UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

RAFAEL FERRAZ BANNITZ

**Estudo das alterações metabólicas e moleculares envolvidas na restrição
calórica e na dieta hipoproteica em seres humanos.**

Ribeirão Preto

2021

RAFAEL FERRAZ BANNITZ

**Estudo das alterações metabólicas e moleculares envolvidas na
restrição calórica e na dieta hipoproteica em seres humanos.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas

Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Profa. Dra. Maria Cristina Foss de
Freitas

Versão corrigida. A versão original encontra-se
disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja
o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD)

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação

Serviço de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Medicina de ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Ferraz-Bannitz, Rafael

Estudo das alterações metabólicas e moleculares envolvidas na restrição calórica e na dieta hipoproteica em seres humanos. Ribeirão Preto, 2021.

110 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientadora: Foss-Freitas, Maria Cristina

1. Restrição Calórica. 2. Restrição Proteica. 3. Diabetes Tipo 2. 4. Resistência Insulínica. 5. Doença Cardiovascular.

FERRAZ-BANNITZ, R.

Estudo das alterações metabólicas e moleculares envolvidas na restrição calórica e na dieta hipoproteica em seres humanos.

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências Médicas.
Área de concentração: Clínica Médica

Aprovado em: 25 de Junho de 2021

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Cristina Foss de Freitas Instituição: FMRP-USP

Julgamento: NÃO VOTANTE

Assinatura: _____

Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes Instituição: FMRP-USP

Julgamento: APROVADO

Assinatura: _____

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Instituição: UNICAMP

Julgamento: APROVADO

Assinatura: _____

Prof. Dr. Luiz Osório Silveira Leiria

Instituição: FMRP-USP

Julgamento: APROVADO

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, meus irmãos e amigos pelo apoio e incentivos para concluir o doutorado.

Dedico também à Profa. Maria Cristina Foss-Freitas pelos ensinamentos, orientação e dedicação que foram fundamentais para a realização desse projeto.

EPÍGRAFE

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve que renunciar para conseguir.”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar me guiando e por colocar em meu caminho pessoas incríveis que permitiram o meu crescimento pessoal e científico.

À minha família, minha mãe Lourdes, ao meu pai Adalberto, a minha Madrinha Anita e os meus irmãos Paulo, Alexandre e Patrícia. Também agradeço a todos os meus amigos.

Ao Profa. Dra. Maria Cristina Foss-Freitas, pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório e por depositar sua confiança em mim. Agradeço pela excelente orientação, por todos os ensinamentos na pesquisa e na vida, pelas discussões e críticas construtivas que me tornaram uma pessoa melhor.

A todos os integrantes do laboratório Foss-Freitas pelos ensinamentos, amizade, apoio, discussões. Agradeço muito a Rebeca Beraldo, Izabela Moscardini e Maria Aparecida Nunes Ferreira.

A todos os participantes do estudo, sem eles nada seria possível. A minha enorme gratidão por mostrarem interesse em contribuir com a ciência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida para realização do estudo, processo nº 2015/12133-0. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

RESUMO

FERRAZ-BANNITZ, R. **Estudo das alterações metabólicas e moleculares envolvidas na restrição calórica e na dieta hipoproteica em seres humanos. 110f. 2021.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2021.

Nas últimas décadas, a obesidade tem se tornado um importante problema mundial de saúde pública, resultando no aumento da prevalência de doenças crônicas, geralmente associadas à obesidade, como a doença coronariana e o diabetes *Mellitus* do Tipo 2. Muitos estudos são desenvolvidos na tentativa de elaborar intervenções que possam bloquear ou minimizar as doenças metabólicas induzidas pela obesidade, em especial o diabetes Tipo 2. A restrição calórica (RC) reduz a adiposidade e melhora o metabolismo em pacientes com um ou mais sintomas da síndrome metabólica. No entanto, ainda não se sabe se os benefícios da RC em humanos são mediados pela restrição de calorias ou nutrientes. Este estudo foi realizado para identificar se a dieta isocalórica com restrição de proteína (RP) é capaz de conferir os efeitos benéficos da RC em pacientes com síndrome metabólica. Submetemos 21 indivíduos com diagnóstico de síndrome metabólica a restrição calórica de curto prazo (ou seja, 27 dias) (RC; n = 11) ou a dieta isocalórica com restrição de proteínas (RP; n = 10) e comparamos os resultados metabólicos e moleculares das intervenções. Assim como a RC, a RP promoveu perda de peso devido à redução da adiposidade e redução da glicemia, dos níveis lipídicos e da pressão arterial nesses indivíduos. Observamos redução na resistência insulínica, pelo aumento de 62,3% e 93,1% na taxa de infusão de glicose durante o clamp euglicêmico hiperinsulinêmico e redução de 61,1% e 56,6% no HOMA-IR, para RC e

RP respectivamente. As assinaturas de expressão gênica no tecido adiposo subcutâneo (SAT) foram significativamente modificadas nas amostras de indivíduos dos grupos RC e RP. Observamos um aumento de expressão de mRNA principalmente em genes relacionados à função metabólica de adipócitos (*Adipoq*) e presença de nutrientes (*AMPK*, *GCN2* e *SIRT1*). Não encontramos mudanças significativas na composição do microbioma intestinal após RP, embora 12 espécies, principalmente Firmicutes, tenham mudado consideravelmente. Nossos dados sugerem que a redução na ingestão de proteínas com um leve aumento na ingestão de carboidratos para manter o equilíbrio isocalórico da dieta é suficiente para melhorar o controle metabólico. A característica isocalórica da intervenção de RP torna essa abordagem uma estratégia dietética mais atrativa e menos drástica em ambientes clínicos e tem maior potencial para ser usada como terapia adjuvante no tratamento da síndrome metabólica.

Palavras-chave: Restrição Calórica; Restrição Proteica; Diabetes *Mellitus* Tipo 2; Resistência Insulínica; Síndrome Metabólica; Doença Cardiovascular.

ABSTRACT

FERRAZ-BANNITZ, R. **Study of the metabolic and molecular changes involved in caloric restriction and the hypoprotein diet in humans.** 2021. 110P. PhD Thesis - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2021.

In recent decades, obesity has become an important public health problem worldwide, resulting in the increased prevalence of chronic diseases, generally associated with obesity, such as coronary heart disease and Type 2 diabetes *mellitus*. Many studies are carried out in an attempt to design interventions that can block or minimize obesity-induced metabolic diseases, especially Type 2 diabetes. Caloric restriction (CR) reduces adiposity and improves metabolism in patients with one or more symptoms of the metabolic syndrome. However, it is not known whether the benefits of CR in humans are mediated by caloric or nutrient restriction. This study was carried out to identify whether the isocaloric diet with protein restriction (PR) is able to confer the beneficial effects of CR in patients with metabolic syndrome. We subjected 21 individuals diagnosed with metabolic syndrome to short-term (ie, 27 days) caloric restriction (CR; n = 11) or isocaloric diet with protein restriction (PR; n = 10) and compared the metabolic and molecular results of the interventions. Like CR, PR promoted weight loss due to reduced adiposity and reduced blood glucose, lipid levels and blood pressure in these individuals. We observed a reduction in insulin resistance, by an increase of 62.3% and 93.1% in the glucose infusion rate during the hyperinsulinemic euglycemic clamp and a reduction of 61.1% and 56.6% in the HOMA-IR, for CR and PR respectively. Gene expression

signatures in subcutaneous adipose tissue (SAT) were significantly modified in samples from individuals in the CR and PR groups. We observed an increase in mRNA expression mainly in genes related to adipocyte metabolic function (*Adipoq*) and presence of nutrients (*AMPK*, *GCN2* and *SIRT1*). We did not find significant changes in the composition of the gut microbiome after PR, although 12 species, mainly Firmicutes, changed considerably. Our data suggest that reducing protein intake with a slight increase in carbohydrate intake to maintain dietary isocaloric balance is sufficient to improve metabolic control. The isocaloric characteristic of the PR intervention makes this approach a more attractive and less drastic dietary strategy in clinical settings and has greater potential to be used as an adjunctive therapy in the treatment of metabolic syndrome.

Key words: Caloric Restriction; Protein Restriction; Type 2 Diabetes *Mellitus*; Insulin Resistance; Metabolic Syndrome; Cardiovascular Disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fluxo de participantes através do estudo	36
Figura 2 -	Algoritmo representando o desenho experimental	37
Figura 3 -	Avaliação do peso corporal e apresentação dos resultados bioquímicos e hematológicos obtidos durante o protocolo de restrição calórica de 25%	47
Figura 4 -	Resultados provenientes do exame Clamp Euglicêmico Hiperinsulinêmico	49
Figura 5 -	Resultados dos índices de HOMA-IR e HOMA- β	50
Figura 6 -	Resultados das correlações entre os valores do HOMA- β e a glicemia de jejum	51
Figura 7 -	Nível de colesterol total dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%	52
Figura 8 -	Nível de LDL dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%	53
Figura 9 -	Nível de triglicérides dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%	54
Figura 10 -	Quantidade de massa muscular e massa gorda corporal dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%	55
Figura 11 -	Avaliação antropométrica (circunferências da cintura, quadril e pescoço) dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%	56

Figura 12 - Quantificação das dobras cutâneas bicipital, tricipital, subescapular, supra-ilíaca e do pescoço dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%	57
Figura 13 - Níveis séricos da Proteína C Reativa (PCR) nos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%	58
Figura 14 - Avaliação da concentração sérica da enzima Creatinofosfoquinase (CPK) nos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%	59
Figura 15 - Análise da pressão arterial sistêmica dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%	60
Figura 16 - Resultado obtidos pela calorimetria indireta em repouso durante 30 minutos dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%	62
Figura 17 - Parâmetros metabólicos após o período de acompanhamento de 1 mês	63
Figura 18 - Avaliação da expressão mRNA de diversos genes envolvidos na via da restrição calórica em amostras de tecido adiposo subcutâneo de indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%	64
Figura 19 - Heatmap mostrando as correlação entre a expressão gênica do tecido adiposo e valores bioquímicos e parâmetros antropométricos de indivíduos submetidos à restrição calórica de 25%	65
Figura 20 - Dados preliminares do RNAseq das amostras de tecido adiposo de indivíduos submetidos à restrição calórica de 25%	67
Figura 21 - Avaliação do peso corporal e apresentação dos resultados	70

bioquímicos e hematológicos obtidos durante o protocolo de restrição proteica

Figura 22 - Resultados provenientes do exame Clamp Euglicêmico Hiperinsulinêmico 72

Figura 23 - Nível de colesterol total dos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica 73

Figura 24 - Nível de LDL dos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica 74

Figura 25 - Nível de triglicérides dos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica 75

Figura 26 - Quantidade de massa muscular e massa gorda corporal dos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica 76

Figura 27 - Avaliação antropométrica (circunferências da cintura, quadril e pescoço) dos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica 77

Figura 28 - Quantificação das dobras cutâneas bicipital, tricipital, subescapular, supra-ílica e do pescoço dos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica 78

Figura 29 - Quantificação sérica da Proteína C Reativa (PCR) nos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica 79

Figura 30 - Avaliação dos níveis séricos da enzima Creatinofosfoquinase (CPK) nos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica 80

Figura 31 - Análise da pressão arterial sistêmica dos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica 81

Figura 32 - Resultado obtidos pela calorimetria indireta em repouso durante 30 minutos dos indivíduos submetidos a restrição proteica	82
Figura 33 - Parâmetros metabólicos após o período de acompanhamento de 1 mês (protocolo de restrição proteica)	83
Figura 34 - Avaliação da expressão mRNA de diversos genes envolvidos na via da restrição calórica em amostras de tecido adiposo subcutâneo de indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica	84
Figura 35 - Heatmap mostrando as correlação entre a expressão gênica do tecido adiposo e valores bioquímicos e parâmetros antropométricos de indivíduos submetidos à restrição proteica	85
Figura 36 - Dados preliminares do RNAseq das amostras de tecido adiposo de indivíduos submetidos à restrição proteica	87
Figura 37 - Restrição proteica não tem efeitos de curto prazo na composição da microbiota intestinal	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Gênero, idade e perfil antropométrico dos indivíduos tratados com o protocolo de restrição calórica de 25%.....	45
Tabela 2 -	Gênero, idade e perfil antropométrico dos indivíduos tratados com o protocolo de restrição proteica.....	68
Tabela 3 -	Dados clínicos, antropométricos e bioquímicos dos indivíduos submetidos a restrição calórica ou restrição proteica e comparações dos resultados obtidos entre os dois procolos.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM2	Diabetes <i>mellitus</i> 2
RC	Restrição calórica
RP	Restrição proteica
ERS	Endoplasmic Reticulum Stress
UPR	Unfolded Protein Response
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance
HOMA-B	Body adiposity index – beta cell function
BIA	Bioimpedância Elétrica
ADIPOQ	Adiponectina
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated Gamma Receptor
PGC-1 α	PPAR γ co-activator-1
EIF2AK3	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3
CHOP	C/EBP homologous protein
GRP78	Heat shock protein family A (Hsp70) member 5
GADD34	Growth arrest and DNA damage-inducible protein
XBP1	X-box binding protein 1
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATF6	Activating Transcription Factor 6
SIRT1	Sirtuin 1
SIRT3	Sirtuin 3
AMPK	AMP-Activated Protein Kinase
GCN2	General Control Nonderepressible 2

SOD1	Superoxide dismutase 1
SOD2	Superoxide dismutase 2
SOD3	Superoxide dismutase 3
NRF2	Nuclear Factor Erythroid 2 -Related Factor 2
Biceps SF	Prega cutânea bicipital
Triceps SF	Prega cutânea tricipital
Subscapularis SF	Prega cutânea subescapular
Supra-Iliac SF	Prega cutânea supra-ilíaca
Neck SF	Prega cutânea do pescoço
CRP	Proteína C reativa
CPK	Creatinofosfoquinase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 JUSTIFICATIVA.....	29
3 HIPÓTESE	31
4 OBJETIVOS	32
5 MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1 Participantes do estudo.....	34
5.2 Composição das dietas.....	36
5.3 Avaliação Clínica e Biométrica.....	37
5.4 Parâmetros Bioquímicos.....	38
5.5 Avaliação do gasto energético.....	38
5.6 Biópsia da gordura abdominal subcutânea.....	39
5.7 Realização da técnica de Clamp Hiperinsulinêmico Euglicêmico.....	39
5.8 RT-PCR em Tempo Real	40
5.9 Análise Metagenômica	41
5.10 Análise estatística.....	42
6 RESULTADOS.....	43
6.1 Restrição calórica.....	43
6.2 Restrição proteica.....	68
7 DISCUSSÃO	90
8 CONCLUSÕES	100
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
10 ANEXOS	109
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	109
ANEXO B - TABELA 3.....	110

1 INTRODUÇÃO

A prevalência da obesidade e sobrepeso aumentou drasticamente pelo mundo, tornando-se um importante problema de saúde pública tanto para países desenvolvidos como em desenvolvimento (Popkin and Doak 1998). Atualmente as estimativas fornecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam para a existência de mais de 1,4 bilhão de adultos com excesso de peso. A partir desses dados estima-se que, nos países em desenvolvimento, mais de 115 milhões de pessoas sofrem de doenças relacionadas à obesidade, tais como diabetes *mellitus* tipo 2 e algumas doenças cardiovasculares (Organization 2012).

Nota-se que em muitos países houveram mudanças importantes no que se refere à geração de renda, estilo de vida e especialmente na demanda nutricional da população, ao mesmo tempo em que a ocorrência da desnutrição na população em geral diminuiu em um ritmo acelerado e houve aumento na prevalência de sobrepeso e obesidade. Um antagonismo de tendências temporais entre desnutrição e obesidade foi estabelecido, definindo desta forma uma das características marcantes do processo de transição nutricional do mundo (Batista Filho and Rissin 2003).

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal resultante do desequilíbrio energético prolongado, que pode ser causado pelo excesso de consumo de calorias e/ou pela inatividade física (Organization 2000). Fatores genéticos desempenham um papel muito importante na determinação da suscetibilidade do indivíduo para o ganho de peso. Estes fatores são responsáveis por 24% a 40% da alteração no índice de massa corpórea (IMC), influenciando vias que controlam a taxa do metabolismo basal (Bouchard 1994). Algumas mutações já

foram associadas com a obesidade e a hiperfagia, como mutações envolvendo a via da melanocortina, que englobam alterações no gene da leptina, do receptor da leptina e da pro-opiomelanocortina (Clement, Vaisse et al. 1998).

A obesidade e o sobrepeso contribuem de forma importante para o surgimento de doenças crônicas e de incapacidades que são frequentes em indivíduos de meia idade e idosos, tais como doença coronariana, diabetes *mellitus* tipo 2, dificuldades respiratórias, osteoartrite, doenças músculo-esqueléticas, doenças cutâneas, disfunção sexual, infertilidade e distúrbios psicológicos, que incluem a depressão e a baixa auto-estima (Pi-Sunyer 1991).

Além disso, temos que ressaltar que o tecido adiposo é considerado um tecido endócrino que produz moléculas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), fator de crescimento transformador- β (TGF- β), proteína C reativa (PCR) e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1). Esse estado inflamatório sistêmico está associado a um aumento no diagnóstico de doenças metabólicas em indivíduos que apresentam grande quantidade de tecido adiposo em seu organismo (Hotamisligil, Shargill et al. 1993, Weyer, Yudkin et al. 2002).

Uma das principais doenças induzidas pelo aumento da obesidade, associado ao sedentarismo e uma má alimentação é o diabetes *mellitus* do tipo 2. Situação que ocorre pelo aumento da resistência a insulina e uma redução da tolerância celular a glicose disponível no sangue. Adicionalmente, a associação de obesidade centrípeta, hiperglicemia/resistência à insulina, dislipidemia aterogênica e hipertensão é conhecida como Síndrome Metabólica (SM) (Ormazabal, Nair et al. 2018). Dados epidemiológicos mostram que mais de 50 milhões de pessoas nos EUA apresentam SM (Saklayen 2018) A prevalência aumenta com a idade, variando

de 24% a partir dos 20 anos a mais de 30% a partir dos 50 anos (Bouchard 1995, Liese, Mayer-Davis et al. 1998).

No Brasil atualmente, segundo a International Diabetes Federation (IDF) o número estimado de indivíduos diabéticos chega a mais de 14 milhões de brasileiros.

A resistência a insulina, característica do diabetes *mellitus* tipo 2, é definida como qualquer situação em que, na presença de quantidade normal de insulina, observa-se menor resposta biológica do hormônio, principalmente, em tecidos como músculo, gordura e fígado (Benito 2011). O efeito biológico da insulina envolve uma complexa resposta celular que afeta o metabolismo tanto de carboidratos, lipídios e proteínas. Ao se ligar ao seu receptor específico na membrana plasmática da célula, a insulina desencadeia uma cascata de eventos, os quais propiciam efeitos metabólicos ou de promoção de crescimento (Haring, White et al. 1985, Kahn 1985). A etapa primária e essencial para a correta sinalização insulínica é a fosforilação dos substratos do receptor de insulina em resíduo tirosina, sendo que, em situações de resistência à insulina, esta fosforilação passa a ser em resíduo serina. No diabetes *mellitus* tipo 2, nota-se uma diminuição na concentração de receptor de insulina, da atividade quinase no receptor, na concentração e fosforilação no receptor de insulina 1 e 2, na atividade da fosfoinositol-3-quinase (PI3K) e menor translocação do transportador de glicose (GLUT4) (Benito 2011).

A resistência a insulina pode ser adquirida por hábitos de vida inadequados, como mencionados anteriormente. Entretanto, existem diversas intervenções nutricionais que sabidamente reduzem a porcentagem de tecido adiposo no organismo, levando a uma melhora da sensibilidade à insulina e diminuição de ácidos graxos na circulação. Uma das mais conhecidas é a restrição calórica. Esta

intervenção tem por intuito diminuir a quantidade total de kilocalorias ingeridas, porém sem causar desnutrição. Dados de vários pesquisadores demonstram que esta intervenção pode ser eficaz no combate aos problemas associados a obesidade e doenças metabólicas. Adicionalmente, a intervenção nutricional demonstrou ser capaz de prolongar o tempo de vida em uma variedade de espécies, incluindo mamíferos (Roth, Ingram et al. 2001), e previne doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Fontana, Klein et al. 2010).

Em humanos ainda não está bem estabelecido se a restrição calórica teria o mesmo efeito benéfico observado em outros modelos animais. Estudos realizados nos membros da *Caloric Restriction Society*, isto é, pessoas que fazem restrição calórica por livre arbítrio, foram publicados recentemente (Martin, Bhapkar et al. 2016, Il'yasova, Fontana et al. 2018). O grupo de pessoas que aderiram à restrição calórica consumiam aproximadamente 1.800 kcal/dia (30% menos calorias quando comparado à dieta típica americana, pareado para sexo e idade). Essa restrição na ingestão calórica durou aproximadamente seis anos e meio. Além da restrição calórica, era realizada uma dieta baseada em alta ingestão de frutas, vegetais, leite e derivados, proteína derivada de soja e baixo consumo de alimentos ultra-processados. Os dados foram comparados com os dados de um grupo controle que seguia uma alimentação típica americana de 2.572 kcal/dia. Nesse estudo, demonstraram que o grupo em restrição calórica tinha menor porcentagem de gordura corporal, pressão arterial sistólica e diastólica, assim como melhor perfil lipídico, aumento da sensibilidade à insulina, baixos níveis de marcadores inflamatórios e baixa concentração de triiodotironina (Fontana, Meyer et al. 2004, Fontana, Klein et al. 2006, Meyer, Kovacs et al. 2006).

A restrição calórica está associada, à diminuição no metabolismo energético e à redução da taxa do metabolismo basal; no entanto, esse efeito é controverso, pois poderia estar relacionado à perda de peso e adaptação metabólica dos tecidos muscular e adiposo (Redman, Heilbronn et al. 2009). Além disso, não é possível determinar um ponto de corte seguro para restrição calórica, uma vez que há diferentes fatores que a influenciam como, por exemplo: composição corporal, diferença do gasto energético total, idade e gênero e além da duração da restrição calórica (Fontana and Klein 2007).

Segundo Soare *et al* em seu artigo de revisão sobre os benefícios da restrição calórica na redução do risco ao diabetes *mellitus* tipo 2, um período curto de restrição calórica (a partir de seis semanas) é suficiente para alterar os parâmetros metabólicos em seres humanos, tais como peso corporal, massa adiposa, glicemia de jejum, insulina de jejum, colesterol e frações, níveis de triglicérides além de reduzir a concentração de marcadores inflamatórios indutores da resistência a insulina (Soare, Weiss et al. 2014).

Simpson *et al* ressaltam a importância dos macronutrientes na dieta ideal para o combate da obesidade e das doenças metabólicas associadas, sugerindo que uma dieta rica em proteínas aumenta os riscos de mortalidade principalmente por induzir doenças cardiovasculares (Simpson, Le Couteur et al. 2015).

Uma dieta com grande quantidade de proteína é facilmente encontrada nos hábitos alimentares de muitas famílias, entretanto indivíduos que tornam-se obesos por ingerem uma dieta tipicamente ocidental consomem altos níveis de gordura e proteína, sendo essas proteínas compostas por mais de 20% de BCAA (Layman and Walker 2006).

Newgard *et al* demonstraram que, em indivíduos obesos, os níveis de aminoácidos de cadeia ramificada, (*Branched-chain amino acids* – BCAAs) valina e leucina/isoleucina estão 20% e 14% aumentados, respectivamente, quando comparado com indivíduos eutróficos. O aumento na concentração de BCAAs circulantes em indivíduos obesos induz a ativação de mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) uma serina/treonina quinase ativada na presença de insulina e BCAAs. Quando ativada, mTOR induz a tradução de proteínas, lipogênese e proliferação celular, sendo responsável pela regulação de muitos processos celulares importantes. A estimulação de mTOR está implicada em diversos estados patológicos incluindo a obesidade e o diabetes *mellitus* tipo 2 (Laplane and Sabatini 2012). O aminoácido leucina em sinergia com a insulina é capaz de ativar mTOR (Greiwe, Kwon et al. 2001). Nesse caso, com o aumento da concentração de leucina na circulação, induz uma ativação prolongada de mTOR que promove um feedback negativo na via de sinalização da insulina, inibindo a fosforilação no resíduo de serina do receptor de insulina (IRS1) por S6K, proteína a jusante de mTOR, mostrando uma relação importante, in vivo, entre a regulação da glicemia, metabolismo adiposo e concentração de BCAA (Tremblay and Marette 2001, Um, Frigerio et al. 2004).

No contexto da restrição calórica e da dieta hipoproteica, mTOR pode ser inibido pela diminuição de BCAAs circulantes, pela redução dos níveis de insulina e pela ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que inibe o complexo 1 de mTOR (mTORC1) (Peng, Robertson et al. 2012). No entanto, a compreensão das relações mecânicas entre os níveis glicêmicos, o tecido adiposo e a redução de BCAAs livres na circulação, provida por uma dieta hipoprotéica aguda forneceria

novos caminhos para o tratamento das doenças metabólicas associadas a obesidade.

Com a ausência de dados consistentes sobre qual seria a dieta ideal e a proporção mais indicada de macronutrientes para a prevenção da obesidade e principalmente do diabetes *mellitus* tipo 2, surge a necessidade da realização de estudos clínicos mais detalhados em seres humanos, a fim de compreender como a restrição calórica e como a dieta hipoproteica modulam a resposta insulínica, principalmente em tecidos como músculo, gordura e fígado, e dessa forma poder desenvolver intervenções que são realmente capazes de bloquear os danos das doenças metabólicas.

Portanto esse estudo buscou investigar os possíveis efeitos bioquímicos, antropométricos e moleculares envolvidos na restrição calórica de 25% e também na dieta isocalórica com restrição de proteínas durante 27 dias em pacientes com síndrome metabólica.

2 JUSTIFICATIVA

O estudo da restrição calórica em humanos torna-se relevante dada a importância dessa intervenção no controle nutricional uma vez que ainda não estão bem caracterizados quais as repercussões bioquímicas, moleculares e metabólicas decorrentes dessa intervenção no organismo humano. Através do tratamento de um grupo de indivíduos que apresentam diabetes *mellitus* tipo 2 com restrição calórica de 25%, comparada à sua dieta ideal, durante 4 semanas, pretendemos elucidar quais mudanças fisiológicas, antropométricas e moleculares são moduladas pela redução da ingestão calórica.

Diversos estudos demonstraram que a restrição calórica, de 30% à 45% das calorias totais, em muitos modelos animais induzem a prevenção de doenças metabólicas e principalmente o controle do diabetes *mellitus* tipo 2. Entretanto esta intervenção em seres humanos não está clara devido a dificuldade de adesão ao tratamento a longo prazo. A nossa proposta é minimizar ao máximo os incômodos deste tratamento a fim de estabelecermos uma intervenção não drástica e acessível de ser introduzida no tratamento dessa população. Vale ressaltar que este projeto é primeiro estudo no Brasil em seres humanos submetidos a restrição calórica de 25% baseado em sua dieta ideal e a primeira oportunidade de entendermos como a redução da ingestão alimentar pode afetar os parâmetros fisiológicos.

Já a utilização de uma dieta isocalórica hipoproteica em indivíduos que apresentam diabetes *mellitus* tipo 2 é de relevante interesse do nosso grupo, pois diversos trabalhos demonstraram que o tecido adiposo é responsável por controlar os níveis circulantes dos BCAAs (Lynch and Adams 2014). Sendo que o aumento de BCAAs em indivíduos obesos está associado a uma diminuição da oxidação desses

aminoácidos no tecido adiposo, o que leva a um aumento dos mesmos na circulação resultando na resistência à insulina e desenvolvendo diabetes *mellitus* em indivíduos obesos. Dessa maneira avaliamos as alterações bioquímicas, fisiológicas, antropométricas e moleculares moduladas em indivíduos diabéticos tipo 2 submetidos a dieta hipoproteica durante 4 semanas.

3 HIPÓTESE

Nesse trabalho hipotetizamos que as alterações metabólicas encontradas em pacientes submetidos a restrição calórica de 25% estaria associada a alterações bioquímicas e moleculares em genes envolvidos com o metabolismo e inflamação em pacientes portadores de DM2.

Adicionalmente, o efeito da dieta isocalórica com restrição proteica resulta em efeitos metabólicos e moleculares comparáveis aos observados com a restrição calórica.

4 OBJETIVOS

Geral

Esse projeto tem por objetivo estudar os parâmetros bioquímicos, metabólicos, antropométricos e moleculares envolvidos na restrição calórica de 25% e na dieta hipoproteica em indivíduos que apresentam diabetes *mellitus* tipo 2 e dislipidemia.

Específicos

Em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 e com dislipidemia submetidos ao protocolo de restrição calórica ou restrição proteica, avaliamos:

1. Parâmetros antropométricos como Peso, Estatura, IMC e Gordura Corporal);
2. Níveis de glicemia de jejum, insulina de jejum, HOMA- β e HOMA-IR e hemoglobina glicada (HbA1c);
3. Perfil lipídico e níveis pressóricos;
4. Marcador de estado inflamatório sistêmico (Proteína C Reativa);
5. Resistência a insulina utilizando *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico;
6. Gasto energético basal através de calorimetria indireta.
7. Expressão gênica no tecido adiposo subcutâneo.
8. Estudo de associações entre a expressão genica e parâmetros bioquímicos e antropométricos.

9. RNAseq das amostras de tecido adiposo subcutâneo

10. Estudo da microbiota intestinal de pacientes submetidos a restrição proteica.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Participantes do estudo

Foram convidados ao todo 150 indivíduos através de anúncios em jornais e divulgação pela mídia. Devido a razões logísticas e incompatibilidade de horários 129 indivíduos foram descontinuados do estudo. Ao final os 21 indivíduos que apresentavam diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e dislipidemia (colesterol e triglicérides acima de 200 mg/dL), provenientes da cidade de Ribeirão Preto-SP, Araraquara-SP, São Carlos-SP, São Paulo-SP, Belo Horizonte-MG, Goiânia-Go e Manaus-AM foram selecionados para fazerem parte desse estudo clínico. Os participantes foram orientados a seguir uma dieta adequada para peso ideal durante período de adaptação de 15 dias em seu domicílio, e depois se submeteram a redução de 25% de calorias totais na alimentação diária ou a uma dieta hipoproteica, durante 4 semanas, internados na Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Os pacientes foram randomizados por meio de sorteio para cada um dos braços do estudo.

Termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os participantes. O estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina – USP (HCRP-FMRP-USP) sob o número 16286/2015 (em anexo). O estudo foi publicado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) com o número de registro: RBR-3hknrw.

Foram excluídos indivíduos que apresentavam uso de insulina, complicações crônicas do diabetes mellitus em estágios avançados (retinopatia proliferativa, insuficiência renal crônica, neuropatia autonômica e história de infarto agudo do

miocárdio ou acidente vascular periférico há menos de 6 meses), gestação, hepatopatias crônicas ou agudas, neoplasias, uso de anticoagulante sistêmico ou imunossupressores.

Figure 1

CONSORT Flow Diagram

Figura 1. Fluxo de participantes através do estudo. Descrição do fluxo de indivíduos que foram convidados a participar do estudo.

5.2 Composição das dietas

A dieta de restrição calórica de 25% em relação ao gasto energético basal, foi planejada pela redução na quantidade de alimentos, visando a redução do total calórico, porém respeitando a proporção de macronutrientes recomendados. Por outro lado, a dieta hipoproteica, foi calculada mantendo o total calórico medindo o gasto energético basal e reduzindo a quantidade de proteínas totais para o mínimo recomendado de 10% do valor calórico total da dieta, ou seja 0.8g/Kg/dia. As duas intervenções dietéticas tiveram duração de 4 semanas. Todas as refeições foram elaboradas pela cozinha da unidade de pesquisa clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. As dietas foram planejadas utilizando alimentos comuns da dieta típica brasileira como arroz, feijão, legumes e verduras e proteínas provenientes de carne bovina e de frango.

Figura 2. Algoritmo representando o desenho experimental. Esquema do protocolo de restrição calórica de 25% e o protocolo da dieta hipoproteica que foi realizada durante 4 semanas na Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

5.3 Avaliação Clínica e Biométrica

Os pacientes foram submetidos inicialmente a uma avaliação clínica e nutricional, incluindo medidas de peso, altura, circunferência da cintura, circunferência do quadril, circunferência abdominal. O peso corporal (kg) foi medido com uma balança eletrônica do tipo plataforma (Filizola) com capacidade máxima de 300 kg e precisão de 0,1 kg. A altura foi medida com um estadiômetro com precisão de 0,1 cm. O IMC foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado. As circunferências foram realizadas com uma fita métrica de metal (Sanny) com precisão de 0,1 cm e comprimento máximo de 2 m. A circunferência da cintura foi aferida a meio caminho entre a margem inferior da última costela e a crista ilíaca em um plano horizontal. O percentual de gordura corporal foi obtido usando um analisador de impedância bioelétrica (B.I.A.) (Modelo 450 Biodynamics). Foram realizadas aferições da pressão arterial segundo a técnica: participante sentado, com os pés no chão e as pernas descruzadas. O protocolo estabelecido foi de três medidas consecutivas, com intervalo de pelo menos cinco minutos entre cada mensuração e considerado como resultado final a média das duas últimas medidas. As aferições foram realizadas utilizando-se de aparelho automático da marca OMROM, modelo HEM741. O HOMA- β e HOMA-IR foram obtidos utilizando o HOMA2 Calculator software (http://www.dtu.ox.ac.uk/homac_alculator/).

5.4 Parâmetros Bioquímicos

Os indivíduos foram avaliados segundo os seguintes exames: glicemia de jejum, insulina de jejum e hemoglobina glicada total (HbA1c). Foi avaliada também a presença de alterações do metabolismo lipídico através da dosagem de colesterol total e frações HDL e LDL (estimado pela fórmula de Friederickson), triglicérides, CPK e dosagem sérica de Proteína C Reativa (PCR) para a avaliação inflamatória sistêmica dos pacientes. Os exames bioquímicos foram realizados nos laboratórios do HCRP seguindo os protocolos já estabelecidos pelo hospital.

5.5 Avaliação do gasto energético

A avaliação do gasto energético foi realizada através da calorimetria indireta pela análise de gases utilizando o calorímetro Quark RMR COSMED. Foram obtidos simultaneamente os seguintes parâmetros: o consumo de oxigênio ($\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$), a produção de dióxido de carbono ($\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$), o gasto calórico (kcal), o índice de trocas respiratórias (RER), a atividade física espontânea e a ingestão alimentar.

5.6 Biópsia da gordura abdominal subcutânea

A biópsia do tecido adiposo subcutâneo (TAS) foi realizada após anestesia local em 21 indivíduos por um cirurgião treinado da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Foram retiradas aproximadamente 2g de TAS em cada biópsia. De forma sistemática, todas as primeiras biópsias foram coletadas do lado direito do abdômen (no primeiro dia de cada intervenção nutricional) e a segunda biópsia do lado esquerdo do abdômen (no último dia de cada intervenção nutricional). O TAS foi rapidamente transportado para o laboratório de pesquisa em gelo. As amostras

de tecido foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato para remover o sangue aderido, depois foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a realização dos experimentos de RT-PCR e RNAseq.

5.7 Realização da técnica de Clamp Hiperinsulinêmico Euglicêmico

Para a técnica do *clamp* hiperinsulinêmico euglicêmico como descrito previamente (Gomes, Hollanda-Miranda et al. 2015). Brevemente, inicialmente foi inserido um cateter de polietileno na veia mediana do braço para coleta das amostras de sangue a cada 5 minutos durante o teste. Um segundo cateter foi inserido na veia antecubital para infusão de sor glicosado 10% e insulina. O objetivo desta técnica é aumentar agudamente a concentração de insulina no plasma para um novo platô (120 μ U/ml) e manter esse nível por 120 minutos. O novo nível resulta em hipoglicemia, o que é evitado pela infusão concomitante de glicose. Então, a dose de insulina infundida é pré-fixada e conhecida e a taxa de infusão de glicose é variável. A solução de insulina é preparada com salina isotônica e insulina cristalina regular na concentração de 300 mU/ml. Durante os primeiros 10 minutos a infusão é feita respeitando a seguinte ordem: durante 0 a 4 minutos a velocidade de infusão foi de 45,6 mL/hora, durante 4 ao 7 minutos a velocidade de infusão foi de 22,8 mL/hora e do 7 ao 10 minutos a velocidade de infusão manteve a 11,4 mL/hora, seguida de uma infusão constante de 40 mU/m² de superfície corporal por minuto por 110 minutos.

5.8 RT-PCR em Tempo Real

Para extração de RNA, utilizamos Trizol® Reagent (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, após a total trituração da

amostra tecidual na presença de Trizol, 1/5 (v/v) de clorofórmio foi adicionado ao tubo. Após 10 minutos em repouso em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas em centrífuga *Eppendorf* refrigerada a 4°C, a 12.000 x g, por 15 min. Após a centrifugação, a fase incolor do tubo foi transferida para um tubo novo para a precipitação do RNA em presença de álcool isopropílico 1:1. Após outra centrifugação a 12.000 x g, 10 min, a 4°C, um precipitado contendo RNA foi identificado. Etanol 75% foi adicionado para lavagem do precipitado e, então, realizada a remoção do etanol, secagem e adição de água milliQ autoclavada. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000c. Para a realização da transcrição reversa, utilizamos o kit iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad®) da seguinte maneira: 1 µg de RNA total, 1 µL 10x RT Buffer, 0.4 µL 100mM dNTP, 0.5 µL, 0.25 µL oligo-dT (100 µM), 0.5 µL Multiscribe RT (50U/µL) e água livre de RNase para um volume total de reação de 10 µL (16°C-30 min, 37°C-2 h, 85°C-10s, e 4°C-para sempre).

Logo após a síntese dos cDNAs, quantificamos a expressão dos genes de interesse por meio de PCR em tempo real (RT-PCR). Utilizamos na reação 100 nM de cada primer (sense e antisense), cerca de 25 ng de cDNA e SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad®), para um volume final de reação de 10 µL. A expressão gênica foi avaliada em um Sistema de Detecção de Sequências CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad®) sob as seguintes condições: 50°C -2 min, 95°C -10 min, e 40 ciclos de 95°C -15s, 60°C -20s, e 72°C -30s. Protocolos de dissociação foram usados para testar a eficácia dos primers em amplificar os genes especificamente. Utilizamos os genes constitutivos GAPDH como controles endógenos.

5.9 Análise Metagenômica

Sequências de DNA brutas foram importadas para QIIME2 (qiime2-2020.2) e filtradas por qualidade usando o plugin DADA2 a fim de detectar e corrigir erros de sequenciamento, filtrando leituras phiX, sequências quiméricas e aparando as sequências com base em gráficos de pontuação de Phred. Uma tabela de recursos foi criada para cada coorte e análises paramétricas de diversidade alfa e beta foram realizadas. Uma vez que algumas métricas de diversidade requerem relações filogenéticas entre os recursos, uma árvore filogenética enraizada usando o alinhamento MAFFT e o pipeline do fasttree foi construída. A diversidade α foi calculada usando o índice de diversidade de Shannon, Faith Phylogenetic Diversity, OTUs observados e métricas de uniformidade de Pielou. A diversidade β foi comparada usando Bray-Curtis, Jaccard, matrizes de distância UniFrac ponderadas e não ponderadas. A normalização dos dados foi feita por rarefação para manter a mesma profundidade de sequenciamento de todas as amostras. Os resultados de β -diversidade foram visualizados em gráficos de PCoA para cada matriz de distância e os padrões de agrupamento de dados foram investigados e testados usando PERMANOVA e PERMDISP. Características de abundância diferencial entre dois componentes (antes e depois das coortes de restrição de proteína) foram identificadas usando ANCOM e ALDEX em QIIME.

5.10 Estatística

Para a análise dos dados clínicos e moleculares foi utilizado o teste t Student pareado para a comparação entre os pacientes antes do tratamento e após o tratamento. Para as análises dos dados entre os diferentes protocolos de tratamentos foi utilizado o teste ANOVA mixed-design analysis of variance, sendo

que a significância foi considerada quando $P < 0,05$. Para as análises de correlações utilizamos os coeficientes de correlação de Pearson. As análises estatísticas foram realizadas com o software SAS (SAS Institute), e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism (Graphpad Prism 9 para Mac).

6 RESULTADOS

Restrição calórica

O protocolo desenvolvido nessa etapa da pesquisa está descrito na figura 2, mas resumidamente foi realizado um período de 15 dias com uma dieta adaptativa em que os pacientes foram orientados a seguir em suas próprias casas, ao final desse período os pacientes iniciavam o tratamento de 4 semanas internados na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do HCRP.

Foram incluídos no protocolo de restrição calórica de 25% 4 homens e 7 mulheres. A média de idade dos voluntários foi de 49 ± 8.5 anos e altura média de 1.64 ± 0.08 m. No início e ao final da internação avaliamos o peso corporal e o Índice de Massa Corpórea (IMC) de todos os indivíduos comparando o início e o final do tratamento. Observamos que houve uma redução de 7.9% do peso corporal e uma redução de 6.6% da razão do IMC como demonstrado na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1- Características dos indivíduos tratados com o protocolo de restrição calórica de 25%.

	Caloric Restriction		
	Start	Final	<i>p-value</i>
	(Mean±SD)	(Mean±SD)	
Gender	4M/7F	-	ns
Age (years)	49.0±8.5	-	ns
Height (m)	1.64±0.08	-	ns
Weight body (kg)	87.6±12.2	80.7±11.2****	< 0.0001
BMI (kg/m²)	32.0±5.4	29.9±5.1****	< 0.0001

As análises estatísticas foram demonstradas com a média ± Desvio Padrão (SD), Teste T Student (pareado), **** sendo $p < 0,0001$

Com o objetivo de detalhar um dos efeitos do protocolo de restrição calórica de 25% sob os indivíduos participantes do estudo, demonstramos a comparação dos pesos corporais dos indivíduos ao iniciarem o tratamento e ao final das internações (Figura 3a), mostrando que todos os participantes perderam peso e que essa perda de peso de 7.9% foi contínua e linear durante as 4 semanas (Figura 3b).

Concluída as análises antropométricas básicas, buscamos avaliar os níveis de glicose de jejum, hemoglobina glicada (Hb1Ac) e a concentração de hemoglobina total (Hb). Observamos uma redução de 56.9% nos níveis de glicemia de jejum ao final do tratamento. Para uma interpretação mais detalhada apresentamos dois gráficos demonstrando a comparação dos valores da glicose de jejum antes e após o tratamento (Figura 3c) e a evolução da glicemia semanalmente durante o tratamento (Figura 3d). Adicionalmente, o protocolo de RC proporcionou uma

redução de 1,5% dos níveis de Hb1Ac comparando antes e ao final do tratamento (Figura 4e). Para excluirmos um possível efeito do tratamento nos níveis sanguíneos de hemoglobina total, que poderia estar influenciando os níveis de A1c quantificamos a concentração de Hemoglobina total fornecida pelo hemograma de todos os pacientes. Não observamos alterações significativas da concentração de Hb comparando o antes e o final da intervenção nutricional (Figura 3f).

Figura 3- Avaliação do peso corporal e apresentação dos resultados bioquímicos e hematológicos obtidos durante o protocolo de restrição calórica

de 25%. Ao final do tratamento observamos que houve uma redução de 7.9% do peso corporal dos indivíduos. Também notamos uma redução de 56.9% da concentração de glicose de jejum e a diminuição de 1.5% da concentração de Hb1Ac dos indivíduos ao final do tratamento. Por fim verificamos que não houve alteração das concentrações de hemoglobina total ao final do protocolo. a) Comparação do peso corporal antes e ao final do tratamento. b) Evolução da perda de peso durante as 4 semanas de tratamento. c) Níveis glicêmicos antes e após o tratamento. d) Evolução da glicemia de jejum dos indivíduos durante as 4 semanas de tratamento. e) Redução de 1.5% da concentração total de Hb1Ac antes e após o tratamento. f) Concentração de hemoglobina total, comparando os resultados fornecidos pelo hemograma antes e ao final do tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student, sendo *** para $p = 0,0001$ e **** para $p < 0,0001$.

Para compreender se a diminuição dos níveis glicêmicos dos pacientes poderia estar associado a redução da resistência insulínica, optamos por realizar o Clamp Euglicêmico Hiperinsulinêmico o qual é padrão ouro para avaliar a ação da insulina. Observamos que o protocolo de restrição calórica de 25% reduziu significativamente a resistência insulínica, representado pelo aumento de 62.3% na taxa de infusão de glicose (GIR) comparando o clamp realizado no primeiro dia de internação (antes da intervenção alimentar), com o clamp ao final do tratamento (Figura 4a). Os níveis de glicemia plasmática reduziram em todos os pontos avaliados durante o teste de clamp euglicêmico hiperinsulinêmico (Figura 4b), com significativa redução de 33.9% na área sob a curva (AUC) (Figura 4c).

Figura 4- Resultados provenientes do exame Clamp Euglicêmico Hiperinsulinêmico. Os resultados do clamp euglicêmico hiperinsulinêmico demonstraram que a restrição calórica de 25% durante 4 semanas proporcionou a redução da resistência insulínica dos pacientes do estudo. a) Taxa de infusão de glicose comparando antes e o final do tratamento, observou-se aumento de 62.3%. b) Curva glicêmica dos indivíduos durante o clamp inicial e final. c) Áreas sob as curvas de glicemia comparado o início ao final do tratamento mostrando redução de 33.9%. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student, sendo *** para $p = 0,0002$ e **** para $p < 0,0001$.

Adicionalmente foi calculado HOMA (*homeostatic model assessment*) IR e β , para quantificação da resistência insulínica e a função das células β presente no pâncreas, respectivamente. Observamos uma redução de 61.1% em HOMA-IR

(Figura 5a) e aumento de 473.2% em do HOMA- β (Figura 5b), sugerindo-nos que a restrição calórica de 25% foi capaz de aumentar a capacidade funcional das células beta pancreáticas destes pacientes.

Figura 5- Resultados dos índices de HOMA-IR e HOMA- β . Os resultados de HOMA IR e β demonstraram uma redução da resistência insulínica e um aumento da atividade das células β pancreáticas. a) HOMA-IR antes a pós o tratamento com redução de 61.1%. b) HOMA- β indicando o aumento de 473.2% da atividade das células β do pâncreas dos indivíduos tratados com o protocolo de restrição calórica de 25%. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo * para $p = 0,0124$ e ** para $p < 0,0076$.

Observamos uma correlação negativa entre glicemia plasmática e HOMA- β no início do tratamento (Figura 6a) que se manteve após a intervenção (Figura 6b)

Figura 6- Resultados das correlações entre os valores do HOMA-β e a glicemia de jejum. Os resultados dos dados demonstraram uma correlação negativa entre os resultados do HOMA-β e os valores de glicemia de jejum, indicando uma melhora da funcionalidade das células β pancreáticas ao final do tratamento. a) Correlação entre os resultados do HOMA-β com os valores de glicemia de jejum no início do tratamento ($R:-0.7000$). b) Correlação entre HOMA-β e níveis de glicose ao final do tratamento ($R:-0.8793$). Estes dados são demonstrados em formato de dotplot, análise de correlação de pearson, sendo $p=0,0204$ para a análise inicial e $p=0,0006$ para análise final.

A fim de avaliarmos os efeitos da restrição calórica nas concentrações lipídicas destes indivíduos, buscamos avaliar o efeito da RC nos níveis séricos de triglicérides e colesterol total e suas frações. O tratamento reduziu em 34.4% os níveis de colesterol total (Figura 7a). O efeito na redução de colesterol total foi observado durante todo o estudo com uma tendência a estabilização após a terceira semana de tratamento (Figura 7b).

Figura 7- Nível de colesterol total dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%. O protocolo de tratamento propiciou a redução dos níveis de colesterol total em 34.4%. a) Concentrações de colesterol total antes e o final do tratamento. b) Evolução do nível de colesterol total dos pacientes durante as 4 semanas tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo **** para $p=0,0001$.

Além o colesterol total, notamos também que os níveis de LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade) apresentou uma redução de 36.9% (Figura 8a). Aqui demonstramos a redução dos níveis de LDL durante o tratamento (Figura 8b).

Figura 8- Nível de LDL dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%.

O tratamento propiciou a redução dos níveis de LDL em 36.9%. a) Níveis de LDL antes e após o tratamento. b) Evolução do nível de LDL dos pacientes durante as 4 semanas tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo **** para $p < 0,0001$.

Verificamos que ao final do tratamento, os níveis de triglicérides reduziram 49.9% comparando o início ao final das internações (Figura 9a). Observamos também uma queda acentuada dos níveis de triglicérides durante o tempo de tratamento dos pacientes, como visto na Figura 9b abaixo.

Figura 9- Nível de triglicérides dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%. O protocolo de tratamento levou a uma redução de 49.9% dos níveis de triglicérides. a) Níveis de triglicérides antes e ao final do tratamento. b) Redução do nível de triglicérides dos pacientes durante as 4 semanas tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo **** para $< 0,0001$.

Não observamos mudanças na massa magra (músculo), comparando antes e após a intervenção da dieta de restrição calórica (Figura 10a). Por outro lado o protocolo de restrição calórica levou a redução de 11.5% na quantidade de massa gorda, como demonstrado na Figura 10b abaixo.

Figura 10- Quantidade de massa muscular e massa gorda corporal dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%. O tratamento não afetou o acúmulo de massa muscular, no entanto induziu uma perda de 11.5% na quantidade de massa gorda dos indivíduos tratados. a) Massa magra (músculo) em Kg, antes e ao final do tratamento. b) Redução do acúmulo de massa gorda (Kg) antes e ao final do protocolo. Os dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo *** para $p = 0,0002$ e ns=0,3771.

Além da avaliação do índice de massa magra e massa gorda, a composição corporal também foi avaliada por medidas antropométricas. Observamos redução na circunferência da cintura (4,8%), circunferência do quadril (3,5%), circunferência do pescoço (3,4%) (Figura 11a-c).

Figura 11- Avaliação antropométrica (circunferências da cintura, quadril e pescoço) dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%. Ao final do tratamento observamos a redução das circunferências da cintura, quadril e pescoço em 4.8%, 3.5% e 3.4% respectivamente. a) Medida da circunferência da cintura (cm) antes e ao final do tratamento. b) Medida da circunferência do quadril (cm) antes e depois do tratamento. c) Medida da circunferência do pescoço (cm) antes e depois do tratamento. Os dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo *** para $p = 0,0002$, ** $p = 0,0020$ e ** $p = 0,0016$ respectivamente.

Adicionalmente, observamos redução em dobras cutâneas bicipital e tricipital (15.4% e 9.8%, respectivamente) (Figura 12a e 12b). Encontramos diminuição de 10,9% na dobra cutânea da região subescapular e 10.6% na dobra cutânea supra ilíaca 10,6% (Figura 12c e 12d). Por fim analisamos a dobra cutânea do pescoço e observamos uma redução de 8.7% (Figura 12e) comparando a avaliação no início da internação com ao final do tratamento.

Figura 12- Quantificação das dobras cutâneas bicipital, tricipital, subescapular, supra-iliaca e do pescoço dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%. A análise das mensurações demonstraram que houveram reduções de medidas das pregas cutâneas bicipital 15.4%, tricipital 9.8%, subescapular 10.9%, supra-iliaca 10.6% e do pescoço em 8.7% ao final do tratamento. a) Medida da dobra cutânea bicipital (mm) antes e ao final do tratamento. b) Medida da dobra cutânea tricipital (mm) antes e ao final do protocolo. c) Medida da dobra cutânea subescapular (mm) antes do tratamento e ao final do protocolo. d) Medida da dobra cutânea supra-iliaca (mm) antes e depois do protocolo. e) Medida da dobra cutânea do pescoço (mm) antes e ao final do tratamento. SF= skin fold. Os dados são

apresentados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo ** para $p = 0,0051$, ** $p = 0,0084$, ** $p = 0,0041$, * $p = 0,0214$, * $p = 0,0171$ respectivamente.

Observamos uma redução de 56.9% da Proteína C Reativa (PCR) (Figura 13a), comparando os níveis no início do tratamento com o momento da alta hospitalar. Também mostramos a evolução linear e contínua da queda dos níveis da PCR no decorrer as 4 semanas do tratamento (Figura 13b).

Figura 13- Níveis séricos da Proteína C Reativa (PCR) nos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%. O protocolo de tratamento induziu a uma redução de 56.9% dos níveis de PCR. a) Níveis de PCR antes e ao final do tratamento. b) Redução do nível de PCR dos pacientes durante as 4 semanas tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo **** para $P < 0.0001$.

Ao analisarmos os níveis de CPK dos indivíduos submetidos ao protocolo de RC, observamos uma redução de 48.3% comparando os níveis antes e ao final do tratamento (Figura 14a). Também demonstramos uma curva decrescente dos níveis de CPK durante todas as semanas de tratamento e podemos observar uma queda importante na primeira semana de tratamento com estabilização nas semanas seguintes (Figura 14b).

Figura 14- Avaliação da concentração sérica da enzima Creatinofosfoquinase (CPK) nos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%. O protocolo de tratamento proporcionou a uma redução de 48.3% dos níveis de CPK. a) Níveis de CPK antes e ao final do tratamento. b) Redução do nível de CPK dos pacientes durante as 4 semanas tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo * para $p = 0,0142$.

Todos os participantes possuíam o diagnóstico de hipertensão arterial prévio e eram usuários de drogas anti-hipertensivas há pelo menos 2 anos. As aferições de pressão arterial foram efetuadas semanalmente e pudemos observar que houve uma redução de 31.0% na pressão sistólica e 29.6% na pressão diastólica ao final das intervenções (Figura 15a). Também avaliamos semanalmente as pressões arteriais dos pacientes, como observado na Figura 15b , evidenciando o declínio das curvas tanto da pressão sistólica como da pressão diastólica. Importante ressaltar que ao final da terceira semana de tratamento, foi necessário suspender ou reduzir o número de medicamentos ou dosagem de drogas anti hipertensivas de vários pacientes, devido a episódios frequentes de hipotensão arterial.

Figura 15- Análise da pressão arterial sistêmica dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%. O protocolo de RC proporcionou a uma redução de 31.0% na pressão sistólica e também uma redução 29.6% na pressão diastólica. a) Pressão arterial sistólica e diastólica (mmHg) antes e ao final do tratamento. b) Monitoramento da pressão arterial sistêmica (sistólica e diastólica) dos pacientes durante as 4 semanas tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo **** para $p < 0,0001$.

Os dados de calorimetria indireta de corpo total realizados no início do estudo foram usados para o cálculo da necessidade energética diárias e a partir desse dado elaboramos a dieta personalizada para cada paciente.

Os resultados fornecidos pela calorimetria indireta nos revelou que o protocolo de restrição calórica de 25% reduziu o consumo de oxigênio (VO_2) e diminuiu a produção de gás carbônico (VCO_2) em 8.79% e 14.91% respectivamente (Figura 16a). Observamos também uma redução do valor do R (razão entre os valores de VCO_2 e VO_2) em 5.28% (Figura 16b). Com esses dados conseguimos calcular o valor do gasto energético basal em Kcal/Min/m², e encontramos um redução de 64.19% do gasto energético após o tratamento (Figura 16c). Por fim, notamos que houve um aumento de 16.58% da utilização de gordura (FAT) como principal substrato energético para geração de energia e não houve alteração do consumo de carboidratos (CHO) comparando os resultados das calorimetrias antes e ao final do protocolo de RC (Figura 16d).

Figura 16- Resultado obtidos pela calorimetria indireta em repouso durante 30 minutos dos indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%. O tratamento propiciou a redução dos níveis de VO₂ e VCO₂ em 8.79% e 14.91% respectivamente, além de reduzir em 5.28% o valor de R. A restrição calórica de 25% reduziu o consumo energético basal em 64.19% e induziu um consumo maior de gorduras em 16.58%. a) Consumo de Oxigênio (VO₂) e a produção de gás Carbônico (VCO₂) comparando antes e ao final do tratamento. b) Valor de R (razão entre os valores de VCO₂ e VO₂). c) Gasto energético basal dos pacientes comparando os valores antes e ao final do tratamento. d) Porcentagem de consumo de gordura (FAT) e carboidratos (CHO) efetuando a comparação antes da internação com o final do tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo * para $p = 0,0450$ e ** para $p = 0,0060$ (a); * para $p = 0,0382$ (b); * para $p = 0,0386$; * para $p = 0,0383$ e ^{ns} $p = 0,679$.

Após a conclusão do ensaio clínico de restrição de 25% do total calórico da dieta ideal, 5 pacientes foram reavaliados após 1 mês de tratamento. A distância geográfica e dificuldade em obter dados clínicos confiáveis foram os motivos de não obtermos dados de todos os pacientes. Não observamos alterações significativas na glicemia de jejum, colesterol, colesterol LDL, triglicerídeos ou peso corporal após 1 mês da alta hospitalar nos pacientes avaliados (Figura 17 a-e).

Figura 17- Parâmetros metabólicos após o período de acompanhamento de 1 mês. Resultado obtido de 5 indivíduos submetidos ao protocolo de Restrição Calórica de 25%. a) Níveis de glicose em jejum ($P = 0,0650$). b) Níveis de colesterol total ($P = 0,3138$). c) Níveis de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) ($P = 0,2559$). d) Níveis de triglicerídeos ($P = 0,5280$). e) Peso corporal ($P = 0,4766$).

Utilizamos amostras de tecido adiposo subcutâneo dos pacientes submetidos a restrição calórica de 25% para avaliar a expressão gênica de diversos genes envolvidos na via de restrição calórica e do estresse de retículo endoplasmático. Observamos que o protocolo de restrição calórica de 25% foi capaz de induzir o aumento da expressão de *SOD2* ($p=0.0294$), *AMPK* ($p< 0.0001$), *ATF4* ($p=0.0008$), *Adipoq* ($p< 0.0001$), *GCN2* ($p=0.0001$), *PGC1 α* ($p=0.0003$), *SIRT1* ($p=0.0008$), *SIRT3* ($p=0.0197$), além de reduzir a expressão de *PERK* ($p=0.0121$) demonstrados na Figura 18a/b.

Figura 18- Avaliação da expressão mRNA de diversos genes envolvidos na via da restrição calórica em amostras de tecido adiposo subcutâneo de indivíduos submetidos a restrição calórica de 25%. O tratamento propiciou o aumento de

diversos genes responsáveis pelos benefícios da restrição calórica comparando a expressão de mRNA das amostras colhidas no início do tratamento ao final do tratamento. a-b) Gráfico representando a expressão de mRNA de amostras de tecido adiposo subcutâneo colhidas no início e ao final do tratamento. Os dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo *para $p = 0,05$; ** $p = 0,01$; *** $p = 0,001$ and **** $p = 0,0001$.

As análises de correlação de indivíduos submetidos à intervenção de restrição calórica mostraram que as mudanças no peso corporal se correlacionaram negativamente com o *GCN2* ($r = -0,66$; $P = 0,036$) e *PPARY* ($r = -0,65$; $P = 0,040$), e o IMC correlacionou-se negativamente com a adiponectina ($r = -0,73$; $P = 0,014$). Além disso, o nível de glicose de jejum foi fortemente correlacionada com *AMPK* ($r = -0,78$; $P = 0,006$) e *SIRT1* ($r = -0,82$; $P = 0,003$). No entanto, o colesterol mostrou uma correlação positiva com *EIF2AK3* ($r = 0,63$; $P = 0,048$) enquanto o colesterol LDL foi negativamente correlacionado com *ATF6* ($r = -0,69$; $P = 0,024$) (Figura 19).

Figura 19- Heatmap mostrando as correlação entre a expressão gênica do tecido adiposo e valores bioquímicos e parâmetros antropométricos de indivíduos submetidos à restrição calórica de 25%. Correlações de Pearson entre a expressão do gene delta e delta das alterações nos valores bioquímicos/parâmetros antropométricos em indivíduos submetidos à restrição calórica. As correlações mostradas em números representam os valores de R e são aquelas que correspondem ao valor $P < 0,05$.

Para compreender com mais detalhes os efeitos da restrição calórica de 25% sob o tecido adiposo humano fizemos uma colaboração com os professores Dr. Marcelo A. Mori (UNICAMP) e Dr. Jonas Treebak (Universidade da Dinamarca - Copenhagen) para a realização de análise de RNAseq. Dessa forma enviamos as amostras de tecido adiposo dos pacientes para a Dinamarca a fim da realização dos experimentos. No total foram avaliados 24122 genes. Os resultados preliminares mostraram que não foi observado nenhuma mudança significativa ($FDR < 0.05$) na expressão de genes ou termos enriquecidos de vias metabólicas para as amostras de restrição calórica (Figura 20a-b), apesar de apresentarem um p-value significativo. No entanto o sexo dos participantes influenciou a distribuição (Figura 20c).

Figura 20- Dados preliminares do RNAseq das amostras detectado adiposo de indivíduos submetidos à restrição calórica de 25%. A. Vias metabólicas supra-reguladas enriquecidas, P-value <0.05. B. Vias metabólicas infra-reguladas enriquecidas, P-value <0.05. C. Distribuição dos principais componentes dos genes analisados separados por sexo.

Restrição proteica

Apresentamos aqui os resultados obtidos dos 10 indivíduos que foram submetidos à dieta isocalórica com restrição de proteínas. Foram avaliados 5 mulheres e 5 homens com média de idade $51,6 \pm 8.9$. O IMC dos pacientes inicialmente era em média 29.1 ± 8.4 e ao final do tratamento houve uma redução de 6.2% chegando a 27.3 ± 7.0 , como demonstrado na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2- Gênero, idade e perfil antropométrico dos indivíduos tratados com o protocolo de restrição proteica.

	Protein Restriction		
	Start	Final	p-value
	(Mean $\pm$ SD)	(Mean $\pm$ SD)	
Gender	5M/5F	-	ns
Age (years)	51.6 ± 8.9	-	ns
Height (m)	1.65 ± 0.08	-	ns
Weight body (kg)	80.5 ± 29.1	$75.5 \pm 23.5^{****}$	< 0.0001
BMI (kg/m ²)	29.1 ± 8.4	$27.3 \pm 7.0^{****}$	< 0.0001

As análises estatísticas foram demonstradas com a média $\pm$ Desvio Padrão (SD).

Teste T Student (pareado), **** sendo $p < 0,0001$

Os indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica durante 4 semanas apresentaram redução de 6.2% do peso corporal ao final do tratamento (Figura 21a), e uma perda contínua de peso durante o tratamento (Figura 21b). Ao avaliarmos a glicemia de jejum dos pacientes comparando o início ao final do

tratamento encontramos uma redução de 52.7% dos níveis de glicose plasmática (Figura 21c). Na Figura 21d demonstramos a redução durante as 4 semanas de tratamento. Também notamos que a concentração da HbA1c apresentou uma redução de 0.9% ao final do tratamento (Figura 21e), e não houve alteração da concentração de hemoglobina total dos pacientes (Figura 21f).

Figura 21- Avaliação do peso corporal e apresentação dos resultados bioquímicos e hematológicos obtidos durante o protocolo de restrição

proteica. Ao final do tratamento observamos que houve uma redução de 6.2% do peso corporal dos indivíduos. Também notamos uma redução de 52.7% da concentração de glicose de jejum e a diminuição de 0.9% da concentração de Hb1Ac dos indivíduos ao final do tratamento. Por fim verificamos que não houve alteração das concentrações de hemoglobina total ao final do protocolo. a) Peso corporal antes e ao final do tratamento. b) Evolução da perda de peso durante as 4 semanas de tratamento. c) Níveis glicêmicos antes e após o tratamento. d) Evolução da glicemia de jejum dos indivíduos durante as 4 semanas de tratamento. e) Níveis de Hb1Ac antes e após o tratamento, observamos redução de 0.9%. f) Concentração de hemoglobina total, comparando os resultados fornecidos pelo hemograma antes e ao final do tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student, sendo ** para $p = 0,01$ e *** para $p = 0,0001$.

Para avaliarmos se a diminuição dos níveis glicêmicos dos indivíduos submetidos a restrição proteica estaria associado a redução da resistência insulínica, realizamos o Clamp Euglicêmico Hiperinsulinêmico. Verificamos que o protocolo de restrição proteica foi capaz de diminuir a resistência insulínica dos pacientes, confirmado pelo aumentando de 93.1% no GIR comparando a realização do clamp antes e ao final da intervenção (Figura 22a). Apesar de estáveis os níveis glicêmicos estavam menores na avaliação após o tratamento. (Figura 22b), com redução significativa de 35% na AUC ao final do tratamento (Figura 22c).

Figura 22- Resultados provenientes do Clamp Euglicêmico Hiperinsulinêmico.

Os resultados do clamp euglicêmico hiperinsulinêmico demonstraram que a restrição proteica durante 4 semanas proporcionou a redução da resistência insulínica dos pacientes submetidos ao tratamento. a) Taxa de infusão de glicose antes e o final do tratamento, mostrando aumento de 93.1%. b) Curva glicêmica dos indivíduos durante o clamp inicial e final. c) Figura indicando a redução de 35.0% dos valores das Áreas sob as curvas de glicemia no início e ao final do tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student, sendo **** para $p < 0,0001$.

Notamos que ao final do tratamento houve uma redução dos níveis de colesterol total em 35.4% comparando as concentrações antes e depois do

tratamento (Figura 23a). Na Figura 23b mostramos a evolução da redução do colesterol total no decorrer das 4 semanas de tratamento.

Figura 23- Nível de colesterol total dos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica. O protocolo de tratamento propiciou a redução dos níveis de colesterol total em 35.4%. a) Níveis séricos de colesterol total antes e o final do tratamento. b) Evolução do nível de colesterol total dos pacientes durante as 4 semanas tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ Desvio Padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo ** para $p=0,0010$.

Além dos níveis de colesterol total, notamos também que os níveis de LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade) apresentaram uma redução de 38.6% (Figura 24a) ao final do tratamento, com redução mais importante na primeira semana de intervenção (Figura 24b).

Figura 24- Nível de LDL dos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica. O tratamento propiciou a redução dos níveis de LDL em 38.6%. a) Níveis séricos de LDL antes e ao final do tratamento. b) Evolução do nível de LDL dos pacientes durante as 4 semanas tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ desvio padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo *** para $p = 0,0006$.

A intervenção reduziu os níveis de triglicérides em 39.5% (Figura 25a) e foi observado redução durante todo o período de tratamento (Figura 25b).

Figura 25- Nível de triglicérides dos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica. O protocolo de tratamento levou a uma redução de 39.5% dos níveis de triglicérides. a) Níveis séricos de triglicérides antes e ao final do tratamento. b) Redução dos níveis de triglicérides dos pacientes durante as 4 semanas tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ desvio padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo ** para $< 0,0022$.

Ao analisarmos a quantidade de massa magra (músculo), observamos que o protocolo não alterou essa variável (Figura 26a). No entanto ao avaliarmos a quantidade da massa gorda (gordura), evidenciamos uma redução de 9.9% da gordura corporal no indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica, como demonstrado na Figura 26b.

Figura 26- Quantidade de massa muscular e massa gorda corporal dos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica. O tratamento não afetou o acúmulo de massa muscular, no entanto induziu uma perda de 9.9% na quantidade de massa gorda dos indivíduos tratados. a) Massa magra (Kg) antes e ao final do tratamento. b) Redução do acúmulo de massa gorda (Kg) demonstrando os resultados antes e ao final do protocolo de RP. Os dados são demonstrados com média $\pm$ desvio padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo *** para $p = 0,0007$ e ns=0,2637.

Observamos também a redução na circunferência da cintura (2.0%), na circunferência do quadril (1.9%) e na circunferência do pescoço (0.8%) (Figura 27a-c).

Figura 27- Avaliação antropométrica (circunferências da cintura, quadril e pescoço) dos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica. Ao final do tratamento observamos a redução das circunferências da cintura, quadril e pescoço em 2.0%, 1.9% e 0.8% respectivamente. a) Medida da circunferência da cintura (cm) antes e ao final do tratamento. b) Medida da circunferência do quadril (cm) antes e ao final do protocolo. c) Medida da circunferência do pescoço (cm) antes do tratamento e ao final do protocolo. Os dados são demonstrados com média $\pm$ desvio padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo * para $p = 0,0187$, * $p = 0,0303$ e ^{ns} $p = 0,1934$ respectivamente.

A fim de completar a avaliação antropométrica dos pacientes que foram tratados com o protocolo de restrição proteica, medimos as suas dobras cutâneas bicipital, triceptal, subescapular, supra ilíaca e de pescoço. Observamos que as dobras cutâneas bicipital e tricipital apresentaram uma redução de 14.2% e 9.0% respectivamente (Figura 28a e 28b). Notamos que houve uma diminuição nas dobras cutâneas da região subescapular 8,4% e supra ilíaca 10,5% (Figura 28c e 28d) assim como na dobra cutânea do pescoço e deparmos com uma redução de 23.0% (Figura 28e) ao final do tratamento.

Figura 28- Quantificação das dobras cutâneas bicipital, tricipital, subescapular, supra-iliaca e do pescoço dos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica. A análise das mensurações demonstraram que houve redução de medidas das pregas cutâneas bicipital 14.2%, tricipital 9.0%, subescapular 8.4%, supra-iliaca 10.5% e do pescoço em 23.0% ao final do tratamento. a) Medida da dobra cutânea bicipital (mm) antes e ao final do tratamento. b) Medida da dobra cutânea tricipital (mm) antes e ao final do protocolo. c) Medida da dobra cutânea subescapular (mm) antes e ao final do protocolo. d) Medida da dobra cutânea supra-iliaca (mm) antes e depois do tratamento. e) Medida da dobra cutânea do pescoço (mm) antes e ao final do tratamento. Os dados são demonstrados com média $\pm$ desvio padrão (SD). Teste

T Student (Pareado), sendo ** para $p = 0,0040$, ** $p = 0,0086$, ** $p = 0,0052$, ** $p = 0,0016$, * $p = 0,0222$ respectivamente.

Com o objetivo de compreender se o protocolo de restrição proteica poderia afetar o processo inflamatório sistêmico dos indivíduos tratados, quantificamos os níveis da Proteína C Reativa (PCR) em nossos pacientes. Observamos uma redução de 69.4% da PCR (Figura 29a), comparando os níveis de PCR no início do tratamento com o momento da alta hospitalar. Também mostramos a evolução linear e contínua da queda dos níveis da PCR no decorrer as 4 semanas do tratamento (Figura 29b).

Figura 29- Quantificação sérica da Proteína C Reativa (PCR) nos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica. O protocolo de tratamento induziu a uma redução de 69.4% dos níveis de PCR. a) Níveis de PCR antes e ao final do tratamento. b) Redução do nível de PCR dos pacientes durante as 4 semanas

tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ desvio padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo ***para $P=0.0009$.

Ao analisarmos os níveis séricos de CPK dos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica, observamos um decréscimo de 51.1%, (Figura 30a). Também demonstramos a curva decrescente dos níveis de CPK durante todas as semanas de tratamento (Figura 30b).

Figura 30- Avaliação dos níveis séricos da enzima Creatinofosfoquinase (CPK) nos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica. O protocolo de tratamento proporcionou a uma redução de 51.1% dos níveis de CPK. a) Níveis de CPK antes e ao final do tratamento. b) Redução do nível de CPK dos pacientes durante as 4 semanas tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ desvio padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo * para $p = 0,0387$.

Observamos uma redução de 26.2% na pressão sistólica e 41.2% na pressão diastólica ao final das internações (Figura 31a), com queda contínua durante todo o estudo (Figura 31b). Da mesma forma como nos pacientes submetidos a restrição calórica, ao final da terceira semana de tratamento, foi necessário suspender ou reduzir o número de medicamentos ou dosagem de drogas anti hipertensivas de 6 pacientes, devido a episódios de hipotensão arterial frequentes.

Figura 31- Análise da pressão arterial sistêmica dos indivíduos submetidos ao protocolo de restrição proteica. O protocolo de tratamento proporcionou a uma redução de 26.2% na pressão sistólica e também uma redução 41.2% na pressão diastólica. a) Pressão arterial sistêmica (sistólica e diastólica) (mmHg) antes e ao final do tratamento. b) Monitoramento da pressão arterial sistêmica (sistólica e diastólica) dos pacientes durante as 4 semanas tratamento. Estes dados são demonstrados com média $\pm$ desvio padrão (SD). Teste T Student (Pareado), sendo **** para $p < 0,0001$.

Os dados de calorimetria indireta mostraram que o protocolo de restrição proteica não foi capaz de alterar o gasto energético basal, VO_2 , VCO_2 , RQ ou oxidação de gordura/carboidrato (Figura 32a-d), exceto por uma leve diminuição no gasto de energia normalizado pela massa magra (Figura 32e).

Figura 32- Resultado obtidos pela calorimetria indireta em repouso durante 30 minutos dos indivíduos submetidos a restrição proteica. O tratamento de restrição proteica não alterou os parâmetros de gasto energético, apenas uma leve diminuição no gasto de energia normalizado pela massa magra. a) Gasto energético basal dos pacientes antes e ao final do tratamento (^{ns} $P=0.1785$). b) Consumo de Oxigênio (VO_2) e a produção de gás Carbônico (VCO_2) antes e ao final do tratamento (^{ns} $P=0.0881$ and ^{ns} $P=0.1078$). c) Valor de R (razão entre os valores de VCO_2 e VO_2) (^{ns} $P=0.4602$). d) Porcentagem de consumo de gordura (FAT) e carboidratos (CHO) antes da internação e ao final do tratamento (^{ns} $P=0.1418$ and ^{ns} $P=0.0765$). e) Gasto energético normalizado pela massa magra (músculo)

(* $P=0.0359$). Estes dados são demonstrados com média $\pm$ desvio padrão (SD).

Teste T Student (Pareado).

Seguindo o mesmo princípio do protocolo de restrição calórica, após a conclusão do ensaio clínico (protocolo de restrição proteica), realizamos uma análise de acompanhamento de 6 pacientes após 1 mês de tratamento para avaliar o quão sustentados os efeitos após a intervenção. Não observamos alterações significativas na glicemia de jejum, colesterol, colesterol LDL, triglicerídeos ou peso corporal após 1 mês da alta hospitalar (Figura 33 a-e). Esses resultados sugerem que os efeitos da restrição proteica são mantidos por pelo menos um mês fora do ambiente hospitalar.

Figura 33- Parâmetros metabólicos após o período de acompanhamento de 1 mês (protocolo de restrição proteica). Resultado obtido de 6 indivíduos submetidos ao protocolo de Restrição Proteica. a) níveis de glicose em jejum ($P=$

0.1926). b) níveis de colesterol total ($P= 0.8557$). c) níveis de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) ($P= 0.6038$). d) níveis de triglicerídeos ($P= 0.3017$). e) Peso corporal ($P= 0.7711$). Dados apresentados de dot-plot. T-test pareado foi usado para análise estatística.

Por último nós buscamos avaliar as vias metabólicas afetadas pelo protocolo de restrição proteica. Nós observamos que o protocolo de restrição proteica foi capaz de induzir o aumento da expressão de *NRF2* ($p=0.0019$), *AMPK* ($p< 0.0009$), *CHOP* ($p< 0.0001$), *ATF4* ($p< 0.0001$), *Adipoq* ($p< 0.0001$), *GCN2* ($p< 0.0001$), *PPARY* ($p< 0.0001$), *SIRT1* ($p< 0.0001$), demonstrados na Figura 34a/b.

Figura 34- Avaliação da expressão mRNA de diversos genes envolvidos na via da restrição calórica em amostras de tecido adiposo subcutâneo de indivíduos

submetidos ao protocolo de restrição proteica. O tratamento propiciou o aumento de diversos genes responsáveis pelos benefícios da restrição calórica comparando a expressão de mRNA das amostras colhidas no início do tratamento ao final do tratamento. a-b) Gráfico representando a comparação da expressão de mRNA de amostras de tecido adiposo subcutâneo colhidas no início e ao final do tratamento. Os dados são demonstrados com média $\pm$ desvio padrão (SD), Teste T Student (Pareado), sendo **p= 0,01; ***p= 0,001 and ****p=0,0001.

Ao fazermos o estudo de coeficiente correlação, observamos associações negativas entre o peso corporal e *NRF2* ($r = -0,67$; $P=0,032$) e Adiponectina ($r = -0,84$; $P=0,001$). O IMC teve associação negativa com *PGC1 α* ($r = -0,72$; $P=0,016$). Além disso, a glicose mostrou uma forte associação entre *AMPK* ($r = -0,82$; $P=0,003$), *Adipoq* ($r = -0,80$; $P=0,004$) e *PPARY* ($r = -0,73$; $P=0,015$). Hb1Ac mostrou associação entre *ATF4* ($r = -0,63$; $P=0,048$) e *SIRT1* ($r = -0,70$; $P=0,023$) e a insulina apresentou associação negativa com *GCN2* ($r = -0,68$; $P=0,029$). Por fim, o LDL apresentou associação com *SOD1* ($r = -0,79$; $P=0,005$) (Figura 35).

Figura 35- Heatmap mostrando as correlação entre a expressão gênica do tecido adiposo e valores bioquímicos e parâmetros antropométricos de indivíduos submetidos à restrição proteica. Correlações de Pearson entre a expressão do gene delta e delta das alterações nos valores bioquímicos/parâmetros antropométricos em indivíduos submetidos à restrição proteica. As correlações mostradas em números representam os valores de R e são aquelas que correspondem ao valor $P < 0,05$.

Com a colaboração com os professores da Unicamp e da Universidade da Dinamarca, realizamos as análises de RNAseq das amostras de tecido adiposo dos pacientes submetidos a restrição proteica. Os resultados de RNAseq sugerem que o gênero dos participantes é o principal determinante das variações gênicas observadas (Figura 36a), entretanto a variação na comparação antes e depois da restrição proteica pode ser atribuída aos níveis de glicose no sangue (Figura 36b). Observa-se um desvio para a direita na valor p-value (Figura 36c). Por fim, verificamos que pela análise de Gene Ontology, observamos um resultado que sugere um enriquecimento de genes associados à ativação principalmente células B e T do sistema imunológico nas amostras de tecido adiposo de pacientes submetidos a restrição proteica (Figura 36d).

c

d

Figura 36- Dados do RNAseq das amostras de tecido adiposo de indivíduos submetidos à restrição proteica. A. Distribuição da expressão gênica separada por pacientes antes e depois da restrição proteica. B. Atribuição dos níveis de glicose as variações gênicas. C. Histograma mostrando os valores de p-value dos genes analisados sugerindo a presença de um fator desconhecido. D. Vias metabólicas enriquecidas supra-reguladas e infra-reguladas .

Por fim, buscamos avaliar se o protocolo de restrição proteica poderia modular a microbiota intestinal dos participantes, dado que muitas alterações metabólicas são associadas a mudanças da composição da microbiota intestinal. Nesse estudo utilizamos amostras de 7 pacientes submetidos a restrição proteica comparando as amostras coletadas antes e depois do tratamento. No entanto, não observamos diferenças significativas na diversidade da microbiota em termos de número de espécies ou riqueza (diversidade alfa) em qualquer uma das medidas testadas. A análise de diversidade beta também não conseguiu apontar nenhum agrupamento específico das amostras. Os testes de abundância diferencial para composição comparando antes e depois das amostras de PR não detectaram mudanças significativas. No entanto, algumas espécies de bactérias principalmente Firmicutes, mostraram um dinamismo em relação a sua abundância chegando a uma alteração de quantidade até 4 vezes (fold change) Figura 37.

Figura 37- Restrição proteica não tem efeitos de curto prazo na composição da microbiota intestinal. A. Composição da microbiota intestinal. Abundância diferencial relativa de bactérias (Log2). B. Construção da árvore filogenética bacteriana.

7 DISCUSSÃO

Nossos dados sugerem que os pacientes com síndrome metabólica submetidos a restrição calórica de 25% ou a uma dieta isocalórica com restrição proteica de curto prazo (ou seja, 27 dias) se beneficiam de uma ampla gama de melhorias clínicas, incluindo redução da adiposidade, normalização da pressão arterial, melhora da sensibilidade à insulina, diminuição dos níveis de glicose e lipídios e redução da inflamação. É importante ressaltar que os efeitos de RC e RP parecem ser persistentes por pelo menos 1 mês quando os indivíduos deixam o ambiente hospitalar.

Dos 21 pacientes tratados em nossos dois protocolos, 12 indivíduos eram mulheres. Acreditamos que o número de mulheres foram maior do que os número de homens, pois a busca e o interesse por novos tratamentos e a atenção a própria saúde é uma característica mais prevalente nas mulheres em comparação aos homens, representando a realidade da saúde brasileira (Figueiredo 2005). A média de idade dos nosso pacientes em ambos os protocolos foi de 50 anos. Essa média de idade pode ser entendida como uma faixa de idade onde os indivíduos apresentam mais atenção a sua saúde devido ao surgimento de sintomas clínicos, além de apresentarem um horário de trabalho mais flexível, podendo se dedicar a um período de tempo mais longo ou até mesmo com dedicação integral a busca da melhoria da sua saúde, como é o caso do nosso protocolo de tratamento. Vale ressaltar que alguns pacientes que estiveram internados na UPC conseguiram manter suas atividades produtivas mesmo estando internados.

Ao iniciarmos nosso estudo, relatamos que os efeitos da RC eram esperados com base em estudos anteriores em humanos e modelos animais principalmente em

relação a alterações do peso corporal, níveis glicêmicos e mudanças do perfil lipídico (Roth, Mattison et al. 2004, Heilbronn, de Jonge et al. 2006, Han and Ren 2010, Kirchner, Hofmann et al. 2012, Martin, Bhapkar et al. 2016), mas faltavam dados substanciais para a RP, particularmente em humanos. Assim como a RC, o protocolo de RP foi capaz de reduzir o peso corporal principalmente a concentração de gordura corporal, diminuir os níveis glicêmicos, aumentar a sensibilidade insulínica, reduzir a concentração de lipídios plasmáticos e diminuir a pressão arterial sistêmica. Descobrimos que a restrição de calorias não é um fator preponderante para a melhora do perfil metabólico. Em vez disso, a restrição de proteínas é suficiente para conferir quase os mesmos resultados clínicos da restrição calórica sem a necessidade de uma redução drástica da ingestão de calorias. Apesar das diferenças na ingestão de calorias entre as dietas RC e RP, ambos os protocolos levaram à perda de peso, e isso se deve principalmente à diminuição da massa gorda, uma vez que a massa magra não é alterada. O conjunto dos dados antropométricos apresentados nos indicam que as reduções de medidas corporais dos pacientes não ficaram limitadas apenas na região abdominal e do quadril, mas em todas as regiões avaliadas nesse estudo, como as circunferências da cintura, quadril e pescoço além das pregas cutâneas bicipitais, tricipitais, sub-escapulares, supra-iliacas e da região do pescoço. Devemos ressaltar que este resultado foi promovido exclusivamente pelos protocolos alimentares, sem nenhum acréscimo de efeitos relacionados a exercício físico.

A perda de massa muscular poderia ser uma possível complicação na dieta com restrição proteica, porém, não foi observado nos pacientes em RP assim como nos pacientes em RC. Esse dado foi confirmado por nenhuma alteração na excreção de creatinina urinária ou uréia após os 2 protocolos de tratamentos (Tabela Anexo).

A manutenção da massa magra é de fundamental importância para esses pacientes, visto que a massa muscular é importante para o controle adequado da glicose (Lee, Kim et al. 2017) e preservação das funções motoras em indivíduos submetidos a intervenções dietéticas.

Mudanças na ingestão de energia estão intimamente ligadas a mudanças no gasto de energia. Em concordância com estudos anteriores, observamos que o gasto energético basal dos participantes submetidos à RC é reduzido, assim como a frequência cardíaca de repouso, sugerindo uma adaptação metabólica e uma menor taxa metabólica, o que pode estar associado aos efeitos benéficos da RC (Heilbronn, de Jonge et al. 2006, Redman, Smith et al. 2018). Somando-se a esses estudos anteriores que usaram exposição de longo prazo à RC (ou seja, entre seis meses e dois anos), nosso estudo demonstra que 27 dias de RC em um ambiente controlado podem diminuir o gasto de energia em pacientes com síndrome metabólica. Vale ressaltar que uma diferença entre esses estudos e o aqui apresentado, é que os indivíduos de nosso estudo apresentavam sobrepeso, além de serem diabéticos, dislipidêmicos e hipertensos, enquanto os indivíduos dos estudos citados eram saudáveis.

Curiosamente, apesar das alterações no peso corporal e na adiposidade, não observamos mudanças no gasto energético basal em indivíduos submetidos à RP, exceto por uma leve diminuição no gasto energético quando normalizado pela massa magra. Isso contrasta com estudos em modelos animais de restrição dietética de metionina, onde o aumento da taxa respiratória e do gasto energético foi associado à diminuição da adiposidade e redução do peso corporal (Wanders, Stone et al. 2016, Barcena, Quiros et al. 2018). Dado que nem a ingestão de energia nem

o gasto energético total são afetados pela RP em nosso estudo, e dado que os indivíduos do grupo RP foram submetidos a uma dieta isocalórica com base no gasto energético basal, não está claro como esses indivíduos perdem peso. Um estudo longitudinal com um número maior de participantes deve ser desenhado para avaliar de forma abrangente o balanço energético em indivíduos submetidos a RP.

Em nosso estudo, a diminuição da adiposidade está associada à redução da pressão arterial e a taxa de batimentos cardíacos, mesmo com a ingestão diária de sal fixada em 4g. Nossos achados com relação à RC estão de acordo com um estudo anterior que mostra redução de fatores de risco associados ao aparecimento de doenças cardiovasculares como, por exemplo, pressão arterial elevada e frequência cardíaca (Redman, Smith et al. 2018). No entanto, a diminuição da pressão arterial conferida pela RP indica que a diminuição da ingestão de proteínas na dieta poderia ser uma estratégia viável para controlar a pressão arterial em pacientes hipertensos. A restrição de aminoácidos sulfurados tais como metionina, cisteína, homocisteína e taurina, podem melhorar a saúde vascular em camundongos (Longchamp, Mirabella et al. 2018). É importante ressaltar que os pacientes com síndrome metabólica submetidos a RC ou RP por 27 dias tiveram sua pressão arterial completamente normalizada ao final da dieta. Associado com uma redução nos níveis de lipídios circulantes (colesterol, LDL, triglicérides) esses dados sugerem que as dietas mitigam o risco de doenças cardiovasculares. Isso está de acordo com outros estudos que mostram que a diminuição do IMC, adiposidade e circunferência da cintura e do quadril está ligada a um risco reduzido de DCV e uma redução em todas as causas de mortalidade em indivíduos submetidos a RC (Flint, Rexrode et al. 2010, Kritchevsky, Beavers et al. 2015, Steven, Hollingsworth et al. 2016, Brandhorst and Longo 2019).

A relação entre a ingestão reduzida de proteína na dieta e o controle glicêmico aprimorado e a sensibilidade à insulina é particularmente impressionante. Para conseguir uma redução na ingestão de proteínas, os pacientes tiveram que aumentar a ingestão de carboidratos até um determinado nível (60% do total de quilocalorias ingeridas diariamente). Apesar desse aumento, o RP levou a reduções nos níveis de glicose no sangue e HbA1c, bem como melhorou a sensibilidade à insulina, confirmado com a realização do clamp euglicêmico hiperinsulinêmico, além da melhora da função das células beta (conforme avaliado pelo HOMA-Beta). Esses dados sugerem que as proteínas na dieta influenciam a homeostase da glicose em pacientes com síndrome metabólica. Isso não é totalmente surpreendente, dado que os aminoácidos essenciais são conhecidos por desencadear as vias de detecção de nutrientes que controlam a ação da insulina e a produção de glicose (Newgard 2012, Yang, Vijayakumar et al. 2018).

Curiosamente, ao comparar a amplitude dos efeitos da RC com os efeitos da RP em indivíduos com síndrome metabólica, descobrimos que a RC é mais eficaz na redução do IMC e dos níveis de HbA1c e triglicerídeos. A RP foi mais eficaz na redução dos níveis de CPK, creatinina e ureia, de acordo com a redução da ingestão de proteínas. Notavelmente, o PR também foi eficaz na melhora da sensibilidade à insulina medida pelo clamp euglicêmico hiperinsulinêmico. Juntos, esses resultados sugerem que a restrição de um macronutriente na dieta, as proteínas, podem atuar como componentes principais dentro de uma dieta para modular alterações antropométricas e cardiometabólica em indivíduos que apresentavam sintomas clássicos de síndrome metabólica. Na verdade, a ingestão de proteínas pode servir como um verdadeiro sinal de ingestão de alimentos, uma vez que os humanos podem produzir endogenamente glicose e ácidos graxos, mas não certos

aminoácidos (Lonnie, Hooker et al. 2018). Nesse sentido, se considerarmos que os aminoácidos essenciais ou metabólitos derivados sinalizam o nível de ingestão de alimentos e desencadeiam uma resposta proporcional a esse nível, seria de se esperar que a baixa ingestão de proteínas resultasse em uma resposta metabólica semelhante à restrição alimentar (Tome 2004, Laeger, Albarado et al. 2016). Na natureza, a redução da ingestão de proteínas é quase sempre acompanhada por redução da ingestão de alimentos, e as espécies provavelmente evoluíram para acoplar a disponibilidade de proteínas com a resposta metabólica à dieta (Galgani and Ravussin 2008).

A adesão a uma intervenção de RC costuma ser baixa no longo prazo, visto que o comportamento alimentar está ligado às interações sociais e proporciona uma sensação de felicidade. Para indivíduos obesos, esse desafio pode ser ainda mais difícil de superar. Nosso estudo propõe o uso da RP como uma intervenção dietética alternativa para auxiliar pacientes com síndrome metabólica a perder peso e controlar a glicemia, os níveis lipídicos e a pressão arterial. Embora a dieta de RP mais adequada deva ser definida individualmente, exemplos de programas gerais de dieta de RP, como o veganismo, já demonstraram fornecer benefícios metabólicos para humanos (Kahleova, Levin et al. 2017). Portanto, nosso estudo abre caminho para futuras investigações destinadas a compreender melhor os benefícios de dietas de RP como adjuvantes no tratamento de doenças cardiometabólicas.

Após um mês da finalização dos protocolos de RC e RP, convidamos os pacientes para fazermos uma análise de acompanhamento dos resultados clínicos e antropométricos. Interessantemente não foram verificadas alterações significativas em relação aos níveis glicêmicos e lipídicos ou em relação ao peso corporal após um mês da alta hospitalar. Estes resultados podem sugerir que os efeitos benéficos

propiciados pela RC e RP são consistentes e mantidos até um mês fora do ambiente hospitalar. Esse dado abre novas perspectivas para a utilização desses protocolos alimentares como uma forma de evitar o “efeito sanfona” muito observado em dietas altamente restritivas, que prometem verdadeiros milagres metabólicos aos seus adeptos.

O tecido adiposo sempre foi alvo de muitos estudos metabólicos. Sabe-se que o tecido adiposo é um órgão endócrino que desempenha um papel importante na homeostase (Ahima and Flier 2000) e seu excesso está associado a muitas doenças complexas, como a síndrome metabólica (Fox, Massaro et al. 2007). Aqui relatamos que, além dos benefícios clínicos contra os componentes da síndrome metabólica, RC e RP foram capazes de modular a expressão de genes importantes no tecido adiposo subcutâneo. Na RC vimos que genes relacionados com a proteção contra estresse oxidativo como *SOD2* tiveram sua expressão de mRNAs aumentados, além do aumento da expressão de genes associados a melhora das respostas metabólicas como *AMPK*, *ATF4*, *Adipoq* (adiponectina), *GCN2*, *PGC1-alpha* e *SIRT 1* e 3, além da redução de *PERK* um gene chave do estresse de retículo endoplasmático e altamente relacionado a síndrome metabólica. Já em relação a RP observamos que a expressão de *NRF2*, considerado o regulador chave da resposta antioxidante, além de sua função termogênica, foi aumentado após a RP, juntamente com a expressão de *AMPK*, *ATF4*, *Adipoq*, *GCN2*, *PPAR-gamma* e *SIRT-1*. Mais surpreendentemente, a dieta RP isocalórica compartilhou as mesmas respostas adaptativas moleculares no tecido adiposo com RC como o aumento dos níveis de mRNA de genes que controlam a homeostase energética das células, como *AMPK*, metabolismo de aminoácidos - *GCN2* e *ATF4*, homeostase lipídica -

SIRT1 e regulação da glicose e oxidação de ácidos graxos - *Adipoq*. Dessa forma podemos observar um dinamismo gênico dos adipócitos quando submetidos a dietas totalmente controladas de curto prazo.

Interessantemente, ao fazermos o estudo de correlações entre as expressões genicas do tecido adiposo com as alterações antropométricas e bioquímicas, verificamos significativas associações negativas principalmente voltadas as alterações do peso corporal, IMC, níveis de glicose, Hb1Ac e insulina. Esses dados poderem sugerir uma conexão causal entre as melhoras clínicas e antropométricas propiciadas pela RC e RP com o dinamismo gênico do tecido adiposo em resposta adaptativa após os 27 dias de tratamento de ambos protocolos.

Nossos dados de RNAseq do tecido adiposo apesar de ser preliminar até o presente momento da elaboração dessa tese, nos mostram que a RP é capaz de induzir uma supra-regulação de genes relacionados ao sistema imune celular. A redução da quantidade de gordura corporal comprovado pelos dados clínicos corroboram com os dados moleculares, nos fornecendo uma indicação muito interessante sobre a reformulação genica das células adiposas, principalmente em células que controlam a resposta imune e o processo inflamatório.

Nossos resultados também fornecem uma descoberta interessante de que indivíduos com síndrome metabólica submetidos à dieta isocalórica com restrição proteica, apesar de terem melhorado muitos parâmetros metabólicos importantes, não apresentam mudanças significativas na composição do microbioma intestinal em curto prazo (27 dias), sugerindo que os benefícios metabólicos da RP são independentes da microbiota intestinal. De fato, estudos anteriores relataram que mudanças na ingestão de alimentos modificam a composição do microbioma, como após a adição de nutrientes individuais (Maier, Lucio et al. 2017), ou até mesmo

após uma mudança de dietas baseadas em plantas para dietas baseadas em animais (David, Maurice et al. 2014). Além disso, mudanças significativas na composição do microbioma foram observadas após a imigração de indivíduos de leste para oeste, principalmente devido à adaptação à dieta ocidental (Vangay, Johnson et al. 2018). Alguns agrupamentos bacterianos apresentaram alterações significativas, especialmente em dietas baseadas em fontes proteicas provenientes de animais (David, Maurice et al. 2014). A manutenção da composição da microbiota intestinal em indivíduos do grupo RP pode ser devido à grande heterogeneidade da população analisada neste estudo, ou seja, indivíduos de diferentes estados do Brasil. Em nosso estudo optamos por manter uma dieta a qual os indivíduos pudessem segui-la em seu ambiente domiciliar, sendo composta por alimentos comuns da alimentação brasileira como arroz, feijão, verduras e legumes, além de proteínas provenientes de fonte bovina e frango. Dessa forma podemos sugerir que como utilizamos as fontes alimentares comuns da mesa do brasileiro em nossos protocolos, sem alterações drástica de alimentos, a modificação alimentar não foi suficiente para visualizarmos alterações significativas na microbiota intestinal dos nossos pacientes. Além disso, a dieta fornecida aos indivíduos do grupo RP em nosso estudo é majoritariamente vegetal, com pouca quantidade de carne. Nossos dados estão, portanto, de acordo com os achados de David e cols. (David, Maurice et al. 2014), que descrevem que a dieta baseada em animais teve um impacto maior sobre a microbiota intestinal do que a dieta baseada em vegetais. No entanto, estudos futuros do microbioma com uma coorte maior de indivíduos submetidos à dieta isocalórica com RP são necessários para validar nossos achados. Na medida em que o microbioma intestinal pode servir como uma leitura sensível para detectar como as mudanças ambientais impactam a fisiologia humana, pode-se sugerir que a

ausência de mudanças na composição do microbioma intestinal comparando os indivíduos antes e depois da RP, nos sugere que o fato de estar em um ambiente hospitalar não influenciou a capacidade do indivíduo de responder à dieta.

8 CONCLUSÕES

Nosso estudo demonstrou que tanto o protocolo de restrição calórica de 25% quanto a dieta isocalórica com restrição proteica proporcionaram uma melhora clínica e metabólica em indivíduos que eram portadores do DM2 e dislipidemia. Observamos uma perda de peso, redução da adiposidade, glicemia, níveis lipídicos e pressão arterial. Os dois protocolos de tratamento aumentaram a expressão de genes importantes no tecido adiposo que podem estar impulsionando os efeitos benéficos observados, como a ativação das vias de *GCN2*, *AMPK* e *Adipoq*. Dessa forma podemos sugerir que tanto a RC quanto a RP além de compartilhar melhoras metabólicas e clínicas, compartilham também vias moleculares importantes as quais podem ser as responsáveis pelo controle da glicemia, do perfil lipídico e da pressão arterial sistêmica. Dessa forma nossos dados sugerem que a restrição proteica e não calórica é o principal impulsionador subjacente aos efeitos benéficos da restrição alimentar. Além disso, a restrição proteica pode ser uma intervenção dietética relativamente simples com o objetivo de ajudar a controlar a glicemia, os níveis de lipídios, o peso corporal e a pressão arterial em indivíduos com síndrome metabólica.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahima, R. S. and J. S. Flier (2000). "Adipose tissue as an endocrine organ." Trends Endocrinol Metab **11**(8): 327-332.
- Barcena, C., P. M. Quiros, S. Durand, P. Mayoral, F. Rodriguez, X. M. Caravia, G. Marino, C. Garabaya, M. T. Fernandez-Garcia, G. Kroemer, J. M. P. Freije and C. Lopez-Otin (2018). "Methionine Restriction Extends Lifespan in Progeroid Mice and Alters Lipid and Bile Acid Metabolism." Cell Rep **24**(9): 2392-2403.
- Batista Filho, M. and A. Rissin (2003). "[Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends]." Cad Saude Publica **19 Suppl 1**: S181-191.
- Benito, M. (2011). "Tissue-specificity of insulin action and resistance." Arch Physiol Biochem **117**(3): 96-104.
- Bouchard, C. (1994). Genetics of obesity: overview and research directions.
- Bouchard, C. (1995). "Genetics and the metabolic syndrome." Int J Obes Relat Metab Disord **19 Suppl 1**: S52-59.
- Brandhorst, S. and V. D. Longo (2019). "Dietary Restrictions and Nutrition in the Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease." Circ Res **124**(6): 952-965.
- Clement, K., C. Vaisse, N. Lahlou, S. Cabrol, V. Pelloux, D. Cassuto, M. Gormelen, C. Dina, J. Chambaz, J. M. Lacorte, A. Basdevant, P. Bougneres, Y. Lebouc, P. Froguel and B. Guy-Grand (1998). "A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction." Nature **392**(6674): 398-401.
- David, L. A., C. F. Maurice, R. N. Carmody, D. B. Gootenberg, J. E. Button, B. E. Wolfe, A. V. Ling, A. S. Devlin, Y. Varma, M. A. Fischbach, S. B. Biddinger, R. J. Dutton and P. J. Turnbaugh (2014). "Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome." Nature **505**(7484): 559-563.

- Figueiredo, W. (2005). "Assistência à saúde dos homens: um desafio para os serviços de atenção primária." Ciênc. saúde coletiva **10** (1) **10**.
- Flint, A. J., K. M. Rexrode, F. B. Hu, R. J. Glynn, H. Caspard, J. E. Manson, W. C. Willett and E. B. Rimm (2010). "Body mass index, waist circumference, and risk of coronary heart disease: a prospective study among men and women." Obes Res Clin Pract **4**(3): e171-e181.
- Fontana, L. and S. Klein (2007). "Aging, adiposity, and calorie restriction." JAMA **297**(9): 986-994.
- Fontana, L., S. Klein and J. O. Holloszy (2010). "Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production." Age (Dordr) **32**(1): 97-108.
- Fontana, L., S. Klein, J. O. Holloszy and B. N. Premachandra (2006). "Effect of long-term calorie restriction with adequate protein and micronutrients on thyroid hormones." J Clin Endocrinol Metab **91**(8): 3232-3235.
- Fontana, L., T. E. Meyer, S. Klein and J. O. Holloszy (2004). "Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6659-6663.
- Fox, C. S., J. M. Massaro, U. Hoffmann, K. M. Pou, P. Maurovich-Horvat, C. Y. Liu, R. S. Vasan, J. M. Murabito, J. B. Meigs, L. A. Cupples, R. B. D'Agostino, Sr. and C. J. O'Donnell (2007). "Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study." Circulation **116**(1): 39-48.
- Galgani, J. and E. Ravussin (2008). "Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation." Int J Obes (Lond) **32 Suppl 7**: S109-119.
- Gomes, P. M., W. R. Hollanda-Miranda, R. A. Beraldo, A. V. Castro, B. Geloneze, M. C. Foss and M. C. Foss-Freitas (2015). "Supplementation of alpha-linolenic acid improves serum

adiponectin levels and insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes." Nutrition **31**(6): 853-857.

Greiwe, J. S., G. Kwon, M. L. McDaniel and C. F. Semenkovich (2001). "Leucine and insulin activate p70 S6 kinase through different pathways in human skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **281**(3): E466-471.

Han, X. and J. Ren (2010). "Caloric restriction and heart function: is there a sensible link?" Acta Pharmacol Sin **31**(9): 1111-1117.

Haring, H. U., M. F. White, C. R. Kahn, Z. Ahmad, A. A. DePaoli-Roach and P. J. Roach (1985). "Interaction of the insulin receptor kinase with serine/threonine kinases in vitro." J Cell Biochem **28**(2): 171-182.

Heilbronn, L. K., L. de Jonge, M. I. Frisard, J. P. DeLany, D. E. Larson-Meyer, J. Rood, T. Nguyen, C. K. Martin, J. Volaufova, M. M. Most, F. L. Greenway, S. R. Smith, W. A. Deutsch, D. A. Williamson, E. Ravussin and C. T. Pennington (2006). "Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial." JAMA **295**(13): 1539-1548.

Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill and B. M. Spiegelman (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." Science **259**(5091): 87-91.

Il'yasova, D., L. Fontana, M. Bhapkar, C. F. Pieper, I. Spasojevic, L. M. Redman, S. K. Das, K. M. Huffman, W. E. Kraus and C. S. Investigators (2018). "Effects of 2 years of caloric restriction on oxidative status assessed by urinary F2-isoprostanes: The CALERIE 2 randomized clinical trial." Aging Cell **17**(2).

Kahleova, H., S. Levin and N. Barnard (2017). "Cardio-Metabolic Benefits of Plant-Based Diets." Nutrients **9**(8).

- Kahn, C. R. (1985). "The molecular mechanism of insulin action." Annu Rev Med **36**: 429-451.
- Kirchner, H., S. M. Hofmann, A. Fischer-Rosinsky, J. Hembree, W. Abplanalp, N. Ottaway, E. Donelan, R. Krishna, S. C. Woods, T. D. Muller, J. Spranger, D. Perez-Tilve, P. T. Pfluger, M. H. Tschop and K. M. Habegger (2012). "Caloric restriction chronically impairs metabolic programming in mice." Diabetes **61**(11): 2734-2742.
- Kritchevsky, S. B., K. M. Beavers, M. E. Miller, M. K. Shea, D. K. Houston, D. W. Kitzman and B. J. Nicklas (2015). "Intentional weight loss and all-cause mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials." PLoS One **10**(3): e0121993.
- Laeger, T., D. C. Albarado, S. J. Burke, L. Trosclair, J. W. Hedgepeth, H. R. Berthoud, T. W. Gettys, J. J. Collier, H. Munzberg and C. D. Morrison (2016). "Metabolic Responses to Dietary Protein Restriction Require an Increase in FGF21 that Is Delayed by the Absence of GCN2." Cell Rep **16**(3): 707-716.
- Laplane, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." Cell **149**(2): 274-293.
- Layman, D. K. and D. A. Walker (2006). "Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome." J Nutr **136**(1 Suppl): 319S-323S.
- Lee, J., D. Kim and C. Kim (2017). "Resistance Training for Glycemic Control, Muscular Strength, and Lean Body Mass in Old Type 2 Diabetic Patients: A Meta-Analysis." Diabetes Ther **8**(3): 459-473.
- Liese, A. D., E. J. Mayer-Davis and S. M. Haffner (1998). "Development of the multiple metabolic syndrome: an epidemiologic perspective." Epidemiol Rev **20**(2): 157-172.
- Longchamp, A., T. Mirabella, A. Arduini, M. R. MacArthur, A. Das, J. H. Trevino-Villarreal, C. Hine, I. Ben-Sahra, N. H. Knudsen, L. E. Brace, J. Reynolds, P. Mejia, M. Tao, G. Sharma, R. Wang, J. M. Corpataux, J. A. Haefliger, K. H. Ahn, C. H. Lee, B. D. Manning, D. A.

Sinclair, C. S. Chen, C. K. Ozaki and J. R. Mitchell (2018). "Amino Acid Restriction Triggers Angiogenesis via GCN2/ATF4 Regulation of VEGF and H2S Production." Cell **173**(1): 117-129 e114.

Lonnie, M., E. Hooker, J. M. Brunstrom, B. M. Corfe, M. A. Green, A. W. Watson, E. A. Williams, E. J. Stevenson, S. Penson and A. M. Johnstone (2018). "Protein for Life: Review of Optimal Protein Intake, Sustainable Dietary Sources and the Effect on Appetite in Ageing Adults." Nutrients **10**(3).

Lynch, C. J. and S. H. Adams (2014). "Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance." Nat Rev Endocrinol **10**(12): 723-736.

Maier, T. V., M. Lucio, L. H. Lee, N. C. VerBerkmoes, C. J. Brislawn, J. Bernhardt, R. Lamendella, J. E. McDermott, N. Bergeron, S. S. Heinzmann, J. T. Morton, A. Gonzalez, G. Ackermann, R. Knight, K. Riedel, R. M. Krauss, P. Schmitt-Kopplin and J. K. Jansson (2017). "Impact of Dietary Resistant Starch on the Human Gut Microbiome, Metaproteome, and Metabolome." mBio **8**(5).

Martin, C. K., M. Bhapkar, A. G. Pittas, C. F. Pieper, S. K. Das, D. A. Williamson, T. Scott, L. M. Redman, R. Stein, C. H. Gilhooly, T. Stewart, L. Robinson, S. B. Roberts and G. Comprehensive Assessment of Long-term Effects of Reducing Intake of Energy Phase 2 Study (2016). "Effect of Calorie Restriction on Mood, Quality of Life, Sleep, and Sexual Function in Healthy Nonobese Adults: The CALERIE 2 Randomized Clinical Trial." JAMA Intern Med **176**(6): 743-752.

Meyer, T. E., S. J. Kovacs, A. A. Ehsani, S. Klein, J. O. Holloszy and L. Fontana (2006). "Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans." J Am Coll Cardiol **47**(2): 398-402.

Newgard, C. B. (2012). "Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance." Cell Metab **15**(5): 606-614.

Organization, W. H. (2000). "Obesity: preventing and managing the global epidemic." World Health Organization(ISBN: 92 4 120894 5).

Organization, W. H. (2012). "Obesity and Overweight." World Health Organization.

Ormazabal, V., S. Nair, O. Elfeky, C. Aguayo, C. Salomon and F. A. Zuniga (2018). "Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease." Cardiovasc Diabetol **17**(1): 122.

Peng, W., L. Robertson, J. Gallinetti, P. Mejia, S. Vose, A. Charlip, T. Chu and J. R. Mitchell (2012). "Surgical stress resistance induced by single amino acid deprivation requires Gcn2 in mice." Sci Transl Med **4**(118): 118ra111.

Pi-Sunyer, F. X. (1991). "Health implications of obesity." Am J Clin Nutr **53**(6 Suppl): 1595S-1603S.

Popkin, B. M. and C. M. Doak (1998). "The obesity epidemic is a worldwide phenomenon." Nutr Rev **56**(4 Pt 1): 106-114.

Redman, L. M., L. K. Heilbronn, C. K. Martin, L. de Jonge, D. A. Williamson, J. P. Delany, E. Ravussin and C. T. Pennington (2009). "Metabolic and behavioral compensations in response to caloric restriction: implications for the maintenance of weight loss." PLoS One **4**(2): e4377.

Redman, L. M., S. R. Smith, J. H. Burton, C. K. Martin, D. Il'yasova and E. Ravussin (2018). "Metabolic Slowing and Reduced Oxidative Damage with Sustained Caloric Restriction Support the Rate of Living and Oxidative Damage Theories of Aging." Cell Metab **27**(4): 805-815 e804.

Roth, G. S., D. K. Ingram and M. A. Lane (2001). "Caloric restriction in primates and relevance to humans." Ann N Y Acad Sci **928**: 305-315.

- Roth, G. S., J. A. Mattison, M. A. Ottinger, M. E. Chachich, M. A. Lane and D. K. Ingram (2004). "Aging in rhesus monkeys: relevance to human health interventions." Science **305**(5689): 1423-1426.
- Saklayen, M. G. (2018). "The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome." Curr Hypertens Rep **20**(2): 12.
- Simpson, S. J., D. G. Le Couteur and D. Raubenheimer (2015). "Putting the balance back in diet." Cell **161**(1): 18-23.
- Soare, A., E. P. Weiss and P. Pozzilli (2014). "Benefits of caloric restriction for cardiometabolic health, including type 2 diabetes mellitus risk." Diabetes Metab Res Rev **30 Suppl 1**: 41-47.
- Steven, S., K. G. Hollingsworth, A. Al-Mrabeh, L. Avery, B. Aribisala, M. Caslake and R. Taylor (2016). "Very Low-Calorie Diet and 6 Months of Weight Stability in Type 2 Diabetes: Pathophysiological Changes in Responders and Nonresponders." Diabetes Care **39**(5): 808-815.
- Tome, D. (2004). "Protein, amino acids and the control of food intake." Br J Nutr **92 Suppl 1**: S27-30.
- Tremblay, F. and A. Marette (2001). "Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells." J Biol Chem **276**(41): 38052-38060.
- Um, S. H., F. Frigerio, M. Watanabe, F. Picard, M. Joaquin, M. Sticker, S. Fumagalli, P. R. Allegrini, S. C. Kozma, J. Auwerx and G. Thomas (2004). "Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity." Nature **431**(7005): 200-205.
- Vangay, P., A. J. Johnson, T. L. Ward, G. A. Al-Ghalith, R. R. Shields-Cutler, B. M. Hillmann, S. K. Lucas, L. K. Beura, E. A. Thompson, L. M. Till, R. Batres, B. Paw, S. L.

Pergament, P. Saenyakul, M. Xiong, A. D. Kim, G. Kim, D. Masopust, E. C. Martens, C. Angkurawaranon, R. McGready, P. C. Kashyap, K. A. Culhane-Pera and D. Knights (2018). "US Immigration Westernizes the Human Gut Microbiome." Cell **175**(4): 962-972 e910.

Wanders, D., K. P. Stone, L. A. Forney, C. C. Cortez, K. N. Dille, J. Simon, M. Xu, E. C. Hotard, I. A. Nikonorova, A. P. Pettit, T. G. Anthony and T. W. Gettys (2016). "Role of GCN2-Independent Signaling Through a Noncanonical PERK/NRF2 Pathway in the Physiological Responses to Dietary Methionine Restriction." Diabetes **65**(6): 1499-1510.

Weyer, C., J. S. Yudkin, C. D. Stehouwer, C. G. Schalkwijk, R. E. Pratley and P. A. Tataranni (2002). "Humoral markers of inflammation and endothelial dysfunction in relation to adiposity and in vivo insulin action in Pima Indians." Atherosclerosis **161**(1): 233-242.

Yang, Q., A. Vijayakumar and B. B. Kahn (2018). "Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism." Nat Rev Mol Cell Biol **19**(10): 654-672.

ANEXO A

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 11 de maio de 2016.

Ofício nº 1571/2016
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 16286/2015

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **"ESTUDO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E MOLECULARES ENVOLVIDAS NA RESTRIÇÃO CALÓRICA E NA DIETA HIPOPROTEICA EM SERES HUMANOS" – Projeto de Pesquisa Versão 2**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 427ª Reunião Ordinária realizada em 09/05/2016, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2.**

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

RAFAEL FERRAZ CONCEIÇÃO

PROFª DRª MARIA CRISTINA FOSS DE FREITAS (Orientadora)

Depto. de Clínica Médica - Endocrinologia

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

	Caloric restriction			Protein restriction			Difference	P-Value
Characteristic	(n=11)			(n=10)			CR vs PR	CR vs PR
Age, mean (SD), y	49 (8.5)			51.6 (8.9)			2.6	.52
Female, No. (%)	7 (63)			5 (50)			2	-
T2DM diagnostic, mean (SD), y	9 (1.3)			8 (1.4)			1	.24
Height, mean (SD), m	1.64 (0.08)			1.65 (0.08)			-.01	.96
Primary Outcomes								
Δ Fasting glucose, mean (SD), mg/dL	-149 (55)			-127 (66)			22	.20
Δ Hemoglobin A _{1c} , mean (SD), %	-1.5 (0.7)			-0.85 (0.6)			.65	.02
Δ Weight loss, mean (SD), Kg	-6.9 (1.9)			-5.4 (3.6)			1.5	.12
Weight loss, mean (SD), %	8 (2.1)			6.6 (4.5)			1.4	.29
Secondary Outcomes								
Δ Cholesterol, mg/dL	-84 (38)			-75 (49)			9	.33
Δ Triglycerides, mg/dL	-135 (71)			-79 (61)			56	.03
Δ LDL cholesterol, mg/dL	-53 (24)			-47 (28)			6	.29
Δ HDL cholesterol, mg/dL	-8.2 (8.4)			-8.3 (6.9)			-.1	.48
Δ CRP, mg/dL	-0.5 (0.2)			-0.6 (0.3)			-.1	.33
Δ BP Systolic, mm Hg	-46.4 (25)			-44.6 (24)			1.8	.38
Δ BP Diastolic, mm Hg	-57.3 (31)			-58.5 (31)			-1.2	.42
Variable	Baseline	After	P-Value	Baseline	After	P-Value		
BMI, mean (SD), kg/m²	32.0 (5.4)	29.9 (5.1)	<.0001	29.1 (8.2)	27.3 (7.0)	.0011	.3	.05
Insulin, mean (SD), µIU/mL	11.1 (7.6)	10.5 (5.4)	.63	10.2 (8.3)	10.3 (5.3)	.96	.5	.37
CPK, mean (SD), mg/dL	112.8 (76)	58.9 (26)	.01	125.8 (74)	61.5 (27)	.03	-10.4	.0001
Free fatty acids, mean (SD), mmol/L	0.7 (0.2)	0.5 (0.1)	.02	0.9 (0.2)	0.7 (0.2)	.04	0	.48

Glycerol, mean (SD), mg/dL	28.3 (11.9)	17.7 (5.3)	.004	15.5 (8.3)	10.6 (5.3)	.03	5.7	.0001
Urinary Creatinine, mean (SD), mg/dL	65.4 (26)	73.0 (26)	.06	55.5 (23)	66.5 (59)	.26	-3.4	.01
Urinary Urea, mean (SD), mg/dL	962 (421)	971 (404)	.47	691 (238)	582 (279)	.12	-100	<.0001
Hb, mean (SD), g/dL	13.3 (1.0)	13.2 (0.9)	.07	13.5 (1.1)	13.4 (0.8)	.05	0	.50
Ht, mean (SD), %	41.0 (3.5)	40.4 (3.1)	.05	41.4 (4.7)	41.1 (4.0)	.33	0.3	<.0001