



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIELLE VENTURINI

**PERFIL METABÓLICO, INFLAMATÓRIO, OXIDATIVO E O
EFEITO DA INGESTÃO DE ÓLEO DE PEIXE E ÓLEO DE
OLIVA EM PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA**

Londrina
2013

DANIELLE VENTURINI

**PERFIL METABÓLICO, INFLAMATÓRIO, OXIDATIVO E O
EFEITO DA INGESTÃO DE ÓLEO DE PEIXE E ÓLEO DE
OLIVA EM PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Isaías Dichi.

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andrea Name Colado
Simão

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

V469p V enturini, Danielle.

Perfil metabólico, inflamatório, oxidativo e o efeito da ingestão de óleo de peixe e óleo de oliva em pacientes com síndrome metabólica / Danielle Venturini.

– Londrina, 2013.

99. f. : il.

Orientador: Isaías Dichi.

Co-orientador: Andrea Name Colado Simão.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Síndrome metabólica – Teses. 2. Lipídios – Metabolismo – Teses. 3. Óleo de peixe – Uso terapêutico – Teses. 4. Azeite – Uso terapêutico – Teses. 5. Estresse oxidativo – Teses. I. Dichi, Isaías. II. Simão, Andrea Name Colado. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 616.43-008

DANIELLE VENTURINI

**PERFIL METABÓLICO, INFLAMATÓRIO, OXIDATIVO E O EFEITO
DA INGESTÃO DE ÓLEO DE PEIXE E ÓLEO DE OLIVA EM
PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Isaías Dichi
UEL – Londrina – PR

Profª. Drª. Flávia Alessandra Guarnier
UEL – Londrina – PR

Profª. Drª. Tânia Longo Mazzuco
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino
UEL – Londrina – PR

Profª. Drª. Alessandra Lourenço Cecchini Armani
UEL – Londrina – PR

Londrina, 18 de novembro de 2013.

Dedico esse trabalho aos meus familiares, principalmente minha mãe, meu pai (in memoriam), meu marido, meu irmão, minha cunhada e meus lindos sobrinhos.

Agradecimentos:

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças, coragem e determinação para realizar este trabalho.

Ao meu marido Rodrigo Bernardes pelo apoio incondicional e pela paciência nos dias difíceis.

À minha mãe, meu pai, meu irmão, minha cunhada, meus sobrinhos e meus sogros, por sempre acreditar em minha capacidade, por entender minhas ausências em determinados momentos e por me apoiarem sempre.

Agradeço ao meu orientador, prof Isaiás Dichi, pelo empenho, pelas valiosas observações e pela contribuição na condução desse trabalho.

À profa Andrea Name Colado Simão, co-orientadora, pelo auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

A todos os docentes do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas da UEL pelo apoio e compreensão, principalmente agradeço aos docentes da disciplina de bioquímica clínica, profs Décio Sabbatini Barbosa, Alessandra M Okino e Jair Aparecido de Oliveira.

A todos os pacientes que gentilmente aceitaram participar desse projeto e que me inspiraram a realizar este trabalho, meu reconhecimento e eterna gratidão pelo mais nobre gesto de ajuda.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão desse trabalho, o meu muito obrigada.

"Os homens me surpreendem... os homens perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem dinheiro para recuperar a saúde; e por pensarem ansiosamente no futuro, esquecem do presente de tal forma que acabam por não viver o presente nem o futuro; e vivem como se nunca fossem morrer e morrem como se nunca tivessem vivido. Então busquemos o equilíbrio, a harmonia!"

Dalai Lama

VENTURINI, D. **Perfil metabólico, inflamatório, oxidativo e o efeito da ingestão de óleo de peixe e óleo de oliva em pacientes com síndrome metabólica.** 2013. 99f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

A síndrome metabólica (SM), assim como a obesidade e o diabetes, é considerada atualmente uma epidemia mundial e pode ser entendida como um conjunto de fatores interligados que aumenta diretamente o risco de doenças cardiovasculares e *diabetes mellitus* tipo 2. Desse modo, as principais alterações observadas nessa síndrome são dislipidemia, hipertensão arterial, resistência à insulina e o obesidade abdominal. Alterações nos estados pró e antiinflamatório e aumento do estresse oxidativo também tem sido implicados na fisiopatologia da SM. Na tentativa de elucidar os principais mecanismos envolvidos, diversos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de se desvendar alvos terapêuticos para o tratamento da SM. Nesse sentido, a pesquisa por alternativas nutricionais que possam contribuir com o tratamento da SM tem sido intensificada. Intervenção nutricional com óleo de peixe e óleo de oliva parece reduzir os riscos cardiovasculares em pacientes com SM. Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), como ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) estão presentes em grandes quantidades no óleo de peixe e estudos têm demonstrado que dietas ricas nestes PUFAs podem trazer efeitos benéficos nos achados clínicos da SM. Por outro lado, o óleo de oliva é rico em ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e compostos antioxidantes, principalmente compostos fenólicos, capazes de reduzir um ou mais fatores de risco CV. Na presente tese de doutorado são apresentados dois artigos científicos cujos objetivos foram: 1º artigo) avaliar os componentes da SM associados aos marcadores de estresse oxidativo; 2º artigo) investigar os efeitos do uso isolado ou concomitante do óleo de oliva e óleo de peixe, nos fatores de risco cardiovascular e estresse oxidativo em pacientes com SM. Concluiu-se nestes artigos que: 1º) hipertriacilglicerolemia, hiperglicemia, resistência à insulina, baixas concentrações séricas de HDL-C, inflamação e hiperuricemia estiveram associados aos marcadores de estresse oxidativo em pacientes com SM; 2º) o uso concomitante de óleo de peixe e óleo de oliva melhorou o perfil lipídico e o estresse oxidativo dos pacientes com SM e esses efeitos foram superiores aos observados com o uso isolado de cada óleo.

Palavras-chave: Síndrome metabólica. Óleo de peixe. Óleo de oliva. Risco cardiovascular. Metabolismo lipídico. Estresse oxidativo.

VENTURINI, D. **Metabolic, inflammatory, oxidative profile and the effect of fish oil and olive oil intake in patients with metabolic syndrome**. 2013. 99p. Thesis (Doctoral degree in Health Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Metabolic syndrome (MetS), as obesity and diabetes, is currently considered a worldwide epidemic and can be understood as a cluster of interconnected factors which directly increase the risk of cardiovascular diseases and type 2 diabetes mellitus. Thereby, the main changes observed in this syndrome are dyslipidemia, hypertension, insulin resistance, abdominal obesity. Pro and antiinflammatory status and oxidative stress imbalance have also been involved. Several studies have been performed to unravel therapeutic targets for MetS in an attempt to elucidate the main physiopathological mechanisms. Thus, the search for nutritional alternatives that may contribute to the treatment of MetS has been intensified. Fish and olive oil nutritional interventions it seems reduce cardiovascular (CV) risk in patients with MetS. Fish oil increases the relative abundance of omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFA) namely eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in the diet and studies have suggested that fish or dietary n-3 PUFA intake may have beneficial effects on the prevalence of MetS and on its individual components. On the other hand, olive oil is rich in monounsaturated fatty acid (MUFA) and antioxidant compounds, mainly phenolic compounds, and is capable to reduce one or more risk factors of MetS. In this thesis we present two papers whose aim were: Article 1) to evaluate which metabolic syndrome components were associated with increased oxidative stress markers; Article 2) to investigate the effects of olive and fish oil, isolated and concomitantly, on CV risks factors and oxidative stress in MetS patients. In conclusion, these studies provides evidence that: 1º) hypertriacylglycerolemia, hyperglycemia and HOMA-IR, low levels of HDL-C, inflammation and high levels of uric acid are closely linked to elevated oxidative stress in MetS patients; 2º) the concomitant use of fish oil n-3 PUFA and olive oil has beneficial effects on lipid metabolism and oxidative stress in MetS patients and these effects were superior to the isolated effect verified with each product.

Keywords: Metabolic syndrome. Fish oil. Olive oil. Cardiovascular risk. Lipid profile. Oxidative stress.

LISTA DE TABELA E FIGURA

Tabela 1 – Definição de SM segundo o Adult Treatment Panel III (ATP III).....	37
Figura 1 – Efeitos cardiometabólicos dos produtos dos adipócitos.....	3:

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AA	ácido araquidônico
AHA	<i>American Heart Association</i>
ALA	ácido α linolênico
ALT	alaninoaminotransferase
AOPP	produtos avançados de oxidação proteica
API-1	<i>activator protein-1</i>
Apo-E	apolipoproteína E
AST	aspartatoaminotransferase
CA	circunferência abdominal
CFs	compostos fenólicos
DCV	doença cardiovascular
DHA	ácido docosahexaenóico
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo-2
DNA	ácido desoxirribonucleico
EGR	<i>early growth response</i>
EPA	ácido eicosapentaenoico
FOX	<i>ferrous oxidation-xylene orange assay</i>
GLUT-4	<i>glucose transporter type 4</i>
GGT	gama glutamiltransferase
HDL-C	lipoproteína de alta densidade
9-HODE	ácido 9-hidroxi octadecadienoico
HOMA-IR	<i>Homeostatic model assessment-Insulin resistance</i>
IAM	infarto agudo do miocárdio
ICAM-1	moléculas de adesão intercelular-1
IDF	International Diabetes Federation
IL-1	interleucina-1
IL1-ra	antagonista do receptor de IL-1
IL-6	interleucina-6
IL-10	interleucina-10
IMC	índice de massa corporal
IRAS	<i>Insulin Resistance Atherosclerosis Study</i>
IRS-1	substrato de receptor de insulina-1

8-iso-PGF2 α	<i>8-iso prostaglandin F2alpha</i>
LA	ácido linoleico
LDL-C	lipoproteína de baixa densidade
LPO	lipoperoxidação
MEIA	enzima imunoensaio em micropartículas
MMP-2	metaloproteinase-2
MMP-9	metaloproteinase-9
MUFAs	ácidos graxos monoinsaturados
NCEP-ATP III	<i>The National Cholesterol Education Program Expert-Panel Adult Treatment III</i>
eNOS	óxido nítrico sintase constitutive
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
NO	óxido nítrico
NADPH oxidase	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NFkB	fator nuclear kB
O ₂ [•]	ânion superóxido
8-oxo-gua	8-oxo-7,8-dihidroguanina
PAI-1	inibidor do ativador do plasminogênio-1
PCR	proteína C reativa
PGI-3	prostaciclina I-3
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinase
PKC	proteína quinase c
PPARs	receptor ativador de proliferação de peroxissomos
PUFAs	ácidos graxos poliinsaturados
QL	quimiluminescência
RNS	espécies reativas de nitrogênio (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	espécies reativas de oxigênio (<i>reactive oxigen species</i>)
SFAS	ácidos graxos saturados (<i>saturated fatty acids</i>)
SM	síndrome metabólica
TAS	estado antioxidante total (<i>total antioxidant status</i>)
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF β	fator de crescimento β
TNF- α	fator de necrose tumoral α
TRAP	capacidade antioxidante total

VCAM-1	molécula de adesão vascular
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	36
1.1	SÍNDROME METABÓLICA	36
1.2	FISIOPATOLOGIA DA SÍNDROME METABÓLICA E O PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO	37
1.3	ÓXIDO NÍTRICO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA SÍNDROME METABÓLICA	3:
1.4	O ESTADO PRÓ-INFLAMATÓRIO NA SÍNDROME METABÓLICA	42
1.5	ÓLEO DE PEIXE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES	44
1.5.1	Efeito dos Marcadores Inflamatórios e de Disfunção Endotelial	49
1.5.2	Óleo de Peixe e Estresse Oxidativo	4:
1.6	ÓLEO DE OLIVA NA REDUÇÃO DE EVENTOS CARDIOVASCULARES	4;
1.6.1	Óleo de Oliva e Estresse Oxidativo	55
2	OBJETIVOS	57
2.1	GERAL	57
2.2	ESPECÍFICOS	57
3	PACIENTES E MÉTODOS	58
3.1	PACIENTES	58
3.2	DETERMINAÇÕES ANTROPOMÉTRICAS E AFERIÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL	58
3.3	ANÁLISES LABORATORIAIS	58
3.3.1	Coleta e Preparo das Amostras	59
3.3.2	Marcadores Inflamatórios e Parâmetros Bioquímicos	59
3.3.3	Determinação Indireta de Óxido Nítrico	59
3.3.4	Avaliação do Estresse Oxidativo	59
3.3.4.1	Capacidade antioxidante total plasmática (TRAP)	59
3.3.4.2	Quimiluminescência induzida por t-Butil Hidroperóxidos	5:
3.3.4.3	Determinação de hidroperóxidos lipídicos	5;
3.3.4.4	Determinação dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP)	5;
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	5;
5	ARTIGOS	63

6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	: 9
7	REFERÊNCIAS	::
8	ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	;;

1. INTRODUÇÃO

1.1. SÍNDROME METABÓLICA

A Síndrome Metabólica (SM) é um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovascular, usualmente relacionados à deposição central de gordura e à resistência à insulina (1). A resistência à insulina pode ser definida como uma resposta insuficiente dos órgãos-alvo, como o fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, à ação da insulina em concentrações fisiológicas, resultando em hiperinsulinemia compensatória (2).

A SM é caracterizada pela dislipidemia com hipertriacilglicerolemia e diminuição dos níveis de HDL, circunferência abdominal aumentada, alterações no metabolismo de glicose e hipertensão arterial. Ela pode ser definida de acordo com uma das três definições, que se baseiam praticamente nos mesmos critérios diagnósticos, propostas pelas seguintes entidades internacionais: *World Health Organization (WHO)*, *The National Cholesterol Education Program Expert Panel Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III)* e a *International Diabetes Federation (IDF)*. Entretanto essas definições diferem entre si por determinarem alguns critérios como sendo essenciais para o diagnóstico. A definição proposta pela WHO determina como requisito obrigatório a presença de alteração no metabolismo de glicose e mais dois outros componentes. Outra diferença é que ela inclui a microalbuminúria no diagnóstico. A definição proposta pela IDF também determina a presença de três componentes, mas tem como fator fundamental a circunferência abdominal (CA). Já a definição do ATP III (Tabela 1) permite a classificação de SM pela presença de três componentes dos cinco propostos, sem exigência de nenhum componente em específico (3). Embora existam várias definições, tem sido difícil estudar a SM devido à ausência de consensos na sua definição e nos pontos de corte dos seus componentes, o que repercute tanto na prática clínica quanto nas políticas de saúde mundial (4). Discute-se, atualmente, a necessidade de se elaborar uma definição que possa ser mais prática e com maior aplicabilidade para as diferentes idades, sexos, raças e etnias, e que possibilite um diagnóstico padronizado e uma vigilância epidemiológica mais eficaz (5).

No Brasil, a NCEP ATP III é a definição recomendada pela I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, tendo-se em vista a simplicidade

e a aplicabilidade dessa definição para a prática clínica, portanto será a diretriz utilizada neste trabalho (6).

Tabela 1: Definição de SM segundo *Adult Treatment Panel III (ATP III)*

Devem estar presentes pelo menos três dos componentes abaixo:

Glicose de jejum ≥ 100 mg/dL

Circunferência abdominal (CA)

Homens ≥ 102 cm

Mulheres ≥ 88 cm

Triacilglicerol ≥ 150 mg/dL

HDL colesterol

Homens < 40 mg/dL

Mulheres < 50 mg/dL

Pressão arterial $\geq 130/85$ mm Hg (ou uso de anti-hipertensivos)

Adaptado de *NCEP ATP III Circulation* 2005;112(17):2735-2752

1.2. FISIOPATOLOGIA DA SÍNDROME METABÓLICA E O PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO

Sabe-se que a mobilização de ácidos graxos livres não-esterificados a partir dos triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo está acelerada em indivíduos resistentes à insulina. Esses ácidos graxos estimulam o aumento da síntese hepática de glicose, de triacilgliceróis, da secreção de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), de apolipoproteína B, de lipoproteína de baixa densidade (LDL), e a diminuição de lipoproteína de alta densidade (HDL) (7). Quanto maior for a quantidade de ácido graxo livre a alcançar os hepatócitos, tanto mais triacilgliceróis serão sintetizados e, liberados na corrente sanguínea, levam à hipertrigliceridemia. O excesso de triacilglicerol será

acoplado no fígado à HDL, resultando em HDL enriquecida com triacilglicerol. Como essa molécula possui alta afinidade pela lipase hepática, a lipoproteína é rapidamente depurada do sistema circulatório, diminuindo a quantidade de HDL que participa do transporte reverso de colesterol, favorecendo a aterogênese e a hipertensão (8). Além disso, os ácidos graxos livres não-esterificados reduzem a sensibilidade muscular à insulina, pela inibição da captação de glicose mediada por insulina, e aumentam a síntese hepática de fibrinogênio e de inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) que estão relacionados a doenças vasculares trombogênicas (5).

Relata-se que o tecido adiposo possui importante papel como secretor de uma variedade de substâncias bioativas correlacionadas à SM. Dentre essas, destacam-se a leptina, a resistina, a visfatina, o fator de necrose tumoral α (TNF α), a interleucina 6 (IL-6) e a angiotensina II, que induzem resistência à insulina (5) (Figura 1). O TNF- α estimula a lipólise, promovendo a liberação de ácidos graxos livres para a circulação. O catabolismo dos ácidos graxos livres pela musculatura esquelética aumenta os níveis intramiocelulares de longas cadeias de acilCoA e diacilglicerol. Essas duas moléculas são potentes ativadores alostéricos da proteína quinase C (PKC), que, por sua vez, promove a fosforilação dos substratos de receptores de insulina 1 (IRS-1) em resíduos de aminoácidos como a treonina e serina, que prejudica a fosforilação funcional em resíduos de tirosina. Essa fosforilação inadequada dos IRS-1 impede a ativação do receptor de insulina, conseqüentemente interrompendo a cascata de sinalização descendente e, por isso, prejudicando a migração e a fusão dos transportadores de glicose (GLUT-4) com a membrana celular. Como resultado, ocorre resistência à insulina e hiperglicemia (8). A leptina é um hormônio secretado pelos adipócitos que promove a redução do consumo calórico e a estimulação da oxidação dos ácidos graxos acumulados em tecidos não adiposos, com a finalidade de minimizar a acumulação ectópica desses ácidos graxos (9) Em indivíduos que possuem acúmulo de gordura visceral, observa-se que há diminuição de adiponectina que possui ação protetora contra o *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2), hipertensão, inflamação e doenças vasculares ateroscleróticas (5).

Em nível de endotélio, a insulina não está relacionada ao recrutamento de transportadores de glicose, mas à ligação com receptores associados à função endotelial que promovem a ativação da via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Essa via é responsável pela fosforilação e ativação da enzima óxido nítrico sintase constitutiva (eNOS), que explica o efeito vasodilatador da insulina. Entretanto, quando a resistência

à insulina ocorre, a via PI3K é afetada resultando em disfunção endotelial, pois há diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e, conseqüentemente, da sua capacidade vasodilatadora (8).

A ação prejudicial de radicais livres, quase sempre representados por espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio, do inglês *reactive oxygen species (ROS)/reactive nitrogen species (RNS)* respectivamente, tem sido implicada na obesidade, hipertensão, disfunção endotelial e na fisiopatologia da SM (10-12). Alguns estudos têm relacionado o estresse oxidativo com a obesidade e com os níveis de glicose e hiperinsulinemia, e tem demonstrado ser o elo para o desenvolvimento da resistência periférica à ação da insulina em pacientes obesos (11,13-15). A obesidade está associada ao aumento do estresse oxidativo e este pode desencadear o desenvolvimento da resistência à insulina (11). Portanto, o estresse oxidativo está associado ao índice de massa corporal (IMC) (10), à relação cintura-quadril e aos níveis de triacilgliceróis (14).

Menon et al. (15) demonstraram que existe uma relação direta entre os níveis séricos de produtos da lipoperoxidação e glicose quando esta se encontra em níveis superiores a 7,0 mmol/L (126,2 mg/dL). Indivíduos adultos com SM apresentam menor concentração plasmática individual de vários antioxidantes e isto parece ser devido à menor ingestão destes compostos na dieta, assim, como também, pelo seu maior consumo devido ao estresse oxidativo (16). Um trabalho realizado com crianças obesas com SM verificou que o estado antioxidante total, do inglês *total antioxidant status (TAS)*, e os níveis plasmáticos de vitamina C e vitamina E foram significativamente inferiores quando comparados àqueles encontrados em crianças obesas sem SM e crianças magras (17). A resistência à insulina avaliada pelo *Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR)*, em pacientes hipercolesterolêmicos, aumenta o estresse oxidativo e influencia negativamente o sistema antioxidante total, do inglês *total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP)* (18).

O estresse oxidativo associado à obesidade ocorre, pois as adipocitocinas liberadas em grande quantidade ativam a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase resultando em aumento da síntese de ROS, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). No endotélio, esse radical reage rapidamente com o NO formando peroxinitrito, uma espécie ainda mais reativa. Assim, a produção de ROS contribui para a disfunção endotelial pela diminuição da biodisponibilidade de NO. Entretanto, o estresse oxidativo não ocorre somente por meio desse mecanismo, já que indivíduos

obesos apresentam um consumo aumentado de oxigênio em resposta ao aumento de carga mecânica e de metabolismo miocárdico. Uma das consequências negativas dessa característica é a produção de ROS derivados da respiração celular e da perda de elétrons ao longo da cadeia respiratória, aumentando a geração de O_2^\bullet (8).

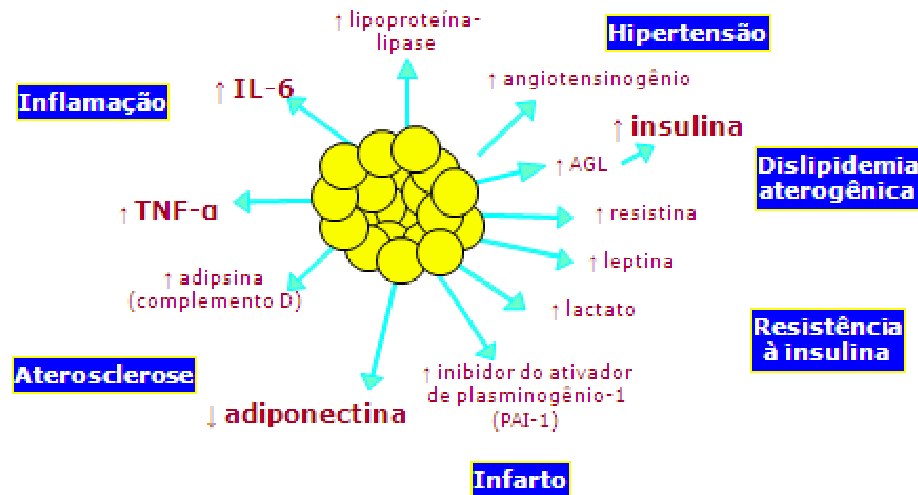


Figura 1: Efeitos cardiometabólicos dos produtos dos adipócitos

1.3. ÓXIDO NÍTRICO (NO) E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA SÍNDROME METABÓLICA

O estresse oxidativo tem sido considerado o mecanismo mais importante na disfunção endotelial da obesidade humana (19, 20). O NO é produzido nas células endoteliais pela expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e é fisiologicamente responsável pela vasodilatação e manutenção da função endotelial. A produção de NO também pode ser estimulada pelo aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Esta enzima quando estimulada, por exemplo, pelo estresse oxidativo ou por citocinas pró-inflamatórias, é capaz de produzir até 1.000 vezes mais NO do que a eNOS (21).

Evidências recentes sugerem que o óxido nítrico também desempenhe um

importante papel na fisiopatologia da hipertensão e do DM2, presentes na SM. Descreve-se que a produção aumentada de ROS em vários tecidos, como o muscular esquelético e o cardiovascular promove a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona que está relacionada à retenção hídrica, à vasoconstrição periférica e ao desenvolvimento de resistência à insulina. Do mesmo modo, a elevação de angiotensina II também pode induzir resistência à insulina por produção de ROS em vários tecidos, como na musculatura esquelética e vascular lisa em pacientes com SM (5).

A ação vascular da insulina é fundamental para a manutenção da homeostase hemodinâmica e metabólica. A insulina estimula a produção vascular de NO e este, por sua vez, aumenta o fluxo sanguíneo para o músculo esquelético favorecendo o consumo de glicose. A insulina é responsável pelo aumento na liberação de NO e da expressão da eNOS. A resistência à insulina está associada à disfunção endotelial devido à diminuição da ação da insulina e é caracterizada por problemas na via de sinalização dependente de PI3K que no endotélio pode causar desequilíbrio entre a produção de NO e secreção de endotelina 1, resultando em diminuição do fluxo sanguíneo (22).

O NO pode participar do estresse oxidativo de várias maneiras: 1) como removedor de radicais livres; 2) como pró-oxidante, reagindo com ROS formando peroxinitrito, um importante oxidante; ou ainda 3) modulando a produção de antioxidantes endógenos na parede vascular. Se o NO agirá como pró ou antioxidante dependerá do equilíbrio entre os níveis de NO e ROS, especialmente do O_2^{\bullet} . A disfunção endotelial pode ocorrer pela redução da biodisponibilidade do óxido nítrico e isto depende principalmente do balanço na produção de óxido nítrico e sua reação com ROS (19). Também tem sido demonstrado *in vitro* e *in vivo*, o aumento sérico de nitrotirosina, um marcador de formação endógena de peroxinitrito, na SM (23,24). Esses dados confirmam o consumo de NO na formação de peroxinitrito em pacientes com SM.

Demonstrou-se em modelo experimental de obesidade, que esta pode levar a superexpressão da iNOS na vasculatura, resultando em aumento na concentração de NO (25). No entanto, o aumento de NO resultante da indução da iNOS pode causar disfunção endotelial (26). Yugar-Toledo et al. (27) evidenciaram que pacientes com diabetes descompensada apresentam reatividade vascular prejudicada na presença de aumento de NO. Possivelmente, o estresse oxidativo levaria a uma diminuição da biodisponibilidade de NO e seria responsável pela resposta anormal do endotélio

mesmo na presença de níveis normais de NO. Esses dados são reforçados pelo trabalho realizado por Lin et al. (28) que demonstraram que pacientes com obesidade grau 3 apresentam níveis de NO comparáveis àqueles encontrados em indivíduos controles não obesos e também aumento do estresse oxidativo. Esses dados sugerem que isso possivelmente ocorra devido a superexpressão da iNOS. Após a cirurgia para redução de peso, os níveis de NO estão paradoxalmente bastante reduzidos e significativamente inferiores ao dos controles. Este fato foi atribuído à inibição da indução da iNOS após a perda de peso.

1.4. O ESTADO PRÓ-INFLAMATÓRIO NA SÍNDROME METABÓLICA

A SM é considerada um estado inflamatório sistêmico de baixo-grau que está relacionado especialmente à obesidade. O estado pró-inflamatório da obesidade e da SM em obesos está principalmente relacionado ao excesso de consumo alimentar, embora outros fatores possam estar implicados. O estresse oxidativo pode induzir o processo inflamatório ativando a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. A resistência à insulina favorece esta situação, uma vez que a insulina, além dos efeitos metabólicos já citados, apresenta importante atividade antiinflamatória e antioxidante. Ela inibe a transcrição de vários fatores pró-inflamatórios como o fator nuclear κ B (NF κ B), suprime as concentrações plasmáticas da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e inibe a geração de ROS. O estado pró-inflamatório induz a resistência à insulina que, por sua vez, promove mais inflamação (29).

O tecido adiposo tem sido considerado um órgão endócrino importante, sendo responsável pela secreção de várias moléculas com atividades pró ou antiinflamatórias. Entre estas moléculas, estão as citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6) e ainda fatores do complemento. A síntese hepática de proteínas de fase aguda como a proteína C reativa (PCR), fator do complemento C3 e C4 estão sob o controle destas citocinas, em especial da IL-6 (30).

Um estudo multicêntrico avaliou a relação de alguns marcadores inflamatórios, como a PCR, o fibrinogênio e a contagem total de leucócitos, com os componentes da síndrome de resistência à insulina em indivíduos não diabéticos, sem doença arterial coronariana, que faziam parte do *Insulin Resistance Atherosclerosis Study* (IRAS). A associação mais forte ocorreu entre a PCR, o IMC e a circunferência abdominal. A PCR

foi independentemente associada à sensibilidade à insulina. Isso poderia ser explicado por três hipóteses: 1) Aumento da secreção de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α , por exemplo, devido à obesidade, levariam ao aumento da produção hepática de PCR (31); 2) O aumento de PCR seria resultante da aterosclerose pré-existente (32); 3) A insulina regula a produção hepática de proteínas de fase aguda, aumenta a produção de albumina e diminui a de fibrinogênio e PCR. Portanto, a resistência à insulina favoreceria a síntese destas proteínas, resultando em um quadro inflamatório (33).

Vários estudos transversais relacionando a PCR e os fatores da SM sugerem que a inflamação está diretamente associada à resistência à insulina, ao IMC, aos níveis de colesterol total, triacilgliceróis, glicose e ácido úrico, e inversamente correlacionado com os níveis de HDL colesterol (34,35). A SM e, especialmente, o conjunto de seus componentes, estão associados com a inflamação sistêmica e podem causar a progressão da aterosclerose (36). Esses estudos corroboram a hipótese de que a inflamação tem importante papel na patogênese do diabetes e aterosclerose como previamente sugerido por Pickup e Crook em 1998 (37). A obesidade central, avaliada pela circunferência abdominal, e a hipertensão arterial são os principais fatores determinantes da inflamação presentes nesta síndrome (37,38). A PCR é mais fortemente relacionada à incidência de diabetes do que a IL-6, isso pode ser devido ao fato da PCR ter um tempo de meia vida significativamente maior que a IL-6, além do fato da IL-6 apresentar variações diurnas em sua liberação (39).

Um estudo prospectivo e metanálise, publicado em 2000, avaliou os níveis séricos de albumina, proteína amilóide A e PCR, e o risco de desenvolver doença coronariana. Concluiu-se que esses marcadores estavam associados com o risco futuro de doença coronariana e que a inflamação era um processo relevante nesta situação (40). A hiperfibrinogenemia também pode ser considerada mais um fator associado a SM e pode estar associado ao aumento da doença cardiovascular nestes pacientes (41). O estudo *Alimentación y Valoración del Estado Nutricional en Adolescentes (AVENA Study)* demonstrou que a concentração de C3 é independentemente associada à obesidade central e que este é um bom marcador para o estudo de doenças relacionadas à obesidade (42).

Embora muitas evidências deixem claro o aumento do processo inflamatório na SM, vários estudos têm demonstrado que nesta situação ocorre também diminuição da proteção à inflamação, representada pela diminuição nos níveis séricos de adiponectina.

1.5. ÓLEO DE PEIXE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES

É notável o crescente interesse da comunidade científica no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos que possam ser empregados no tratamento e na prevenção de doenças cardiovasculares. Observa-se que inúmeros componentes dos alimentos desempenham funções regulatórias relacionadas ao equilíbrio energético do organismo. No entanto, embora tenha se observado que alterações específicas na dieta melhorem diversos componentes da SM, ainda não se estabeleceu o padrão dietético mais eficaz para o tratamento dessa síndrome (7). Portanto, diversos autores têm descrito potenciais alimentos e nutrientes que possam beneficiar isolada ou conjuntamente o tratamento de pacientes diagnosticados com SM.

Os lipídios da dieta são importantes fontes de energia e precursores de numerosos compostos biologicamente ativos. Os humanos podem sintetizar todos os lipídios necessários à saúde, com exceção dos ácidos graxos de cadeia longa ômega 3 (n-3) e ômega 6 (n-6) (43), sendo estes chamados de essenciais (44). Esses ácidos graxos de cadeia longa podem ser divididos em três famílias, dependendo da posição da primeira ligação dupla da cadeia carbônica: os n-3, n-6 e ômega 9 (n-9). Os ácidos graxos n-3 e n-6 são poliinsaturados, enquanto que a maioria dos n-9 são monoinsaturados. Os ácidos graxos da família n-6 são mais prevalentes nos alimentos da dieta que os n-3, mas deficiências clínicas de n-6 são mais comuns que de n-3; no entanto, ambas são raras (43).

O ácido linoléico (LA, 18:2) e o ácido α -linolênico (ALA, 18:3) representam as famílias ômega 6 (n-6) e ômega 3 (n-3), respectivamente (45). Esses compostos possuem duas ou mais insaturações e por isso são chamados ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), podendo ser representados por símbolos, como C18:3n-3 representando o ALA e o C18:2n-6 representando o LA. O número justaposto ao C indica o número de átomos de carbono, o segundo número indica a quantidade de duplas ligações e o número a seguir indica a localização da 1^a dupla ligação a partir do radical metil (44).

A partir do ácido linoléico é sintetizado ácido araquidônico (AA) e a partir do ácido linolênico, o ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA). O ácido linoléico (n-6) e o ácido linolênico (n-3) estão presentes principalmente em alimentos de origem vegetal, como a semente de linhaça e de chia, enquanto que o DHA

e o EPA estão presentes em altas concentrações nos peixes e no óleo de peixe. Sabe-se que o AA (n-6) e o EPA (n-3) estão intrinsecamente envolvidos na síntese de tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos. No entanto, discute-se que as subclasses derivadas do AA possuam um potencial pró-inflamatório maior e que, por isso, para um efeito cardioprotetor maior, os seres humanos devam consumir alimentos com relação de ácidos graxos n-6/n-3 diminuída. Porém, essas considerações ainda são controversas (46).

A primeira observação dos efeitos cardioprotetores dos n-3 PUFAs data de aproximadamente 50 anos atrás, quando Sinclair analisava os efeitos negativos da deficiência de ácidos graxos essenciais na ocorrência de doenças cardiovasculares. Ele reforçou sua hipótese quando observou os baixos índices de mortalidade por doença coronariana em esquimós da Groelândia, uma população que possui uma dieta rica em gordura, mas rica em n-3 PUFAs (47).

Atualmente existem diversos produtos alimentícios enriquecidos com ácido graxo ômega 3, porém é necessário distinguir entre os ácidos graxos ômega 3 de cadeia curta, como o ALA, cujos efeitos benéficos ainda não estão bem esclarecidos, e os ácidos graxos ômega 3 de cadeia longa, como o EPA e o DHA, cujos efeitos cardioprotetores possuem evidência científica (48).

O efeito benéfico do ALA, EPA e DHA na redução da hipertensão e na remodelação cardiovascular está bem documentado. Três metanálises que compararam estudos de grupo controle e placebo concluíram que a administração de n-3 PUFAs (3-15g/dia), principalmente EPA e DHA em óleo de peixe, desencadeou uma pequena redução de pressão arterial, clinicamente significativa, de 2 a 5mmHg. Esse efeito modulador de hipertensão pode ser explicado pelo efeito dos n-3 PUFAs como antagonistas de receptor de angiotensina II, pelo efeito inibitório no sistema renina-angiotensina, especialmente secreção de renina e na atividade da enzima conversora de angiotensina. Além disso, os n-3 PUFAs estimulam a liberação de NO e podem estar envolvidos com a via de sinalização mediada por cálcio para a contração aórtica (49).

Uma revisão conduzida por Lavie et al. demonstrou que o consumo moderado de óleo de peixe diminuiu o risco de ocorrência de inúmeros eventos cardiovasculares, como o infarto do miocárdio, parada cardíaca súbita, doença coronariana, fibrilação atrial e, mais recentemente, morte em pacientes com insuficiência cardíaca (50). Os n-3 PUFAs também reduzem o risco de doença cardiovascular por melhorarem o perfil lipídico. Entretanto, os mecanismos pelos quais essas alterações são desencadeadas

parecem ser diferentes para o ácido graxo de cadeia curta e os ácidos graxos de cadeia longa. Enquanto o ALA exerce a maioria dos seus efeitos por meio da modulação das lipoproteínas, o EPA e o DHA atuam reduzindo a síntese de triacilglicerol e a adiposidade (49).

Sugere-se que o EPA e o DHA diminuem a secreção hepática e aumentam a depuração plasmática de triacilglicerol. Essa última pode estar relacionada à propriedade modulatória de apolipoproteína-E (Apo-E) atribuída a esses PUFAs. Além disso, há evidências suficientes que sugerem a atividade desses ácidos graxos como potentes ligantes de receptor ativador de proliferação de peroxissomos α e γ (PPAR- α e PPAR- γ , respectivamente), que regulam a expressão das enzimas lipase lipoprotéica e triacilglicerol lipase envolvidas na catalização da reação hidrolítica de triacilglicerol (49). A ativação de PPARs desencadeia um aumento na expressão de genes responsáveis pela oxidação dos ácidos graxos, como a acil-CoA oxidase, a acil-CoA sintetase e a hidroximetilglutaril – CoA sintetase. A família de PPARs constitui o alvo mais interessante e mais estudado da atividade hormônio-*like* dos PUFAs (46).

Observou-se também que os n-3 PUFAs não modificaram significativamente o colesterol plasmático, exceto em alguns pacientes em que o n-3 aumentou a colesterolemia total. Muito embora isso possa parecer um efeito pró-aterogênico, esse aumento foi atribuído ao aumento no tamanho da partícula de LDL que a tornou menos aterogênica (48).

Outro parâmetro funcional que pode influenciar a pressão arterial é a produção de moléculas de adesão e de citocinas pró-inflamatórias pela parede das artérias. Recentes evidências demonstraram que o DHA inibe a fosfolipase A_2 endotelial, importante fator de risco para aterosclerose, por meio de mecanismos antioxidantes e vias mediadas por fosfoquinase C (PKC) (48).

Os n-3 PUFAs podem também inibir a síntese de mediadores inflamatórios e fibróticos incluindo a proteína C reativa (PCR), as interleucinas, o TNF- α , as metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9 respectivamente) e os inibidores teciduais de metaloproteinases. Pacientes com dislipidemia tratados com EPA e DHA por mais de 6 meses exibiram um decréscimo nos níveis plasmáticos de PAI-1, fibrinogênio, MMP-2, MMP-9, dentre outras proteínas (51). Um ensaio duplo-cego, com grupo controle e placebo, realizado por Rizza et al. analisou a suplementação de 2g/dia de n-3 PUFAs, por 12 semanas, para 50 filhos de pacientes diabéticos, que exibiam disfunção endotelial associada a um perfil inflamatório crônico. Observou-se que esses pacientes obtiveram

uma melhora significativa da dilatação arterial mediada por fluxo, uma diminuição da concentração plasmática de triglicérides e de TNF- α e uma tendência de aumento dos níveis plasmáticos de adiponectina (52).

Dados que relacionem os n-3 PUFA's à homeostase glicêmica e à resistência à insulina em humanos e em animais são inconsistentes e sugestivos de que esses ácidos graxos não influenciam esse componente da SM. Uma recente metanálise de 11 ensaios randomizados controlados conduzida por Akinkuolie et al. (total: 618 indivíduos) concluiu que os n-3 PUFA's não possuem efeito sobre a resistência à insulina (53). Olza et al. também colaboraram para essa conclusão ao analisar os efeitos da administração de uma dieta enriquecida com n-3 PUFA's, por 6 meses, a 33 pacientes com idade superior a 65 anos. Os autores concluíram que a administração de EPA e DHA melhorou o perfil lipídico dos idosos, reduziu a concentração plasmática de triacilglicérides, mas não afetou a resistência à insulina (54).

Simão et al. concluíram que a ingestão de óleo de peixe propiciou uma diminuição nos níveis plasmáticos de triacilglicérides e um aumento na capacidade antioxidante total de pacientes com SM, porém houve um aumento nos níveis de LDL e na resistência à insulina. Estes autores relatam que a diminuição de triacilglicérides possui uma relação dose-resposta com o consumo dos ácidos graxos n-3, e que essa diminuição se deva a uma redução da lipogênese hepática. Discute-se que o efeito prejudicial dos PUFA's no controle glicêmico, ocorra devido ao aumento do fluxo de precursores hepáticos da gliconeogênese (55).

Sociedades Europeias e Americanas de Cardiologia incluíram a ingestão de EPA e DHA em *guidelines* para infarto agudo do miocárdio (IAM), prevenção de doença cardiovascular e prevenção de morte súbita cardíaca (56). A Associação Americana de Cardiologia (*American Heart Association-AHA*) recomenda a ingestão de duas refeições/semana de peixe gorduroso para indivíduos saudáveis (prevenção primária) e de 1g/dia de EPA + DHA, preferencialmente proveniente de peixe gorduroso e de suplementos prescritos por médico, para pacientes com doença coronariana (prevenção secundária). Os dois trabalhos que mais influenciaram na decisão da AHA foram os de Sicovick et al (57) e do *Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocárdico (GISSI) Prevenzione Investigators* (58). Estudando indivíduos saudáveis, Sicovick et al (57) verificaram que a ingestão de 5,5g/mês de ácidos graxos n-3, equivalente a uma refeição com peixe gorduroso/semana, reduzia a morte súbita em

50% e que o aumento de 5% dos ácidos graxos n-3 nos fosfolipídios de membrana das hemácias diminuiu em 70% o risco de morte súbita. O estudo *GISSI Prevenzione Investigators* (58) observou uma diminuição de 20% na mortalidade total e 45% na morte súbita após 3,5 anos de tratamento em pacientes pós IAM, utilizando 850 mg de óleo de peixe/dia (3 cápsulas).

Burr et al.(59) avaliaram o efeito da gordura do peixe na recidiva de infarto do miocárdio em homens. Estes foram divididos em dois grupos, sendo que um grupo foi orientado a consumir entre 200 e 400g de peixe semanalmente e o grupo controle não recebeu esta orientação. Os grupos foram seguidos durante dois anos. Após este período, observou-se redução de 29% da mortalidade no grupo que havia consumido dieta à base de peixe.

Lorgeril et al.(60) observaram qual seria o efeito de uma dieta Mediterrânea rica em ALA na prevenção secundária de infarto do miocárdio quando comparada a uma dieta usual pós-infarto e concluiu que uma dieta rica em ácidos graxos n-3 diminuiu a mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV). Entretanto, outros estudos não mostraram associação entre a ingestão de ácidos graxos n-3 e n-6 com a incidência de DCV (61,62).

O *Nurses Health Study* avaliou a associação entre o consumo de peixes e o risco de doenças cardíacas em mulheres de 34 a 59 anos de idade que nunca tiveram doença cardíaca ou câncer. Essas mulheres foram seguidas por 16 anos; as que comeram peixes duas a quatro vezes por semana, tiveram um risco 31% menor de doença cardíaca do que aquelas que comeram peixes menos de que uma vez pôr mês. As mulheres que comeram peixes cinco vezes por semana tiveram um risco 45% menor de morrer de doença cardíaca do que aquelas que comeram menos peixes (63).

Simopoulos (64) descreveu o papel protetor dos ácidos graxos n-3 em doenças crônicas como o diabetes, doenças cardiovasculares, renais e inflamatórias. Resumidamente, o papel protetor dos PUFAs n-3 está relacionado à substituição de PUFAs n-6, especialmente AA, por EPA e DHA, principalmente na membrana de plaquetas, eritrócitos, neutrófilos, monócitos e células hepáticas. Portanto, a ingestão de peixe ou óleo de peixe resulta em: 1) diminuição da produção de prostaglandinas E2 e seus metabólitos; 2) diminuição das concentrações de tromboxana A2, que é um importante agregador plaquetário e vasoconstritor; 3) diminuição da formação de

leucotrieno B4 que é um indutor da resposta inflamatória e agente quimiotático para leucócitos e aumento da concentração de tromboxana A3 que induz fracamente a agregação plaquetária e a vasoconstrição; 4) aumento das concentrações de prostaciclina I3 (PGI3) que é um importante vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária; e 5) aumento da concentração de leucotrieno B5, que é um fraco agente indutor de inflamação e com baixa ação quimiotática.

Pode-se alcançar o nível de ômega 3 indicado pelos órgãos científicos internacionais por meio do aumento do consumo de peixe ou por meio da suplementação com óleo de peixe. No entanto, para indivíduos que exibem severa hipertrigliceridemia, os ácidos graxos ômega 3 devem ser prescritos em concentrações adequadas e administrados em preparações farmacêuticas, como parte integral da terapia (48). Embora os efeitos dos ácidos graxos n-3 estejam bem estabelecidos na prevenção secundária de doenças cardiovasculares, a prevenção primária deve ser realizada com cautela. Uma suplementação correta de PUFAs para a população em geral não deve ser realizada antes se verificarem os níveis plasmáticos desses ácidos graxos e o consumo energético total, bem como o consumo de gorduras de cada indivíduo (46).

1.5.1. EFEITO NOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

Estudos clínicos têm mostrado que os ácidos graxos modulam a resposta inflamatória por muitos mecanismos, inclusive atuando na diminuição da transcrição de citocinas pró-inflamatórias e na expressão de moléculas de adesão leucocitária na superfície vascular. Em particular, em estudos experimentais em modelos animais, os ácidos graxos n-3 inibiram a produção de interleucina 1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral α (TNF α)(65).

Estudo realizado por Pischon et al. (66) mostrou que a ingestão dietética de ácidos graxos n-3 e n-6 em homens e mulheres americanos era inversamente associado com níveis plasmáticos do receptor 1 e 2 de TNF α , mas não com outras citocinas. Esta observação é importante porque sugere que níveis fisiológicos de ácidos graxos modulam a inflamação.

Ferrucci et al. (65) realizaram um estudo com 1123 pessoas, com idade entre 20

a 98 anos, onde avaliaram a relação entre a concentração plasmática de ácidos graxos no plasma de jejum e os níveis de marcadores inflamatórios. Da quantidade plasmática de n-3, 13,6% era de ALA, 18,8% de EPA e 67,7% de DHA e dos ácidos graxos n-6, 75,3% eram de LA e 24,4% de AA. Constatou-se que baixos níveis de AA e DHA foram associados com valores significativamente altos de IL-6 e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1 ra) e níveis significativamente baixos de fator de crescimento β (TGF β). Baixas concentrações de ALA foram correlacionadas com altos níveis de PCR e IL-1 ra e baixos níveis de EPA foram associados com valores elevados de IL-6 e baixos de TGF β . Valores plasmáticos baixos de DHA foram fortemente associados a baixos níveis de interleucina 10 (IL-10). Quando a relação n-6:n-3 se manteve alta, baixos níveis de IL-10 foram observados. Esses achados reforçam a hipótese de que ácidos graxos n-3 podem ser benéficos em pacientes com doenças que cursam com ativação inflamatória e disfunção endotelial como ocorre na aterosclerose.

Analizou-se a concentração plasmática de moléculas de adesão solúveis em pacientes diabéticos e hipertriglicéridêmicos recebendo 4g de PUFA n-3 diariamente. Inicialmente, os pacientes tinham altas concentrações de ICAM-1, de molécula de adesão vascular (VCAM-1) e de E-selectina em relação ao grupo controle. Após seis semanas de tratamento com PUFA n-3 não foi constatada redução significativa nas moléculas de adesão solúveis, porém, após sete meses, verificou-se uma redução de 9% nas ICAM-1 e de 16% na E-selectina (67).

O efeito da suplementação com PUFA n-3 em homens fumantes com hiperlipidemia também foi investigado. Estes indivíduos ingeriram 4,8g de PUFA n-3 por 6 semanas e avaliou-se algumas variáveis de hemostasia e os níveis de moléculas de adesão solúveis. Os resultados foram contraditórios, uma vez que constataram que a suplementação acarretou uma redução benéfica significativa no Fator de vonWillebrand e na trombomodulina, mas aumentou os níveis de VCAM-1 e de E-selectina (68).

1.5.2 ÓLEO DE PEIXE E ESTRESSE OXIDATIVO

Os PUFAs são altamente susceptíveis ao ataque de radicais livres, sendo que os ácidos graxos n-3 de cadeia longa, como o EPA e DHA, oxidam mais facilmente por terem maior número de duplas ligações. Entretanto, estudos têm demonstrado resultados contraditórios em relação ao efeito do EPA e do DHA na oxidação *in vivo*.

Meydani et al. (69) verificaram aumento nas concentrações plasmáticas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um teste utilizado para verificar a presença de produtos de oxidação lipídica. No entanto, outros estudos têm mostrado que o consumo de ácidos graxos não altera a produção de lipoperóxidos. Wander e Du (70) avaliaram o efeito da suplementação com EPA e DHA na oxidação protéica e na lipoperoxidação no plasma de mulheres pós-menopausa tratadas com óleo de peixe. Utilizou-se também a vitamina E para avaliar seu possível efeito protetor. A suplementação com os ácidos graxos aumentou discretamente a concentração de produtos da lipoperoxidação verificada pelo teste de TBARS que foi inibida pela vitamina E. Por outro lado, o consumo do óleo de peixe não aumentou a oxidação protéica, independentemente da presença de vitamina E. Como o teste de TBARS sofre várias interferências e o aumento foi muito discreto e não confirmado pela avaliação da oxidação protéica, os resultados sugerem que o EPA e o DHA não aumentam a oxidação.

O estudo de pacientes com retocolite ulcerativa utilizando 4,5g de ácidos graxos n-3 de óleo de peixe também não demonstrou aumento do estresse oxidativo nesses pacientes. Ao contrário, os pacientes apresentaram aumento de sua capacidade total antioxidante com o uso dos ácidos graxos n-3, mesmo embora não houvesse diminuição da atividade inflamatória da doença. Os autores sugeriram uma possível ação dos ácidos graxos n-3 como “removedores de radicais livres” (71).

Um estudo transversal realizado com 495 participantes avaliou a associação entre as concentrações séricas de n-3 e n-6 PUFAs e concentração urinária de 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxo-gua), um marcador de dano oxidativo no DNA, e verificaram que os indivíduos com maiores concentrações de n-3 PUFAs apresentaram menores concentrações desse marcador (72).

1.6. ÓLEO DE OLIVA NA REDUÇÃO DE EVENTOS CARDIOVASCULARES

O óleo de oliva é considerado um alimento funcional rico em ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e uma grande variedade de componentes não-graxos que possuem propriedades biológicas potenciais (73). Os ácidos graxos constituem a fração oleosa que corresponde a 98-99% do total do óleo de oliva. Dentre a fração oleosa, os MUFAs correspondem a 73-75%, com predomínio de ácido oléico, 10-15% são

compostos de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), e 14-15% de ácidos graxos saturados (SFAs). Os compostos fenólicos (CFs), responsáveis pelos efeitos cardioprotetores, compõe a fração não oleosa do óleo de oliva virgem, que representa cerca de 1,5% da sua composição total. (74). Dentre os CFs, destaca-se a presença dos ácidos fenólicos, das lignanas e dos flavonóides. Além disso, também estão presentes na fração não oleosa a clorofila e seus derivados, os hidrocarbonetos, os carotenóides, e os tocoferóis (73).

Deve-se atentar para uma importante distinção que há entre óleo de oliva e óleo de oliva virgem/extra virgem. Enquanto o primeiro é refinado e, portanto, desprovido de compostos fenólicos, o segundo contém mais de 1g dessas moléculas por quilograma de óleo de oliva. Embora a indústria tente mascarar a palatabilidade do óleo de oliva, o melhor óleo possui características sensoriais distintas, um aroma mais picante e um sabor mais amargo, devido à maior concentração de polifenóis (74). Entretanto, a concentração desses compostos pode variar conforme o cultivo, o clima, a maturação das olivas na colheita e o sistema de processamento empregado na produção dos diferentes tipos de óleo de oliva (73).

Durante muitos séculos a produção de óleo de oliva se restringia à região próxima ao Mar Mediterrâneo, que determinava um padrão de alimentação diferenciada que só era aplicável aos países que o cercavam. Contudo, nos últimos anos, o interesse científico pela dieta do Mediterrâneo tem aumentado significativamente. Isso se deve à maior longevidade, melhor qualidade de vida e menor incidência de doenças cardiovasculares, oncológicas e cognitivas relacionadas a esse padrão de alimentação (75).

A tradicional dieta Mediterrânea é caracterizada pela presença de saladas, frutas, vegetais, legumes e grãos em abundância, de óleo de oliva como a principal fonte de gordura, quantidade pequena a moderada de vinho, peixe, aves, derivados de leite e ovos, e pequena quantidade de carne vermelha (76). De modo geral, essa dieta fornece grandes quantidades de fibras, antioxidantes e ácidos graxos insaturados que influenciam potencialmente os diversos componentes da SM (77).

Vários estudos têm evidenciado uma redução de fatores associados ao aumento do risco cardiovascular com o consumo de óleo de oliva. Perona et al (78) avaliaram 31 idosos hipertensos que participaram de um ensaio clínico randomizado, no qual ingeriram, durante 4 semanas, óleo de oliva virgem ou óleo de girassol. A pressão arterial sistólica normalizou no grupo óleo de oliva (136 ± 10 mmHg) quando comparado

ao grupo óleo de girassol (150 ± 8 mmHg). Outro estudo avaliou durante três semanas a ingestão de 50 mL de óleo de oliva virgem ou 50 mL de óleo de oliva refinado em 40 homens com doença coronariana estável. Foi observada no grupo de óleo de oliva virgem uma menor oxidação de LDL ($p<0,001$), menor peroxidação lipídica ($p=0,003$) e redução da pressão arterial sistólica nos participantes hipertensos ($p=0,001$) (79).

Um ensaio clínico randomizado de prevenção primária avaliou 180 pacientes (99 homens e 81 mulheres) com síndrome metabólica, de acordo com os critérios do ATP III, alocando-os em dois grupos, 90 no grupo intervenção com uma dieta tipo mediterrâneo (frutas, legumes, hortaliças, pães e cereais integrais, peixe, frango, nozes e óleo de oliva em abundância) e 90 no grupo controle, com uma dieta prudente (gorduras $<30\%$ das calorias totais). Após dois anos, o grupo dieta do Mediterrâneo, comparado ao grupo controle, apresentou redução significativa da concentração plasmática dos marcadores inflamatórios PCR ($p=0,01$); IL-6 ($p=0,04$) além de redução da resistência à insulina ($p<0,001$) e melhora da função endotelial ($p<0,001$)(80).

Kastorini et al., a partir de uma meta-análise que comparou cerca de 50 estudos, totalizando cerca de 1,5 milhões de indivíduos, concluíram que a aderência ao padrão de dieta do Mediterrâneo está associada à baixa prevalência e progressão de SM. Esses resultados de grande importância para a saúde pública mundial se devem aos efeitos benéficos dessa dieta sobre os diversos componentes dessa síndrome. Constatou-se que essa dieta está relacionada com a redução da obesidade abdominal e da pressão arterial, e com a alteração do metabolismo de glicose e das concentrações séricas de lipídios (81).

Nesse sentido, diversas evidências científicas apontam para a prevenção de risco cardiovascular associada ao consumo de dieta rica em óleo de oliva. Atribui-se ao óleo de oliva virgem a capacidade de modular as concentrações plasmáticas dos lipídios, por meio da redução do colesterol LDL e da manutenção ou elevação do colesterol HDL. Além disso, ele melhora o controle dos níveis de glicose e da pressão arterial (75). Um estudo de Papageorgiou et al. concluiu que o consumo de óleo de oliva, óleo de soja e óleo de fígado de bacalhau, diminuiu significativamente os níveis de TNF- α . Além disso, o grau de alteração dos níveis de TNF- α estava correlacionado ao grau de alteração dos níveis de ICAM-1, indicando que a expressão de TNF- α , após o consumo do óleo de oliva, pode regular a subsequente expressão dos níveis de ICAM-1(82).

Nesse contexto, Camargo et al. sugeriram que o consumo da dieta do Mediterrâneo enriquecida com óleo de oliva virgem por idosos saudáveis reduziu a

expressão de genes inflamatórios quando comparada a uma dieta rica em SFAs e a outra dieta rica em carboidratos e PUFAs. Adicionalmente, a dieta do Mediterrâneo reduziu a expressão de MMP-9 relacionadas à instabilidade da placa aterosclerótica, quando comparada à dieta rica em SFAs (83).

Em outro estudo de Camargo et al., demonstrou-se que o consumo de óleo de oliva virgem, por pacientes com SM, diminuiu a proliferação de células mononucleares de sangue periférico no período pós-prandial, sugerindo que esse hábito possa reduzir o desenvolvimento e a progressão de aterosclerose. Segundo esse trabalho, essa ação se deve principalmente à presença de CFs no óleo de oliva que alteraram a expressão de 51 genes, dentre os quais 18 estavam envolvidos com processos de sinalização celular. Dentre esses genes, destacou-se a repressão 3 membros da família de fatores de transcrição *Early Growth Response* (EGR) e do fator de transcrição *Activator protein 1* (AP-1) que exercem importantes papéis no controle de programas celulares de diferenciação, proliferação e morte celular (84).

No estudo de Richard et al., pacientes que não perderam peso e ingeriram a dieta do Mediterrâneo apresentaram uma redução da concentração plasmática de LDL que parece estar intimamente relacionada com o aumento do *clearance* de LDL combinado à diminuição da absorção intestinal, sem qualquer alteração na síntese do colesterol (85). Além disso, um maior interesse tem sido direcionado para o conhecimento de fatores que possam influenciar os mecanismos envolvidos na estabilidade da placa aterosclerótica, como os efeitos benéficos desencadeados pelos CFs e os MUFAs. Dentre esses efeitos, destaca-se o potencial antioxidante e antiinflamatório do óleo de oliva e sua capacidade de gerar um ambiente menos pró-trombótico e de aumentar a vasodilatação dependente do endotélio (75).

Relatou-se que a ingestão dos CFs presentes no óleo de oliva extra virgem, por voluntários saudáveis e pacientes que apresentaram um episódio coronariano, propiciou uma melhora no perfil lipídico, na resistência à insulina e na função endotelial. Além disso, houve redução da oxidação lipídica e do DNA, da atividade pró-trombótica e do perfil inflamatório desses indivíduos. Solà-Alberich et al. relataram que a atividade desempenhada pelos CFs pode ocorrer devido à modificação da expressão (indução ou repressão) de genes que estão envolvidos em distintas vias metabólicas, conforme observado em indivíduos saudáveis que ingeriram agudamente óleo de oliva extra virgem (86).

Embora ainda existam controvérsias sobre a influência dos MUFAs derivados do

óleo de oliva sobre a sensibilidade à insulina, discute-se que a incorporação de ácido oléico na membrana celular resulte em menor fluidez dessa estrutura que pode favorecer a liberação da insulina pelas células β pancreáticas em resposta à glicose. Além disso, o ácido oléico consumido em grandes quantidades pode interagir com polimorfismos do gene de PPAR γ 2, resultando em aumento de sensibilidade tecidual à insulina (76).

1.6.1. ÓLEO DE OLIVA E ESTRESSE OXIDATIVO

Diversos estudos de intervenção suportam a ideia de que os efeitos cardioprotetores da dieta do mediterrâneo são decorrentes da ingestão de quantidades significativas de antioxidantes, dentre eles os polifenóis presentes no óleo de oliva. Os benefícios decorrentes da ingestão de óleo de oliva no estresse oxidativo se dão pela presença de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) na composição do óleo, principalmente ácido oléico, o qual protege as membranas celulares da oxidação. Os polifenóis presentes no óleo de oliva apresentam propriedades antioxidantes e antiinflamatórias e são hábeis em reduzir a oxidação da LDL-C, importante fator de risco para aterosclerose.

Recente estudo controlado e randomizado avaliou a capacidade dos polifenóis do óleo de oliva em modular *in vivo* a expressão de genes relacionados com a aterosclerose, na qual a oxidação da LDL está envolvida. Os participantes foram divididos em dois grupos os quais ingeriram diariamente, por três semanas, 25mL de óleo de oliva contendo baixa concentração de polifenóis (2.7mg/kg) ou alta concentração de polifenóis (366mg/kg). No grupo que recebeu óleo de oliva com alta concentração de polifenóis houve redução na expressão de genes envolvidos nos processos aterogênicos e inflamatórios (87).

Esposito et al. avaliaram os efeitos da dieta do mediterrâneo com ou sem restrição calórica no estresse oxidativo em homens com sobrepeso. Após dois anos de intervenção, independente da ingestão calórica, houve uma melhora significativa no grupo dieta do mediterrâneo em vários fatores de risco cardiovascular, dentre eles, diminuição da pressão arterial, diminuição das concentrações séricas de colesterol, triacilgliceróis e aumento da fração HDL-C, redução no estresse oxidativo (avaliado pela determinação de 8-iso-PGF2 α) e melhora na sensibilidade à insulina (88).

Outro estudo conduzido por Urquiaga et al. avaliou o efeito da dieta ocidental e/ou dieta do mediterrâneo no estresse oxidativo em indivíduos jovens (20-27 anos), concomitantemente ou não com a ingestão de moderada quantidade de vinho tinto. O

grupo que fez a dieta do mediterrâneo apresentou melhora na capacidade antioxidante que foi avaliada pelos níveis plasmáticos de vitamina C, carotenóides e capacidade antioxidante total. Por outro lado, a dieta ocidental aumentou os níveis plasmáticos de vitamina E, o que não foi observado com a dieta do mediterrâneo. O consumo moderado de vinho tinto nos dois grupos melhorou a capacidade antioxidante e diminuiu os níveis dos marcadores de estresse oxidativo avaliados neste estudo (89). Corroborando com esse estudo, Gaskins et al. não observaram diferença estatística nas concentrações séricas de vitamina E em 259 mulheres (idade média 27,3 anos) que foram acompanhadas por dois anos (2005-2007) e que aderiram à dieta do mediterrâneo. Por outro lado, houve melhora significativa nas concentrações séricas de ácido ascórbico e diminuição nos marcadores de peroxidação lipídica, 8-iso-PGF2 α e ácido 9-hidroxiotadecadienoico (9-HODE) (90). A dieta do mediterrâneo é capaz de diminuir a lipoperoxidação (LPO) através de alguns mecanismos biológicos: 1) a grande ingestão de tocoferóis presentes nos alimentos promove efeito protetor da LPO, removendo radicais peroxil e alcoxil (91); 2) a ingestão de grandes quantidades de ácido ascórbico atua como removedor (scavengers) de radicais livres (92); 3) o óleo de oliva confere proteção à LPO pois os MUFAs são mais resistentes ao ataque de radicais livres (93); 4) a alta ingestão de flavonóides promove proteção à LPO por remover diretamente alguns radicais livres e inibir enzimas responsáveis pela oxidação da partícula de LDL-C (94).

Assim, considerando que: 1º) O consumo de peixe ou a ingestão de cápsulas de óleo de peixe tem demonstrado causar alterações no perfil lipídico e melhora em outros fatores de risco para doenças cardiovasculares, como, por exemplo, na hipertensão arterial; 2º) Os compostos fenólicos encontrados no óleo de oliva exercem importante efeito antiinflamatório e antioxidante, o que poderia contribuir para a redução da inflamação observada em indivíduos com síndrome metabólica; 3º) A determinação dos níveis séricos dos marcadores pró-inflamatórios e sua correlação com os componentes da SM poderiam acrescentar novos dados aos já existentes sobre a fisiopatologia da SM e 4º) Há controvérsias na literatura em relação aos efeitos do óleo de peixe e/ou oliva no estresse oxidativo. Os objetivos do presente estudo são:

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar o efeito do consumo isolado ou concomitante de óleo de peixe e óleo de oliva nos parâmetros clássicos, no estresse oxidativo e nos marcadores inflamatórios de pacientes com síndrome metabólica.

2.2. ESPECÍFICOS

- 1) Verificar se há relação entre os componentes da síndrome metabólica e os marcadores de estresse oxidativo;
- 2) Avaliar o efeito da ingestão de óleo de peixe e/ou óleo de oliva na composição corporal e pressão arterial de indivíduos com síndrome metabólica;
- 3) Analisar o efeito da ingestão de óleo de peixe e/ou óleo de oliva no perfil lipídico e glicídico de indivíduos com síndrome metabólica;
- 4) Verificar o efeito da ingestão de óleo de peixe e/ou óleo de oliva no estresse oxidativo e a na capacidade antioxidante total plasmática de indivíduos com síndrome metabólica.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Pacientes:

Este protocolo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário de Londrina (CEP 258/08). Foi realizado estudo clínico aleatorizado, com cerca de 102 indivíduos com síndrome metabólica, segundo os critérios ATP III, atendidos no Ambulatório de Clínica Médica e de Cardiologia do Hospital Universitário de Londrina. Foram selecionados para este trabalho, indivíduos com padrão alimentar semelhante e que não tinham o hábito de ingerirem produtos à base de óleo de peixe e/ou óleo de oliva. Foram excluídos pacientes com doenças renais, hepáticas, gastrointestinais e neoplásicas, assim como em uso de medicamentos que interferissem no perfil lipídico e/ou glicêmico. Por motivos éticos, os pacientes hipertensos continuaram fazendo uso de sua medicação habitual.

Os pacientes foram selecionados e alocados aleatoriamente em quatro grupos de aproximadamente vinte indivíduos. O 1º grupo (grupo controle) recebeu orientação nutricional enquanto os demais grupos receberam a orientação associada à intervenção específica. O segundo grupo ingeriu diariamente 3,0 g de ácidos graxos n-3 (10 cápsulas/dia de óleo de peixe). O terceiro grupo consumiu 10 mL de óleo de oliva extra-virgem e o quarto grupo fez a ingestão da mesma quantidade descrita acima de óleo de peixe e óleo de oliva extra-virgem. Cada cápsula de óleo de peixe contém 180 mg de ácido eicosapentaenóico e 120 mg de ácido docosahexaenóico. As coletas de sangue e demais medidas foram efetuadas antes do início do consumo de óleo de oliva e/ou ingestão de cápsulas de óleo de peixe e após 90 dias da utilização diária dos mesmos.

3.2. Determinações Antropométrica e Aferição da Pressão Arterial

Todos os pacientes foram avaliados mediante: peso (kg), estatura (m) e a partir destes dados foi calculado o IMC (peso/altura²); circunferência abdominal, circunferência do quadril e duas medidas de pressão arterial (PA) após vinte minutos de repouso no início e após 90 dias de estudo. Para fins do estudo o paciente foi considerado hipertenso quando a PA $\geq 130/85$ ou uso de antihipertensivo, uma vez que essa é a definição operacional adotada pelo ATP III

3.3. Análises laboratoriais

3.3.1. Coleta e Preparo das Amostras:

As amostras de sangue foram obtidas após 12 horas de jejum. O plasma e o soro foram aliquotados e armazenados em freezer a - 70°C (Indrel®) até a realização dos testes.

3.3.2. Marcadores inflamatórios e parâmetros bioquímicos:

A determinação das concentrações séricas de proteína C reativa (PCR) foi realizada por nefelometria (Dade-Behring).

As análises de colesterol total, colesterol HDL, triacilglicerol, ácido úrico, gama glutamil transferase (GGT), alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), glicose, uréia e creatinina foram efetuadas em um auto-analisador bioquímico (Dade AR®), utilizando-se kits Dade Behring. Os níveis de insulina de jejum foram determinados por enzima imunoensaio em micropartículas (MEIA) no equipamento AXSYN (ABBOTT). O *Homeostatic Model Assessment* (HOMA) é um método utilizado para quantificar a resistência à insulina (RI) e a função das células beta pancreáticas (96). O índice HOMA-IR foi calculado da seguinte forma: $HOMA-IR = \text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulinemia de jejum (mU/L)} / 22,5$.

3.3.3. Determinação indireta de óxido nítrico (NO):

A produção de óxido nítrico foi avaliada através da determinação da concentração de nitritos no plasma. Para uma avaliação mais precisa, é necessário que os íons nitratos presentes sejam reduzidos a íons nitrito. Para esta transformação o meio de reação foi tratado com grânulos de cádmio. A concentração de nitritos foi avaliada colorimetricamente por meio do reagente de *Griess* (95).

3.3.4. Avaliação do Estresse Oxidativo:

3.3.4.1 Capacidade Antioxidante Total Plasmática (TRAP):

A capacidade antioxidante total plasmática (TRAP) foi avaliada por quimiluminescência (QL) em uma adaptação do método da técnica descrita por Repetto *et al.* (97). Esta metodologia detecta antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma. Ao meio de reação (1,8 mL de tampão glicina 0,1 M, pH 8,6) serão acrescentado 100 µL de luminol em solução aquosa 200 µM, 5 µL de soro diluído 50% em tampão glicina e 100 µL de solução aquosa de 2,2' azo-bis (2-amidinopropano) 200 mM. É bem

sabido que o 2,2' azo-bis gera radicais peroxil rapidamente, via interação com radicais centrados em carbono e oxigênio molecular, causando a oxidação de lipídeos e proteínas em biomoléculas (98). Estes radicais livres reagem com o luminol (que atua como um amplificador de sinal), produzindo Quimiluminescência (QL). Esta reação é inibida pela superóxido dismutase (SOD), catalase e análogos da vitamina E. A adição de plasma também diminui a QL em níveis basais por um período (tempo de indução t_i) proporcional à concentração plasmática de antioxidantes (TRAP) até que os radicais do luminol sejam regenerados, restituindo-se os níveis iniciais de QL. O sistema foi calibrado com análogo de vitamina E (Trolox), 100 μL na concentração de 20 μM em tampão glicina pH 8,6. Uma comparação do tempo de indução depois da adição de concentrações conhecidas de Trolox e plasma permitiu obter valores de TRAP em equivalentes de Trolox segundo a equação:

$$\text{TRAP } (\mu\text{M Trolox}) = D \times \frac{t_{\text{amostra}}}{t_{\text{Trolox}}}$$

D é um fator de diluição da amostra no meio de reação, t_{amostra} é o tempo de indução promovido pela adição da amostra de plasma, t_{Trolox} é o tempo de indução promovido por 1 μM de Trolox. Os resultados foram expressos em μM de Trolox. Este experimento foi conduzido em um contador β marca Beckman® (EUA) modelo LS 6000, utilizando-se um modo de contagem não coincidente por 30 minutos, com uma faixa de resposta entre 300 a 620 nM.

3.3.4.2. Quimiluminescência Induzida por t-Butil Hidroperóxidos (QL):

A avaliação da formação de lipoperóxidos por QL foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita por González-Flecha e colaboradores (99). A QM estimulada por t-butil hidroperóxido foi empregada para analisar a integridade dos mecanismos de defesa antioxidante não-enzimáticos e os níveis de lipoperóxidos. Este teste baseia-se na premissa de que um aumento de QM está relacionado com um estresse oxidativo prévio sofrido pelo tecido, levando ao consumo das defesas antioxidantes de baixo peso molecular, tais como vitamina E e formação de lipoperóxidos, resultando em aumento da emissão de fótons (71,99,100,101).

As análises foram realizadas em frascos plásticos para cintilação com capacidade para 20 mL e protegidos da luz. O meio de reação consistiu de 1750 µL de tampão fosfato 30 mM pH 7,4 e KCl 20 mM (v/v) acrescidos de 250 µL de soro e mais 20 µL de terc-butyl (t-BuOOH) com concentração final de 3 mM em 2,0 mL de meio de reação. A QL foi medida em um contador β modelo LS 6000, em um modo de contagem não coincidente, com uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm. Este experimento foi conduzido a uma temperatura de 30°C. Os resultados foram expressos em contagem por minuto (c.p.m.).

3.3.4.3. Determinação de hidroperóxidos lipídicos

As concentrações de hidroperóxidos lipídicos foram determinados pela técnica de *Ferrous Oxidation-xyleneol Orange Assay* (FOX). O reagente de Fox foi preparado utilizando 90 mL de metanol puro, 10 mL de H₂SO₄ na concentração de 250 mM, 88 mg de BHT, 7,6 mg de xilenol Orange e 9,8 mg de sulfato de ferro hexahidratado. Procedeu-se a realização de uma curva de calibração com padrão nas concentrações de 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 e 4.0 mM. As reações foram lidas em espectrofotômetro da marca Thermo Spectronic, modelo Helyos α, em 560 nm e os resultados foram expressos em mmol/L (102).

3.3.4.4. Determinação dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP)

Concentrações plasmáticas de AOPP foram determinados utilizando método semiautomatizado descrito por Witko-Sarsat et al. O reagente foi preparado utilizando iodeto de potássio (KI) a 1,16 M em água deionizada e ácido acético para análise (pa). As amostras de plasma foram diluídas 1:5 com solução de PBS. Procedeu-se a realização de uma curva de calibração com padrão nas concentrações de 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µmol. Após a adição dos reagentes e amostras procedeu-se a leitura imediata em espectrofotômetro da marca Thermo Spectronic, no comprimento de onda de 340 nm. As concentrações de AOPP foram expressas em micromoles por litro (µmol/L) de equivalentes de cloramina (103).

4. Análise estatística

O teste de Mann-Whitney foi utilizado no artigo 1 para as comparações entre o grupo controle e grupo de pacientes com SM, bem como as associações entre

componentes da SM e marcadores de estresse oxidativo. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0.05$. O programa estatístico utilizado para as análises foi Graph Pad InStat (Graph Pad Software, Inc).

No artigo 2 o teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar as mudanças intra-grupo e o teste de Kruskal-Wallis com post hoc Dunn foi utilizado para avaliar as diferenças entre os tratamentos (inter-grupo). Para as diferenças entre os grupos no início do estudo (basal) foi utilizado a análise de variância (ANOVA) com post hoc de Tukey. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão ou mediana e interquartis (25-75%). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0.05$. O programa estatístico utilizado para as análises foi o R.

5. ARTIGOS

O projeto resultou na produção de dois artigos científicos:

ARTICLE 1: Influence of metabolic syndrome components on biomarkers of oxidative stress

Danielle Venturini¹, Andréa Name Colado Simão¹, Isaias Dichi²,

¹: Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology - University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

² Department of Internal Medicine - University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

Corresponding author: Isaias Dichi, PhD. Department of Internal Medicine. Robert Koch Avenue nº 60 Bairro Cervejaria, University of Londrina. Londrina, Paraná, Brazil.

CEP: 86038-440 Tel: (55) 43 3371 2313 E-mail: dichi@sercomtel.com.br

Abstract

Background: Metabolic syndrome (MetS) is characterized by increased adiposity, insulin-resistance, atherogenic dyslipidemia, oxidative stress (OS), and elevated cardiovascular risk and frequently involves low-grade inflammation and hyperuricemia.

Objective: The objective of this study was to evaluate which metabolic syndrome components were associated with oxidative stress markers. **Methods:** The present study

was cross-sectional and evaluated 76 subjects with MetS (15 male and 61 female) aged (49.8 ± 9.09) selected among Internal Medicine ambulatory patients and 20 healthy workers (1 male and 19 female) aged (48 ± 4.4) of the University Hospital of Londrina,

Paraná, Brazil. **Results:** Higher plasma OS was demonstrated by high plasma levels of advanced oxidation protein products (AOPP) ($p: 0.0084$) and AOPP/TRAP index

(0.0020), whereas the total antioxidant capacity (TRAP) was significantly lower in the MetS group when compared with control group ($p=0.0481$). Obese patients showed

higher plasma hydroperoxides concentration levels ($p < 0.05$), whereas patients with

increased glucose plasma levels, hypertriacylglycerolemia and increased HOMA-IR (> 2.5) showed higher AOPP ($p < 0.05$, $p < 0.0001$ and $p < 0.05$ respectively) and lower

total antioxidant capacity ($p < 0.05$, $p < 0.05$ and $p < 0.0001$ respectively). Patients with

hyperuricemia demonstrated higher AOPP and nitric oxide (NO) levels ($p < 0.05$) and

was positively correlated with NO ($r: 0.2760$, $p: 0.03$), whereas patients with increased

C-reactive protein presented higher AOPP and ferrous oxidation-xylenol orange (FOX)

levels ($p < 0.05$). Patients who had higher HDL-cholesterol showed decreased AOPP

levels. **Conclusion:** This study provides evidence that hypertriacylglycerolemia, hyperglycemia and HOMA-IR, low levels of HDL-C, inflammation and high serum

levels of uric acid are closely linked to elevated systemic oxidative stress in MetS patients.

Key words: Oxidative stress, metabolic syndrome, hyperuricemia, hypertriacylglycerolemia.

1. Introduction

The metabolic syndrome (MetS), a growing medical problem in industrialized countries, represents a risk factor for cardiovascular diseases and type 2 diabetes mellitus and is characterized by central obesity, insulin resistance, dyslipidemia, and hypertension (1). Chronic inflammation may represent a triggering factor in the origin of MetS (2). Oxidative stress (OS), which is also referred to as a reactive oxygen-nitrogen species (ROS-RNS)-antioxidant imbalance, occurs when the net amount of ROS-RNS exceeds the antioxidant capacity. It has been suggested that OS could be an early event in the pathology of the chronic diseases associated with MetS, rather than merely a consequence of this disorder (3). Hyperglycemia and inflammation, two components of MetS, are also associated with overproduction of ROS. Additionally, obesity is the central and causal component in the MetS and the increased oxidative stress in accumulated fat is an early instigator of MetS (4). A recent review evaluated the correlation between OS biomarkers and the metabolic features of MetS and observed that oxidative status might contribute to the identification of a subset of patients at increased risk of metabolic and cardiovascular complications (5).

Advanced oxidation protein products (AOPP), which are proteins that are damaged by OS, most notably albumin and its aggregates, have begun to attract the attention of various investigators. AOPPs are the dityrosine-containing and cross-linking protein products formed during OS by reaction of plasma protein with chlorinated oxidants, including hypochloric acid and chloramines, which result from myeloperoxidase activity (6). The use of total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) has been proposed to explore the antioxidant capacity of plasma sample. TRAP evaluates the antioxidant capacity due to known and unknown antioxidants present in the sample as well as their mutual co-operation. In addition, the measure of TRAP in

conditions with associated hyperuricemia, as is the case of MetS patients, may be jeopardized because uric acid concentration is responsible for 60% of plasmatic total antioxidant capacity and some reports have verified an unexpected increase in total antioxidant capacity in MetS patients (7). Thus, a correction of total antioxidant capacity based on uric acid concentration is needed.

The purpose of this study was to assess the impact of oxidative stress biomarkers and its association with the MetS components.

2. Material and methods

2.1. Subjects

Seventy six individuals (15 male and 61 female) aged 49 ± 9.09 years selected among Internal Medicine ambulatory patients of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil, were chosen to participate in this cross-sectional study. Information on lifestyle factors and medical history were obtained through clinical evaluation. MetS was defined following the Adult Treatment Panel III (ATP III) criteria (7). When three of five of the listed characteristics were verified, a diagnosis of MS was performed: 1) Abdominal obesity: waist circumference ≥ 102 cm in men and ≥ 88 cm in women; 2) Hypertriglyceridemia ≥ 150 mg/dl (1.695 mmol/L); 3) Low levels of HDL cholesterol: ≤ 40 mg/dl (1.036 mmol/l) in men and ≤ 50 mg/dl (1.295 mmol/l) in women; 4) High blood pressure: $\geq 130/85$ mmHg; 5) High fasting glucose: ≥ 100 mg/dl. The control group consisted of 20 healthy workers (1 male and 19 female) aged 48 ± 4.41 years of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. None of the participants of the study presented thyroid, renal, hepatic, gastrointestinal, or oncological disease, and none of the participants had a clinically evident infection or were receiving drugs for hyperglycaemia or drugs known to affect lipoprotein and uric acid metabolism or antiinflammatory drugs, for at least 4 weeks before the study. All patients gave written

informed consent, and the study protocol (CEP 258/08) was fully approved by the Ethical committee of the University of Londrina (Paraná, Brazil).

2.2. Anthropometric and Blood Pressure Measurements

Height and weight were measured in the morning with subjects wearing light clothing, but no shoes. Following these, two blood pressure measurements, taken with a ten minute's interval between them after the subject had been seated, were recorded. The mean of these measurements was used in the analysis. We considered the current use of antihypertensive medication as an indication of high blood pressure. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. Waist circumference (WC) was measured with a soft tape on standing subjects midway between the lowest rib and the iliac crest and, the waist-hip ratio (WHR) was calculated.

2.3. Biochemical and Inflammatory Biomarkers Measurements

After fasting for 12 hours, the subjects underwent the following laboratory blood analysis: glucose, total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triacylglycerol (TG), uric acid, gamma glutamyltransferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and creatinine which were evaluated by a biochemical auto-analyzer (Dimension Dade AR; Dade Behring, Deerfield, IL, USA), using Dade Behring® kits; plasma insulin levels were determined by MEIA (AXSYM, ABBOTT® Laboratory) and serum highly sensitive C-reactive protein (CRP) was measured using a nephelometric assay (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Marburg, Germany).

All samples were centrifuged at 3,000 xg for 15 minutes, and plasma or serum aliquots were stored at -70°C until assayed. Interassay and intraassay coefficient of

variation (CV) for all assays were <10% as determined in human serum.

The Homeostasis Model Assessment insulin resistance (HOMA-IR) was used as a surrogate measure of insulin sensitivity (8) as follows: $\text{HOMA-IR} = \text{insulin fasting } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucose fasting (mmol/L)} / 22.5$.

2.4. Oxidative Stress Measurements

Samples for evaluating oxidative stress and total antioxidant capacity were performed with EDTA as anticoagulant and antioxidant. All samples were centrifuged at 3.000 xg for 15 minutes and plasma aliquots stored at -70°C until assayed.

Analysis of plasma hydroperoxide concentrations by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH) in plasma was evaluated as described previously by González-Flecha et al. (9) and reported previously by our group (10). The results are expressed in counts per minute (cpm). Plasma lipid hydroperoxides levels were also determined by ferrous oxidation-xylenol orange (FOX) assay (11) and results were expressed in mmol/L.

Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) was determined in the plasma using the semiautomated method described by Witko-Sarsat et al. (12). AOPP concentrations were expressed as micromoles per liter (umol/L) of chloramines-T equivalents.

The total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) was determined as reported by Repetto et al. (13). This method detects hydrosoluble and/or liposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by 2,2-azobis (2-amidinopropane). The system was calibrated with the vitamin E analog TROLOX, and the values of TRAP are expressed in equivalent of μM Trolox. As described in previous studies, TRAP was expressed after correction by uric acid levels

(10).

Serum nitric oxide (NO) metabolite levels were assessed by nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) concentration according to the Griess reaction, supplemented by the reduction of nitrate to nitrite with Cadmium (Cd) (14)

2.5. Statistical Analysis

Data were expressed as the mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range (25th - 75th percentile). Comparisons between control subjects and patients with MetS and associations between MetS components and OS biomarkers were performed using the Mann-Whitney test. Correlations were evaluated by Spearman's rank correlation. The results were considered significant when $p < 0.05$. A statistical analysis program (Graph Pad InStat, Graph Pad Software, Inc) was used for evaluations.

3. Results

Control and MetS group did not show differences between age, sex, ethnicity, smoking and alcohol intake. Statistically differences were observed between control and MetS groups with respect to use of anti-hypertensive medications. None of control group did use anti-hypertensive, whereas 46 (60.5%) patients in the MetS group used anti-hypertensive ($p < 0.0001$). In the present study, 27 patients (58.7%) with MetS were treated by ACE inhibitors. For ethical reasons, we could not ask the patients to stop using anti-hypertensive medication to participate in the study.

As expected, there were significant differences between the control and MetS

groups in several parameters related to MetS criteria, including BMI ($p < 0.0001$), WC ($p < 0.0001$), SBP ($p < 0.0001$), DBP ($p = 0.0254$), triacylglycerol (TG) ($p = 0.0005$), HDL-cholesterol ($p < 0.0001$), TC/HDL and LDL/HDL ratios ($p < 0.0001$ and 0.0062 respectively), fasting glucose ($p = 0.0151$), fasting insulin ($p = 0.0012$), HOMA-IR ($p = 0.0003$), uric acid ($p < 0.0001$), GGT ($p = 0.0279$), AST ($p = 0.0002$), CRP ($p = 0.0004$) (Table 1).

Higher plasma oxidative stress in MetS group was confirmed by significantly elevated levels in the following markers: AOPP ($p = 0.0084$) and AOPP/TRAP index (0.0020) (Table 2). The total antioxidant capacity (TRAP) was significantly lower in the MetS group when compared with control group ($p = 0.0481$) (Table 2).

With regard to the relationship between metabolic syndrome components with oxidative stress markers, obese patients, who were represented by $BMI \geq 30$, showed higher plasma hydroperoxides concentration determined by ferrous oxidation-xylenol orange assay (FOX) levels ($p < 0.05$), whereas patients with increased glucose levels, hypertriacylglycerolemia and increased HOMA-IR (> 2.5) showed higher advanced oxidation protein products (AOPP) ($p < 0.05$, $p < 0.0001$ and $p < 0.05$ respectively) and lower total antioxidant capacity ($p < 0.05$, $p < 0.05$ and $p < 0.0001$ respectively). Patients with hyperuricemia demonstrated higher AOPP and nitric oxide levels ($p < 0.05$), whereas patients with increased C-reactive protein presented higher AOPP and FOX levels ($p < 0.05$). Patients who had higher HDL-cholesterol showed decreased AOPP levels (Table 3). Uric acid was positively correlated with nitric oxide ($r = 0.2760$, $p = 0.0313$) (Figure 1).

4. Discussion

The present study showed that OS is increased and antioxidant defences are

decreased in MetS patients. In addition, with the exception of hypertension, all other components of the MetS criteria were associated with markers of OS.

As expected, all parameters related to MetS were significantly altered in the MetS group in relation to the control group. TC/HDL-C and LDL-C/HDL-C indexes, which represent atherogenic risk factors similar to increased apolipoprotein-B levels (15), were also significantly higher in the MetS group.

It has been proposed that elevation of liver enzymes including ALT, AST and GGT may be associated with insulin resistance (IR) which is a central feature in the pathogenesis of MetS and type 2 diabetes, predicting the development of diabetes in prospective studies (16). In addition, the increase of serum GGT may predict the beginning of the MetS and the incidence of cardiovascular disease (17). Kang et al. (18) showed that GGT is strongly related to insulin resistance (HOMA) and to the number of altered components of the MetS, being influenced namely by serum triacylglycerol and glucose levels. On the other hand, increased GGT levels may be considered an important mechanism of oxidative stress. A previous study (19) has verified that, in MetS patients, GGT may generate reactive oxygen species, which could exceed the capacity of the antioxidant system and induce cellular oxidative stress damage. Our group previously demonstrated that patients with MetS showed increased oxidative stress, verified by elevated levels of serum hydroperoxides and GGT (20). These findings were not evidenced in our study, considering that GGT wasn't associated with OS biomarkers in patients who had higher GGT activity (Table 3).

AOPP and TRAP levels were respectively higher and lower in MetS group, showing an imbalance between oxidative/antioxidative systems. Our study used an additional marker of OS, AOPP/TRAP index, which indicates the oxidant-antioxidant

ratio, as a reflection of the cellular redox state in the MetS. This index showed that MetS patients presented higher oxidative and lower antioxidant capacity. A recent report (21) investigated the relationship between AOPP levels, total antioxidant capacity (TAC) and pro-oxidant-antioxidant balance (PAB) in 55 MetS patients. AOPP and PAB were significantly higher in patients with MetS than in control subjects and a positive correlation were observed between the AOPP levels and glucose, TG, insulin and HOMA-IR levels. Catakay (22) reported that patients with type 2 diabetes exhibit elevated AOPP levels and that this can be correlated with glycemia and glicemic control. Similarly to those previous studies, the present study also showed a positive association between AOPP levels and fasting glucose, HOMA-IR TG, uric acid, and negative association with HDL-C levels.

Our group conducted a previous study, which showed that hypertriacylglycerolemia, hyperglycemia, hypertension, and lower HDL cholesterol values are essential factors to evoke oxidative stress and then, it is conceivable to assume that in MetS patients a redox imbalance, characterized by increased plasma oxidation and reduced antioxidant capacity, may contribute to a worsening of the clinical picture (10).

Serum CRP levels, a marker of chronic low-grade inflammation, is known to be a sensitive predictor of CVD and is related to MetS components. In the current study CRP levels were higher in the MetS group compared to control group and were positively associated with AOPP and FOX levels. AOPP are formed during OS by the action of chloraminated oxidants, mainly hypochlorous acid and chloramines, produced by myeloperoxidase in activated neutrophils. They are defined as dityrosine-containing cross-linked proteins products and are considered as reliable markers to estimate the degree of oxidative modifications of proteins (12, 22). Kaneda et al. (23) suggested that

AOPP is an independent risk factor for coronary artery disease. Piwowar et al evaluated the components of the oxidative/antioxidative status in 94 patients with type 2 diabetes and demonstrated that AOPP enhanced progressively with the increase of fat mass assessed by BMI (24). Additionally, Zhou et al (25) identified that accumulation of AOPP might be involved in adipocytes dysfunction as seen in metabolic syndrome and type 2 diabetes. Inflammation has been recognized as the link between obesity, insulin resistance and type 2 diabetes and accumulation of AOPPs has been observed in these conditions (25).

On the other hand, the ferrous oxidation in xylenol orange (FOX) assay is based on different assumptions, and oxidation of ferrous ions to ferric ions by lipid hydroperoxides (ROOH) under acidic conditions has been employed to determine whole plasma lipid ROOH (26). So far, this methodology has been used by our group to evaluate lipid ROOH in MetS patients (10). In the present study, FOX levels were associated with obesity and inflammation, indicated by BMI and CRP, respectively.

In the current study, total antioxidant capacity was measured by TRAP methodology, a method in which hydrosoluble and/or liposoluble plasma antioxidants are detected by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by 2,2 azobis (2-amidinopropane). Uric acid is an important antioxidant, being responsible for 60% of the scavenging of the free radicals in human plasma and could influence all above cited tests. The potential confounding effects of uric acid indicate that those methodologies should be accompanied by the measure of plasma uric concentration (20). In the present study, uric acid levels were increased in the MetS group. Thus, a correction of total antioxidant capacity based on uric acid concentration was performed. TRAP corrected by uric acid levels was significantly lower in the MetS group and together with increased AOPP/TRAP index demonstrated that a disturbance between

oxidant/antioxidant occurs in this group in favor of oxidant system.

Elevated uric acid levels (hyperuricemia) has been significantly associated with the component numbers of MetS (27), and furthermore, the prevalence of MetS also increased significantly with uric acid levels (28). Importantly, hyperuricemia is strongly associated with endothelial dysfunction in humans, and it is reasonable to assume that uric acid may contribute to the severity of cardiovascular diseases by impairing NO production. Endothelial dysfunction is considered a hallmark in the pathophysiology of MetS, and it can be evaluated by several means, including the assessment of NO metabolite levels (29). Nakagawa et al. (30) hypothesized a causal role of uric acid in fructose-induced metabolic syndrome showing that uric acid dose dependently blocked acetylcholine mediated arterial dilatation, suggesting that uric acid can impair endothelial function. In this present study, uric acid levels were positively correlated with NO metabolites and a plausible explanation is that the synthesis of NO is given by inducible NO synthase (iNOS) expression by inflammatory and oxidative stress stimulus (31). While the antioxidant effects of uric acid can protect endothelial cells from OS, most studies show that the entry of uric acid into cells is associated with a reduction in endothelial NO synthase bioavailability (32). Although endothelial dysfunction has been considered an important issue in patients with MetS, the results of studies on serum NO metabolite levels in patients with MetS have been contradictory (33,34). Sun et al. (33) showed that NO metabolite levels were reduced in MetS. However, Asl et al. (34) showed higher NO metabolite concentration in subjects with MetS and type 2 diabetes.

The current study has several limitations to consider. First, the group sizes are small and this cross-sectional study could not determine causality between metabolic abnormalities and OS. Larger, prospective studies are needed to establish the

relationship between MetS components and OS. Second, this study examines the redox state by measuring plasma concentrations but does not evaluate the effects on various tissues involved. However, the findings obtained via plasma concentrations could reflect what is occurring in different body tissues.

In conclusion, AOPP, and TRAP/uric acid may be considered useful markers to estimate the degree of oxidant-antioxidant redox in MetS patients. The positive correlation verified between uric acid and nitric oxide reinforces the importance of uric acid as a marker of endothelial dysfunction. At last, this study also provides evidence that hypertriglycerolemia, hyperglycemia and HOMA-IR, low levels of HDL-C, inflammation and high levels of uric acid are closely linked to elevated systemic oxidative stress shown especially by AOPP, but also in some degree by FOX, in MetS patients.

Disclosure

The authors declare that they do not have any conflict of interest

5. References

1. Gami AS, Witt BJ, Howard DE, et al. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J. Am Coll Cardiol* 2007;49:403-14.
2. Heber D. An integrative view of obesity. *Am J Clin Nutr* 2010;91 (suppl):2880S-3S.
3. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci* 2009;84:705-12.
4. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-

- 1761.
5. Hopps E, Noto D, Caimi G, Averna MR. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutr, Met & Cardiovasc Dis* 2010;20:72-77.
 6. Cakatay U, Kayali R, Uzun H. Relation of plasma protein oxidation parameters and paraoxonase activity in the ageing population. *Clin Exp Med* 2008;8:51-7.
 7. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation* 2005;112(17):2735–2752.
 8. Haffner SM. Insulin resistance, inflammation and the prediabetic state. *Am J Cardiol* 2003;92:18-26J.
 9. González-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med*. 1991;10:93-100.
 10. Venturini D, Simão AN, Scripes NA, et al. Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 2012;20:2361-6.
 11. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff S. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Analyt Biochem*, v.220, p.403-409, 1994.
 12. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996;49(5):1304-13.
 13. Repetto M, Reides C, Carretero MLG, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta*. 1996; 255: 107-117.

14. Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kieć A, et al. (1998) Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 274, 177–188.
15. Liem AH, van de Woestijne AP, Roeters van Lennep HW, Zwinderman AH, van der Steeg WA, Jukema JW. ApoB/A1 and LDL-C/HDL-C and the prediction of cardiovascular risk in statin-treated patients. *Curr Med Res Opin* 2008 Feb;24(2):359-64.
16. Zhang Y, Lu X, Hong J, Chao M, Gu W, Wang W, Ning G. Positive correlations of liver enzymes with metabolic syndrome including insulin resistance in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Endocrine* 2010 Oct;38(2):181-7.
17. Lee DS, Evans JC, Robins SJ, Wilson PW, Albano I, Fox CS, et al. Gamma glutamyltransferase and metabolic syndrome, cardiovascular disease, and mortality risk. The Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:127–33.
18. Kang YH, Min HK, Son SM, Kim IJ, Kim YK. The association of serum gamma glutamyltransferase with components of the metabolic syndrome in the Korean adults. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77:306–1332.
19. Lee DH, Blomhoff R, Jacobs Jr DR. Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radic Res* 2004;38:535–9.
20. Simão ANC, Dichi JB, Barbosa DS, Cecchini R, Dichi I. Influence of uric acid and gammalutamytransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *Nutrition* 2008;24:675–681.
21. Korkmaz GG, Altinoglu E, Civelek S, Sozer V, Erdenen F, Tabak O, Uzun H. The association of oxidative stress markers with conventional risk factors in the metabolic syndrome. *Metabolism* 2013;

<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2013.01.002>

22. Catakay U. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab* 2005;31:551-7.
23. Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, Aizawa T, Ohno M. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2002;162:221-225.
24. Piwowar A, Knapik-Kordecka M, Warwas M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice* 2007;77:188-192.
25. Zhou QG, Zhou M, Lou AJ, Xie D, Hou FF. Advanced oxidation protein products induce inflammatory response and insulin resistance in cultured adipocytes via induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Physiol Biochem* 2010;26:775-786.
26. Eva Södergren, Jaffar Nourooz-Zadeh, Lars Berglund, Bengt Vessby. Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. *J. Biochem. Biophys. Methods* 37 (1998) 137–146.
27. Li Q, Yang Z, Lu B, et al. Serum uric acid level and its association with metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in patients with type2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2011;10:72.
28. Rodrigues SL, Baldo MP, Cappingana P et al. Gender distribution of serum uric acid and cardiovascular risk factors: population based study. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2012;98:13-21.
29. Williams IL, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanism of reduced nitric oxide bioavailability

- in obese human. *Int J Obes* 2002;26:754-64.
30. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM, Johnson RJ. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006;290:625-631.
31. Simão ANC, Lovozoy MAB, Dichi I. The uric acid metabolism pathway as a therapeutic target in hyperuricemia related to metabolic syndrome. *Expert Opin Ther Target* 2012;16:1175-87.
32. Schwartz IF, Grupper A, Chernichovski T et al. Hyperuricemia attenuates aortic nitric oxide generation, though inhibition of arginine transport, in rats. *J Vas Res* 2011;48:252-60.
33. Sun YX, Hu SJ, Zhang XH, Sun J, Zhu CH, Zhang ZJ. Plasma levels of vWF and NO in patients with metabolic syndrome and their relationship with metabolic disorders. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2006;35:315-8.
34. Asl SZ, Ghasemi A, Azizi F. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. *Clin Biochem*. 2008;41:1342-7.

Table 1: Demographic and biochemical values of metabolic syndrome patients and controls

	MetS group (n:76)	Control group (n: 20)	P
Age (media \pm SD)	49.8 \pm 9.09	48.0 \pm 4.4	NS
Sex (male/female)	15/61	1/19	NS
Etnics (caucasian/not caucasian)	60/16	13/7	NS
Smoking/not smoking	7/69	4/16	NS
Alcohol intake	4/72	1/19	NS
Anti-hypertensive Yes/no	46/30	0/20	<0.0001
ACE	27 (58.7%)		
β blockers	16 (34.8%)		
Diuretics	24 (52.2%)		
Angiotensin II receptor antagonists	5 (10.8%)		
CCB	3 (6.5%)		
BMI (mean \pm SD)	36.82 \pm 6.85	23.07 \pm 1,65	<0.0001
WC (cm)	114.32 \pm 13.92	86.22 \pm 6.13	<0.0001
WHR	0.95 \pm 0.08	1.39 \pm 2.08	0.096
SBP (mmHg)	130.23 \pm 19.14	108.4 \pm 16.51	<0.0001
DBP (mmHg)	80.66 \pm 16.51	71.90 \pm 9.10	0.0254
Creatinine (mg/dL)	0.75 \pm 0.25	0.70 \pm 0.11	0.8117
Triacylglycerol (mg/dL)	186.63 \pm 108.26	89.76 \pm 27.57	0.0005
TC (mg/dL)	204.94 \pm 45.87	202.17 \pm 30.78	0.8143
HDL-C (mg/dL)	46.58 \pm 8.27	62.88 \pm 8.89	<0.0001
LDL-C (mg/dL)	122.90 \pm 44.32	108.53 \pm 47.46	0.2236
TC/HDL-C ratio	4.48 \pm 1.08	3.27 \pm 0.63	<0.0001
LDL-C/HDL-C ratio	2.65 \pm 0.94	1.97 \pm 0.57	0.0062
Fasting glucose (mg/dL)	126.51 \pm 62.99	87.19 \pm 7.58	0.0151
Fasting insulin (mg/dL)	15.77 \pm 10.69	6.59 \pm 2.37	0.0012
HOMA-IR	5.36 \pm 4.04	1.44 \pm 0.58	0.0003
AST (U/L)	27.13 \pm 9.44	17.94 \pm 4.13	0.0002
ALT (U/L)	41.86 \pm 21.01	32.82 \pm 5.69	0.0837
GGT (U/L)	61.36 \pm 67.33	24.53 \pm 12.02	0.0279
CRP (mg/dL)	7.73 \pm 6.62	1.74 \pm 1.26	0.0004
Uric acid (mg/dL)	5.23 \pm 1.37	3.74 \pm 1.02	0.0001

Mann-Whitney test. Data are mean \pm SD or (percentage)

SD: standard deviation, ACE: angiotensin-converting enzyme. CCB: calcium channel blocker, BMI: body mass index, MetS: metabolic syndrome, WC: waist circumference, WHR: waist-hip-ratio, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, TC: total cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein- cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein- cholesterol, HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment-Insulin resistance, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, GGT: gamma-glutamyl transpeptidase, CRP: C-reactive protein.

Table 2: Oxidative stress parameters of MetS and control groups

OS parameters	MetS group n: 76	Control group n: 20	P
Hydroperoxides (cpm)	17664 (7542-56972)	13968 (3239-31538)	0.1478
AOPP (umol/L)	184.23 (79.35-545.55)	159.54 (90.37-217.24)	0.0084
FOX (mM)	1.38 (0.36-3.23)	1.38 (0.74-1.67)	0.2472
TRAP/uric acid (uM of Trolox) index	155.48 (97.34-479.77)	181.48 (121.05-330.87)	0.0481
AOPP/TRAP index	1.32 (0.21-4.33)	0.80 (0.30-1.46)	0.0020

Mann-Whitney test. Data are median and interquartiles (25-75)

OS: oxidative stress, MetS: metabolic syndrome, AOPP: Advanced oxidation protein products, FOX: Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Assay, TRAP: Total radical trapping antioxidant parameter.

Table 3: Relationship between MetS components with oxidative stress biomarkers.

	AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	FOX (mM)	NO ($\mu\text{mol/L}$)	TRAP/uric acid index
Hypertension				
No (30)	213.0 (135.3-312.9)	1.44 (1.14-1.90)	4.55 (3.41-5.89)	145.3 (118.0-172.9)
Yes (46)	184.0 (126.9-279.2)	1.38 (1.10-1.86)	4.79 (3.71-6.03)	160.4 (134.8-178.3)
BMI ≥ 30				
No (12)	169.0 (120.6-284.6)	1.185 (0.858-1.508)	4.97 (4.04-6.40)	154.7 (125.1-172.2)
Yes (64)	202.7 (132.8-282.1)	1.440 1.155-1.960*	4.70 (3.56-5.79)	158.9 (134.7-179.3)
Fasting glucose $\geq 100\text{mg/dL}$				
No (27)	157.2 (125.7-227.5)	1.37 (1.14-1.86)	3.96 (3.08-4.92)	173.8 (148.3-186.7)
Yes (49)	222.2 (151.5-323.3)*	1.42 (1.10-2.01)	4.84 (3.73-6.49)	151.0 (128.9-169.0)*
HDL-C $\leq 40\text{mg/dL}$ or 50mg/dL				
No (32)	156.8 (123.1-242.5)*	1.310 (1.140-1.990)	4.33 (3.30-6.03)	151.8 (135.6-187.1)
Yes (44)	226.6 (141.2-337.6)	1.430 (1.153-1.857)	4.83 (3.81-6.21)	160.4 (129.4-176.3)
Triacylglycerol $\geq 150\text{mg/dL}$				
No (31)	132.8 (103.9-182.0)	1.312 (1.070-1.748)	4.61 (3.43-5.21)	170.0 (141.2-191.4)
Yes (45)	241.7 (168.9-350.4)**	1.450 (1.145-1.960)	4.77 (3.69-6.49)	151.0 (128.3-166.0)*
CRP $\geq 3.0\text{mg/dL}$				
No (23)	156.8 (125.7-222.8)	1.254 (0.750-1.517)	4.11 (3.16-6.20)	148.6 (132.0-175.7)
Yes (53)	224.4 (137.8-315.9)*	1.460 (1.177-2.005)*	4.83 (3.72-6.10)	155.6 (134.9-182.5)
Uric acid $\geq 4.5\text{mg/dL}$				
No (23)	137.8 (106.6-226.1)	1.569 (1.092-1.903)	3.71 (3.24-4.95)	186.4 (175.4-203.1)
Yes (53)	222.1 (155.4-296.7)*	1.375 (1.148-1.878)	4.80 (3.77-6.49)*	148.3 (128.3-165.9)**
GGT $> 55\text{ U/L}$				
No (58)	184.30 (96.6-421.91)	1.46 (0.73-2.67)	4.98 (2.38-11.09)	141.82 (117.45-245.07)
Yes (18)	182.68 (79.35-545.55)	1.32 (0.36-3.23)	4.70 (0.64-11.88)	162.53 (97.34-479.77)
HOMA-IR > 2.5				
No (8)	151.58 (103.83-260.85)	1.74 (0.94-2.02)	3.93 (3.46-6.13)	181.63 (161.89-479.77)
Yes (68)	244.53 (80.61-545.55)*	1.51 (0.36-3.23)	4.87 (0.64-11.09)	154.95 (97.34-245.07)**

Mann-Whitney test. Data are median and interquartiles (25-75). Patients n: 76. AOPP: Advanced oxidation protein products, FOX: Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Assay, NO: Nitric oxide, TRAP: Total radical trapping antioxidant parameter, BMI: Body mass index, HDL-C: High density lipoprotein, CRP: C-reactive protein, GGT: gamma-glutamyl transpeptidase, HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment-Insulin resistance. * $p < 0.05$ ** $p < 0.0001$

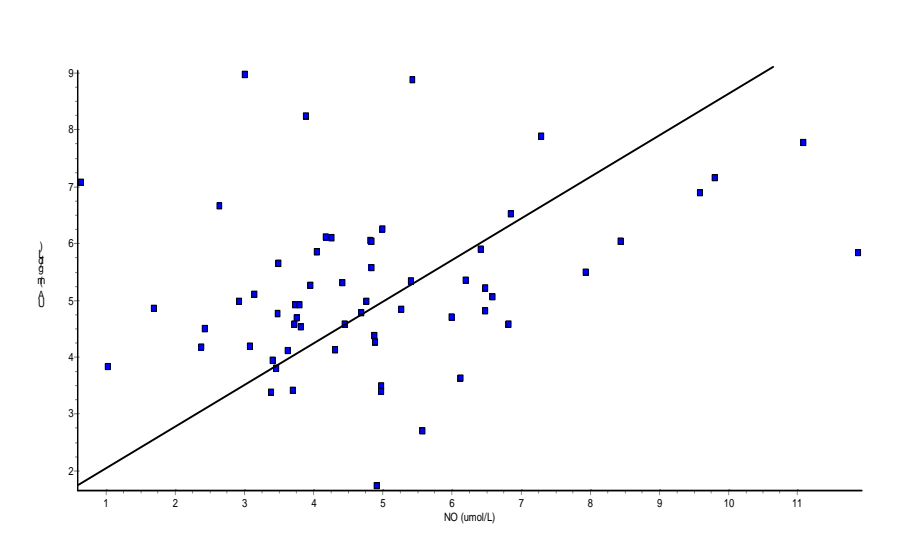


Fig. 1: Spearman's correlation between nitric oxide (NO) and uric acid (UA) serum concentrations in metabolic syndrome patients ($r= 0.2760$; $p = 0.0313$).

ARTICLE 2: Title: Synergistic Effects of Olive oil and Fish Oil on Lipid Profile and Oxidative Stress in Patients with Metabolic Syndrome

Running title: Olive oil and fish oil in metabolic syndrome

Danielle Venturini¹, Andréa Name Colado Simão¹, Mariana Ragassi Urbano² Isaias Dichi³,

¹ Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology - University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

² Department of Statistical - University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

³ Department of Internal Medicine - University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

Corresponding author: Isaias Dichi, PhD. Department of Internal Medicine. Robert Koch Avenue n° 60 Bairro Cervejaria, University of Londrina. Londrina, Paraná, Brazil.

CEP: 86038-440 Tel: (55) 43 3371 ---- E-mail: dichi@sercomtel.com.br

Key Words: metabolic syndrome, olive oil, fish oil, lipid profile, oxidative stress.

Abstract

Abstract

The hypothesis tested was that extra-virgin olive oil and fish oil would have a synergistic action on several parameters related to metabolic syndrome (MetS). One hundred and two patients (81 female and 21 male) with MetS (aged 51.45 years) from the ambulatory of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil participated in this interventional study. A control group (CG) maintained their usual diet; the fish oil group (FO) received 3 g/d of fish oil n-3 fatty acids originated from sardines; the olive oil group (OO) received 10mL/d of extra-virgin olive oil, and the fish and olive oil group (FOO) received 3 g/d of fish oil and 10mL/d of extra-virgin olive oil. Assessments were performed at baseline and after 90 days. In relation to baseline values, there was a significant decrease in FOO in LDL-C ($p<0.05$), and TC/HDL-C ($p<0.05$) and LDL-C/HDL-C ($p<0.05$) indexes after 90 days and differences across treatment groups showed a statistically significant decrease in TC ($p<0.05$) and LDL-C ($p<0.05$) when FOO was compared with CG and OO, respectively. In relation to baseline values, there was a decrease in hydroperoxides ($p<0.05$), in advanced oxidation protein products (AOPP) ($p<0.05$) and in AOPP/ total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) index ($p<0.05$) in FOO, and an increase in TRAP/uric acid ratio in OO ($p<0.05$) and in TRAP/AOPP index ($p<0.05$) in FOO after 90 days. The present study provides evidence that increased dietary n-3 PUFA and extra-virgin olive oil have beneficial synergistic effects on lipid metabolism and oxidative stress in MetS patients.

Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is a multi-component disorder characterized by hypertriglyceridemia, low HDL-cholesterol, hyperglycemia, abdominal obesity, and is closely linked to cardiovascular (CV) disease and type 2 diabetes mellitus [1]. MetS patients have higher oxidative damage, caused by an imbalance between reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) production and antioxidant defenses [2]. Several studies have reported that a Mediterranean dietary pattern, in which olive oil is the main source of fat, is associated with a decrease in CV and overall mortality [3-5]. Olive oil is rich in MUFA and antioxidant compounds, mainly phenolic compounds, and is capable to reduce one or more risk factors of MetS [6]. In addition, an Italian study showed that regular consumption of olive oil, compared with no or infrequent consumption, significantly reduce mortality risk by 24% in men and women with previous myocardial infarction. [7].

The proposed mechanisms by which virgin olive oil can exert its beneficial effects on cardiovascular risk include improvement of lipid profile, through a decrease in total and LDL-C and an increase of the HDL-total cholesterol ratio [8-11], reduction of LDL-C susceptibility to oxidation and amelioration of oxidative vascular damage [10,12], and improved endothelial function and blood pressure [12,13].

Another intervention that may reduce CV risk in patients with MetS is increasing the relative abundance of omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids (PUFA) namely eicosapentaenoic acid (EPA) and docosaexaenoic acid (DHA) in the diet [14]. Several studies have suggested that fish or dietary n-3 PUFA intake may have beneficial effects on the prevalence of MetS [15] and on its individual components [16].

The treatment of dyslipidemia is a cornerstone in the prevention of CV diseases, and clinical trials have consistently demonstrated that a reduction in LDL-C levels is of

primary importance in risk reduction. Epidemiological studies, which have been focused on fatty acids dietary consumption, have shown contradictory results for PUFA. Some studies have reported a reduction in total cholesterol (TC) and LDL-C concentrations [17,18]. Conversely, others have shown no change in TC or a slight increase in LDL-C [19]. Meantime, the more consistent result using fish oil is the decrease in triacylglycerol levels [20].

Olive oil may act synergistically with fish oil by increasing the incorporation of n-3 fatty acids in cell membranes [21,22]. In a previous study, we verified that association of fish oil and olive oil had more beneficial effects than isolated use of fish oil in patients with rheumatoid arthritis [23]. Our main assumption was that olive oil and fish oil would have a synergistic action on several parameters of metabolic syndrome, which could be even superior to the expected benefit with the use of one isolated oil.

Because several features of the MetS are associated with enhanced lipoproteins levels and oxidative stress markers, it is relevant to investigate if these markers can be lowered by altering dietary fat intake, especially by MUFA and PUFA. While previous researchers have focused their studies on the effect of olive or fish oil on the incidence and prevention of metabolic syndrome, the aim of present study is to investigate the effects of olive and fish oil on CV risk factors and oxidative stress in MetS patients.

Methods and Materials

Participants

One hundred and two patients (81 female and 21 male) with MetS (aged 51.45 ± 8.27 years) from the ambulatory patients of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil participated in this interventional study. Their motivation was related to the

intake of a non-pharmacological therapy that was practically without side effects. The exclusion criteria were thyroid, renal, hepatic, gastrointestinal or oncological diseases and utilization of lipid-lowering drugs, estrogens replacement therapy, drugs for hyperglycemia, and intake of fish oil supplements. Patients who were taking antihypertensive drugs were not excluded and were allowed to continue taking the same dose of the drugs. None of the subjects followed a specific diet before the study began. The patients were instructed not to change their usual diets, alcohol intake, level of physical activity or other lifestyle factors throughout the intervention period. This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human patients were approved by the Ethical Committee of the University of Londrina, Paraná, Brazil (study protocol CEP 258/08). Written informed consent was obtained from all patients. Anthropometric measurements, oxidative stress and biochemical parameters were assessed at the beginning of the study and after 90 days. MetS was defined following the Adult Treatment Panel III (ATP III) criteria [24]. When three of five of the listed characteristics were verified, a diagnosis of MetS was performed 1) Abdominal obesity: waist circumference ≥ 102 cm in men and ≥ 88 cm in women; 2) Hypertriglyceridemia ≥ 150 mg/dl (1.695 mmol/L); 3) Low levels of HDL cholesterol: ≤ 40 mg/dl (1.036mmol/l) in men and ≤ 50 mg/dl (1.295 mmol/l) in women; 4) High blood pressure: $\geq 130/85$ mmHg; 5) High fasting glucose: ≥ 110 mg/dl.

Experimental protocol

Before beginning the study, the patients were followed up on a regular basis. Patients were randomly assigned to one of four groups: The first group (control group-CG, n 42) was only instructed to maintain its usual diet; the second group (fish oil group-FO, n 21) received 3 g/d of fish oil n-3 fatty acids (ten capsules); the third group

(olive oil group-OO, n 13) received 10mL/d of extra-virgin olive oil at lunch and dinner and the fourth group (fish oil and olive oil group-FOO, n 26) received 3 g/d of fish oil n-3 fatty acids and 10mL/d of extra-virgin olive oil. Each fish oil capsule contained 180 mg of EPA and 120 mg of DHA originated from sardines. The capsules were given at breakfast, lunch and dinner. Fish oil capsules were provided by Opção Fenix manufacturers of pharmaceutical products, São Paulo, Brazil. The subjects were recommended to refrain from resting after meals to avoid unpleasant effects. All the groups were evaluated at the beginning of the study and after 90 days.

Steps taken to optimize compliance

Before each trial began, it was ensured that the patients understood that they could be allocated to any group. Boxes of fish oil capsules were handed out at the initial interview and at the two later visits. The subjects were asked to return the boxes at each visit so that the number of capsules taken could be estimated by questioning the patients and counting the remaining capsules. Olive oil compliance was measured by questioning the patients, counting the olive oil bottles consumed and the quantity, which remained in the bottle when patients returned for their clinical and nutritional evaluation.

Anthropometric and Blood Pressure Measurements

Height and weight were measured in the morning with subjects wearing light clothing, but no shoes. After 5 minutes of rest, each subject had his/her blood pressure measured on the left arm with the subject in a sitting position. We considered the current use of antihypertensive medication as an indication of high blood pressure. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared.

Waist circumference was measured at the umbilical level with the subjects standing after normal expiration and the hip girth was measured at the widest part of the hip and, the waist and hip ratio (WHR) was calculated.

Biochemical and Inflammatory Biomarkers Measurements

After fasting for 12 hours, the subjects underwent the following laboratory blood analysis: glucose, total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triacylglycerol (TG), uric acid, which were evaluated by a biochemical auto-analyzer (Dimension Dade AR, Dade Behring, Deerfield, IL, USA), using Dade Behring® kits. Plasma insulin levels were determined by MEIA (AXSYM, ABBOTT® Laboratory). Serum highly sensitive C-reactive protein (CRP) was measured using a nephelometric assay (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Marburg, Germany). All samples were centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes, and plasma or serum aliquots were stored at -70°C until assayed. Interassay and intraassay CVs for all assays were <10% as determined in human serum.

The Homeostasis Model Assessment insulin resistance (HOMA-IR) was used as a surrogate measure of insulin sensitivity [25]. $HOMA-IR = \text{insulin fasting } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucose fasting (mmol/L)} / 22.5$.

Oxidative Stress Measurements

Samples for evaluating oxidative stress and total antioxidant capacity were performed with EDTA as anticoagulant and antioxidant. All samples were centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes and plasma aliquots stored at -70°C until assayed.

Analysis of plasma hydroperoxide concentrations by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH) assay in plasma was evaluated as described

previously by González-Flecha et al. [26] and reported previously by our group [27]. The results are expressed in counts per minute (cpm).

Determination of Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) was determined in the plasma using the semiautomated method described by Witko-Sarsat et al. [28]. AOPP concentrations were expressed as micromoles per liter ($\mu\text{mol/L}$) of chloramines-T equivalents.

Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) was determined as reported by Repetto et al. [29]. This method detects hydrosoluble and/or liposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by 2,2-azobis (2-amidinopropane). The system was calibrated with the vitamin E analog TROLOX, and the values of TRAP are expressed in equivalent of μM Trolox.

Statistical Analysis

The Wilcoxon matched pairs test was performed to verify changes from baseline (intra-group changes). Kruskal-Wallis with post hoc Dunn's test was performed to verify differences across treatment groups (inter-group changes). ANOVA with post hoc Tukey's was performed to compare differences between the groups at baseline. Data are presented as the mean (\pm SD) or median and interquartile range (25%-75%). Significance was set at $p\text{-value} < 0.05$. The statistical analysis program R was used for evaluations.

Results

One hundred and twenty eight patients entered the study and 102 completed the intervention. Twenty-six participants did not return for the second clinical visit, ten from the CG, ten from the FO, and six from the FOO. All patients from OO returned after 90d. According to self-reports, each subject's lifestyle was unchanged throughout

the study. In all groups, subjects did not drink alcohol regularly.

Despite their known influence on lipid and glucose metabolism, we could not ask the patients to stop using antihypertensive medication (diuretics and β blockers) during the study because their medical necessity, but there was no statistically significant difference between groups when they were compared.

No significant differences were found at the baseline characteristics between the four groups of MetS patients assigned to each diet in the intervention study (Table 1). With regard to clinical and anthropometric parameters, no intra-group changes were observed, whereas there was a reduction in WC ($p<0.05$) in OO compared to FO after 90 d intervention (Table 2).

There was a significant decrease in FOO in LDL-C ($p<0.05$), and TC/HDL-C ($p<0.05$) and LDL-C/HDL-C ($p<0.05$) indexes after 90d when compared to baseline values (Table 3). Differences across treatment groups showed a statistically significant decrease in TC ($p<0.05$) and LDL-C ($p<0.05$) when FOO was compared with CG and OO, respectively (Table 3).

With respect to OS, there was a decrease in AOPP in CG ($p<0.05$), and in hydroperoxides ($p<0.05$), AOPP ($p<0.05$) and AOPP/TRAP index ($p<0.05$) in FOO after 90d when compared to baseline values, whereas an increase was verified in TRAP/uric acid ratio in OO ($p<0.05$) and in TRAP/AOPP index ($p<0.05$) in FOO after 90d when compared to baseline values (Table 4).

Differences across treatment groups showed a statistically significant decrease in hydroperoxides ($p<0.05$) when FOO was compared with CG, whereas there was an increase in TRAP/AOPP ($p<0.05$) in FOO when compared to FO (Table 4).

Discussion

The main findings of the present study were that extra-virgin olive oil given concomitantly with fish oil improved lipid metabolism, decreased prooxidant state and increased antioxidant defenses. Of note, olive oil alone decreased abdominal adiposity when compared to fish oil and improved antioxidant defenses when compared to the control group.

Another important result observed in this study was the decrease in LDL-C levels, TC/HDL-C and LDL-C/HDL-C indexes, which represent atherogenic risk factors similar to increased apolipoprotein-B levels [30], after 90 days of supplementation with fish oil and olive oil. Regarding TC and LDL-C, randomized controlled trials supplementing fish oil to MetS patients have shown conflicting results [31,32]. Our group has recently verified an increase in TC and LDL-C levels when high fish oil doses (3g/d) were used for 3 months and that soy based derived product (kinako) attenuated this undesirable effect [33]. A large-scale clinical trial showed that 1.8g g/d EPA did not affect TC, LDL-C or HDL-C, but significantly reduced TG in 14981 patients for a period of 5 years [32].

The most consistent finding in lipid profile when fish oil n-3 fatty acids are used in doses of 2-4 g is a lowering of triglycerides concentration [34]. Of note, fish oil n-3 fatty acids are recommended for prescription in patients with severe hypertriglycerolemia [33]. Perhaps, in the present study, this expected decrease was not observed because the baseline values verified in FO was much lower than in the other groups. Regarding glucose metabolism, although adverse effects on glucose metabolism have been reported when n-3 fatty acids were used in doses above 3g/day [33], concerns on this issue has decreased with meta-analysis and reviews showing no adverse effect on glycemic control [35] and substantial reduction in cardiac events [36]

in patients with diabetes mellitus. Meantime, in the present work, as in most supplementation studies with n-3 fatty acids, we found no significant effect on CRP levels [37,38]. Extra-virgin olive oil also showed no effects on glucose metabolism or CRP levels, but its main expected effects are on lipid profile and oxidative stress [39], which was only shown in the present study when extra-virgin olive oil was associated with fish oil ingestion.

Oxidative stress may play an important role in the etiology of various risk factors of metabolic syndrome-related manifestations, including atherosclerosis, hypertension, type 2 diabetes, adiposity, and insulin resistance [40]. The role of n-3 PUFAs in reducing oxidative damage and restoring free radical homeostasis is not completely understood. Although some studies suggest that EPA e DHA may reduce oxidative damage in humans and animals [41,42], others have suggested that supplementation with highly unsaturated n-3 PUFA can increase OS in both humans and animals [43-45]. However, there is considerable evidence that n-3 PUFAs have antioxidant rather than pro-oxidative effects [46]. One of the possible reasons to explain the decrease in prooxidant markers with fish oil is its role in decreasing inflammatory status, although CRP have not shown significantly decreased values in the present study after fish oil supplementation. However, advanced oxidation protein products (AOPP) may be a potential inducer of cellular inflammation *in vivo* under certain pathophysiological circumstances, and thus AOPP are not only markers of oxidative stress, but also act as inflammatory mediators [47]. Of note, in the present study, reduced AOPP levels were verified in FOO after 90 days.

The mechanisms by which extra-virgin olive oil can exert its protective antioxidant effect can be explained by the activity of polyphenols or by the combined protective effect of both polyphenols and MUFA content. Extra-virgin olive oil has

been shown to counteract both metal- and radical-dependent LDL oxidation, and to act as chain-breaking antioxidant for lipid peroxidation [48]. Besides their own antioxidant capacity, extra-virgin olive oil could protect the activity of other biological antioxidants such as vitamin E [49]. The PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea) study, a large parallel multicenter, randomized controlled trial, recently demonstrated that non-enzymatic antioxidant capacity measured by TRAP and ferric reducing antioxidant potential improved after Mediterranean diet supplemented with virgin olive oil and nuts [50]. The antioxidant effects of extra-virgin olive oil phenolic compounds have mainly been tested in patients with an enhanced oxidative stress status, such as MetS. Reported data suggest that supplementation with polyphenol-rich food may offer health benefits in young and middle-aged healthy population by increasing antioxidant capacity in plasma [51], modifying the lipid profile [52], preventing oxidative damage [53], or improving antioxidant enzyme function [54].

In the current study, OO showed a statistically significant increase in TRAP/uric acid ratio at end of study. In addition, FOO decreased OS prooxidant markers shown by hydroperoxides and AOPP levels and increased antioxidant defenses shown by TRAP/AOPP index. The use of TRAP has been proposed to explore the antioxidant capacity of plasma sample. TRAP evaluates the antioxidant capacity due to known and unknown antioxidants present in the sample as well as their mutual co-operation. In addition, the measure of TRAP in conditions associated with hyperuricemia, as is the case of MetS patients, may be jeopardized because uric acid concentration is responsible for 60% of plasmatic total antioxidant capacity and some reports have verified an unexpected increase in total antioxidant capacity in MetS patients [55]. Thus, a correction of total antioxidant capacity based on uric acid concentration is needed [56].

The current study has several limitations to consider. First, the small number of the subjects; second, although the patients were instructed not to change their usual diets or other lifestyle factors throughout the intervention period, those variables were not directly measured.

In relation to the consistency of our initial hypothesis, the present study seems to confirm the assumption that olive oil and fish oil have a synergistic action, which was more evident in changes verified in lipid profile and oxidative stress.

In conclusion, the present study provides evidence that increased dietary n-3 PUFA and extra-virgin olive oil have beneficial synergistic effects on lipid metabolism and oxidative stress in MetS patients.

Further studies are needed to determine the mechanisms underlying the effects of n-3 PUFAs and extra-virgin olive oil and to relate this topic to human health, so that novel preventive and therapeutic approaches for MetS can be developed.

Conflict of interest

The authors declare that there is no competing financial interest in relation to the work described.

References:

1. Eckel RH, Alberti KGMM, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2010;375:181-3.
2. Venturini D, Simão AN, Sripes NA, Bahls LD, Melo PAS, Belinetti FM, et al. Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 2012;20:2361-6.

3. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 2013;368:1279-90.
4. Kastorini CM, Milionis HJ, Esposito K, Giugliano D, Goudevenos GA, Panagiotakos DB. The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1299-313.
5. Buckland G, Agudo A, Travier N, María Huerta J, Cirera L, Tormo MJ, et al. Adherence to the Mediterranean diet reduces mortality in the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into cancer and nutrition *Br J Nutr* 2011;106(10):1581-91.
6. Minich DM, Bland JS. Dietary management of the metabolic syndrome beyond macronutrients. *Nutr Rev* 2008;66:429-44.
7. Barzi F, Woodward M, Marfisi RM, Tavazzi L, Valagussa F, Marchioli R. Mediterranean diet and all-causes mortality after myocardial infarction: results from the GISSI- Prevenzione trial. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:604-11.
8. Perez-Jimenez F, Ruano J, Perez-Martinez P, Lopez-Segura F, Lopez-Miranda J. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:1199-208.
9. Carluccio MA, Massaro M, Scoditti E, De Caterina R. Vasculoprotective potential of olive oil components. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:1225-34.
10. Estruch R, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, Salas-Salvado J, Ruiz-Gutierrez V, Covas MI, et al. Effects of a Mediterranean style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2006;145:1-11.
11. Vincent-Baudry S, Defoord C, Gerber M, Bernard MC, Verger P, Helal O, et al. The Medi-RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk after a 3-mo

- intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet. *Am J Clin Nutr* 2005;82:964-71.
12. Ruano J, Lopez-Miranda J, Fuentes F, Moreno JA, Bellido C, Perez-Martinez P, et al. Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1864-8.
 13. Bondia-Pons I, Schroder H, Covas MI, Castellote AL, Kaikkonen J, Poulsen HE, et al. Moderate consumption of olive oil by healthy European men reduces systolic blood pressure in non-Mediterranean participants. *J Nutr* 2007;137:84-7.
 14. Yashodhara BM, Umakanth S, Pappachan JM, Bhat SK, Kamath R, Choo BH. Omega-3 fatty acids: a comprehensive review of their role in health and disease. *Postgrad Med J* 2009;85:84-90.
 15. Ruidavets JB, Bongard V, Dallongeville J, Arveiler D, Ducimetière P, Perret B, et al. High consumptions of grain, fish, dairy products and combinations of these are associated with a low prevalence of metabolic syndrome. *J Epidemiol Community Health* 2007;61:810-7.
 16. Lara JJ, Economou M, Wallace AM, Rumley A, Lowe G, Slater C, et al. Benefits of salmon eating on traditional and novel vascular risk factors in young, non-obese healthy subjects. *Atherosclerosis* 2007;193:213-21.
 17. Mensik RP, Zock PL, Kester ADM, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1146-55.
 18. Harris WS, Mozaffarian D, Rimm E, Kris-Etherton, Rudel LL, Appel LJ, et al. Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease. A Science Advisory from the American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on

- Nutrition, Physical Activity, and Metabolism: Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2009;119:902-7.
19. Zuliani G, Galvani M, Leitersdorf E, Volpato S, Cavalieri M, Fellin R. The role of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the treatment of dyslipidemias. *Curr Pharmac Design* 2009;15:4087-93.
 20. Belalcazar LM, Reboussin DM, Haffner Sm, Reeves RS, Schwenke DC, Hoogeveen Rc, et al. Marine omega-3 fatty acid intake: associations with cardiometabolic risk and response to weight loss intervention in the Look AHEAD (Action for Health in Diabetes) study. *Diabetes Care* 2009;33:197-9.
 21. Crawford M, Galli C, Visioli F, Renaud S, Simopoulos AP, Spector AA. Role of plant-derived omega-3 fatty acids in human nutrition. *Ann Nutr Metab* 2000;44:263-5.
 22. Mangas-Cruz MA, Fernandez-Moyano A, Albi T, Guinda A, Relimpio F, Lanzón A, et al. Effects of minor constituents (non-glyceride compounds) of virgin oil in plasma lipid concentrations in male Wistar rats. *Clin Nutr* 2001;20:211-5.
 23. Berbert AA, Kondo CRM, Almendra CL, Matsuo T, Dichi I. Supplementation of fish oil and olive oil in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition* 2005;21:131-6.
 24. Jacobs DR Jr. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and high blood cholesterol in adults (Adults Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
 25. Haffner SM. Insulin resistance, inflammation and the prediabetic state. *Am J*

- Cardiol 2003;92:18-26J
26. Flecha BG, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 1991;10:93-100.
 27. Simão ANC, Dichi JB, Barbosa DS, Cecchini R, Dichi I. Influence of uric acid and gammaglutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *Nutrition* 2008;24:675–81.
 28. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49:1304-13.
 29. Repetto M, Reides C, Carretero MLG, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 1996; 255: 107-17.
 30. Liem AH, van de Woestijne AP, Roeters van Lennep HW, Zwinderman AH, van der Steeg WA, Jukema JW. ApoB/A1 and LDL-C/HDL-C and the prediction of cardiovascular risk in statin-treated patients. *Curr Med Res Opin* 2008;24:359-64.
 31. Simão AN, Godeny P, Lozovoy MA, Dichi JB, Dichi I. Effect of n-3 fatty acids in glycemic and lipid profiles, oxidative stress and total antioxidant capacity in patients with metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2010;54:463-9.
 32. Saito Y, Yokoyama M, Origasa H, Matsusaki M, Matsuzawa Y, Ishikawa Y, et al. JELIS investigators Japan. Effects of EPA on coronary artery disease in hypercholesterolemic patients with multiple risk factors: sub-analysis of primary prevention cases from the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). *Atherosclerosis* 2008;200:135-40.

33. Simão ANC, Lozovoy MAB, Dichi I. Effect of soy product kinako and fish oil on serum lipids and glucose metabolism in women with metabolic syndrome. *Nutrition* (in press).
34. Saravanan P, Davidson NC, Schmidt E, Calder PC. Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. *Lancet* 2010;376:540-50.
35. De Caterina R, Madonna R, Bertolotto A, Schmidt EB. N-3 fatty acids in the treatment of diabetic patients: biological rationale and clinical data. *Diabetes Care* 2007;30:1012-26.
36. Oikawa S, Yokoyama M, Origasa H, Matsusaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, et al. For the Jelis Investigators, Japan. Suppressive effect of EPA on the incidence of coronary events in hypercholesterolemia with impaired glucose metabolism: sub-analysis of the Japan Lipid Intervention Study (JELIS). *Atherosclerosis* 2009;206:535-9.
37. Daamsgard CT, Frokiaer H, Andersen AD, Lauritzen L. Fish oil combination with high or low intakes of linoleic acid lowers plasma triacylglycerols but does not affect other cardiovascular risk markers in healthy men. *J Nutr* 2008;138:1061-6.
38. Simão ANC, Lovozoy MAB, Bahls LD, Morimoto HK, Simão TNC, Matsuo T, et al. Blood pressure decrease with ingestion of a soy product (kinako) or fish oil in women with metabolic syndrome: role of adiponectin and nitric oxide. *Br J Nutr* 2012;108:1435-42.
39. Covas MI, Nyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft, HJF, Kieseeweter H, et al. The effects of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors. A randomized trial. *Ann Intern Med* 2006;145:333-41.
40. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci* 2009;84:705-12.
41. Prasad K. Flaxseed and cardiovascular health. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;54:369-77.
42. Shi XY, Hou FF, Niu HX, Wang GB, Xie D, Guo ZM, et al. Advanced

- oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal adenine dinucleotide phosphase oxidase. *Endocrinology* 2008;149:1829-39.
43. McAnulty SR, Nieman DC, Fox-Rabinovich M, Duran V, McAnulty LS, Henson DA, et al. Effect of n-3 fatty acids and antioxidants on oxidative stress after exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2010;42:1704-11.
44. Melo JU, Santos JM, Kimura OS, Campos Júnior MM, Melo RB, Vasconcelos PRL. Effects of fatty acids on liver regeneration in rats. *Rev Col Bras Cir* 2010;37:351-7.
45. Al Gubory KH. Mitochondria: omega-3 in the route of mitochondrial reactive oxygen species. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:1569-73.
46. Crnkovic S, Riederer M, Lechleitner M, Hallström A, Malli R, Graier WF, et al. Docosahexaenoic acid-induced unfolded protein response, cell cycle arrest, and apoptosis in vascular smooth muscle cells are triggered by Ca²⁺-dependent induction of oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 2012;52:1786-95.
47. Schmidt S, Stahl F, Mutz KO, Scheper T, Hahn A, Schuchardt JP. Transcriptome-based identification of antioxidant gene expression after fish oil supplementation in normo- and dyslipidemic men. *Nutr Metab (Lond)* 2012;9(45):1-13
48. Fitó M, Covas MI, Lamuela-Raventós RM, Vila J, Torrents J, de la Torre C, et al. Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation. *Lipids* 2000;35:633-8.
49. Visioli F, Bellomo G, Mododoro G, Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 1995;117:25-32.
50. Zamora-Ros R, Serafini M, Estruch R, Lamuela-Raventós RM, Martínéz-

- González MA, Salas-Salvadó J, et al. Mediterranean diet and non enzymatic antioxidant capacity in the PREDIMED study: Evidence for a mechanism of antioxidant tuning. *Nutr, Metab & Cardiovasc Dis* 2013;1-8.
51. Samaniego-Sánchez C, Quesada-Granados JJ, Sánchez-Navarro MR, López-García de la Serrana H, López-Martínez . Antioxidant capacity of blood after extra-virgin olive oil intake in humans volunteers. *Olive and olive oil in health and disease prevention*, Amsterdam, Netherlands: Elsevier B.V. ISBN 978-0-12-374420-3.
52. Konstantinidou V, Covas MI, Munõz-Aguayo D, Khymenets O, de la Torre R, Saez G, et al. *In vivo* nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: A randomized controlled trial. *FASEB Journal* 2010;24:2546-57.
53. Castañer O, Covas MI, Khymenets O, Nyssonen K, Konstantinidou V, Zunft HF, et al. Protection of LDL from oxidation by olive oil polyphenols is associated with a down regulation of CD40-ligand expression and its downstream products *in vivo* in humans. *Am J Clin Nutr* 2012;95:1238-44.
54. Kesavulu MM, Rao BK, Giri R, Vijaya J, Subramanyam G, Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetes with coronary heart disease. *Diab Res Clin Pract* 2001;53:33-9.
55. Skalicky J, Muzakova V, Kandar R, Meloun M, Rousar T, Palicka V. Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46:499-505.
56. Simão AN, Lozovoy MA, Dichi I. The uric acid metabolism pathway as a therapeutic target in hyperuricemia related to metabolic syndrome. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(12):1175-87.

Table 1: Demographic and clinical aspects in patients with metabolic syndrome at the beginning of the study.

	CG (n: 42)	FO (n: 21)	OO (n: 13)	FOO (n: 26)
Age	51.7±8.2	52.8±7.8	51.9±7.4	49.5±9.4
Sex (female/ male)	33/9	18/3	8/5	22/4
Ethnicity (caucasian/not caucasian)	29/13	14/7	11/2	22/4
Smoking/not smoking	5/37	3/18	1/12	2/24
Alcohol intake yes/no	3/39	2/19	0/13	2/24
Anti-hypertensive Yes/no	25/17	12/9	8/5	16/10

Data are median±SD. Wilcoxon test was performed to verify changes from baseline. CG: control group; FO: fish oil group; OO: olive oil group; FOO: fish and olive oil group.

Table 2: Clinical and anthropometric parameters in patients with metabolic syndrome at the beginning and after 90 days of the study.

Variables	CG (n: 42)		FO (n: 21)		OO (n: 13)		FOO (n: 26)	
	baseline	90-d	baseline	90-d	Baseline	90-d	Baseline	90-d
BMI (kg/m ²)	37.70 (27.14-50.95)	35.60 (26.70-50.20)	32.66 (27.00-41.50)	32.90 (27.29-41.50)	32.50 (26.74-48.10)	32.68 (26.00-48.00)	33.19 (27.10-46.20)	32.58 (26.23-49.00)
WC (cm)	113.0 (88.0-153.0)	113.0 (88.0-140.0)	114.0 (104.0-127.0)	117.0 (103.0-128.0)	104.0 (88.0-129.0)	102.0 (80.0-126.0) ζ	107.0 (92.0-128.0)	106.50 (79.0-122.0)
WHR	0.96 (0.79-1.12)	0.94 (0.75-1.08)	0.93 (0.77-1.05)	0.92 (0.79-1.06)	0.97 (0.86-1.09)	0.94 (0.82-1.07)	0.92 (0.83-1.02)	0.92 (0.80-1.02)
SBP (mmHg)	125.0 (76.0-170.0)	129.0 (78.0-180.0)	130.0 (102.0-168.0)	128.0 (100.0-156.0)	130.0 (100.0-181.0)	125.0 (120.0-149.0)	125.0 (100.0-177.0)	129.0 (100.0-164.0)
DBP (mmHg)	79.0 (38.0-109.0)	75.0 (53.0-119.0)	73.0 (52.0-100.0)	80.0 (56.0-100.0)	84.0 (70.0-120.0)	70.0 (85.0-115.0)	76.0 (67.0-109.0)	82.0 (60.0-110.0)

Data are median and interquartiles (25%-75%). Wilcoxon test was performed to verify changes from baseline (intra-group changes). Kruskal-Wallis with post hoc Dunn's test was performed to verify differences across treatment groups (inter-group changes). CG: control group; FO: fish oil group; OO: olive oil group; FOO: fish and olive oil group. BMI: body mass index; WC: waist circumference; WHR: waist-hip-ratio; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure;

Inter-group changes:

ζ Percentage of change from baseline: FO versus OO ($p < 0.05$)

Table 3: Biochemical and inflammatory biomarkers in patients with metabolic syndrome at the beginning and after 90 days of the study

Variables	CG (n: 42)		FO (n: 21)		OO (n: 13)		FOO (n: 26)	
	Baseline	90-d	Baseline	90-d	Baseline	90-d	Baseline	90-d
Triacylglycerol (mg/dL)	192.0 (48.0-404.0)	150.0 (60.0-573.0)	118.0 (53.0-404.0)	123.0 (64.0-573.0)	191.0 (80.0-326.0)	157.0 (81.0-415.0)	144.50 (36.0-336.0)	104.0 (45.0-537.0)
TC (mg/dL)	207.0 (128.0-313.0)	212.0 (121.0-357.0)	209.0 (158.0-277.0)	212.0 (157.0-308.0)	216.0 (167.0-262.0)	204.0 (139.0-296.0)	211.50 (32.0-344.0)	190.50 (130.0-274.0) ‡‡
HDL-C (mg/dL)	46.0 (29.0-67.0)	47.0 (28.0-69.0)	45.0 (32.0-79.0)	47.0 (28.0-67.0)	45.0 (29.0-69.0)	43.0 (22.0-56.0)	46.50 (24.0-65.0)	46.50 (35.0-66.0)
LDL-C (mg/dL)	116.50 (50.0-229.0)	121.0 (58.0-175.0)	136.0 (98.0-203.0)	133.0 (84.0-235.0)	126.0 (77.0-166.0)	125.50 (58.0-215.0)	149.50 (79.0-269.0)	122.0 (71.0-193.0)* §
Fasting glucose (mg/dL)	102.0 (81.0-280.0)	102.0 (75.0-310.0)	101.0 (82.0-297.0)	103.0 (84.0-305.0)	93.0 (79.0-150.0)	86.0 (75.0-132.0)	99.50 (86.0-166.0)	98.50 (86.0-154.0)
Fasting insulin (mg/dL)	14.65 (4.00-28.30)	15.40 (5.70-32.30)	8.70 (3.50-30.0)	8.90 (3.50-16.80)	13.90 (2.80-31.40)	14.50 (2.20-58.0)	11.70 (4.0-23.0)	11.60 (6.20-28.70)
HOMA-IR	4.03 (0.99-11.65)	3.83 (1.30-17.53)	2.33 (0.27-14.30)	2.07 (0.78-12.65)	3.42 (0.23-8.68)	2.93 (0.52-11.89)	3.13 (1.59-6.03)	2.83 (1.39-7.53)
Uric acid (mg/dL)	4.98 (2.70-10.18)	5.17 (1.01-8.96)	5.04 (3.39-10.18)	5.06 (3.84-8.03)	4.75 (2.61-6.35)	4.79 (3.42-7.53)	4.38 (2.61-6.35)	4.63 (3.22-6.53)
CRP (mg/dL)	4.60 (0.76-33.40)	5.30 (0.47-36.40)	4.57 (1.30-16.30)	3.95 (0.38-10.40)	1.05 (0.40-13.0)	2.61 (0.47-6.90)	3.76 (0.72-26.60)	3.26 (0.48-13.50)
TC/HDL-C index	4.13 (2.58-7.16)	4.26 (2.69-7.39)	4.54 (2.87-6.83)	4.93 (3.06-7.39)	4.80 (2.78-6.65)	4.54 (2.48-10.27)	4.98 (2.80-8.66)	4.40 (2.84-7.02)*
LDL-C/HDL-C index	2.34 (1.16-4.98)	2.42 (1.13-4.40)	3.03 (1.70-4.83)	3.03 (1.84-4.65)	2.97 (1.17-4.05)	2.80 (1.03-5.03)	3.25 (1.55-6.17)	2.88 (1.58-4.95)*

Data are median and interquartiles (25%-75%). Wilcoxon test was performed to verify changes from baseline (intra-group changes). Kruskal-Wallis with post hoc Dunn`s test was performed to verify differences across treatment groups (inter-group changes). CG: control group; FO: fish oil group; OO: olive oil group; FOO: fish and olive oil group. TC: total cholesterol; HDL-C: high density lipoprotein; LDL-C: low density lipoprotein; HOMA-IR: Homeostatic model assessment – insulin resistance; CRP: C-reactive protein

Intra-group changes:

*p<0.05

Inter-group changes:

‡‡ Percentage of change from baseline: CG versus FOO (p<0.05)

§ Percentage of change from baseline: OO versus FOO (p<0.05)

Table 4: Effect of intervention dietary (fish oil, olive oil and fish+olive oil) on oxidative stress parameters at baseline and after 90 days.

OS parameters	CG (n: 42)		FO (n: 21)		OO (n: 13)		FOO (n: 26)	
	Baseline	90-d	Baseline	90-d	Baseline	90-d	Baseline	90-d
Hydroperoxide (cpm)	16833.0 (7428.0-40694.0)	19602.0 (9388.0-50501.0)	22055.0 (10216.0-58276.0)	20866.0 (9013.0-56972.0)	16065.0 (4865.0-23075.0)	14459.0 (5763.0-25045.0)	21990.0 (9579.0-43047.0)	15393.0 (8725.0-23360.0)* ††
AOPP (umol/L)	210.30 (80.61-387.26)	168.65 (75.25-393.45)*	138.30 (88.85-302.60)	130.55 (79.35-527.25)	126.88 (69.94-198.64)	109.97 (73.31-351.0)	120.10 (75.35-366.78)	99.03 (59.92-393.45)*
TRAP/Uric acid ratio	161.89 (95.28-245.07)	128.13 (87.64-537.91)	145.51 (79.41-210.63)	134.37 (87.66-168.84)	132.88 (90.15-199.35)	158.48 (121.67-234.70)* ‡	164.53 (171.02-250.06)	151.96 (102.87-218.80)* ††
AOPP/TRAP index	0.23 (0.08-0.53)	0.23 (0.11-0.59)	0.20 (0.10-0.45)	0.19 (0.12-0.91)	0.18 (0.13-0.32)	0.13 (0.08-0.36)	0.17 (0.11-0.52)	0.13 (0.08-0.55)*
TRAP/AOPP index	4.28 (1.90-11.57)	4.21 (1.69-9.28)	4.59 (2.20-9.34)	5.17 (1.09-8.40)	5.44 (3.10-7.51)	7.23 (2.75-12.28)	5.64 (1.94-9.14)	7.42 (1.83-12.22)* †

Data are median and interquartiles (25%-75%). Wilcoxon test was performed to verify changes from baseline (intra-group changes). Kruskal-Wallis with post hoc Dunn`s test was performed to verify differences across treatment groups (inter-group changes). CG: control group; FO: fish oil group; OO: olive oil group; FOO: fish and olive oil group. AOPP: advanced oxidation protein products; TRAP: total radical trapping antioxidant parameter

Intra-group changes:

*p<0.05

Inter-group changes:

†† Percentage of change from baseline: CG versus FOO (p<0.05)

† Percentage of change from baseline: FO versus FOO (p<0.05)

‡ Percentage of change from baseline: OO versus CG (p<0.05)

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Diante da epidemia mundial de SM, observa-se que há uma tendência no aumento da conscientização de que hábitos saudáveis possam prevenir o aparecimento dessa síndrome. No entanto, quando se estabelece o diagnóstico de SM, a restrição calórica e a atividade física regular, tornam-se medidas de intervenção imperativas. Nesse sentido, na tentativa de melhorar a qualidade de vida e a manutenção da saúde obtida por meio do tratamento convencional de SM, as propriedades funcionais dos alimentos tornaram-se alvo de extensas pesquisas. Muito se tem descoberto a respeito desses alimentos e de como eles podem melhorar os principais componentes da SM. Estudos de intervenção com alimentos funcionais têm mostrado melhora nos fatores de risco cardiovascular e no estresse oxidativo em pacientes com SM, e dentre esses alimentos destacam-se o óleo de oliva e o óleo de peixe. A presente tese de doutorado é composta de dois artigos; no primeiro, avaliou-se a relação entre os componentes da SM e o estresse oxidativo (EO) e, com exceção da hipertensão arterial, todos os demais componentes da SM estiveram relacionados ao EO. Este trabalho também demonstrou uma correlação positiva entre ácido úrico e óxido nítrico, reforçando a importância desses marcadores na disfunção endotelial observada em pacientes com SM. No segundo, demonstrou-se que a associação do óleo de peixe e óleo de oliva apresentava efeito sinérgico na melhora do perfil lipídico e do EO em pacientes com SM.

Finalmente, espera-se que pesquisas futuras avancem de tal modo que possam proporcionar uma abordagem holística dos pacientes, bem como uma avaliação do efeito sinérgico de alimentos consumidos concomitantemente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37:1595-1607.
2. Wassink AMJ, Olijhoek JK, Visseren FLJ. The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. *Eur J Clin Invest* 2007;37(1):8-17.
3. Executive Summary of the Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285(19):2486-97.
4. Brandão AP, coordenador. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2005, 84.
5. Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Medicine*. 2011;9:48-61.
6. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation* 2005;112(17):2735–2752.
7. Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, Rinfret S, Schiffrin EL, Eisenberg MJ. The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American College of Cardiology* 2010; 56(14):1113-1132.
8. Gutiérrez-Salmán G, Ceballos-Reyes G, Ramírez-Sánchez I. Obesity and metabolic syndrome: Future therapeutics based on novel molecular pathways. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis* 2012;24(4):204-211.
9. Unger RH, Clark GO, Scherer PE, Orci L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010;1801:209-214.
10. Ohmori K, Ebihara S, Kuriyama S, et al. The relationship between body mass index and plasma lipid peroxidation biomarker in an older, healthy Asian community. *Ann Epidemiol* 2005;15:80-84.
11. Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y, et al. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:4673-4676.
12. Abdilla N, Tormo MC, Fabia MJ, Chaves FJ, Saez G, Redon J. Impacto f the

components of metabolic syndrome on oxidative stress and enzymatic antioxidant activity in essential hypertension. *J Human Hypert* 2007;21:68-75.

13. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:816-823.

14. Lee K-U. Oxidative stress markers in Korean subjects with insulin resistance syndrome. *Diabetes Res Clin Pract.* 2001;54(Suppl2):29-33.

15. Menon V, Ram M, Dorn J, et al. Oxidative stress and glucose levels in a population-based sample. *Diabetic Med* 2004;21:1346-1352

16. Ford ES, Giles WH. A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions. *Diabetes Care* 2003;26:575–581.

17. Molnár D, Decsil T, Koletzko B. Reduced antioxidant status in obese children with multimetabolic syndrome. *Intern J Obesity* 2004;28:1197-1202.

18. Shin M-J, Park E, Lee JH, Chunga N. Relationship between insulin resistance and lipid peroxidation and antioxidant vitamins in hypercholesterolemic patients. *Ann Nutr Met.* 2006;50:115-120.

19. Williams IL, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanism of reduced nitric oxide bioavailability in obese human. *Int J Obes* 2002;26:754-764.

20. Perticone F, Ceravolo R, Candigliota M, et al. Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress. Protective effect of vitamin C. *Diabetes* 2001;50:159-165.

21. Natham C. inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997;24:17-23.

22. Kim J, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relation between insulin resistance and endothelial dysfunction. *Circulation* 2006;113:1888-1904.

23. Yamaguchi Y, Yoshikawa N, Kagota S, Nakamura K, Haginaka J, Kunitomo M. Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. *Nitric Oxide* 2006;15:380-386.

24. Esposito K, Ciotola M, Schisano B, et al. Oxidative stress in the metabolic

syndrome. *J Endocrinol Invest* 2006;29(9):791-5.

25. Noronha BT, Li JM, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity. *Diabetes* 2005;54:1082-9.

26. Gunnett CA, Heistad DD, Faraci FM. Gene targeted mice reveal a critical role for inducible nitric oxide synthase in vascular dysfunction during diabetes. *Stroke* 2003;34:2970-4.

27. Yugar-Toledo JC, Tanus-Santos JE, Sabha M, et al. Uncontrolled hipertensión, uncompensated type 2 diabetes, and smoking have different patterns of vascular dysfunction. *Chest* 2004;125:823-30.

28. Lin L-Y, Lee W-J, Shen H-N, et al. Nitric oxide production is paradoxically decreased after weight reduction surgery in morbid obesity patients. *Atherosclerosis* 2007;190:436-442.

29. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic Syndrome. A comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005;111:144-1454.

30. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004;92:347-55.

31. Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 1998;4:1241-1248.

32. Tracy RP. Inflammation in cardiovascular disease: cart, horse or both? *Circulation* 1998;97:2000-2002.

33. De Feo P, Volpi E, Lucidi P, et al. Physiological increments in plasma insulin concentrations have selective and different effects on synthesis of hepatic proteins in normal humans. *Diabetes* 1993;42:995-1002.

34. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 1999;282:2131-2135.

35. Frohlich M, Imhof A, Berg G, et al. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes care* 2000;23:1835-1839.

36. Tamakoshi K, Yatsuya H, Kondo T, et al. The metabolic syndrome is associated with elevated circulating C-reactive protein in healthy reference range, a systemic low-grade inflammatory state. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:443-449.
37. Santos AC, Lopes C, Guimaraes JT, Barros H. Central obesity as a major determinant of increased high-sensitivity C-reactive protein in metabolic syndrome. *Int J Obes* 2005;29:1452-6.
38. Florez H, Castiloo-Florez S, Mendez A, Casanova-Romero P, Larreal-Urdaneta C, Lee D, Glodberg R. C-Reactive protein is elevated in obese patients with the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;71:92-100.
39. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-Reactive Protein, interleukin 6, and risk of development type 2 diabetes Mellitus. *JAMA* 2001;286(3):327-334.
40. Danesh J, Whincup P, Walker M, et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and update meta-analyses. *BMJ* 2000;321:199-204.
41. Imperatore G, Riccardi G, Jovine C, Rivellesse AA, Vaccaro O. Plasma fibrinogen: a new factor of the metabolic syndrome. A population-based study. *Diabetes Care* 1998;21(4):649-54.
42. Wärnberg J, Nova E, Moreno LA, et al. Inflammatory proteins are related to total and abdominal adiposity in a healthy adolescent population: the AVENA Study. *Am J Clin Nutr.* 2006;84:505-12.
43. Alexander W. Immunonutrition: The role of ω -3 fatty acids. *Nutrition.* 1998; 14(7-8):627-33.
44. Carvalho PO, Bueno PRC, Noffs MD, Oliveira JG, Shimizu MT, Silva, DM. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Quim Nova.* 2003;26(1):175-80.
45. Nair, SSD, Leitch JW, Falconer J, Garg ML. Prevention of Cardiac Arrhythmia by Dietary (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids and Their Mechanism of Action. *J Nutri.* 1997;127(3):383-393.
46. Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical Pharmacology* 2009;77:937-946.

47. Sinclair HM. Deficiency of essential fatty acids and atherosclerosis, etcetera. *Lancet* 1956;270:381-383.
48. Visioli F. Nutritional support in the pharmacological treatment of metabolic syndrome. *European Journal of Pharmacology* 2011;668:S43-S49.
49. Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, Brown L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. *Progress in Lipid Research* 2011;50:372-387.
50. Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR, Ventura HO. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2009;54(7):585-594.
51. Derosa G, Maffioli P, D'Angelo A, Salvadeo SA, Ferrari I, Fogari E, et al. Effects of long chain omega-3 fatty acids on metalloproteinases and their inhibitors in combined dyslipidemia patients. *Expert Opin Pharmacother* 2009;10:1239-1247.
52. Rizza S, Tesauro M, Cardillo C, Galli A, Iantorno M, Gigli F, Sbraccia P, Federici M, Quon MJ, Lauro D. Fish oil supplementation improves endothelial function in normoglycemic offspring of patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2009;206:569-574.
53. Akinkoulie AO, Ngwa JS, Meigs JB, Djoussé L. Omega-3 polyunsaturated fatty acid and insulin sensitivity: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical Nutrition* 2011;30:702-707.
54. Olza J, Mesa MD, Aguilera CM, Moreno-Torres R, Jiménez A, Cruz AP, Gil A. Influence of an eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid-enriched enteral nutrition formula on plasma fatty acid composition and biomarkers of insulin resistance in the elderly. *Clinical Nutrition* 2010;29:31-37.
55. Simão ANC, Godeny P, Lozovoy MAB, Dichi JB, Dichi I. Efeito dos ácidos graxos n-3 no perfil glicêmico e lipídico, no estresse oxidativo e na capacidade antioxidante total de pacientes com síndrome metabólica. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia* 2010;54:463-469.
56. Von Shacky C, Angerer P, Kothny W, Theisen K, Mudra H. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:129-35.
57. Sicovick DS, Raghunathan TE, King I et al. Dietary intake and cell membrane levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac

- arrest. *JAMA – Journal of the American Medical Association* 1995;274:1363-7.
58. GISSI Prevenzione Investigators (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico). Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI Prevenzione trial *Lancet* 1999;354:447-55.
59. Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, Elwood PC, Deadman NM. Effects of changes in fat, fish and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet*. 1989;2(8666):757-761.
60. Lorgèril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P, Martin JL, Monjaud I, et al. Mediterranean alpha linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet*. 1994;343(8911):1454-1459.
61. Watts GF, Jackson P, Burke V, Lewis B. Dietary fatty acids and progression of coronary artery disease in men. *Am J Clin Nutr*. 1996;64(2):202-209.
62. Pietinen, P, Ascherio A, Korhonen P, Hartman AM, Willett C, Albanes WD et al. Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort finnish men. The Alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study. *American Journal of Epidemiology*. 1997;145(10):876-887.
63. Hu FB, Bronner, L, Willett WC, Stampfer MJ, Rexrode KM, Albert CM *et al*. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *J Am Med Assoc*. 2002;287(14):1815-1821.
64. Simopoulos, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr*. 1999;70(Suppl):560S-9S.
65. Ferrucci L, Cherubini A, Bandinelli S, Bartali B, Corsi A, Lauretani F *et al*. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *The J of Clin Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(2):439-446.
66. Pischon T, Hankinson SE, Hotamisligil GS, Rifai N, Willett WC, Rimm EB. Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among U.S. men and women. *Circulation*. 2003;108:155-160.
67. Abe Y, El-Masri B, Kimball KT. Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Atheroscler*

Thromb Vasc Biol. 1998;18:723-31.

68. Seljeflot I, Arnesen H, Brude IR, Nenseter MS, Drevon CA, Hjerermann I. Effects of omega-3 fatty acids and/or antioxidants on endothelial cell markers. *Eur J Clin Invest.* 1998;28:629-35.

69. Meydani M, Evans WJ, Handelman G, Biddle L, Fielding RA, Meydani SN *et al.* Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *Am J Physiol.* 1993;264:R992-8.

70. Wander RC, Du SH. Oxidation of plasma proteins is not increased after supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:731-7.

71. Barbosa DS, Cecchini R, El Kadri MZ, Rodríguez MAM, Burini RC, Dichi I. Decrease oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega.3 fatty acids. *Nutrition.* 2003;19:837-42.

72. Kimura Y, Sato M, Kurotani K, Nanri A, Kawai K, Kasai H, Imaizumi K, Mizoue T. PUFAs in serum cholesterol ester and oxidative DNA damage in Japanese men and women. *Am J Clin Nutr* 2012;95(5):1209-14.

73. Abete I, Goyenechea E, Zulet MA, Martínez JA. Obesity and metabolic syndrome: Potential benefit from specific nutritional components. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2011;21:B1-B15.

74. Unger RH, Clark GO, Scherer PE, Orci L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010;1801:209-214.

75. Martínez PP, López-Miranda J, Delgado-Lista J, López-Segura F, Jiménez FP. Aceite de oliva y prevención cardiovascular: más que una grasa. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis* 2006;18(5):195-205.

76. Tierney AC, Roche HM. The potential role of olive oil-derived MUFA in insulin sensitivity. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:1235-1248.

77. Jones JL, Fernandez MA, McIntosh MS, Najm W, Calle MC, Kalynych C, Vikich C, Barona J, Ackermann D, Kim JE, Kumar V, Lott M, Volek JS, Lerman RH. A Mediterranean-style low-glycemic-load diet improves variables of metabolic syndrome in women, and addition to phytochemical-rich medical food enhances benefits on lipoprotein metabolism. *Journal of Clinical Lipidology* 2011;5:188-196.

78. Perona JS, Canizares J, Montero E, et al. Virgin olive oil reduces blood pressure in hypertensive elderly subjects. *Clin Nutr.* 2004;23(5):1113-1121.
79. Fito M, Cladellas M, de la Torre R, et al. Antioxidant effect of virgin oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis.* 2005;181(1):149-58.
80. Esposito K, Marfella R, Ciotola M, et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA.* 2004;292(12):1440-1446.
81. Kastorini CM, Milionis HJ, Esposito K, Giugliano D, Goudevenos JA, Panagiotakos DB. The Effect of Mediterranean Diet on Metabolic Syndrome and its Components. *Journal of the American College of Cardiology* 2011;57(11):1299-1313.
82. Papageorgiou N, Tousoulis D, Psaltopoulou T, Giolis A, Antoniadis C, Tsiamis E, Miliou A, Toutouzas K, Siasos G, Stefanadis C. Divergent anti-inflammatory effects of different oil acute consumption on healthy individuals. *European Journal of Clinical Nutrition* 2011;65:514-519.
83. Camargo A, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Cruz-Teno C, Yubero-Serrano EM, Perez-Martinez P, Gutierrez-Mariscal FM, Lora-Aguilar P, Rodrigues-Cantalejo F, Fuentes-Jimenes F, Tinahones FJ, Malagon MM, Perez-Jimenes F, Lopes-Miranda J. Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the Mediterranean diet in elderly people. *British Journal of Nutrition* 2012;108:500-508.
84. Camargo A, Ruano J, Fernández JM, Parnell LD, Jiménez A, Santos-González M, Marín C, Pérez-Martínez P, Uceda M, López-Miranda J, Pérez-Jiménez F. Interacción de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen con las rutas de señalización celular. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis* 2011;23(6):262-268.
85. Richard C, Couture P, Desroches S, Benjannet S, Seidah NG, Lichtenstein AH, Lamarche B. Effect of the Mediterranean diet with and without weight loss on surrogate markers of cholesterol homeostasis in men with the metabolic syndrome. *British Journal of Nutrition* 2012;107:705-711.
86. Sòla-Alberich R, Valls-Zamora RM, Fernández-Castillejo S, Catalán-Santos U, Pedret-Figuerola A, Giralt-Batista M, Konstantinidou V. ¿Los compuestos fenólicos ejercen sus efectos en nuevas vías o mecanismos que explicarían efectos cardiosaludables del aceite de oliva virgen? *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*

2011;23(6):275-277.

87. Castañer O, Covas MI, Khymenets O, Nyyssonen K, Konstantinidou V, Zunft HF, de la Torre R, Muñoz-Aguayo D, Vila J, Fitó M. Protection of LDL from oxidation by olive oil polyphenols is associated with a downregulation of CD40-ligand expression and its downstream products *in vivo* in humans. *Am J Clin Nutr* 2012;95(5):1238-44.

88. Esposito K, Di Palo C, Maiorino MI, Petrizzo M, Bellastella G, Siniscalchi I, Giugliano D. Long-term effect of Mediterranean-style diet and calorie restriction on biomarkers of longevity and oxidative stress in overweight men. *Cardiology Research and Practice* Volume 2011, Article ID 293916, 5 pages.

89. Urquiaga I, Strobel P, Perez D, Martinez C, Cuevas A, Castillo O, Marshall G, Rozowski J, Leighton F. Mediterranean diet and red wine protect against oxidative damage in young volunteers. *Atherosclerosis* 2010;211:694-699.

90. Gaskins AJ, Rovner AJ, Mumford SL, Yeung E, Browne RW, Trevisan M, Perkins NJ, Wactawski-Wende J, Schisterman EF. Adherence to a mediterranean diet and plasma concentrations of lipid peroxidation in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2010;92:1461-7.

91. Munteanu A, Zingg JM, Azzi A. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E-myth or reality? *J Cell Mol Med* 2004;8:59-76.

92. Carr AC, Zhu BZ, Frei B. potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res* 2000;87:349-54.

93. Reaven P, parthasarathy S, Grasse BJ, et al. Feasibility of using na oleate-rich diet to reduce the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification in humans. *Am J Clin Nutr* 1991;54:701-6.

94. Kris-Etherton PM, lefevre M, Beecher GR, Gross MD, Keen Cl, Etherton TD. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for stablishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Ann Rev Nutr* 2004;24:511-38.

95. Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiéc et al: Determination of nitrito/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 1998; 274:177-188.

96. Haffner SM, Miettinen H, Stern MP. The homeostasis model in the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*. 1997;207:1087-92.

97. Repetto M, Reides C, Carretero MLG, Costa M, Griembertg G, Llesuy S: Oxidative

- stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 1996; 255:107-117.
98. Yokozawa T, Cho EJ, Hara Y, Kitani K. Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride. *J Agric Food Chem* 2000;48(10):5068-73.
99. González-Flecha B, Llesuy S, Boveris A: Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, Liver, and muscle. *Free Rad Biol Med* 1991;10:93-100.
100. Oliveira FJA & Cecchini R. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L) chagasi*. *J Parasitol* 2000;86:1067-1072.
101. Tagliari KC, Cecchini R, Rocha JAV, Vargas VMF. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. *Mutation Res* 2004;561:101-17.
102. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff S. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Analyt Biochem*, v.220, p.403-409, 1994.
103. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49(5):1304-13.

8. ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: PERFIL METABÓLICO, INFLAMATÓRIO, OXIDATIVO E O EFEITO DA INGESTÃO DE ÓLEO DE PEIXE E ÓLEO DE OLIVA EM PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima intitulado e que, caso aceite, fará parte de um dos quatro grupos de estudo mediante sorteio. Os grupos serão os seguintes: 1) Pacientes que receberão instruções nutricionais (grupo controle); 2) Pacientes que farão ingestão de 3 g/dia de óleo de peixe contendo ácidos graxos n-3 (grupo óleo de peixe); 3) Pacientes que consumirão de 9,6 mL/dia de óleo de oliva extra-virgem (grupo azeite); 4) Pacientes que farão ingestão de 3 g/dia de óleo de peixe contendo ácidos graxos n-3 e consumirão de 9,6 mL/dia de óleo de oliva extra-virgem (grupo óleo de peixe e azeite).

Estou ciente que ao fazer uso desses nutrientes não terei nenhum risco à minha saúde, uma vez que são nutrientes que fazem parte da dieta. Por outro lado, não terei garantias de benefícios ao consumir essas substâncias, apesar de ter sido esclarecido que muitos estudos utilizando esses nutrientes tiveram redução nos riscos de doenças cardiovasculares.

No início e após 90 dias de acompanhamento/tratamento serei submetido a coleta de sangue por uma equipe treinada para avaliação dos parâmetros laboratoriais necessários e que os riscos deste procedimento são mínimos como tonturas, vertigens, mal estar. Caso isso ocorra, serei prontamente atendido. Estou ciente de que este projeto realiza-se sob a responsabilidade do Prof. Dr Isaias Dichi, que estará disponível para quaisquer dúvidas, esclarecimentos, ou intercorrências que, por acaso ocorram durante o curso deste estudo. Finalmente, estou também ciente que este estudo se compromete a assegurar a privacidade dos participantes quanto aos dados obtidos, que posso ter acesso aos dados obtidos referentes à minha participação, que não receberei nenhuma remuneração por participar desse projeto e de que posso retirar este meu consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à minha pessoa. As dúvidas que surgirem poderão ser sanadas com o pesquisador responsável ou no CEP/UEL conforme telefones constantes neste termo.

Data: _____

Nome:

Idade: ____ Anos: ____ Telefone: _____

Endereço: _____

Assinatura do Paciente ou responsável

Prof. Dr. Isaias Dichi
Tel. para contato: 3371-2332
Tel. CEP-UEL: 3371-2490