



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAROLINE MORAES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO MARCADOR DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL VCAM-1 EM
INDIVÍDUOS SADIOS ADEPTOS À DIETA VEGETARIANA E ONÍVORA**

BOTUCATU

2020

CAROLINE MORAES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO MARCADOR DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL VCAM-1 EM
INDIVÍDUOS SADIOS ADEPTOS À DIETA VEGETARIANA E ONÍVORA**

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas, sob orientação da Professora Doutora Valéria Cristina Sandrim.

BOTUCATU
2020

CAROLINE MORAES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO MARCADOR DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL VCAM-1 EM
INDIVÍDUOS SADIOS ADEPTOS À DIETA VEGETARIANA E ONÍVORA**

BOTUCATU
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pereira, Caroline Moraes.

Avaliação do marcador de disfunção endotelial VCAM-1 em indivíduos saudáveis adeptos às dietas vegetariana e onívora / Caroline Moraes Pereira. - Botucatu, 2022

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Valéria Cristina Sandrim
Capes: 21000000

1. Aterosclerose. 2. Biomarcadores. 3. Dieta vegetariana. 4. Endotélio.

Palavras-chave: Aterosclerose; Biomarcador; Dieta vegetariana; Disfunção endotelial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto de Biociências, ao Departamento de Farmacologia e ao Laboratório pela oportunidade de desenvolver uma pesquisa partilhando do espaço e de companhia incríveis, em especial à Carolina, que sempre acolheu minhas dúvidas com carinho e atenção. E à minha orientadora Profa. Dra. Valéria Cristina Sandrim, que me ensinou para além da ciência.

Às minhas companheiras de vida, Giulia e Luiza, que junto comigo construíram um segundo ninho que permitisse meu primeiro vôo. Estar solo é lindo mas não se compara a companhia de vocês.

À todos os amigos que cultivei em Botucatu, nossas lembranças nunca serão esquecidas. Ao Sandro, que apesar dos mil e tantos quilômetros que nos separam, manteve o coração quente e perto.

À toda minha família, pelo suporte e cuidado, em especial à minha mãe, que por vezes foi forte e corajosa por nós duas juntas. Você me ensinou que o divino tem rosto de mulher.

E à todas as versões de mim mesma que fui até aqui.

RESUMO

Pesquisas indicam um melhor perfil cardiometabólico em indivíduos adeptos à dieta vegetariana quando comparados aos onívoros. Entretanto, os mecanismos moleculares da influência da dieta ainda não estão esclarecidos. Postula-se que uma das vias dessa interação possa estar relacionada à produção de alguns biomarcadores endoteliais envolvidos no processo aterosclerótico. Nesse contexto, as moléculas de adesão podem interferir no desenvolvimento da placa aterogênica e sua produção pode estar relacionada às características qualitativas e quantitativas da dieta. O presente trabalho buscou realizar um screening Luminex Magpix Assay para eleição de possíveis biomarcadores de risco cardiovascular entre homens saudáveis vegetarianos e onívoros. Além de quantificar e comparar os níveis plasmáticos da proteína 1 de adesão celular vascular (VCAM-1, do inglês *vascular cell adhesion protein 1*) de 44 vegetarianos e 44 onívoros, aparentemente saudáveis, reunidos no estudo CARVOS (Carotid atherosclerosis and arterial stiffness in vegetarians and omnivorous subjects), realizado pelo Instituto do Coração (InCor) em São Paulo, Brasil, para determinação de um padrão aumentado ou diminuído de acordo com o perfil dietético do indivíduo e ainda correlacionar aos parâmetros clínicos IMT e de velocidade de onda de pulso (VOP), do perfil lipídico e da hsPCR (*high sensitivity protein C reactive*). Todavia, a distribuição das concentrações fora similar entre os grupos, o que pode ser explicado pelo perfil da população selecionada.

Palavras-chave: VCAM, vegetarianismo, plant-based, aterosclerose, moléculas de adesão

ABSTRACT

Researches indicate a better cardiometabolic profile in individuals adhering to the vegetarian diet when compared to omnivores. However, the molecular mechanisms of dietary influence are still unclear. It's postulated that one of the pathways of this interaction may be related to the production of some endothelial biomarkers involved in the atherosclerotic process. In this context, adhesion molecules can interfere with the development of atherogenic plaque and their production may be related to the qualitative and quantitative characteristics of the diet. The present study sought to conduct a Luminex Magpix Assay screening to select possible biomarkers of cardiovascular risk among healthy vegetarian and omnivorous men. In addition to quantifying and comparing plasma levels of vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1), 44 vegetarians and 44 omnivores, apparently healthy, gathered in the study CARVOS (Carotid atherosclerosis and arterial stiffness in vegetarians and omnivorous subjects), carried out by Instituto do Coração (InCor) in São Paulo, Brazil, to determine an increased or decreased pattern according to the individual's dietary profile and also correlate with clinical IMT parameters and pulse wave velocity (VOP), lipid profile and hsPCR (high sensitivity protein C reactive). However, the distribution of concentrations was similar between groups, which can be explained by the profile of the selected population.

Keywords: VCAM, vegetarianism, plant-based, atherosclerosis, adhesion molecules;

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	10
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
OBJETIVO	21
MATERIAIS E MÉTODOS	21
ESTATÍSTICA	23
RESULTADOS	24
DISCUSSÃO	33

ABREVIATURAS

ApoB	Apoproteína B
DIC	Doença Isquêmica Cardíaca
DM	Diabetes Mellitus
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL	do inglês <i>High Density Lipoprotein</i>
ICAM-1	do inglês <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
IMT	do inglês <i>Intima-media Thickness</i>
LDL	do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i>
MCP-1	do inglês <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MRFIT	do inglês <i>Multiple Risk Factor Intervention Trial</i>
NO	do inglês <i>Nitric Oxide</i>
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAI-1	do inglês <i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	Proteína C Reativa

VCAM-1	do inglês <i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VOP	Velocidade da Onda de Pulso

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O processo aterosclerótico, condição em que ocorre o acúmulo de gordura nas paredes vasculares, frequentemente se desenvolve sem manifestações clínicas, de forma que só é detectado mediante um evento cardiovascular maior. Os estudos de Framingham, Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) e PROCAM, em 1948, 1973 e 2002 respectivamente, demonstraram fatores de risco independentes para progressão da aterosclerose. Também encontraram correlações nas dislipidemias, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diabetes mellitus (DM). Além desses, foram descritos fatores predisponentes como obesidade, sedentarismo, etnia e histórico precoce de Doença Isquêmica Cardíaca (DIC), e fatores condicionais, como triglicérides, LDL pequeno e denso, fibrinogênio, lipoproteína(a) e homocisteína (CERVATO, AM et al, 1997) (Mustad, VA, Kris-Etherton, PM, 2001).

Em estudos recentes, têm sido relatados que os hábitos alimentares têm importante efeito modulador sobre as doenças cardiovasculares. Delgado & Cano (1996), observaram tal associação na caracterização de grupos com dietas diferentes e seu perfil cardiometabólico. Dentre os principais padrões dietéticos já estudados, a comparação entre indivíduos com consumo frequente de produtos de origem animal e indivíduos com exclusão total ou parcial desses produtos e maior consumo daqueles de origem vegetal demonstrou resultados positivos para o grupo vegetariano quanto a cardioproteção (Tong et al, 2019) .

Sendo assim, a composição percentual dos alimentos de origem animal na dieta parece estar correlacionado com as doenças cardiovasculares. Tong et al (2019) mostraram que o consumo rotineiro de carne e produtos lácteos, característico da dieta ocidental, está relacionado ao aumento do colesterol sérico. Por outro lado, o vegetarianismo apresenta-se como uma dieta rica em vegetais, grãos, legumes e leguminosas e baixo consumo das chamadas “calorias vazias” e gordura saturada. Estudos demonstraram uma incidência 16% menor de doença cardiovascular, um risco 32% menor de mortalidade cardiovascular e um risco 25% menor de mortalidade por todas as causas às dietas da categoria “Plant-Based” (HYNKU, K et

al, 2019), que abrangem hábitos alimentares que, de fato, baseiam-se no consumo de vegetais.

Ainda que a constituição quantitativa do percentual de gordura na composição dietética demonstre influência sobre o perfil cardiometabólico, a constituição qualitativa apresenta maior destaque nesse sentido. Isso porque, mediante a substituição da gordura saturada pela insaturada, observa-se a redução dos níveis séricos de lipídios e colesterol maior do que a observada quando a saturada é restrita (DEWAILLY, E et al, 2001; DJOSSÉ, L et al., 2001).

O potencial modulatório da dieta sobre coeficientes predisponentes ou protetores de doenças crônicas e agudas tem sido estudado nos últimos anos (LA, DAVID et al, 2014; TURNBAUGH, PJ et al, 2009). Essa possível proteção conferida pela prevenção dietética é, no entanto, plástica, podendo ser revertida pouco tempo após a adoção de uma dieta caracterizada pelo pobre consumo de leguminosas e rica em calorias e gordura saturada (Oliveira SP, Tahin QS & Cavalcanti TC, 1991).

O estabelecimento de uma relação entre características qualitativas e quantitativas da dieta e ocorrência de enfermidades crônicas não-transmissíveis permite a definição de estratégias nutricionais de prevenção e tratamento. Tendo em vista que modificações na quantidade e qualidade da composição lipídica da dieta promovem alterações nos níveis plasmáticos de colesterol (FORNES NS, et al, 2000; GUEDES DP, GUEDES JERP, 2001). A dietoterapia pode ser utilizada como estratégia na prevenção primária (doença não estabelecida), secundária (apresentação de fatores de risco) e terciária (manejo da doença diagnosticada).

Conforme supracitado, segundo a literatura vigente, evidências apontam que indivíduos que adotam uma dieta vegetariana apresentam um melhor perfil cardiometabólico, com riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares inferiores quando comparados aos onívoros, incluindo aterosclerose (KM, Lara et al, 2019). Os mecanismos moleculares do impacto de diferentes perfis dietéticos não estão completamente elucidados. Entretanto, especula-se que o comportamento

alimentar pode afetar a produção de alguns biomarcadores endoteliais envolvidos no processo aterosclerótico (YOKOYAMA, Y et al, 2014). Essa hipótese deve-se a determinante função exercida pelo endotélio no controle da homeostase vascular, regulando sinais intracelulares, permeabilidade, tônus, cascata de coagulação, agregação de leucócitos, entre outras.

Para executar esse controle, o endotélio sintetiza substâncias de atuação parácrina e autócrina. À vista disso, temos um rol de classes de proteínas que podem ser listadas como de importante destaque na apresentação dos diferentes perfis cardiovasculares. Nos casos de agressão à parede vascular, a resposta inflamatória desencadeada envolve disfunção das células endoteliais e recrutamento de diversos outros tipos celulares como linfócitos, monócitos, plaquetas e células musculares lisas. Esse processo pode culminar no enrijecimento da parede vascular e possível formação da placa aterosclerótica. (Laurent, S. et al, 1979)

A aterosclerose afeta principalmente as camadas internas e médias de pequenas artérias. Inicia-se com a ativação da cascata de adesão celular, levando ao aumento na expressão e liberação dessas moléculas, desencadeado pelo estímulo de citocinas pró-inflamatórias, lipopolissacarídeos bacterianos ou de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDL-ox) (Lopez-Garcia, E. et al; Zapolska-Downar et al.). Esse processo é protagonizado pelas selectinas, integrinas e membros da superfamília de imunoglobulinas como as moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1). Essas moléculas transmigram pelas junções endoteliais e permitem que a ligação célula-célula ou célula-matriz extracelular culmine na deposição de células espumosas no espaço subendotelial e consequente aumento da espessura do vaso ou completa obstrução do lúmen. (Watanabe, T. , Fan, J, 1998)

As selectinas promovem a retenção inicial dos leucócitos, que é intensificada frente a maior oferta de citocinas pró-inflamatórias e desencadeiam a ação das integrinas, receptores celulares presentes em células leucocitárias e responsáveis por mediar a formação dos primeiros aglomerados celulares. Esses receptores ligam-se a

proteínas de adesão, como ICAM-1 e VCAM-1. O receptor para VCAM-1 é predominantemente expresso em monócitos e linfócitos, característica que poderia influenciar seu papel no desenvolvimento da placa aterogênica (LANGER, H. F., CHAVAKIS, T, 2009).

O processo inflamatório envolve ainda uma redução da biodisponibilidade de vasodilatadores, como o óxido nítrico (do inglês *Nitric Oxide*, NO), e aumento de vasoconstritores. Uma vez que o comportamento da camada muscular do vaso é determinado pelas substâncias produzidas por seu endotélio, tamanho desse equilíbrio prejudica a vasodilatação dependente, agravando o quadro clínico (Sampaio, S A et al, 2017).

As células recrutadas durante o desenvolvimento do processo inflamatório vascular podem atuar secretando citocinas pró-inflamatórias que podem, nos hepatócitos, adipócitos e em células da musculatura lisa vascular, induzir a produção de proteína C reativa ou PCR, um marcador não específico de inflamação. As citocinas secretadas são ainda responsáveis pelo aumento da expressão de moléculas de adesão supracitadas, proteína quimiotática de monócitos do tipo 1 (MCP-1), endotelina e inibidor do ativador de plasminogênio (PAI), além de reduzir a biodisponibilidade de NO e induzir a diferenciação dos monócitos em macrófagos (Sampaio, S A et al, 2017).

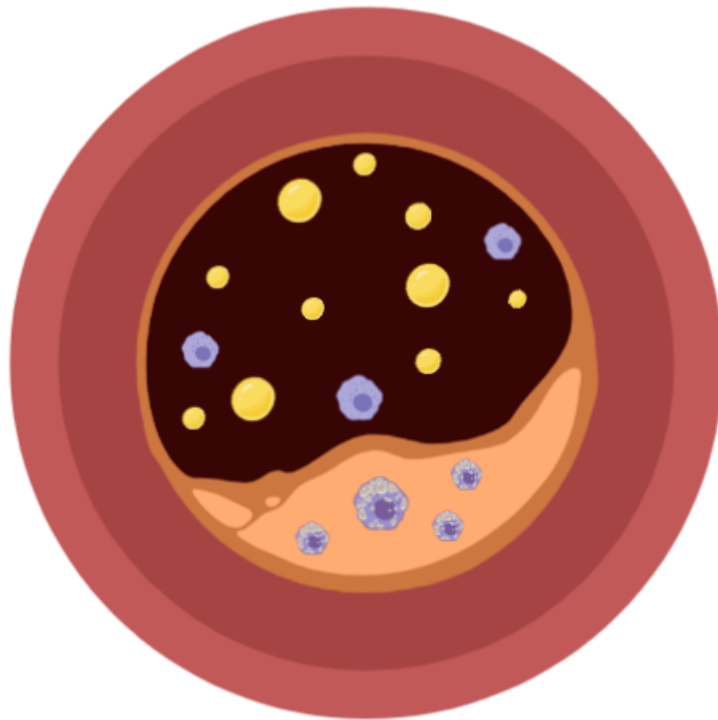


Figura 1 - Luz vascular de um vaso com aterosclerose apresentando a placa de gordura, macrófagos, lipídeos circulante e células espumosas.

O que acontece, então, é que essas citocinas liberadas atraem monócitos, que fagocitam o LDL oxidado, resultante do maior montante de gordura ingerida cronicamente (Ley, K, Huo, Y, 2001). A fagocitose resulta no acúmulo progressivo de lipídio dentro da célula e, conseqüentemente, acúmulo dessas células na camada íntima do vaso, formando a lesão inicial (**Figura 1**). Os monócitos nessa situação são chamados de células espumosas (*foam cells*) e são elas as responsáveis por constituir a placa aterosclerótica. O acúmulo de LDL-ox passa a ser também extracelular, formando “pools” de lipídeos na camada muscular elástica, deslocando continuamente a íntima e diminuindo a luz vascular.

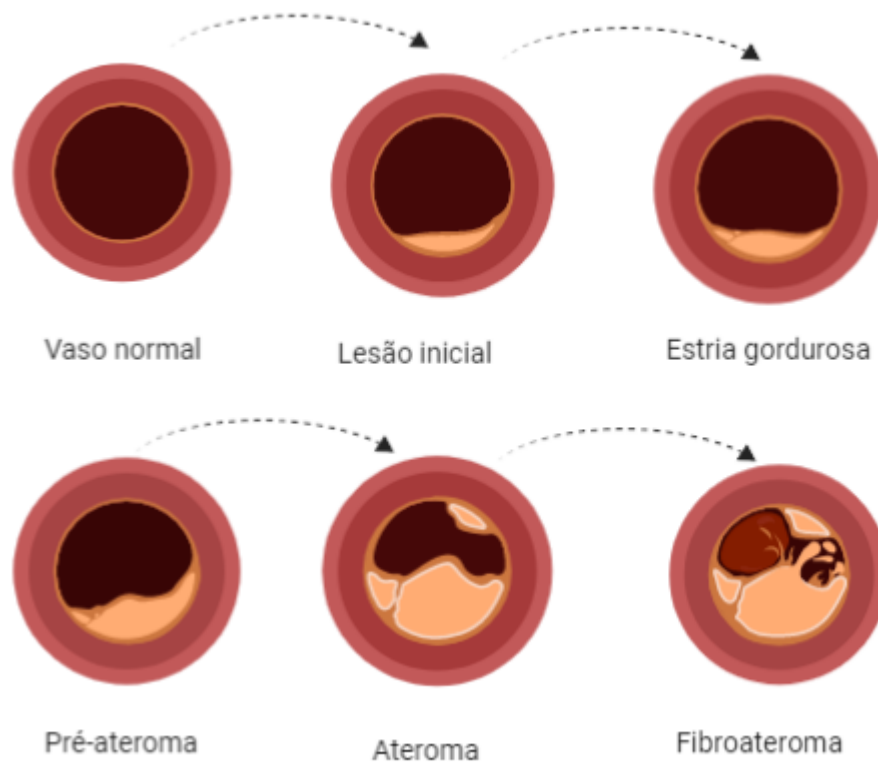


Figura 2 - Evolução da placa aterosclerótica.

A camada média também apresenta alterações adaptativas como hiperplasia e hipertrofia celular, crescendo células em número e tamanho para sustentar o ateroma. Com a evolução da placa (**Figura 2**), esse acúmulo extracelular de gordura passa a ser também composto por células necrosadas, colágeno e depósitos de cálcio, evoluindo a lesão para o estágio de fibroateroma. Observa-se a formação de capilares provenientes da camada adventícia e que permitem micro vazamentos de sangue, atraindo plaquetas e trombócitos, iniciando o possível processo de trombose (Stary HC, Chandler AB, Glagov S et al, 1999; Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE et al, 1994).

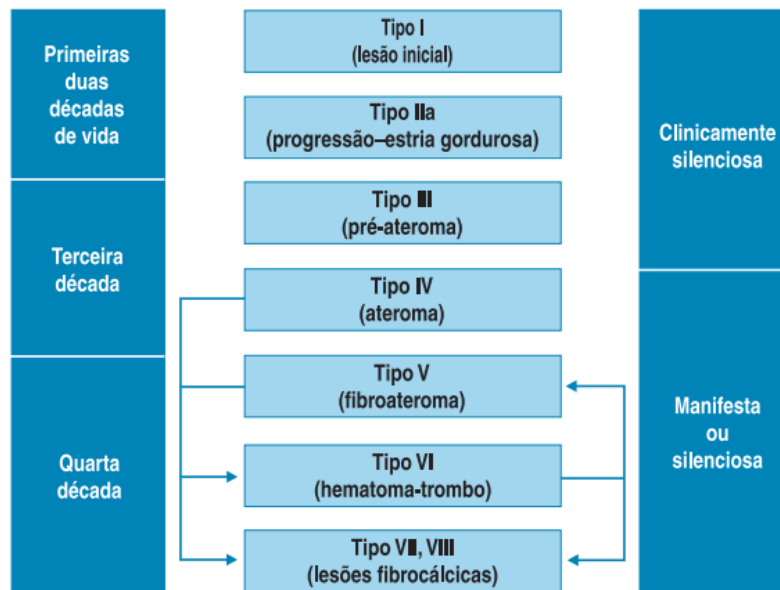


Figura 3 - Evolução das lesões ateroscleróticas e manifestações clínicas (Stary HC, 1999).

Os leucócitos podem ainda contribuir para a evolução da placa com o aumento da expressão de gelatinases como a MMP-9 e MMP-2, enzimas responsáveis pela clivagem de componentes de matriz extracelular e secretadas pelos macrófagos durante o processo inflamatório, progressivamente degradam os componentes colagenosos da cápsula fibrosa que envolve a placa, comprometendo sua estabilidade e a integridade da membrana basal do endotélio.

Entendendo a fisiopatologia da aterosclerose, descrita acima e ilustrada nas **Figuras 1, 2 e 3**, é possível compreender o decorrer do processo de evolução da placa de maneira clinicamente silenciosa. No entanto, observando as vias de evolução, podemos elencar marcadores e moléculas como agentes ativos que podem contribuir para um diagnóstico prévio à manifestação clínica.

No rastreamento de Doença Coronariana subclínica, estratificamos o risco coronariano de acordo com a análise conjunta das características do paciente. O Escore de Risco de Framingham é utilizado para definir a gravidade do risco e analisa fatores agravantes de risco (Assmann G, Cullen P, Schulte H, 2002). Além disso, agrega-se testes bioquímicos e busca de marcadores como a Proteína C

reativa (PCR), Escore de Cálcio e Angiotomografia Coronariana, Espessamento Mediointimal (EMI) ou IMT do inglês *intima-media thickness*, Hiper-homocisteinemia, Lipoproteína A – LP (a) (Ferreirós ER, Boissonet CP, Pizzaro R et al, 1999; Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP et al, 2003; Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D et al, 1998).

Um dos maiores estudos de corte já realizado envolveu 89.000 adventistas vegetarianos comparados aos semi vegetarianos e onívoros e demonstrou a diminuição progressiva da incidência de hipertensão, obesidade e diabetes conforme o maior consumo de alimentos de origem vegetal (Le, L. & Sabaté, J, 2014). De acordo com esses achados, outros estudos demonstraram um menor índice de massa corporal (IMC), colesterol da lipoproteína de baixa densidade (c-LDL), colesterol da lipoproteína de alta densidade (c-HDL). (Navarro, J. A. *et al.*, 2019, Wang, F. et al, 2015). Além de uma melhor resposta à dilatação vascular (Lin, C. L., Fang, T. C. & Gueng, M. K, 2001), menor velocidade de onda de pulso (VOP) e espessura intima-média da carótida (c-IMT, do inglês *carotid intima-media thickness*), outros marcadores de função vascular. (Acosta-Navarro, J. et al, 2017)

Assim sendo, pesquisas anteriores indicaram um melhor perfil cardiometabólico encontrado em indivíduos adeptos à dieta vegetariana quando comparados aos onívoros (KM, Lara et al, 2019; APPLEBY, N P et al, 2016; Kahleova, H., Levin, S. & Barnard, 2018). Com suporte em tais estudos e tendo em vista a aparente modulação dietética sobre o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, esperamos encontrar indícios dessas diferenças entre os perfis dietéticos apresentados através da análise de biomarcadores e parâmetros clínicos.

A fim de elencar os potenciais marcadores para aterosclerose em nosso trabalho utilizamos o ensaio Screening Luminex Magpix, que permite a avaliação da concentração de um vasto rol de substâncias. Neste trabalho foi analisado, dois principais grupos de analitos: moléculas de adesão como P-Selectina, sVCAM-1 e sICAM-1, e adipocinas, como Adiponectina, Resistina, Adipsina e o Inibidor 1 do ativador do plasminogênio (do inglês *plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1).

O teste *screening* consiste em um rastreamento para detecção de analitos de interesse em amostras biológicas, sendo aplicado em pesquisas e diagnóstico clínico. Por meio do ensaio é possível verificar a presença e concentração dos analitos acima selecionados, de forma que possibilite a caracterização do perfil mais predisposto ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Essa caracterização é possível devido ao importante papel biológico e patológico desempenhado por este conjunto de moléculas sobre a formação e estabilidade da placa aterogênica. Tendo em vista a problemática levantada anteriormente a respeito do diagnóstico tardio da aterosclerose, é de grande valia o estudo de biomarcadores com ação primária e constitutiva sobre placa.

Entendendo os hábitos alimentares como importante ferramenta na prevenção e no tratamento das doenças cardiovasculares, é importante elucidar os mecanismos moleculares da dieta na prevenção e tratamento. Nesse sentido, o foco do presente trabalho é o estudo da proteína de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e sua apresentação sérica no plasma de indivíduos de grupos diferentes dietéticos e sua relação com parâmetros clínicos e marcadores de função vascular, de forma que seja possível analisar o efeito da dieta vegetariana sobre o desenvolvimento da aterosclerose. A escolha deste biomarcador foi decorrente do primeiro passo deste estudo no qual rastreamos todas as moléculas descritas acima.

OBJETIVO

Realizar o *screening* para identificação prévia de biomarcadores de risco cardiovascular entre homens saudáveis vegetarianos e onívoros.

Quantificar e comparar os níveis plasmáticos de VCAM-1 entre vegetarianos e onívoros aparentemente saudáveis para determinação de um padrão aumentado ou diminuído de acordo com o perfil dietético do indivíduo,

Correlacionar estes níveis plasmáticos aos parâmetros clínicos IMT e de velocidade de onda de pulso (VOP), além do perfil lipídico e hsPCR (*high sensitivity protein C reactive*).

MATERIAIS E MÉTODOS

- Grupo amostral e mensurações bioquímicas

O grupo amostral foi reunido em estudo intitulado CARVOS (*Carotid atherosclerosis and arterial stiffness in vegetarians and omnivorous subjects*), realizado pelo Instituto do Coração (InCor) em São Paulo, Brasil, com aceite do comitê de ética local. Foram recrutados 745 indivíduos entre julho de 2013 e janeiro de 2014 através de interações sociais e internet.

A separação dos grupos se deu de acordo com os padrões dietéticos, caracterizando vegetarianos e onívoros. O critério de inclusão para o grupo vegetariano foi a exclusão de todos os tipos de carne dos hábitos alimentares por pelo menos 4 anos, abrangendo as categorias ovo-lacto-vegetariano, lacto-vegetariano e veganos. Por sua vez, o critério de inclusão para o grupo dos onívoros foi o consumo de qualquer tipo de carne em pelo menos 5 refeições em uma semana.

Dos 745 voluntários recrutados, 416 eram mulheres e foram excluídas pelo dimorfismo sexual derivado dos efeitos hormonais nos parâmetros clínicos e

bioquímicos. Os critérios de exclusão foram histórico de diabetes, dislipidemia, doença cardiovascular ou cerebrovascular, hipertensão ou administração de anti hipertensivos e tabagismo. Por fim, outros 241 homens foram excluídos após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão dietéticos.

O grupo amostral trabalhado será então, composto por indivíduos do gênero masculino aparentemente saudáveis e que seguem critérios de inclusão acima listados. Esses indivíduos serão divididos segundo seu padrão dietético, conforme supracitado, sendo 44 indivíduos onívoros e 44 indivíduos vegetarianos.

As amostras de sangue foram coletadas com tubos contendo ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) e, após 10-12h horas, imediatamente centrifugados e armazenados a -80°C até seu uso.

- Screening Luminex Magpix Assay

Para análise prévia de potenciais biomarcadores para aterosclerose, selecionamos 16 amostras randomicamente a partir das 88 amostras da nossa população, 8 de indivíduos vegetarianos e 8 de onívoros, para participar do teste Screening Luminex Magpix.

A reação consiste em um imunoenensaio à base de esferas magnéticas, com a adição da amostra a uma mistura de *beads* codificadas por cor e pré-revestidas com anticorpos de captura específicos para o analito. Esses anticorpos se ligam aos analitos de interesse formando um conjunto que, por sua vez, será alvo de anticorpos de detecção biotinilados específicos, formando um sanduíche anticorpo-antígeno.

A estreptavidina conjugada com ficoeritrina (PE) é adicionada e liga-se aos anticorpos de detecção biotinilados. As esferas são então lidas pelo Luminex MAGPIX® Analyzer, um instrumento de detecção baseado na captura das *beads* por um ímã, mantendo-as em uma monocamada, enquanto dois diodos emissores de luz

(LEDs) distintos espectralmente as iluminam. Assim, um LED identifica o analito detectado e o segundo determina a magnitude do sinal derivado de PE.

- Mensuração da carotid intima-media thickness (IMT)

A análise das propriedades funcionais e anatômicas da carótida direita foi realizada por um dispositivo ultrassom que atua como um sistema de rastreamento do eco na parede vascular (Wall-Track System, PieMedical, Maastricht, Países Baixos), conforme descrito por Acosta-Navarro.

Todos os sujeitos foram submetidos ao ultrassom vascular convencional do modo B da artéria carótida extracraniana. A artéria carótida comum foi obtida 2 cm abaixo da bifurcação carotídea e foram realizadas as medidas de IMT e diâmetro; variação sistólica-diastólica da carótida batida a batida, o percentual dessa variação sistólico-diastólica considerou a distensibilidade relativa.

- Mensuração da Velocidade da Onda de Pulso (VOP)

Os experimentos de mensuração de VOP foram performados conforme descrito por Acosta-Navarro, com o valor obtido da carótida comum e artéria femoral por um tradutor sensível de pressão. A distância (D) entre os dois sítios é medida e a onda calculada através da definição $VOP=D/t$ onde (t) representa o tempo de trânsito do pulso.

ESTATÍSTICA

O software utilizado para análise dos dados foi o Graph Prism 6.0. Para comparação entre os dois grupos, serão realizados t-testes. Os coeficientes de correlação de Pearson e Spearman serão utilizados para determinar a relação entre os níveis plasmáticos de VCAM-1 em amostras e os parâmetros clínicos e bioquímicos para dados com distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente. As variáveis envolvidas no desenvolvimento de doenças cardiovasculares como idade, IMC, perfil lipídico e hsPCR foram incluídas como variáveis independentes na análise de regressão linear múltipla.

RESULTADOS

A partir de um vasto rol de substâncias verificamos e comparamos os níveis plasmáticos dos analitos de interesse nos dois grupos dietéticos. Para isso foram analisado dois principais grupos de analitos, as moléculas de adesão como P-Selectina, sVCAM-1 e sICAM-1, e adipocinas, como Adiponectina, Resistina, Adipsina e o PAI-1. Após o rastreamento, observou-se uma distribuição similar de concentração quanto as adipocinas e P-selectina e ICAM-1. Porem uma diferença expressiva quanto a VCAM-1 (**Figura 4**).

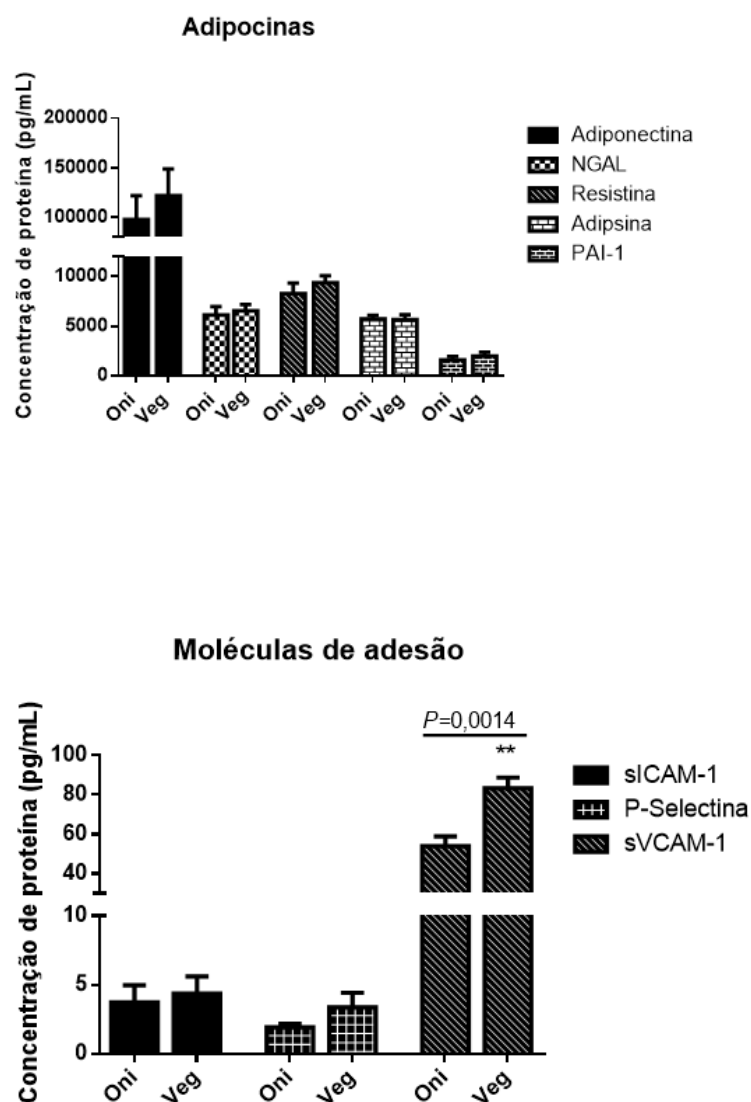


Figura 4. Relação da concentração de moléculas de adesão presentes nas amostras dos subgrupos de vegetarianos (Veg) e onívoros (Oni) analisadas pelo screening MagPix. Os valores estão

expressos como média e erro padrão. Foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$, Mann Whitney test, GraphPad Prism software).

Esse subgrupo amostral, utilizado para o ensaio de screening, tem seus parâmetros clínicos demonstrados na **Tabela 1**. Para uma melhor caracterização do perfil de maior predisposição ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, optou-se por investigar apresentação plasmática dessa molécula de adesão em um número amostral maior, analisando o restante do grupo.

Tabela 1 - Parâmetros clínicos do subgrupo amostral para screening. Os dados paramétricos estão apresentados na forma média \pm desvio padrão e os não paramétricos estão apresentados como mediana \pm desvio padrão. Os dados que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$, *Pearson test*) estão identificados pelo (*), os demais não apresentaram ($p > 0,05$, *T test*). Abreviações: IMC (índice de massa corporal), IMT (do inglês *intima-media thickness*), VOP (velocidade de onda de pulso), PAD (pressão arterial diastólica), PAS (pressão arterial sistólica), hsPCR (proteína C reativa), ApoB (apoproteína B), HDL (do inglês *high density lipoprotein*), LDL (do inglês *Low Density Lipoprotein*).

	Vegetarianos (N=8)	Onívoros (N=8)
Idade (anos)	45,00 \pm 7,00	47,00 \pm 9,00
Peso (kg)	79,43 \pm 12,90 (*)	72,23 \pm 8,98
IMC (kg/m²)	24,01 \pm 3,15	26,55 \pm 3,91
IMT (mm)	569,40 \pm 62,70	628,80 \pm 136,60 (*)
VOP (m/s)	7,22 \pm 0,64 (*)	7,23 \pm 0,93
PAD (mmHg)	82,38 \pm 13,86	79,63 \pm 17,63
PAS (mmHg)	128,60 \pm 14,47	126,00 \pm 13,00
hsPCR (mg/dL)	3,57 \pm 6,02	1,88 \pm 2,06
ApoB (mg/L)	0,80 \pm 0,30 (*)	0,95 \pm 0,29
HDL (mg/dL)	49,63 \pm 7,37	45,13 \pm 5,62
LDL (mg/dL)	100,50 \pm 29,98	128,60 \pm 44,82
Não-HDL (mg/dL)	119 \pm 41,08	147,9 \pm 48,17

Para melhor entendimento respeito dos dados obtidos pelo *screening* e pelo Elisa, foi analisado o grupo de 16 indivíduos anterior aos demais. A distribuição dos níveis plasmáticos de VCAM-1 no plasma dos dois grupos encontram-se na **Figura 5**.

Comparação da concentração de VCAM-1 no plasma de vegetarianos e onívoros

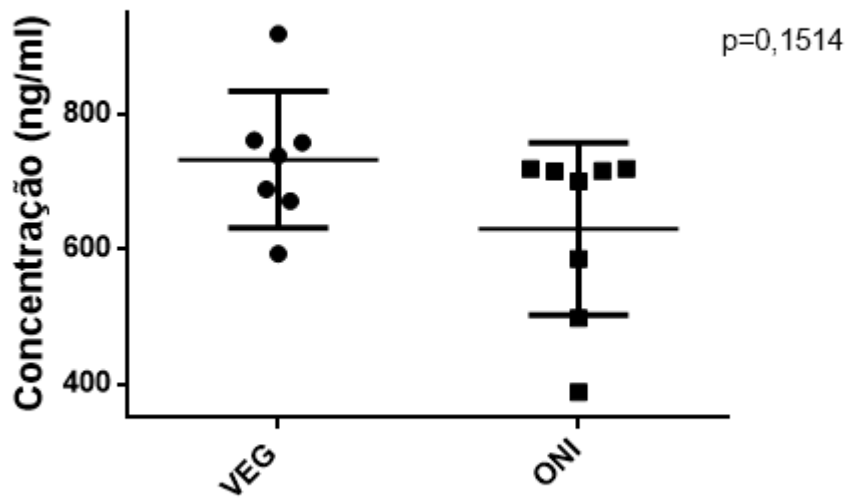


Figura 5 - Comparação da concentração de VCAM-1 no plasma dos 8 vegetarianos e 8 onívoros selecionados para screening. Não foi demonstrada diferença estatística significativa entre os grupos ($p>0,05$, Mann Whitney test, GraphPad Prism software).

Correlacionando dados e parâmetros clínicos da subamostra, encontramos que o IMC demonstrou correlação positiva com a concentração de VCAM-1 em vegetarianos (**Figura 6A**) e negativa para onívoros (**Figura 6B**). O IMT demonstrou correlação negativa em ambos os grupos (**Figura 7A** e **Figura 7B**).

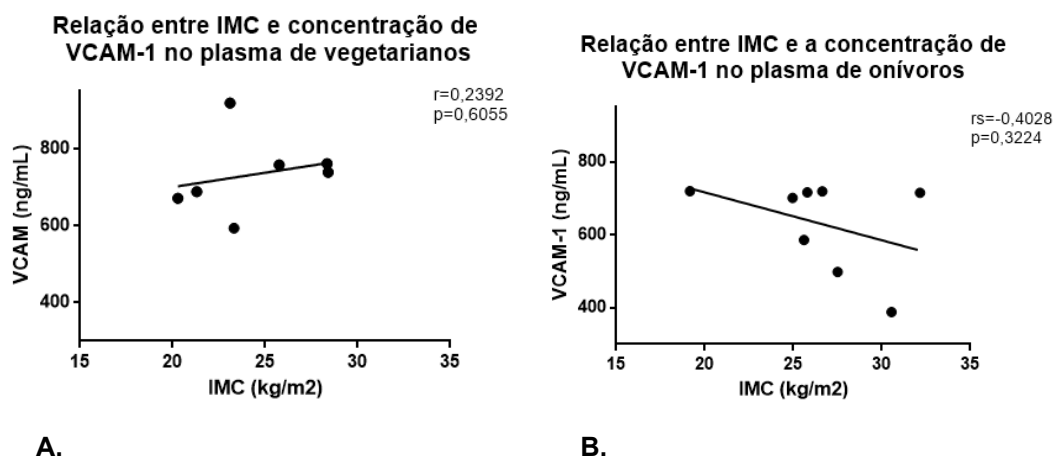
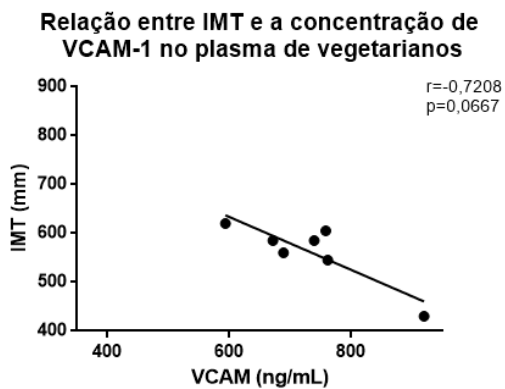
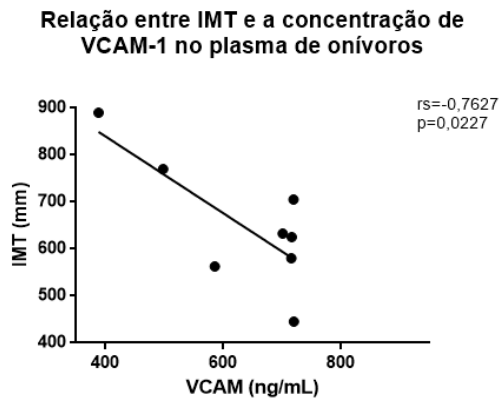


Figura 6. Relação entre IMC e concentração de VCAM-1 no plasma de vegetarianos e onívoros da subamostra, respectivamente. A diferença estatística significativa entre os grupos não foi demonstrada entre onívoros ($p>0,05$, Spearman test) e vegetarianos ($p>0,05$, Pearson test).



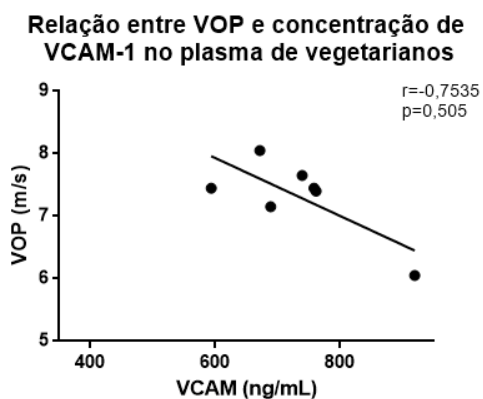
A.



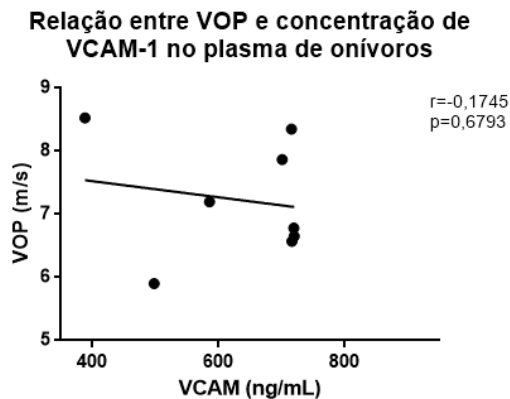
B.

Figura 7. Relação entre IMT e concentração de VCAM-1 no plasma de vegetarianos (7A) e onívoros (7B) da subamostra, respectivamente. A diferença estatística significativa entre os grupos não foi demonstrada entre vegetarianos ($p > 0,05$, *Pearson test*) mas foi entre onívoros ($p < 0,05$, *Spearman test*).

O VOP também demonstrou correlação negativa com VCAM-1 plasmática entre os vegetarianos (**Figura 8A**), mas foi negativa entre os onívoros (**Figura 8A**). A concentração de LDL, por sua vez, apresentou resultados divergentes entre os grupos, com correlação positiva para vegetarianos (**Figura 9A**) e correlação negativa para onívoros (**Figura 9B**).

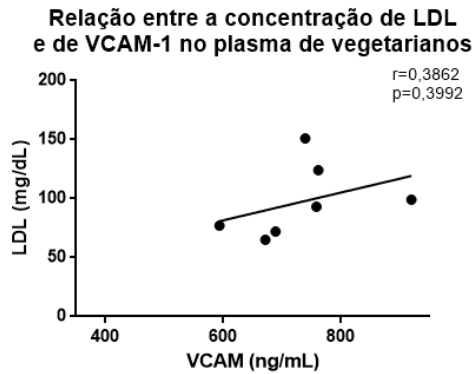


A.

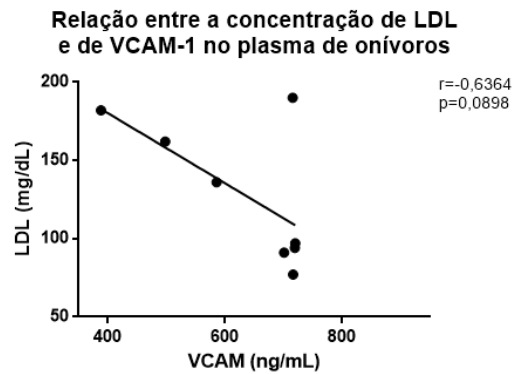


B.

Figura 8. Relação entre VOP e concentração de VCAM-1 no plasma de vegetarianos (8A) e onívoros (8B) da subamostra, respectivamente. A diferença estatística significativa entre vegetarianos e onívoros não foi demonstrada (*Pearson test*, $p > 0,05$).



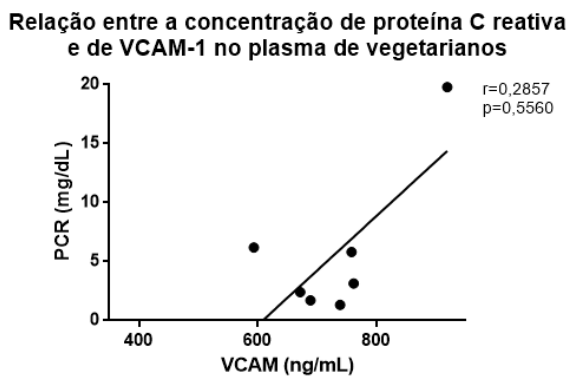
A.



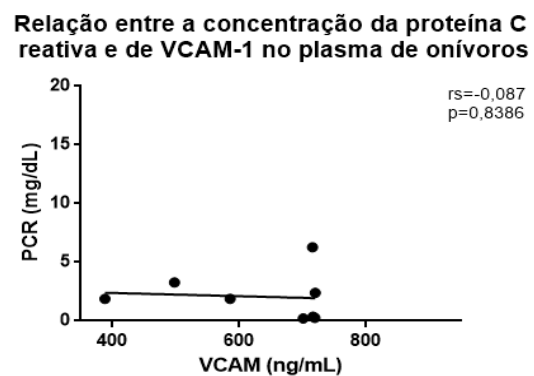
B.

Figura 9. Relação entre a concentração de LDL e concentração de VCAM-1 no plasma de vegetarianos (9A) e onívoros (9B) da subamostra, respectivamente. A diferença estatística significativa entre vegetarianos e onívoros não foi demonstrada (*Pearson test*, $p>0,05$).

Por fim, a correlação de concentração de proteína C reativa também divergiu, sendo positiva para os vegetarianos (**Figura 10A**), mas ausente em onívoros (**Figura 10B**).



A.



B.

Figura 10. Relação entre a concentração de proteína C reativa e concentração de VCAM-1 no plasma de vegetarianos (10A) e onívoros (10B) da subamostra, respectivamente. A diferença estatística significativa entre vegetarianos (*Pearson test*) e onívoros (*Spearman test*) não foi demonstrada ($P>0,05$).

A partir da análise prévia da subamostra, cujos resultados motivaram o presente estudo, foi possível analisar todo o grupo amostral. Para isso, caracterizamos também nosso grupo amostral total, conforme ilustrado na **Tabela 2**. Assim, observamos a distribuição desigual das características que podem ser relacionadas diretamente à saúde cardiovascular como peso, pressão arterial diastólica e hsPCR entre vegetarianos e onívoros .

Tabela 2 - Parâmetros clínicos do grupo amostral. Os dados paramétricos estão apresentados na forma média \pm desvio padrão e os não paramétricos estão apresentados como mediana \pm desvio padrão. Nenhum dado apresentou diferença significativa ($p > 0,05$, *Spearman test* e *Pearson test*). Abreviações: IMC (índice de massa corporal), IMT (do inglês *intima-media thickness*), VOP (velocidade de onda de pulso), PAD (pressão arterial diastólica), PAS (pressão arterial sistólica), hsPCR (proteína C reativa), ApoB (apoproteína B), HDL (do inglês *high density lipoprotein*), LDL (do inglês *Low Density Lipoprotein*).

	Vegetarianos (N=44)	Onívoros (N=44)
Idade	45 \pm 7,77	45,50 \pm 9,56
Peso (kg)	70,94 \pm 9,52	82,37 \pm 15,01
IMC (kg/m²)	27,32 \pm 21,67	27,15 \pm 169,4
IMT (mm)	0,593,4 \pm 93,73	0,648,8 \pm 128,2
VOP (m/s)	7,1 \pm 0,79	7,7 \pm 0,876
PAD (mmHg)	74,50 \pm 8,60	83,98 \pm 10,45
PAS (mmHg)	119,5 \pm 10,44	127 \pm 15,14
hsPCR (mg/dL)	1,010 \pm 3,21	1,205 \pm 6,31
ApoB (mg/L)	0,88 \pm 0,28	1,01 \pm 0,262
HDL (mg/dL)	47,59 \pm 9,25	42,50 \pm 11,64
LDL (mg/dL)	109 \pm 33,20	128,5 \pm 32,38
Não-HDL (mg/dL)	132,5 \pm 43,25	157,3 \pm 36,63

Após a caracterização e mensuração, comparamos os níveis de VCAM-1 no plasma de onívoros e vegetarianos, da mesma forma que anteriormente feito para o subgrupo amostral, encontrando uma distribuição similar entre os dois grupos (**Figura 11**).

Comparação da concentração de VCAM-1 no plasma de vegetarianos e onívoros

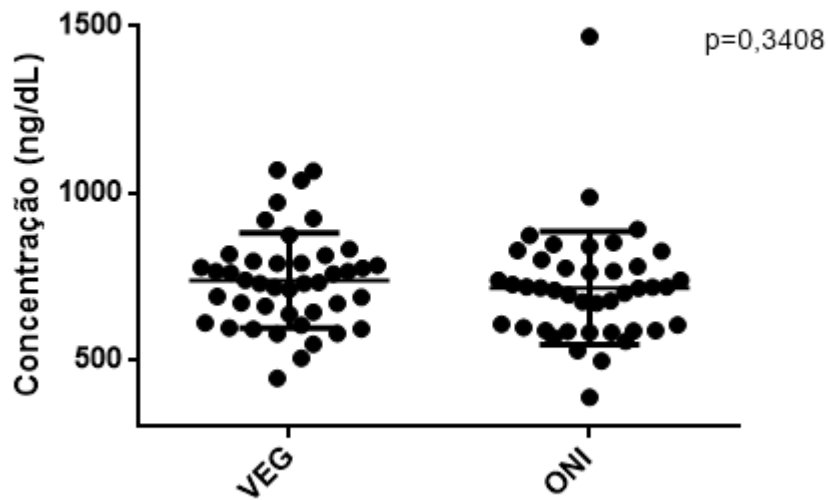
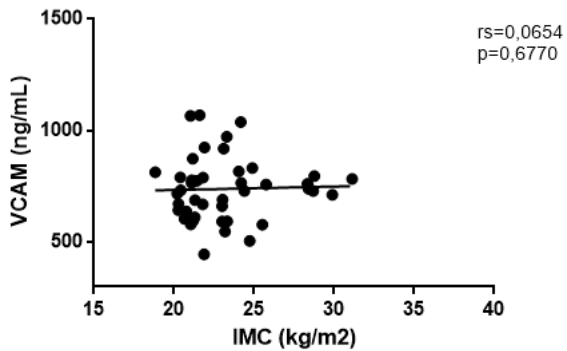


Figura 11. Comparação da concentração de VCAM-1 no plasma de vegetarianos e onívoros. Não foi demonstrada diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$, Mann Whitney test, GraphPad Prism software).

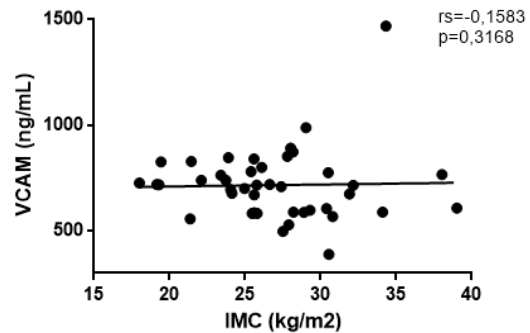
Foi possível correlacionar os níveis de VCAM-1 e os parâmetros clínicos avaliados. Conforme ilustrado nas **Figuras 12A** e **Figura 12B**, o IMC não demonstrou correlação com os níveis plasmáticos de VCAM-1, ainda que apresente diversidade de valores maior em onívoros, com maior espalhamento dos dados, do que em vegetarianos. Já os níveis de LDL plasmáticos demonstraram correlação positiva para os vegetarianos (**Figura 13A**) e negativa para os onívoros (**Figura 13B**).

Relação entre IMC e concentração de VCAM-1 no plasma de vegetarianos



A.

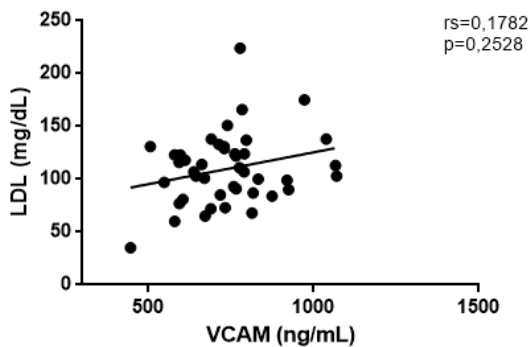
Relação entre IMC e concentração de VCAM-1 no plasma de onívoros



B.

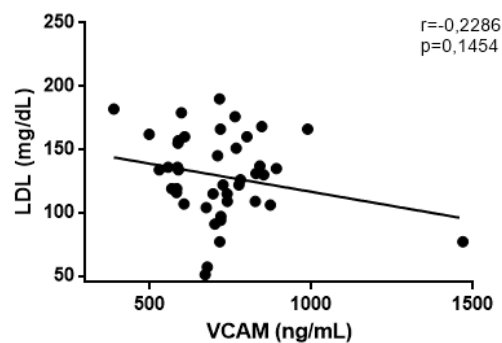
Figura 12. Relação entre IMC e concentração de VCAM-1 no plasma de vegetarianos (12A) e onívoros (12B), respectivamente. A diferença estatística significativa entre vegetarianos e onívoros não foi demonstrada ($p > 0,05$, Spearman test).

Relação entre a concentração de LDL e de VCAM-1 no plasma de vegetarianos



A.

Relação entre a concentração de LDL e de VCAM-1 no plasma de onívoros

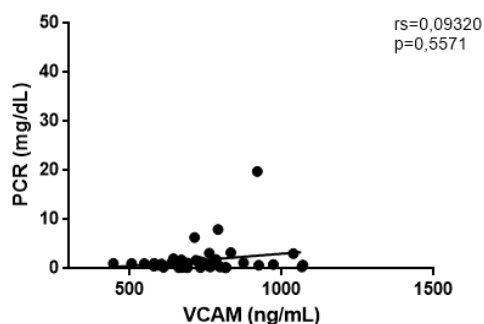


B.

Figura 13. Relação entre a concentração de LDL e de VCAM-1 no plasma de vegetarianos (13A) e onívoros (13B), respectivamente. A diferença estatística significativa entre vegetarianos (Spearman test) e onívoros (Pearson test) não foi demonstrada ($P > 0,05$).

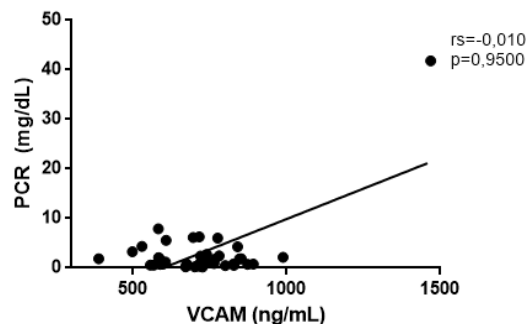
A concentração de proteína C reativa demonstrou correlação positiva para ambos os grupos (Figura 14A e Figura 14B), enquanto o IMT não demonstrou qualquer correlação (Figura 15A e Figura 15B).

Relação entre a concentração de proteína C reativa e de VCAM-1 no plasma de vegetarianos



A.

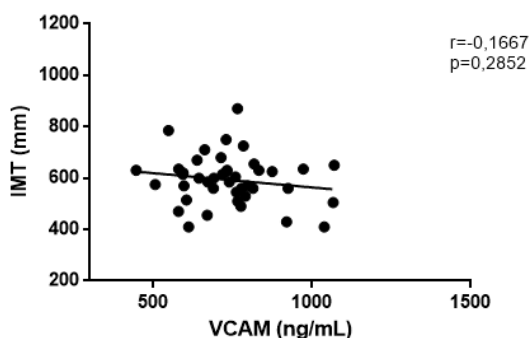
Relação entre a concentração de proteína C reativa e de VCAM-1 no plasma de onívoros



B.

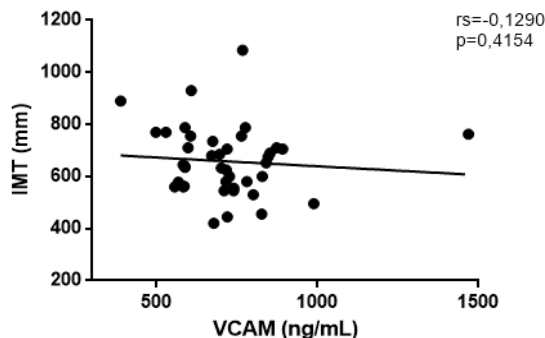
Figura 14. Relação entre a concentração de proteína C reativa e de VCAM-1 no plasma de vegetarianos (14A) e onívoros (14B), respectivamente. A diferença estatística significativa entre vegetarianos e onívoros não foi demonstrada (*Spearman test*, $P>0,05$).

Relação entre IMT e a concentração de VCAM-1 no plasma de vegetarianos



A.

Relação entre IMT e a concentração de VCAM-1 no plasma de onívoros

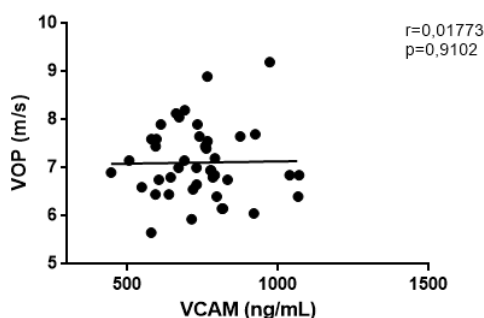


B.

Figura 15. Relação entre IMT e concentração de VCAM-1 no plasma de vegetarianos (15A) e onívoros (15B), respectivamente. A diferença estatística significativa entre vegetarianos (*Pearson test*) e onívoros (*Spearman test*) não foi demonstrada ($P>0,05$).

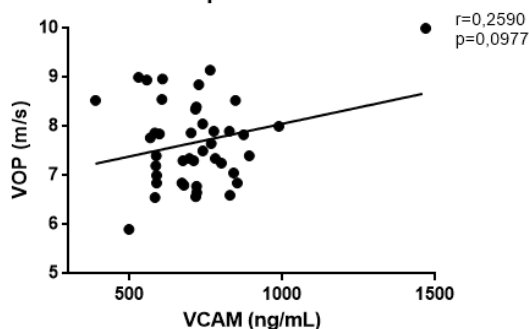
Por fim, a VOP não apresentou correlação com os níveis plasmáticos de VCAM-1 em vegetarianos (**Figura 16A**), mas demonstrou correlação positiva em onívoros (**Figura 16B**), o que poderia ser um indício do comprometimento da elasticidade das artérias dos sujeitos deste grupo

Relação entre VOP e concentração de VCAM-1 no plasma de vegetarianos



A.

Relação entre VOP e concentração de VCAM-1 no plasma de onívoros



B.

Figura 16. Relação entre a concentração de VOP e concentração de VCAM-1 no plasma de vegetarianos (16A) e onívoros (16B), respectivamente. A diferença estatística significativa entre vegetarianos e onívoros não foi demonstrada (*Pearson test*, $P > 0,05$).

DISCUSSÃO

Conforme observado nos dados apresentados, a concentração de VCAM-1 se mostrou semelhante em ambos os grupos. Essa distribuição pode ser justificada pelo perfil da amostra, sendo composta por homens saudáveis, sem doenças crônicas não transmissíveis, com média de idade 46 anos.

Ainda assim, dentre os parâmetros clínicos analisados, o resultado da correlação de VOP e a concentração da molécula de adesão se sobressaiu, com expressão bem definida entre os grupos. Entre os vegetarianos, os dados não apresentaram correlação, mas entre os onívoros a relação foi positiva, permitindo concluir que o aumento da concentração de VCAM-1 poderia acompanhar um aumento na velocidade da onda de pulso, podendo ser um indício do comprometimento da elasticidade das artérias dos sujeitos deste grupo. Esse resultado está de acordo com os da literatura, uma vez que uma maior rigidez arterial é associada à elevação do risco de eventos cardiovasculares (Ben-Shlomo Y, Spears M, Boustred C, et al, 2014; Kaess BM, Rong J, Larson MG, et al, 2012).

Importante ressaltar que a velocidade da onda de pulso aumentada causa um aumento adicional na pressão diastólica pelo retorno precoce das ondas de pulso refletidas da periferia tanto para a aorta ascendente quanto para o ventrículo esquerdo (Pizzi, O et al.). Conseqüentemente, as pressões aórtica e ventricular esquerda são aumentadas, levando a um maior consumo de oxigênio do miocárdio e promovendo o processo de hipertrofia ventricular esquerda.

Cavalcante et al (2018), demonstraram que correlacionando VCAM-1, ICAM-1, E-selectina e MMP 9 circulantes e a extensão de lesões coronarianas, altas concentrações (>876 ng / mL) de VCAM-1 foram encontrada em todos os pacientes

com lesões maiores, além de apresentarem um risco 9,81 vezes maior de apresentar lesões intermediárias. Acompanhando essa análise, no presente estudo indivíduos com altas concentrações foram encontrados em proporção similar entre os grupos. No entanto, a caracterização de seus parâmetros clínicos difere, permitindo caracterizar dois diferentes perfis. Entre os vegetarianos, o indivíduo médio apresentou IMC de 23,12 kg/m², IMT de 599,2 mm, concentração de PCR 1,2 mg/dL e VOP de 7,11. Já o indivíduo onívoro médio apresentou IMC de 30,46 kg/m², IMT de 654,2 mm, concentração de PCR 14,82 mg/dL e VOP de 8,47. Logo, o perfil do indivíduo onívoro com VCAM-1 >876 ng/ml é sobrepeso, estado inflamatório aumentado e maior rigidez arterial.

Como já mencionado, pesquisas recentes levantaram a hipótese de que os hábitos nutricionais à base de plantas, como o vegetarianismo e o veganismo, podem melhorar os processos inflamatórios e, conseqüentemente, diminuir os níveis circulantes de biomarcadores inflamatórios, reduzindo o risco de doenças crônicas nessas populações. O estabelecimento de uma relação entre características qualitativas e quantitativas da dieta e ocorrência de enfermidades crônicas não-transmissíveis permite a definição de estratégias nutricionais de prevenção e tratamento.

Nesse sentido, Menzel, J. et al., 2020, em um estudo transversal investigando um amplo espectro de biomarcadores inflamatórios de 36 veganos em comparação a 36 onívoros, não demonstrou diferenças significativas dos biomarcadores inflamatórios adiponectina, ICAM-1, IL-18, IL-1 RA, omentina-1 ou resistina. Além disso, os veganos de longa data (>4,8 anos) apresentaram uma tendência maior para níveis mais baixos de hsCRP (0,50 mg/l (95%-CI 0,21-0,85) em comparação com veganos que aderem a uma dieta vegana há menos de 4,8 anos (0,85 mg/l (95%-CI 0,46-1,33), p=0,09).

Esse estudo apoia ainda a relação entre IMC e a circunferência da cintura como importantes fatores de influência no estado inflamatório. Indivíduos obesos frequentemente são adeptos a dietas ricas em ácidos graxos trans, um tipo especial de gordura presente em gorduras parcialmente hidrogenadas, óleos refinados, carne, leite e derivados de animais ruminantes. Assim sendo, é coerente que apresentem maior concentração plasmática de proteína C reativa, IL-6, E-selectina, sICAM-1 e sVCAM-1 em comparação àqueles indivíduos com reduzido consumo desses ácidos graxos, uma vez que os ácidos graxos saturados podem atuar ativando a via de sinalização do NF-κB, aumentando a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF-α) e, conseqüentemente, o estado inflamatório (Bastos, H. M., Rogero, M. M., Arêas, J. A., 2009).

As equipes de Bullo M (2007) e Shah A (2008) demonstraram que a obesidade está diretamente relacionada a alterações das funções endócrinas e metabólicas no tecido adiposo, aumentando a síntese de adipocinas, iNOS, proteína C reativa, o fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β), a proteína quimiotática para monócitos (MCP-1), ICAM, o angiotensinogênio, o PAI-1, o TNF- α , a interleucina-6 (IL-6) e a leptina. Diferentemente da menor expressão no tecido adiposo de indivíduos magros, dentro do espectro de IMC recomendado.

Isso posto, podemos considerar que o IMC

Cabe mencionar que os achados do screening, destoantes dos achados do ELISA, podem ser justificados devido à maior sensibilidade do método Screening Magpix e a aleatoriedade na escolha das amostras que seriam analisadas. Uma vez que o método consiste em um imunoenensaio à base de esferas magnéticas, com a adição da amostra a uma mistura de beads pré-revestidas com anticorpos de captura específicos para o analito, a área disponível para contato com o analito na amostra é maior, aumentando a sensibilidade (Dunbar AS, Hoffmeyer MR, 2013).

Frente às limitações do estudo e entendendo os hábitos alimentares como importante ferramenta na investigação de doenças cardiovasculares, estudos posteriores que explorem a VCAM-1 com maior profundidade em populações maiores e de diferentes perfis se fazem necessários. Sendo então possível determinar com maior precisão intervalos de classificação para biomarcadores com ação primária e constitutiva sobre placa.

REFERÊNCIAS

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).

APPLEBY, N P et al., Mortality in vegetarians and comparable nonvegetarians in the United Kingdom, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2016

Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* 2002; 105(3):310-5.

Bastos, H. M., Rogero, M. M., Arêas, J. A. Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53/5

Ben-Shlomo Y, Spears M, Boustred C, et al. Aortic pulse wave velocity improves cardiovascular event prediction: an individual participant meta-analysis of prospective observational data from 17,635 subjects. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(7):636-46.

BJ, Pettersen et al., Vegetarian diets and blood pressure among white subjects: results from the Adventist Health Study-2 (AHS-2), *Public Health Nutr.*, 2012.

Bullo M, Casas-Agustench P, Migo-Correig P, Aranceta J, SalasSalvado J. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. *Public Health Nutr.* 2007;10(10A):1164-72.

Cavalcante, J. et al. Relationship between circulating VCAM-1, ICAM-1, E-selectin and MMP9 and the extent of coronary lesions, *Clinics* vol.73, São Paulo, 2018.

Cervato AM, Mazzilli RN, Martins IS, Marucci MFN. Dieta habitual e fatores de risco para doenças cardiovasculares. *Rev Saude Publica* 1997; 31(3):227-35.

Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. SCORE project group. *Eur Heart J* 2003; 24(11):987-1003.

Delgado M, Gutierrez A, Cano MD. Elimination of meat, fish and derived products from the Spanish-Mediterranean diet: effect on the plasma lipid profile. *Ann Nutr Metab* 1996; 40:202-11.

Dewailly E, et al. Relations between n-3 Fatty-Acid status and cardiovascular disease risk factors among Quebecers. *Am J Clin Nutr* 2001; 74(5):603-11.

Djossé L, et al. Relations between dietary Linolenic Acid and coronary artery disease in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Clin Nutr* 2001; 74(5):612-9.

Dunbar AS, Hoffmeyer MR. Microsphere-based multiplex immunoassays: development and applications using Luminex® xMAP® technology. In: John R, Sheehan C, Binder S, He J, editors. *The Immunoassay andbook*. 4th. ed. Elsevier; 2013. p.157-74.

Ferreirós ER, Boissonet CP, Pizzaro R et al. Independent prognostic value of elevated C-reactive protein in unstable angina. *Circulation* 1999; 100:1958-63.

Filho, W. S. et al. Intracoronary Inflammatory Markers after Percutaneous Coronary Interventions. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v85, n3. p. 180-185, Sep 2005.

Fornes NS, et al. Food frequency consumption and Lipoproteins serum levels in the population of na urban area, Brazil. *Rev Saude Publica* 2000; 34(4):380-7.

Guedes DP, Guedes JERP. Physical activity, cardiorespiratory fitness, dietary content, and risk factor that cause a predisposition towards cardiovascular disease. *Arq Bras Cardiol* 2001; 77(3):251-7.

HYNKU, K et al, Plant-Based Diets Are Associated With a Lower Risk of Incident Cardiovascular Disease, Cardiovascular Disease Mortality, and All-Cause Mortality in a General Population of Middle-Aged Adults. *Journal of the American Heart Association*. 2019;8:e012865

Kaess BM, Rong J, Larson MG, et al. Aortic stiffness, blood pressure progression, and incident hypertension. *JAMA*. 2012;308(9):875-81.

Kahleova, H., Levin, S. & Barnard, N. D. Vegetarian Dietary Patterns and Cardiovascular Disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 61, 54–61 (2018)

Keys A. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 1986; 124:903-15.

KM, Lara et al., Dietary Patterns and Incident Heart Failure in U.S. Adults Without Known Coronary Disease, *J Am Coll Cardiol.*, 2019

LA, DAVID et al., Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome, *Nature*, 2014

LANGER, H. F., CHAVAKIS, T. Leukocyte – endothelial interactions in inflammation. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 13, No 7, 2009 pp. 1211-1220

Laurent, S. et al. Carotid artery distensibility and distending pressure in hypertensive humans. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* 23, 878–83 (1994).

Le, L. & Sabaté, J. Beyond Meatless, the Health Effects of Vegan Diets: Findings from the Adventist Cohorts. *Nutrients* 6, 2131–2147 (2014).

Ley, K, Huo, Y. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107(10):1209-1210.

Lin, C. L., Fang, T. C. & Gueng, M. K. Vascular dilatory functions of ovo-lactovegetarians compared with omnivores. *Atherosclerosis* 158, 247–51 (2001).

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)

Menzel, J. et al. Associations of a vegan diet with inflammatory biomarkers. *Nature*, 10:1933. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58875-x>. (2020)

Mustad VA, Kris-Etherton PM. Além da redução do colesterol: decifrando os benefícios da intervenção alimentar para a doença cardiovascular. *Curr Atheroscler Reports Brasil* 2001; 1:2-7.

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).

Oliveira SP, Tahin QS, Cavalcanti TC. Epidemiologia das doenças isquêmicas do coração: papel da dieta. *Rev Nutr PUCCAMP* 1991; 4(1/2):146-53.

Pizzi, O et al. Pulse wave velocity – methodology and prognostic implications in hypertension. *Rev Bras Hipertens* vol.13(1): 59-62, 2006.

Park, K.-H. & Park, W. J. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J. Korean Med. Sci.* 30, 1213 (2015).

Salvaro, R. P.; Junior, S. Á. Socer J, Fatores de Risco para Doença Cardiovascular: Velhos e Novos Fatores de Risco. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 47 nº 2, 2009.

Sampaio, S A et al, Métodos de Investigação da Função Endotelial: Descrição e suas Aplicações, *International Journal of Cardiovascular Sciences*. 2017;30(3):262-273, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Shah A, Mehta N, Reilly MP. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2008;32(6):638-44.

Stary HC. Atlas of atherosclerosis progression and regression. New York/London, Parthenon Publishing 1999.

Stary HC, Chandler AB, Glagov S et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesion of atherosclerosis: A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Special Report. *Circulation* 1994; 89: 2462-78.

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Special Report. *Circulation* 1995; 92: 1355-74

TONG, N Y T. et al, Risks of ischaemic heart disease and stroke in meat eaters, fish eaters, and vegetarians over 18 years of follow-up: results from the prospective EPIC-Oxford study. *British Medical Journal*, 2019.

TURNBAUGH, PJ et al., The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice, *Sci Transl Med.* 2009

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).

Watanabe, T. , Fan, J. Atherosclerosis and inflammation Mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathway in atherogenesis, *International Journal of Cardiology*, 1998

YOKOYAMA, Y et al., Vegetarian diets and blood pressure: a meta-analysis, *JAMA Intern Med.* 2014

ZAPOLSKA-DOWNAR et al., Butyrate inhibits cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in cultured endothelial cells: the role of NFkappaB and PPARalpha. *J Nutr Biochem* 15(4): 220-228, 2004;

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)

Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; 97:1837-47.