

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Nutrição Experimental

Efeito do uso combinado de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 e
estatinas sobre biomarcadores do estresse oxidativo em mulheres com
dislipidemia

Mariana de Magalhães Carrapeiro

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa.Dra. Inar Alves de Castro

São Paulo
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Nutrição Experimental

Efeito do uso combinado de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 e
estatinas sobre biomarcadores do estresse oxidativo em mulheres com
dislipidemia

Mariana de Magalhães Carrapeiro

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa.Dra. Inar Alves de Castro

São Paulo
2010

Mariana de Magalhães Carrapeiro

Efeito do uso combinado de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 e
estatinas sobre biomarcadores do estresse oxidativo em mulheres com
dislipidemia

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Inar Alves de Castro
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

A meus pais, **Sidnei** e **Miriam**, minha irmã **Juliana**,
e minhas avós, **Eurídice** e **Sirlei**, pelo amor, carinho, apoio
e incentivo durante todos esses anos dedicados aos estudos.

E ao **Felipe**, que fez com que o final dessa caminhada
se tornasse bem mais leve com todo seu carinho e companheirismo...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde e capacidade de realizar este trabalho.

A minha orientadora, Professora **Inar**, pelos 5 anos de aprendizado, pela paciência, confiança e amizade. E, principalmente, por ter me orientado de verdade na realização deste projeto.

Aos **meus familiares**, pelas orações, pela torcida, por todo o incentivo e interesse no meu trabalho.

A todos os colegas de laboratório (**Ana Carolina, Arthur, Camile, Caroline, Cláudia, Cristina, Cyntia, Daniel, Flávia, Gabriel, Karina, Luciene, Marliz, Natália, Patrícia, Roberto, Vânia e Vitor**) pelo apoio, auxílio nas análises, pela amizade e, principalmente, pelos momentos de descontração.

Um agradecimento especial à **Natália**, aluna de iniciação científica desse projeto, por sua dedicação incansável, pelo interesse constante e por entender minha neura de organização. Esse trabalho não seria possível sem a sua colaboração!

À **Patrícia**, pela companhia nas aventuras internacionais, nas angústias do dia-a-dia e por toda a ajuda nas análises.

À **Luciene** e à **Marliz**, por sempre esclarecerem minhas dúvidas de química e informática e pela amizade tão especial que cultivamos desde os tempos da iniciação.

À **Lurdinha e Joana**, pela atenção, carinho e pelos tão necessários cafezinhos!

Ao **Prof. Julio Tirapegui** e todos os amigos do laboratório de Bioquímica da Nutrição **Carol, Daiana, Emídio, Gabriela, Ivanir, Leonardo, Lucas, Michele e Tatyana**, por todos os empréstimos, dúvidas esclarecidas, metodologias compartilhadas, pelos momentos de descontração e por ajudarem a carregar os pesos do mestrado, literalmente!

À **Aline, Lúcia, Neuza, Tânia** e todos os **Professores** do Laboratório de Bioquímica de Alimentos por toda a cooperação em todos esses anos.

À todos os amigos que fiz no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP ao longo desses 5 anos.

Aos professores das disciplinas que cursei durante o mestrado.

Aos professores que participaram da banca de qualificação e de defesa e também àqueles que me ajudaram quando foi preciso.

À minhas amigas **Aline Paz, Jennifer Rodrigues, Kelen Martins, Mariana Garbi, Mariana Novais, Paula Kosaka, Patrícia Pontilho e Tatiane Bottan**, pela amizade mantida apesar dos diferentes caminhos percorridos.

Ao **Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP e à **Comissão de Pós-Graduação**, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao **Edílson, Cléo e Mônica**, da Secretaria do Bloco 14, por todo o auxílio e atenção.

À **Elaine e Jorge**, da Secretaria de Pós-Graduação, pela atenção disponibilizada.

Aos **voluntários**, pela valiosa contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP**, pela concessão do auxílio financeiro para a realização da pesquisa e da bolsa de estudo.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. Caracterização do estresse oxidativo.....	18
2.2. Estresse oxidativo e doenças cardiovasculares	21
2.3. Estatinas.....	24
2.4. Ácidos graxos poliinsaturados Omega-3	27
3. OBJETIVOS	36
3.1. Hipóteses.....	36
3.2. Objetivo Geral.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. Material.....	37
4.1.1. Ácidos Graxos Ômega 3	37
4.1.2. Reagentes.....	37
4.2. Delineamento Experimental.....	38
4.3. Métodos.....	40
4.3.1. <i>Análise do perfil de ácidos graxos das cápsulas de óleo de peixe e óleo de soja e milho</i>	40
4.3.2. <i>Análise da concentração sérica de glicose, lipoproteínas e proteína C reativa</i>	42
4.3.3. <i>Análise do perfil de ácidos graxos no plasma</i>	42
4.3.4. <i>Determinação dos biomarcadores do estresse oxidativo</i>	43
4.3.5. <i>Cálculo da ingestão energética, de macro e micronutrientes.....</i>	51
4.4. Análise Estatística	51
5. RESULTADOS	53
5.1. Análise do perfil de ácidos graxos do óleo contido nas cápsulas	53
5.2. Características basais da população de estudo	55
5.3. Parâmetros bioquímicos e antropométricos avaliados antes e após o período de intervenção.....	57
5.4. Perfil de ácidos no plasma antes e após o período de intervenção.....	69
5.5. Ingestão de energia, macro e micronutrientes antes e após o período de intervenção.....	69
6. DISCUSSÃO	72

7.	CONCLUSÕES	77
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
9.	REFERENCIAS.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Perfil dos principais ácidos graxos das cápsulas de óleo de peixe ou óleo de soja/milho.	54
Tabela 2 Características basais da população de estudo (n=45).	56
Tabela 3 Parâmetros bioquímicos e antropométricos avaliados antes e após o período de intervenção.	58
Tabela 4 Concentrações plasmáticas de α -, δ -, e γ -tocoferol avaliadas antes e após o período de intervenção.	59
Tabela 5 Atividade e expressão protéica das enzimas antioxidantes	60
Tabela 6 Perfil dos principais ácidos graxos avaliados no plasma dos indivíduos antes e após a intervenção.	70
Tabela 7 Ingestão de energia, macro e micronutrientes antes e após o período de intervenção.	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Desenvolvimento e progressão da aterosclerose.....	23
Figura 2 Esquema da síntese do colesterol.....	25
Figura 3 Estrutura química das estatinas empregadas clinicamente.....	26
Figura 4 Estrutura química do HMG-CoA.....	26
Figura 5 Ácidos graxos poliinsaturados da família Omega 3.....	29
Figura 6 Ácidos graxos da família Omega 6.....	29
Figura 7 Esquema da formação de AA, EPA e DHA a partir de LA e ALA por meio de reações de alongamento e dessaturação.....	31
Figura 8 Fatores de transcrição influenciados pelos ácidos graxos poliinsaturados Omega 3.....	33
Figura 9 Mecanismos potenciais da modulação de triacilgliceróis por ácidos graxos poliinsaturados Omega 3 (EPA e DHA).....	34
Figura 10 Esquema do planejamento experimental.	39
Figura 11 Sequência de reações da determinação da atividade da enzima GPx.....	47
Figura 12 Detecção de Western Blotting da SOD, catalase e β -actina nos 4 grupos após 42 dias de suplementação.....	61
Figura 13 Superfície de Resposta para a alteração de LDL em função da ausência (-1) ou presença (+1) das variáveis, Omega e Estatina.	62
Figura 14 Efeitos principais e da interação na alteração de LDL.....	62
Figura 15 Superfície de Resposta para a redução de TG em função da ausência (-1) ou presença (+1) das variáveis.	63
Figura 16 Efeitos principais e da interação na redução de TG.....	64
Figura 17 Superfície de Resposta para o aumento da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) em função da ausência (-1) ou presença (+1) das variáveis.....	65
Figura 18 Efeitos principais e da interação no aumento da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD).	65
Figura 19 Superfície de Resposta para o aumento da expressão protéica da enzima Superóxido Dismutase (SOD) em função da ausência (-1) ou presença (+1) das variáveis.....	66
Figura 20 Efeitos principais e da interação na alteração da expressão protéica da enzima Superóxido Dismutase (SOD).....	66

Figura 21 Superfície de Resposta para o aumento da expressão protéica da enzima catalase em função da ausência (-1) ou presença (+1) das variáveis.....	67
Figura 22 Efeitos principais e da interação no aumento da expressão protéica da enzima catalase.	67
Figura 23 Superfície de Resposta para a formação de MDA em função da ausência (-1) ou presença (+1) das variáveis.....	68
Figura 24 Efeitos principais e da interação na formação de MDA.	69
Figura 25 Efeito da suplementação com AGPI n-3 sobre o estresse oxidativo	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
ACC	acetil coenzima A carboxilase
AG	ácidos graxos
AGNE	ácidos graxos não esterificados
AGPI n-3	ácidos graxos poliinsaturados Omega 3
ALA	ácido alfa linolênico
AOCS	American Oil Chemists' Society
ApoB-100	apolipoproteína B-100
AVC	acidente vascular cerebral
CC/CQ	razão entre as circunferências da cintura e do quadril
COX	cicloxygenase
CT	colesterol total
DCV	doenças cardiovasculares
DGAT	acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase
DHA	ácido docosaexaenóico
DPA	ácido docosapentaenóico
EPA	ácido eicosapentaenóico
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
FAS	ácido graxo sintase
FDA	Food and Drug Administration
FXR	receptor farnesóide X
GLA	ácido gama linolênico
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
HDL	lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	3-hidróxi-3-metil-glutaril coenzima A
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IDL	lipoproteína de densidade intermediária
IMC	índice de massa corporal
iNOS	óxido nítrico sintase induzível

LA	ácido linoléico
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LOX	lipoxigenase
LPL	lipase de lipoproteína
LXR	receptor X do fígado
NADP+	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF κ B	fator nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	proteína C reativa
PPARs	receptores ativados por proliferadores de peroxissomos
RXR	receptor retinóide X
SOD	superóxido dismutase
SREBP-1c	proteína ligada ao elemento regulado por esterol 1c
STD	ácido estearidônico
TG	triacilgliceróis
UA	unidade de atividade
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa

EFEITO DO USO COMBINADO DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS ÔMEGA 3 E ESTATINAS SOBRE BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES COM DISLIPIDEMIA

Alimentos e suplementos adicionados de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3, tais como os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA), tem sido comercializados com a alegação funcional de reduzir as concentrações de triacilgliceróis (TG) e, assim, reduzir o risco para doenças cardiovasculares. Entretanto, pelo fato desses ácidos graxos apresentarem uma cadeia carbônica altamente insaturada, o consumo crônico em doses elevadas poderia levar a um aumento da susceptibilidade do organismo ao estresse oxidativo. O desequilíbrio nos processos oxidativos pode ser um agravante em indivíduos dislipidêmicos, uma vez que essa população normalmente controla as altas concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL) com medicamentos como as estatinas, e a oxidação da LDL é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento da aterosclerose. Uma vez que a proposta dos alimentos funcionais e suplementos nutracêuticos é de agir como coadjuvantes à prescrição terapêutica, indivíduos sob tratamento a base de estatinas seriam um público-alvo para produtos adicionados de ácidos graxos ômega 3. Desta forma, a proposta deste estudo foi de avaliar o efeito de uma suplementação contendo EPA e DHA sobre alguns biomarcadores do estresse oxidativo em mulheres com dislipidemia controlada por estatinas. Seguindo delineamento *crossover* duplo cego, 45 indivíduos foram distribuídos em 4 grupos e receberam a seguinte suplementação: cápsulas de óleo de milho/soja, sem estatina (Placebo); cápsulas de milho/soja, com estatina (Estatina); cápsulas de óleo de peixe, sem estatina (Omega 3); cápsulas de óleo de peixe, com estatina (Combinado). Os indivíduos foram orientados a consumir 4 cápsulas (2,3 g de EPA e DHA) por dia durante 42 dias. Foram realizadas coletas de sangue antes e após o período de intervenção para análise das concentrações séricas de glicose, lipoproteínas, perfil de ácidos graxos no plasma e marcadores do estresse oxidativo. A suplementação com EPA e DHA na dosagem de 2,3 g/dia foi efetiva na redução das concentrações séricas de LDL e TG apenas na presença de estatinas, confirmando o uso combinado desses compostos para melhoria do perfil lipoprotéico. Por outro lado, essa suplementação parece induzir um aumento do estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento da concentração plasmática de malondialdeído, provavelmente decorrente da redução da expressão da catalase promovida pelos AGPI n-3.

Palavras-chave : Ômega 3. EPA. DHA. Estresse oxidativo. Humanos.

EFFECT OF OMEGA 3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS SUPPLEMENTATION COMBINED WITH STATINS ON OXIDATIVE STRESS MEASURED IN DYSLIPIDEMIC WOMEN

Food and supplements that contain n-3 fatty acids, such as eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids, have been commercialized using functional claim to reduce triacylglycerol (TG) concentration and, hence, reduce the risk of cardiovascular diseases. However, as these fatty acids are highly unsaturated, the chronic consumption in high doses could raise the susceptibility of the organism to oxidative stress. Oxidative processes imbalance can be a problem in dyslipidemic individuals, once this population usually controls the high concentration of low density lipoproteins (LDL) with drugs such as statins, and oxidation of LDL is one of the most important factors to the atherosclerosis development. Since functional foods and nutraceutical supplements are supposed to contribute to the therapeutic prescription, dyslipidemic individual under statins treatment could be the target to products containing n-3 fatty acids. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of a supplementation containing EPA and DHA on some biomarkers of oxidative stress in women with dyslipidemia controlled by statins. A randomized double-blind placebo-controlled crossover study was carried out with 45 women who were distributed into 4 groups that received the following supplementation: corn/soy oil capsules, no statin (Placebo); corn/soy oil capsules, with statin (Statin); fish oil capsules, no statin (Omega 3); fish oil capsules, with statin (Combined). The individuals were instructed to consume 4 capsules (2.3 g of EPA and DHA) every day during 42 days. Blood samples were collected before and after the supplementation to evaluate serum glucose and lipoprotein concentrations, plasma fatty acid profile and biomarkers of oxidative stress. N-3 PUFA supplementation (2.3 g/day) was effective in reducing serum LDL and TG concentrations only when combined with statins, confirming the combined use of these compounds for improvement of lipoprotein profile. On the other hand, this supplementation seemed to induce an increase of the oxidative stress, evidenced by the higher malondialdehyde plasma concentrations, probably due to the reduction in catalase expression promoted by n-3 PUFA.

Keywords : Omega 3. EPA. DHA. Oxidative stress. Human.

1. INTRODUÇÃO

Alimentos e suplementos adicionados de ácidos graxos poliinsaturados Omega 3 (AGPI n-3), tais como os ácidos eicosapentaenóico (EPA, C20:5) e docosaexaenóico (DHA, C22:6) tem sido comercializados pelas indústrias com a alegação funcional de reduzir as concentrações de triacilgliceróis (TG) e, conseqüentemente, promover uma redução de risco para doenças cardiovasculares (DCV). Entretanto, pelo fato desses ácidos graxos apresentarem uma cadeia carbônica altamente insaturada, o consumo crônico em doses elevadas poderia levar a um aumento da susceptibilidade do organismo ao estresse oxidativo (HANWELL, et al., 2009; HIGDON et al., 2001).

Várias pesquisas têm ressaltado a importância do estresse oxidativo no desenvolvimento das DCV. Esse estresse pode ser definido como a ruptura da sinalização e do controle redox. Evidências indicam que as reações oxidativas estão envolvidas nos principais processos patológicos, incluindo doenças cardiovasculares, pulmonares, neurodegenerativas e câncer (JONES, 2006).

A oxidação de moléculas lipídicas e protéicas presentes nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) tem sido considerada como um dos principais fatores de risco para desenvolvimento e progressão da aterosclerose (NIKI, 2009). Desta forma, o desequilíbrio nos processos oxidativos pode ser um agravante em indivíduos dislipidêmicos, uma vez que as concentrações de LDL e/ou TG dessa população já apresentam valores alterados. De acordo com as diretrizes do “National Cholesterol Education Program” (2004), a prescrição de medicamentos deve ser considerada para pacientes com risco moderado que, apesar de se submeterem a uma dieta apropriada, prática regular de atividade física, e perda de peso, apresentem ainda concentrações elevadas de LDL (≥ 160 mg/dL).

Os inibidores de HMG-CoA redutase (3-hidróxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase), conhecidos como estatinas são os medicamentos mais amplamente utilizados no controle das dislipidemias (CHOY et al., 2004). Estudos indicam que a terapia com estatinas é o meio mais efetivo de redução dos níveis de colesterol, inibindo portanto a progressão da aterosclerose e reduzindo a incidência de doenças

cardiovasculares (PENUHMATSA et al., 2007). Além do efeito na redução de colesterol, estudos demonstram que as estatinas podem promover também melhorias na função endotelial, efeito anti-hipertensivo, aumento da estabilidade da placa aterosclerótica, diminuição da inflamação e segundo alguns estudos, poderiam apresentar efeito antioxidante (CANGEMI, et al., 2007; NIROGI, MUDIGONDA; KANDIKERE, 2007; TOUSOLIS, et al., 2007).

Uma vez que a proposta dos alimentos e suplementos funcionais é de agir como coadjuvantes à prescrição terapêutica, indivíduos que controlam dislipidemia através de estatinas seriam um público-alvo para produtos adicionados de AGPI n-3. Desta forma, a proposta deste estudo foi de avaliar o efeito da combinação da ingestão crônica de AGPI n-3 em mulheres submetidas à terapia a base de estatinas sobre alguns biomarcadores do estresse oxidativo.

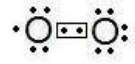
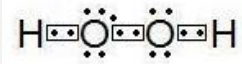
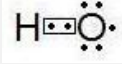
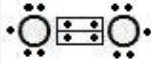
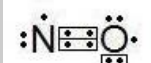

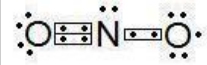
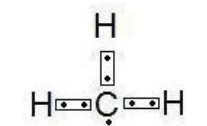
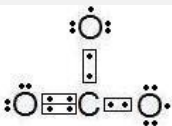
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Caracterização do estresse oxidativo

Em 1985, Sies definiu o estresse oxidativo como “um distúrbio no estado de equilíbrio dos sistemas pró-oxidantes/antioxidantes em células intactas”. Para a manutenção da homeostase dos tecidos, organismos multicelulares dependem de complexas redes de sinais intra e extracelulares que possibilitam a comunicação entre as células. Assim, embora a definição clássica do estresse oxidativo tenha sido útil no direcionamento das pesquisas por duas décadas, estudos de intervenção com antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo, indicam que uma definição contemporânea mais adequada seria “uma ruptura da sinalização e do controle redox” (JONES, 2006).

O fornecimento de energia para realização de processos vitais aos organismos aeróbios depende de reações de oxidação. Essas reações geram radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), que não são apenas subprodutos prejudiciais, mas também são participantes essenciais na sinalização e regulação celular, com importante papel nas reações de biossíntese, defesa química e funções de detoxificação. No **Quadro 1** estão relacionadas as principais espécies reativas de importância biológica. Quando presentes em excesso, os radicais livres podem promover alterações em moléculas de DNA, proteínas, carboidratos e lipídios. A oxidação das biomoléculas pode levar a apoptose ou a lesão em tecidos associados ao desenvolvimento de diversas patologias, incluindo câncer, doenças hepáticas e aterosclerose (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; FRANKEL, 2005).

Quadro 1: Principais espécies reativas de importância biológica. (Adaptado de Laurindo, 2005).

Elemento Centralizador	Radical	Propriedades
Oxigênio	<p>Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)</p>  <p>Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)</p>  <p>Hidroxila (OH^{\bullet})</p>  <p>Oxigênio singlete (1O_2)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Provável mediador de sinais em vasos. Relativamente pouco reativo, atravessa membranas celulares através de canais aniônicos. - Relativamente inerte <i>per se</i>, pode entretanto dar origem a radicais tóxicos. Bastante difusível e permeia membranas. - O mais potente oxidante conhecido passível de ser formado em condições biológicas. - Não é um radical, mas sim o produto da excitação energética de um elétron da última camada, por exemplo, por radiação ionizante. Significado biológico possível mas não confirmado.
Nitrogênio	<p>Óxido nítrico (NO^{\bullet})</p>  <p>Peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$)</p>  <p>Dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet})</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Radical livre gasoso, é um fator relaxante derivado do endotélio. Relativamente pouco reativo <i>per se</i>. Lipossolúvel e altamente difusível trans-membranas. - Dá origem a um oxidante potente. Propriedades vasodilatadoras cujo mecanismo é ainda incerto. - É um potente intermediário capaz de nitrar resíduos de proteínas.
Carbono	<p>Metila</p>  <p>Carbonato</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Possível envolvimento em modificações do DNA. - Subproduto do peroxinitrito. Potente oxidante. Efeitos biológicos têm se tornado evidentes.

As células desenvolveram um eficiente e sofisticado sistema de defesa antioxidante para controlar a formação de radicais livres e limitar seus efeitos prejudiciais. No citoplasma, os principais mecanismos de defesa são enzimáticos, enquanto no plasma, pequenas moléculas respondem pela maior parte do poder antioxidante (FÖRSTERMANN, 2008). Quando esses mecanismos são esgotados por excesso de produção de radicais livres, ou quando tais mecanismos não são acessíveis ou perdem a eficiência para tamponar o efeito dessas espécies, ocorre o estresse oxidativo (LAURINDO, 2005). Resumidamente, o sistema de defesa antioxidante consiste de:

(a) Agentes que removem cataliticamente os radicais livres e outras espécies reativas, como por exemplo as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.

(b) proteínas que minimizam a disponibilidade de pro - oxidantes como íons ferro e cobre, como por exemplo as transferrinas e metalotioneínas. Essa categoria também inclui proteínas que oxidam íons ferrosos, como a ceruloplasmina.

(c) proteínas que protegem biomoléculas contra danos por outros mecanismos, como por exemplo as proteínas de choque térmico (ou *heat shock proteins*).

(d) agentes de baixo peso molecular que apresentam atividade “scavenger” de EROs e ERNs, como glutathione, α -tocoferol, ácido ascórbico, bilirrubina, ácido úrico e compostos polifenólicos. Alguns desses antioxidantes são provenientes da dieta, principalmente o ácido ascórbico e o α -tocoferol, de forma que existe uma forte relação entre a nutrição e as defesas antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; FÖRSTERMANN, 2008).

A lipoperoxidação é provavelmente o processo induzido por radicais livres mais extensivamente investigado. Os mecanismos, dinâmica e produtos da lipoperoxidação *in vitro* têm sido extensivamente estudados, compreendidos e documentados. Entretanto, os efeitos biológicos e fisiológicos da lipoperoxidação e seus produtos ainda não foram completamente elucidados (NIKI, 2009). A presença abundante de fosfolípidios de membrana em locais onde radicais livres são formados, tornam-os alvos endógenos facilmente acessíveis e rapidamente afetados

pelos radicais livres (de ZWART et al., 1999). Dessa forma, a lipoperoxidação promove alterações na integridade, fluidez e permeabilidade das membranas, levando à perda de sua função, além de gerar produtos potencialmente tóxicos (NIKI, 2009).

Inúmeras evidências sugerem que a peroxidação de lipídios componentes das lipoproteínas, especialmente da LDL, desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão da aterosclerose (GRUNDT et al., 2003; LAURINDO, 2005).

2.2. Estresse oxidativo e doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, especialmente entre as mulheres, seguidas pelas doenças infecciosas e parasitárias e pelo câncer. (WHO, 2008). As principais formas de DCV são: angina, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) e aterosclerose (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004). Entre seus fatores de risco, destacam-se idade, obesidade, sedentarismo, tabagismo, hipertensão arterial, diabetes mellitus e níveis elevados de colesterol (STOCKER; KEANEY, 2004). A maior parte dos casos de ataques do coração (infarto do miocárdio) e muitos dos casos de acidentes vasculares cerebrais são secundários à condição de aterosclerose (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A aterosclerose é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos. Durante os últimos trinta anos, foi observado um declínio razoável da mortalidade por causas cardiovasculares em países desenvolvidos, enquanto elevações relativamente rápidas e substanciais têm ocorrido em países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil. De acordo com as projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS), esta tendência de elevação na doença cardiovascular tende a persistir, agravando ainda mais o quadro de morbidade e mortalidade nesses países que, com o aumento da prosperidade econômica global, adquiriram diversos hábitos de vida característicos dos países desenvolvidos (STOCKER; KEANEY, 2004; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007)

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular em resposta a diversos fatores como envelhecimento, toxinas, infecções virais, reações imunológicas, hipertensão arterial, tabagismo, elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, lipoproteínas de densidade intermediária - IDL, lipoproteínas de densidade muito baixa - VLDL, remanescentes de quilomícrons), além de produtos da lipoperoxidação presentes na dieta e nas partículas de LDL oxidadas (FRANKEL, 2005; MATSUURA et al., 2006; FÖRSTERMANN, 2008).

A disfunção endotelial ocasionada por esses fatores leva a um aumento da permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial (Figura 1 - a). Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação, causando a exposição de diversos neo-epítomos, tornando-as imunogênicas. Esse processo de deposição é proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma (PACKARD; LIBBY, 2008).

A disfunção endotelial também promove o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, processo estimulado pela presença de LDL oxidada. As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial. Induzidos por proteínas quimiotáticas, os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam as LDL oxidadas. Os macrófagos repletos de lípidos são conhecidos como células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas (Figura 1 – a), que configuram as lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (CHOY et al., 2004). Além de monócitos, outros tipos de leucócitos, particularmente células T, são recrutados para a lesão aterosclerótica, ajudando a perpetuar o estado de inflamação crônica (Figura 1 – b) (RADER; DAUGHERTY, 2008).

Alguns mediadores da inflamação estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial (Figura 1 – b). Estas, ao migrarem para a íntima, passam a produzir não só citocinas e fatores de

crescimento, como também matriz extracelular que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica (PACKARD; LIBBY, 2008; RADER; DAUGHERTY, 2008).

A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular (que formam a capa fibrosa, rica em colágeno) e núcleo lipídico (rico em colesterol) (Figura 1 – c). Finalmente, as células espumosas morrem, resultando na liberação de debris celulares e colesterol cristalino. Esse processo contribui para a formação de um núcleo necrótico no interior da placa que promove o recrutamento de células inflamatórias (RADER; DAUGHERTY, 2008).

As placas estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno, organizado em capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico de proporções menores (Figura 1 – d). As instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, especialmente nas suas bordas laterais, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e capa fibrótica tênue. A ruptura desta capa expõe material lipídico altamente trombogênico, levando à formação de um trombo sobrejacente (Figura 1 – c). Este processo, também conhecido por aterotrombose, é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (STOCKER; KEANEY, 2004; MATSUURA et al., 2006)

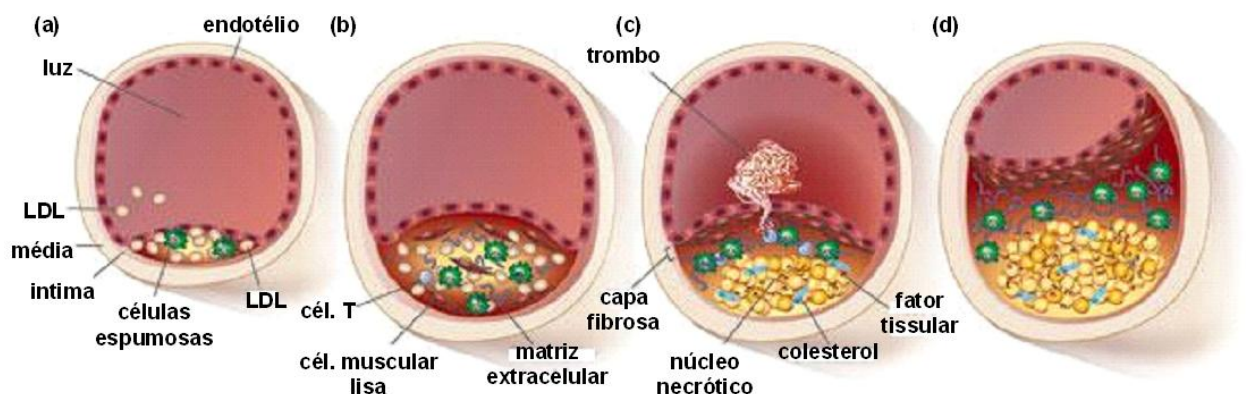


Figura 1 Desenvolvimento e progressão da aterosclerose.

(Adaptado de Rader; Daugherty, 2008)

O papel dos lipídios plasmáticos na etiologia da aterosclerose e doença coronária foi bem definido (CHOY et al., 2004). Altas concentrações plasmáticas de colesterol total, TG e LDL colesterol e baixa concentração plasmática de HDL colesterol são consideradas importantes fatores de risco para doenças coronárias, uma vez que a deposição de lipoproteínas no espaço subendotelial é um dos passos fundamentais para o início e progressão da aterogênese (STOCKER; KEANEY, 2004; HOUSTON et al., 2009).

De acordo com as diretrizes do “National Cholesterol Education Program” (2001), a prescrição de medicamentos deve ser considerada para pacientes que, apesar de se submeterem a uma dieta apropriada, prática regular de atividade física e perda de peso, apresentam concentrações elevadas de colesterol plasmático. Visto que uma grande proporção do colesterol corpóreo é sintetizada pelo fígado e apenas um quarto é obtido pela dieta, inibir parcialmente a síntese de colesterol no fígado seria uma solução lógica. Portanto, os inibidores de HMG-CoA redutase têm sido prescritos para o tratamento de hiperlipidemias (CHOY et al., 2004).

2.3. Estatinas

As estatinas atuam inibindo competitivamente a enzima HMG-CoA redutase na síntese endógena do colesterol (Figura 2), causando uma depleção no “pool” intracelular. Essa redução na síntese de colesterol induz uma resposta fisiológica que resulta em aumento da atividade dos receptores de LDL na superfície celular e, conseqüentemente, a uma redução dos níveis de colesterol circulante (MCCRINDLE, 2003; LAWS et al., 2005, RODRÍGUEZ-YÁÑEZ et al., 2008).

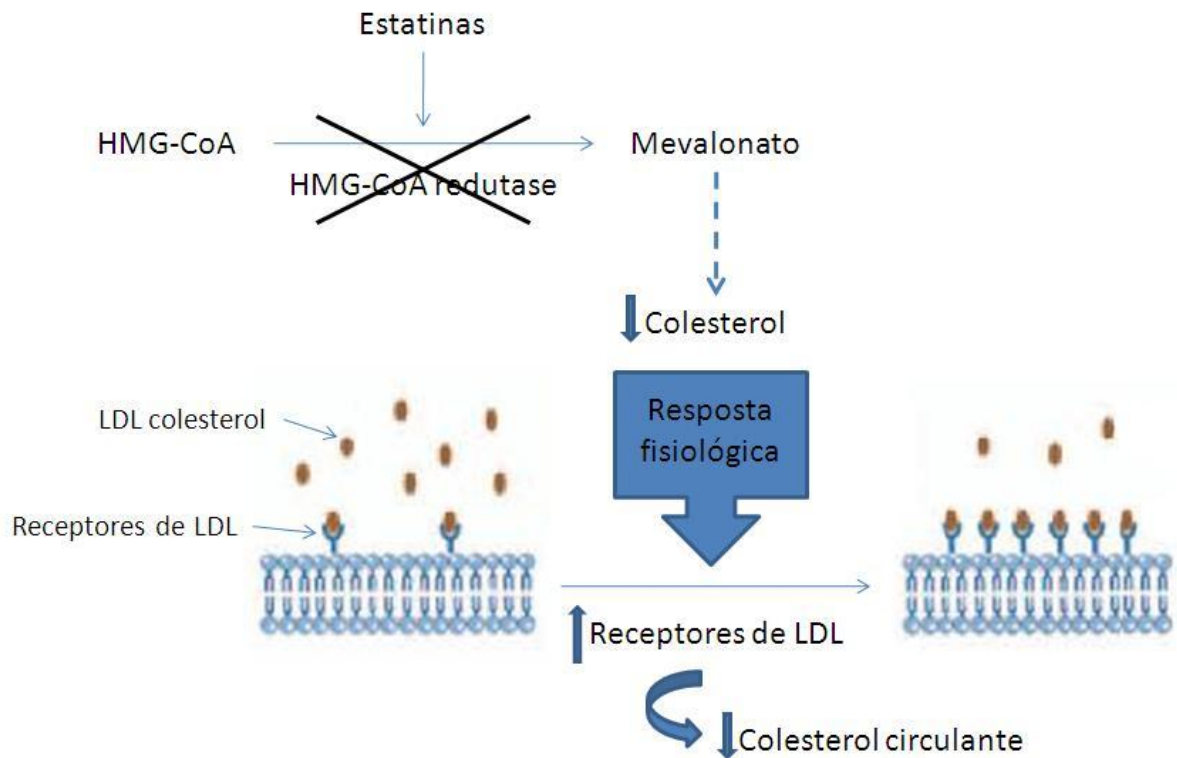


Figura 2 Esquema da síntese do colesterol.

(Adaptado de RODRÍGUEZ-YÁÑEZ et al., 2008)

Atualmente, seis estatinas são empregadas clinicamente: lovastatina, pravastatina, simvastatina, fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina. A pitavastatina é uma nova estatina altamente efetiva, disponível para uso apenas no Japão e em fase de testes na Europa e nos Estados Unidos (NIROGI; MUDIGONDA; KANDIKERE, 2007).

Lovastatina, simvastatina e pravastatina são derivadas naturais da fermentação fúngica. Fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina foram mais recentemente desenvolvidas e são sintetizadas quimicamente (NIROGI; MUDIGONDA; KANDIKERE, 2007).

Todas as estatinas possuem um componente estrutural que é muito semelhante à porção HMG da HMG-CoA, atuando como inibidores competitivos da HMG-CoA redutase. As diferenças estruturais existentes entre as estatinas determinam sua lipofilicidade, meia-vida e potência (NIROGI; MUDIGONDA; KANDIKERE, 2007). As estruturas químicas das estatinas e da HMG-CoA podem ser visualizadas nas figuras 3 e 4, respectivamente.

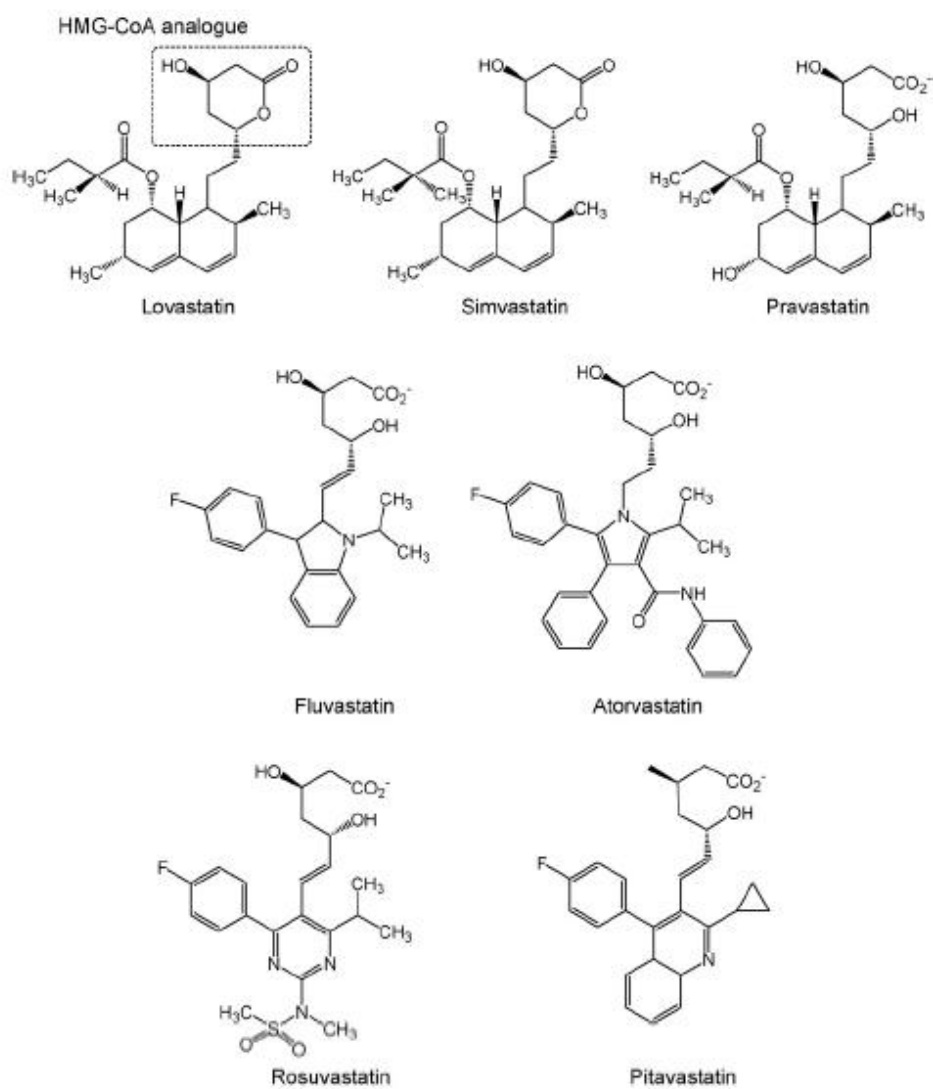


Figura 3 Estrutura química das estatinas empregadas clinicamente.
(Nirogi, Mudigonda e Kandikere, 2007).

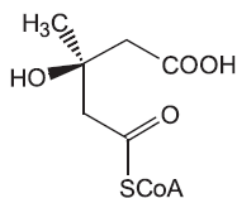


Figura 4 Estrutura química do HMG-CoA.
(Modificado de Campo e Carvalho, 2007).

Além das alterações no perfil lipídico, recentes evidências clínicas e experimentais indicam que as estatinas implicam em melhoria e restabelecimento da função endotelial, aumento da estabilidade das placas de ateroma, diminuição do estresse oxidativo e da inflamação, inibição da resposta trombogênica na parede vascular, inibição da agregação plaquetária, imunomodulação, estímulo à formação óssea e inibição do crescimento de células tumorais (ROSENSON, 2004; KINLAY, 2005; TOUSOLIS et al., 2007, KY et al., 2008).

A redução do estresse oxidativo atribuída às estatinas, deve-se a uma possível redução da síntese de EROs, aumento da liberação de óxido nítrico, e uma provável influência nos antioxidantes endógenos (ROSENSON, 2004; CANGEMI, et al., 2007; TOUSOLIS et al., 2007; KY et al., 2008).

Em altas dosagens, as estatinas podem reduzir moderadamente os níveis de TG e aumentar os níveis de HDL colesterol. No entanto, podem afetar a função hepática, causar dores e fraqueza muscular (CHOY et al., 2004). Assim, a suplementação de AGPI n-3 em conjunto com a terapia medicamentosa pode resultar em maior redução de TG, otimizando a terapia e reduzindo a ocorrência de efeitos colaterais em indivíduos dislipidêmicos (NAMBI; BALLANTYNE, 2006). Esta hipótese tem sido confirmada através de vários estudos que avaliaram o efeito do uso combinado de estatinas e AGPI n-3 em indivíduos com dislipidemia combinada e após infarto do miocárdio (CONTACOS; BARTER; SULLIVAN, 1993; NORDØY et al., 1998; GISSI-PREVENZIONE, 1999 ; DURRINGTON et al., 2001 ; CHAN et al., 2002 ; NORDØY; SVENSSON; HANSEN, 2003; YOKOYAMA; ORIGASA, 2003 ; HONG et al., 2004).

2.4. Ácidos graxos poliinsaturados Omega-3

Há aproximadamente três décadas, observou-se que a ocorrência de doenças cardiovasculares era baixa em populações de esquimós da Groenlândia. Apesar do elevado consumo de gorduras, essas populações subsistiam com grande quantidade de peixes e frutos do mar (BANG; DYEBERG, 1972; BANG; DYEBERG; HJOORNE, 1976; KROMANN; GREEN, 1980). Resultados similares foram

observados em outras populações com alto consumo de peixe, como nativos do Alasca (NEWMAN et al., 1993) e japoneses residentes em vilas de pesca (YAMORI et al.1985). Desde então, o efeito benéfico potencial do consumo de peixe na saúde humana, particularmente na redução do risco de DCV, passou a ser alvo de extensivas pesquisas.

Ácidos graxos poliinsaturados Omega 3, incluindo o EPA, o ácido docosapentaenóico (DPA) e o DHA, que são quase exclusivamente derivados de fontes marinhas, foram propostos como os nutrientes essenciais responsáveis pelos efeitos cardioprotetores potenciais do consumo de peixes. Como o DPA é um intermediário entre o EPA e o DHA e está presente em quantidades relativamente pequenas, as pesquisas tiveram seu foco principal no EPA e no DHA (HE, 2009). Muitos estudos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos relacionando os AGPI n-3 a DCV foram publicados nas últimas décadas. Embora a literatura não seja totalmente consistente, a maioria dos estudos sugere efeitos cardioprotetores do consumo de AGPI n-3 (CASTRO; BARROSO; SINNECKER, 2005; LAVIE et al., 2009; ESLICK et al., 2009).

Devido a estes possíveis efeitos benéficos, uma maior ingestão desses ácidos graxos (EPA e DHA) através do consumo de óleo de peixe tem sido recomendada. A “American Heart Association” recomenda o consumo de peixe pelo menos 2 vezes por semana. Em 2004, o Food and Drug Administration (FDA) aprovou a alegação qualificada de saúde para o uso de EPA e DHA em alimentos convencionais e suplementos dietéticos (FDA, 2004). Atualmente, vários alimentos são suplementados com AGPI n-3 em diferentes dosagens com o objetivo de explorar comercialmente a alegação funcional.

Os ácidos graxos Omega-3 são gorduras poliinsaturadas nas quais a primeira insaturação contada a partir do radical metila está localizada entre o 3º e o 4º carbono. Os principais ácidos graxos da família Omega-3 são: alfa-linolênico (ALA, 18:3n-3), EPA (20:5n-3) e DHA (22:6n-3), e compreendem uma das duas classes de ácidos graxos poliinsaturados (Figura 5). EPA e DHA pré-formados podem ser obtidos a partir de peixes gordos ou suplementos de óleo de peixe, enquanto o ALA pode ser obtido de alguns óleos vegetais. A outra classe de ácidos graxos poliinsaturados é composta pelos ácidos graxos Omega-6 (Figura 6), como o

ácido linoléico (LA, 18:2n6) e o ácido araquidônico (AA, 20:4n-6) (HARRIS *et al.*, 2008).

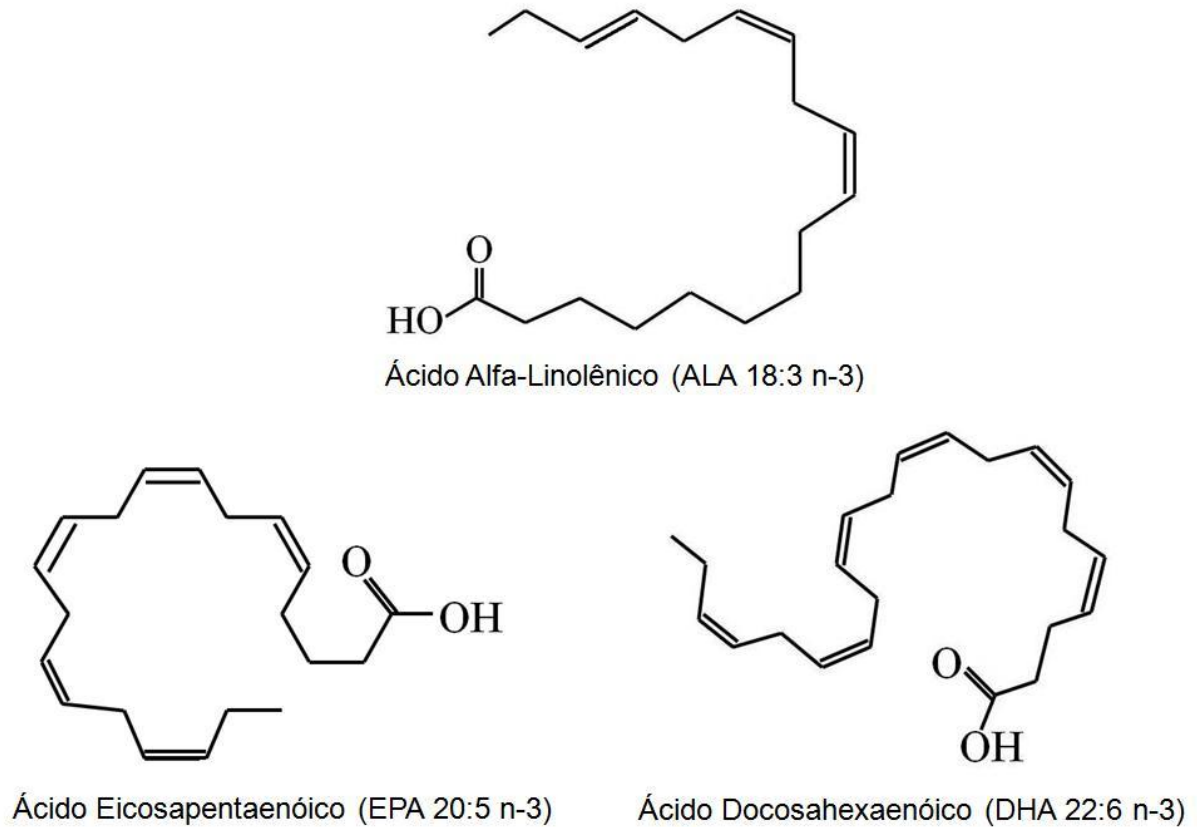


Figura 5 Ácidos graxos poliinsaturados da família Omega 3.

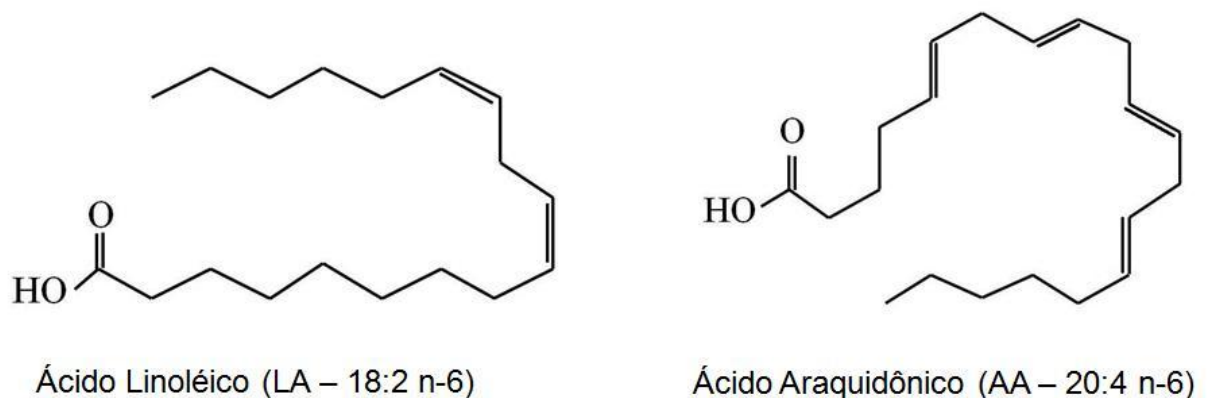


Figura 6 Ácidos graxos da família Omega 6

No organismo humano, o ALA pode ser convertido a EPA e DHA e o LA pode ser convertido a AA por meio de reações de alongamento e dessaturação. Porém, as taxas exatas de produção endógena de EPA e DHA são desconhecidas.

Aproximadamente 5 a 10% do ALA dietético pode ser convertido em EPA e mais 2 a 5% podem ser futuramente convertidos em DHA em adultos (WIJENDRAN; HAYES, 2004). A figura 7 apresenta as etapas mais importantes da conversão de LA e ALA em seus derivados insaturados. Uma das enzimas chave no metabolismo de ácidos graxos essenciais e poliinsaturados é a δ -6-dessaturase que reconhece e metaboliza LA e ALA produzindo os ácidos γ -linolênico (GLA) e estearidônico (STD), respectivamente. A afinidade da δ -6-dessaturase pelos ácidos graxos essenciais é diferente; de fato, a concentração de ALA precisa ser cerca de 10 vezes maior que a de LA para inibir em 50% a formação de GLA, sugerindo que na presença de alta concentração de LA, como ocorre em um sistema vivo, a via de formação do AA é preferencial (BENATTI *et al.*, 2004). Após a dessaturação pela δ -6-dessaturase, um ciclo de alongamentos e dessaturações pela δ -5-dessaturase gera AA e EPA, a partir de LA e ALA, respectivamente. Em mamíferos, dois ciclos de alongamentos e uma dessaturação pela δ -6-dessaturase formam os ácidos tetracosaeanoico e tetracosapentaenoico. Esse dois ácidos graxos são transferidos do retículo endoplasmático para peroxissomos, onde eles são submetidos à beta-oxidação para gerar DHA e EPA, que retornam ao retículo endoplasmático (SPRECHER; CHEN, 1999; RUSSO, 2009).

Embora ambos, AGPI n-3 e n-6, sejam substratos para mediadores lipídicos e sejam incorporados como componentes estruturais na formação de bicamadas lipídicas das membranas celulares, os efeitos biológicos dos AGPI n-3 são diferentes dos efeitos dos AGPI n-6. Sob ação das enzimas ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX), os AGPI n-6 levam à formação de prostanóides da série 2 (prostaglandinas E2, prostaciclina I2 e tromboxanos A2) e leucotrienos da série 4 (LTB4, LTC4 e LTE4), compostos caracterizados pela ação pró-inflamatória e pró-agregatória. Por outro lado, os AGPI n-3 são precursores de prostanóides da série 3 (prostaglandinas E3, prostaciclina I3 e tromboxanos A3) e leucotrienos da série 5 (LTB5, LTC5 e LTE5) que são biologicamente menos ativos, resultando em uma resposta antiinflamatória. (HARRIS, 2004; RUSSO, 2009).

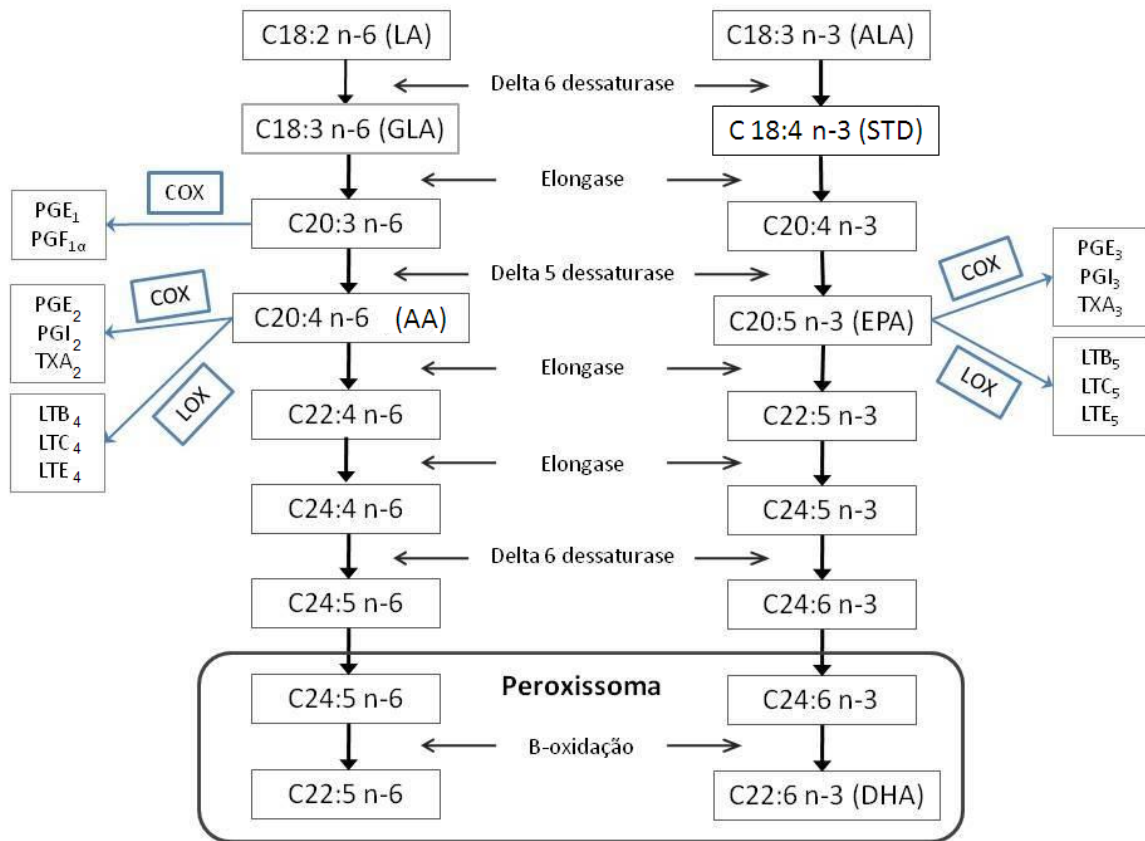


Figura 7 Esquema da formação de AA, EPA e DHA a partir de LA e ALA por meio de reações de alongamento e dessaturação.

(Adaptado de Russo, 2009)

Evidências consistentes de estudos experimentais, epidemiológicos e clínicos indicam que o consumo de peixes ou a ingestão AGPI n-3 de cadeia longa podem prover efeito cardioprotetor (HE, 2009). As propriedades anti-arrítmicas, que podem diminuir o risco de morte súbita, estão relacionadas à estabilização elétrica das células através de seus efeitos em canais iônicos (principalmente sódio, cálcio e potássio) e da presença de interações dos AGPI n-3 nos fosfolípidos da membrana, alterando sua fluidez. As propriedades antitrombóticas, que podem diminuir o risco da morte súbita, estão relacionadas à diminuição da função dos trombócitos e da síntese de fatores que promovem a agregação, coagulação e vaso constricção e ao aumento da atividade fibrinolítica. As propriedades antiinflamatórias, com importante papel na gênese da aterosclerose, diabetes mellitus, hipertensão, síndrome metabólica e déficit cardíaco crônico, podem ser atribuídas à redução da síntese do AA levando à inibição da formação de eicosanóides pró-inflamatórios pelas enzimas COX e LOX, além de seu efeito sobre a manutenção da função

endotelial (KRIS-ETHERTON; HARRIS; APPEL, 2003; FEDAČKO et al., 2007). Outros mecanismos incluem a redução plasmática de VLDL e da síntese de TG, e a maior produção de partículas de LDL maiores e menos aterogênicas (TINKER et al., 1999; SONG; FUJIMOTO; MIYZAWA, 2000; FRENOUX et al., 2001; HUDERT et al., 2006).

Os AGPI n-3 encontrados no óleo de peixe reduzem concentrações plasmáticas de TG tanto no jejum como no período pós-prandial sem apresentarem efeitos clinicamente significativos na absorção de gordura. Em geral, ensaios clínicos indicam que o EPA e o DHA têm efeitos similares na redução de TG (HARRIS, 2008).

Os mecanismos moleculares pelos quais o EPA e o DHA reduzem a concentração sérica de TG ainda não estão completamente esclarecidos, mas vários mecanismos potenciais foram hipotetizados a partir de estudos pré-clínicos. Os principais fatores de transcrição influenciados pelos AGPI n-3 estão ilustrados na **Figura 8**. Esses estudos fornecem evidências convincentes de que o EPA e o DHA podem reduzir a síntese e a secreção hepática de VLDL e podem aumentar a remoção de TG dos quilomícrons e da VLDL, por meio de sua interação com fatores de transcrição que regulam a expressão de enzimas envolvidas com a síntese e a degradação de ácidos graxos. De forma resumida, os AGPI n-3 ativam os receptores retinóide X (RXR) e farnesóide X (FXR) que, por sua vez, inibem o receptor X do fígado (LXR), inibindo seu efeito na ativação da proteína ligada ao elemento regulado por esterol 1c (SREBP-1c), que modula a expressão de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos. Os AGPI n-3 também ativam os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) que, além de modularem a expressão de enzimas envolvidas na oxidação dos ácidos graxos (AG), também atuam inibindo a SREBP-1c. Somado à ação direta dos AGPI n-3 na inibição da SREBP-1c, essas formas indiretas de inibição contribuem para a redução da síntese de AG. Os AGPI-n3 também atuam na inibição do fator nuclear kappa B (NFκB), modulando a resposta inflamatória. (FERNANDEZ; WEST, 2005; DAVIDSON, 2006; HARRIS, 2008; SCHMITZ; ECKER, 2008).

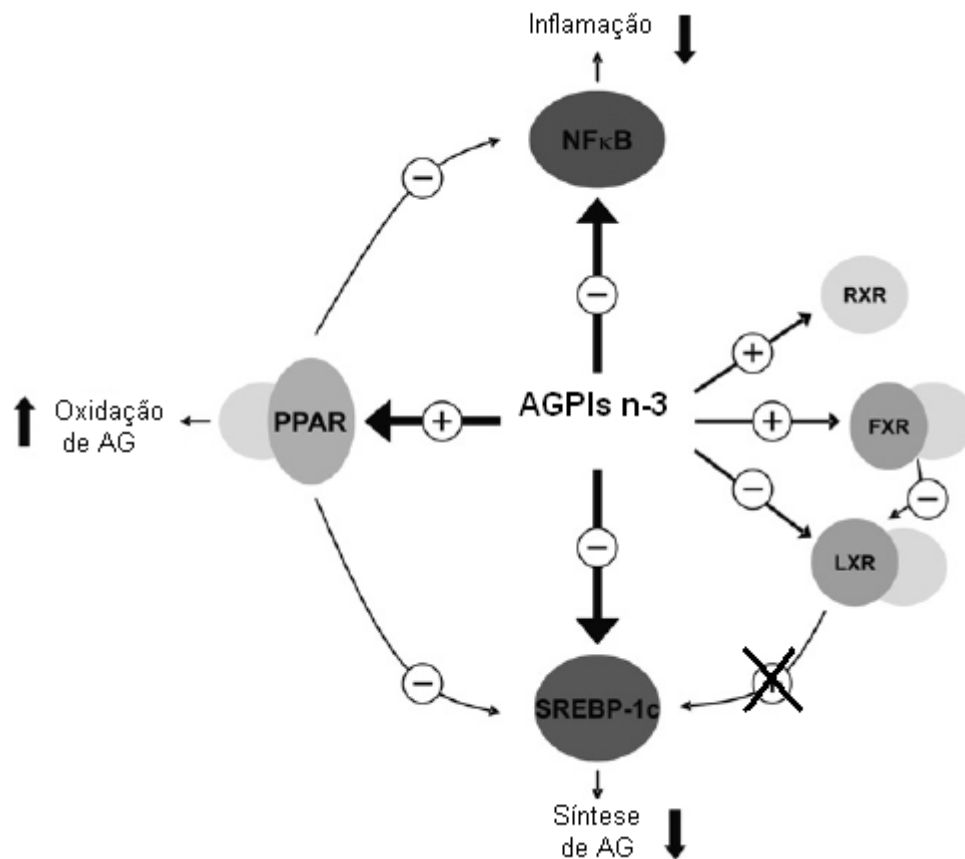


Figura 8 Fatores de transcrição influenciados pelos ácidos graxos poliinsaturados Omega-3.

(AGPI n-3: ácidos graxos poliinsaturados Omega 3; FXR: receptor farnesóide X; LXR: receptor X do fígado; NFκB: fator nuclear kappa B; PPAR: receptor ativado por proliferadores de peroxissomos; RXR: receptor retinóide X; SREBP-1c: proteína ligada ao elemento regulado por esterol 1c)
(Adaptado de Schimitz e Ecker, 2008).

O conjunto de ações dos AGPI n-3 sobre esses fatores de transcrição, culmina na redução da síntese de AG e no aumento de sua degradação pela via da β -oxidação hepática (**Figura 9**). A inibição dos receptores LXR e RXR e do SREBP-1c leva a uma redução da expressão da acetil CoA carboxilase (ACC) e da ácido graxo sintase (FAS), reduzindo a síntese de ácidos graxos. É possível que o SREBP-1c também module a expressão da acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase (DGAT), reduzindo a síntese de TG. O aumento da expressão de PPAR- α promove aumento da β -oxidação e reduz a expressão de transportadores de AG, o que leva a uma redução do transporte de ácidos graxos não esterificados (AGNE) dos tecidos periféricos para o fígado. Devido à menor disponibilidade de AG para a síntese de TG e à redução da síntese de apolipoproteínas B-100 (Apo B-100), a síntese e

secreção hepática de VLDL é reduzida. Observa-se também efeitos nos tecidos periféricos, onde a remoção de VLDL é aumentado, possivelmente por ação dos PPARs α e γ modulando a expressão da lipase lipoprotéica (LPL) (HARRIS, 2008).

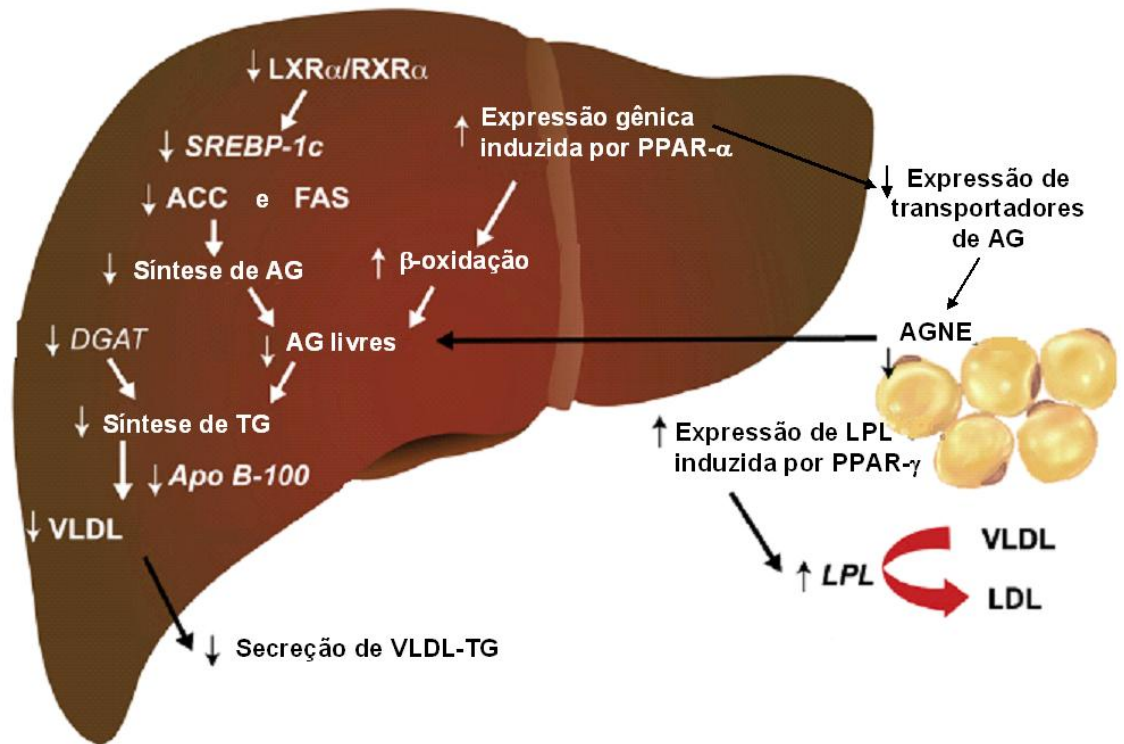


Figura 9 Mecanismos potenciais da modulação de triacilgliceróis por ácidos graxos poliinsaturados Omega 3 (EPA e DHA).

(ACC: acetil CoA carboxilase; AG: ácidos graxos; AGNE: ácidos graxos não esterificados; Apo B-100: apolipoproteína B-100; DGAT: acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase; FAS: ácido graxo sintase; LDL: lipoproteína de alta densidade; LPL: lipoproteína lipase; LXR: receptor X do fígado; PPAR: receptores ativado por proliferadores de peroxissomos; RXR: receptor retinóide X; SREBP-1c: proteína ligada ao elemento regulado por estero 1c; TG: triacilgliceróis; VLDL: lipoproteínas de densidade muito baixa)

(Adaptado de Harris, 2008).

O fator de transcrição redox-sensível NF- κ B, é conhecido por regular a expressão de diversos genes envolvidos na resposta imune e inflamatória, e recentemente tem mostrado um importante papel determinando o destino celular durante o estresse oxidativo (ADZIC et al., 2006). O NF- κ B induz a expressão gênica de um grande número de moléculas, incluindo citocinas (IL-2, IL-6, IL-8, interferon- γ , TNF- α), fatores de crescimento, receptores imunes (receptores de células T, receptores IL-2), moléculas de adesão (E-selectinas, ICAM-1), da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e da Mn-SOD, entre outros (KABE et al., 2005). Assim, a

ação dos AGPI n-3 na inibição do NF- κ B, estaria associado ao seu efeito antiinflamatório (FERNANDEZ; WEST, 2005; DAVIDSON, 2006; HARRIS, 2008; SCHMITZ; ECKER, 2008).

Apesar de apresentarem todos esses efeitos benéficos, ácidos graxos poliinsaturados como o EPA e o DHA, que contém em sua estrutura cinco e seis insaturações respectivamente, são extremamente susceptíveis à lipoperoxidação, mesmo na presença de antioxidantes adicionados (YUAN; KITTS, 2003), e seu consumo crônico em doses elevadas poderia levar a um aumento da susceptibilidade da LDL à oxidação (HIGDON et al., 2001; HANWELL, et al., 2009). Embora mais insaturações aumentem a susceptibilidade dos ácidos graxos poliinsaturados a oxidarem *in vitro* (DECKER; ALAMED; CASTRO, 2010), não está estabelecido que isso também ocorra *in vivo* (THOLSTRUP et al., 2004). Pesquisas que se propuseram a avaliar o efeito da lipoperoxidação *in vivo* em humanos e em animais observaram aumento, nenhum efeito ou diminuição da susceptibilidade à oxidação (GRUNDT et al., 2003; YUAN; KITTS, 2003). A variabilidade desses resultados pode ser atribuída a vários fatores, incluindo: grau, tempo e forma de suplementação, concentração de antioxidantes no óleo de peixe e diferenças nas metodologias empregadas para avaliação do estresse oxidativo (LEIGH-FIRBANK et al., 2002; GRUNDT et al., 2003).

Diante das evidências apresentadas na literatura, percebe-se que os AGPI n-3 e as estatinas poderiam apresentar efeitos antagônicos na susceptibilidade do organismo humano ao estresse oxidativo. Assim, diante do maior interesse da população no consumo de suplementos e alimentos funcionais contendo AGPI n-3 e dada a importância do estresse oxidativo no desenvolvimento das doenças cardiovasculares, estudos que abordem interações entre esses alimentos e medicamentos fazem-se extremamente necessários, e contribuirão para fornecer bases científicas à recomendação de uso de alimentos e suplementos como coadjuvantes no controle da dislipidemia através de estatinas.

3. OBJETIVOS

3.1. Hipóteses

Indivíduos com dislipidemia controlada por estatinas que recebem suplementação com AGPI n-3 apresentam maior redução de TG e menos estresse oxidativo que indivíduos não suplementados com AGPI n-3.

3.2. Objetivo Geral

Avaliar se mulheres com dislipidemia controlada por estatinas submetidas a suplementação com AGPI n-3 (2,3 g de EPA + DHA/dia) apresentavam maior redução de TG e menor estresse oxidativo que mulheres não suplementadas com AGPI n-3.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Ácidos Graxos Ômega 3

As cápsulas de Ômega 3 (óleo de peixe) e de placebo (óleo de soja e milho), foram adquiridas junto à *Ocean Nutrition Canada Limited, (Nova Scotia, Canada)*. As cápsulas continham de 900 a 1100 mg de óleo e foram adicionadas de 2 mg de tocoferóis naturais por grama de óleo. Os Certificados de Análise fornecidos pela empresa (Anexo 1 e 2) indicavam que as cápsulas eram adequadas para consumo, pois foram aprovadas em teste microbiológicos, de acidez e de oxidação, além de apresentarem quantidades permitidas de metais pesados e outros contaminantes. De acordo com o certificado de análise, as cápsulas de Ômega 3 apresentaram um conteúdo médio de 380 mg de EPA e 200 mg de DHA/unidade. As cápsulas de Placebo não continham nenhum desses dois ácidos graxos.

4.1.2. Reagentes

Foram utilizados os seguintes padrões e reagentes: Trifluoreto de boro (BF_3) metanólico 14% (B1127); Padrões de ácidos graxos: Mistura de metil ésteres de ácidos graxos (18919); PUFA nº3 (óleo de sardinha) (47085U); Mistura de metil ésteres de ácidos graxos Supelco® 37 (47885U); 2,6-Di-terc-butil-4-metilfenol (BHT) (B1378); ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (T5500); Tetrabutylamônio de malondialdeído (MDA) (Fluka: 63287); Tris Base ou 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propenodiol (T1378); Triton X-100 ou 4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil) fenil-polietileno glicol (X-100); Aprotinina de pulmão bovino (A4529); Hemissulfato de leupeptina (L8511); Fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF) (P7626); Citocromo c de coração eqüino (C7752); Xantina (X4002); xantina oxidase de leite bovino (X1875); β -nicotinamida adenina dinucleotideo 2'-fosfato tetra-sódico reduzido (NADPH) (N1630); Glutathione Redutase de levedura (G3664); L-glutathione reduzida (GSH) (G6529); hidroperóxido

de terci-butil (458139) adquiridos da Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Acetonitrila, Etanol, Metanol, Isoctano, Heptano e n-Hexano grau HPLC da Merck S.A. (Darmstadt, Germany). Os demais reagentes utilizados apresentaram grau de pureza analiticamente compatível. Água MiliQ foi utilizada no preparo de todas as soluções aquosas (Millipore Corp., Billerica, MA, USA).

4.2. Delineamento Experimental

Sessenta indivíduos do sexo feminino, com idade compreendida entre 40 e 80 anos, com colesterolemia e hipertensão ausente ou controlada, sem histórico de diabetes, intervenção cardiovascular ou insuficiência renal, sem reposição hormonal, com prática de atividade física ausente ou moderada, consumo de álcool ausente ou eventual e que não estivessem fazendo uso de suplementos alimentares foram entrevistados quanto à concordância em participar do estudo, segundo as normas do Comitê de Ética (Anexo 3).

Em um primeiro encontro, os indivíduos selecionados receberam melhores esclarecimentos a respeito do protocolo, foram orientados quanto ao consumo das cápsulas e conscientizados quanto aos demais procedimentos durante o período experimental, como da manutenção de seus hábitos dietéticos e nível de atividade física. Os indivíduos foram submetidos às avaliações antropométricas iniciais, responderam a um questionário sócio-econômico (Anexo 4) e foram instruídos quanto ao preenchimento do registro alimentar.

Utilizou-se um delineamento *crossover* duplo cego para compor os quatro grupos:

- Grupo Placebo: Voluntárias que não estavam sob terapia com estatinas e que receberam cápsulas de placebo (óleo de milho e soja).
- Grupo Estatina: Voluntárias que estavam sob terapia com estatinas e receberam cápsulas de placebo.

- Grupo Omega: Voluntárias que não estavam sob terapia com estatinas e receberam cápsulas de Ômega 3 (óleo de peixe).

- Grupo Combinado: Voluntárias que estavam sob terapia com estatinas e receberam cápsulas de Ômega 3.

As voluntárias que estavam sob terapia com estatinas já faziam uso desse medicamento na dosagem de 10 a 40 mg/dia por um período mínimo de seis meses. Quatorze indivíduos desistiram de participar do estudo antes da primeira coleta por não poderem comparecer na data pré-determinada. Após o início do protocolo experimental, um indivíduo desistiu por apresentar problemas de saúde (intoxicação alimentar) e dois indivíduos não puderam comparecer na data pré-determinada devido a motivos pessoais.

A **Figura 10** apresenta um esquema do planejamento experimental.

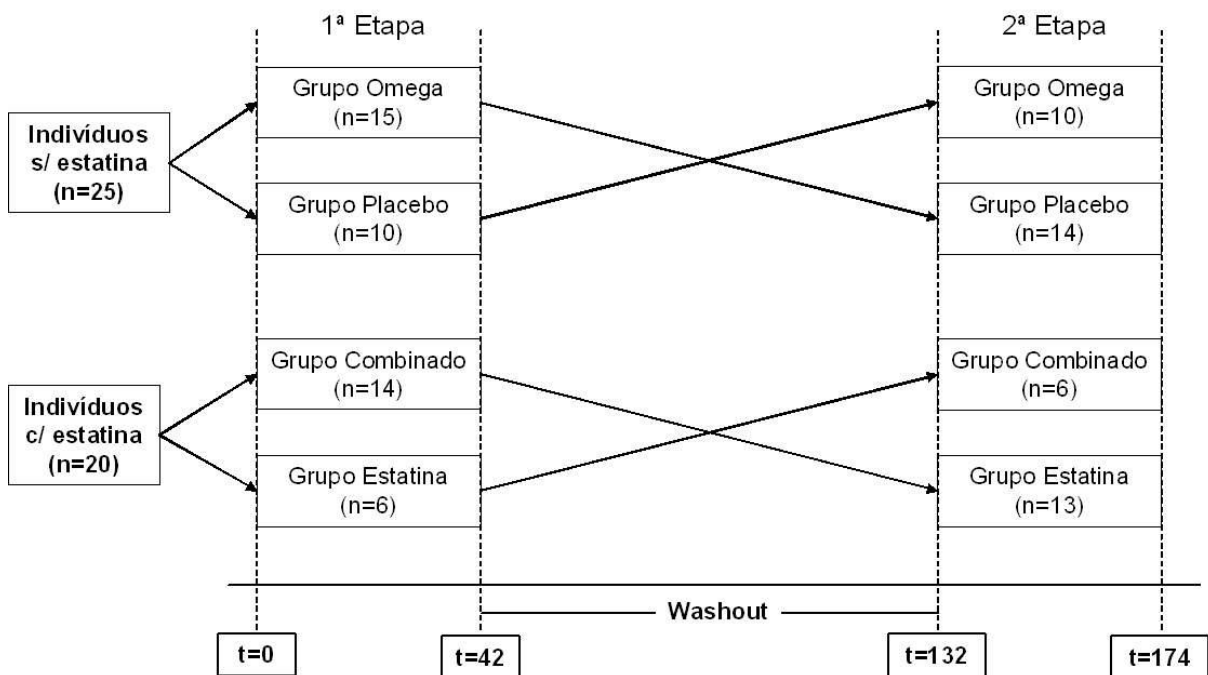


Figura 10 Esquema do planejamento experimental.

Os indivíduos receberam frascos contendo cápsulas de óleo de peixe (Omega 3) ou óleo soja/milho (Placebo) e foram orientados a consumir 4 cápsulas por dia, por 42 dias. Durante esse período, foram contatados por telefone para

assegurar a aderência ao estudo. Após 90 dias de *washout*, a suplementação foi invertida, e os indivíduos foram acompanhados por mais um período de 42 dias. Foram realizadas coletas de sangue, avaliações antropométricas e inquérito alimentar com registro alimentar de 3 dias (Anexo 5) elaborado segundo Herbert et al. (1999), no início e no final de cada período de intervenção.

A coleta de sangue foi realizada por uma equipe de enfermagem previamente contratada, seguindo todos os cuidados de higiene e assepsia. O sangue foi coletado com seringas descartáveis e transferido para tubos Vacutainer (Becton Dickinson, NJ), contendo 1% K₂EDTA para determinação do perfil de ácidos graxos e dos biomarcadores do estresse oxidativo, e tubos sem anticoagulante para mensuração de variáveis bioquímicas. As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas a 4°C, o soro foi encaminhado para análises laboratoriais e o plasma foi transferido para tubos tipo *ependorf*, que foram congelados sob nitrogênio líquido. As amostras foram estocadas a temperatura de -80°C para análises posteriores.

4.3. Métodos

4.3.1. Análise do perfil de ácidos graxos das cápsulas de óleo de peixe e óleo de soja e milho

O conteúdo das cápsulas foi esterificado de acordo com as metodologias oficiais da AOCS (1998). Para as amostras de óleo de peixe, foi empregada a metodologia Ce 1b-89. Pesou-se aproximadamente 25 mg de amostra de óleo. Adicionou-se 1,5 ml de solução de NaOH 0,5 N em metanol, e a amostra foi incubada a 100°C por 5 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, a amostra foi adicionada de 2 ml de solução de BF₃ em metanol a 14%, seguida de nova incubação a 100°C por 30 minutos. Após resfriar até 30-40°C, adicionou-se 1 ml de isoctano e agitou-se vigorosamente por 30 segundos. Em seguida, adicionou-se 5 ml de solução saturada de NaCl e após resfriar até temperatura ambiente, transferiu-se a camada de isoctano para um novo tubo. Extraíu-se novamente a fase

metanol/água com 1 ml de isooctano. Combinou-se os extratos de isooctano e foram concentrados até aproximadamente 1 ml através de evaporação com N₂, sendo a fase superior transferida para um *vial* contendo aproximadamente 0,5g de sulfato de sódio para injeção no cromatógrafo. Para as amostras de óleo de soja/milho, foi empregada a metodologia Ce 2-66. Pesou-se entre 50-125 mg de amostra de óleo. Adicionou-se 2 ml de NaOH 0,5 N em metanol, e a amostra foi incubada a 100°C por 5 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, a amostra foi adicionada de 2,5 ml de solução de BF₃ em metanol a 14%, seguida de nova incubação a 100°C por 2 minutos. Adicionou-se 1 ml de hexano e amostra foi incubada a 100°C por mais 1 minuto. Em seguida, adicionou-se 5 ml de solução saturada de NaCl e agitou-se vigorosamente por 15 segundos. Após resfriar até temperatura ambiente, a amostra foi extraída 2 vezes com 1 ml de heptano. Combinou-se os extratos de heptano, que foram concentrados até aproximadamente 1 ml através de evaporação com N₂, sendo a fase superior transferida para um *vial* contendo aproximadamente 0,5g de sulfato de sódio para injeção no cromatógrafo.

A identificação foi realizada em um cromatógrafo a gás SHIMADZU, GC-17A, equipado com uma coluna capilar (Supelcowax: Supelco, Bellefonte, PA, USA) fundida de silicone com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno e um detector de ionização em chama. Hélio foi usado como gás de arraste (1mL/min) e os ácidos graxos foram separados usando um gradiente de 80 a 150° C (10° C/min), com um acréscimo de 6° C/min até atingir 230° C, permanecendo nesta temperatura por 30 minutos. A temperatura da câmara injetora e do detector foi de 250° C. Os ácidos graxos foram calculados pelas áreas de pico relativo à área de pico da mistura padrão de trinta e sete ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma Chemical Co.) complementados com uma mistura padrão "n-3 PUFA" contendo dezenove componentes (Supelco, Inc). Os resultados foram expressos em % do total de ácidos graxos presentes.

O índice de peroxidabilidade (IP) das amostras foi calculado segundo Hsu; Lee e Chen (2001), onde:

$$PI = (\% \text{ dienóico} \times 1) + (\% \text{ trienóico} \times 2) + (\% \text{ tetraenóico} \times 3) + (\% \text{ pentaenóico} \times 4) + (\% \text{ hexaenóico} \times 5).$$

4.3.2. Análise da concentração sérica de glicose, lipoproteínas e proteína C reativa

As amostras de soro foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório Médico de Análises Clínicas de São Paulo LMC LTDA., para análise das concentrações séricas de glicose, colesterol total, HDL - colesterol e triacilgliceróis – por meio de métodos colorimétrico enzimáticos - e de proteína C reativa (PCR) ultrasensível, por meio de método turbidimétrico. A concentração de LDL - colesterol foi calculada utilizando-se a fórmula de Friedewald, Levy e Fredrickson (1972), onde:

$$\text{LDL} = \text{CT} - (\text{HDL} - \text{TG}/5).$$

4.3.3. Análise do perfil de ácidos graxos no plasma

As amostras de plasma foram derivatizadas utilizando a técnica de esterificação direta conforme descrita por Shirai, Suzuki e Wada (2005). Uma alíquota de 150 µL de amostra de plasma foi adicionada a 1 mL de solução 0,5M de NaOH em metanol e, após agitação no vortex por 15 segundos, a mistura foi aquecida em banho Maria a 100°C por 15 minutos. Após resfriar, a amostra foi adicionada de 2 mL de solução de BF₃ em metanol a 14%, seguida de agitação por 15 segundos e aquecimento a 100°C por 20 segundos. Após resfriar até temperatura ambiente, a mistura foi adicionada de 1 mL de isoctano e 5 mL de solução saturada de NaCl, seguida de agitação vigorosa por 15 segundos. A fase superior foi transferida para um microtubo, evaporada sob atmosfera de nitrogênio e estocada até o momento da injeção.

A composição de ácidos graxos foi determinada em um cromatógrafo a gás SHIMADZU, 2010, equipado com uma coluna capilar Supelco 2560 de 100 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo de 1mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C e 260°C, respectivamente. A programação de temperatura da coluna foi de 140°C inicial com um acréscimo de 4°C/min até atingir 230°C, recebendo então um acréscimo de 5°C/min até atingir um platô de 240°C e permanecendo nesta

temperatura por 11 minutos. Uma mistura padrão de trinta e sete ésteres metil de ácidos graxos (Sigma Chemical Co.) foi utilizada para identificar os picos. Os resultados foram expressos como % do total de ácidos graxos presentes na amostra.

As amostras foram analisadas em conjunto nove meses após a primeira coleta.

4.3.4. Determinação dos biomarcadores do estresse oxidativo

Os biomarcadores do estresse oxidativo foram avaliados através da medida de produtos secundários da oxidação lipídica (malondialdeído) e da medida das possíveis alterações no sistema antioxidante em decorrência do aumento do estresse oxidativo: atividade e expressão protéica das enzimas antioxidantes (Catalase, Superóxido Dismutase e Glutathione Peroxidase), determinação da concentração plasmática de Tocoferol e da capacidade antioxidante total do plasma pela técnica de ORAC. As seguintes metodologias experimentais foram utilizadas:

Concentração de malondialdeído no plasma

A concentração de malondialdeído no plasma foi medida por meio da sua separação pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) como descrito previamente por Cheng et al. (2008) com adaptações. A 50 µL de plasma foram adicionados 25 µL de BHT 1%, 250 µL de TBA 39,9 mM, 425 µL de H₂O miliQ e 750 µL de ácido fosfórico. Após agitação no vortex, as amostras foram incubadas em banho maria a 100°C durante 1 hora e resfriadas em gelo. Uma alíquota de 500 µL foi transferida para um *ependorf* e adicionados de 400 µL de metanol grau HPLC e 100 µL de NaOH 1M, seguido de centrifugação a 24.100 g a 4°C por 5 minutos (centrífuga HITACHI modelo CF-15R, Tokio, Japan). O sobrenadante foi transferido para um *vial* após filtração em membrana de PTFE de 0,45 µm de porosidade.

A identificação foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent Technologies 1200 series - Santa Clara, USA), equipado com coluna de fase reversa Phenomenex C18 de 250 mm x 4,6 mm com partículas de 5µm (Phenomenex, Torrance, USA) e pré-coluna Phenomenex LC8-D8 AJ0-1287 (Phenomenex, Torrance, USA). A temperatura no amostrador foi mantida em 4°C, e a temperatura da coluna foi de 25°C. A fase móvel utilizada foi 60% Tampão Fosfato de Potássio (50 mM; pH 6,0) e 40% metanol. O volume de injeção foi de 20 µL e a taxa de fluxo de 1 mL/minuto e o tempo de corrida de 10 minutos, mais 10 minutos de limpeza da coluna com acetonitrila e água e 5 minutos de pós-corrída. A detecção foi realizada fluorimetricamente a uma excitação de 515 nm e emissão de 543 nm. O tempo de retenção do MDA foi de aproximadamente 8,5 minutos.

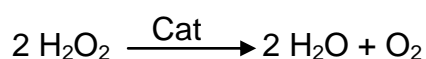
O cálculo da concentração de MDA foi realizado a partir da equação da reta gerada por uma curva de calibração nas concentrações 0,5 a 5,0 µmol. A cada corrida feita no HPLC foi preparado o branco com água milli-Q e um controle externo constituído por uma solução de MDA na concentração de 5 µmol. As amostras foram analisadas em triplicata 10 meses após a primeira coleta.

Preparo das amostras para análise da atividade e expressão das enzimas antioxidantes

As amostras foram preparadas no dia da coleta conforme descrito por Adzic et al. (2006). Após centrifugação a 1500 g por 5 min a 4°C para separação do plasma, o pellet de células do sangue total foi lisado pela adição de tampão contendo 0.32 M de sacarose, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100 e um coquetel de inibidores de protease (aprotinina, leupeptina, NaF e PMSF). Foram separadas alíquotas para determinação da atividade das enzimas antioxidantes e da concentração de proteína com o kit BCA (Pierce – Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), estocadas a -20°C. As alíquotas separadas para o Western Blotting, foram adicionadas de tampão de desnaturação conforme proposto por Laemmli (1970), incubadas em banho de ebulição por 2 minutos e estocadas a -80°C para análise posterior.

Atividade da enzima Catalase

A atividade da Catalase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Aebi (1984). Visto que a função da catalase é decompor o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) conforme a reação abaixo descrita, a metodologia empregada baseia-se no monitoramento do decréscimo do H₂O₂ por meio da leitura da absorbância a 230nm.

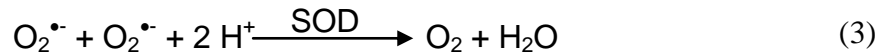
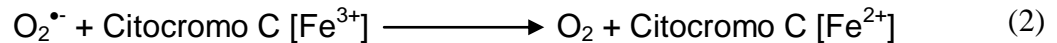
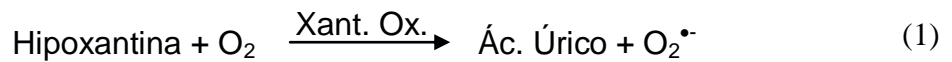


Amostras de lisado de células do sangue total no volume de 20 µl, diluídas na proporção de 1:200, foram adicionadas a uma cubeta contendo 640 µl de Tampão Fosfato de Potássio 50mM, pH 7,0. Após adição de 340 µl de solução de peróxido de hidrogênio 30 mM, iniciou-se a leitura a 230 nm, a cada 60 s, durante 5 minutos. A análise foi realizada a 37°C e os resultados foram expressos em Unidade de atividade (UA) por minuto por mg de proteína.

As amostras foram analisadas em triplicata no prazo máximo de até 4 dias após cada coleta devido à baixa estabilidade da enzima nas amostras de sangue.

Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Mc Cord e Fridovich (1969), utilizando hipoxantina e xantina oxidase para gerar radicais superóxidos (1), que doam elétrons para o Citocromo C, formando um composto que absorve luz a 550 nm (2). Visto que a função da SOD é acelerar a dismutação do radical superóxido (3), sua atividade é medida através do grau de inibição da redução do Citocromo C.



Amostras de lisado de células do sangue total no volume de 15 μl , diluídas na proporção de 1:5, foram adicionadas a uma cubeta com 1 ml de meio de reação contendo Citocromo C, Xantina 50mM, EDTA 1mM e KCN 200 μM diluídos em Tampão Fosfato de Potássio 0,05M, pH 7,8. Após adição de xantina oxidase em volume pré-testado, iniciou-se a leitura a 550 nm, a cada 60 s, durante 6 minutos. A análise foi realizada a 37°C. Os resultados foram expressos em UA por minuto por mg de proteína.

As amostras foram analisadas em triplicata no prazo de até 20 dias após cada coleta.

Atividade da enzima Glutationa Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Wendel, 1981. Visto que a função da glutaciona peroxidase é de catalisar a redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos utilizando a glutaciona (GSH) como agente redutor, esta metodologia baseia-se na redução do hidroperóxido de terc-butil, com a imediata redução da glutaciona oxidada (GSSG) catalisada pela glutaciona redutase e a concomitante oxidação de NADPH a NADP⁺, que pode ser medida pela redução da absorvância a 340 nm.

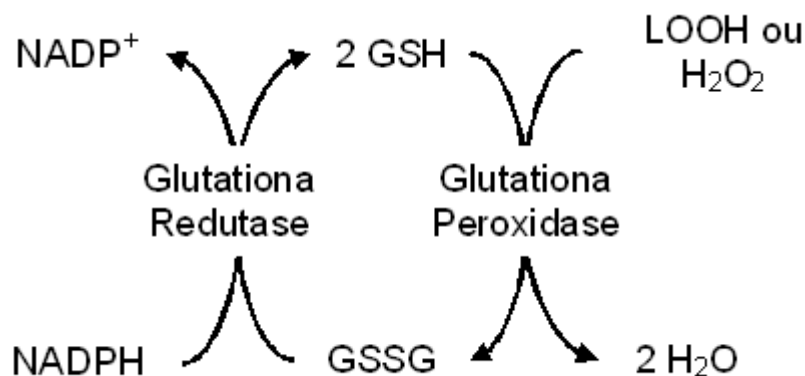


Figura 11 Seqüência de reações da determinação da atividade da enzima GPx.

Amostras de lisado de células do sangue total no volume de 10 μl , diluídas na proporção de 1:5, foram adicionadas a uma cubeta contendo 1 ml de meio de reação contendo NADPH 0,2 mM, glutaciona redutase $5 \times 10^{-5} \text{U}$ e glutaciona reduzida 1mM diluídos em Tampão Tris-HCl 0,1M EDTA 0,5 mM, pH 8,0. Após adição de 10 μl de solução de hidroperóxido de terc-butil 0,5 mM, iniciou-se a leitura a 340 nm, a cada 60 s, durante 6 minutos. A análise foi realizada a 37°C Os resultados foram expressos em UA por minuto por mg de proteína.

As amostras foram analisadas em triplicata no prazo de até 20 dias após cada coleta.

Expressão protéica das enzimas Catalase e SOD

As alíquotas da amostra preparadas para Western Blotting foram diluídas em água na proporção de 1:20 e adicionadas de tampão de desnaturação (Laemli, 1970) na proporção de 1:1. Uma alíquota contendo 30 μg de proteína foi separada através de SDS-PAGE, juntamente com o padrão de peso molecular, a 70 v por aproximadamente 80 minutos através do gel de empilhamento (5% de acrilamida), seguido de mais 130 minutos a 120v através do gel de separação (12% de acrilamida), utilizando tampão de corrida (25mM Tris base, 192mM Glicina, 0,1% SDS, H_2O milli Q q.s.p. 1000mL).

As proteínas foram transferidas para membrana de polivinilideno (polyvinylidene difluoride - PVDF) previamente ativada em metanol por 5 minutos. A transferência foi realizada em sistema semi-seco (GE Healthcare) a 25 mA por 105 minutos, utilizando-se o tampão de transferência (Tris base 25mM, Glicina 192mM, 0,02% SDS, 10% Metanol, H₂O milli Q q.s.p. 1000mL). A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana por 5-10 min com corante Ponceau (0,1% Vermelho de Ponceau, 1% ácido acético), seguida de lavagem com PBST (NaCl 1,4M, KCl 27mM, KH₂PO₄ 15mM, Na₂HPO₄ 81mM, Tween 20 0,5%). A membrana foi cortada horizontalmente de acordo com as faixas de peso molecular de cada proteína.

As tiras de membrana foram então bloqueadas com solução de soro albumina bovina a 5% em PBST por 1 hora para evitar a ocorrência de ligações inespecíficas, e incubadas com os anticorpos primários (Anti-Catalase Rabbit pAb Cat. No. 219010, Calbiochem; SOD1 Antibody #2770, Cell Signaling) previamente diluídos na proporção de 1:1000. Após lavagem do excesso de anticorpos, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase de raiz forte, previamente diluído na proporção de 1:5000 (HARLOW E LANE, 1988; SAMBROOK ET AL., 1989) e com o anticorpo anti- β actina, também conjugado com peroxidase. Após lavagem do excesso de anticorpos secundários e anti- β actina, as tiras de membrana foram incubadas por 1 minuto com o reagente de revelação contendo luminol, ácido p-cumárico, Tris 1M pH 8,5, peróxido de hidrogênio 30%, água Milli-Q q.s.p 20 mL.

A aquisição e a análise das imagens resultantes foram feitas por meio de um sistema de imagem digital (IMAGE QUANT™ 400 versão 1.0.0), utilizando o software ImageQuant™ Capture Software. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA), calculadas após normalização do volume das bandas de cada amostra pelo volume da banda da β -actina correspondente. Os volumes das bandas de amostras do grupo placebo foi considerado como 1 UA, e os demais foram calculados em função deste.

Determinação da concentração plasmática de α -, δ -, e γ -tocoferol

De acordo com a metodologia descrita por Siluk et al (2007), a uma alíquota de 200 μ l de plasma, foram adicionados 20 μ l de solução padrão interno (150 μ g/ml de Acetato de α -Tocoferol em etanol contendo 0,04% de BHT) e 200 μ l de H₂O MiliQ. A solução resultante foi agitada no vortex por 10 segundos, seguido da adição de 400 μ l de etanol contendo 0,04% de BHT e agitada novamente por 10 segundos. Adicionou-se uma alíquota de 800 μ l de hexano contendo 0,04% de BHT e a solução foi agitada no vortex por 1 minuto, seguida de centrifugação a 2.200 rpm, a 10°C por 10 minutos. Uma alíquota de 700 μ l da camada superior foi transferida para outro tubo para evaporação do hexano com nitrogênio gasoso. O pellet resultante foi ressuspensão em 200 μ l de metanol, agitado no vortex por 30 segundos e transferido para um vial após filtração em membrana de PTFE de 0,45 μ m de porosidade.

A identificação foi realizada em HPLC da marca Agilent, equipado com coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 de 150mm x 4.6mm com partículas de 5 μ m, conectado a um coluna de guarda RX-C8 de 12.5mm x 4.6mm com partículas de 5 μ m (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). A temperatura no amostrador foi mantida em 4°C, e a temperatura da coluna foi de 30°C. Após a injeção de 20 μ l de amostra, a separação foi realizada utilizando metanol como fase móvel.

A detecção foi realizada por fluorescência, com comprimentos de onda de 295 nm para excitação e 330 nm para emissão, ganho de 3 e sensibilidade média.

O cálculo das concentrações de α -, δ -, e γ -tocoferol foi realizado a partir da equação gerada por uma curva de calibração para cada um dos compostos. A cada corrida feita no HPLC foi preparado o branco com metanol e um controle externo constituído por uma solução de acetato de α -tocoferol.

Capacidade antioxidante do plasma pela técnica de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

A capacidade antioxidante do plasma foi mensurada pela técnica de ORAC, conforme descrito por Prior et al. (2003), que estima a habilidade do plasma de resistir ao dano oxidativo, refletindo os efeitos combinados de todos os antioxidantes do plasma.

Uma alíquota de 100µl de plasma foi transferida para um microtubo e adicionada de 200 µl de etanol e 100 µl de água milliQ, seguida da adição de 400 µl de hexano e posterior agitação. A mistura foi mantida em repouso por 1-2 minutos ou até que as duas camadas se separassem e então foi centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm (Hitachi, CF-15R). A camada de hexano foi removida e transferida para outro microtubo. Adicionou-se 400 µl de hexano ao tubo original para realizar uma nova extração, com agitação e centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm. A camada de hexano foi removida e os extratos combinados foram concentrados com nitrogênio gasoso para preparação da porção lipofílica. À porção hidrofílica que restou após as extrações com hexano, adicionou-se 400 µl de ácido perclórico 0.5 M para precipitação das proteínas. A amostra foi então centrifugada por 5 min a 14000 rpm.

Para análise da porção lipofílica do plasma, a amostra foi ressuspensa em 250 µl de acetona e diluída com 750 µL de solução de β-ciclodextrina a 7%, seguida de nova diluição na proporção de 1:4. Alíquotas de 25 µl das amostras diluídas foram pipetadas em uma microplaca de 96 poços. A cada poço foram injetados automaticamente 150 µL de solução de fluoresceína 40 nM, seguida de incubação por 30 minutos e então foram injetados 25 µl de solução AAPH 153 nM e a leitura foi realizada imediatamente. Para análise da porção hidrofílica, o extrato foi diluído na proporção de 1:10 em tampão fosfato 75 mM, pH 7. Alíquotas de 25 µl das amostras diluídas foram pipetadas em uma microplaca. As soluções de fluoresceína e AAPH foram adicionadas como descrito no ensaio lipofílico. A placa foi agitada por 10 segundos após cada injeção. A intensidade da fluorescência foi medida fluorimetricamente com comprimento de onda de emissão de 528/20 nm e excitação

de 485/20 nm a cada 60 segundos, durante 1 hora em um leitor de microplacas (Multi-Detection microplate reader, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT).

Uma curva de calibração foi preparada utilizando uma solução de Trolox nas faixas de concentração de 6,5 a 50 $\mu\text{mol/l}$ para o ensaio lipofílico e de 6,5 a 100 $\mu\text{mol/l}$ para o ensaio hidrofílico.

Os valores finais de ORAC foram calculados utilizando a equação de regressão entre a concentração de Trolox e a área abaixo da curva de decaimento da fluoresceína, calculada pelo software do equipamento (Gen 5TM, BIOTEK, Winooski, VT). Os resultados foram expressos em μmol de Trolox equivalente por litro de amostra ($\mu\text{mol TE/L}$).

4.3.5. Cálculo da ingestão energética, de macro e micronutrientes

O cálculo da ingestão energética, de macro e micronutrientes foi realizado a partir dos registros alimentares preenchidos pelos pacientes em 2 dias de semana e um sábado ou domingo, totalizando 3 registros em cada etapa do protocolo experimental.

Para isso, foi utilizado o software Nutri quanti®, que se baseia em tabelas de composição de alimentos como a TACO, a USDA e a tabela da USP (www.nutriquanti.com.br). O programa disponibiliza a quantidade de calorias, carboidratos, proteínas, lipídios totais, fibras, minerais, algumas vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis, ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados e colesterol em cada 100 gramas do alimento consumido.

4.4. Análise Estatística

Os resultados observados em cada grupo experimental foram apresentados como média \pm desvio padrão. Os parâmetros determinados nos quatro grupos no intervalo de tempo utilizado na intervenção (0-42 dias) foram tratados por

ANOVA para medidas repetidas seguido de teste de Tukey para identificação de contrastes significativos. Os valores foram inicialmente avaliados quanto a homogeneidade de variâncias através do teste de Hartley, e quando necessário foram transformados antes da aplicação da ANOVA. A diferença absoluta entre os valores iniciais e finais de cada grupo (delta) foi avaliada por ANOVA univariada, ou o equivalente teste não paramétrico (Kruskal-Wallis ANOVA) para grupos com variâncias não homogêneas. Modelos de regressão foram ajustados para a alteração percentual das seguintes variáveis: (HDL, LDL, TG, SOD e MDA), considerando-se os fatores x_1 (suplementação com ácidos graxos Omega 3) e x_2 (ingestão de estatinas) e a interação x_1x_2 como variáveis dependentes. A dimensão e significância dos fatores padronizados foram apresentadas na forma de gráficos de Pareto. A alteração da resposta em função dos fatores foi apresentada na forma de Curvas de Contorno. Adotou-se um valor α de 0.05 como crítico para rejeição da hipótese de nulidade. Cálculos e gráficos foram realizados utilizando-se o software StatSoft versão 9.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Análise do perfil de ácidos graxos do óleo contido nas cápsulas

O perfil dos principais ácidos graxos das cápsulas contendo óleo de peixe e óleo de milho/soja está descrito na **Tabela 1**. Os valores obtidos estão de acordo com o certificado de análise fornecido pelo fabricante (Anexo 1), onde as cápsulas de óleo de peixe apresentaram 41% de EPA e 22% de DHA.

Tabela 1 Perfil dos principais ácidos graxos das cápsulas de óleo de peixe ou óleo de soja/milho.

Ácidos Graxos (%)	Óleo de Peixe	Óleo de Soja/Milho
C14:0 - ácido mirístico	1,01	0,00
C16:0 - ácido palmítico	2,71	10,13
C17:0 - ácido margárico	0,00	0,07
C18:0 - ácido esteárico	4,53	3,04
C20:0 - ácido aráquico	0,83	0,38
C22:0 - ácido behênico	0,00	0,24
Σ AGS	9,08	13,86
C16:1 - ácido palmitoléico	0,88	0,09
C18:1 - ácido oléico	6,61	26,72
C20:1 - ácido eicosaenóico	3,66	0,21
C22:1 - ácido erúcico	2,59	0,00
Σ AGMI	13,73	27,03
C18:2 - ácido linoléico	0,00	54,40
C18:3 - ácido linolênico	0,00	3,51
C18:4 - ácido estearidônico	1,34	0,00
C20:4 n-6 - ácido araquidônico	2,53	0,00
C20:4 n-3 – ácido eicosatetraenóico	1,82	0,00
C20:5 - ácido eicosapentaenóico	42,23	0,00
C22:5 - ácido docosapentaenóico	3,27	0,00
C22:6 - ácido docosaexaenóico	23,72	0,00
Σ AGPI	74,91	57,91
Σ Total	97,71	98,80
IP ¹	308,21	61,88

¹ Índice de peroxidabilidade. Calculado de acordo com HSU, LEE e CHEN (2001).

5.2. Características basais da população de estudo

As características basais da população de estudo estão descritas na **Tabela 2**. Observa-se que a população apresenta características clínicas e antropométricas dentro dos limites desejáveis, exceto pelo IMC médio, que caracteriza sobrepeso (28,21 kg/m²), e pela concentração sérica de PCR, que se encontra na faixa de risco coronariano moderado (2,71 mg/L). A maioria dos indivíduos dessa população apresentou nível de escolaridade até o 2º grau, eram caucasianos e praticavam atividade física suave (1 a 2 vezes por semana).

Os indivíduos que faziam uso de estatina, utilizavam principalmente a simvastatina nas dosagens de 10 a 20 mg.

Tabela 2 Características basais da população de estudo (n=45).

Variável	(n=45)	Valores de Referência
Idade (anos)	61,30 ± 7,8	-
IMC (kg/m ²)	28,21 ± 4,77	18,50 a 24,90 ¹
CC/CQ	0,86 ± 0,07	0,85 -1,00 ¹
Glicemia (mg/dL)	86,37 ± 12,10	70,00 – 100,00 ²
Colesterol Total (mg/dL)	207,84 ± 36,78	<200,00 ²
HDL-c (mg/dL)	50,14 ± 12,38	>40,00 ²
LDL-c (mg/dL)	134,78 ± 34,09	<130,00 ²
TG (mg/dL)	117,47 ± 48,47	< 150,00 ²
PCR (mg/L)	2,11 ± 2,09	<1,00 ³
Escolaridade (%)		
Até 1º grau completo	34,88	
Até 2º grau completo	32,56	
Superior completo	23,26	
Pós-graduação	9,30	
Etnia (%)		
Caucasiano	65,12	
Indígena	16,28	
Afrodescendente	13,95	
Asiático	4,65	
Atividade Física (%)		
Suave	72,41	
Moderado	20,69	
Intenso	6,90	
Tipo de Estatina (%)		
Atorvastatina	33,33	
Simvastatina	57,14	
Rosuvastatina	4,76	
Pravastatina	4,76	
Dosagem Estatina (%)		
9 mg	1,00	
10 mg	7,00	
20 mg	8,00	
40 mg	2,00	
não responderam	2,00	
Fumo (%)		
	6,98	
Hipertensão (%)		
	38,00	
Pós-menopausa (%)		
	96,00	

¹World Health Organization, 2000. ²National Cholesterol Education Program (NCEP), 2001. ³Pearson, TA, et al., 200

5.3. Parâmetros bioquímicos e antropométricos avaliados antes e após o período de intervenção

Foram observadas diferenças significativas nas concentrações séricas de colesterol total, LDL e TG entre os 4 grupos após o período de intervenção, como pode ser observado na **Tabela 3**. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de IMC, na razão entre as circunferências da cintura e do quadril, nas concentrações séricas de glicose e HDL, na concentração plasmática de MDA e na capacidade antioxidante total do plasma em nenhum dos quatro grupos experimentais.

Não foram observadas diferenças significativas na concentração plasmática de α -, δ -, e γ -tocoferol em nenhum dos grupos experimentais, como pode ser observado na **Tabela 4**.

Não foram observadas diferenças significativas na atividade das enzimas antioxidantes entre os quatro grupos após o período de intervenção (**Tabela 5**). Em relação à expressão protéica, observou-se redução significativa na expressão de catalase apenas no grupo Combinado (**Tabela 5 e Figura 12**).

Tabela 3 Parâmetros bioquímicos e antropométricos avaliados antes e após o período de intervenção.

	PLACEBO	ESTATINA	OMEGA 3	COMBINADO	DP médio	p ¹	Valores reportados na literatura
	n=24	n=19	n=25	n=20			
IMC t=0 (kg/m ²)	29,25	26,90	29,06	27,08	4,77	0,454	18,50 a 24,90 ²
IMC t=42 (kg/m ²)	29,07	26,78	28,98	27,18	4,68		
CC/CQ t=0	0,86	0,86	0,86	0,83	0,07	0,504	0,85 -1,00 ²
CC/CQ t=0	0,87	0,86	0,88	0,86	0,07		
Glicose t=0 (mg/dL)	87,79	83,79	89,00	86,50	12,10	0,207	70,00 – 100,00 ³
Glicose t=42 (mg/dL)	88,58	82,84	92,36	86,75	13,45		
Colesterol Total t=0 (mg/dL)	216,67 ^{ab}	191,68 ^a	208,72 ^{ab}	211,50 ^{ab}	36,78	0,002	<200,00 ³
Colesterol Total t=42 (mg/dL)	228,75 ^b	196,16 ^{ab}	225,36 ^{ab}	196,30 ^{ab}	43,14		
HDL t=0 (mg/dL)	49,58	50,63	52,44	50,10	13,54	0,702	>40,00 ³
HDL t=42 (mg/dL)	52,08	51,63	53,60	52,95	12,67		
LDL t=0 (mg/dL)	144,50 ^{ab}	116,88 ^a	136,04 ^{ab}	133,39 ^{ab}	32,92	0,038	<130,00 ³
LDL t=42 (mg/dL)	154,85 ^b	121,38 ^a	149,04 ^{ab}	121,77 ^a	37,37		
TG t=0 (mg/dL)	112,92 ^{ab}	120,84 ^{ab}	101,20 ^{ab}	140,05 ^a	48,47	0,026	< 150,00 ³
TG t=42 (mg/dL)	109,08 ^{ab}	115,74 ^{ab}	92,96 ^b	107,90 ^b	51,27		
MDA t=0 (uMol/L)	2,07	2,19	1,81	1,92	0,60	0,142	1,00 ⁴
MDA t=42 (uMol/L)	2,29	2,07	2,64	2,28	1,18		
ORAC t=0 (uMol TE/L)	2000,31	1833,81	1767,85	1771,06	584,07	0,600	1721,5 – 2011 ⁵
ORAC t=42 (uMol TE/L)	1832,62	1881,73	1702,13	1853,70	629,46		

¹ Valor de probabilidade para a interação grupos x tempo determinada por ANOVA para medidas repetidas. ² World Health Organization, 2000. ³National Cholesterol Education Program (NCEP), 2001. ⁴Cheng et al., 2008. ⁵Prior et al., 2003.

Tabela 4 Concentrações plasmáticas de α -, δ -, e γ -tocoferol avaliadas antes e após o período de intervenção

	PLACEBO	ESTATINA	OMEGA 3	COMBINADO	DP	P ¹	Valores de Referência
α -tocoferol t=0 (ug/ml)	10,51	11,50	10,23	11,33	3,11	0,852	2,03- 28,18 $\mu\text{g/mL}^2$
α -tocoferol t=42 (ug/ml)	10,23	12,16	10,11	10,96	3,41		
δ -tocoferol t=0 (ug/ml)	0,13	0,13	0,13	0,12	0,06	0,180	0,01-0,23 $\mu\text{g/mL}^2$
δ -tocoferol t=42 (ug/ml)	0,11	0,12	0,12	0,14	0,06		
γ -tocoferol t=0 (ug/ml)	1,44	1,65	1,48	1,52	0,59	0,167	0,23 – 3,9 $\mu\text{g/mL}^2$
γ -tocoferol t=42 (ug/ml)	1,65	2,01	1,48	1,66	0,63		

¹ Valor de probabilidade para a interação grupos x tempo determinada por ANOVA para medidas repetidas. ²Siluk et al., 2007.

Tabela 5 Atividade e expressão protéica das enzimas antioxidantes

	PLACEBO	ESTATINA	ÔMEGA 3	COMBINADO	DP médio	P ¹
Atividade						
CAT T=0 (UA/min/mg PTN)	1,61	2,40	2,04	1,66	0,98	0,142
CAT T=42 (UA/min/mg PTN)	1,18	1,28	1,33	1,29	0,39	
SOD T=0 (UA/min/mg PTN)	2,86	3,12	2,63	2,51	0,93	0,039
SOD T=42 (UA/min/mg PTN)	2,88	2,77	3,11	2,96	0,50	
GPx T=0 (UA/min/mg PTN)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,981
GPx T=42 (UA/min/mg PTN)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	
Expressão Protéica						
CAT T=0 (UA)	1,00 ^a	0,91 ^{ab}	0,80 ^{ab}	1,05 ^a	0,28	0,005
CAT T=42 (UA)	1,00 ^a	0,97 ^a	0,75 ^{ab}	0,39 ^b	0,38	
SOD T=0 (UA)	1,00	0,80	1,10	0,97	0,31	0,314
SOD T=42 (UA)	1,00	1,42	1,29	1,28	0,47	

¹ Valor de probabilidade para a interação grupos x tempo determinada por ANOVA para medidas repetidas

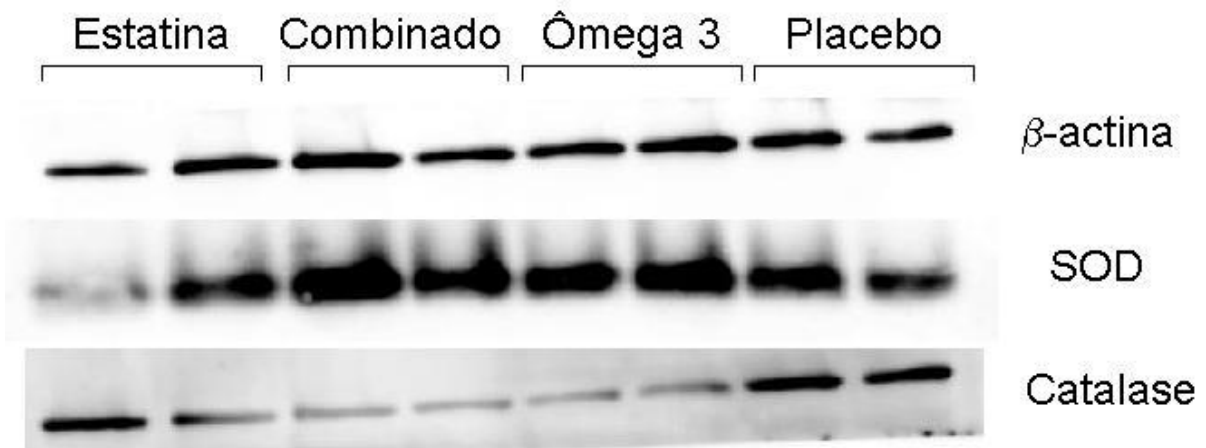


Figura 12 Detecção de Western Blotting da SOD, catalase e β -actina nos 4 grupos após 42 dias de suplementação.

O Grupo Combinado apresentou redução significativa da concentração sérica de LDL após 42 dias de suplementação (121,77 mg/dL) quando comparado ao grupo Placebo (154,85 mg/dL). A superfície gerada para essa resposta (LDL) em função da presença ou ausência de estatinas e AGPI n-3 (**Figura 13**) sugere que na ausência da estatina, a suplementação com AGPI n-3 não altera a concentração de LDL (faixa vermelha). Entretanto, na presença da estatina, a suplementação com AGPI n-3 tende a contribuir para a redução da LDL (faixas coloridas). O valor dos efeitos apresentados no gráfico de Pareto (**Figura 14**) confirma a significância única da estatina no resultado observado, porém com forte tendência ($p=0,128$) da ocorrência de interação entre AGPI n-3 e estatinas nesse benefício na população avaliada neste estudo.

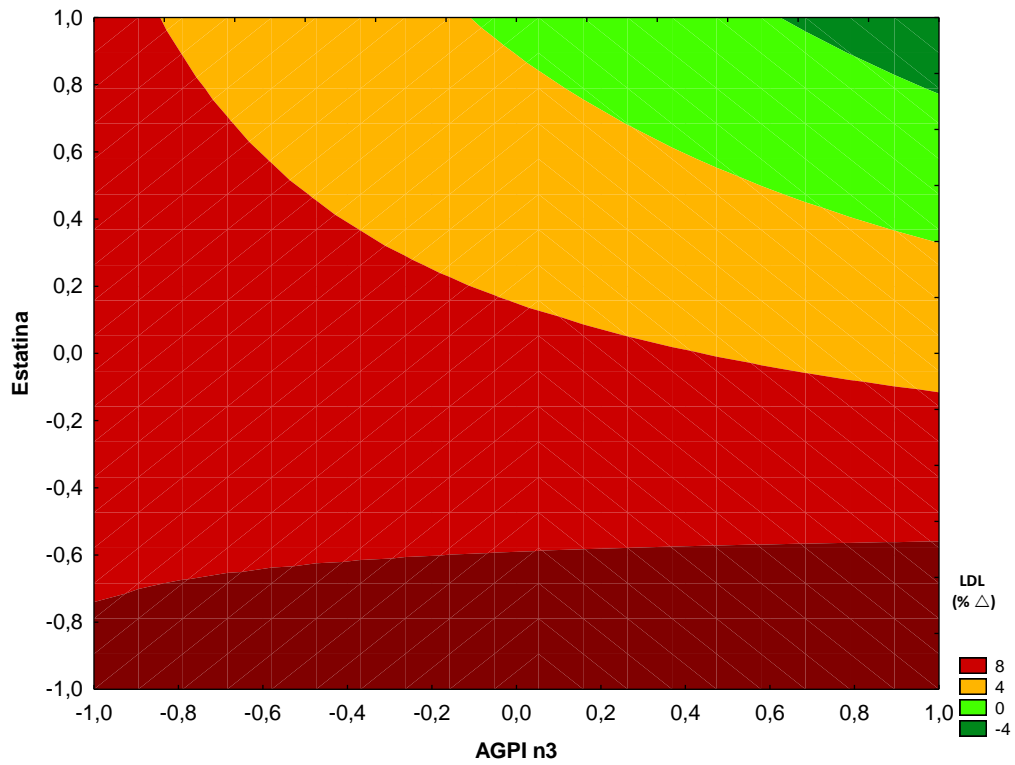


Figura 13 Superfície de Resposta para a alteração de LDL em função da ausência (-1) ou presença (+1) das variáveis, Omega e Estatina.

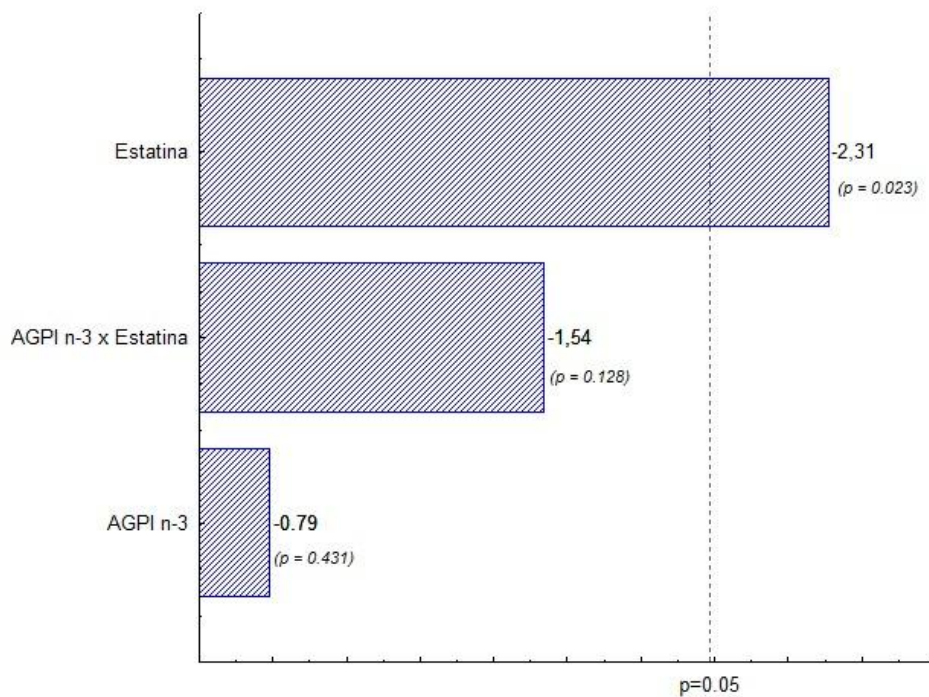


Figura 14 Efeitos principais e da interação na alteração de LDL.

Em relação à concentração sérica de TG, observou-se também uma maior redução quando comparado ao valor inicial no Grupo Combinado (**Tabela 3**). A superfície gerada para a alteração de TG sugere que a suplementação com AGPI n-3 tende a ser efetiva na redução de TG ($p=0,054$) apenas na presença de estatina (**Figura 15**), entretanto, essa contribuição não alcançou evidência estatística (**Figura 16**) na população avaliada neste estudo.

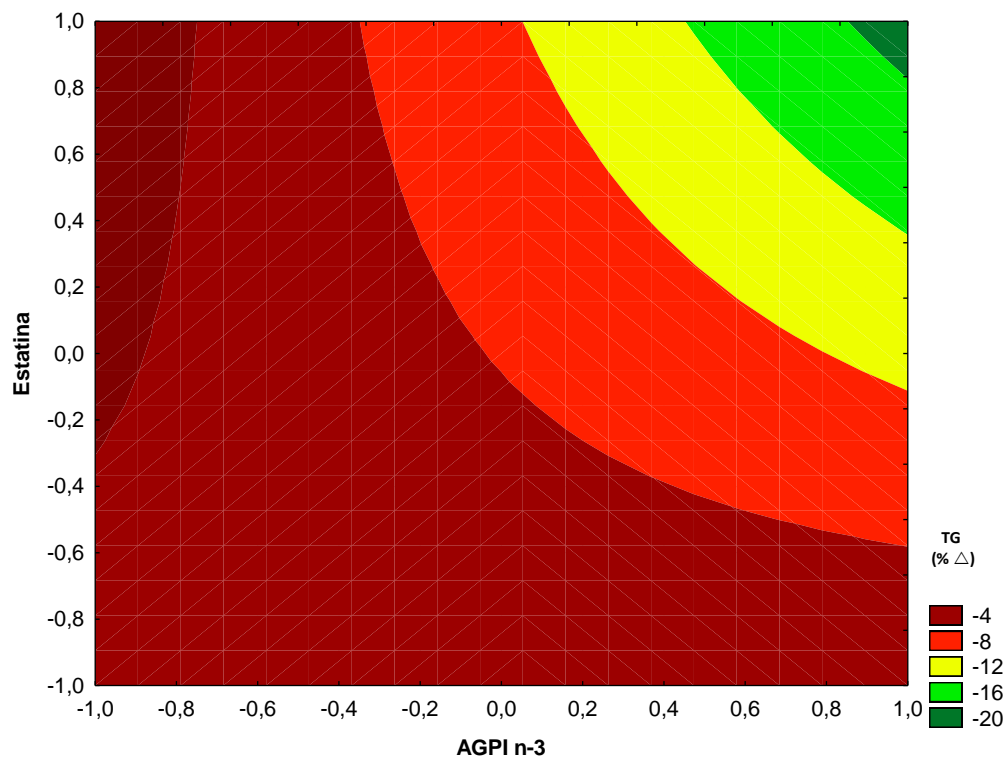


Figura 15 Superfície de Resposta para a redução de TG em função da ausência (-1) ou presença (+1) das variáveis.

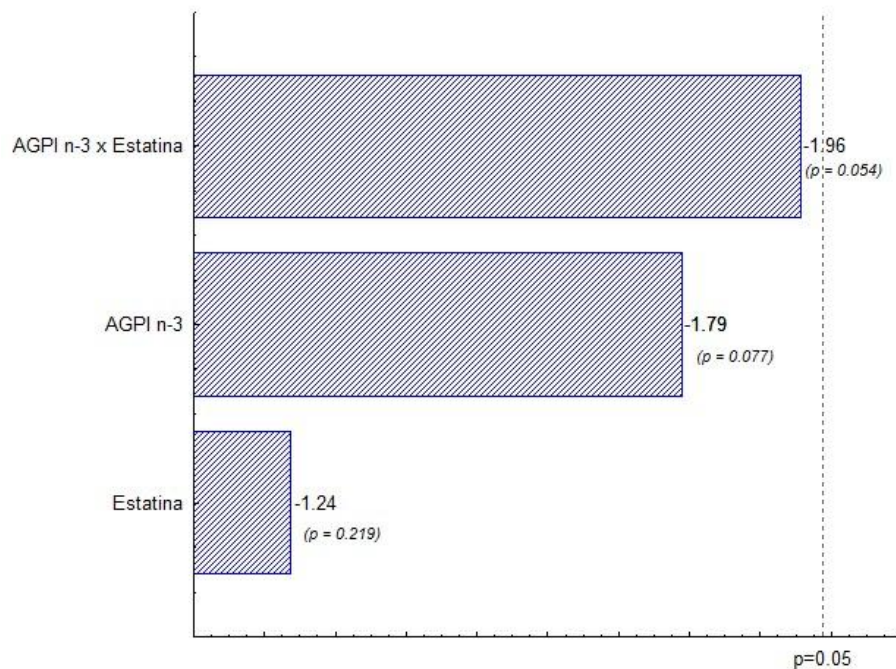


Figura 16 Efeitos principais e da interação na redução de TG.

As alterações observadas na atividade da SOD decorrentes da intervenção (**Figura 17**) sugerem que a suplementação com AGPI n-3 causou um aumento significativo (**Figura 18**), enquanto que a estatina não apresentou nenhuma influência na atividade dessa enzima.

No entanto, a superfície gerada para a alteração da expressão protéica da SOD sugere que o uso de estatina parece ser efetivo no aumento da expressão dessa enzima (**Figura 19**), com forte tendência dos AGPI n-3 ($p=0,063$) na redução dessa expressão. Os valores dos efeitos apresentados no gráfico de Pareto (**Figura 20**) confirmam a significância única da estatina no resultado observado, sugerindo esse mecanismo como um dos possíveis efeitos pleiotrópicos atribuídos a essa classe de fármacos.

A superfície gerada para a alteração da expressão protéica da catalase (**Figura 21**) sugere que a suplementação com AGPI n-3 causou uma redução significativa (**Figura 22**) enquanto que a estatina não apresentou nenhuma influência na expressão dessa enzima.

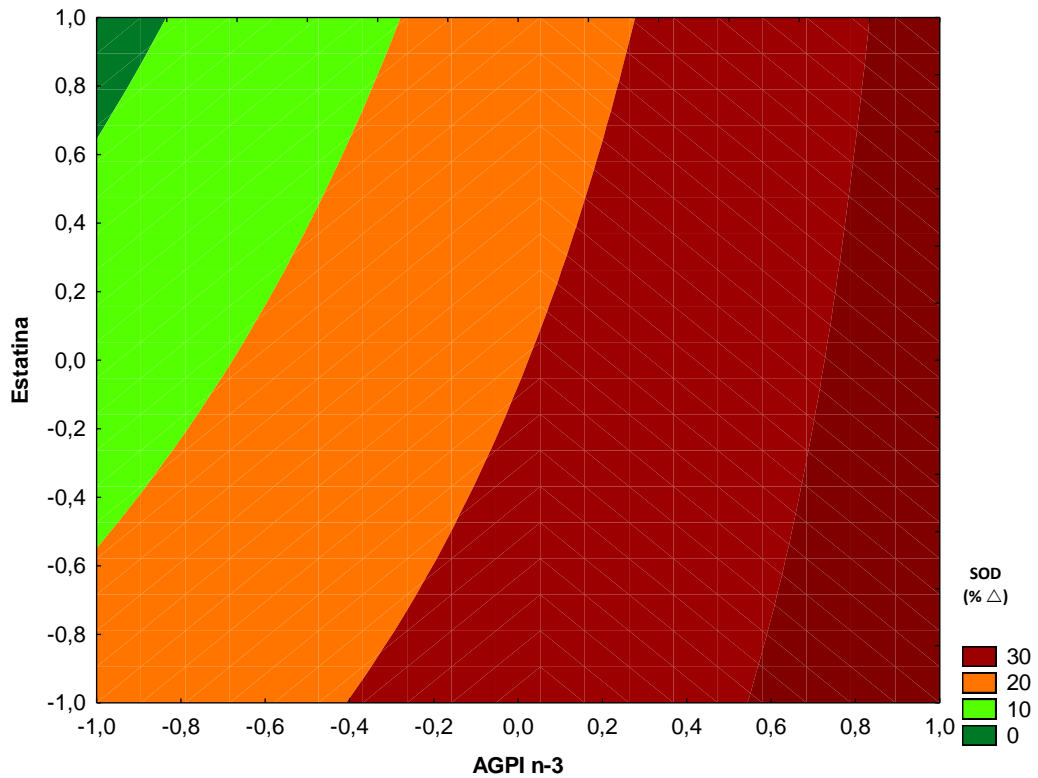


Figura 17 Superfície de Resposta para o aumento da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) em função da ausência (-1) ou presença (+1) das variáveis.

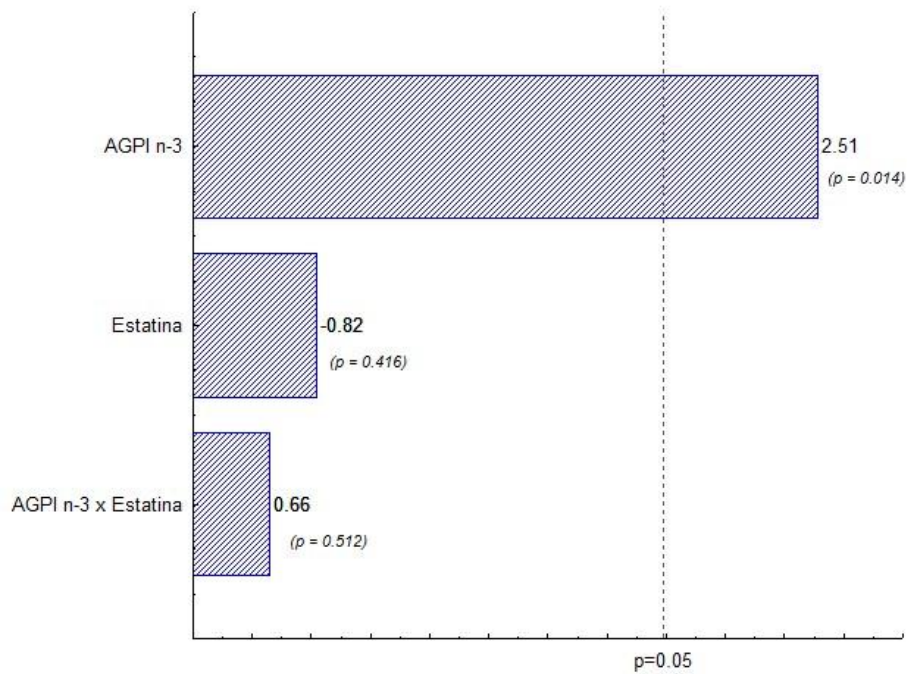


Figura 18 Efeitos principais e da interação no aumento da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD).

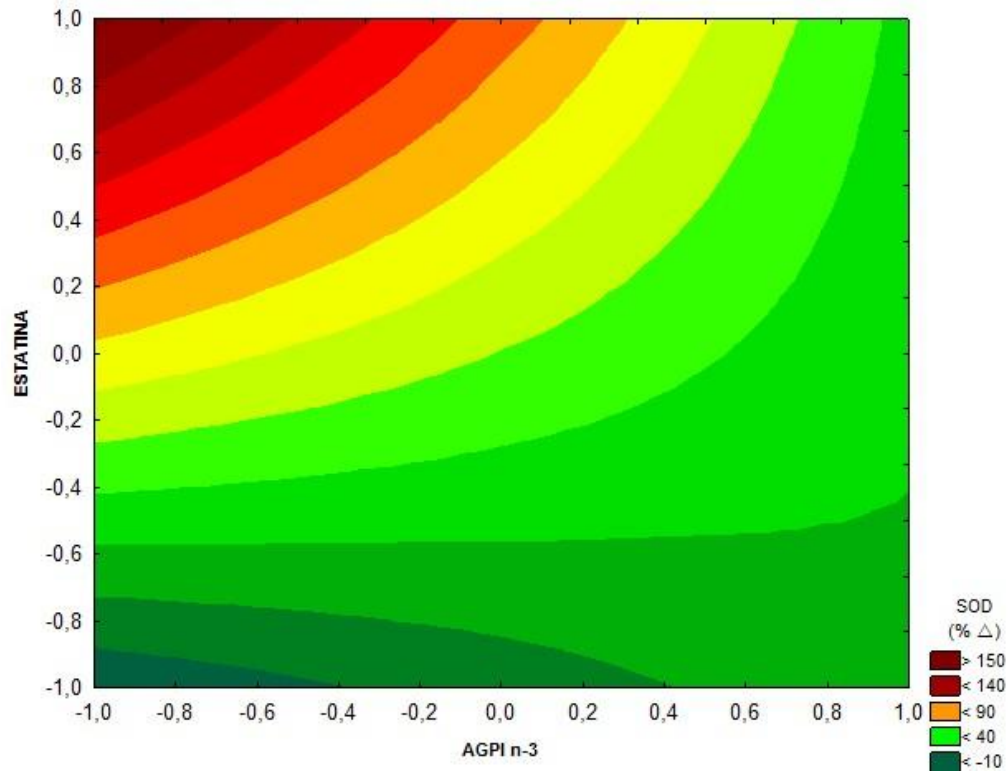


Figura 19 Superfície de Resposta para o aumento da expressão protéica da enzima Superóxido Dismutase (SOD) em função da ausência (-1) ou presença (+1) das variáveis.

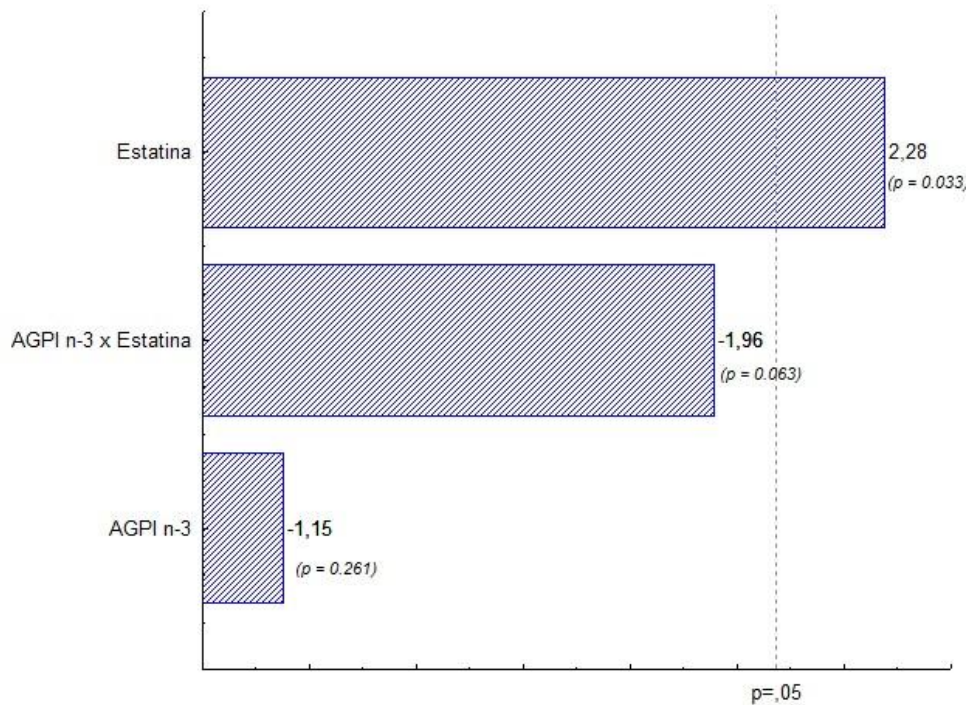


Figura 20 Efeitos principais e da interação na alteração da expressão protéica da enzima Superóxido Dismutase (SOD).

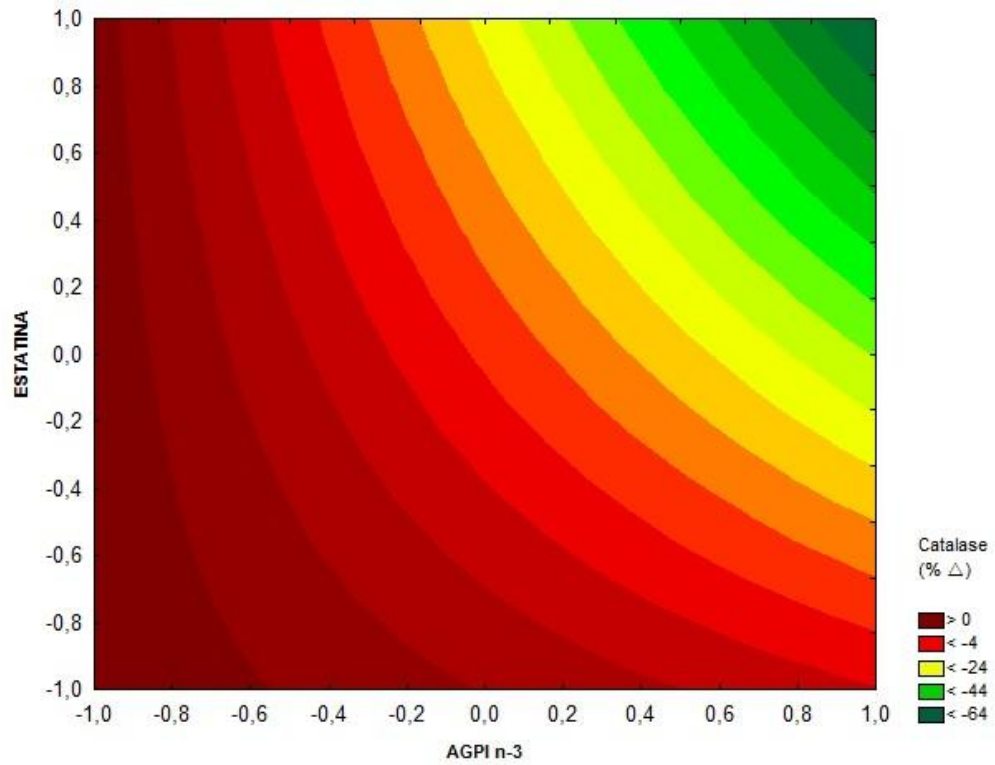


Figura 21 Superfície de Resposta para o aumento da expressão protéica da enzima catalase em função da ausência (-1) ou presença (+1) das variáveis.

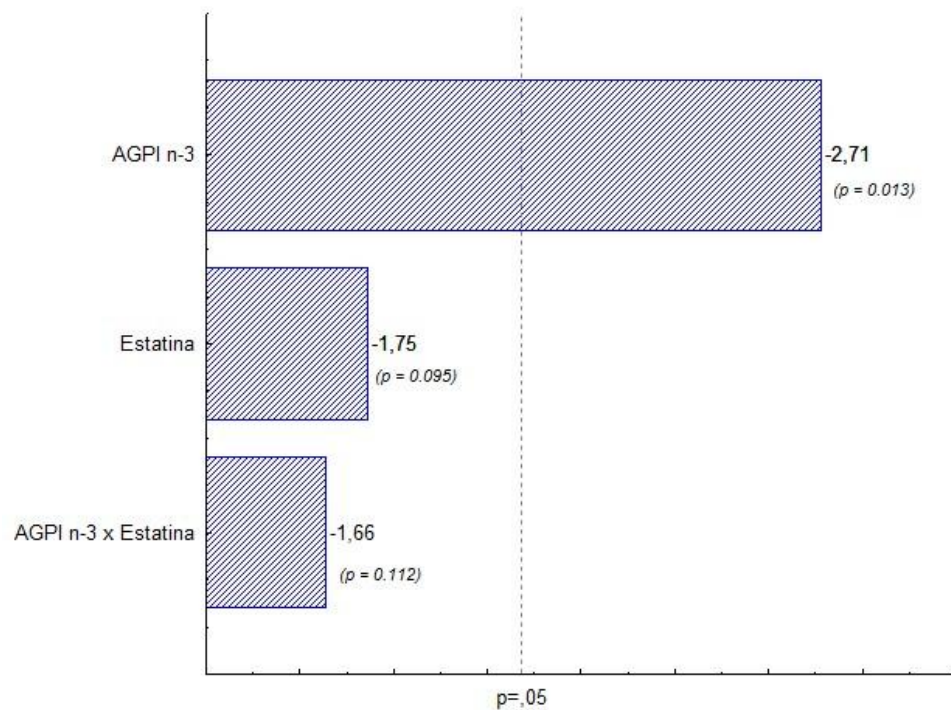


Figura 22 Efeitos principais e da interação no aumento da expressão protéica da enzima catalase.

A formação de MDA seguiu padrão de resposta similar a atividade da SOD (**Figura 23**), sendo a contribuição da suplementação com AGPI n-3 única e significativa (**Figura 24**) para o aumento da concentração de MDA no plasma dos indivíduos avaliados neste estudo.

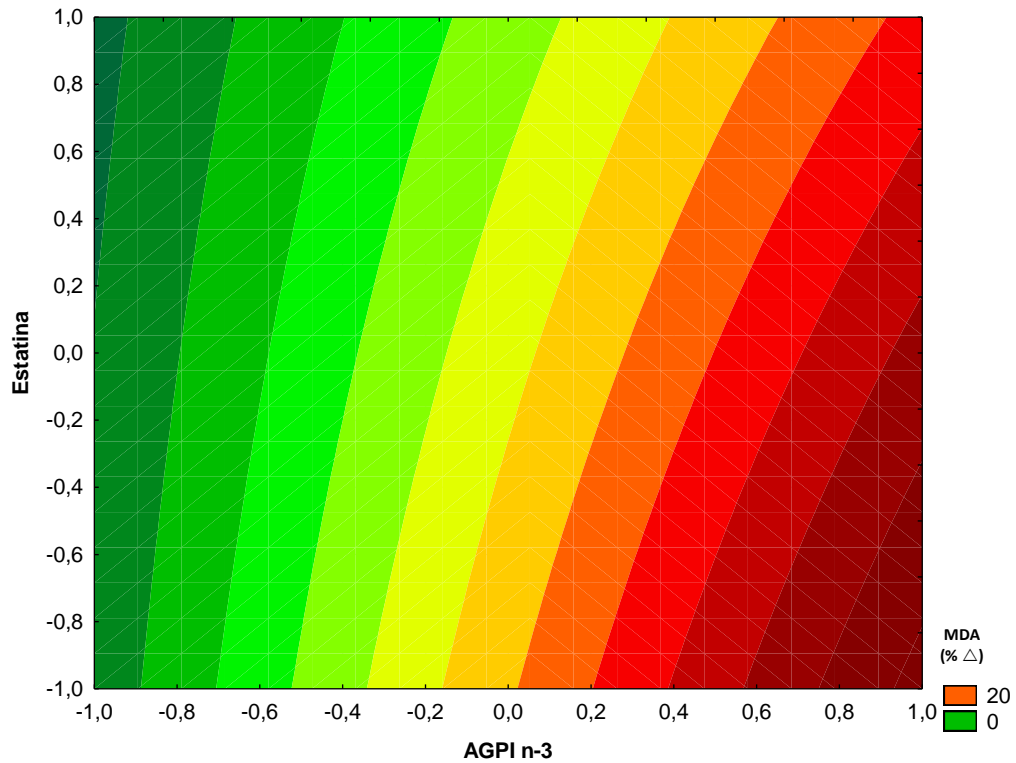


Figura 23 Superfície de Resposta para a formação de MDA em função da ausência (-1) ou presença (+1) das variáveis.

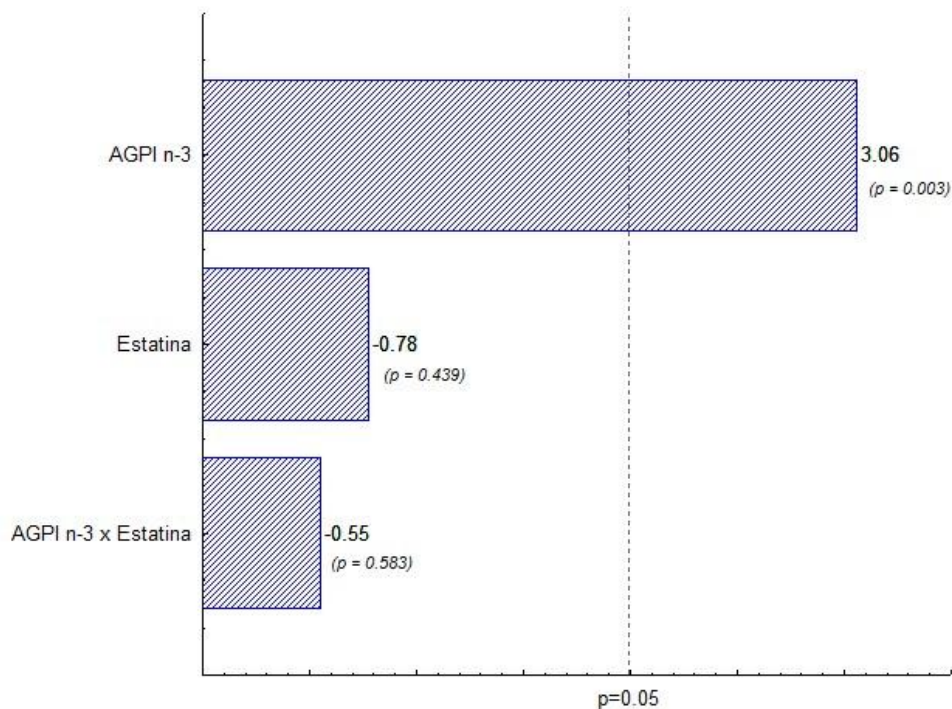


Figura 24 Efeitos principais e da interação na formação de MDA.

5.4. Perfil de ácidos no plasma antes e após o período de intervenção

As alterações no perfil dos principais ácidos graxos do plasma decorrentes da suplementação com AGPI n-3 estão apresentadas na **Tabela 6**. Os grupos que foram suplementados com AGPI n-3 apresentaram redução na porcentagem dos ácidos linoléico e araquidônico, acompanhada por um aumento na porcentagem do ácido eicosapentaenóico, demonstrando claramente a substituição dos AG n-6 pelos AGPI n-3 no plasma dos indivíduos suplementados. Devido a problemas na identificação, não foi possível apresentar a porcentagem de ácido docosaexaenóico nessas amostras.

5.5. Ingestão de energia, macro e micronutrientes antes e após o período de intervenção

As quantidades de energia, macro e micronutrientes ingeridas pelos indivíduos antes e após o período de intervenção estão apresentadas na **Tabela 7**. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para nenhum dos parâmetros avaliados.

Tabela 6 Perfil dos principais ácidos graxos avaliados no plasma dos indivíduos antes e após a intervenção.

Ácidos Graxos (%)	Placebo	Estatina	Ômega 3	Combinado	DP (médio)	P ¹
C16:0 t=0	17,55	17,99	17,56	18,36	2,54	0,022
C16:0 t=42	18,06	17,17	17,56	17,03	2,56	
C18:0 t=0	6,16 ^{ab}	6,63 ^{ab}	6,05 ^a	6,81 ^b	0,80	0,146
C18:0 t=42	6,23 ^{ab}	6,45 ^{ab}	6,40 ^{ab}	6,51 ^{ab}	0,68	
AGS t=0	24,91	26,10	24,80	26,77	3,28	0,051
AGS t=42	25,28	24,55	24,89	24,78	3,28	
C16:1 t=0	1,69 ^{ab}	1,76 ^{ab}	1,55 ^{ab}	1,76 ^b	0,57	0,049
C16:1 t=42	1,63 ^{ab}	1,57 ^{ab}	1,42 ^{ab}	1,41 ^a	0,55	
C18:1 t=0	15,98 ^{ab}	17,39 ^{ab}	15,53 ^{ab}	17,79 ^b	3,28	0,002
C18:1 t=42	16,43 ^{ab}	16,41 ^{ab}	15,11 ^{ab}	15,42 ^a	3,05	
AGM t=0	16,43 ^{ab}	18,15 ^{ab}	15,93 ^{ab}	18,53 ^b	3,36	0,002
AGM t=42	16,74 ^{ab}	16,82 ^{ab}	15,57 ^a	16,02 ^a	3,04	
C20:4 t=0	5,91 ^{ab}	7,48 ^{cd}	6,13 ^{abc}	7,17 ^{bcd}	1,51	0,003
C20:4 t=42	6,30 ^{abcd}	7,54 ^d	5,76 ^a	6,58 ^{bcd}	1,55	
C20:5 t=0	0,42 ^a	0,42 ^a	0,41 ^a	0,49 ^a	0,19	< 0,001
C20:5 t=42	0,51 ^a	0,49 ^a	2,57 ^b	2,51 ^b	1,35	
AGPI t=0	50,37 ^{ab}	49,14 ^{ab}	51,05 ^{ab}	48,77 ^a	5,02	0,064
AGPI t=42	51,24 ^{ab}	51,60 ^{ab}	52,24 ^{ab}	52,17 ^b	4,79	
Omega 3 t=0	15,33 ^{ac}	12,85 ^{ab}	15,46 ^c	11,29 ^b	4,21	< 0,001
Omega 3 t=42	13,68 ^{ab}	14,10 ^{ab}	18,53 ^c	18,22 ^c	4,44	
Omega 6 t=0	33,31 ^{ac}	34,56 ^{abcd}	33,96 ^{abcd}	35,62 ^{cd}	4,08	< 0,001
Omega 6 t=42	35,79 ^{bd}	35,87 ^{abcd}	32,36 ^{abcd}	32,63 ^{ab}	4,53	

¹ Valor de probabilidade para a interação grupos x tempo determinada por ANOVA para medidas repetidas

Tabela 7 Ingestão de energia, macro e micronutrientes antes e após o período de intervenção.

	PLACEBO		ESTATINA		OMEGA 3		COMBINADO		DP	P ¹	Ingestão dietética de referência (DRI) ²
	t=0	t=42	t=0	t=42	t=0	t=42	t=0	t=42			
Energia (Kcal)	1487,5	1379,0	1294,3	1290,1	1594,6	1505,4	1280,5	1327,7	435,4	0,528	2.000,0
Proteína (g)	63,9	60,8	57,0	49,4	68,0	62,8	52,0	52,2	25,3	0,727	10,0- 35,0
Carboidrato (g)	193,4	179,1	160,6	159,4	204,8	206,7	174,3	168,4	60,4	0,686	45,0 - 65,0
Lipídio (g)	45,6	46,6	47,1	39,0	55,9	52,6	41,7	43,6	20,4	0,344	20,0 – 35,0
AGS (g)	14,0	15,0	12,7	12,7	18,4	16,4	13,6	13,5	7,9	0,72	-
AGS (% energia)	7,5	8,7	7,9	7,8	9,2	8,7	8,5	8,1			< 10% do total de energia ³
AGMI (g)	12,2	12,4	11,7	10,1	13,8	13,3	10,8	11,8	6,3	0,516	-
AGMI (% energia)	6,6	7,2	7,2	6,2	6,9	7,1	6,7	7,1			-
AGPI(g)	8,4	6,6	6,5	5,1	8,4	7,7	7,5	7,0	4,6	0,808	-
AGPI(% energia)	4,5	3,8	4,0	3,2	4,2	4,1	4,7	4,2			6 -10%of total energia ³
Colesterol (mg)	200,1	198,0	172,7	149,8	187,1	197,0	138,9	157,7	104,3	0,673	<300,0mg ³
Fibra (g)	18,6	16,9	14,4	15,4	17,4	18,0	15,9	16,9	7,2	0,452	25 ,0- 30,0
Fe (mg)	6,1	6,6	5,1	4,8	6,6	6,4	4,9	5,2	2,4	0,603	8,0 -18,0
Zinco (mg)	7,4	9,4	6,6	6,6	8,9	7,8	5,9	5,7	4,6	0,35	8,0 – 11,0
Manganês (mg)	1,6	1,4	1,1	1,3	1,6	1,4	1,3	1,2	0,7	0,257	1,8 – 2,3
Vitamina C (mg)	112,2	131,9	129,4	124,9	112,0	141,2	121,8	119,1	106	0,921	75,0 – 90,0

¹ Probabilidade obtida pelo teste T para variáveis dependentes. ² *United States Department of Agricultural - Dietary Reference Intakes, 2004.* ³ *World Health Organization, 2003.*

6. DISCUSSÃO

A concentração de EPA aumentou significativamente no grupo Omega e no grupo Combinado, evidenciando sua absorção e a elevada aderência das voluntárias ao estudo. Após suplementação com 1,4g/dia de AGPI n-3 (EPA e DHA) por 3 semanas, Micallef e Garg (2009) observaram um aumento de 1,1% para 1,5% na porcentagem de EPA no plasma de indivíduos hiperlipidêmicos de ambos os sexos. No presente trabalho, com uma suplementação de 2,3g/dia de AGPI n-3, foi observado um aumento de 1,7% e de 1,6% nos grupos Omega e Combinado, respectivamente.

Os resultados obtidos nesta pesquisa confirmam que a combinação de AGPI n-3 na dosagem de 2,3 g/dia e estatinas melhora o perfil lipídico plasmático em termos de redução de LDL e TG. Entretanto, o aumento da concentração de AGPI observado no plasma das voluntárias em consequência da suplementação promoveu um aumento do estresse oxidativo, evidenciado pela maior concentração de MDA (produto secundário da oxidação de ácidos graxos com mais que duas insaturações). Considerando-se a ausência de alterações na concentração de antioxidantes plasmáticos, a elevação do estresse oxidativo proporcionada pela ingestão de AGPI n-3 pode ser decorrente de um desequilíbrio no sistema antioxidante enzimático, evidenciado principalmente pela redução de expressão da catalase.

Várias pesquisas têm reportado a ausência de efeito dos AGPI n-3 na redução de LDL em estudos conduzidos em humanos (CASTRO; BARROSO; SINNECKER, 2005; BALK et al., 2006; ESLICK et al., 2009). Nossos resultados mostram que a suplementação com AGPI n-3, tanto na forma isolada como em combinação com a estatina, não alteraram a concentração de LDL inicialmente observada. Entretanto, comparando-se o valor final do grupo combinado (121,77 mg/dL) com o grupo placebo (154,85 mg/dL), observou-se uma redução significativa, sugerindo uma interação entre essas duas variáveis na redução da LDL.

Como esperado, a suplementação isolada com AGPI n-3 apresentou forte tendência ($p=0,026$) de reduzir a concentração de TG (-8,1%). Entretanto, redução

significativa de TG (-23%) foi observada apenas com a combinação de AGPI n-3 e estatinas.

Apesar de apresentarem diferenças em relação à população de estudo e/ou à dosagem de AGPI n-3 e estatinas, diversos trabalhos verificaram que a adição de EPA e DHA ao tratamento com estatinas promoveu redução de TG e de colesterol total, sem promover aumento significativo de LDL (NØRDOY et al., 1998; DURINGTON, 2001; CHAN et al., 2002; CONTACOS et al., 2003; DAVIDSON et al., 2007; MEYER et al., 2007; MAKI et al., 2009). Esses resultados indicam que, quando a síntese de colesterol está inibida pelas estatinas, o aumento esperado de LDL causado pela ingestão de AGPI n-3 parece ser anulado pelo aumento da expressão e atividade de receptores de LDL (NØRDOY et al., 1998). A suplementação com AGPI n-3 promove aumento da expressão da LPL via PPAR- γ (Figura 9), aumentando assim a conversão de VLDL em LDL (HARRIS, 2008). Em indivíduos tratados com estatinas, a redução da síntese de colesterol promove aumento da atividade dos receptores de LDL, reduzindo a concentração plasmática dessa lipoproteína (LAWS et al., 2005). Assim, é provável que a suplementação com AGPI n-3, aliada ao tratamento com estatinas, reduza o colesterol total através da redução tanto das concentrações de VLDL como também de LDL.

Após suplementação com 4 ou 8 g/dia de óleo de peixe por 6 meses em pacientes que recebiam tratamento estável a base de estatinas, Meyer e col. (2007) observaram uma tendência dose-resposta à redução de CT e sugeriram que esse resultado fosse um reflexo da redução de VLDL. Nordoy e col. (1998) observaram maior redução nas concentrações séricas de TG, CT e da apolipoproteína E após o uso combinado de simvastatina (20 mg/dia) e óleo de peixe (4 g/dia) por 5 semanas. Esse efeito na redução de ApoE, componente dos quilomícrons remanescentes, VLDL, IDL e HDL, foi atribuído aos AGPI n-3 e tem como consequência a redução do CT (NØRDOY et al., 1998).

Alguns estudos indicam que as estatinas tenham um papel na ativação fatores de transcrição como os PPARs α e γ através da modulação de enzimas que fosforilam essas proteínas (MARTIN et al., 2001; CHAN et al., 2002; PANADERO et al., 2008). Ativando os PPARs, as estatinas promoveriam o mesmo efeito de redução de TG promovido pelos AGPI n-3. Na Figura 16, observa-se que o efeito da

interação entre os dois fatores, AGPI n-3 e estatinas, é correspondente à soma de seus efeitos isolados, indicando um possível efeito aditivo dos AGPI n-3 e estatinas na redução de TG.

Baseado em estudos realizados em diversos modelos experimentais, como células epidermais, ratos hipertrigliceridêmicos e coelhos, Das (2001 e 2002) sugeriu que os AGPI, especialmente os da família n-3, atuem de maneira similar às estatinas, inibindo a atividade da HMG-CoA redutase. Segundo o autor, é provável que os ácidos graxos essenciais e seus derivados atuem como mediadores da ação das estatinas, uma vez que as estatinas possuem efeitos sobre o seu metabolismo, aumentando a conversão de LA e EPA exógenos a seus derivados de cadeia longa, por aumento da atividade das δ -6- e δ -5-desaturases. Esse fato poderia explicar a similaridade de suas ações (DAS, 2001).

Assim, acredita-se que os AGPI n-3 e as estatinas possam atuar sobre os lipídios plasmáticos por mecanismos similares, apresentando efeitos aditivos. O efeito das estatinas sobre os PPARs e dos AGPI n-3 sobre a HMG-CoA redutase talvez não sejam suficientes para promover alterações significativas quando empregados de forma isolada, porém no tratamento combinado talvez esses efeitos possam ser somados e aliados à inibição do efeito hipercolesterolêmico dos AGPI n-3 discutido anteriormente.

No presente trabalho, a suplementação com 2,3 g/dia de AGPI n-3, aliada ao uso de estatinas, demonstrou ser uma dosagem suficiente para promover uma melhora significativa no perfil lipoprotéico dessa população, porém, promoveu aumento do estresse oxidativo, uma vez que os AGPI n-3 são mais susceptíveis a oxidação. O aumento da atividade da SOD indica uma resposta do organismo à maior formação do ânion superóxido. Porém, o aumento na concentração plasmática de MDA sugere que essa adaptação não teria sido suficiente para reverter o estresse oxidativo, principalmente em função da redução da expressão da catalase.

As enzimas antioxidantes SOD, catalase e GPx atuam de forma coordenada contra as espécies reativas de oxigênio. A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que é altamente reativo, em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie bem menos reativa que é então

inativada pela ação da catalase e da GPx (MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; CASTRO, 1999). No presente trabalho, observou-se aumento na atividade da SOD e redução na expressão da catalase com a suplementação de AGPI n-3. Assim, o aumento na formação de H_2O_2 resultante da dismutação do $O_2^{\bullet-}$ não foi contido, justificando o aumento na concentração de MDA (Figura 25).

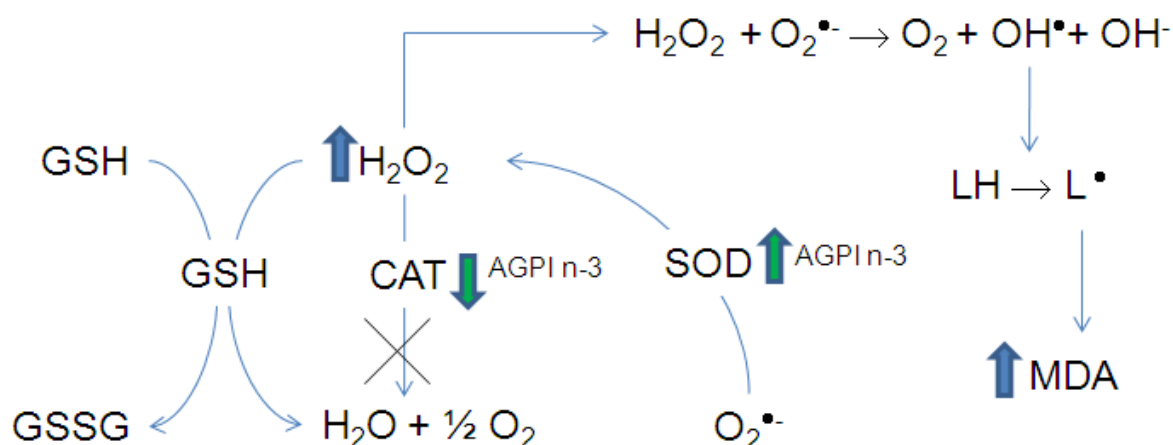


Figura 25 Efeito da suplementação com AGPI n-3 sobre o estresse oxidativo

Grundt e col. (2003), observaram aumento na concentração de MDA após 1 ano de suplementação com 3,5 g/dia de EPA e DHA em indivíduos que haviam sofrido infarto do miocárdio. Também foi observado aumento no grupo suplementado com óleo de milho, de 1,92 para 3,35 $\mu\text{mol/L}$, porém esse aumento foi mais pronunciado no grupo suplementado com óleo de peixe (de 1,95 para 3,63 $\mu\text{mol/L}$). Nesse mesmo trabalho, foi realizada análise de subgrupos comparando-se as concentrações de MDA dos indivíduos que estavam em tratamento à base de estatinas com aqueles que não utilizavam esse medicamento. Não foram encontradas diferenças significativas, sugerindo que as estatinas não teriam efeito sobre o estresse oxidativo quando o MDA é utilizado como biomarcador (GRUNDT et al., 2003). Os resultados obtidos no presente trabalho concordam com aqueles reportados por Grundt e col. (2003), uma vez que não foi observada diferença significativa nas concentrações de MDA entre os grupos com e sem uso de estatina (Figura 24).

Entretanto, a análise apresentada na Figura 20 demonstra a ação antioxidante das estatinas sobre o aumento da expressão da SOD. Porém, como

não foi verificado aumento na atividade dessa enzima, sugere-se que uma provável ausência de co-fatores ou que outros mecanismos fisiológicos tenham anulado esse efeito pleiotrópico.

Nordoy e col. (1998) não observaram aumento na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) nem de peróxidos lipídicos no plasma após suplementação com 4 g/dia de óleo de peixe e 16 mg/dia de vitamina E em indivíduos sob tratamento estável com simvastatina (20 mg/dia). Porém, o grupo que recebeu óleo de peixe apresentou menor concentração plasmática de α -tocoferol quando comparado ao grupo que recebeu óleo de milho, indicando que o α -tocoferol possa ter sido consumido na contenção do estresse oxidativo (NØRDOY et al., 1998). Nossos resultados não concordam com aqueles observados por Nordoy e col., uma vez que não foi observada nenhuma alteração nas concentrações de α , δ e γ -tocoferol no plasma das voluntárias analisadas neste estudo.

Os resultados observados no presente trabalho indicam que a suplementação com AGPI n-3 parece ter influenciado principalmente o sistema antioxidante enzimático, uma vez que não foram observadas alterações nos antioxidantes plasmáticos avaliados.

Ressalta-se que enquanto a suplementação com AGPI n-3 apresentou um caráter agudo, a ingestão de estatinas pode ser caracterizada como crônica. Dessa forma, 6 semanas pode não ter sido um período suficiente para a adequação dos mecanismos adaptativos celulares, ou que tais mecanismos não seriam suficientes nesse nível de suplementação.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, o presente trabalho permite concluir que a suplementação de AGPI n-3 na dosagem de 2,3 g/dia foi efetiva na redução das concentrações séricas de LDL e TG apenas na presença de estatinas. Por outro lado, essa suplementação parece induzir um aumento do estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento da concentração plasmática de MDA em consequência da redução da expressão de catalase.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das conclusões deste trabalho, acredita-se que os mecanismos pelos quais a suplementação com AGPI n-3 influenciam no estresse oxidativo devem ser melhor investigados, observando-se também seus efeitos na resposta imunológica e na função endotelial, para que o uso desses ácidos graxos possa ser recomendado de forma segura.

Uma vez que as defesas antioxidantes plasmáticas parecem não sofrer influência da suplementação e não foram eficientes na inibição da formação de produtos secundários da oxidação de ácidos graxos, acredita-se que a suplementação com antioxidantes não seja a melhor forma de evitar os efeitos deletérios dos AGPI n-3. Para a realização de intervenções antioxidantes efetivas, ainda precisa-se de avanços nos conhecimentos da fisiologia dos processos redox, considerando a compartimentalização da formação de espécies reativas, a regulação de enzimas fontes de espécies reativas e do sistema antioxidante enzimático, bem como as vias envolvidas nas cascatas de sinalização. Assim será possível planejar estratégias moleculares destinadas a modificar a sinalização celular e o controle redox, inclusive no campo da nutrigenômica.

9. REFERENCIAS

ADZIC, M.; NICIFOROVIC, A.; VUCIC, V.; NESKOVIC-KONSTANTINOVIC, Z.; SPASIC, S.D.; JONES, D.R.; RADOJCIC, M.B.; SPASIC, M.B. Systemic NF- κ B activation in blood cells of breast cancer patients. **Redox Report**, v.11, n.1, p.39-44, 2006.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121–126, 1984.
AOCS, 1998. Fatty acid composition by GLC. Official method Ce 1b-89. In: **Official methods and recommended practices of American Oil Chemists' Society**. 5th ed. Champaign, IL.

AOCS, 1998. Preparation of methyl esters of fatty acids. Official method Ce 2-66. In: **Official methods and recommended practices of American Oil Chemists' Society**. 5th ed. Champaign, IL.

BALK, E.M.; LICHTENSTEIN, A.H.; CHUNGA, M.; KUPELNICK, B.; CHEWA, P.; LAUA, J. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: A systematic review. **Atherosclerosis**, v.189, p.19–30, 2006.

BANG H.O.; DYERBERG, J. Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic west coast Eskimos. **Acta Medica Scandinavica**, v.192, p.85-94, 1972

BANG, H.O.; DYERBERG, J.; HJOORNE, N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. **Acta Medica Scandinavica**, v.200, p.69-73, 1976

BENATTI, P.; PELUSO, G.; NICOLAI, R.; CALVANI, M. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 281-302, 2004.

CAMPO, V.L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v.30, p.425-430, 2007.

CANGEMI, R.; LOFFREDO, L.; CARNEVALE, R.; PIGNATELLI, P.; VIOLI, F. Statins enhance circulating vitamin E. **International Journal of Cardiology**, v.123, p.172-174, 2007.

CASTRO, I.A.; BARROSO, L.P.; SINNECKER, P. Functional foods for coronary heart disease risk reduction: a meta-analysis using a multivariate approach. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.82, p.32-40, 2005.

CHAN, D.C.; WATTS, G.F.; MORI, T.A.; BARRETT, P.H.; BEILIN, L.J.; REDGRAVE, T.G. Factorial study of the effects of atorvastatin and fish oil on dyslipidaemia in visceral obesity. **European Journal of Clinical Investigation**, v.32, p.429–436, 2002.

CHENG, G., WU, H., HUANG, Y. Simultaneous determination of malondialdehyde and ofloxacin in plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography/fluorescence detection system. **Analytica Chimica Acta**, v.616, p.230–234, 2008.

CHOY, P.C.; SIOW, Y.L.; MYMIN, D.; O, K. Lipids and atherosclerosis. **Biochemistry and Cell Biology**, v.82, p.212-224, 2004.

CHRCZANOWICZ, J.; GAWRON, A.; ZWOLINSKA, A.; DE GRAFT-JOHNSON, J.; KRAJEWSKI, W.; KROL, M.; MARKOWSKI, J.; KOSTKA, T.; NOWAK, D. Simple method for determining human serum 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity - possible application in clinical studies on dietary antioxidants **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.46, n.3, p.342-349, 2008.

CONTACOS, C.; BARTER, P.J.; SULLIVAN, D.R. Effect of pravastatin and omega-3 fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in patients with combined hyperlipidemia. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v.13, p.1755–1762, 1993.

DAS, U.N. Essential fatty acids as possible mediators of the actions of statins. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.65, n.1, p.37-40, 2001.

DAS, U.N. Estrogen, statins, and polyunsaturated fatty acids: similarities in their actions and benefits – is there a common link? **Nutrition**, v.18, n.2, p.178-188, 2002.

DAVIDSON, M. H. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. **American Journal of Cardiology**, v. 98, n. 4A, p. 27i-33i, 2006.

DAVIDSON, M.H.; STEIN, E.A.; BAYS, H.E.; MAKI, K.C.; DOYLE, R.T.; SHALWITZ, R.A.; BALLANTYNE, C.M.; GINSBERG, H.N. for the COMBination of prescription Omega-3 with Simvastatin (COMBOS) Investigators. Efficacy and tolerability of adding prescription omega-3 fatty acids 4 g/d to simvastatin 40 mg/d in hypertriglyceridemic patients: an 8-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Clinical Therapeutics**, v.29, n.7, p.1354-1367, 2007.

DE ZWART, L.L. ; MEERMAN, J.H. ; CAMMANDEUR, J.N. ; VERMEULEN, N.P. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free radicals in biology and medicine**, v.26, p.202-226, 1999.

DECKER, E.A.; ALAMED, J.; CASTRO, I.A. Interaction between polar components and the degree of unsaturation of fatty acids on the oxidative stability of emulsions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. Doi:10.1007/s11746-010-1556-3.

DURRINGTON, P.N.; BHATNAGAR, D.; MACKNESS, M.I.; MORGAN, J.; JULIER, K.; KHAN, M.A.; FRANCE, M. An omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate administered for one year decreased triglycerides in simvastatin treated patients with coronary heart disease and persisting hypertriglyceridaemia. **Heart**, v.85, p.544 – 548, 2001.

ESLICK, G. D.; HOWE, P. R.; SMITH, C.; PRIEST, R.; BENSOUSSAN, A. Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cardiology**, v. 136, n. 1, p. 4-16, 2009.

FEDAČKO, J.; PELLA, D.; MECHÍROVÁ, V.; HORVATH, P.; RYBÁR, R.; VARJASSYOVÁ, P.; VARGOVÁ, V. n-3 PUFAs – From dietary supplements to medicines. **Pathophysiology**, v.14, p. 127-132, 2007.

FERNANDEZ, M.L.; WEST, K.L. Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. **The Journal of Nutrition**, v.135, p.2075-2078, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Omega-3 Fatty Acids & Coronary Heart Disease. Docket No. 2003Q-0401, 2004. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/qhc-sum.html#omega3>. Acesso em: 16 fev. 2009.

FÖRSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. 6 2008

FRANKEL, E.N. **Lipid oxidation**. 2.ed. Bridgewater: Oily Press, 2005. p.391-405. (Oily Press lipid library, v.18).

FRENOUX, J.M.; PROST, E.D.; BELLEVILLE, J.L.; PROST, J.L. A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutrition**, v.131, p.39-45, 2001.

FRIEDWALD, W.T.; LEVY, R.; FREDRICKSON, D.S. Estimations of serum low density lipoprotein cholesterol without use of preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p.499-502, 1972.

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.

GRUNDT, H.; NILSEN, D. W.; MANSOOR, M. A.; NORDOY, A. Increased lipid peroxidation during long-term intervention with high doses of n-3 fatty acids (PUFAs) following an acute myocardial infarction. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 793-800, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Clarendon Press; Oxford: Oxford University Press, 1999. p.617-638. (Oxford Science Publications).

HANWELL, H. E. C.; KAY, C. D.; LAMPE, J. W.; HOLUB, B. J.; DUNCAN, A. M. Acute Fish Oil and Soy Isoflavone Supplementation Increase Postprandial Serum (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids and Isoflavones but Do Not Affect Triacylglycerols or Biomarkers of Oxidative Stress in Overweight and Obese Hypertriglyceridemic Men. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 6, p. 1128-1134, 2009.

HARLOW, M.B.; LANE, D. In: **Antibody**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1988. 726 p.

HARRIS, W. S.; MILLER, M.; TIGHE, A. P.; DAVIDSON, M. H.; SCHAEFER, E. J. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. **Atherosclerosis**, v. 197, n. 1, p. 12-24, 2008.

HARRIS, W.S. Fish oil supplementation: evidence for health benefits. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.71, n.3, p.208-210, 212, 215-218, 2004.

HE, K. Fish, long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and prevention of cardiovascular disease--eat fish or take fish oil supplement? **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 52, n. 2, p. 95-114, 2009.

HERBERT, J.R.; EBBELING, C.B.; OCKENE, I.S.; MA, Y.; RIDER, L.; MERRIM, P.A.; OCKENE, J.K.; SAPERIA, G.M. A dietitian-delivered group nutrition program leads to reductions in dietary fat, serum cholesterol, and body weight: the worcester area trial for counseling in hyperlipidemia (WATCH). **Journal of the American Dietetic Association**, v.99, n.5, p.544-552, 1999.

HIGDON, J.V.; DU, S.H.; LEE, Y.S.; WU, T.; WANDER, R.C. Supplementation of postmenopausal women with fish oil does not increase overall oxidation of LDL ex

vivo compared to dietary oils rich in oleate and linoleate. **Journal of Lipid Research**, v.42, n.3, p.407-418, 2001.

HONG, H.; XU, Z.M.; PANG, B.S.; CUI, L.; WEI, Y.; GUO, W.J.; MAO, Y.L.; YANG, X.C. Effects of simvastatin combined with omega-3 fatty acids on high sensitive C-reactive protein, lipidemia, and fibrinolysis in patients with mixed dyslipidemia. **Chinese Medical Sciences Journal**, v.19, p.145–149, 2004.

HOUSTON, M.C.; FAZIO, S.; CHILTON, F.H.; WISE, D.E.; JONES, K.B.; BARRINGER, T.A.; BRAMLET, D.A. Nonpharmacologic Treatment of Dyslipidemia. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v.52, p.61–94, 2009.

HSU, H.C.; LEE, Y.T.; CHEN, M.F. Effects of fish oil and vitamin E on the antioxidant defense system in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v.66, p.99-108, 2001.

HUDERT, C.A.; WEYLANDT, K.H.; LU, Y.; WANG, J.; HONG, S.; DIGNASS, A.; SERHAN, N.; KANG, J.X. Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.103, n30, p.11276-1181, 2006.

JONES, D.P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.8, n.9/10, p.1865-1879, 2006.

KABE, Y.; ANDO, K.; HIRAO, S.; YOSHIDA, M.; HANDA, H. Redox regulation of NF- κ B activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. **Antioxidants & Redox signaling**, v.7, p.395-403, 2005.

KINLAY, S. Potential vascular benefits of statins. **The American journal of medicine**, v. 118 Suppl 12A, p. 62-7, 2005.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HARRIS, S.W.; APPEL, J.L. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new recommendations from the American Heart Association. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.23, p.151-152, 2003.

KROMANN, N.; GREEN, A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. **Acta Medica Scandinavica**, v.208, p.401-406, 1980

KY, B.; BURKE, A.; TSIMIKAS, S.; WOLFE, M. L.; TADESSE, M. G.; SZAPARY, P. O.; WITZTUM, J. L.; FITZGERALD, G. A.; RADER, D. J. The influence of pravastatin and atorvastatin on markers of oxidative stress in hypercholesterolemic humans. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 17, p. 1653-62, 2008.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAURINDO, F.R.M. Desequilíbrio redox, resposta vascular à lesão e aterosclerose. In: LUZ, P.L.; LAURINDO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. Endotélio & doenças cardiovasculares. São Paulo: Atheneu, 2005. Cap 9, p.115-132.

LAVIE, C. J.; MILANI, R. V.; MEHRA, M. R.; VENTURA, H. O. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 7, p. 585-94, 2009.

LAWS, P. E.; SPARK, J. I.; COWLED, P. A.; FITRIDGE, R. A. The role of statins in vascular disease. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 27, n. 1, p. 6-16, 2004.

LEIGH-FIRBANK, E.C.; MINIHANE, A.M.; LEAKE, D.S.; WRIGHT, J.W.; MURPHY, M.C.; GRIFFIN, B.A.; WILLIAMS, C.M. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oils: differential associations with lipid responses. **British Journal of Nutrition**, v.87, p.435-445, 2002.

MAKI, K. C.; LUBIN, B. C.; REEVES, M. S.; DICKLIN, M. R.; HARRIS, W. S. Prescription omega-3 acid ethyl esters plus simvastatin 20 and 80 mg: effects in mixed dyslipidemia. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 3, n. 1, p. 33-38, 2009.

MARTIN, G.; DUEZ, H.; BLANQUART, C.; BEREZOWSKI, V.; POULAIN, P.; FRUCHART, J.; NAJIB-FRUCHART, J.; GLINEUR, C.; STAELS, B. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPAR α and induces HDL apoA-I. **Journal of Clinical Investigation**, v.107, p.1423-1432, 2001.

MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I.N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. **Clinical Biochemistry**, v.32, n.8, p.595-603, 1999.

MATSUURA, E.; KOBAYASHI, K.; TABUCHI, M.; LOPEZ, L. R. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 6, p. 466-86, 2006.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. Enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.6049-6055, 1969.

MCCRINDLE, B.W. Drug therapy of hyperlipidemia. **Progress in Pediatric Cardiology**, v.17, p. 141–150, 2003.

MEYER, B.J.; HAMMERVOLD, T.; RUSTAN, A.C.; HOWE, P.R.C. Dose-dependent effects of docosahexaenoic acid supplementation on blood lipids in statin-treated hyperlipidaemic subjects. **Lipids**, v.42, p.109–115, 2007.

MICALLEF, M. A.; GARG, M. L. Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals. **Atherosclerosis**, v. 204, n. 2, p. 476-82, 2009.

NAMBI, V.; BALLANTYNE, C.M. Combination Therapy with Statins and Omega-3 Fatty Acids **American Journal of Cardiology**, v.98[suppl]:34i–38i, 2006.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program. Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA**, v.285, p.2486-2497, 2001.

NATIONAL COLESTEROL EDUCATION PROGRAM. Implications of Recent Clinical Trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. **Circulation**. v.110, p.227-239, 2004.

NEWMAN, W.P.; MIDDAUGH, J.P.; PROPST, M.T.; ROGERS, D.R. Atherosclerosis in Alaska Natives and non-natives. **Lancet**, v.341, p.1056-1057, 1993.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology & Medicine**, v.47, p.469-484, 2009.

NIROGI, R.; MUDIGONDA, K.; KANDIKERE, V. Chromatography-mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, p.379-387, 2007.

NORDOY, A.; BONAA, K. H.; NILSEN, H.; BERGE, R. K.; HANSEN, J. B.; INGEBRETSEN, O. C. Effects of Simvastatin and omega-3 fatty acids on plasma

lipoproteins and lipid peroxidation in patients with combined hyperlipidaemia. **Journal of Internal Medicine**, v. 243, n. 2, p. 163-170, 1998.

NORDØY, A. ; SVENSSON, B. ; HANSEN, J.B. Atorvastatin and omega-3 fatty acids protect against activation of the coagulation system in patients with combined hyperlipemia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.1, p.690–697, 2003.

PACKARD R.R.S.; LIBBY, P. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. **Clinical Chemistry**, v.54, p.24–38, 2008.

PANADERO, M.I.; GONZÁLEZ, M.C.; HERRERA, E.; BOCOS, C. Modulación del PPAR α por agentes farmacológicos y naturales y sus implicaciones metabólicas. **Clínica e investigación en Arteriosclerosis**, v.20, p.259-289, 2008.

PEARSON, T. A.; MENSAH, G. A.; ALEXANDER, R. W.; ANDERSON, J. L.; CANNON, R. O., 3RD; CRIQUI, M.; FADL, Y. Y.; FORTMANN, S. P.; HONG, Y.; MYERS, G. L.; RIFAI, N.; SMITH, S. C., JR.; TAUBERT, K.; TRACY, R. P.; VINICOR, F. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. **Circulation**, v. 107, n. 3, p. 499-511, 2003.

PENUMATHSA, S.V.; THIRUNAVUKKARASU, M.; KONERU, S.; JUHASZ, B.; ZHAN, L.; PANT, R.; MENON, V.P.; OTANI, H.; MAULIK, N. Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** , v.42, p.508–516, 2007.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., v.51, n. 11, p.3273–3279, 2003.

RADER, D. J.; DAUGHERTY, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 904-913, 2008.

RODRÍGUEZ-YÁÑEZ, M.; AGULLA, J.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, R.; SOBRINO, T.; CASTILLO, J. Statins and stroke. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, v.2, p.157-166, 2008.

ROSENSON, R.S. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. **Atherosclerosis**, v.173, p.1-12, 2004.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. In: **Molecular cloning**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. p. 174-184.

SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 47, n. 2, p. 147-55, 2008.

SHIRAI, N.; SUZUKI, H.; WADA, S. Direct methylation from mouse plasma and from liver and brain homogenates. **Analytical Biochemistry**, v.343, p.48-53, 2005.

SIES H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. In: Oxidative Stress, edited by Sies H. London, Academic Press: London. 1985, pp. 1–8.

SILUK, D.; OLIVEIRA, R.V.; ROSAS, M.E.R.; LING, S.; BOS A.; FERRUCCI, L.; WAINER, I.W. A validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, p.1001–100, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose - Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** – v. 88, Suplemento I, 2007.

SONG, J.H.; FUJIMOTO, K.; MIYAZAWA, T. Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils. **Journal of Nutrition**, v.130, n.12, p.3028-3033, 2000.

SPRECHER, H.; CHEN, Q. Polyunsaturated fatty acid biosynthesis: a microsomal-peroxisomal process. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 60, n. 5-6, p. 317-21, 1999.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F.. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. **Physiological Reviews**, n.84, p. 1381-1478, 2004

THOLSTRUP T, HELLGREN LI, PETERSEN M, BASU S, STRAARUP EM, SCHNOHR P, SANDSTROM B. A solid dietary fat containing fish oil redistributes lipoprotein subclasses without increasing oxidative stress in men. **Journal of Nutrition**, v.134, n.5, p.1051-1057, 2004.

TINKER, L.F.; PARKS, E.J.; BEHR, S.R.; SCHNEEMAN, B.O.; DAVIS, P.A. (n-3) fatty acid supplementation in moderately hypertriglyceridemic adults changes postprandial lipid and apolipoprotein B responses to a standardized test meal. **Journal of Nutrition**, v.129, n.6, p.1126-1134, 1999.

TOUSOLIS, D.; CHARAKIDA, M.; STEFANADI, E.; SIASOS, G.; LATSIOS, G.; STEFANADIS, C. Statins in heart failure. Beyond the lipid lowering effect. **International Journal of Cardiology**, v.115, p.144-150, 2007.

WENDEL, A. Glutathione Peroxidase. **Methods in Enzimology**, New York, v.77, p.325-333, 1981.

WIJENDRAN, V; HAYES, K.C. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. **Annual Review of Nutrition**, v. 24, p. 597-615, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO Consultation**. Geneva: World Health Organization, 2000. 256p. (WHO Technical Report Series, 894).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2004- changing history**. Geneva: World Health Organization, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The global burden of disease: 2004 update**. Geneva: World Health Organization, 2008. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2008/np11/en/index.html>. Acesso em: 03 maio 2010.

YAMORI Y.; NARA, Y.; IRITANI, N., WORKMAN, R.J., INAGAMI, T. Comparison of serum phospholipid fatty acids among fishing and farming Japanese populations and American inlanders. **Journal of nutritional science and vitaminology (Tokyo)**, v.31, p.417-422, 1985

YOKOYAMA, M.; ORIGASA, H. for the JELIS Investigators. Effects of eicosapentaenoic acid on cardiovascular events in Japanese patients with hypercholesterolemia: rationale, design, and baseline characteristics of the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). **American Heart Journal**, v. 146, p. 613– 620, 2003.

YUAN, Y.V.; KITTS, D.D. Dietary (n-3) Fat and Cholesterol Alter Tissue Antioxidant Enzymes and Susceptibility to Oxidation in SHR and WKY Rats¹. **Journal of Nutrition**, v.133, p.679–688, 2003.

Anexo 1: **Certificado de análise das cápsulas de óleo de peixe.**



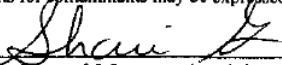
**Bulk Capsules
Certificate of Analysis***

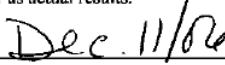
Product Name: 40/20 EE 1000mg Capsules	O.N.C. Lot #: 13641
Product Code #: 4020PB1000CT	Date: Sept. 13/2006
Manufacture Date: Aug. 15/2006	Expiry Date: Aug./2009
QC Lot #: QC63175	Specification #: 4020EEPB1000CT.01

ANALYSIS	SPECIFICATIONS	RESULTS
Free Fatty Acid (as % Oleic)	Max. 1.5%	0.5
Acid Value	Max. 3.0 mg of KOH/g	0.9
p-Anisidine Value	Max. 20	6
Peroxide Value	Max. 5 meq/Kg	2
Appearance	Clear yellow oil, characteristic of fish oil	Pass
Moisture	Max. 0.1%	0.0
Totox Number	Max. 26	10
Disintegration	Max. 30 minutes	8
<u>Fatty Acid Profile</u>		
EPA	Min. 40%	41
DHA	Min. 20%	22
EPA mg/g (expressed as EE)	Min. 350 mg/capsule	380
DHA mg/g (expressed as EE)	Min. 170 mg/capsule	200
EPA mg/g (expressed as FFA)	Min. 320 mg/capsule	350
DPA mg/g (expressed as FFA)	Min. 160 mg/capsule	190
<u>Tocopherols</u>		
Mixed Natural Tocopherols	Minimum 2 mg/g	Pass
<u>Fill Weight</u>		
Average fill weight	900-1100 mg/capsule	988 mg/capsule
<u>Microbiological Tests (as per Encapsulator)</u>		
Total Count	Maximum 3000CFU/g	<10/g
Yeast/Mold	Maximum 300CFU/g	<10/g
Pseudomonas	Negative	Negative
Salmonella	Negative	Negative
S. aureus	Negative	Negative
E.coli	Negative	Negative
Coliforms	Maximum 10 CFU/g	<3/g
<u>PCB & Heavy Metals (based on input oil)**</u>		
PCB (IUPAC no. 28,52,101,118,138,153,180 Total)	Max. 0.09ppm	Compliant
Total PCBs (Canada Only)	Max. 0.1ppm	Compliant
Dioxins (PCDDs and PCDFs)	Max. 2 pg WHO-PCDD/FTEQ/g	Compliant
Arsenic	<0.1 ppm	Compliant
Cadmium	<0.1 ppm	Compliant
Lead	<0.1 ppm	Compliant
Mercury	Max. 0.01 ppm	Compliant
Strontium (Canada Only)	Max. 0.5ppm	Compliant

*The company presenting this CoFA has agreed to comply with the standards and methods outlined in the CRN Voluntary Monograph. A copy of the CRN Voluntary Monograph including analytical methods, a list of companies agreeing to comply with the monograph, and a list of third party testing labs can be found at www.crnusa.org/.

**Results for contaminants may be expressed as either compliant/non compliant (based on Master Batch Testing) or as actual results.


Quality Control Manager (or delegate)


Date

Anexo 2: Certificado de análise das cápsulas de óleo de soja/milho.



Bulk Capsules
Certificate of Analysis*

Product Name: Corn/Soybean Placebo 1000 mg Capsules	O.N.C. Lot #: 13644
Product Code #: PLACEBO1000	Manufacture Date: Aug. 18/06
Expiry Date: Aug./2009	Specification #: PLACEBO1000.01

ANALYSIS	SPECIFICATIONS	RESULTS
Free Fatty Acid (as % Oleic)	Max. 1.5%	0.1
Acid Value	Max. 3.0 mg of KOH/g	0.2
p-Anisidine Value	Max. 30	2
Peroxide Value	Max. 10 meq/Kg	1
Appearance	Clear yellow oil, characteristic of fish oil	Pass
Moisture	Max. 0.1%	0.0
Disintegration	Max. 30 minutes	8
<u>Fatty Acid Profile</u>		
% EPA	Not Present	Not Present
% DHA	Not Present	Not Present
Identification	Pass / Fail	Pass
<u>Tocopherols</u>		
Mixed Natural Tocopherols	Min. 2 mg/g	Pass
<u>Fill Weight</u>		
Average fill weight	900-1100 mg/capsule	992
<u>Microbiological Tests (as per Encapsulator)</u>		
Total Count	Max. 3000/g	<10/g
Yeast/Mold	Max. 300/g	<10/g
Pseudomonas	Negative/ 10g	Negative
Salmonella	Negative/10 g	Negative
S. aureus	Negative/10 g	Negative
E.coli	Negative/10 g	Negative
Coliforms	Max. 10 mpn/g	<3mpn/g
<u>Heavy Metals (based on input oil)**</u>		
Arsenic	<0.1 ppm	Compliant
Cadmium	<0.1 ppm	Compliant
Lead	<0.1 ppm	Compliant
Mercury	Max. 0.01 ppm	Compliant
Strontium (Canada Only)	Max. 0.5ppm	Compliant

*The company presenting this CofA has agreed to comply with the standards and methods outlined in the CRN Voluntary Monograph. A copy of the CRN Voluntary Monograph including analytical methods, a list of companies agreeing to comply with the monograph, and a list of third party testing labs can be found at www.crnusa.org/.

**Results for contaminants may be expressed as either compliant/non compliant (based on Master Batch Testing) or as actual results.

Quality Control Manager (or delegate)

Date

Anexo 3: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa FCF/USP.**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPOfício CEP nº 16/2008

São Paulo, 26 de fevereiro de 2008.

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Inar Alves de Castro
FBA

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 25 de fevereiro de 2008, **APROVOU** o projeto "Efeito do uso combinado de ácidos graxos polinsaturados omega 3 e estatinas nos biomarcadores do stress oxidativo em indivíduos com dislipidemia" (Protocolo CEP nº 464) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

n.º:

Questionário: Clínico e Dados Pessoais

Nome: _____

Escolaridade:

- Até 1º grau completo Superior completo
 Até 2º grau completo Pós-graduação

Etnia: caucasiano afrodescendente indígena asiático

Peso: _____ kg Altura: _____ m

Circ. Cintura: _____ cm Circ. Quadril: _____ cm

Fumante?

- Não Menos de ½ maço de cigarro/dia
 Sim De ½ a 2 maços de cigarro/dia
 Mais de 2 maços de cigarro/dia

Prática exercícios físicos?

- Não Suave, de 1 a 2 vezes/semana
 Sim Moderado, de 3 a 5 vezes/semana
 Intenso, acima de 5 vezes/semana

Qual? _____

Faz uso de estatina?

- Não Qual? _____
 Sim Dosagem: _____

Faz uso de suplementar alimentar?

- Sim
 Não

Apresenta no momento, ou já sofreu algum desses problemas?

- doença do coração
 cirurgia do coração
 insuficiência renal
 Outro. Especifique: _____
 Nenhum

Ingerir bebida alcoólica?

- Nunca Eventualmente
 Sim Diariamente

Tem hipertensão arterial (acima de 140/90 mmHg)?

- Não Estou em tratamento
 Sim Não estou em tratamento

Tem diabetes (Glicemia de jejum acima de 126 mg/dl)?

- Sim
 Não
 Não sei

Já alcançou a menopausa?

- Não Faço reposição hormonal
 Sim Não faço reposição hormonal

Tem algum outro distúrbio da saúde?

- Sim. Qual? _____
 Não

Muito obrigada pela colaboração!

Anexo 5: Registro alimentar elaborado segundo Herbert et al., 1999.

Registro Alimentar

Nome: _____ Data: ___ / ___ / ___

Refeição	Alimento	Quantidade
Café da Manhã Horário:		
Lanche da manhã Horário:		
Almoço Horário:		
Lanche Horário:		
Jantar Horário:		
Ceia Horário:		

() Dia Típico

() Dia Atípico

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)