

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 24/07/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"  
Instituto de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**NAIARA DA COSTA CINEGAGLIA**

**COMPARAÇÃO DE PADRÕES DE DIETA VEGETARIANA  
VERSUS ONÍVORA SOBRE O EFEITO DE ATIVAÇÃO DA VIA  
NRF2 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. VALÉRIA CRISTINA SANDRIM**

**Naiara da Costa Cinegaglia**

**COMPARAÇÃO DE PADRÕES DE DIETA VEGETARIANA  
VERSUS ONÍVORA SOBRE O EFEITO DE ATIVAÇÃO DA VIA  
NRF2 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS**

**Orientadora: Profa. Dra. Valéria Cristina Sandrim**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Cinegaglia, Naiara da Costa.

Comparação de padrões de dieta vegetariana versus onívora sobre o efeito de ativação da via NRF2 em células endoteliais / Naiara da Costa Cinegaglia. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Valéria Cristina Sandrim  
Capes: 00000000

1. Vegetarianismo. 2. Sistema cardiovascular - Doenças.  
3. Fatores de risco. 4. Endotélio. 5. Telômero. 6. Oxigenases.

Palavras-chave: Células endoteliais; Dieta vegetariana;  
Heme-oxigenase; Risco cardiovascular; Telômero.

*À Deus pela Luz Divina que nos abençoa em todas as circunstâncias  
e ajuda-nos o ideal na estrada imensa da vida.  
Em especial à minha família,  
Aos meus pais **Carlos e Silvia**,  
Meus exemplos de força, coragem e determinação,  
À eles serei eternamente grata por toda dedicação, confiança, incentivo e apoio.  
Aos meus queridos irmãos **Heler e Caio**,  
Pela confiança, força, companheirismo, respeito e apoio sempre.*

*dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pelo apoio da bolsa de estudo e auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto (Processo nº 2015/20669-8).

Ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu, ao Programa de Pós-Graduação Biotecnologia, em especial ao Departamento de Farmacologia e ao Laboratório pela oportunidade de desenvolver o doutorado e por todo apoio e conhecimento adquiridos durante o desenvolvimento do projeto.

À Professora Dra. Valéria Cristina Sandrim, por ser um grande exemplo como pessoa, professora e pesquisadora. Que nos inspira dia-a-dia através do seu trabalho, com muita dedicação, competência, inovação, e acima de tudo, por todo respeito e por compartilhar sua Luz conosco. Sou grata pelas oportunidades que ela me proporcionou, todo o crescimento que tive nestes 4 anos, toda compreensão e paciência frente as minhas limitações e, sobretudo, pela amizade, confiança e grande apoio em todos os momentos.

Aos meus companheiros de laboratório, Débora, Sarah, Carol, Victória, José Sérgio, e a todos os queridos amigos do departamento de Farmacologia, pela amizade, apoio, disponibilidade, respeito e companheirismo.

À Mayara Dias, pela sincera amizade, por me ensinar, me apoiar e compartilhar tanto conhecimento científico desde do início.

Ao meu namorado Bruno Alves, por todo apoio, amor, confiança e paciência, e principalmente pelo incentivo e grande companheirismo em todos os momentos.

À minha amiga Bianca Picado, pela sincera amizade, pelo apoio, conselhos, sinceridade, companheirismo e por todos os bons momentos que vivenciamos e compartilhamos desde a nossa graduação.

*No pensar, clareza  
No sentir, cordialidade,  
No querer, prudência:  
Almejando-as  
Posso então esperar,  
Que eu corretamente  
Possa encontrar-me  
Nas trilhas da vida  
Diante de corações humanos  
No âmbito do dever.  
Pois clareza  
Provém da luz da alma,  
E cordialidade  
Contém o calor espiritual,  
Prudência  
Intensifica a força da vida.  
E tudo isso,  
Em confiança em Deus anseia,  
Em caminhos humanos conduz  
A passos bons e seguros na vida.*

***Rudolf Steiner***

## **FINANCIAMENTO**



**Bolsa de Doutorado: nº processo: 2015/20669-8**

**Período de vigência 01/11/2016 à 31/07/2019**



## RESUMO

Evidências apontam que a dieta vegetariana diminui a probabilidade de desenvolver doenças cardiovasculares (DCVs). Um dos principais mecanismos que levam às doenças cardiovasculares é a disfunção do endotélio, associada com a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS). Do ponto de vista de biomarcadores de estresse oxidativo/antioxidante e de envelhecimento biológico, enzimas com propriedades antioxidantes e o comprimento do telômero podem apresentar efeitos na modulação do sistema vascular. O presente estudo inclui dois manuscritos, sendo o primeiro relacionado a via de regulação NRF2/HO-1 e o segundo ao comprimento dos telômero em onívoros (ONI) e vegetarianos (VEG). No primeiro manuscrito, o objetivo foi verificar a concentração de HO-1 circulante, bem como investigar o efeito da incubação do plasma de ONI e VEG em células endoteliais sob a modulação da via NRF2/HO-1 e a produção de NO. Dos 745 indivíduos inicialmente recrutados, 44 ONI e 44 VEG do sexo masculino aparentemente saudáveis foram incluídos no estudo. A concentração de HO-1 circulante foi mensurado usando o ensaio de ELISA. As células endoteliais foram incubadas com amostras de plasma de ONI e VEG. Nós observamos que a concentração de HO-1 circulante foi maior nos ONI em relação aos VEG. A incubação das células endoteliais com o plasma de ONI induziu o aumento da expressão gênica/proteica do NRF2 e HO-1, bem como a atividade do ARE e a produção de NO, quando comparado com o grupo VEG. Estes achados indicam que a produção de HO-1 circulante nos ONI pode estar relacionada a um maior status pro-oxidativo. A ativação da via HO-1/NRF2 e a produção de NO em cultura de células endoteliais incubadas com o plasma de ONI, parece refletir um mecanismo adaptativo de proteção destas células contra possíveis danos. No segundo manuscrito, nosso objetivo foi avaliar o comprimento do telômero em leucócitos (LTL, do inglês *leukocyte telomere length*) nos ONI e VEG e sua associação com biomarcadores clássicos de risco cardiovascular. O LTL foi mensurado em 39 amostras de ONI e 41 de VEG através da reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (RT-QPCR). Apesar de não haver diferença no comprimento do telômero entre ONI e VEG, uma forte correlação negativa entre LTL e a espessura intima-média da carótida (IMT, do inglês *intima-media thickness*) foi observada nos ONI, mas não no grupo VEG. Além disso, os ONI que foram classificados com o LTL curto apresentaram maior IMT comparado com VEG. Nossos achados sugerem que o comprimento do telômero pode ser utilizado como um marcador de aterosclerose subclínico no grupo de onívoros.

**Palavras-chave:** células endoteliais, dieta vegetariana, heme-oxigenase, risco cardiovascular, comprimento do telômero.

## ABSTRACT

Several studies report that a vegetarian diet lowers the probability of developing cardiovascular diseases (CVDs). The endothelial dysfunction is one of the main mechanism that leads to CVDs, associated with decreased nitric oxide (NO) bioavailability and excessive production of reactive oxygen species (ROS). Regarding oxidative/antioxidant stress and biological aging biomarkers, enzymes with antioxidant properties and telomere length may have effects on vascular system modulation. The present study includes two manuscripts related to: 1) regulation of NRF2/HO-1 pathway and 2) telomere length in omnivorous (OMN) and vegetarians (VEG). In the first manuscript, our objectives were to verify circulating HO-1 levels and the effect of plasma incubation from omnivorous and vegetarians in endothelial cells on modulating of NRF2/HO-1 pathway and NO production. From 745 participants initially recruited, 44 omnivorous and 44 vegetarian men apparently healthy were included in this study and circulating HO-1 was measured using ELISA assay. Endothelial cells were incubated plasma samples from OMN and VEG. We found higher circulating HO-1 production in omnivorous compared to vegetarian. Moreover, the plasma collected from omnivorous was able to increase the gene/protein NRF2/HO-1 expression, ARE activity, and NO production in endothelial cells culture compared to vegetarian group. We suggest that HO-1 induction in omnivorous may indicate a pro-oxidative. Activation of the HO-1 / NRF2 pathway and NO production in endothelial cell culture incubated with ONI plasma seems to reflect an adaptive mechanism of protection of these cells against possible damage. In the second manuscript, our objectives were to evaluate leukocyte telomere length (LTL) in VEG and OMN subjects and its association with classical cardiovascular risk biomarkers. LTL was measured in 39 omnivorous and 41 vegetarians by Real-Time Quantitative PCR reaction. Although telomere length was not different between omnivorous and vegetarians, we found a strong negative correlation between LTL and intima-media thickness (IMT) in omnivorous, but not in vegetarian group. In addition, omnivorous who were classified with short telomere length had higher carotid IMT compared to vegetarians. Our data suggest that telomere length can be a marker of subclinical atherosclerosis in the omnivorous group.

**Key words:** endothelial cells, vegetarian diet, heme-oxygenase, cardiovascular risk, telomere length.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Risco cardiovascular .....	1
1.2. Padrão alimentar vegetariano .....	2
1.3. Heme-oxigenase .....	5
1.4. Telômeros .....	8
<b>2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>10</b>
<b>3. MANUSCRITO I.....</b>	<b>16</b>
<b>4. MANUSCRITO II .....</b>	<b>44</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Risco cardiovascular

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de mortes, responsáveis por ~31% de óbitos mundialmente. As DCVs envolvem um grupo de distúrbios do coração e dos vasos sanguíneos, entre elas podemos citar as doenças causadas pela aterosclerose como, doença coronariana, doença cerebrovascular, doenças vascular periférica e hipertensão <sup>1</sup>, sendo que 85% destas mortes, são por ataque cardíaco e acidente vascular cerebral (AVC) <sup>2</sup>. Os fatores de risco cardiovascular incluem: dieta inadequada, sedentarismo, consumo excessivo de álcool, tabagismo, bem como a idade e fatores genéticos <sup>1</sup>; logo, os efeitos destes fatores de risco podem se manifestar nos indivíduos através do aumento da pressão arterial, diabetes, hiperlipidemia, sobrepeso e obesidade (Organização Pan-Americana da Saúde, OPAS, 2017) <sup>3</sup>.

Várias evidências apontam que o comprometimento funcional do endotélio é um dos primeiros sinais do processo de aterosclerose, mas também pode ser um importante fator na progressão e no desenvolvimento da doença cardiovascular aterosclerótica <sup>4</sup>. O endotélio vascular é uma monocamada ativa de células que cobre o lúmen dos vasos sanguíneos, separando a parede vascular do sangue circulante <sup>4</sup>. Estas células endoteliais mantêm a homeostase interna dos vasos sanguíneos através da produção substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras, desempenhando importante papel na regulação da resistência vascular e pressão sanguínea <sup>4,5</sup>. Em condições patológicas, a produção desses fatores vasoativos é desregulada, podendo levar à diminuição de substâncias vasodilatadoras (como o óxido nítrico) e ao aumento simultâneo de vasoconstritores <sup>4,6</sup>.

O óxido nítrico (NO), um poderoso fator vasodilatador, é sintetizado pelo aminoácido L-arginina através da eNOS (NOS endotelial); rapidamente, o NO se desloca do endotélio para as células do músculo liso vascular para ativar a guanilato ciclase solúvel (GCs), que por sua vez, induz um aumento na concentração de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), levando assim a um relaxamento das células musculares lisas com consequente vasodilatação <sup>5</sup>. Porém, sugere-se que um defeito na atividade da eNOS, leva a redução da biodisponibilidade de NO e ao aumento de radicais livres, incluindo peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) e óxido nitroso (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) na vasculatura, causando danos no DNA e envelhecimento endotelial <sup>7,8</sup>.

Logo, a diminuição do NO, o aumento de estresse oxidativo resultante da produção excessiva de espécie reativa de oxigênio (ROS) e/ou a falha nos mecanismos de defesa dos antioxidantes, têm sido associados com a disfunção do endotélio <sup>4,9</sup>. Conseqüentemente, o sistema vascular está predisposto à vasoconstrição, agregação de plaquetas, aderência leucocitária e inflamação <sup>4,5</sup>. Tendo isso em vista, o foco do presente estudo foi a célula endotelial.

Estudos *in vitro* e *in vivo* já demonstraram os efeitos benéficos do maior consumo de frutas e vegetais associado com a diminuição nos danos celulares, no DNA e no estresse oxidativo <sup>10</sup>. Evidências epidemiológicas confirmam estes achados, mostrando que a dieta vegetariana <sup>11,12</sup>, DASH (da sigla em inglês *Dietary Approaches to Stop Hypertension*) <sup>13</sup>, mediterrânea <sup>14</sup> e de restrição calórica <sup>15</sup>, podem modular positivamente as doenças cardiovasculares. Em contraste, o consumo excessivo de carne vermelha ou processadas leva ao aumento de estresse oxidativo <sup>16-18</sup>. Sendo assim, o presente estudo deu ênfase à dieta vegetariana.

## **1.2. Padrão alimentar vegetariano**

O número de vegetarianos e adeptos ao vegetarianismo tem aumentado nos últimos anos. Estudos epidemiológicos apontam que em 2009, ~3% da população americana seguiu uma dieta vegetariana; em 2012, esse número passou para ~5%, e 43% dos americanos revelaram que consomem pelo menos uma refeição vegetariana na semana <sup>19</sup>. No Brasil, uma pesquisa realizada recentemente em 142 municípios, mostrou que essa proporção passou de 8% em 2012 para 14% em 2018, representando 30 milhões de brasileiros (IBOPE Inteligência, 2018) <sup>20</sup>. Baseado no modelo de outros países como Estados Unidos e Reino Unido, foi lançado no Brasil pela Sociedade Vegetariana Brasileira (SVB) uma campanha em 2009 nomeada “Segunda Sem Carne”, convidando as pessoas a tirar a carne do cardápio pelo menos uma vez na semana, estimulando hábitos mais saudáveis e a consumirem mais verduras e frutas <sup>21</sup>. Grandes organizações, como a Organização Mundial de Saúde, reconhecem os benefícios de uma alimentação vegetariana para a saúde, se pronunciando sobre os riscos do consumo elevado de carne <sup>20</sup>. A Associação Dietética Americana (ADA), declara: “*as dietas vegetarianas apropriadamente planejadas são saudáveis, adequadas em termos nutricionais e apresentam benefícios para a saúde na prevenção e no tratamento de*

determinadas doenças, e pode ser adotada em qualquer ciclo da vida”<sup>22</sup>. O Conselho Regional de Nutricionistas – 3ª Região, também publicou em 2012 o parecer sobre as dietas vegetarianas com recomendações aos nutricionistas<sup>23</sup>.

O padrão alimentar vegetariano exclui o consumo de todos os tipos de carnes, sendo classificado de acordo com o grau de restrição de alimentos de origem animal: lactovegetariano (permite laticínios) e ovolactovegetariano (permite ovos e laticínios) e vegetariano estrito (exclui qualquer tipo de alimento de origem animal)<sup>24</sup>. Outra definição conhecida como veganismo refere-se a uma filosofia ou um modo de viver, que busca excluir todo e qualquer tipo de exploração e sofrimento dos animais, seja no consumo de alimentos/produtos de origem animal, bem como nos produtos testados em animais<sup>25</sup>. No âmbito da alimentação, vegano e vegetariano estrito são sinônimos<sup>25</sup>.

Em geral, a dieta vegetariana é rica em fibras, vitaminas C e E, ácido fólico, potássio, magnésio, carboidratos complexos), fitoquímicos e antioxidantes, e baixa em gorduras saturadas, colesterol e gordura total<sup>26</sup>. Estes compostos podem ser obtidos através de alimentos como cereais, legumes, verduras, nozes, sementes e frutas; produtos animais como laticínios e ovos, podem ser ou não incluídos nesse tipo de dieta<sup>27</sup>. Entretanto, seguir uma alimentação vegetariana desequilibrada e/ou excluir todos os alimentos de origem animal, pode resultar em desvantagens à saúde para estes indivíduos, como falta de vitamina D, vitamina B12, ferro heme e zinco<sup>28</sup>. A deficiência de vitamina B12 ocorre principalmente entre os indivíduos veganos e foi associada com o aumento no nível de homocisteína no plasma<sup>29,30</sup>.

Evidências relatam que o padrão alimentar vegetariano diminui o risco de desenvolver doenças cardiovasculares<sup>31,32</sup>. Um estudo transversal (*Adventist Health Study 2*), que incluiu 592 participantes, mostrou que a probabilidade de indivíduos veganos/vegetarianos desenvolverem hipertensão foi 44% menor em relação aos onívoros; a prevalência de diabetes foi de 8,9% em veganos/vegetarianos, 18,8% em psicovegetarianos e 15,6% em onívoros<sup>33</sup>. Um dos maiores estudos de coorte envolvendo 89.000 adventistas californianos que consumiam dietas vegetarianas (psicovegetarianos, ovolactovegetarianos, veganos) comparado aos semivegetarianos e onívoros, mostrou que a taxa de hipertensão diminuiu gradualmente a medida que as pessoas se alimentavam a base de planta; e o mesmo foi observado para diabetes e obesidade<sup>34</sup>. Os efeitos da dieta na pressão sanguínea foram comprovados em estudos de coorte com intervenção de dietética. Foi observado que

indivíduos vegetarianos que incluíram a carne na dieta por 11 dias, apresentaram aumento na pressão arterial <sup>35</sup>. Foi observado que a retirada da carne da dieta dos indivíduos que seguia uma dieta onívora, levou a redução da pressão arterial em apenas 7 dias, considerando que antes da intervenção dietética, os medicamentos anti-hipertensivos ou antiglicêmicos foram reduzidos ou eliminados <sup>36</sup>.

Estes achados estão de acordo com os aspectos tipos encontrados nos vegetarianos em relação aos onívoros, que incluem: menor pressão sanguínea, índice de massa corpórea (IMC), glicose, hemoglobina glicada, colesterol da lipoproteína de baixa densidade (c-LDL), colesterol da lipoproteína de alta densidade (c-HDL) colesterol total (CT) e gordura total (GT) <sup>12,37</sup>. De modo interessante, um estudo transversal envolvendo indivíduos com 50 anos ou mais, avaliou a resposta de dilatação vascular acessada por dilatação mediada por fluxo e dilatação independente do endotélio (após a administração de nitroglicerina, NTG); foi observado que a função vascular nos vegetarianos foi melhor em relação aos onívoros, e que estes efeitos foram dependentes da dieta e independentes de outros fatores relacionados à aterosclerose (tabagismo, envelhecimento, diabetes, hipertensão, hiperlipidemia) <sup>38</sup>. Os autores ainda relataram que a melhor resposta a dilatação vascular nos vegetarianos, foi diretamente relacionada ao tempo que estes indivíduos adotaram a dieta, sugerindo que a dieta vegetariana pode ter efeito direto na função endotelial <sup>38</sup>. *Navarro* e colaboradores confirmaram estes achados, mostrando que outros marcadores de função vascular, como velocidade de onda de pulso (VOP), espessura íntima-média da carótida (c-IMT, do inglês *carotid intima-media thickness*), também estavam diminuídos nos vegetarianos em relação aos onívoros <sup>39</sup>.

Estudos sugerem que ROS apresenta papel importante no controle da função vascular a manutenção do tônus vascular <sup>40</sup>. Em condições fisiológicas, o equilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes é mantido ligeiramente em favor dos pró-oxidantes, favorecendo um estresse oxidativo moderado <sup>41</sup>. Entretanto, o excesso de ROS e/ou a diminuição da defesa antioxidante foram associados com a disfunção endotelial e ao aumento da pressão sanguínea <sup>9</sup>. Isso justifica o fato de que grande parte dos efeitos benéficos da dieta vegetariana para a saúde cardiovascular, tenham sido atribuídos a alta quantidade de antioxidantes endógenos e exógenos (provenientes dos alimentos baseados em plantas) presente neste indivíduos <sup>28</sup>. Alguns estudos observaram menores níveis de estresse oxidativo (peroxidação lipídica) <sup>42,43</sup>, e maiores níveis de antioxidantes como (glutathione peroxidase,

carotenoides, Vitamina E e ácido ascórbico) nos vegetarianos em relação aos onívoros <sup>11,42,44</sup>. De modo interessante, biomarcadores antioxidantes e de estresse oxidativo foram mensurados no plasma de onívoros e vegetarianos jovens (20-30 anos de idade) e idosos (60-70 anos) <sup>11</sup>. Os níveis de Vitamina C e  $\beta$ -caroteno estavam diminuídos nos onívoros idosos, sendo que nos vegetarianos, os níveis plasmáticos foram similares entre os indivíduos jovens e idosos <sup>11</sup>. Da mesma forma, os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo (quebra e oxidação do DNA, proteínas carboniladas e ácidos graxos dienos conjugados) não diferiu significativamente entre os onívoros e vegetarianos, porém os vegetarianos idosos apresentaram menores níveis de estresse oxidativo quando comparado aos onívoros da mesma idade <sup>11</sup>.

Vale ressaltar que parte destes antioxidantes são fitoquímicos (como vitamina C e carotenoides), os quais apresentam atividade pró-oxidantes *in vivo*, e ainda assim desempenham importantes funções regulatórias e de sinalização celular, incluindo o balanço redox e controle da ativação do elemento de resposta antioxidante (ARE) <sup>28</sup>. O ARE é uma região promotora do gene sensível-redox que regula enzimas antioxidantes, incluindo a heme oxigenase (HO) <sup>28</sup>.

### 1.3. Heme-oxigenase

A heme-oxigenase é uma enzima envolvida na degradação do grupo heme. Resumidamente, a HO cliva o heme em 3 produtos biológicos ativos: monóxido de carbono (CO), íons ferro (Fe<sup>2+</sup>) e biliverdina, que por sua vez é convertido em bilirrubina pela biliverdina redutase <sup>45</sup>. *Tenhuen* e colaboradores, identificaram três isoformas da HO <sup>46</sup>. A primeira, HO-1 é uma proteína induzível por estímulos, como heme (o principal indutor), metais pesados, hipóxia e oxidantes (como peróxido de hidrogênio e NO <sup>47</sup>). A HO-2 é uma proteína sintetizada constitutivamente, e no geral não responde a nenhum indutor da HO-1 <sup>48</sup>. Por fim, a HO-3 também participa da degradação heme, mas sua função ainda é indefinida <sup>48</sup>.

A HO-1 em particular, é altamente expressa no baço, fígado e medula óssea, enquanto que nos demais tecidos, como no endotélio, sua expressão ocorre em níveis basais <sup>49</sup>. Sua indução fisiológica pode ser uma resposta benéfica ou adaptativa aos estímulos, apresentando papel fundamental na manutenção da homeostase vascular e, exercendo efeitos antioxidativo, anti-inflamatório, antiapoptótico, antiproliferativo e vasodilatador <sup>45</sup>. Em nível molecular, a



expressão HO-1 é ativada principalmente pelo fator de transcrição NRF2 (*nuclear factor, erythroid 2-like 2*), através da ligação com o elemento de resposta antioxidante (ARE). Em condições normais, o NRF2 se liga a proteína inibidora Keap-1 (*Kelch-like ECH-associated protein-1*) rica em cisteína, tornando-se alvo de ubiquitinação e degradação proteossomal, mantendo seu nível baixo no citoplasma <sup>50</sup>. Porém, o NRF2 é oxidado quando exposto a oxidantes endógenos, pró-oxidantes derivado de fitoquímicos ou eletrófilos (incluindo produtos de oxidação lipídica eletrolítica 4-hidroxinonenal, HNE), resultando na dissociação do NRF2 e Keap-1 <sup>50</sup>. Agora livre, o NRF2 é transportado para o núcleo, onde encontra outros fatores de transcrição como Maf (*v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*), liga-se na sequência ARE, promovendo a transcrição da HO-1 e de outras enzimas antioxidantes <sup>50</sup>. Além disso, HO-1 também pode ser induzido por outros fatores de transcrição como *activator protein-1* (AP-1) e *signal transducer e activator of transcription 3* (STAT3) <sup>49</sup>.

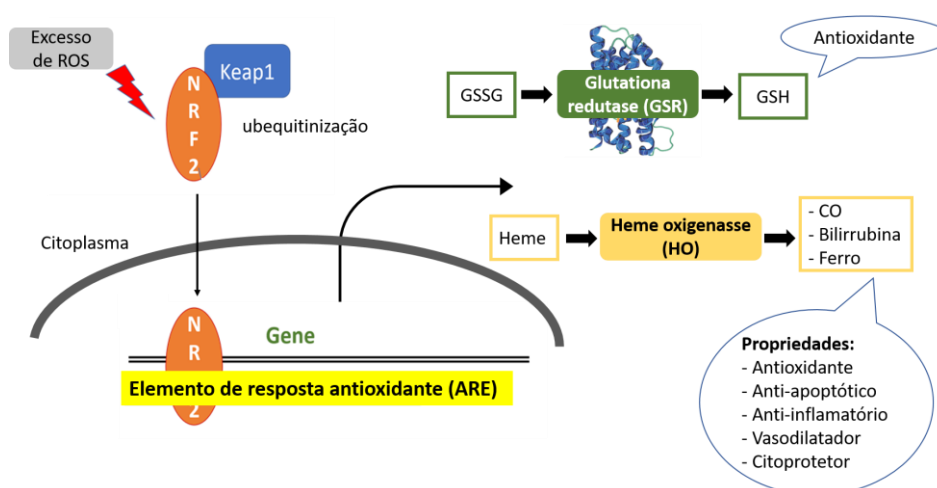
A contribuição da atividade da HO-1 e de seus produtos finais, tem sido extensamente investigada no contexto das doenças cardiovasculares. A degradação do heme livre parece ser a primeira contribuição da atividade da HO-1 na proteção do tecido <sup>45</sup>. A bilirrubina é um potente antioxidante endógeno, desempenhando importante papel anti-inflamatório através da inibição da NADPH oxidase <sup>48</sup>. CO atua como um segundo mensageiro para aumentar a resistência celular ao estresse oxidativo, através da ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) e consequente aumento de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) <sup>51</sup>. Estudos sugerem que CO interage com NO, os quais concomitantemente promovem a vasodilatação, ativam antioxidantes, além de inibir a apoptose e ações inflamatórias <sup>51</sup>.

Diante de todos estes mecanismos citoprotetores mediados pela HO, a literatura tem mostrado que alguns antioxidantes sintéticos (como *dihydromyricetin*, *willow bark*, resveratrol) são capazes de induzir a HO-1 através do NRF2 nas células endoteliais, e tem sido proposto como potencial alvo terapêutico para a prevenção das doenças cardiovasculares <sup>52-54</sup>. Entretanto, o uso de suplementos antioxidantes pode alterar o sistema de defesa e de síntese dos antioxidantes endógenos nas células, além de modificar os níveis de morte celular <sup>10</sup>. Portanto, uma alimentação baseada em plantas como a dieta vegetariana parece ser a melhor opção para a saúde cardiovascular.

Além disso, é importante considerar as dificuldades em avaliar os efeitos desses antioxidantes sintéticos em níveis fisiológicos, pois a adição de extratos ou alimentos

integrals podem não representar a real dose ou a biotransformação destes em situações *in vivo*<sup>55</sup>. Por exemplo, em células de hepatócitos de animais, 50 e 75mmol/L de resveratrol ativou o NRF2 e induziu a produção de enzimas antioxidantes (ex. catalase, superóxido dismutase, glutaciona peroxidase)<sup>56</sup>, entretanto estas doses são muito mais elevadas do que as alcançadas na circulação em condições fisiológicas. Para resolver isso, alguns estudos têm incluído os indivíduos como ‘biorreatores’, utilizando amostras de plasma/soro destes sujeitos após a ingestão de alimentos ou extratos de interesse<sup>55,57</sup>. Estudos evidenciando os efeitos benéficos da dieta de restrição calórica, e mais recentemente da dieta vegetariana, mostraram que fatores circulatórios presentes no soro de animais e humanos, incubados em cultura de células, conferem modificações na expressão gênica e significativo efeito antioxidante, antiproliferativo e anti-apoptótico<sup>43,58-60</sup>. Dessa forma, nós sugerimos que o plasma dos vegetarianos module a HO-1 de maneira diferente dos onívoros nas células endoteliais.

Considerando que indivíduos vegetarianos apresentam risco cardiovascular reduzido em relação aos onívoros, e que isso pode estar relacionado a alta quantidade de antioxidantes presentes nessa dieta, é importante avaliar quais são os mecanismos moleculares de proteção da dieta vegetariana ao risco cardiovascular. É possível que o plasma de vegetarianos module a HO-1 de maneira diferente dos onívoros, tornando este um possível alvo farmacológico. Além disso, não há dados na literatura mostrando o efeito do plasma de vegetarianos em cultura de células endoteliais, portanto este estudo pode contribuir para o conhecimento sobre os parâmetros celulares e bioquímicos deste grupo que vem crescendo mundialmente.



**Figura 1.** Via de regulação do NRF2/HO. Em condições fisiológicas normais, o NRF2 se encontra no citoplasma associado a proteína Keap-1, tornando-se alvo de ubiquitinação e degradação. Em condições de estresse como quando induzido pelo excesso de ROS, o NRF2 se dissocia da Keap-1, sendo posteriormente transportado para o núcleo onde reconhece o ARE, determinando a síntese de moléculas antioxidantes como a heme oxigenase e a glutaciona.

## 1.4. Telômeros

Os telômeros são estruturas de nucleoproteínas repetidas (TTAGGG) localizadas na região 3' das extremidades dos cromossomos <sup>61</sup>. Tais nucleoproteínas representam uma capa protetora (da sigla em inglês *cap*), apresentando duas principais funções: 1) proteger as extremidades dos cromossomos de mecanismos inapropriados de reparo ao DNA, que de outra forma, poderiam ser reconhecidos como quebras na cadeia dupla do DNA e resultar na fusão de um cromossomo com outros; 2) impedir a degradação de genes próximos ao final dos braços dos cromossomos, preservando o material genético <sup>62</sup>. Devido a replicação do DNA incompleta, a sequência dos telômeros não são completamente replicadas, ocorrendo uma perda dos pares de base progressivamente, tornando os telômeros mais curtos a cada replicação das células somáticas <sup>63</sup>. Eventualmente, as células podem entrar em senescência e apoptose, resultando na perda dos telômeros <sup>64</sup>. Em adição, a ação de uma enzima especializada chamada telomerase, promove a manutenção e o alongamento dos telômeros <sup>64</sup>. Por ser uma transcriptase reversa, a telomerase adiciona nucleotídeos nas extremidades do DNA recém sintetizado, mantendo o comprimento do telômero <sup>65</sup>. Muitos tipos de células como, as células germinativas, células-tronco e em alguns tipos de células cancerígenas apresentam um alto nível de atividade da telomerase, enquanto que nas células somáticas, o seu nível de atividade é baixo ou indetectável <sup>64</sup>. Logo, o comprimento do telômero é considerado um “relógio mitótico” e tem sido proposto como um potencial biomarcador de envelhecimento <sup>66-70</sup>.

Além do problema de replicação, outros fatores podem contribuir com o encurtamento do telômero, como inflamação, estresse oxidativo, fatores ambientais incluindo o alto consumo de álcool e a ingestão calórica em excesso <sup>71</sup>.

Diante deste cenário, estudos têm mostrado que o encurtamento do telômero está envolvido na patogênese de doenças relacionadas ao envelhecimento, como as DCVs <sup>66-70</sup>. Um estudo longitudinal observou que o encurtamento do telômero foi associado com a incidência e progressão da aterosclerose, mostrando potencial utilidade clínica na predição da aterosclerose <sup>66</sup>. Outros estudos demonstraram maior encurtamento do telômero em indivíduos com aterosclerose <sup>67</sup>, hipertensão <sup>68,69</sup> e doença arterial coronariana <sup>70</sup>.

Evidências apontam que, além do envelhecimento, o aumento da inflamação e o estresse oxidativo aceleram o atrito do telômero, possivelmente explicando a associação

observada entre o comprimento do telômero e DCVs <sup>64,72</sup>. De modo interessante, tanto o comprimento do telômero como o risco cardiovascular podem ser modificados pela dieta <sup>14,39,73,74</sup>. Uma dieta equilibrada rica em frutas, vegetais e grãos integrais é anti-inflamatória e antioxidativa, que por sua vez, diminui a produção de ROS e danos ao DNA <sup>10,75</sup>. *Lian* e colaboradores <sup>73</sup> mostraram que os telômeros mais longos foram associados com menor risco de desenvolver hipertensão somente no grupo de indivíduos que consumiam mais vegetais <sup>73</sup>. Em outro estudo, a maior adesão à dieta mediterrânea foi associada com telômeros mais longos, entretanto, não houve correlação entre o comprimento dos telômeros e os componentes dietéticos da dieta mediterrânea, sugerindo que a preservação do comprimento dos telômeros resultou do efeito global deste padrão de dieta. Em contrapartida, o alto consumo de carne vermelha e processada pode resultar no aumento do estresse oxidativo <sup>16-18</sup>, o qual pode induzir danos ao DNA e afetar o comprimento do telômero <sup>76,77</sup>. Diante deste contexto, uma dieta vegetariana balanceada pode proteger os cromossomos.

Estudos epidemiológicos têm investigado o comprimento do telômero nas doenças cardiovasculares, bem como sua relação com a dieta <sup>70,73,74</sup>, entretanto, nenhum estudo incluindo indivíduos vegetarianos aparentemente saudáveis foi realizado até o momento. Considerando que a dieta vegetariana é rica em frutas e vegetais, nossa hipótese é que a dieta vegetariana pode prevenir ou reduzir o encurtamento do telômero.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organization, W. W. H. F. W. S. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control Policies, strategies and interventions. (2011). Available at: [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/publications/atlas\\_cvd/en/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/). (Accessed: 10th July 2019)
2. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). Available at: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). (Accessed: 10th July 2019)
3. Organização Pan Americana de Saúde (OPAS); Organização Mundial da Saúde. No Title. *Doenças cardiovasculares* (2017). Available at: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=839](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=839). (Accessed: 10th July 2019)
4. Park, K.-H. & Park, W. J. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J. Korean Med. Sci.* **30**, 1213 (2015).
5. Flammer, A. J. & Lüscher, T. F. Human endothelial dysfunction: EDRFs. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **459**, 1005–1013 (2010).
6. Ungvari, Z., Kaley, G., de Cabo, R., Sonntag, W. E. & Csiszar, A. Mechanisms of Vascular Aging: New Perspectives. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **65A**, 1028–1041 (2010).
7. Bautista-Niño, P., Portilla-Fernandez, E., Vaughan, D., Danser, A. & Roks, A. DNA Damage: A Main Determinant of Vascular Aging. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 748 (2016).
8. Kumar, R. G., Spurthi, M. K., Kumar, K. G., Sahu, S. K. & Rani, S. H. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism G298T in association with oxidative DNA damage in coronary atherosclerosis. *J. Genet.* **91**, 349–52 (2012).
9. Montezano, A. C. *et al.* Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can. J. Cardiol.* **31**, 631–41 (2015).
10. Poljsak, B., Šuput, D. & Milisav, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 956792 (2013).
11. Krajcovicová-Kudlácková, M., Valachovicová, M., Pauková, V. & Dusinská, M. Effects of diet and age on oxidative damage products in healthy subjects. *Physiol. Res.* **57**, 647–51 (2008).
12. Navarro, J. A. *et al.* Reduced levels of potential circulating biomarkers of cardiovascular diseases in apparently healthy vegetarian men. *Clin. Chim. Acta.* **461**, 110–3 (2016).
13. Tangney, C. C. DASH and Mediterranean-Type Dietary Patterns to Maintain Cognitive Health. *Curr. Nutr. Rep.* **3**, 51–61 (2014).

14. de Lorgeril, M. & Salen, P. The Mediterranean-style diet for the prevention of cardiovascular diseases. *Public Health Nutr.* **9**, 118–23 (2006).
15. Soare, A., Weiss, E. P. & Pozzilli, P. Benefits of caloric restriction for cardiometabolic health, including type 2 diabetes mellitus risk. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **30**, 41–47 (2014).
16. Montonen, J. *et al.* Consumption of red meat and whole-grain bread in relation to biomarkers of obesity, inflammation, glucose metabolism and oxidative stress. *Eur. J. Nutr.* **52**, 337–45 (2013).
17. Romeu, M. *et al.* Diet, iron biomarkers and oxidative stress in a representative sample of Mediterranean population. *Nutr. J.* **12**, 102 (2013).
18. Belinova, L. *et al.* Differential acute postprandial effects of processed meat and isocaloric vegan meals on the gastrointestinal hormone response in subjects suffering from type 2 diabetes and healthy controls: a randomized crossover study. *PLoS One* **9**, e107561 (2014).
19. STAHLER, C. The Vegetarian Resource Group website. How often do Americans eat vegetarian meals? And how many adults in the US are vegetarian? (2012). Available at: <http://www.vrg.org/blog/2012/05/18/how-often-do-americans-eat-vegetarian-meals-and-how-many-adults-in-the-u-s-are-vegetarian/>. (Accessed: 10th July 2019)
20. INTELIGÊNCIA, I. 14% da população se declara vegetariana. (2018). Available at: <http://www.ibopeinteligencia.com/noticias-e-pesquisas/14-da-populacao-se-declara-vegetariana/>. (Accessed: 10th July 2019)
21. Buava, M. Segunda sem carne. O que é a campanha? *Sociedade Vegetariana Brasileira (SVB)* (2018). Available at: <http://www.segundasemcarne.com.br/o-que-e-a-campanha/>. (Accessed: 10th July 2019)
22. Craig, W. J., Mangels, A. R. & American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: vegetarian diets. *J. Am. Diet. Assoc.* **109**, 1266–82 (2009).
23. VEGETARIANA, N., N. Parecer do CRN-3 sobre dietas vegetarianas. (2012). Available at: <http://www.nutriveg.com.br/parecer-do-crn-3-sobre-dietas-vegetarianas-2012.html>. (Accessed: 10th July 2019)
24. McEvoy, C. T. & Woodside, J. V. 2.9 Vegetarian Diets. in *World review of nutrition and dietetics* **113**, 134–138 (2015).
25. Vegetarianismo. *Sociedade Vegetariana Brasileira (SVB)* Available at: <https://www.svb.org.br/vegetarianismo1>. (Accessed: 16th September 2019)
26. Li, D. Chemistry behind Vegetarianism. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 777–84 (2011).
27. Cullum-Dugan, D. & Pawlak, R. Position of the academy of nutrition and dietetics: vegetarian diets. *J. Acad. Nutr. Diet.* **115**, 801–10 (2015).
28. Benzie, I. F. F. & Wachtel-Galor, S. Vegetarian diets and public health: biomarker and redox connections. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 1575–91 (2010).

29. Cappuccio, F. P. *et al.* Homocysteine levels in men and women of different ethnic and cultural background living in England. *Atherosclerosis* **164**, 95–102 (2002).
30. Mezzano, D. *et al.* Cardiovascular risk factors in vegetarians. Normalization of hyperhomocysteinemia with vitamin B(12) and reduction of platelet aggregation with n-3 fatty acids. *Thromb. Res.* **100**, 153–60 (2000).
31. Appleby, P. N., Davey, G. K. & Key, T. J. Hypertension and blood pressure among meat eaters, fish eaters, vegetarians and vegans in EPIC-Oxford. *Public Health Nutr.* **5**, 645–54 (2002).
32. Fraser, G. E., Orlich, M. J. & Jaceldo-Siegl, K. Studies of chronic disease in Seventh-day Adventists. *Int. J. Cardiol.* **184**, 573 (2015).
33. Fraser, G. *et al.* Vegetarian diets and cardiovascular risk factors in black members of the Adventist Health Study-2. *Public Health Nutr.* **18**, 537–45 (2015).
34. Le, L. & Sabaté, J. Beyond Meatless, the Health Effects of Vegan Diets: Findings from the Adventist Cohorts. *Nutrients* **6**, 2131–2147 (2014).
35. Donaldson, A. N. THE RELATION OF PROTEIN FOODS TO HYPERTENSION. *Cal. West. Med.* **24**, 328–31 (1926).
36. McDougall, J. *et al.* Effects of 7 days on an ad libitum low-fat vegan diet: the McDougall Program cohort. *Nutr. J.* **13**, 99 (2014).
37. Wang, F. *et al.* Effects of Vegetarian Diets on Blood Lipids: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J. Am. Heart Assoc.* **4**, e002408 (2015).
38. Lin, C. L., Fang, T. C. & Gueng, M. K. Vascular dilatory functions of ovo-lactovegetarians compared with omnivores. *Atherosclerosis* **158**, 247–51 (2001).
39. Acosta-Navarro, J. *et al.* Reduced subclinical carotid vascular disease and arterial stiffness in vegetarian men: The CARVOS Study. *Int. J. Cardiol.* **230**, 562–566 (2017).
40. Satta, S., Mahmoud, A. M., Wilkinson, F. L., Yvonne Alexander, M. & White, S. J. The Role of Nrf2 in Cardiovascular Function and Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 9237263 (2017).
41. Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95 (2002).
42. Somannavar, M. S. & Kodliwadmth, M. V. Correlation between oxidative stress and antioxidant defence in South Indian urban vegetarians and non-vegetarians. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **16**, 351–4 (2012).
43. Vanacore, D. *et al.* Effect of restriction vegan diet's on muscle mass, oxidative status, and myocytes differentiation: A pilot study. *J. Cell. Physiol.* **233**, 9345–9353 (2018).
44. Haldar, S. *et al.* Influence of habitual diet on antioxidant status: a study in a population of vegetarians and omnivores. *Eur. J. Clin. Nutr.* **61**, 1011–22 (2007).
45. Chung, H.-T., Pae, H.-O. & Cha, Y.-N. Role of heme oxygenase-1 in vascular disease.

- Curr. Pharm. Des.* **14**, 422–8 (2008).
46. Tenhunen, R., Marver, H. S. & Schmid, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **61**, 748–755 (1968).
  47. Idriss, N. K., Blann, A. D. & Lip, G. Y. H. Hemoxygenase-1 in Cardiovascular Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **52**, 971–978 (2008).
  48. Haines, D. D. & Tosaki, A. Role of Heme Oxygenases in Cardiovascular Syndromes and Co-morbidities. *Curr. Pharm. Des.* **24**, 2322–2325 (2018).
  49. Ayer, A., Zarjou, A., Agarwal, A. & Stocker, R. Heme Oxygenases in Cardiovascular Health and Disease. *Physiol. Rev.* **96**, 1449–1508 (2016).
  50. Chen, B., Lu, Y., Chen, Y. & Cheng, J. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *J. Endocrinol.* **225**, R83–R99 (2015).
  51. Cebová, M., Košútová, M. & Pecháňová, O. Cardiovascular effects of gasotransmitter donors. *Physiol. Res.* **65**, S291–S307 (2016).
  52. Luo, Y. *et al.* Dihydromyricetin protects human umbilical vein endothelial cells from injury through ERK and Akt mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Apoptosis* **22**, 1013–1024 (2017).
  53. Ishikado, A. *et al.* Willow bark extract increases antioxidant enzymes and reduces oxidative stress through activation of Nrf2 in vascular endothelial cells and *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 1506–1515 (2013).
  54. Ungvari, Z. *et al.* Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **292**, H2417–H2424 (2007).
  55. Canali, R. *et al.* A novel model to study the biological effects of red wine at the molecular level. *Br. J. Nutr.* **97**, 1053–1058 (2007).
  56. Rubiolo, J. A., Mithieux, G. & Vega, F. V. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: *Eur. J. Pharmacol.* **591**, 66–72 (2008).
  57. Markovitch, D. *et al.* Lycopene supplementation (passata sauce) reduces apoptosis but does not affect oxidant-responsive heme oxygenase-1 in human lymphocytes. *Nutrition* **25**, 668–675 (2009).
  58. de Cabo, R. *et al.* An in vitro model of caloric restriction. *Exp. Gerontol.* **38**, 631–9 (2003).
  59. Allard, J. S. *et al.* In Vitro Cellular Adaptations of Indicators of Longevity in Response to Treatment with Serum Collected from Humans on Calorie Restricted Diets. *PLoS One* **3**, e3211 (2008).
  60. Csiszar, A. *et al.* Caloric restriction confers persistent anti-oxidative, pro-angiogenic, and anti-inflammatory effects and promotes anti-aging miRNA expression profile in cerebromicrovascular endothelial cells of aged rats. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **307**, H292–H306 (2014).
  61. Blackburn, E. H., Epel, E. S. & Lin, J. Human telomere biology: A contributory and



- interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science* **350**, 1193–8 (2015).
62. Turner, K., Vasu, V. & Griffin, D. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells* **8**, 73 (2019).
  63. Aviv, A. & Levy, D. Telomeres, atherosclerosis, and the hemothelium: the longer view. *Annu. Rev. Med.* **63**, 293–301 (2012).
  64. Yeh, J.-K. & Wang, C.-Y. Telomeres and Telomerase in Cardiovascular Diseases. *Genes (Basel)*. **7**, 58 (2016).
  65. Houben, J. M. J., Moonen, H. J. J., van Schooten, F. J. & Hageman, G. J. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 235–46 (2008).
  66. Chen, S. *et al.* Short leukocyte telomere length predicts incidence and progression of carotid atherosclerosis in American Indians: the Strong Heart Family Study. *Aging (Albany, NY)*. **6**, 414–27 (2014).
  67. Toupance, S. *et al.* Short Telomeres, but Not Telomere Attrition Rates, Are Associated With Carotid Atherosclerosis. *Hypertension* **70**, 420–425 (2017).
  68. Demissie, S. *et al.* Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging Cell* **5**, 325–30 (2006).
  69. Zgheib, N. K. *et al.* Short Telomere Length is Associated with Aging, Central Obesity, Poor Sleep and Hypertension in Lebanese Individuals. *Aging Dis.* **9**, 77–89 (2018).
  70. Mukherjee, M., Brouillette, S., Stevens, S., Shetty, K. R. & Samani, N. J. Association of shorter telomeres with coronary artery disease in Indian subjects. *Heart* **95**, 669–73 (2009).
  71. Booth, S. A. & Charchar, F. J. Cardiac telomere length in heart development, function, and disease. *Physiol. Genomics* **49**, 368–384 (2017).
  72. Zhang, J. *et al.* Ageing and the telomere connection: An intimate relationship with inflammation. *Ageing Res. Rev.* **25**, 55–69 (2016).
  73. Lian, F. *et al.* Effect of vegetable consumption on the association between peripheral leucocyte telomere length and hypertension: a case-control study. *BMJ Open* **5**, e009305–e009305 (2015).
  74. Crous-Bou, M. *et al.* Mediterranean diet and telomere length in Nurses' Health Study: population based cohort study. *BMJ* **349**, g6674 (2014).
  75. Lopez-Garcia, E. *et al.* Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 1029–35 (2004).
  76. Rafie, N., Golpour Hamedani, S., Barak, F., Safavi, S. M. & Miraghajani, M. Dietary patterns, food groups and telomere length: a systematic review of current studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* **71**, 151–158 (2017).

77. Kasielski, M., Eusebio, M.-O., Pietruczuk, M. & Nowak, D. The relationship between peripheral blood mononuclear cells telomere length and diet - unexpected effect of red meat. *Nutr. J.* **15**, 68 (2016).