

Universidade de São Paulo

Faculdade de Saúde Pública

Departamento de Nutrição

**Biomarcadores do consumo de EPA e DHA e sua associação com  
marcadores inflamatórios em indivíduos adultos**

Aluno: Gustavo Henrique Ferreira Gonçalves

NºUSP: 8035146

Orientadora:

Professora Doutora Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Trabalho de Conclusão do Curso de

Bacharelado em Nutrição

São Paulo, 2016

**Biomarcadores do consumo de EPA e DHA e sua associação com  
marcadores inflamatórios em indivíduos adultos**

Aluno: Gustavo Henrique Ferreira Gonçalinho

NºUSP: 8035146

Orientadora:

Professora Doutora Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Trabalho de Conclusão do Curso de  
Bacharelado em Nutrição

São Paulo, 2016

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

## RESUMO

**Introdução:** As doenças cardiovasculares são a maior causa de mortalidade no Brasil e no mundo, e estas doenças têm como principal fator de risco modificável o estilo de vida. Os ácidos graxos poli-insaturados EPA e DHA plasmáticos têm sido associados a melhores parâmetros inflamatórios cardiometabólicos. **Objetivo:** Considerando o potencial anti-inflamatório do EPA, do DHA e de seus metabólitos, o objetivo do presente estudo foi associar os biomarcadores de consumo de EPA e DHA, individualmente e somados, com marcadores inflamatórios em indivíduos adultos. **Métodos:** A partir de uma subamostra do estudo CARDIONUTRI (estudo clínico, randomizado, controlado e duplo-cego com seguimento de 8 semanas) foi realizado um corte transversal, selecionando 291 indivíduos de todos os grupos no período basal (t0). Foram monitorados o perfil clínico e antropometria. Amostras de sangue foram coletadas após 12 horas de jejum para avaliação do perfil lipídico, glicídico e inflamatório. Foi feita estratificação dos indivíduos em dois grupos, segundo a mediana, para as variáveis de EPA e DHA plasmáticos isolados. Já para o índice ômega-3 plasmático (EPA e DHA plasmáticos somados) foi utilizado como ponte de corte o valor 8%. Para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o programa estatístico SPSS v20.0. **Resultados:** DHA associou-se negativamente com TG e positivamente com HDL pequena e grande, tamanho de LDL e com leptina. EPA associou-se negativamente com HDL, Apo A-I, tamanho de LDL, índice HOMA-IR, insulinemia e positivamente com LDL pequena e TNF- $\alpha$ . O índice  $\omega$ -3 se associou positivamente com HDL grande e LDL modificada, e negativamente com índice HOMA-IR, insulinemia, IL-7 e IL-10. Nas correlações lineares realizadas, o EPA plasmático correlacionou-se positivamente de modo fraco com a razão TG/HDL e com a concentração relativa e absoluta de LDL pequena, e correlacionou-se negativamente de modo fraco com o tamanho de LDL e insulinemia. Já o DHA plasmático correlacionou-se positivamente de modo fraco com a concentração absoluta de HDL grande e com o tamanho de LDL, e negativamente de modo fraco com TG, glicemia, razão TG/HDL, concentrações absoluta e relativa de LDL pequena e o índice HOMA-IR. O índice ômega-3 correlacionou-se positivamente de modo fraco com LDL modificada e negativamente de modo fraco com o índice HOMA-IR, IL-7, IL-10 e insulinemia. Nas correlações parciais, os principais resultados de EPA foram as correlações fortemente positivas com Apo A-I, com LDL grande e com HDL grande. Já o DHA teve correlações fortemente positivas com adiponectina e tamanho de LDL e correlações fortemente negativas com TG, LDL pequena e índice HOMA-IR. O índice ômega-3 apresentou correlações fortemente positivas com Apo A-I, adiponectina e HDL grande. **Conclusão:** Concentrações mais altas de EPA e/ou DHA trazem benefícios cardiometabólicos, principalmente pela redução de TG, aumento da sensibilidade à insulina e aumento de HDL.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Aspectos epidemiológicos e fatores de risco para doenças cardiovasculares.....	1
1.2. Fisiopatologia da aterosclerose.....	1
1.3. Ácidos graxos poli-insaturados $\omega$ -3 e doenças cardiovasculares.....	3
1.4. Efeitos isolados do ácido docosahexaenoico nas doenças cardiovasculares.....	5
1.5. Efeitos isolados do ácido eicosapentaenoico nas doenças cardiovasculares.....	7
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>9</b>
3.1. Casuística.....	9
3.2. Amostra.....	10
3.3. Avaliações clínica e antropométrica.....	10
3.4. Avaliações bioquímicas.....	12
3.4.1. Coleta de sangue.....	12
3.4.2. Determinação do perfil lipídico e de apolipoproteínas.....	12
3.4.3. Determinação do tamanho das lipoproteínas LDL e HDL.....	12
3.4.4. Determinação da concentração de LDL modificada.....	13
3.4.5. Determinação da concentração de autoanticorpos anti-LDL(-).....	14
3.4.6. Análise da composição de ácidos graxos plasmáticos.....	14
3.4.7. Determinação da adiponectina sérica.....	15
3.4.8. Determinação da leptina sérica.....	15
3.4.9. Determinação da glicose, insulina e índice de resistência à insulina (HOMA-IR).....	16
3.4.10. Determinação da concentração de citocinas e quimiocinas.....	16

3.5. Análises estatísticas.....	16
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>27</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos epidemiológicos e fatores de risco para doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem um grupo de doenças inter-relacionadas que inclui a doença arterial coronariana (DAC), aterosclerose, hipertensão arterial, doença cardíaca isquêmica, doença vascular periférica e insuficiência cardíaca (IC). As DCV são a maior causa de mortalidade no mundo, representando 31% das mortes em 2008 (17,5 milhões), e também no Brasil, representando 29,4% dos óbitos em 2006 (302.682) (AHA, 2014; MDS, 2009; SBC, 2010; IOM, 2010; WHO, 2011). As DCV são doenças de complexa etiologia multifatorial, cujos principais fatores de risco incluem hereditariedade, gênero masculino, tabagismo, hipertensão, obesidade e sedentarismo. Do ponto de vista bioquímico, os maiores fatores de risco são a concentração plasmática elevada de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de triacilgliceróis, e baixo conteúdo de colesterol associado à lipoproteínas de alta densidade (HDL). O diabetes também é um importante fator de risco, uma vez que o risco de DAC é de 3 a 5 vezes maior nesse grupo, ainda que outros fatores de risco conhecidos estejam controlados. A coexistência de fatores de risco causa maior efeito que o somatório, e, de fato, esse impacto é geralmente sinérgico (AHA, 2014; SBC, 2010; IOM, 2010; WHO, 2011). A DAC é a doença cardiovascular que tem a maior causa de mortes no mundo e é a segunda DCV que mais causa de mortes no Brasil (90.604 – 8,8% do total de óbitos), sendo que a primeira é o acidente vascular encefálico (96.530 – 9,4% do total de óbitos) (MDS, 2009; WHO, 2011)

O termo DAC descreve a doença cardíaca causada pelo impedimento ao fluxo sanguíneo coronariano normal. Na maioria dos casos, a DAC é causada por aterosclerose, o que afeta não somente as artérias coronárias, mas também artérias em outras áreas do corpo. As DAC podem causar isquemia do miocárdio e angina, infarto do miocárdio ou ataque cardíaco, arritmias cardíacas, defeitos de condução, insuficiência cardíaca e morte súbita. A aterosclerose é, de longe, a causa mais comum de DAC, sendo seu desenvolvimento um processo crônico, que pode demandar décadas até sua primeira manifestação clínica (Porth & Matfin, 2010).

### 1.2. Fisiopatologia da aterosclerose

O termo *aterosclerose*, que vem das palavras gregas *atheros* (“sopa” ou “pasta”) e *sclerosis* (“dureza”), denota a formação de lesões fibrogordurosas a partir de um processo inflamatório crônico no revestimento da túnica íntima das artérias de grande e médio calibres (Porth & Matfin, 2010). A disfunção endotelial é o principal mecanismo de base, caracterizado pela alteração da função

endotelial, aumento da expressão de moléculas de adesão e comprometimento das respostas vasodilatadoras (Porth & Matfin, 2010).

Aproximadamente 70% das lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) são removidas da corrente sanguínea através da via dependente de receptores para LDLs (aproximadamente 75% dos receptores estão localizados nos hepatócitos) e o resto é removido pela via fagocítica, envolvendo a captação das LDLs por monócitos e macrófagos, via receptores scavengers (LOX-1, LOX-2, CD36) (Porth & Matfin, 2010). Na presença de disfunção endotelial, o processo inflamatório local cria um microambiente favorável à internalização das partículas de LDL. Neste ambiente, os componentes superficiais da LDL (*i. e.*, fosfolípídeos, colesterol, apo B-100) na presença de radicais livres e reduzido conteúdo antioxidante, podem ser modificados. A LDL oxidada possui vários efeitos diretos sobre as células endoteliais, incluindo a redução na viabilidade endotelial e na sua produção de óxido nítrico que é um potente vasodilatador e ateroprotetor. Além disso, a apo B-100 associada ou não a lipídeos oxidados se liga aos receptores *scavenger* expressos pelos macrófagos, que então endocitam a LDL oxidada. Os receptores *scavenger* não são sub-regulados por sua carga (LDL oxidada) ou por subprodutos intracelulares da LDL oxidada que foi endocitada, portanto, não há um feedback negativo que limita sua captação pelos macrófagos. Como consequência, os macrófagos se transformam em células espumosas, perdem suas funções imunológicas e passam a ser unidades secretoras de citocinas inflamatórias e depósito de colesterol dentro da íntima. Esse processo gera as estrias gordurosas, que evoluem para as lesões ateroscleróticas primárias e, posteriormente, tornam-se lesões maduras, vascularizadas, com um core necrótico e com deposição de cálcio.

A LDL oxidada também pode contribuir para indução e manutenção da resposta inflamatória crônica, que se inicia *in situ*, mas evolui para expressão e secreção de diversas citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ), agregação plaquetária, seguida de proliferação e migração das células do músculo liso vascular para dentro da íntima, proliferação de tecido conjuntivo e formação das placas fibrosas (Porth & Matfin, 2010).

Uma placa fibrosa típica consiste em uma cápsula composta, em sua maioria, por células musculares lisas com tecido conectivo denso contendo colágeno, elastina, proteoglicanos e membranas basais, que reveste uma área rica em macrófagos, células musculares lisas e linfócitos T. Geralmente, há um núcleo necrótico profundo que contém restos celulares, depósito de lipídeos extracelulares e cristais de colesterol. Posteriormente, é comum haver deposição de sais de cálcio com o colesterol e outros lipídeos, resultando em calcificações duras, que aumentam a rigidez das artérias (Porth & Matfin, 2010).



As artérias ateroscleróticas perdem a maior parte de sua capacidade de relaxamento e, por causa das áreas necróticas em suas paredes, sofrem ruptura com facilidade. Além disso, nos locais em que as placas fazem protrusão no fluxo sanguíneo, o caráter áspero de suas superfícies provoca a formação de coágulos, com conseqüente desenvolvimento de trombos ou êmbolos, os quais podem bloquear subitamente todo o fluxo sanguíneo na artéria. A constrição causada pelas placas fibrosas pode resultar em estagnação do fluxo sanguíneo, que pode ser grave, uma vez que os coágulos tendem a se formar em locais com fluxo sanguíneo diminuído. Os coágulos também podem se formar pela exposição de tecidos danificados. Uma vez formado, é possível que o coágulo migre pela corrente sanguínea obstruindo artérias no coração ou no cérebro. O maior evento no infarto do miocárdio é a oclusão aguda de uma ou mais artérias coronárias epicárdicas. As fissuras das placas com hemorragia intravascular e adesão de plaquetas, os espasmos vasculares e a formação de trombos são fatores cruciais no desenvolvimento do infarto (Porth & Matfin, 2010).

Considerando a gravidade dos eventos cardiovasculares, que podem ser fatais ou altamente limitantes, o monitoramento dos fatores de risco, associados à ações preventivas, tornam-se a base dos principais programas de saúde pública voltados a saúde cardiovascular.

Destaca-se ainda o papel inquestionável do estilo de vida como variável modificável que tem ação importante em diversos fatores de risco cardiovasculares, tais como obesidade, hipertensão, diabetes, tabagismo e dislipidemias. Nesse contexto, a dieta passar a exercer um relevante papel cardioprotetor, sob a perspectiva do conteúdo de fibras alimentares, de ácidos graxos monoinsaturados e insaturados, em detrimento do papel aterogênico associado aos carboidratos refinados, sódio e gorduras saturadas, colesterol e ácidos graxo trans.

### 1.3. Ácidos graxos poli-insaturados $\omega$ -3 e doenças cardiovasculares

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) são ácidos carboxílicos formados por longas cadeias não ramificadas compostas por número par de carbonos e apresentam mais de uma dupla ligação. Estes ácidos graxos são classificados de acordo com a posição da primeira dupla ligação contada a partir de seu radical metil ( $\omega$ ) ou a partir de seu grupo funcional (representado pela letra delta –  $\delta$ ). Desses, os ácidos graxos denominados  $\omega$ -3 têm despertado interesse na comunidade científica e do público geral por causa de sua essencialidade, mas também devido sua associação inversa com as doenças cardiovasculares (Anderson & Ma, 2009; Karkow, 2010; Wang *et al*, 2006). Os AGPI  $\omega$ -3 se encontram em alimentos de origem marinha, principalmente o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA) e, em alimentos de origem vegetal, sob

a forma de ácido graxo alfa-linolênico (ALA), sendo que os AGPI  $\omega$ -3 mais consumidos na dieta correspondem ao ALA (Akoh & Min, 2002; Anderson & Ma, 2009; Karkow, 2010; SBC, 2010).

O fígado, o tecido adiposo e as glândulas mamárias são capazes de sintetizar diferentes ácidos graxos a partir de glicose e aminoácidos, por meio de reações enzimáticas específicas: alongação, com a inserção de novos átomos de carbono na cadeia carbônica de ácidos graxos e dessaturação, com a formação de duplas ligações na cadeia carbônica de um ácido graxo. No entanto, o organismo humano não possui enzimas delta-12 e delta-15 dessaturases, responsáveis por adicionar uma dupla ligação antes do nono carbono a partir da extremidade distal. Dessa maneira, assim como os AGPI  $\omega$ -6, os AGPI  $\omega$ -3 não podem ser produzidos de novo endogenamente em quantidades significantes no ser humano. Embora o corpo humano seja capaz de converter pequenas quantidades de ALA em EPA e DHA, essa biotransformação não é suficiente para manter as necessidades corporais, fato que mantém sua essencialidade e obtenção a partir da dieta ou suplementos alimentares (Anderson, 2009; Karkow, 2010).

O elo entre a ingestão de AGPI, inflamação e imunidade pode ser atribuído ao fato de que o perfil lipídico de membranas das células, inclusive as imunológicas, sofre influência da composição de ácidos graxos da dieta. A incorporação de AGPI na membrana das células influencia sua fluidez, a estrutura e a função de diferentes receptores, transportadores, enzimas e canais iônicos com ela relacionados. Essas alterações podem modular funções de leucócitos de maneira direta ou indireta, e quanto mais AGPI na dieta, maior a tendência de a resposta imunológica ser diminuída em comparação com uma dieta mais pobre em AGPI, mas claro, com certos limites (Akoh & Min, 2002; Karkow, 2010).

Os AGPI ômega-3 (EPA) incorporados nos fosfolipídeos de membranas celulares participam diretamente da resposta imune inflamatória, servindo como substrato alternativo a AGPI ômega-6 (ácido linoleico) e seu derivado o ácido araquidônico – AA para síntese de eicosanoides – família de moléculas de sinalização biológica muito potente que atuam como mensageiros de curta distância, agindo sobre os tecidos próximos às células que os produzem. Frente a um estímulo antigênico, EPA e AA são mobilizados a partir de fosfolipídeos de membranas celulares pela enzima fosfolipase A2 e competem pelas mesmas vias enzimáticas (cicloxigenase e lipoxigenase – COX e LOX) para a formação de mediadores inflamatórios. Notadamente, os eicosanoides de série ímpar formados a partir de EPA, têm potencial inflamatório significativamente menor do que aqueles eicosanoides de série par sintetizados a partir de AA. Desta forma, os perfis alterados de eicosanoides podem exercer

efeitos subsequentes, porque estes mediadores lipídicos regulam a produção de citocinas inflamatórias (Karkow, 2010).

Também existem outros grupos de mediadores sintetizados a partir de AGPI via derivação de COX-2 que exercem efeitos anti-inflamatórios. São eles: lipoxinas (LXs) derivadas de AA; resolvinas de série E derivadas de EPA e resolvinas de série D, docosatrienos e protectinas derivados de DHA. As resolvinas da série E estão associadas à redução do número de leucócitos e dos níveis de citocinas inflamatórias. As protectinas D exercem potentes efeitos anti-inflamatórios e protetores de tecido, como redução da transmigração endotelial de neutrófilos e reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias. A neuroprotectina D – protectina originária do cérebro - está associada à potente redução da transcrição do gene de IL-1 $\beta$  estimulada pelo TNF- $\alpha$  em células gliais humanas (Anderson & Ma, 2009; Karkow, 2010).

Entretanto, efeitos do EPA e DHA que não dependentes de eicosanoides parecem ser igualmente prováveis. Estes AGPI inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 e modulam favoravelmente a produção da citocina contrarreguladora IL-10, por meio da inibição da ativação do fator de transcrição pró-inflamatório NF $\kappa$ B e da ativação do fator de transcrição anti-inflamatório PPAR- $\gamma$  (*peroxisome proliferator – activated receptors*) – mais associados ao DHA – , além de alterarem aspectos estruturais e funcionais fundamentais da membrana plasmática (Karkow, 2010). Como resultado, o EPA e DHA alteram a quimiotaxia de leucócitos, expressão de moléculas de adesão e produção de citocinas inflamatórias.

A literatura mostra que os benefícios cardiovasculares do consumo dos ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -3 EPA e DHA resumidamente são, em humanos, a diminuição dos níveis sanguíneos de triacilgliceróis (TG), a influência favorável no enchimento diastólico cardíaco, na complacência arterial e também em algumas mensurações de inflamação e estresse oxidativo, e ainda a redução da agregação plaquetária. Apesar de haver evidências das vantagens do consumo de EPA e DHA, pouco se sabe sobre os efeitos isolados destes lipídeos e também se estes efeitos são complementares ou não (Mozaffarian & Wu, 2012). A seguir serão revistos alguns efeitos isolados do EPA e do DHA e suas atuações nas doenças cardiovasculares.

#### 1.4. Efeitos isolados do ácido docosaheptaenoico nas doenças cardiovasculares

Um alto consumo de DHA tem sido relacionado à redução e melhora de fatores de risco cardiovasculares. O efeito cardioprotetor mais conhecido do DHA é a redução de triacilgliceróis plasmáticos, principalmente em pacientes hipertrigliceridêmicos, associada com o aumento do

tamanho das partículas de LDL, tornando-as menos aterogênicas, e com o aumento da quantidade de HDL-2, que transportam mais colesterol e são mais cardioprotetoras que a HDL-3 (Anderson & Ma, 2009; Arnoldussen & Kiliaan, 2014; Cottin *et al*, 2011; Ma *et al*, 2012; Mozaffarian & Wu, 2012; Russell & Bürgin-Maunder, 2012; Singhal *et al*, 2013). O efeito redutor de VLDL e TG do DHA (também do EPA, em menor grau) possivelmente está relacionado à redução da secreção hepática destas partículas, ao aumento do *clearance* de TG provenientes de VLDL e de quilomícrons, assim como alterações do tamanho e concentração das VLDL (Cottin *et al*, 2011). Os potenciais mecanismos moleculares envolvem a modulação da atividade de fatores de transcrição das proteínas de ligação aos elementos reguladores de esterol (*sterol regulatory element-binding protein*-SREBP) e PPAR. O DHA (e também o EPA) inibem a atividade da SREBP-1c, que controla a síntese de ácidos graxos e TG, tendo associação com diminuição da expressão de enzimas lipogênicas. Como o DHA (e o EPA) são ligantes do PPAR, estes ácidos graxos podem estimular a  $\beta$ -oxidação por meio de mecanismos PPAR $\alpha$ -dependentes, contribuindo para a redução de TG secretados pelo fígado e aumentando o *clearance* de TG dos quilomícrons. O DHA também inibe a atividade da enzima 3-hidroxi-3metilglutaril redutase (HMG-CoA redutase) nos hepatócitos, provavelmente através de mecanismos de modulação da SREBP-2 que, por sua vez, modula a síntese de colesterol (Cottin *et al*, 2011).

Por conta de sua cadeia carbônica grande e um maior nível de instauração em relação ao EPA, o DHA pode ser mais efetivo em alterar a estrutura e função da membrana lipídica da célula, conferindo maior fluidez à mesma. Quando há incorporação de DHA nos *lipid rafts* (estruturas rígidas das membranas ricas em colesterol, esfingolípídeos e fosfolípídeos ricos em ácidos graxos saturados, tendo funções de transdução de sinais e ativação de canais iônicos) há um aumento das atividades metabólicas (por exemplo,  $\beta$ -oxidação), maior deslocamento de receptores para a membrana e inibição da proliferação de citocinas pró-inflamatórias, tendo papéis importantes na inflamação e nas doenças cardiovasculares (Anderson & Ma, 2009; Mozaffarian & Wu, 2012).

Os benefícios da suplementação com DHA também estão relacionados com efeitos hemodinâmicos, que englobam a diminuição da pressão arterial e da frequência cardíaca, a melhoria da função endotelial e da complacência arterial (Arnoldussen & Kiliaan, 2014; Cottin *et al*, 2011; Ma *et al*, 2012; Mozaffarian & Wu, 2012; Russell & Bürgin-Maunder, 2012). A diminuição da pressão arterial através da suplementação de DHA possivelmente é ocasionada pela geração do metabólito ácido epoxidocosapentaenoico (19,20-EDP), um potente vasodilatador sintetizado a partir da biotransformação do DHA por enzimas da família CYP450. A suplementação de DHA também parece diminuir a resposta vasoconstritiva associada à noradrenalina e aumentar a resposta

vasodilatadora associada à acetilcolina, além de diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 TNF- $\alpha$  e de outras moléculas como VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular 1), ICAM-1 (molécula de adesão intracelular 1) e E-selectina, que estão associadas à disfunção endotelial. Estas modificações sugerem melhorias da função endotelial, e também diminuição da inflamação, que induz aterosclerose e outras doenças metabólicas (Arnoldussen & Kiliaan, 2014; Cottin *et al*, 2011; Ma *et al*, 2012; Russell & Bürgin-Maunders, 2012).

Os AGPI  $\omega$ -3 incorporados nos fosfolipídeos de membranas podem influenciar a função de canais iônicos de membranas, incluindo os canais de Na<sup>+</sup>, canais de Ca<sup>+</sup> do tipo L e canais Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup>, regulando a excitabilidade elétrica e contratilidade das células. O DHA está presente nas membranas das células do miocárdio em quantidades entre cinco a dez vezes maiores que a quantidade de EPA. Desta forma, a suplementação de DHA tem um especial efeito protetor contra arritmias cardíacas e também tem o efeito de diminuir a variabilidade da frequência cardíaca, diminuindo assim o risco cardiovascular, porém existem muitas inconsistências quanto a estes efeitos (Cottin *et al*, 2011; Mozaffarian & Wu, 2012; Mozaffarian *et al*, 2013).

O DHA parece ter um ótimo efeito anti-trombótico ao ser eficiente para reduzir a agregação plaquetária e a produção de tromboxanos de série 2 (TX-2), inibir a síntese do fator de agregação plaquetária e estimular a atividade endotelial da óxido nítrico sintetase (NOS). O DHA também tem um outro metabólito criado a partir das enzimas da CYP450, o ácido hidroxidocosahexaenoico (22-HDoHE), que é um potente inibidor da agregação plaquetária (Cottin *et al*, 2011; Russell & Bürgin-Maunders, 2012).

Em relação a efeitos indiretos nas doenças cardiovasculares, a suplementação de DHA pode melhorar a resposta glicêmica diminuindo a resistência à insulina através do aumento da secreção de adiponectina, que aumenta a sensibilidade à insulina, e também da diminuição de marcadores inflamatórios. Outro fator que influencia a melhora da sensibilidade à insulina é a ativação do PPAR $\gamma$ , que aumenta a expressão e translocação de GLUT-1 e GLUT-4 e de receptores de insulina para as membranas, facilitando a captação da glicose nas células, e também aumenta a  $\beta$ -oxidação mitocondrial de ácidos graxos livres. As resolvinas E1 e neuroprotectina D1 apresentam efeitos miméticos à insulina, além de também induzirem a expressão gênica de adiponectina (Anderson & Ma, 2009; Cottin *et al*, 2011; Russell & Bürgin-Maunders, 2012). Desta forma, o alto consumo de DHA pode trazer benefícios em parâmetros relacionados à obesidade e diabetes, e conseqüentemente, às doenças cardiovasculares.

### 1.5. Efeitos isolados do ácido eicosapentaenoico nas doenças cardiovasculares

O consumo elevado de EPA também tem sido relacionado à redução de TG plasmáticos, apesar de não apresentar um resultado tão eficiente como os induzidos pelo DHA e nem ter alterações do tamanho das partículas de LDL e HDL (Cottin *et al*, 2011; Mori & Woodman, 2006; Mozaffarian & Wu, 2012). O efeito redutor de VLDL e TG associado ao EPA, assim como nos efeitos do DHA já citados, está relacionado à redução da secreção hepática destas lipoproteínas e ao aumento do *clearance* de TG. O EPA também apresenta modulação da atividade de SREBP (inibindo as atividades da SREBP-1c e da SREBP-2), da HMG-CoA redutase e do PPAR, porém aparentemente de forma mais tênue que o DHA (Cottin *et al*, 2011).

O EPA é incorporado nos fosfolípidos de membrana, porém o EPA é o substrato preferencial das enzimas COX e LOX, sendo um melhor competidor do ácido araquidônico que o DHA. EPA também é substrato preferencial da enzima fosfolipase A2, fazendo com que a liberação dos AA dos fosfolípidos para a síntese de eicosanoides pró-inflamatórios seja inibida. Desta forma, o EPA parece ser mais eficiente que o DHA na formação de eicosanoides de série ímpar, mediando uma resposta anti-inflamatória. As resolvinas E, metabólitos de EPA, inibem a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$ , citocinas que induzem a disfunção endotelial e, posteriormente, a aterosclerose. O EPA também apresenta ação anti-trombótica através da inibição da síntese de tromboxanos de série par, porém mesmo assim o DHA apresenta melhores resultados de diminuição de agregação plaquetária (Anderson & Ma, 2009; Mozaffarian & Wu, 2012 Russell & Bürgin-Maunders, 2012).

Em relação aos efeitos hemodinâmicos, nota-se que a suplementação de DHA traz mais benefícios que a suplementação de EPA. Aparentemente não há efeito isolado do EPA na regulação da pressão arterial e na frequência cardíaca (Cottin *et al*, 2011; Mori & Woodman, 2006; Mozaffarian & Wu, 2012). O EPA modula a função endotelial e a complacência arterial, porque ativa a enzima NOS, fazendo aumentar a geração de NO e, conseqüentemente, estimula a vasodilatação. Além disso, o metabólito de EPA formado pelas enzimas do CYP450, o ácido epoxieicosatetraenoico (17,18-EEQ) também exibe efeitos de vasodilatação arterial. Outro mecanismo de modulação da função endotelial é através de efeitos anti-inflamatórios do EPA, porém mesmo assim EPA exibe menor potência do que o DHA em inibir a expressão de moléculas de adesão (Cottin *et al*, 2011; Mori & Woodman, 2006; Russel & Bürgin-Maunders).

Nos efeitos indiretos sobre as doenças cardiovasculares, a suplementação de EPA, da mesma forma que a suplementação de DHA, pode melhorar a sensibilidade à insulina. O EPA aumenta a secreção de adiponectina e ativa o PPAR $\gamma$ , aumentando a expressão e translocação de receptores de

insulina e GLUT-1 e GLUT-4 para as membranas. A resolvina E1 gerada a partir do EPA também auxilia na resposta glicêmica mimetizando a insulina e aumentando a expressão de adiponectina. O efeito de aumentar a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos nos músculos esqueléticos e no fígado através dos PPAR $\alpha$  e  $\gamma$  parece ser maior quando se suplementa EPA (Anderson & Ma, 2009; Cottin *et al*, 2011; Mori & Woodman, 2006; Russell & Bürgin-Maunders, 2012). Desta forma, o alto consumo de EPA também pode trazer benefícios em parâmetros relacionados à obesidade e diabetes, e consequentemente, às doenças cardiovasculares.

## **2. OBJETIVOS**

Considerando o potencial anti-inflamatório do EPA, do DHA e de seus metabólitos, o objetivo do presente estudo foi associar os biomarcadores de consumo de EPA e DHA com marcadores inflamatórios em indivíduos adultos.

## **3. METODOLOGIA**

O presente estudo baseou-se em uma subamostra do estudo CARDIONUTRI, que foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Saúde Pública (protocolo 2264) e do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (protocolo 1126/11) e que teve a autorização dos participantes através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### *3.1. Casuística*

Utilizou-se um corte transversal do período basal (t0) do estudo CARDIONUTRI, formado por indivíduos de ambos os gêneros, com idade entre 30 e 74 anos.

No estudo mencionado, os participantes foram recrutados do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP – São Paulo, Brasil). Não foram incluídos gestantes, lactantes, indivíduos que participavam de outros estudos, com evento cardiovascular prévio (monitorado por eletrocardiograma e avaliação clínica), usuários de drogas ilícitas e alcoolistas.

O estudo principal teve caráter prospectivo e intervencional por meio da suplementação randomizada dos ácidos graxos  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9 (através de alimentos fontes destes nutrientes) controlada por placebo.

No estudo atual foram analisados estatisticamente dados percentuais de EPA e DHA plasmáticos, tanto isoladamente quanto a somatória dos ácidos graxos, e foram associados com marcadores inflamatórios plasmáticos, perfil lipídico e perfil glicídico.

### 3.2. *Amostra*

A base de dados original do CARDIONUTRI consta de 374 participantes, mas, para a realização da pesquisa atual, foram excluídos da base 83 pacientes que não tinham dados de AGPI  $\omega$ -3 plasmáticos, fazendo com que a amostra final seja composta por 291 pessoas. Estes indivíduos foram estratificados em dois grupos, segundo a mediana, para as variáveis de EPA e DHA plasmáticos isolados. Já para o índice ômega-3 (EPA e DHA plasmáticos somados), Harris e von Shacky (2004) propuseram que as pessoas com o valor maior que 8% teriam maior proteção cardiovascular, e, portanto, foi utilizado este valor para a estratificação desta variável.

### 3.3. *Avaliações clínica e antropométrica*

Para a caracterização da amostra, no estudo atual, foram utilizados somente dados clínicos e antropométricos obtidos no estudo utilizado como base. Gênero, idade, tabagismo, presença de doenças (relatadas pelos indivíduos) e uso de medicamentos (relatados pelos indivíduos) foram os dados clínicos utilizados. Nutricionistas ou médicos colaboradores obtiveram os dados através de entrevista direta, pesquisa em prontuário e avaliações clínicas. Nas avaliações clínicas foram realizadas aferições da pressão arterial dos pacientes por meio de um esfigmomanômetro e com o auxílio da equipe de enfermagem do HU-USP. A medida feita em duplicata e o valor final considerado foi a média entre os dois valores coletados. O protocolo seguido e classificação da presença ou não de hipertensão arterial teve como base as recomendações e classificações das Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (SBC, 2010).

Já a antropometria foi realizada com a aferição da estatura, do peso corporal, da circunferência da cintura, e também análises de composição corporal, como porcentagem de gordura corporal e índice de massa corporal (IMC), sendo todas as medidas coletadas pelo mesmo pesquisador e em duplicata, para não haver divergência dos valores.

A aferição da estatura foi realizada com o estadiômetro portátil Seca® (TBW, São Paulo, Brasil) com limite de 2,0m e precisão de 1,0mm; esta medida foi feita com os indivíduos descalços e em posição ereta, com os pés paralelos, calcanhares, panturrilha, glúteos e ombros encostados na parede e com a cabeça sob o plano horizontal de Frankfurt (Lohman *et al*, 1998). O peso corporal foi medido com os participantes usando o mínimo de roupas e descalços, utilizando-se para fazer a



medida a balança digital Toledo®, modelo 2096PP/2 (Toledo, São Paulo, Brasil) com limite de capacidade de 200,0 kg e precisão de 50,0 kg. A classificação do IMC utilizada para os adultos e idosos se encontra no **Quadro 1**.

**Quadro 1 – Classificação de IMC de adultos (\*) e de idosos (\*\*). São Paulo, 2016.**

<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)*</b>	<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>**</b>	<b>Classificação</b>
<b>&lt; 18,50</b>	<b>&lt;23,00</b>	Baixo peso
<b>18,5 – 24,99</b>	<b>23,00 – 27,99</b>	Eutrofia
<b>25,00 – 29,99</b>	<b>28,00 – 29,99</b>	Sobrepeso
<b>≥30,00</b>	<b>≥30,00</b>	Obesidade

Fonte: WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization, 2000.

Para aferir a circunferência da cintura, os indivíduos foram posicionados em pé, com os braços paralelos ao corpo e pés unidos, além de permanecerem com o abdômen relaxado. Esta medida foi aferida com uma fita inelástica, flexível e com precisão de 1 mm (TBW, São Paulo, Brasil), adotando-se como referencial anatômico a última costela e crista ilíaca. A classificação utilizada para a circunferência de cintura encontra-se no **Quadro 2**.

O percentual de massa gorda (%MG) foi determinado por meio dos valores obtidos na bioimpedância elétrica (BIA) tetrapolar Biodynamics®, modelo 450 (TBW, São Paulo, Brasil), com corrente elétrica de baixa amplitude (800µA) e frequência de 50 KHz. Para realização desse teste, os indivíduos foram orientados a retirar calçados e meias e a ficarem imóveis durante o procedimento. Nesse teste, os indivíduos ficam deitados em posição supina e com os braços em ângulo de 30° em relação ao corpo e com as pernas sem contato entre si. A corrente elétrica passa pelo corpo deste através de dois pares de eletrodos adesivos posicionados na mão e pé direito do participante. Para fazer o cálculo do %MG, utilizou-se o programa Biodynamics® (TBW, São Paulo, Brasil), considerando o sexo, idade, peso, altura, nível de atividade física, valores de resistência e reatância. Os valores normais de %MG considerados foram de 15 a 25% para o sexo masculino e de 20 a 30% para o sexo feminino (Armatruda, 2001).

**Quadro 2- Classificação do risco de complicações metabólicas associados à circunferência abdominal de homens e mulheres. São Paulo, 2016.**

<b>Risco de complicações metabólicas</b>	<b>Circunferência de cintura (cm)</b>	
	<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>

<b>Sem risco</b>	<94	<80
<b>Risco elevado</b>	≥94	≥80
<b>Risco substancialmente elevado</b>	≥102	≥88

Fonte: WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization, 2000.

### 3.4. Avaliações bioquímicas

#### 3.4.1. Coleta de sangue

Após um jejum de 12 horas foram coletadas 20 mL de amostras de sangue em tubos *vacutainer* contendo *ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) (1 mg/mL) (da marca BD, Brasil), o qual foi utilizado como anticoagulante e antioxidante. Cerca de 4 mL de sangue foram coletados em tubo seco, para posterior extração de soro. Tubos com fluoreto de sódio foram utilizados para colher o sangue que seria usado para determinar o conteúdo de glicose.

Todos os tubos foram mantidos em sob refrigeração (8°C) até o processamento das amostras. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm a 4°C por 10 minutos e ao plasma resultante foi acrescentado os inibidores de proteases: aprotinina (10 µg/mL de plasma), benzamidina (10 µM/mL de plasma) e *phenylmethysulfonyl fluoride* (PMFS) (5 µM/mL de plasma), além do antioxidante *butylated hydroxytoluene* (BHT) (100 µM/mL de plasma). Todas as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento das análises.

#### 3.4.2. Determinação do perfil lipídico e de apolipoproteínas

As concentrações de colesterol total (CT) e HDL-c foram realizadas por métodos padrões (Colesterol Liquiform® Labtest, Minas Gerais, Brasil) e (Colesterol HDL® Labteste, Minas Gerais, Brasil), respectivamente. Já para determinação dos triglicérides (TG) no plasma, utilizou-se o Kit Triglicérides Liquiform® (Labtest, Minas Gerais, Brasil). O LDL-c foi calculado por meio da fórmula de Friedewald (1972), onde:  $LDL-C = CT - HDL-C - TG/5$ , sendo que esta apenas foi aplicada para aqueles indivíduos com  $TG < 400$  mg/dL.

As apolipoproteínas APOAI e APOB foram determinadas pelo 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. Todas as análises foram feitas em duplicata. A partir dos resultados acima foram calculados os índices TG/HDL, CT/HDL, LDL/HDL, APOB/APOAI, HDL/APOAI, LDL/APOB.

#### 3.4.3. Determinação 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 uma 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 uma banda de VLDL + LDL e 10 subfrações de HDL, sendo as bandas 1 a 3 consideradas 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 interensaio para as subfrações de LDL pequenas foi de 5,3% e para as subfrações de LDL grandes foi de 5,0%.

#### 3.4.4. *Determinação da concentração de LDL modificada*

A LDL(-) ou LDL modificada foi detectada por ELISA sanduíche, seguindo o protocolo adaptado do método validado por Faulin *et al* (2008). A sensibilização das placas (Costar®, modelo 3690, Corning, US) foi feita com anticorpo monoclonal anti-LDL(-) (MAb-1A3) (0,5 µg/mL, 50,0 µL/poço), diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,25 M, pH 9,6), sendo as placas incubadas por uma noite à 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 0,01 mol/L (PBS – pH 7,4) e incubados à 37°C por 2h. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS-Tween (0,05%). Foi adicionado 50,0 µL/poço de plasma diluído (1:1600) em tampão PBS, sendo a placa incubada por 2h em temperatura ambiente. Após essa etapa, a placa foi lavada, conforme descrito anteriormente, e foi adicionado 50,0 µL/poço de anticorpo monoclonal anti-LDL(-) biotilado (MAb-2C7) (0,5 µg/mL, 50,0 µL/poço). As placas foram novamente incubadas em temperatura

ambiente por 2h e, em seguida, lavadas conforme descrito acima. Após essa etapa, foram adicionados 50,0 µL/poço de estreptoavidina-peroxidase (1:80000) diluída em PBS. As placas foram incubadas por 1h em temperatura ambiente e novamente lavadas, conforme descrito anteriormente. A reação de cor foi desenvolvida por adição de substrato composto por 3,3', 5,5'- tetrametilbenzina (TMB), tampão citrato-fosfato (0,1 M, pH 4,2) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) (250/12/10, µL/mL/µL). As placas foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. A reação foi bloqueada com 50,0 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,0 M) e a absorbância monitorada em 450 nm. Os resultados foram expressos pela média das absorbâncias das amostras menos o branco e, posteriormente, aplicados à curva padrão e multiplicados pela respectiva diluição, sendo os resultados expressos em mg/ml. Os anticorpos utilizados nessa análise foram doados pela Professora Doutora Dulcineia Saes Parra Abdalla, do Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Os autoanticorpos LDL(-) foram determinados segundo Faulin *et al* (2012).

#### 3.4.5. Determinação da concentração de autoanticorpos anti-LDL(-)

Os autoanticorpos anti-LDL(-) foram detectados por ELISA de captura de anticorpo. A LDL(-), isolada por *fast protein liquid chromatography* (FPLC), foi diluída em tampão carbonato-bicarbonato (0,25 M, pH 9,6) até concentração final de 1 µg de proteína/poço, e incubada em período *overnight* (15h) a 4°C. Os espaços livres foram bloqueados com 5% de leite desnatado diluído em tampão fosfato-salina 0,01 mol/L (PBS – pH 7,4) e incubados a 37°C por 90 minutos. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS-*tween* (0,05%). As amostras foram diluídas (1:300) em PBS-*tween* (0,01%) e incubadas em temperatura de 37°C por 90 minutos. As placas foram novamente lavadas, conforme protocolo. Foi adicionado 50,0 µL/poço de anti-IgG humana marcada com peroxidase, (1:5000) diluída em PBS. As placas foram incubadas por 90 minutos, à 37°C, seguida de lavagem, conforme protocolo. A reação de cor se desenvolveu pela adição de substrato composto por 3,3', 5,5' – tetrametilbenzina (TMB), tampão citrato-fosfato (0,1 M, pH 4,2) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) (250/12/10, µL/mL/µL). As placas foram incubadas por 30 minutos à 37°C, sob proteção da luz. A reação foi bloqueada com 50 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,0 M) e a absorbância monitorada em 450 nm. Os resultados foram gerados aplicando-se a média das absorbâncias das amostras, descontando o branco, à equação da curva padrão de MAb 2C7 (0,004 – 0,125 um/L).

#### 3.4.6. Análise da composição de ácidos graxos plasmáticos

O percentual de adesão dos participantes ao protocolo de intervenção foi avaliado por dois métodos: contagem de cápsulas consumidas ao longo do estudo e perfil de ácidos graxos no plasma.

Inicialmente, os lipídeos foram extraídos utilizando o método de Bligh e Dyer (1959), utilizando-se 100 µL de plasma, 50 µL de hidróxido de sódio, 50 µL de ácido heptadecanoico (padrão interno), 350 µL de etanol com antioxidante BHT a 150 µM para evitar oxidações dos lipídeos durante o procedimento e 50 µL de H<sub>2</sub>O com 100 µM de DTPA. Esta mistura permaneceu em repouso por 90 min em ambiente escuro e após este período, os ácidos graxos livres foram extraídos utilizando-se 2 mL de acetato de etila com BHT e hexano (1:9) e 1 mL de NaCl 1% com 100 µM de DTPA. Após esta etapa, as amostras foram agitadas (vórtex) por 2 min e permaneceram em gelo por 5 min. Foi retirado o sobrenadante somente com lipídeos. A quantificação dos ácidos graxos foi realizada utilizando sonda fluorescente 9-antrildiazometano (ADAM) (Nimura & Kinoshita, 1980). Os lipídeos extrapidos foram secados sob fluxo de nitrogênio. A partir das amostras secas e hidrolisadas, foi realizada a reação de derivatização. Os lipídeos foram resuspendidos em 50 µL de acetato de etila e derivatizados com 50 µL de ADAM (0,25 mg/mL) em temperatura ambiente, sob proteção da luz e mantidos por 30 min em gelo. Os ácidos graxos derivatizados foram analisados pelo HPLC utilizando uma coluna Kinetex C18 (50 x 3,0 mm com 2,6 µm de tamanho de partícula) e pré-coluna de C18. Para cada corrida de amostras do plasma do HPLC, correu também uma amostra de branco apenas com padrão interno (ácido heptadecanoico), uma amostra de ADAM puro e uma amostra de padrão externo (mix de ácidos graxos separados – EPA, DHA, ácido araquidônico, ácido palmitoleico, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido linolênico e ácido esteárico) para determinar o tempo de retenção dos ácidos graxos em cada corrida e proceder a integração dos mesmos de acordo com este tempo. Para a separação dos ácidos graxos foi utilizado um gradiente de acetonitrila e H<sub>2</sub>O, partindo de um gradiente de 79% de acetonitrila, chegando a 93%, com fluxo de 1,45 mL/min e 12 min para cada análise. A fluorescência foi monitorada em 350 nm e sua emissão analisada em 450 nm. Após integração dos picos obtidos em cada corrida, foi calculado o percentual da área de cada pico.

#### 3.4.7. *Determinação da adiponectina sérica*

A concentração de adiponectina no sangue dos participantes foi feita pela dosagem quantitativa no soro dos participantes da pesquisa, utilizando o método de ensaio imunoenzimático (ELISA) sanduíche (EMD Millipore®). O imunoensaio apresentou controles positivo, negativo e curvas de calibração. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

#### 3.4.8. *Determinação da leptina sérica*

A concentração de leptina no sangue dos participantes foi feita pela dosagem quantitativa no soro dos participantes da pesquisa, utilizando o método ELISA sanduíche (Enzo Lifesciences®). O

imunoensaio apresentou controles positivo, negativo e curvas de calibração. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

#### 3.4.9. *Determinação da glicose, insulina e índice de resistência à insulina (HOMA-IR)*

A glicose plasmática foi determinada através do kit comercial, enzimático e colorimétrico Glicose PAP Liquiform® (Labtest, Minas Gerais, Brasil). Já a insulina no plasma foi detectada por meio do método de imunoensaio através do kit comercial *HumanInsulinDirect ELISAKit, Novex*®.

A resistência insulínica foi calculada pelo índice de resistência à insulina (HOMA-IR), em que  $HOMA-IR = [\text{concentração da insulina de jejum } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicemia de jejum (mmol/L)}] / 22,5$ . A presença de resistência insulínica foi determinada de acordo com o Modelo 1, adotado pela Sociedade Brasileira de Diabetes – SBD (2009) e que foi proposto por Stern et al. (2005), em que esta é diagnosticada se quaisquer um dos seguintes critérios estiver presente:  $IMC > 28,9 \text{ kg/m}^2$ ,  $HOMA-IR > 4,65$  ou  $IMC > 27,5 \text{ kg/m}^2$  e  $HOMA-IR > 3,6$ .

#### 3.4.10. *Determinação da concentração de citocinas e quimiocinas*

A concentração dos marcadores inflamatórios (interleucinas 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), 2 (IL-2), 4 (IL-4), 5 (IL-5), 6 (IL-6), 7 (IL-7), 8 (IL-8) e 10 (IL-10), 12 (IL-12), 13 (IL-13), 17 (IL-17), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )) foi determinada por dosagem no soro utilizando Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex Assay, realizando ELISA sanduíche. As análises foram realizadas em duplicata e o imunoensaio apresentou controles positivo, negativo e curva de calibração.

### 3.5. *Análises estatísticas*

Para a caracterização das amostras foi utilizado o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de aderência assumindo a expectativa de grupos iguais. Os dados estão apresentados na forma de valores absolutos, seguidos de suas respectivas porcentagens e o valor  $p$  do qui-quadrado. Para a apresentação dos dados quantitativos, assim como para a determinação dos testes utilizados, foi considerado o tipo de distribuição dessas variáveis (teste *Kolmogorov-Smirnov*,  $p < 0,05$ ). Para as variáveis paramétricas foi utilizado o teste  $t$  de Student ( $p < 0,05$ ), e para as variáveis não-paramétricas foi utilizado o teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). A estratificação dos valores de percentuais dos ácidos graxos plasmáticos (Tabelas 2 e 3) foi realizada de acordo com a mediana das

amostras (p50). Foram realizadas correlações lineares paramétricas e não-paramétricas de acordo com a distribuição da variável, e, posteriormente, foram realizadas correlações parciais com ajustes das variáveis da tabela de caracterização da amostra. A interpretação foi feita de acordo com a seguinte classificação: correlação fraca ( $r < 0,4$ ); correlação moderada ( $0,4 \leq r < 0,7$ ); correlação forte ( $0,7 \leq r < 0,9$ ); e correlação muito forte ( $r \geq 0,9$ ). Os testes estatísticos foram realizados no programa SPSS versão 20.0.

#### 4. RESULTADOS

A **Tabela 1** exibe a caracterização da amostra do estudo segundo os dados clínicos e antropométrico dos participantes. Observou-se predominância do sexo feminino (62,9%), predominância de pacientes com idade entre 40 e 60 anos (55,0%) e também de não fumantes (52,4%). Em relação às doenças autorrelatadas, 89,0% dos pacientes apresentam pelo menos uma das enfermidades apresentadas na tabela, onde observou-se predominância de hipertensão arterial sistêmica (57,4%) e dislipidemia (55,7%), seguidas por *Diabetes mellitus* (19,2%). Quanto ao uso de medicamentos, 78,7% utilizavam algum dos medicamentos de uso contínuo, sendo que houve predominância de uso de anti-hipertensivos (52,2%), seguido pelo uso de estatinas (27,5%) e hipoglicemiantes (21,3%). Destaca-se a elevada prevalência de obesidade (50,5%) e sobrepeso (28,2%), circunferência de cintura muito elevada (70,8%) e alta porcentagem de gordura corporal (72,5%). Esse perfil evidencia que a população estudada apresentava elevado número de fatores de risco cardiovasculares.

**Tabela 1- Caracterização da amostra, segundo perfil clínico e antropométrico. São Paulo, 2016.**

Variável	n	%	Valor p do qui-quadrado
<b>Gênero</b>			<0,001
Masculino	108	37,1	
Feminino	183	62,9	
<b>Idade</b>			<0,001
30 a 40 anos	49	16,8	
40 a 60 anos	160	55,0	
60 a 74 anos	82	28,2	
<b>Tabagismo</b>			<0,001
Fumantes	68	19,5	
Não fumantes	183	52,4	
Ex-fumantes	98	28,1	
<b>Doenças autorrelatadas</b>			
Total	259	89,0	<0,001
<i>Diabetes mellitus</i>	56	19,2	
HAS	167	57,4	

Hipotireoidismo	38	13,1	
Hepatopatias	7	2,4	
Insuficiência renal crônica	2	0,7	
Dislipidemia	162	55,7	
Doença arterial coronariana	37	12,2	
<b>Uso de medicamentos</b>			
Total	229	78,7	<0,001
Estatinas	80	27,5	
Antihipertensivos	152	52,2	
Hipoglicemiantes	62	21,3	
Fibrato	8	2,7	
Ansiolítico	14	4,8	
Tireoide	41	14,1	
<b>Índice de massa corporal</b>			
Baixo peso	4	1,4	
Eutrofia	58	19,9	
Sobrepeso	82	28,2	
Obesidade	147	50,5	
<b>Circunferência de cintura</b>			
Sem risco	37	12,7	<0,001
Elevada	48	16,5	
Muito elevada	206	70,8	
<b>Porcentagem de gordura corporal</b>			
Baixa	6	2,1	<0,001
Normal	66	22,7	
Alta	211	72,5	

n=291. Resultados apresentados em número (n) e frequência (%). HAS: hipertensão arterial sistêmica. Valor de significância  $p < 0,05$  referente ao teste qui-quadrado de aderência assumindo a expectativa de grupos iguais.

A **Tabela 2** apresenta os perfis lipídico, glicídico e inflamatório de acordo com a porcentagem de EPA ou DHA plasmáticos, sendo os grupos estratificados pelas medianas. O maior percentual de DHA plasmático se associou com a menores níveis de TG ( $p < 0,001$ ), maior percentual de HDL pequena ( $p = 0,016$ ), HDL grande ( $p = 0,002$ ), maior tamanho das LDL ( $p = 0,011$ ) e maior nível de leptina plasmática ( $p = 0,032$ ). Já o EPA plasmático relacionou-se com menor nível de HDL ( $p = 0,009$ ), de apo A-I ( $p < 0,001$ ), de insulinemia ( $p = 0,022$ ) e do índice HOMA-IR ( $p = 0,010$ ). EPA também se relacionou com maior percentual de LDL pequena ( $p = 0,004$ ) e maior nível plasmático de TNF- $\alpha$  ( $p = 0,021$ ). Quando os percentuais de EPA e DHA plasmáticos foram somados, observou-se, na **Tabela 3**, relação com maior percentual de partículas grandes de HDL ( $p = 0,043$ ), e relação com menor índice HOMA-IR ( $p = 0,003$ ), menor insulinemia ( $p = 0,017$ ), e também menor nível plasmático das citocinas IL-7 ( $p = 0,014$ ) e IL-10 ( $p = 0,021$ ).

Nas **Tabelas 4, 5 e 6** estão apresentadas as correlações lineares significantes entre as concentrações ou porcentagens de EPA, DHA ou EPA e DHA somados plasmáticos com os perfis lipídico, glicídico e inflamatório. A **Tabela 4** aponta uma relação do EPA com os altos níveis de TG, evidenciada pela razão TG/HDL ( $r = 0,136$ ;  $p = 0,020$ ), com a insulinemia ( $r = -0,132$ ;  $p = 0,042$ ) e com



as partículas pequenas de LDL, exibida pelas correlações com o percentual ( $r=0,177$ ;  $p=0,003$ ) e concentração ( $r=0,162$ ;  $p=0,006$ ) das partículas pequenas de LDL e com o tamanho destas lipoproteínas ( $r=-0,172$ ;  $p=0,004$ ). A **Tabela 5** reforça a relação de DHA na redução de TG ( $r=-0,246$ ;  $p<0,001$ ), demonstrada também pela relação TG/HDL ( $r=-0,261$ ;  $p<0,001$ ) e na melhora da sensibilidade à insulina, demonstrada pela correlação negativa com a glicemia em jejum ( $r=-0,142$ ;  $p=0,015$ ) e com o índice HOMA-IR ( $r=-0,174$ ;  $p=0,007$ ) além da diminuição de partículas pequenas de LDL, evidenciada pela correlação negativa com o percentual ( $r=-0,139$ ;  $p=0,018$ ) e concentração ( $r=-0,129$ ;  $p=0,029$ ) destas lipoproteínas e pela correlação positiva com o tamanho da LDL ( $r=0,198$ ;  $p=0,001$ ). A **Tabela 6** mostra uma correlação negativa com o índice HOMA-IR ( $r=-0,205$ ;  $p=0,001$ ), com a insulinemia ( $r=-0,166$ ;  $p=0,010$ ) e com as IL-7 ( $r=-0,295$ ;  $p=0,015$ ) e IL-10 ( $r=-0,321$ ;  $p=0,011$ ), além da correlação positiva com os níveis de LDL modificadas pela oxidação ( $r=0,119$ ;  $p=0,042$ ).

A **Tabela 7** apresenta as correlações parciais entre porcentagens de EPA e DHA isolados e somados.

Observou-se que a correlação positiva do EPA com a Apo A-I foi fortemente influenciada pelo gênero, tabagismo, IMC, CC e uso de medicamentos (estatinas, anti-hipertensivos e hipoglicemiantes). Verificou-se ainda que a associação com o tamanho da HDL foi dependente do sexo e do uso de estatinas. Interessantemente, verificou-se que gordura corporal (percentual e classificação) influenciou positivamente a associação do EPA com a Apo B.

Em relação ao DHA, foi observado que a correlação positiva com a adiponectina foi fortemente influenciada pelo gênero, tabagismo e uso de estatinas. Já as correlações negativas com TG e com HOMA-IR foram fortemente influenciadas pelo gênero e uso de hipoglicemiante. Nota-se também que há associação positiva com o tamanho da LDL dependente de gênero e associação negativa com a quantidade de partículas pequenas da lipoproteína em função do gênero e do IMC. Já em relação às citocinas, nota-se que as correlações foram fortemente influenciadas pela CC.

Agora o EPA e o DHA somados apresentam correlações com a Apo A-I influenciadas pelo gênero, tabagismo, uso de medicamentos (estatinas, anti-hipertensivos e hipoglicemiantes), IMC e CC. A quantidade de partículas grandes de HDL foi influenciada pelo gênero. É importante também notar que o gênero, o tabagismo, o uso de anti-hipertensivo e estatinas influenciaram as correlações com adiponectina.

Tabela 2 - Perfis lipídico, glicídico e inflamatório de acordo com porcentagem de EPA ou DHA plasmáticos. São Paulo, 2016.

Variáveis bioquímicas	DHA plasmático (%)			EPA plasmático (%)		
	<5,75% (n=145)	≥5,75% (n=146)	P	<1,68% (n=145)	≥1,68% (n=146)	P
<b>CT (mg/dL)*</b>	208,0 (±42,0)	204,0 (±42,0)	0,473	205,0 (±39,0)	207,0 (±45,0)	0,617
<b>HDL-C (mg/dL)*</b>	36,0 (±9,4)	38,3 (±10,2)	0,053	38,7 (±10,9)	35,6 (±8,5)	0,009
<b>LDL-C (mg/dL)*</b>	137,2 (±37,2)	139,2 (±38,3)	0,657	137,0 (±35,7)	139,6 (±39,8)	0,563
<b>TG (mg/dL)</b>	178,0 (±107,0)	135,0 (±68,0)	<0,001	149,0 (±86,0)	165,0 (±97,0)	0,182
<b>Glicemia em jejum (mg/dL)</b>	109,0 (±39,0)	102,0 (±21,0)	0,195	104,0 (±33,0)	107,0 (±30,0)	0,107
<b>Apo A-I (mg/dL)*</b>	130,9 (±26,1)	132,3 (±24,3)	0,639	137,3 (±26,4)	125,9 (±22,4)	<0,001
<b>Apo B (mg/dL)*</b>	104,9 (±24,9)	104,0 (±24,0)	0,743	102,4 (±22,7)	106,5 (±25,9)	0,158
<b>HDL pequena (%)*</b>	20,9 (±7,3)	18,9 (±6,8)	0,016	20,4 (±6,3)	19,3 (±7,9)	0,211
<b>HDL grande (%)*</b>	28,2 (±8,4)	31,3 (±8,5)	0,002	29,5 (±8,1)	30,0 (±9,0)	0,708
<b>LDL pequena (%)</b>	4,2 (±4,9)	2,7 (±3,0)	0,078	2,7 (±3,4)	4,1 (±4,7)	0,004
<b>LDL grande (%)*</b>	25,8 (±5,5)	26,8 (±4,8)	0,108	26,7 (±4,8)	25,9 (±5,8)	0,164
<b>Tamanho de LDL (nm)</b>	267,0 (±6,0)	269,0 (±4,0)	0,011	269,0 (±5,0)	267,0 (±6,0)	0,007
<b>HOMA-IR</b>	5,2 (±3,2)	4,4 (±2,2)	0,067	5,0 (±2,6)	4,5 (±2,9)	0,042
<b>Insulinemia (µIU/mL)</b>	19,2 (±8,9)	17,4 (±7,8)	0,161	19,2 (±8,2)	17,2 (±8,2)	0,022
<b>LDL modificada (mg/dL)</b>	13,9 (±21,9)	18,9 (±31,1)	0,350	16,5 (±29,8)	16,3 (±24,0)	0,254
<b>Anti-LDL modificada</b>	7,5 (3,9)	7,9 (±3,8)	0,426	7,7 (±3,9)	7,7 (±3,9)	0,899
<b>Adiponectina</b>	18,0 (±11,0)	17,0 (±9,0)	0,921	18,0 (±10,0)	16,0 (±10,0)	0,476
<b>Leptina</b>	43,0 (±51,0)	58,0 (±48,0)	0,032	57,0 (±63,0)	42,0 (±32,0)	0,908
<b>IL-1β*</b>	70,8 (±57,4)	61,4 (±90,55)	0,795	2,9 (±0,9)	75,5 (±70,7)	0,179
<b>IL-2</b>	22,0 (±41,9)	14,3 (±38,8)	0,748	4,7 (±3,4)	26,4 (±49,7)	0,090
<b>IL-4</b>	18,7 (±40,6)	10,9 (±42,1)	0,399	1,5 (±1,0)	22,4 (±51,0)	0,093
<b>IL-5</b>	34,6 (±59,2)	23,5 (±67,4)	0,236	3,7 (±1,5)	42,5 (±74,2)	0,189
<b>IL-6</b>	32,5 (±60,6)	23,5 (±83,6)	0,423	6,7 (±4,5)	40,5 (±90,8)	0,238
<b>IL-7</b>	30,6 (±52,0)	16,9 (±49,8)	0,076	5,1 (±2,8)	32,7 (±60,9)	0,570
<b>IL-8</b>	36,6 (±48,8)	27,0 (±53,2)	0,418	16,3 (±12,2)	40,6 (±62,7)	0,095
<b>IL-10</b>	39,1 (±67,0)	25,2 (±77,2)	0,132	5,5 (±3,5)	45,5 (±85,9)	0,547
<b>IL-12</b>	24,1 (±40,9)	25,6 (±62,3)	0,690	9,5 (±6,9)	34,3 (±66,0)	0,143
<b>IL-13</b>	25,9 (±53,1)	10,6 (±20,7)	0,129	3,9 (±1,6)	24,0 (±46,9)	0,234
<b>IL-17</b>	33,6 (±58,8)	21,3 (±35,8)	0,523	13,3 (±10,9)	35,3 (±58,8)	0,093
<b>G-CSF</b>	42,8 (±39,1)	37,3 (±37,8)	0,531	30,9 (±20,8)	45,3 (±45,0)	0,272
<b>GM-CSF</b>	41,8 (±57,2)	30,3 (±54,1)	0,384	19,7 (±14,7)	45,5 (±68,2)	0,099
<b>IFN-γ*</b>	102,3 (±69)	96,9 (±72,2)	0,725	94,8 (±65,7)	102,2 (±73,6)	0,634
<b>MCP-1</b>	63,9 (±109,9)	34,3 (±84,5)	0,065	15,0 (±6,7)	68,1 (±119,7)	0,102
<b>MIP-1β</b>	222,9 (±473,2)	89,0 (±284,1)	0,093	18,9 (±6,5)	231,1 (±473,9)	0,321
<b>TNF-α*</b>	34,2 (±41,6)	29,1 (±57,1)	0,658	17,8 (±12,9)	39,9 (±62,1)	0,021

n=291. Grupos estratificados pelas medianas. \*: Variáveis paramétricas (foi utilizado Teste t de Student para obtenção do valor p).

Para as variáveis não-paramétricas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Foi adotado valor de significância p<0,05 para ambos os testes. Apo A-I: apolipoproteína A-I. Apo B: apolipoproteína B. CT: colesterol total. G-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos. GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos. HDL: lipoproteína de alta densidade. HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina. IFN- γ: interferon gama. IL: interleucina. LDL: lipoproteína de baixa densidade. MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1. MIP-1β: proteína inflamatória de macrófago 1β. TNF-α: fator de necrose tumoral α.

Tabela 3 - Perfis lipídico, glicídico e inflamatório de acordo com o percentual de EPA e DHA plasmáticos. São Paulo, 2016.

Variáveis bioquímicas	EPA+DHA (%)		P
	<8,0% (n=120)	≥8,0% (n=171)	
CT (mg/dL)*	204,0 (±38,0)	207,0 (±46,0)	0,555
HDL-C (mg/dL)*	35,9 (±10,1)	38,0 (±9,6)	0,079
LDL-C (mg/dL)*	135,4 (±33,3)	140,2 (±40,4)	0,271
TG (mg/dL)	168,0 (±100,0)	149,0 (±85,0)	0,096
Glicemia em jejum (mg/dL)	109,0 (±39,0)	103,0 (±25,0)	0,394
Apo A-I (mg/dL)*	130,6 (±27,0)	132,3 (±23,6)	0,567
Apo B (mg/dL)*	103,0 (±22,7)	105,4 (±25,9)	0,417
HDL pequena (%)*	20,7 (±6,7)	19,3 (±7,4)	0,095
HDL grande (%)*	28,5 (±8,1)	30,6 (±8,8)	0,043
LDL pequena (%)	3,5 (±4,3)	3,3 (±4,0)	0,561
LDL grande (%)*	26,2 (±5,5)	26,4 (±5,3)	0,733
Tamanho de LDL (nm)	268,0 (±6,0)	268,0 (±5,0)	0,946
HOMA-IR	5,2 (±2,6)	4,4 (±2,8)	0,003
Insulinemia (µIU/mL)	19,3 (±7,7)	17,5 (±8,8)	0,017
LDL modificada (mg/dL)	12,6 (±21,8)	19,1 (±29,9)	0,025
Anti-LDL modificada	7,6 (±3,9)	7,7 (±3,9)	0,946
Adiponectina	16,0 (±11,0)	18,0 (±10,0)	0,219
Leptina	46,0 (±59,0)	52,0 (±41,0)	0,069
IL-1β*	60,4 (±65,3)	71,5 (±76,9)	0,761
IL-2	19,3 (±37,7)	17,4 (±41,8)	0,633
IL-4	18,4 (±42,8)	12,8 (±41,0)	0,320
IL-5	32,4 (±58,6)	27,9 (±65,5)	0,125
IL-6	32,9 (±62,0)	25,7 (±77,8)	0,215
IL-7	32,8 (±55,6)	19,7 (±49,2)	0,014
IL-8	38,9 (±52,9)	28,4 (±50,6)	0,264
IL-10	39,5 (±66,6)	29,1 (±74,7)	0,021
IL-12	25,2 (±45,3)	24,7 (±56,6)	0,507
IL-13	26,8 (±61,9)	14,1 (±25,6)	0,268
IL-17	37,1 (±68,7)	22,9 (±36,2)	0,258
G-CSF	48,0 (±45,1)	36,5 (±34,9)	0,270
GM-CSF	44,1 (±62,8)	32,1 (±52,4)	0,300
IFN-γ*	112,5 (±73,7)	94,1 (±68,9)	0,272
MCP-1	61,9 (±110,9)	42,3 (±92,0)	0,191
MIP-1β	231,2 (±514,5)	118,0 (±320,1)	0,199
TNF-α*	34,9 (±40,8)	29,9 (±54,1)	0,695

n=291. Grupos separados pelo índice ômega-3 de 8% proposto por Harris e von Schacky (2004). \*: Variáveis paramétricas (foi utilizado Teste t de Student para obtenção do valor p). Para as variáveis não-paramétricas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Foi adotado valor de significância p<0,05 para ambos os testes. Apo A-I: apolipoproteína A-I. Apo B: apolipoproteína B. CT: colesterol total. G-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos. GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos. HDL: lipoproteína de alta densidade. HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina. IFN- γ: interferon gama. IL: interleucina. LDL: lipoproteína de baixa densidade. MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1. MIP-1β: proteína inflamatória de macrófago 1β. TNF-α: fator de necrose tumoral α.

**Tabela 4 - Correlações lineares significantes da porcentagem de EPA plasmático. São Paulo, 2016.**

Variáveis bioquímicas	% EPA	P
TG/HDL	r= 0,136	0,020
LDL pequena (%)	r= 0,177	0,003
LDL pequena (mg/dL)	r= 0,162	0,006
Tamanho de LDL (nm)	r= -0,172	0,004
Insulinemia (μIU/mL)	r= -0,132	0,042

n=291. Valor de significância p<0,05 referente ao teste de correlação de Spearman. % EPA: porcentagem de EPA plasmático. HDL: lipoproteína de alta densidade. LDL: lipoproteína de baixa densidade. TG: triglicédeos.

**Tabela 5 - Correlações lineares significantes da porcentagem de DHA plasmático. São Paulo, 2016.**

Variáveis bioquímicas	% DHA	p
TG (mg/dL)	r= -0,246	<0,001
Glicemia em jejum (mg/dL)	r= -0,142	0,015
TG/HDL	r= -0,261	<0,001
HDL grande (mg/dL)	r= 0,235	<0,001
LDL pequena (%)	r= -0,139	0,018
LDL pequena (mg/dL)	r= -0,129	0,029
Tamanho de LDL (nm)	r= 0,198	0,001
HOMA-IR	r= -0,174	0,007

n=291. Valor de significância p<0,05 referente ao teste de correlação de Spearman. % DHA: porcentagem de DHA plasmático. HDL: lipoproteína de alta densidade. HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina. LDL: lipoproteína de baixa densidade. TG: triglicédeos.

**Tabela 6- Correlações lineares significantes da porcentagem de EPA e DHA plasmáticos. São Paulo, 2016.**

Variáveis bioquímicas	% EPA+DHA	p
HOMA-IR	r= -0,205	0,001
LDL modificada (mg/dL)	r= 0,119	0,042
IL-7	r= -0,295	0,015
IL-10	r= -0,321	0,011
Insulinemia (μIU/mL)	r= -0,166	0,010

n=291. Valor de significância p<0,05 referente ao teste de correlação de Spearman. % EPA+DHA: porcentagem de EPA e DHA plasmáticos (ou índice ômega-3). HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina. IL: interleucina. LDL: lipoproteína de baixa densidade.

Tabela 7 – Correlações parciais testadas entre as porcentagens de EPA, DHA plasmáticos analisados isoladamente e somados. São Paulo, 2016.

Variáveis bioquímicas	EPA (%)	p	DHA (%)	p	EPA+DHA (%)	p
<b>Gênero</b>						
TG (mg/dL)	N/S	-	r= -0,793	0,019	N/S	-
Apo A-I (mg/dL)	r=0,794	0,019	N/S	-	r=0,830	0,011
HDL grande (%)	r=0,761	0,028	N/S	-	r=0,814	0,014
LDL pequena (%)	N/S	-	r=-0,766	0,027	N/S	-
Tamanho de LDL (nm)	N/S	-	r=0,743	0,034	N/S	-
HOMA-IR	N/S	-	r=-0,786	0,021	N/S	-
Adiponectina	N/S	-	r=0,821	0,012	r=0,774	0,024
<b>Tabagismo</b>						
Apo A-I (mg/dL)	r=0,792	0,019	N/S	-	r=0,766	0,027
LDL grande (%)	r=0,725	0,042	N/S	-	N/S	-
Adiponectina	N/S	-	r=0,757	0,030	r=0,788	0,020
<b>Idade</b>						
G-CSF	r=0,731	0,039	N/S	-	N/S	-
<b>Uso de estatina</b>						
Apo A-I (mg/dL)	r=0,794	0,019	N/S	-	r=0,790	0,020
HDL grande (%)	r=0,845	0,008	N/S	-	N/S	-
Adiponectina	r=0,889	0,003	r=0,778	0,023	r=0,965	<0,001
<b>Uso de anti-hipertensivo</b>						
Apo A-I (mg/dL)	r=0,823	0,012	N/S	-	r=0,832	0,010
Adiponectina	N/S	-	N/S	-	r=0,714	0,047
<b>Uso de hipoglicemiante</b>						
TG (mg/dL)	N/S	-	r=-0,806	0,016	N/S	-
Apo A-I (mg/dL)	r=0,791	0,019	N/S	-	r=0,755	0,030
HOMA-IR	N/S	-	r=-0,773	0,025	r=-0,766	0,027
<b>IMC</b>						
CT (mg/dL)	r=0,767	0,026	N/S	-	r=0,858	0,006
LDL-C (mg/dL)	N/S	-	N/S	-	r=0,726	0,041
Apo A-I (mg/dL)	r=0,722	0,043	N/S	-	N/S	-
LDL grande (%)	N/S	-	r=0,721	0,043	N/S	-
<b>Circunferência de cintura</b>						
Apo A-I (mg/dL)	r=0,724	0,042	N/S	-	r=0,721	0,044
IL-2	N/S	-	r=0,834	0,010	N/S	-
IL-4	N/S	-	r=0,756	0,030	N/S	-
IL-5	N/S	-	r=0,725	0,042	N/S	-
IL-12	N/S	-	r=0,741	0,035	N/S	-
IL-13	N/S	-	r=0,890	0,003	N/S	-
IL-17	N/S	-	r=0,748	0,033	N/S	-
<b>Gordura corporal (%)</b>						
Apo B (mg/dL)	r=0,872	0,011	N/S	-	N/S	-

n=291. Valor de significância  $p < 0,05$  referente ao teste de correlação parcial. % EPA: porcentagem de EPA plasmático. % DHA: porcentagem de DHA plasmático. % EPA+DHA: porcentagem de EPA e DHA plasmáticos (ou índice ômega-3). N/S: não significante. Apo A-I: apolipoproteína A-I. Apo B: apolipoproteína B. CT: colesterol total. G-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos. HDL: lipoproteína de alta densidade. HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina. IL: interleucina. LDL: lipoproteína de baixa densidade.

## 5. DISCUSSÃO

O estudo mostrou que o EPA e o DHA podem exercer diversos efeitos tanto isoladamente quanto em conjunto.

De acordo com o presente estudo, maiores concentrações plasmáticas de DHA estão associadas com menores níveis de TG em relação ao EPA, e parece estar mais relacionado com tamanhos maiores de LDL e HDL e maiores concentrações relativas de partículas de LDL e HDL grandes. Estas informações foram apresentadas pela **Tabela 2** e pelas fracas correlações lineares, mas foram reforçadas pelos testes de correlações parciais, que mostraram associações fortes. Foram apresentadas também fracas correlações lineares com melhor sensibilidade à insulina, demonstrada pelo menor índice HOMA-IR e menor glicemia em jejum, e estes resultados foram reforçados pelas correlações parciais, que apresentaram fortes associações negativas com o parâmetro HOMA-IR (controladas pelo uso de hipoglicemiante e pelo gênero) e também associações positivas de adiponectina (controladas por gênero, tabagismo, uso de estatinas e anti-hipertensivos), mostrando um possível aumento da secreção do hormônio induzido pela alta taxa de DHA sanguíneo. Estes resultados indicam que níveis mais elevados de DHA no plasma possam ter efeitos benéficos no metabolismo lipídico e glicídico, indicando um perfil mais antiaterogênico e melhor sensibilidade à insulina, fazendo com que haja benefícios adicionais nos desfechos cardiovasculares, como foi demonstrado na literatura (Anderson & Ma, 2009; Arnoldussen & Kiliaan, 2014; Cottin *et al*, 2011; Ma *et al*, 2012; Mozaffarian & Wu, 2012; Russell & Bürgin-Maunders, 2012; Singhal *et al*, 2013). Um dos possíveis mecanismos associados à esta melhora do perfil glicídico e lipídico poderia estar relacionado ao estímulo dos PPAR- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$ . O PPAR- $\gamma$ , expresso principalmente no fígado e no tecido adiposo (marrom e branco), está envolvido na ativação de genes necessários para a diferenciação de fibroblastos em adipócitos e de genes que codificam proteínas necessárias para a síntese e o armazenamento de lipídeos nos adipócitos. O PPAR- $\gamma$  também está relacionado a benefícios no metabolismo de TG e glicose, pois este aumenta a lipólise de TG circulantes, a expressão de receptores de insulina, GLUT-1 e GLUT-4 e ainda estimula a síntese de adiponectina (Ahmadian *et al*, 2013; Berger & Moller, 2002; Kersten *et al*, 2000). A ativação do PPAR- $\gamma$  pelo DHA poderia explicar como houve esta associação positiva com adiponectina, como também a ativação do fator de transcrição pelos metabólitos do DHA, a resolvína E1 e a neuroprotectina D1, que estão relacionados com o aumento de adiponectina plasmática e a mimetização da insulina nos receptores de insulina (Anderson & Ma, 2009; Cottin *et al*, 2011; Russell & Bürgin-Maunders, 2012). Já o PPAR- $\alpha$  é expresso no fígado, no rim, no coração, no músculo esquelético e no tecido adiposo marrom. O PPAR- $\alpha$  ativa os genes necessários para a captação e a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos. O

PPAR- $\alpha$ , assim como o PPAR- $\gamma$ , regula expressão da lipase lipoproteica e a lipase de triacilglicerol adiposo, que têm papel central em catalisar a hidrólise de TG. O PPAR- $\alpha$  também suprime a expressão hepática de SREBP-1 (*sterol regulatory element-binding protein-1*), um fator de transcrição responsável por ativar genes envolvidos na síntese de ácidos graxos, além de aumentar a síntese de HDL (Ahmadian *et al*, 2013; Berger & Moller, 2002; Kersten *et al*, 2000; Pudyal *et al*, 2011). Este pode ser o mecanismo de ação hipotriacilgliceridêmica e de aumento de HDL do DHA.

Quanto ao EPA, o estudo mostrou alguns resultados inconsistentes com a literatura, como a falta de associação com efeitos hipotrigliceridêmicos, a associação com altos níveis de partículas pequenas de LDL, diminuição de HDL-C e baixos níveis de Apo A-I e HDL-C, evidenciados pelas correlações lineares (que foram fracas) e pela **Tabela 2**. Em contrapartida, as correlações parciais foram fortes e exibiram efeito contrário, como associações positivas com partículas grandes de HDL (controlado pelo gênero e uso de estatinas), LDL (controlado pelo tabagismo) e Apo A-I (controlado pelo gênero, tabagismo, uso de estatinas, hipoglicemiantes e anti-hipertensivos, IMC e CC), que foi o resultado mais marcante do EPA. Esta associação com a Apo A-I indica que há uma relação do EPA com o aumento das lipoproteínas de alta densidade, podendo indicar também que alta concentração plasmática de EPA melhora o perfil lipídico e pode ser fator protetor para doenças cardiovasculares. Além disso, EPA também parece ter relação com melhor metabolismo de glicose, indicado pelo menor valor de HOMA-IR (**Tabela 2**) e insulinemia (**Tabela 2** e **Tabela 4**), porém o DHA parece ser mais eficiente que o EPA nestes quesitos. Para os benefícios do EPA em relação a sensibilidade à insulina, o possível mecanismo de ação é a ativação do PPAR- $\gamma$ , como foi citado acima. Agora em relação ao benefício do EPA no perfil lipídico apresentado, este pode ser explicado pelo mecanismo de ativação do PPAR- $\alpha$ , que estimula a expressão de Apo A-I, indicando um aumento da síntese de HDL (Ahmadian *et al*, 2013; Berger & Moller, 2002; Kersten *et al*, 2000; Pudyal *et al*, 2011). Não foi encontrada nenhuma associação do EPA com o efeito hipotrigliceridêmico consistente com a literatura (Anderson & Ma, 2009; Arnoldussen & Kiliaan, 2014; Cottin *et al*, 2011; Ma *et al*, 2012; Mozaffarian & Wu, 2012; Russell & Bürgin-Maunder, 2012; Singhal *et al*, 2013).

Já o índice ômega-3 (EPA e DHA) plasmático indica que valores maiores que 8% apresentam associações com maior nível de partículas grandes de HDL, menor índice HOMA-IR e menor insulinemia (**Tabela 2**). As correlações lineares, apesar de fracas, reforçaram esta ideia e as correlações parciais apresentaram associações positivas com Apo A-I (controladas por gênero, tabagismo, uso de estatinas, anti-hipertensivos e hipoglicemiantes e CC), com adiponectina (controladas por gênero, tabagismo, uso de estatinas e anti-hipertensivos) e com HOMA-IR (controladas por hipoglicemiantes). Desta forma, parece que o índice ômega-3 plasmático maior que

8% é fator antiaterogênico e antidiabetogênico, pois parece melhorar o perfil de HDL plasmático e a sensibilidade à insulina, assim como foi demonstrado na literatura (Anderson & Ma, 2009; Arnoldussen & Kiliaan, 2014; Cottin *et al*, 2011; Ma *et al*, 2012; Mozaffarian & Wu, 2012; Russell & Bürgin-Maunders, 2012; Singhal *et al*, 2013). O provável mecanismo de ação envolvido nestes resultados é a ativação do PPAR- $\alpha$  e do PPAR- $\gamma$ , tendo o efeito hipotrigliceridêmico e aumentando a expressão de Apo A-I, a síntese de HDL, e a expressão de adiponectina, melhorando os parâmetros cardiometabólicos (Ahmadian *et al*, 2013; Berger & Moller, 2002; Kersten *et al*, 2000; Pudyal *et al*, 2011).

O índice ômega-3 cumpre muitos dos requerimentos para um fator de risco incluindo evidência epidemiológica consistente, um mecanismo de ação plausível, um ensaio reprodutível, independência de fatores de risco clássicos, modificabilidade, e, o mais importante, a demonstração que o aumento do índice levará a uma redução do risco de eventos cardíacos (von Schacky, 2014; Harris, 2008). O trabalho de Albert *et al* (2002), em que foi demonstrado que o índice ômega-3 plasmático maior que 6,87% se associou com risco 81% menor de morte cardíaca súbita em relação ao grupo com índice 3,58%, indicando melhores parâmetros cardiometabólicos, apesar de não terem sido avaliados no estudo. Além deste estudo, a literatura mostra que o aumento do índice ômega-3 de membranas eritrocitárias está relacionado a redução da frequência cardíaca e sua variabilidade, a redução da pressão arterial, a redução da agregação plaquetária, a redução de triglicerídeos, a aumento do tamanho das LDL e das HDL, a diminuição das VLDL, e a diminuição de citocinas pró-inflamatórias. A literatura mostra também que valores mais altos da soma de EPA e DHA estão associados com baixo risco de mortalidade geral, parada cardíaca súbita e infarto fatal e não fatal do miocárdio, mas em países ocidentais é mais raro observar índices acima do ponto de corte proposto, pois só em países asiáticos, onde o consumo de frutos do mar é alto, se observa, com maior facilidade, valores acima de 8% (von Schacky, 2014; Harris, 2008). No estudo de Block *et al* (2007) foi examinado as relações entre o uso relatado de suplemento óleo de peixe e a distribuição do índice ômega-3 em 768 controles de síndrome coronariana aguda. Apenas 1% dos participantes que não relataram uso de peixe apresentou índice ômega-3 de 8% ou mais, enquanto dos que relataram uso de suplemento apenas 17% tinham o índice nesta faixa. No grupo que foi relatado o uso de suplementos, a maioria estava na faixa de 4% a 8% do índice (64%), enquanto isso no grupo em que o uso não foi relatado a maioria estava na faixa abaixo de 4% do índice, considerado de alto risco cardiovascular (Harris & von Shacky, 2004), então isso mostra que o ponto de corte de 8% parece inatingível, já que mesmo com o suplemento de óleo de peixe a maioria dos controles não conseguiu alcançar o índice proposto. São necessários mais estudos aprofundados para a determinação do ponto de corte do



índice ômega-3, pois este parâmetro parece vantajoso de se utilizar, pois este é um fator de risco modificável que indica o risco cardiovascular do indivíduo, e também fornece aos nutricionistas um alvo terapêutico com potencial de reduzir o risco de morte por doenças cardiovasculares (Harris & von Schacky, 2004). Uma limitação do estudo atual foi a utilização da soma de EPA e DHA plasmáticos, o que não reflete necessariamente o conteúdo destes ácidos graxos nas membranas celulares, mas mesmo assim os ácidos graxos plasmáticos se correlacionam com o conteúdo celular – da mesma forma que a glicemia e a HbA1c se relacionam (von Schacky & Harris, 2007).

Quanto à modulação das citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, o resultado apresentado pelo EPA e DHA isoladamente e em conjunto não ficou consistente com a literatura (Anderson & Ma, 2009; Arnoldussen & Kiliaan, 2014; Cottin *et al*, 2011; Ma *et al*, 2012; Mori & Woodman, 2006; Mozaffarian & Wu, 2012; Russell & Bürgin-Maunders, 2012).

Uma limitação importante do estudo é o fato dele ser transversal, pois isso não indica de fato uma causalidade. Então seria necessária uma investigação acompanhada para se obter mais informações de como o EPA e DHA isoladamente e em conjunto se comportam nas doenças cardiovasculares. Outras limitações seriam o fator de confusão causado pelos medicamentos, pois este estudo mostrou que há influência destes nos efeitos de EPA e DHA, e o fato de a maioria dos participantes utilizar estes medicamentos. Serão necessários mais estudos prospectivos e intervencionais controlados por placebo para se avaliar os efeitos diferenciais de EPA e DHA na inflamação e nas doenças cardiovasculares.

## 6. CONCLUSÃO

Os ácidos graxos plasmáticos EPA e DHA se correlacionaram com alguns marcadores cardiovasculares e de metabolismo glicídico. DHA parece apresentar melhor efeito hipotrigliceridêmico e efeito na sensibilidade insulínica pela regulação da adiponectina em relação ao EPA. Já o EPA parece ser mais potente que o DHA na modulação das lipoproteínas. Em conjunto, parece que alguns dos efeitos se somam. Com isso, afirma-se que concentrações mais altas de EPA e/ou DHA trazem benefícios cardiometabólicos, principalmente pela redução de TG, aumento da sensibilidade à insulina e aumento de HDL.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmadian, M; Suh, JM; Hah, N; Liddle, C; Atkins, AR; Downes, M; Evans, RM. *PPAR- $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future*. Nature Medicine, 2013.

Akoh, CC; Min, DB. *Food Lipids*. 2<sup>nd</sup> edition. Marcel Dekker, 2002.

Albert, CM; Campos, H; Stampfer, MJ; Ridker, PM; Manson, JE; Willett, WC; Ma, J. *Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death*. N Engl J Med, Vol. 346, No. 15, 2002.

American Heart Association (AHA). *Heart Disease and Stroke Statistics 2014 Update: a Report from the American Heart Association*. Dallas, Texas. American Heart Association, Circulation, 2014.

Anderson, BM; Ma, DWL. *Are all  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids created equal?* Lipids in Health and Disease, 2009.

Arnoldussen, IAC; Kiliaan, AJ. *Impact of DHA on Metabolic Diseases from Womb to Tomb*. Marine Drugs 2014, 12, 6190-6212.

Armstrong, JM. Linemeyer, DL. *Obesity*. In: Felig, P; Frohmann, LA. *Endocrinology & Metabolism*. 4<sup>th</sup> ed. USA: McGraw Hill, 2001. p. 945-79.

Berger, J; Moller, DE. *The Mechanisms of Action of PPARs*. Annu. Rev. Med., 2002. 53:409-35.

Bligh, EG; Dyer, WJ. *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. 1959; 37(8):911-7.

Block, RC; Harris, WS; Reid, KJ; Sands, SA; Spertus, JA. *EPA and DHA in blood cell membranes from acute coronary syndrome patients and controls*. Elsevier. Atherosclerosis 197 (2008) 821-828.

Cottin, SC; Sanders, TA; Hall, WL. *The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors*. Proceedings of the Nutrition Society; 70, 215-231; 2011.

Faulin, TES; Sena, KC; Telles AER; Grosso, DM; Faulin, EJB; Abdalla, DSP. *Validation of a novel ELISA for measurement of electronegative low-density lipoprotein*. Clin Chem Lab Med 2008;46(12):1769-1775.

Faulin, TES; Sena-Evangelista, KCM; Pacheco, DB; Augusto, EM; Abdalla, DSP. *Development of immunoassays for anti-electronegative LDL autoantibodies and immune complexes*. Clin Chim Acta, 2012;413:291-297.

Friedewald, WT; Levy, RI; Fredrickson, DS. *Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge*. The American Association of Clinical Chemists, Inc. Vol. 18, issue 6; 1972.

Harris, WS. *The omega-3 index as a risk factor for coronary heart disease*. Am J Clin Nutr 2008; 87(suppl):1997S-2002S.

Harris, WS; von Schacky, C. *The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease?* Elsevier, Preventive Medicine 39 (2004) 212-220.

Institute of Medicine (IOM). Committee on Preventing the Global Epidemic of Cardiovascular Disease: Meeting the Challenges in Developing Countries. *Promoting cardiovascular health in the developing world: a critical challenge to achieve global health*. Washington DC: National Academies Press (US); 2010.

Karkow, FJ. *Tratado de Metabolismo Humano*. Livraria e Editora Rubio, 2010.

Kersten, S; Desvergne, B; Wahli, W. *Roles of PPARs in health and disease*. Nature, 2000.

Lohman, TG; Roche, AF; Martorell, R. *Anthropometric standardization manual*. Champaign, IL: Human Kinetics; 1988.

Ministério da Saúde (MDS). *Saúde Brasil 2008*. Brasília/DF, 2009.

Ma, Y; Lindsey, ML; Halade, GV. *DHA derivatives of fish oil as dietary supplements: a nutrition-based drug discovery approach for therapies to prevent metabolic cardiotoxicity*. Expert Opin Drug Discov, 2012; 7(8): 711-721.

Mori, TA; Woodman, RJ. *The independent effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular risk factor in humans*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2006; 9:95-104.

Mozaffarian, D et al. *Plasma Phospholipid Long-Chain Omega-3 Fatty Acids and Total and Cause-Specific Mortality in Older Adults: the Cardiovascular Health Study*. Ann Intern Med. 2013; 158(7): 515-525.

Mozaffarian, D; Wu, JHY. *(n-3) Fatty Acids and Cardiovascular Health: Are Effects of EPA and DHA Shared or Complementary?* The Journal of Nutrition, American Society for Nutrition, 2012.

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.

Porth, CM; Matfin, G. *Fisiopatologia*. 8ª edição. Guanabara Koogan, 2010.

Poudyal, H; Panchal, SK; Diwan, V; Brown, L. *Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action*. Elsevier, Progress in Lipid Research 50 (2011) 372-387.

Russell, FD; Bürgin-Maunders, CS. *Distinguishing Health Benefits of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids*. Marine Drugs 2012, 10, 2535-2559.

Singhal, A *et al*. *Docosahexaenoic Acid Supplementation, Vascular Function and Risk Factors for Cardiovascular Disease: A Randomized Controlled Trial in Young Adults*. Journal of the American Heart Association, 2013.

Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC). *VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão*. Arq Bras Cardiol; 95(1 supl.1): 1-51, 2010.

Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC). *V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose*. Arq Bras Cardiol; Volume 101, n°4, supl. 1, 2013.

Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes*, 3ª edição. Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009.

Stern, ES; Williams, K; Ferrannini, E; DeFronzo, RA; Bogardus, C; Stern, MP. *Identification of Individuals With Insulin Resistance Using Routine Clinical Measurements*. Diabetes, vol. 54; 2005.

von Schacky, C. *Omega-3 index and cardiovascular health*. Nutrients 2014, 6, 799-814.

von Schacky, C; Harris, WS. *Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids*. Elsevier. Cardiovascular Research 73 (2007) 310-315.

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

World Health Organization (WHO). *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*. B editors. World Health Organization, Geneva 2011.

World Health Organization (WHO). *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation*. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization, 2000.