutrition Service, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ⁵ School of Public Health, SPH, USP, São Paulo, SP, Brazil; ⁶ SPH, USP; Nutrition and Dietetics Service, University Hospital, USP, São Paulo, SP, Brazil.

Footnote:

¹ This study was partially supported by the National Institute of Science and Technology for Complex Fluids (INCT-FCx), NAP-FCx-USP, São Paulo Research Foundation (FAPESP), and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

N.R.T. Damasceno was the recipient of a grant from FAPESP (2011/12523-2), INCT-FCx and NAP-FCx; M.N. Aldin was the recipient of a grant from CNPq, P.A. Lima and A.A.F. Carioca expert in statistical analysis data; S. Miyamoto was experts in fatty acids analysis; E. Ros is a Senior consultant in design and critical analysis of data. All authors read and approved the final manuscript.

The authors have no conflict of interest to declare.

⁷ **Abbreviations used:** %FFM: percentage of fat-free mass; %FM: percentage of fat mass; **ADAM:** 9-anthryldiazomethane; **Apo AI:** apolipoprotein AI; **Apo B:** apolipoprotein B; **Apo CIII:** apolipoprotein CIII; **BHT:** 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-hydroxytoluene; **BMI:** body mass index; **C17:** heptadecanoic acid; **CETP:** cholesteryl ester transfer protein; **CVD:** cardiovascular diseases; **DGAT:** diacylglycerol acyltransferase; **DHA:** docosahexaenoic acid; **DTPA:** diethylenetriaminepentaacetic acid; **ECG:** electrocardiogram; **EDTA:** ethylenediaminetetraacetic acid; **ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; **EPA:** eicosapentaenoic acid; **FA:** fatty acids; **FPLC:** Fast Protein Liquid Chromatography; **HDL:** high-density lipoprotein; **HDL-C:** HDL cholesterol; **HPLC:** high-performance liquid chromatography; **LDL(-):** electronegative LDL; **LDL:** low-density lipoprotein; **LDL-C:** LDL cholesterol; **LPL:** lipoprotein lipase; **Lp-PLA₂:** lipoprotein-associated phospholipase A₂; **mAb 2C7:** monoclonal anti-LDL(-) biotinylated antibody; **mAb-1A3:** monoclonal anti-LDL(-) antibody; **m ± SD:** mean ± standard deviation; **NEFA:** non-esterified fatty acids; **non-HDL-C:** non-HDL cholesterol; **OPD:** *ortho*-phenylenediamine; **PAP:** phosphatidic acid phosphatase; **PBS:** phosphate-buffered saline; **PMSF:** phenylmethylsulfonyl fluoride; **Q4:** highest quartile; **SD:** standard deviation; **TBARS:** thiobarbituric acid-reactive substances; **TC:** total cholesterol; **TG:** triglycerides; **VLDL:** very low-density lipoprotein; **w-3 FA:** omega-3 fatty acids; **WC:** waist circumference.

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail:nagila@usp.br

Abstract

Cardiovascular diseases are the leading cause of morbidity and mortality worldwide. In this scenario, omega-3 takes a prominent role. Evaluation of the effect of supplemental omega-3 fatty acid (w-3 FA) on biochemical changes in adults and elderly individuals would also be important. This study was based on transversal sub-sample of prospective, randomized, double-blind CARDIONUTRI study. We selected adult and elderly subjects ($n = 77$) of both genders to receive supplementation of w-3. We collected socioeconomic, clinical, and anthropometric data, dietary intake, physical activity level, and blood samples (after fasting; 12-14 h) at baseline and after 4 and 8 weeks of intervention (3.0 g/d; w-3 containing 60% eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids, EPA+DHA). Plasma fatty acids were analyzed (HPLC), and from plasma concentration of lipid markers [TC, LDL, HDL, Apo AI, Apo B, NEFA, and LDL(-)], and physicochemical aspects of lipoprotein particles (size and concentration) were evaluated. Our results showed that 4 % of plasma DHA was incorporated. After 4 and 8 weeks of intervention, w-3 FA supplementation was associated with significant decrease in TG ($P < 0.001$), TC ($P = 0.002$), LDL-C ($P = 0.003$), LDL(-) subfraction, non-HDL-C ($P < 0.001$), and the TG/HDL-C, TC/HDL-C, LDL-C/HDL-C, LDL-C/APO B ratios. Higher values for plasma EPA+DHA were associated with a higher content of HDL_{large} subfraction ($P = 0.041$), decreased HDL_{intermediate} ($P = 0.007$) and LDL(-) ($P = 0.004$) subfractions. In conclusion, our results showed that supplementation of w-3 rich in EPA+DHA exert multiple and beneficial effects on the lipid metabolism.

Introduction

Cardiovascular diseases (CVD)⁷ remain the main cause of mortality in the world although deaths in developing countries have reduced. This fact reinforces the importance of preventing and monitoring cardiovascular risk factors, mainly in low- and mid-income countries where incidence of CVD is increasing (1).

In this context, diet is the main focus of public health programs due to its safety and effectiveness. In the last four decades, consumption of fish and fish-derived products has been stimulated due to its negative association with CVD as observed in animal models (2) and clinical trials (3). The beneficial cardiovascular role attributed to omega-3 fatty acid (w-3 FA), especially the eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids, is linked to the reduced levels of triglycerides (TG), antiarrhythmic effects, decreased platelet aggregation (4,5), stabilization of atherosclerotic plaque (6), lowered blood pressure (7,8), preventing pressure overload-induced cardiac fibrosis (9), reduced heart rate (10), and anti-inflammatory action (11).

Furthermore, intake of w-3 FA can also modulate the physical and oxidative characteristics of lipoproteins.

Oxidation of low-density lipoprotein has been accepted as an essential event in the initiation and development of atherosclerosis (12). Regarding the atherogenic role of modified LDL, Avogaro et al. (13) identified an electronegative sub-fraction of LDL, which was named electronegative LDL [LDL(-)]. Presence of this modified particle has been associated with low levels of antioxidant and high content of oxidized cholesterol, lipoperoxides, conjugated dienes, and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) (14). In addition, Sanchez-Quesada et al. (15) described other ways of generating LDL(-) such as enrichment of non-esterified fatty acids (NEFA), lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂), apolipoprotein CIII, and non-enzymatic glycosylation. Recently, de Queiroz Mello et al. (16) associated LDL(-), a smaller and denser LDL particle, with increased atherogenic properties.

Positive effects of w-3 FA were observed in primary and secondary prevention trials (17). These studies showed changes in cardiovascular risk factors and clinical outcomes such as total death, sudden death, and fatal and nonfatal myocardial infarction. However, a recent hybrid primary and secondary prevention trial did not show beneficial effects of w-3 FA in relation to placebo (18). Similarly, an intervention study based on supplementation of w-3 FA did not show reduction in the numbers of death, myocardial infarction or stroke during a 1-6 y follow-up (19).

Regarding this controversial scenario, new approaches are necessary to further investigate the possible positive association between consumption of w-3 FA and cardiovascular risk factors. In this study, we have investigated the impact of w-3 FA supplementation on the biochemical, oxidative, and physical properties of lipoproteins in individuals with different cardiovascular risk levels.

Subjects, Materials, and Methods

Study design and subjects. The subjects included in the present study is a subsample of the CARDIONUTRI trial. It is a prospective, clinical nutritional intervention, double-blind, randomized, and parallel-group trial that can assess the effects of different fatty acids in subjects with distinct levels of cardiovascular risk. The design and methods of the CARDIONUTRI trial have been previously described (in press). Men and woman aged 30-74 y, who were free from CVD, were eligible subjects. They were evaluated by both electrocardiogram and clinical history, and showed at least 1 of the following criteria: type-2 diabetes mellitus or the presence of one or more CVD risk

factors such as smoking, hypertension, dyslipidemia, and overweight. Exclusion criteria included previous history of CVD, any severe chronic illness, alcohol abuse, and history of food allergy or intolerance to intervention. Malnourished individuals and pregnant or lactating women were not eligible. All subjects gave written informed consent, and the protocol study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital. The trial flowchart is shown in **Figure 1**. For estimative of cardiovascular risk information about gender, age, systolic blood pressure, total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), smoking status, and diabetes were investigated according to the proposals of both D'Agostino et al. (20) for men and Mosca et al. (21) for women.

Figure 1 Flowchart of subjects in the trial.

Intervention protocol. The steps of data collection and delivery of capsules occurred in different times. At the basal time (T0) and after four (T4) and eight (T8) weeks, subjects received capsules containing w-3 FA (1 g/capsule, with 37% EPA and 23% DHA). Subjects were instructed to take three of

these capsules per day. Capsules were manufactured and supplied by Relthy Industries (Indaiatuba, SP, Brazil). Possible adverse effects were registered in the “patient’s booklet”, and heartburn, vomiting, flatulence, diarrhea, constipation, itch, and bleeding were monitored daily. Changes in the drug scheme and health status were also registered in this booklet.

Adherence to the intervention was monitored by both number of capsules consumed and changes in plasma fatty acid levels. Regarding the importance of adherence level to validity of the study, results of plasma fatty acid analysis were performed in 100% of samples.

Fatty acid analysis. Plasma concentration of fatty acids (FA) was determined using a validated method, which included derivatization of FA with the fluorescent probe 9-anthryldiazomethane (ADAM) (22) and use of heptadecanoic acid (C17) as an internal standard, of HPLC analysis as described by Miyamoto et al. (23). An aliquot of the sample (100 μ L) was incubated (25°C; 90 min) in NaOH (10 M; 50 μ L) in presence of butylhydroxytoluene (BHT) diluted in ethanol (350 μ L; 1:30, v/v). The saponification product was suspended in an aqueous NaCl solution (1%; 1 ml) containing diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA; 100 μ M), and the [free] FA were then extracted with ethyl acetate (2 ml) containing BHT (1 mM) diluted in hexane (50 μ L; 1:9, v/v). The organic phase was collected, evaporated under a stream of nitrogen and then derivatized with freshly-prepared ADAM (0,25 mg/ml) reagent (100 μ L). Quantification of FA was performed using ADAM, with heptadecanoic acid (C17) as an internal standard, and analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) according to Miyamoto et al. (23). The FA so derivatized were analyzed by HPLC on a Shimadzu Prominence system (Tokyo, Japan), which comprised a SIL-20AV autosampler, two LC-20AT pumps, a CBM-20A controller, and a RF-10Axi fluorescence detector. The sample (5 μ L) was injected onto a reversed-phase column (Synergi C₁₈; 50×3 mm; 2.5- μ m particle size; Phenomenex, Torrance, CA, USA). The HPLC mobile phase was composed of deionized water (A) and acetonitrile (B), and the mixture was propelled at a constant flow rate (1.45 mL/min). Separation of the fluorescent adducts was performed using the following elution program: 79% B (4.5 min), 85-90% (1.5 min), 90% B (2 min), and 90-93% B (0.5 min). The intra- and inter-day variability was checked by running a blank sample containing the internal standard, ADAM reagent, and external FA standard. The samples were monitored by their fluorescence (λ_{ex} = 365 nm, λ_{em} = 412 nm) and analyses were performed in duplicates.

Characterization of subjects. Demographic (age and gender) and clinical (family history of diseases and use of tobacco, alcohol, and drugs) data were continuously collected during the study. Other information on the subjects such as race, occupation, comorbidities (diabetes, hypertension, dyslipidemia, and obesity), and use of drugs (statins, fibrate, and antihypertensives) were also recorded. Their nutritional status was assessed by body mass index (BMI, kg/m²), waist circumference (WC), and body composition. For percentage of fat (%FM) and fat-free (%FFM) mass, the bioimpedance method (Quantum X - BIA Analyzer, RJL Systems®, Detroit, MI, USA) was used. Anthropometric measures were obtained according to Lohman et al. (24). The habitual physical activity was assessed by a questionnaire as proposed by Baecke (25), and was validated by Florindo and Latorre (26) for Brazilian subjects.

Dietary intake. Assessment of food intake was performed by applying two 24-hour recalls (24 h) on alternate days (one day during the week and one day on weekends). Energy and nutrients (fiber, sodium, carbohydrates, proteins and lipids, including cholesterol, DHA, EPA, oleic and linoleic acids, and monounsaturated, polyunsaturated, w-3, and saturated fatty acids) were evaluated quantitatively. Data collection was performed according to the multiple pass method as proposed by Johnson et al. (27) and Guenther et al. (28). Standard recipes and portions, energy, and raw nutrients were analyzed using “The Food Processor” software (version 10.11.0, 2012) (29). Recalls with mean energy intake <500 or >5000 kcal/day were excluded from the study due to lack of accuracy of the nutrition survey or because the consumption values were considered outliers.

Intra-subject variability in the raw data was corrected by using the Multiple Source Method statistical tool (version 1.0.1, 2012) (30). Nutrients were then adjusted for energy intake, as proposed by Willett and Stampfer (31) and Mackerras (32). The final results of dietary intake are presented as adjusted values.

Blood sample collection. At basal time, four and eight weeks after intervention, blood samples (20 ml) were collected after fasting (12 h). Blood samples were collected in dry tubes (for lipid profile) or vacutainer tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 1 mg/mL) or sodium fluorate (for glucose analysis). The protease inhibitors aprotinin (10 mg/mL), benzamidine (10 mM), and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; 5 mM) in addition to the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT; 100 mM) were

added to plasma and serum (3,000 rpm; 10 min; 4 °C). All samples were stored at -80 °C until analysis.

Biochemical analysis. The levels of total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C), and triglycerides (TG) were determined by commercial standard methods (Cholesterol Liquiform® Labtest, MG, Brazil). Cholesterol content in LDL was determined using the Friedewald equation (33), where $LDL-C = TC - (HDL-C + TG/5)$. This equation was applied only to samples with TG <400 mg/dL. Intra- and inter-assay variation rates were respectively determined for TC (1.0 and 0.5%), TG (2.0 and 1.0%), and HDL (3.5 and 1.5%).

Apolipoproteins AI (Apo AI) and B (Apo B) were determined by a standard immuno-turbidimetric method, using the APO AI Autokit® and APO B Autokit® (Randox Chemicals®, Northen Ireland, UK), respectively. Analyses were performed in the automatic Cobas Mira System. All analyses were performed in duplicate, and the intra- and inter-assay variation coefficients were respectively determined for Apo AI (2.2 and 3.7%) and Apo B (3.7 and 8.8%). The non-esterified fatty acids (NEFA) in serum were determined calorimetrically (Wako® Pure Chemicals Industries, Ltd. Osaka, Japan) HR Series NEFA-HR, in the Cobas Mira System, and the intra- and inter-assay variation coefficients were 5.4 and 3.8%, respectively. From these results, we determined the TG/HDL-C, TC/HDL-C, LDL-C/HDL-C, non-HDL-C, Apo B/Apo AI, Apo AI/HDL-C, and Apo B/LDL-C ratios.

Lipoprint system. The LDL and HDL particle sizes were analyzed by the electrophoretic method of the Lipoprint® System (Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, USA). In the preparation phase, plasma samples (25 µl) were pipetted onto a loading gel (200 or 300 µl) with a dye respectively lipophilic to LDL and HDL, in a glass tube filled with polyacrylamide gel, which was then handled mixed (7 times). The samples (30 min) were photopolymerized and then submitted to electrophoresis within a solution containing buffer salts. During the first phase of the electrophoresis, the lipoprotein particles are usually concentrated into a sharp narrow band in the loading and stacking gel. The lipoprotein particles migrated through the separating gel matrix and they were separated into lipoprotein bands according to their particle sizes, from the largest to the smallest particle. A typical LDL Lipoprint profile had one VLDL band, three midbands, up to seven LDL bands, and one HDL band. We used kits in order to obtain seven LDL subfractions. The larger LDL-1 and LDL-2 subfractions were designated "Pattern A" (diameter > 26.50 nm) whereas the smaller and denser (from

LDL-3 to LDL-7) subfractions were designated "Pattern B" (diameter < 26.50 nm). The relative area for each LDL subfraction band was determined by the level of TC in each sample. The HDL kit allowed analyzing ten HDL subfractions, and the smallest of them had 8 to 10 bands. A typical HDL Lipoprint profile had one band containing LDL+VLDL, ten HDL bands, and one albumin band. The relative area for each HDL subfraction band was determined by the levels HDL-C in each sample. The inter assay variation coefficient was calculated for LDL_{small} (5.3%) and LDL_{large} (5.0%) subfractions.

Analysis of LDL(-). LDL(-) was detected by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) following a standardized protocol established by Faulin et al. (34). The plates (Costar®, Model 3690, Corning, New York, NY, USA) were sensitized with monoclonal anti-LDL(-) antibody (mAb-1A3; 10 µg/mL, 50 µL/well), diluted in carbonate-bicarbonate buffer (0.25 M, pH 9.6), and incubated (4 °C; overnight). The free sites in the wells were then blocked with 2% skim milk (Molico, Nestlé®, São Paulo, SP, Brazil) diluted in a solution containing phosphate-buffered saline (PBS; 0.01 mol/L; pH 7.4) and 0.01% Tween (PBS-Tween), and incubated (37 °C; 90 min). Then, the plates were washed with PBS-Tween (0.05%; three times). Thereafter, plasma (50 µL/well; diluted 1:1000 in 0.01% PBS-Tween) and 1% [skim, and the plates were incubated (37 °C; 90 min). After, the plate was washed as described above and the biotinylated monoclonal anti-LDL(-) antibody (mAb 2C7; 10 µg/mL, 50 µL) was added to each well. The plates were incubated (37 °C; 1 h) and washed as described above. After this step, streptavidin-horseradish peroxidase [conjugate] (1:100,000; 50 µL; diluted in PBS-Tween (0.01 %) and 1% milk) was added to each well. The plates were incubated (37 °C; 1 h), and washed again as described above. Color reaction was developed by adding the *ortho*-phenylenediamine (OPD) substrate diluted in citrate-phosphate buffer (0.1 M, pH 4.2) and 30% H₂O₂. The plates were incubated (37 °C; 10 min), the reaction was blocked with H₂SO₄ (2 M; 50 µL/well), and light absorption was monitored (λ = 490 nm). The results were expressed as the difference between the values for mean absorbance by the sample and absorbance by the blank, which was applied to the standard curve and multiplied by the corresponding dilution. A calibration curve was constructed for each plate, using LDL(-) as a standard (0.6-20 µg/mL). Electronegative LDL was extracted from human plasma by purification with FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). The results were expressed as U/L, and 1 unit is equivalent to 1.0 g/L of oxidized Apo B. The intra- and inter-assay variation coefficients were calculated (5.84 and 15.0%, respectively).

Statistical analyses. Statistical tests were performed by using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®; version 16.0; 2006; SPSS Incorporation, Chicago, IL, USA). The value for significance was set at $P < 0.05$. For qualitative variables, the results are shown as absolute values followed by their respective percentages. In order to determine the tests to be used, type of distribution of continuous variables was first evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test, ($P > 0.05$). Variables with normal distribution are presented as mean and standard deviation, and MANOVA tests were performed. For other variables, non-parametric tests such as those of Friedman and *post-hoc* Wilcoxon tests were used.

Bivariate correlation analysis was performed for parametric variables by Pearson's correlation coefficient and nonparametric variables by Spearman's correlation coefficient.

Analyses for categorical variables were performed using the McNemar test with the cut-off points adopted for APO AI, APO B, NEFA, and LDL(-). The highest quartile (Q4) was arbitrarily accepted as an adequate value.

Multiple linear regression was performed with models adjusted for age, gender, and smoking to evaluate the influence of changes in plasma levels of EPA+DHA on cardiovascular risk parameters.

Results

The main demographic and clinical characteristics of the subjects before w-3 intervention are shown in **Table 1**. Most participants were women with white skin and overweight (31 kg/m²), and their mean age ($\pm$ SD) was 52 $\pm$ 10 y. The subjects showed elevated prevalence of hypertension (56%), obesity (51%), and dyslipidemia (49%). Such profile was confirmed by drugs of continuous use as reported by them. Hypertension and diabetes mellitus were the major diseases reported in the family history.

No significant difference regarding the values for each anthropometric characteristic or body composition of subjects was observed throughout the intervention (**Table 2**).

Diet evaluation showed reduced consumption of carbohydrates ($P = 0.001$), monounsaturated ($P < 0.001$) and polyunsaturated ($P < 0.001$) fat, w-6 FA ($P = 0.001$), fibers ($P = 0.010$), and sodium ($P = 0.048$) after the intervention (**Table 3**).

Analysis of plasma FA shown in **Table 4** indicates higher levels of DHA (22:6; 4%) and α -linolenic acid (16:0; $P < 0.001$) after eight weeks of supplementation. On the other hand, linoleic acid (18:2) showed a significant decrease after 4 and 8 weeks of intervention ($P < 0.001$, for all). These changes were confirmed by reduction in the levels of plasma arachidonic acid (20:4; $P < 0.001$). This profile is reinforced by the percentage of capsules ingested during the intervention time (T4: 92%; T8: 91%).

TABLE 1 Demographic and clinical characteristics of subjects at basal time.

Variables	n	%
Age, y *	52	±10
Genders		
Men	28	36
women	49	63
BMI, kg/m² *	31	±6
Races		
White	54	70
Black	23	30
Smoking	16	21
Former smoker	21	27
No smoking	40	52
Comorbidities		
Pre-Diabetes Mellitus	5	7
Diabetes Mellitus	12	16
Hypertension	43	56
Dyslipidemia	38	49
Obesity	39	51
Drugs		
Statins	16	21
Antihypertensive	37	48
Hypoglycemiant	13	17
Fibrate	2	3
Blood Pressure, mm Hg *		
Systolic	134	±20
Diastolic	82	±11
Family history of disease		
Obesity	15	20
Hypertension	48	62
Myocardial infarction	26	34
Stroke	16	21
Diabetes Mellitus	29	38
PVD	6	8
Regular physical activity *	7	±2

BMI: body mass index; **PVD:** peripheral vascular disease. * The values are mean ± SD. The values are number of subjects in the sample (n) and percentage (%) of total.

TABLE 2 Anthropometric characteristics and body composition of subjects included in the study throughout the intervention.

Variables	Duration of w-3 intervention			P
	T0	T4	T8	
[Body] weight, <i>kg</i>	82.4 ± 18.7	82.9 ± 18.8	82.9 ± 18.9	0.984
BMI, <i>kg/m²</i>	30.7 ± 6.2	31.0 ± 6.1	31.0 ± 6.3	0.985
WC, <i>cm</i>	99.9 ± 1.3	99.9 ± 1.2	99.8 ± 1.3	0.881
FM, %	36.4 ± 12.0	36.4 ± 12.0	36.3 ± 11.7	0.998

BMI: body mass index; **FM:** fat mass; **WC:** waist circumference. Analyses by MANOVA to evaluate the effect of time. Values are mean ± SD. Level of significance ($P < 0.05$).

TABLE 3 Diet profile evaluated by 24-h recall, by intervention time.

Nutrients	Duration of w-3 intervention			p
	T0	T4	T8	
Energy, <i>kcal</i>	1660.14 ± 481.94	1644.66 ± 393.87	1603.54 ± 417.45	0.704
Proteins, <i>g</i>	72.56 ± 14.88	73.82 ± 12.29	73.43 ± 14.03	0.845
Carbohydrates, <i>g</i>	222.50 ± 27.51	217.26 ± 29.34	204.27 ± 32.17 ^{*,**}	0.001
Total fat, <i>g</i>	52.68 ± 11.26	49.65 ± 15.44	53.40 ± 8.87	0.130
Cholesterol, <i>mg</i>	214.35 ± 110.75	225.78 ± 85.69	217.94 ± 57.70	0.299
SAFA, <i>g</i>	17.84 ± 4.85	16.60 ± 4.48	16.94 ± 3.84	0.243
MUFA, <i>g</i>	16.60 ± 4.48	13.65 ± 3.62 [*]	14.21 ± 3.08 [*]	<0.001
Oleic acid, <i>g</i>	9.22 ± 3.40	9.51 ± 2.51	9.76 ± 2.41	0.489
PUFA, <i>g</i>	5.78 ± 1.98	7.07 ± 2.34 [*]	5.89 ± 1.51 ^{**}	<0.001
w-6, <i>g</i>	3.85 ± 1.5	4.16 ± 1.54	3.32 ± 0.90 ^{*,**}	0.001
Linoleic acid, <i>g</i>	3.89 ± 1.60	4.16 ± 1.54	4.11 ± 1.11	0.464
w-3, <i>g</i>	0.59 ± 0.26	0.64 ± 0.39	0.63 ± 0.24	0.345
EPA, <i>g</i>	0.04 ± 0.05	0.03 ± 0.06	0.05 ± 0.05 ^{**}	0.003
DHA, <i>g</i>	0.10 ± 0.11	0.09 ± 0.09	0.14 ± 0.10 ^{*,**}	0.002
Fibers, <i>g</i>	15.77 ± 4.54	15.95 ± 3.63	14.14 ± 3.86 ^{*,**}	0.010
Sodium, <i>mg</i>	2232.20 ± 511.54	2309.62 ± 325.98	2136.11 ± 446.03 ^{**}	0.048

DHA: docosahexaenoic acid; **EPA:** eicosapentaenoic acid; **MUFA:** monounsaturated fatty acids; **PUFA:** polyunsaturated fatty acids; **SAFA:** saturated fatty acids; **FA:** fatty acid. Results are mean ± SD. Variables with normal distribution were analyzed by MANOVA and non-parametric variables were analyzed by the Friedman and *post-hoc* Wilcoxon tests. ^{*}T8 vs T0 or T4 vs T0: $P < 0.05$; ^{**} T8 vs T4: $P < 0.05$.

TABLE 4 Fatty acid composition of plasma lipids, by intervention time.

Fatty acids (%)	Duration of w-3 intervention			<i>P</i>
	T0	T4	T8	
22:6	6.9 ± 3.8	10.4 ± 4.7*	11.6 ± 6.0*	<0.001
20:5	3.1 ± 3.9	5.4 ± 8.6	4.4 ± 8.6	0.161
18:2	32.6 ± 10.6	28.9 ± 10.5*	29.7 ± 13.1*	<0.001
18:3	1.3 ± 1.8	2.0 ± 2.3*	1.9 ± 1.8*	<0.001
16:0	6.7 ± 5.6	7.6 ± 9.2	7.1 ± 4.0**	0.048
20:4 + 16:1	21.4 ± 9.9	16.2 ± 5.5*	17.2 ± 7.7*	0.001
18:1	22.3 ± 13.6	16.6 ± 9.4*	13.8 ± 6.9*	<0.001
18:0	4.0 ± 7.2	5.4 ± 10.6	4.6 ± 5.6	0.989
22:6 + 20:5	10.0 ± 5.1	15.8 ± 8.3	15.9 ± 9.3	0.720
22:6 + 20:5 + 18:3	11.3 ± 6.0	17.9 ± 9.6	17.9 ± 10.2	0.623

22:6: docosahexaenoic acid (DHA); 20:5: eicosapentaenoic acid; 18:2: linoleic acid; 18:3: α -linolenic acid; 16:0: palmitic acid; 20:4 + 16:1: araquidonic + palmitoleic acid; 18:1: oleic acid; 18:0: stearic acid. Results are shown mean $\pm$ SD. Variables with normal distribution were analyzed by MANOVA and non-parametric variables were analyzed using the Friedman and *post-hoc* Wilcoxon tests. *T8 vs T0 or T4 vs T0: $P < 0.05$; ** T8 vs T4: $P < 0.05$.

The biochemical and oxidative profile throughout w-3 intervention is shown in **Table 5**. After 4 and 8 weeks of intervention, the w-3 supplementation was associated with a significant decrease in TG ($P < 0.001$), TC ($P = 0.002$), LDL-C ($P = 0.003$), the TG/HDL-C, TC/HDL-C, LDL-C/HDL-C, LDL-C/APO B ratios, and non-HDL-C ($P < 0.001$ for all). Conversely, w-3 intervention was associated with an increase in HDL-C ($P = 0.003$) and the HDL-C/Apo AI ratio ($P < 0.001$). After supplementation of w-3 FA, significant increase in the HDL_{large} and HDL_{intermediate} ($P < 0.001$ for all) subfractions and decrease in HDL_{small} ($P = 0.011$) were observed after 8 weeks of intervention. The levels of LDL(-) decreased after intervention ($P < 0.001$). The levels of NEFA, LDL_{large}, and Pattern B showed a decrease, and Apo AI, Apo B, Apo B/Apo AI ratio, LDL_{small}, and Pattern A showed an increase. However, these changes were not statistically significant. The size of LDL particles remained unchanged after intervention.

Table 6 shows that there was a decrease in the number of individuals with hypercholesterolemia (TC ≥ 200 mg/dL) ($P = 0.003$), decreased number of subjects with hypertriglyceridemia (TG ≥ 150 mg/dL) ($P = 0.008$) and increased the number of women with HDL-C ≥ 50 mg/dL ($P = 0.003$).

Table 7 shows that increased values for plasma EPA+DHA were associated to a higher content of HDL_{large} ($P = 0.041$) and decreased HDL_{intermediate} ($P = 0.007$) and LDL(-) ($P = 0.004$).

TABLE 5 Biochemical, oxidative, and physical characterization of lipoproteins, by intervention time.

Duration of w-3 intervention				
Variables	T0	T4	T8	P
TG, mg/dL	143 ± 81	106 ± 54 *	108 ± 54 *	<0.001
TC, mg/dL	204 ± 37	186 ± 39 *	187 ± 38 *	0.002
LDL-C, mg/dL	138 ± 36	120 ± 36 *	124 ± 36 *	0.003
HDL-C, mg/dL	38 ± 11	45 ± 11 *	41 ± 11	0.003
TG/HDL-C	4.4 ± 3.5	2.7 ± 1.9 *	2.9 ± 2.1 *	<0.001
CT/HDL-C	5.8 ± 1.9	4.4 ± 1.3 *	4.7 ± 1.4 *,**	<0.001
LDL-C/HDL-C	4.0 ± 1.5	2.9 ± 1.1 *	3.2 ± 1.2 *,**	<0.001
Non-HDL-C, mg/dL	167 ± 37	141 ± 38 *	146 ± 37 *	<0.001
NEFA, mEq/L	0.69 ± 0.3	0.62 ± 0.3	0.63 ± 0.3	0.362
Apo AI, mmol/L	131.2 ± 26.1	137.5 ± 27.0	139.0 ± 28.1	0.109
Apo B, mmol/L	103.9 ± 22.3	110.3 ± 27.5	109.7 ± 25.8	0.157
HDL-C/Apo AI	0.29 ± 0.1	0.32 ± 0.1 *	0.31 ± 0.1	<0.001
LDL-C/Apo B	1.4 ± 0.3	1.1 ± 0.2 *	1.2 ± 0.3 *	<0.001
Apo B/Apo AI	0.81 ± 0.2	0.82 ± 0.2	0.82 ± 0.2	0.861
LDL _{LARGE} , mg/dL	54.2 ± 16.6	53.3 ± 15.8	53.3 ± 16.3	0.829
LDL _{SMALL} , mg/dL	5.9 ± 9.9	4.8 ± 5.3	6.4 ± 9.0	0.731
LDL size, nm	26.9 ± 0.6	27.0 ± 0.4	26.9 ± 0.5	0.308
Pattern A, n (%)	20 (26)	21 (27)	26 (34)	0.630
Pattern B, n (%)	57 (74)	56 (73)	51 (66)	0.828
HDL _{LARGE} , mg/dL	11.5 ± 5.5	15.6 ± 7.2 *	14.8 ± 6.7 *	<0.001
HDL _{INTERMEDIATE} , mg/dL	18.5 ± 4.6	21.2 ± 4.2 *	19.8 ± 4.5 *,**	<0.001
HDL _{SMALL} , mg/dL	7.5 ± 3.3	8.1 ± 2.9	6.9 ± 2.2 **	0.011
LDL(-), U/L	6.6 ± 7.9	5.0 ± 6.1 *	5.1 ± 4.9 *	<0.001

Quantitative variables are shown as mean ± SD, and categorical variables are shown in absolute numbers and percentage. Variables with normal distribution were analyzed by MANOVA and non-parametric variables were analyzed by the Friedman and *post-hoc* Wilcoxon test. *T8 vs T0 or T4 vs T0: $P < 0.05$; ** T8 vs T4: $P < 0.05$.

Table 6. Impact w-3 FA supplementation on classification of biochemical and physical parameters, by intervention time.

Variables	T0 (n/%)	T8 (n/%)	Interaction <i>P</i>
BMI, kg/m²			
< 30	38 (49)	38 (49)	1.000
≥ 30	39 (51)	38 (49)	
Glucose, mg/dL			
< 100	46 (60)	48 (62)	0.804
≥ 100	31 (40)	29 (38)	
BPS, mm Hg			
< 130	38 (49)	44 (57)	0.210
≥ 130	39 (51)	33 (43)	
BPD, mm Hg			
< 85	51 (66)	59 (77)	0.057
≥ 85	26 (34)	18 (23)	
TC, mg/dL			
< 200	34 (44)	49 (64)	0.003
≥ 200	43 (56)	28 (36)	
TG, mg/dL			
< 150	52 (68)	64 (83)	0.008
≥ 150	25 (33)	13 (17)	
HDL-C, mg/dL (women)			
< 50	43 (88)	32 (65)	0.003
≥ 50	6 (12)	17 (35)	
HDL-C, mg/dL (men)			
< 40	25 (89)	23 (82)	0.687
≥ 40	3 (11)	5 (18)	
LDL-C, mg/dL			
< 160	59 (77)	65 (84)	0.238
≥ 160	18 (23)	12 (16)	
Apo AI, mmol/L *			
< 151	61 (79)	61 (79)	1.000
≥ 151	16 (21)	16 (21)	
Apo B, mmol/L *			
< 124	63 (82)	61 (79)	0.549
≥ 124	13 (17)	16 (21)	
NEFA, mEq/L *			
< 0.762	48 (62)	51 (66)	0.481
≥ 0.763	24 (31)	19 (25)	
LDL size, nm			
< 26.5	10 (13)	13 (17)	0.508
≥ 26.5	67 (87)	64 (83)	
LDL(-), U/L *			
< 16.6	53 (69)	54 (70)	0.727
≥ 16.6	23 (30)	21 (27)	

BMI: Body mass index; **BPD:** Blood Pressure diastolic; **BPS:** Blood Pressure systolic. Analyses of categorical variables were performed using the McNemar test. Cut-off points (* percentile 75) were adopted for Apo AI, Apo B, NEFA, and LDL(-). Significance: *P* < 0.05.

Table 7. Multiple linear regression models for influence of change (Δ T8-T0) in plasma EPA+DHA on cardiovascular risk parameters.

Change in variables	Adjusted Model ^a		
	β	<i>P</i>	CI (95%)
Δ HDL _{LARGE} , mg/dL	0.106	0.041	0.004; 0.208
Δ HDL _{INTERMEDIATE} , %	-0.166	0.007	-0.286; -0.047
Δ HDL _{SMALL} , mg/dL	0.017	0.692	-0.068; 0.102
Δ LDL(-), U/L	-1.23	0.004	-0.316; -0.095

^aModels adjusted for age, gender, and smoking ($P < 0.05$).

Discussion

Supplementation of w-3 FA promoted changes in the lipid profile, LDL(-) level, and HDL size, thus contributing to a less atherosclerotic phenotype.

The association between action of w-3 FA and TG metabolism in biological systems is well described (35). However, the mechanism by which w-3 FA reduces the levels of TG is not clear. The main possible mechanisms are described as follows: (1) increased expression of lipoprotein lipase (LPL) (36), (2) reduced production of VLDL (37,38), (3) decreased availability of FA, which could be secondary to an increase in beta-oxidation, or reduction in the availability of NEFA to the liver, or yet inhibition of lipogenesis, (4) decreased enzymatic activity of either diacylglycerol acyltransferase (DGAT) or phosphatidic acid phosphatase (PAP), or (5) increased synthesis of phospholipids, which could deviate PAP from diacylglycerol via DGAT (39,40). These mechanisms were not investigated in the present study. However, supplementation with w-3 FA (3 g/d) was able to reduce 25% of plasma TG after 8 weeks.

In addition, our results showed that diet supplementation with w-3 FA caused a significant reduction in the levels of TC and LDL-C, and increased the levels of HDL-C. These changes reinforce the idea that w-3 FA have a role in lipid transfer between lipoprotein particles in direction of a less atherogenic profile. According to Abbey et al. (41), this beneficial action of w-3 FA is associated with their inhibitory role on the activity of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) (41). The increased intracellular degradation of Apo B in hepatocytes, leading to a decrease in VLDL production and decreased levels of circulating NEFA, has also been investigated (39). In the present study, the levels of Apo B, Apo AI, and NEFA remained, however, unchanged after the intervention. Such profile indicates that w-3 FA act mainly on lipid transfer.

Nestel et al. (42) was one of the first authors who related w-3 FA supplementation with a better and less atherogenic profile of LDL. Later, Suzukawa et al. (43) showed that supplementation with w-3 FA (3-4 g/day; 6 weeks) promoted an increase in LDL size by reducing the levels of triglycerides. Although our results did not confirm these results, we have observed a positive impact of supplementation with w-3 FA on the levels of TG. Furthermore, our results also showed that w-3 FA supplementation did not change the LDL phenotype B to A. However the levels of anti-atherogenic particles showed a slight increase after intervention. According to Suzukawa et al. (43), LDL size is under a direct influence of balance between TG and TC associated with LDL and HDL, respectively. Enrichment of LDL particles with TG stimulates LPL activity, resulting in the formation of smaller LDL particles. Thus, reduction in plasma TG, as a result of supplemental w-3 FA, could decrease the TG content in LDL particles leading to an increase in their size (43). De Graaf et al. (44) described that smaller LDL particles are more susceptible to oxidation than larger ones, and an increase in size of this particle after supplementation with w-3 FA can contribute to reduce their atherogenic risk. It is noteworthy that supplementation with w-3 FA promoted a reduction in LDL(-) levels, and this decrease was negatively associated with plasma EPA+DHA in the present study. However, LDL(-) has been associated with small dense LDL (45), and the same authors concluded that LDL(-) subfraction have a complex and multiple origin (45). Therefore, action of w-3 FA on LDL(-) generation could be related to its paradoxical protective role in LDL oxidation of these FA (especially DHA) (46,47) in addition to their role in lipid metabolism.

The results presented in this study amplify the role of w-3 FA showing significant changes in the size of HDL particles. Pownall et al. (48) showed that w-3 FA intensify conversion of VLDL to LDL, accelerating the catabolism of rich-TG particles and reducing CETP activity. These events contribute to transfer cholesterol from HDL_{small} to HDL_{large} subfraction (49). Our results have shown a significant reduction in the levels of HDL_{small}, and an increase in the levels of HDL_{large} and HDL_{intermediate} after supplementation with w-3 FA. HDL_{large} subfraction have been associated with a more efficient cholesterol reverse transport and cardioprotective profile (50). Previously, Annuzzi et al. (51) observed that w-3 FA were associated with HDL_{LARGE} subfraction. However, our study showed not only increased levels of HDL_{large} and HDL_{intermediate} but also decreased levels of HDL_{small} and LDL(-) subfractions. Recently, we showed an increase in the levels of HDL_{LARGE} and LDL_{LARGE} subfractions, as detected by nuclear magnetic resonance, in subjects who consumed (1 y) nuts, a rich source of linolenic acid (52). Studies with plant n-3 FA have identified changes in the profile of lipoprotein subclasses and size

of LDL particles (53,54). These results show that w-3 FA from animal and vegetable origins has a cardioprotective action.

We emphasize that the w-3 FA used in this study had a high content (60%) of EPA+DHA, which was obtained from ultra-purified fish oil. The consumption recommended during the present intervention provided 1.8 g/d of EPA+DHA, a level much higher than that found in a usual Western diet (0.1-0.2 g/d) or in typical commercial supplements (usually 30% EPA+DHA). Therefore, regarding dairy recommendation to primary prevention, we suggest three different diet strategies for population: (I) intake of 2 to 3 servings of fish (especially tuna, salmon, and sardines) per week, (II) supplementation with w-3 FA, and consumption of (III) vegetal foods rich in linolenic acid.

Conclusion

Our study showed that dietary supplementation with EPA+DHA-rich w-3 FA participates in multiple and advantageous cardioprotective mechanisms. Through them, lipid metabolism (low levels of TG, TC, and LDL, and high levels of HDL), oxidative modification of LDL [LDL(-)] and HDL particles (low levels of HDL_{small} and high levels of HDL_{large} and HDL_{intermediate}) give a cardioprotective profile in primary prevention of subjects with high cardiovascular risk factors.

Literature Cited

1. World Health Organization (2011) World Health Statistics. Report. Geneva.
2. Serhan C. Systems approach to inflammation resolution: identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *J Thromb and Haemostasis*. 2009;7(s1):44-8.
3. Wang Q, Liang X, Wang L, Lu X, Huang J, Cao J, et al. Effect of omega-3 fatty acids supplementation on endothelial function: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis*. 2012;221(2):536-43.
4. Hirai A, Terano T, Hamazaki T, Sajiki J, Kondo S, Ozawa A, et al. The effects of the oral administration of fish oil concentrate on the release and the metabolism of [¹⁴C] arachidonic acid and [¹⁴C] eicosapentaenoic acid by human platelets. *Thrombosis Res*. 1982;28(3):285-98.
5. Tamura Y, Hirai A, Terano T, Takenaga M, Saitoh H, Tahara K, et al. Clinical and epidemiological studies of eicosapentaenoic acid (EPA) in Japan. *Progr Lipid Res*. 1986;25:461-6.
6. Kawano H, Yano T, Mizuguchi K, Mochizuki H, Saito Y. Changes in aspects such as the collagenous fiber density and foam cell size of atherosclerotic lesions composed of foam cells, smooth muscle cells and fibrous

components in rabbits caused by all-cis-5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid. *J Ather Thromb*. 2002;9(4):170-177.

7. Geleijnse JM, Giltay EJ, Grobbee DE, Donders AR, Kok FJ. Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *J Hypertens*. 2002;20(8):1493-9.
8. Theobald HE, Goodall AH, Sattar N, Talbot DC, Chowienczyk PJ, Sanders TA. Low-dose docosahexaenoic acid lowers diastolic blood pressure in middle-aged men and women. *J Nutr*. 2007;137(4):973-8.
9. Chen J, Shearer GC, Chen Q, Healy CL, Beyer AJ, Nareddy VB, et al. Omega-3 fatty acids prevent pressure overload-induced cardiac fibrosis through activation of cyclic GMP/protein kinase G signaling in cardiac fibroblasts. *Circulation*. 2011;123(6):584-93.
10. Mozaffarian D, Geelen A, Brouwer IA, Geleijnse JM, Zock PL, Katan MB. Effect of fish oil on heart rate in humans a meta-analysis of randomized controlled trials. *Circulation*. 2005;112(13):1945-52.
11. Din JN, Newby DE, Flapan AD. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease - fishing for a natural treatment. *BMJ*. 2004;328(7430):30-5.
12. Hermansson A, Ketelhuth DF, Strodtzoff D, Wurm M, Hansson EM, Nicoletti A, et al. Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. *J Exper Med*. 2010;207(5):1081-93.
13. Avogaro P, Bon GB, Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1988;8(1):79-87.
14. Chang YH, Abdalla DS, Sevanian A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997;23(2):202-14
15. Sanchez-Quesada JL, Benítez S, Ordóñez-Llanos J. Electronegative low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol*. 2004;15(3):329-35.
16. de Queiroz Mello AP, da Silva IT, Oliveira AS, Nunes VS, Abdalla DSP, Gidlund M, et al. Electronegative low-density lipoprotein is associated with dense low-density lipoprotein in subjects with different levels of cardiovascular risk. *Lipids*. 2010;45(7):619-25.
17. Wang C, Harris WS, Chung M, Lichtenstein AH, Balk EM, Kupelnick B, et al. n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary-and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(1):5-17.
18. Rizos EC, Ntzani EE, Bika E, Kostapanos MS, Elisaf MS. Association Between Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Risk of Major Cardiovascular Disease Events: A Systematic Review and Meta-analysis. *Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease. JAMA*. 2012;308(10):1024-33.

19. Roncaglioni M, Tombesi M, Avanzini F, Barlera S, Caimi V, Longoni P, et al. Risk and Prevention Study Collaborative Group (2013). n-3 fatty acids in patients with multiple cardiovascular risk factors. *N Engl J Med*.368:1800-8.
20. D'Agostino Sr RB, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care. *Circulation*. 2008;117(6):743-53.
21. Mosca L, Benjamin EJ, Berra K, Bezanson JL, Dolor RJ, Lloyd-Jones DM, et al. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women - 2011 update: a guideline from the American Heart Association. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(12):1404-23.
22. Nimura N, Kinoshita T. Fluorescent labeling of fatty acids with 9-anthryldiazomethane (ADAM) for high performance liquid chromatography. *Analyt Letters*. 1980;13(3):191-202.
23. Miyamoto S, Dupas C, Murota K, Terao J. Phospholipid hydroperoxides are detoxified by phospholipase A2 and GSH peroxidase in rat gastric mucosa. *Lipids*. 2003;38(6):641-9.
24. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual: Human Kinetics Books Champaign; 1988.
25. Baecke J, Burema J, Frijters J. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr*. 1982;36(5):936-42.
26. Florindo AA, Latorre MRD. Validation and reliability of the Baecke questionnaire for the evaluation of habitual physical activity in adult men. *Rev Bras Medicina do Esporte*. 2003;9(3):129-35.
27. Johnson RK, Driscoll P, Goran MI. Comparison of multiple-pass 24-hour recall estimates of energy intake with total energy expenditure determined by the doubly labeled water method in young children. *J Am Diet Assoc*. 1996;96(11):1140-4.
28. Guenther PM 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. Department of Agriculture Research Service Nationwide Food Surveys Report No. 96-1. Beltsville, MD: United States Department of Agriculture, 1998.
29. The Food Processor Software [software em CD-ROM]. Version 10.11.0. Salem (OR): ESHA Research, 2012.
30. The Multiple Source Method (MSM) [software in internet]. Version 1.0.1. Potsdam: Department of Epidemiology of the German Institute of Human Nutrition; 2008-2011.

31. Willet W, Stampfer M. Implications of total energy intake for epidemiologic analyses. *Nutritional epidemiology*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1998.
32. Mackerras D. Energy adjustment: the concepts underlying the debate. *J Clin Epidemiol*. 1996;49(9):957-62.
33. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499-502.
34. Faulin S, do Espirito T, de Sena KCM, Rodrigues Telles AE, de Mattos Grosso D, Bernardi Faulin EJ, et al. Validation of a novel ELISA for measurement of electronegative low-density lipoprotein. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(12):1769-75.
35. Shearer GC, Savinova OV, Harris WS. Fish oil - how does it reduce plasma triglycerides? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molec Cell Biol Lipids*. 2011. [1821(5): 843-51]
36. Park Y, Harris WS. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *J Lipid Res*. 2003;44(3):455-63.
37. Harris WS, Miller M, Tighe AP, Davidson MH, Schaefer EJ. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis*. 2008;197(1):12-20.
38. Chan DC, Watts GF, Barrett PHR, Beilin LJ, Mori TA. Effect of atorvastatin and fish oil on plasma high-sensitivity C-reactive protein concentrations in individuals with visceral obesity. *Clin Chem*. 2002;48(6):877-83.
39. Harris WS, Bulchandani D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Current Opinion in Lipidology*. 2006;17(4):387-93.
40. Fisher EA, Pan M, Chen X, Wu X, Wang H, Jamil H, et al. The triple threat to nascent apolipoprotein B Evidence for multiple, distinct degradative pathways. *J Biol Chem*. 2001;276(30):27855-63.
41. Abbey M, Clifton P, Kestin M, Belling B, Nestel P. Effect of fish oil on lipoproteins, lecithin: cholesterol acyltransferase, and lipid transfer protein activity in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1990;10(1):85-94.
42. Nestel P, Connor W, Reardon M, Connor S, Wong S, Boston R. Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. *J Clinl Investig*. 1984;74(1):82-89.
43. Suzukawa M, Abbey M, Howe P, Nestel PJ. Effects of fish oil fatty acids on low density lipoprotein size, oxidizability, and uptake by macrophages. *J Lipid Res*. 1995;36(3):473-84.
44. de Graaf J, Hak-Lemmers H, Hectors M, Demacker P, Hendriks J, Stalenhoef A. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low

density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1991;11(2):298-306.

45. Mello APQ, da Silva IT, Abdalla DSP, Damasceno NRT. Electronegative low-density lipoprotein: origin and impact on health and disease. *Atherosclerosis.* 2011;215(2):257-65.
46. Mesa MD, Buckley R, Minihane AM, Yaqoob P. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on the oxidizability and thrombogenicity of low-density lipoprotein. *Atherosclerosis.* 2004;175(2):333-43.
47. Calzada C, Colas R, Guillot N, Guichardant M, Laville M, Véricel E, et al. Subgram daily supplementation with docosahexaenoic acid protects low-density lipoproteins from oxidation in healthy men. *Atherosclerosis.* 2010;208(2):467-72.
48. Pownall HJ, Brauchi D, Kiliç C, Osmundsen K, Pao Q, Payton-Ross C, et al. Correlation of serum triglyceride and its reduction by ω -3 fatty acids with lipid transfer activity and the neutral lipid compositions of high-density and low-density lipoproteins. *Atherosclerosis.* 1999;143(2):285-97.
49. Wooten JS, Biggerstaff KD, Ben-Ezra V. Responses of LDL and HDL particle size and distribution to omega-3 fatty acid supplementation and aerobic exercise. *J Applied Physiol.* 2009;107(3):794-800.
50. Yvan-Charvet L, Wang N, Tall AR. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(2):139-43.
51. Annuzzi G, Rivellese AA, Wang H, Patti L, Vaccaro O, Riccardi G, et al. Lipoprotein subfractions and dietary intake of n-3 fatty acid: the Genetics of Coronary Artery Disease in Alaska Natives study. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(6):1315-22.
52. Damasceno NR, Sala-Vila A, Cofán M, Pérez-Heras AM, Fitó M, Ruiz-Gutiérrez V, et al. Mediterranean diet supplemented with nuts reduces waist circumference and shifts lipoprotein subfractions to a less atherogenic pattern in subjects at high cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* 2013;230(2):347-53.
53. Almario RU, Vonghavaravat V, Wong R, Kasim-Karakas SE. Effects of walnut consumption on plasma fatty acids and lipoproteins in combined hyperlipidemia. *Am J Clin Nutr.* 2001;74(1):72-9.
54. Lamarche B, Desroches S, Jenkins DJ, Kendall CW, Marchie A, Faulkner D, et al. Combined effects of a dietary portfolio of plant sterols, vegetable protein, viscous fibre and almonds on LDL particle size. *Brit J Nutr.* 2004;92(4):657-64.