Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Parente, Érika Bezerra

Influência da composição da dieta na gordura intramiocelular, função endotelial e resistência à insulina, em mulheres jovens com sobrepeso metabolicamente saudáveis / Érika Bezerra Parente. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientador: Alfredo Halpern.

Descritores: 1.Gorduras na dieta 2.Lipídeos 3.Sobrepeso 4.Pletismografia
5.Espectroscopia de ressonância magnética

USP/FM/SBD-134/09

ÉRIKA BEZERRA PARENTE

**Influência da composição da dieta na gordura intramiocelular,
função endotelial e resistência à insulina, em mulheres jovens
com sobrepeso metabolicamente saudáveis**

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

Área de concentração: Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Halpern

São Paulo

2009

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Edit, um exemplo de perseverança na busca dos objetivos traçados. Sempre serei grata aos seus ensinamentos.

Ao meu filho, Paulo, que participou da elaboração desta tese, mesmo antes de nascer.

Ao meu esposo, Vladimir, pois sem sua ajuda este trabalho não teria sido finalizado.

À minha família, Manuel, meu pai, Everton e Herbert, meus irmãos, Iane, minha cunhada e Lucas, meu sobrinho, pelo apoio durante os momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e oportunidade de realizar e finalizar este trabalho.

A todas as voluntárias que participaram deste projeto e tornaram possível sua realização.

Ao Prof Dr Alfredo Halpern, meu orientador, pela confiança e oportunidade de executar esta tese sob sua atenção.

A todos do laboratório de investigação médica número 10 (LIM 10) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela colaboração durante este projeto.

À Patrícia Pereira, Valéria Nunes e Fabiana Dias, por todo seu trabalho e empenho no decorrer deste projeto de pesquisa.

A todos da Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por seu trabalho nos exames de pletismografia deste projeto.

À Márcia Gowdak e Vanessa Corassa da Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio, trabalho e colaboração nos exames de pletismografia.

Às enfermeiras do setor de Ressonância Magnética do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por toda ajuda na execução dos exames de espectroscopia.

À Dra Cíntia Lima e ao Dr Cláudio Campi do setor de Ressonância Magnética do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo grande apoio na análise dos exames de ressonância.

A Sra Maria Aparecida, do setor de pós-graduação da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas orientações e ajuda nos momentos mais oportunos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Racional do Estudo.....	01
1.2 Dietas.....	01
1.3 Lipídeo intramiocelular (IMCL).....	04
1.4 Função endotelial.....	06
2. OBJETIVOS.....	10
3.CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	11
3.1 Critérios de Inclusão.....	11
3.2 Critérios de Exclusão.....	11
3.3 Desenho do Estudo.....	12
3.4 Dietas.....	15
3.5 Avaliação do IMCL por Espectroscopia ¹ H em Ressonância Magnética.....	16
3.6 Avaliação da Função Endotelial por Pletismografia.....	19
3.6.1 Avaliação do Fluxo Sanguíneo Muscular.....	19
3.6.1.1 Protocolo de Exercício Isométrico.....	20
3.6.1.2 Protocolo de Estresse Mental.....	21
3.7 Avaliação dos Lipídeos/Glicemia/Insulinemia e Resistência à Insulina.....	22
3.7.1 Coleta do Material Biológico.....	22

3.7.2 Dosagem de Glicemia e Insulinemia.....	23
3.7.3 Cálculo da Resistência à Insulina.....	23
3.7.4 Dosagem de Lipídeos.....	24
3.7.5 Curvas de Glicemia, Insulinemia e Triglicerídeos de 8 horas.....	24
3.8 Análise Estatística.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1 Peso.....	26
4.2 IMCL.....	27
4.3 Função endotelial.....	29
4.4 Glicemia e insulinemia em jejum/ resistência à insulina.....	31
4.5 Lipídios em jejum.....	33
4.6 Curvas de Glicemia, Insulinemia e Triglicerídeos de 8 horas.....	35
5. DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÕES.....	43
7. REFERÊNCIAS.....	44

RESUMO

Dietas ricas em gordura ou carboidrato têm sido difundidas e consumidas nas últimas décadas, entretanto pouco é conhecido sobre as consequências metabólicas destas em longo prazo. Neste estudo, foram analisados a quantidade de gordura intramio celular (IMCL), a função endotelial, além da lipemia, glicemia, insulinemia e resistência à insulina após semanas de dieta rica em gordura ou carboidrato, perdendo ou mantendo peso. De 43 mulheres triadas com sobrepeso ($25 < \text{BMI} < 29.9 \text{ Kg/m}^2$), 22 foram randomizadas para duas diferentes sequências de dietas. O IMCL foi medido através de espectroscopia por ressonância magnética ^1H e a função endotelial pela pletismografia. Após 4 semanas de dieta rica em carboidrato, mantendo peso, foi observado aumento no IMCL do músculo tibial anterior (2.06 ± 1.27 vs. 3.52 ± 1.92 , $p=0.04$) e na insulinemia em jejum (11.55 ± 4.43 vs. 14.03 ± 5.23 , $p=0.04$), enquanto a dieta rica em gordura, no mesmo período, ocasionou aumento no HDL-C (37.06 ± 8.42 vs. 42.5 ± 9.32 , $p=0.003$) e redução nos níveis de triglicerídeos em jejum ($102,83 \pm 34,10$ vs. $75,83 \pm 20,91$, $p=0,02$). A função endotelial, colesterol total, LDL-C e resistência à insulina não mudaram durante esta fase. A perda de peso (média de 5%, por 8 semanas), não promoveu modificações nos parâmetros metabólicos vistos com a dieta de manutenção de peso. A partir destes resultados, concluiu-se que a ingestão de dieta rica em carboidrato, por 4 semanas de manutenção de peso, aumenta a insulinemia em jejum e o IMCL do músculo tibial anterior, enquanto a dieta rica em gordura pelo mesmo período aumenta o HDL-C e reduz triglicerídeos em mulheres saudáveis com sobrepeso.

Descritores: Gorduras na dieta, Lipídeos, Sobrepeso, Pletismografia, Espectroscopia de ressonância magnética

SUMMARY

High fat or high carbohydrate (cab) diet have been widely difunded and consumed during last decades; however it is not clear their metabolic effects in long term. In the present study we analyzed intramyocellular lipids (IMCL), endothelial function, plasma lipids, glucose, insulin and insulin resistance after high fat or high cab diet during weeks, maintaining or losing weight. 43 overweight women ($25 < \text{BMI} < 29.9 \text{ Kg/m}^2$) were screened, 22 of them were randomized to two different diet sequence. IMCL was measured by using ^1H magnetic resonance spectroscopy and endothelial function by using plethysmography method. *Tibialis* anterior IMCL (2.06 ± 1.27 vs. 3.52 ± 1.92 , $p=0.04$) and fasting insulinemia increased (11.55 ± 4.43 vs. 14.03 ± 5.23 , $p=0.04$) after four weeks of high cab diet after maintenance phase, while fasting HDL-C increased (37.06 ± 8.42 vs. 42.5 ± 9.32 , $p=0.003$) and triglycerides levels decreased (102.83 ± 34.10 vs. 75.83 ± 20.91 , $p=0.02$) after maintenance phase of high fat diet. Endothelial function, total cholesterol, LDL-C and insulin resistance did not alter during maintenance phase. A weight loss of 5%, after eight weeks, did not promote changes in the metabolic parameters, as seen during maintenance phase. Based on these results, it was concluded that high cab diet, four weeks with no weight change, increases *tibialis* anterior IMCL and fasting insulinemia, while high fat diet during same period increases HDL-C and decreases triglycerides in a healthy overweight women population.

Descriptors: Dietary fats, Lipid metabolism, Plethysmography, Magnetic resonance spectroscopy

1. INTRODUÇÃO

1.1 RACIONAL DO ESTUDO

O número de indivíduos com obesidade e sobrepeso vem crescendo nas últimas décadas e, conseqüentemente, surgem os vários tipos de dietas com diferentes composições, na tentativa de maximizar a perda de peso destes indivíduos. Alguns trabalhos têm mostrado alterações metabólicas após consumo de dieta rica em gordura ou carboidrato em populações de diabéticos e/ou obesos, entretanto pouco é conhecido a respeito do efeito destas dietas em mulheres jovens com sobrepeso e metabolicamente saudáveis, que representam uma parcela significativa dos consumidores de tais dietas.

1.2 DIETAS

Com o aumento da prevalência da obesidade, observamos também o crescimento das comorbidades como diabetes, hipertensão e dislipidemia¹. Objetivando tratar o excesso de peso de acordo com a teoria da gênese da obesidade² (baseada no excesso de ingestão calórica em relação ao gasto calórico), surgiram vários tipos de dietas nos últimos anos³⁻⁷. A restrição calórica, entretanto, não foi a única variável destas dietas, pois a composição de macronutrientes como gorduras, carboidratos e proteínas passaram a ter um papel importante na perda de peso e alterações metabólicas.

Dietas ricas em gordura ganharam espaço no tratamento do sobrepeso/obesidade após publicações mostrando redução de peso significativa associada a melhora do perfil lipídico⁸. Entretanto, alguns estudos sugerem que dietas ricas em gorduras são mais adipogênicas que dietas ricas em carboidratos com o mesmo valor energético total^{9,10}

Alguns trabalhos mostram que dietas pobre em carboidrato e ricas em proteína resultam em maior perda de peso, em um período de três a seis meses de seguimento, que dietas convencionais ricas em carboidrato e pobres em gordura^{8,11-18}. Outros estudos, no entanto, discordam destes resultados¹⁹⁻²³. Em relação ao seguimento a longo prazo, um pequeno grupo de estudos estendeu o seguimento por um ano e não mostrou a superioridade da dieta pobre em carboidrato e rica em proteína em relação a dieta pobre em gordura quanto a perda de peso^{13,17, 2,24-26}. Por outro lado, outros autores constataram que uma dieta muita rica em carboidrato e muito pobre em gordura foi superior a dieta convencional rica em carboidrato e pobre em gordura²⁷⁻²⁹ para perda de peso. Os estudos sobre o efeito da composição da dieta na perda de peso, são vários, mas nem sempre concordantes, e com populações geralmente de obesos e/ou diabéticos.

Avaliando-se os efeitos de tais dietas sobre a glicemia, insulinemia e lipídeos, alguns trabalhos em obesos e diabéticos mostram, em geral, que as dietas ricas em gordura promovem aumento do colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-C) e redução dos triglicerídeos (TG) em jejum, mas existem divergências quanto aos resultados sobre os valores de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), glicemia e insulinemia^{7-10,12,13}. Sabe-se que a quantidade e o tipo de gordura alimentar influenciam diretamente nas concentrações de lipídeos e lipoproteínas

plasmáticas. O tipo de cadeia de carbono, bem como o grau de saturação dos ácidos graxos, são alguns dos fatores determinantes dos níveis de TG, colesterol total (CT), LDL-C e HDL-C. Os mecanismos de ação pelos quais os ácidos graxos saturados elevam a colesterolemia já foram estudados e estão publicados em uma série de estudos clínicos e experimentais³⁰⁻³³

Não somente os lipídeos sofrem influência da composição da dietas, mas também a glicemia e insulinemia. Foi demonstrado que os graxos livres, podem inibir a secreção de insulina pelo pâncreas, in vitro^{34,35}, enquanto em cães³⁶, as dietas ricas em gordura diminuem a função das células β pancreáticas. Os dados em humanos são escassos, porém foi demonstrado que a alimentação rica em gordura pode ocasionar danos sobre as células β , o que poderia comprometer a secreção de insulina e consequentemente o controle glicêmico³⁷.

A maioria dos trabalhos sobre dietas e o metabolismo de lipoproteínas, glicemia e insulinemia foi realizado em jejum porque se acreditava que os dados obtidos fossem mais reprodutíveis e melhor definidos para estudos metabólicos. No entanto, o estado alimentar pós prandial retrata condições metabólicas freqüentemente negligenciadas nos estudos em jejum. Após uma refeição forma-se uma maior quantidade de lipoproteínas potencialmente aterogênicas³⁸ que são metabolizadas no endotélio das artérias, e que podem estimular a formação de lesões ateroscleróticas.

No presente estudo, procuramos elucidar os efeitos de dois tipos de composição de dieta (rica em gordura ou carboidrato), mantendo ou perdendo peso, nos valores de glicemia, insulinemia e lipídeos em jejum e após sobrecarga de

gordura ou carboidrato em uma população ainda não estudada, porém frequentemente consumidora de tais dietas.

1.3 Lipídeo intramiocelular (IMCL)

Estudos demonstram que, não somente o excesso de peso corporal, mas principalmente, como este excesso de gordura se distribui no organismo, faz diferença em relação ao metabolismo glicídico^{39, 40}.

A deposição de gordura nas células musculares tem sido estudada como um dos mecanismos pelos quais o excesso de peso contribui para a resistência à insulina⁴¹⁻⁴³. O mecanismo pelo qual o lipídeo intramiocelular (IMCL) está associado à resistência à insulina tem sido proposto por Randle e colaboradores⁴⁴, assim como por Shulman e colaboradores⁴⁵.

Alguns trabalhos mostram que o IMCL no músculo esquelético associa-se fortemente a resistência à insulina em indivíduos obesos e diabéticos⁴⁶⁻⁴⁸. Por outro lado, indivíduos magros descendentes de diabéticos tipo 2 com resistência à insulina, medida pelo exame de *clamp* euglicêmico, mostram maiores valores de IMCL que seus controles (magros, descendentes de diabéticos do tipo 2, mas sem resistência à insulina). Pacientes diabéticos também apresentam maior IMCL em relação a não diabéticos e indivíduos obesos comparados a magros⁴⁶⁻⁴⁹.

Alguns trabalhos em indivíduos diabéticos e obesos demonstram que dietas ricas em gordura aumentam o depósito de IMCL⁴⁶⁻⁴⁸. Foi demonstrado que o aumento da oxidação de gordura induz um defeito na oxidação de glicose em indivíduos diabéticos obesos mas não nos diabéticos não obesos⁵⁰. Acredita-se que o

acúmulo de IMCL nos indivíduos diabéticos e obesos ocorra não somente pela maior capacidade adipogênica das gorduras¹⁰ e uma menor oxidação das mesmas em relação aos carboidratos⁵¹⁻⁵³, mas também por alterações no sistema do metabolismo das gorduras e carboidratos vistas nestes indivíduos.

Em relação a indivíduos saudáveis, os poucos trabalhos publicados sobre dietas e IMCL, são em geral representados por um pequeno número de indivíduos do sexo masculino⁵⁴⁻⁵⁶. De acordo com Bachmann e colaboradores⁵⁴, três dias de dieta rica em gordura aumenta o IMCL do músculo tibial anterior sem modificar o IMCL no músculo sóleo. Neste estudo, a dieta rica em gordura era hipercalórica e, portanto, não podemos excluir a influência do desbalanço de calorias no resultado. Neste mesmo estudo, demonstrou-se que a dieta rica em carboidrato não causou mudanças no IMCL de ambos os músculos⁵⁴. Outro estudo em homens saudáveis (n=10) mostra um aumento no IMCL do músculo vasto lateral após uma semana de dieta rica em gordura, porém não há avaliação no IMCL após dieta rica em carboidrato⁵⁶. Segundo Stettler e colaboradores⁵⁵ três dias de dieta rica em gordura ou carboidrato aumenta o IMCL do músculo vasto lateral em uma população de homens saudáveis (n=8).

Os fatores que influenciam o depósito de IMCL ainda não são bem esclarecidos na literatura. Foi visto que a infusão lipídica intravenosa juntamente com insulina leva a um aumento no IMCL dos músculos tibial anterior e sóleo, contudo a infusão de lipídios sem insulina não altera o IMCL⁵⁴. Existem algumas evidências de que a variação de peso e atividade física também podem influenciar no depósito de IMCL. Um estudo em obesos e diabéticos mostra que uma redução de peso após 16 semanas com dieta e atividade física resulta em decréscimo no IMCL do músculo vasto lateral⁵⁷. Outro estudo demonstra que um programa de perda de

peso com dieta isoladamente não reduz o IMCL do músculo tibial anterior em diabéticos, enquanto a dieta associada ao exercício sim⁵⁸. White e colaboradores⁵⁹ também mostram que o exercício aeróbio de 3h reduz o IMCL do músculo vasto lateral em uma população de indivíduos saudáveis.

Para fazer as avaliações e discriminação do depósito de lipídeos intra-mioclulares (IMCL) e extra-mioclulares (EMCL), tem-se utilizado mais recentemente um método não invasivo e validado na literatura, a espectroscopia ^1H por ressonância magnética (^1H -ERM)⁶⁰⁻⁶². Devido ao arranjo geométrico da gordura dentro das células musculares (IMCL) e entre as células musculares (EMCL) a ^1H -ERM é capaz de distinguir entre estes dois compartimentos lipídicos. Alguns trabalhos usam o músculo vasto lateral^{47, 57}, e mais frequentemente o músculo sóleo e tibial anterior para avaliação do IMCL^{54,58}. Os músculos humanos são compostos de uma mistura de fibras; e o músculo sóleo é composto basicamente de fibras oxidativas lentas (fibras tipo I), enquanto o músculo tibial anterior é composto por fibras glicolíticas rápidas (fibras tipo IIb)⁶³.

Neste trabalho, usamos a ^1H -ERM para avaliar o IMCL de um grupo ainda não estudado, mulheres saudáveis com sobrepeso, após semanas de dieta rica em gordura ou carboidrato, mantendo ou perdendo peso.

1.4 FUNÇÃO ENDOTELIAL

Na última década tornou-se mais evidente o reconhecimento da importância do endotélio no desenvolvimento da aterosclerose. O endotélio produz várias substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, que não regulam somente o tônus

vasomotor, mas também o recrutamento e a atividade de células inflamatórias. Os três principais componentes que relacionam o endotélio a fatores de risco cardiovascular são vasodilatação, inflamação e trombose⁶⁴.

As células endoteliais interagem com componentes sanguíneos desempenhando um importante papel em vários aspectos da função vascular. Vários estímulos fisiológicos e fisiopatológicos são frequentemente mediados por nutrientes que podem influenciar o tônus vascular, a coagulação, o crescimento celular e respostas imunológicas e inflamatórias. Consequentemente, alterações funcionais no endotélio mediadas por nutrientes podem estar significativamente envolvidas na patogênese de processos como a aterosclerose^{64, 65}. Dietas ricas em gordura ou em calorias são consideradas fatores de risco para a aterosclerose e recente estudo evidenciou que certos derivados lipídicos comprometem a integridade endotelial, reduzindo a capacidade do endotélio em agir como uma barreira de permeabilidade seletiva à componentes sanguíneos⁶⁶.

O impacto das dietas na função endotelial é assunto ainda de controvérsias e motivo de investigações. Para alguns, a ingestão aguda de gordura provoca alterações expressivas nos vasos sanguíneos que parecem estar relacionadas à insulina ou aos triglicerídeos plasmáticos^{67,68}. Enquanto o aumento de insulina provoca vasodilatação, a elevação plasmática de triglicerídeos reduz a vasodilatação pelo fato de diminuir as partículas de LDL-C tornando-as mais vulneráveis à oxidação e, por isto, atenua a capacidade de gerar óxido nítrico das células endoteliais pela redução na atividade da enzima óxido nítrico sintetase⁶⁹. Paralelamente a este efeito, ocorre um aumento da síntese de espécies reativas de oxigênio e um desbalanço entre componentes oxidantes e antioxidantes em favor do primeiro, provocando o estresse

oxidativo e prejuízo ao funcionamento do endotélio⁷⁰. Nos trabalhos que mostram redução da reatividade vascular muscular após ingestão ou infusão aguda de gordura, encontramos uma elevação significativa da trigliceridemia pós prandial^{71,72}. Portanto, parece que o contato prolongado das células endoteliais com os ácidos graxos livres provoca prejuízo na função vascular.

Alguns estudos em animais tentam elucidar o efeito dos componentes da dieta na função endotelial. Foi demonstrado que a dieta rica em gordura e sacarose estão associadas à significativa diminuição no relaxamento do endotélio em ratos⁷³. Este efeito foi revertido quando os animais receberam dieta pobre em gordura e rica em carboidratos complexos⁷³. Estudos com células endoteliais e segmentos da aorta de ratos mostram que dietas ricas em gordura rompem a integridade endotelial^{66, 73}, podendo contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose.

Em humanos, um estudo demonstrou que a dieta rica em gordura provocou diminuição da função endotelial medida após quatro horas à ingestão aguda de sobrecarga de gordura (50g)⁷¹. Resultado semelhante foi obtido em outro estudo, cujo objetivo foi comparar dieta rica em carboidratos a dieta rica em ácidos graxos monoinsaturados⁷⁴. Em contrapartida, foi visto que os carboidratos melhoram a atividade vascular mediada pelo fluxo sanguíneo agudamente, o que pode ser explicado pelo aumento da liberação de óxido nítrico induzido pela insulina⁷⁵.

Está claro que a disfunção endotelial está intimamente ligada à síndrome metabólica e às doenças cardiovasculares^{64,65}, e embora vários aspectos envolvendo dieta e função vascular já tenham sido estudados, ainda não está devidamente elucidado na literatura o efeito da exposição, por semanas, a dieta rica em gordura ou carboidrato sobre a função endotelial de mulheres com sobrepeso metabolicamente

saudáveis. Para estudar tal efeito nesta população, utilizamos o método da pletismografia com dois tipos de protocolo: exercício isométrico e estresse mental^{76,77}.

2. OBJETIVOS

2.1 Primário

Avaliar a influência da exposição à dieta isocalórica ou hipocalórica, rica em gordura ou carboidrato em mulheres jovens com sobrepeso metabolicamente saudáveis, sobre os seguintes fatores:

2.1.1) Quantidade de gordura intramiocelular (IMCL)

2.1.2) Função endotelial

2.1.3) Resistência à insulina

2.1.4) Glicemia, insulinemia e lipemia em jejum

2.2 Secundário

Avaliar a curva de glicemia, insulinemia e triglicerídeos de 8 horas após refeição com sobrecarga de gordura ou carboidrato em mulheres jovens com sobrepeso metabolicamente saudáveis, logo após semanas de consumo de dieta isocalórica ou hipocalórica, rica em gordura ou carboidrato.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As participantes foram recrutadas através de divulgação entre funcionários do Hospital das Clínicas sobre este protocolo envolvendo mulheres com sobrepeso. 43 mulheres que satisfizeram os critérios de inclusão e exclusão iniciais entraram no protocolo. Todas tiveram conhecimento e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) incluso no protocolo de pesquisa aprovado pela (CAPPESQ), sob o número 939/02.

3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

3.1.1 sexo feminino

3.1.2 $20 \leq \text{idade} \leq 40$ anos

3.1.3. índice de massa corporal $25 \leq \text{IMC} < 30 \text{ Kg/m}^2$

3.1.4 pressão arterial sistólica $< 140 \text{ mmHg}$ e pressão arterial diastólica $< 90 \text{ mmHg}$

3.1.5 ciclo menstrual regular

3.1.6 Triglicerídeos (TG) em jejum $< 150 \text{ mg/dL}$

3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

3.2.1 Uso de método contraceptivo hormonal.

- 3.2.2 Uso de medicações anti-hipertensivas, hipolipemiantes ou anti-hiperglicemiantes nos últimos três meses antes da entrada no estudo
- 3.2.3 Uso de glicocorticoesteróides nos últimos três meses antes da entrada no estudo
- 3.2.4 Uso de medicação para perda ou controle de peso nos últimos três meses antes da entrada no estudo
- 3.2.5 Sinais clínicos de resistência à insulina como acantose nigricante
- 3.2.6 Ter realizado atividade física regular nos últimos seis meses
- 3.2.7 Presença de doenças crônicas como: Diabetes Mellito, hipertensão arterial sistêmica, nefropatia, tireoideopatia, hepatopatia, dislipidemia ou cardiopatia
- 3.2.8 Presença de alteração do metabolismo de carboidrato: Glicemia em jejum $\geq 100\text{mg/dL}$ ou glicemia aos 120 minutos no Teste de Tolerância Oral à Glicose $75\text{g} \geq 140\text{mg/dL}$.
- 3.2.9 HOMA-IR $\geq 3,9$ ⁷⁸⁻⁸⁰
- 3.2.10 Esteatose hepática
- 3.2.11 Gestante, ou pacientes em idade fértil que pretendessem engravidar durante o período do estudo

3.3 DESENHO DO ESTUDO

As 43 participantes incluídas no protocolo foram submetidas a exame físico médico (verificação de pressão arterial, peso, altura e exame clínico geral). As voluntárias com exame físico normal foram submetidas a exames laboratoriais de triagem em jejum de 12h (glicemia, insulinemia, teste de tolerância oral à glicose

com 75g, TSH, aminotransferases hepáticas, imunoglobulina G para vírus da hepatite C, creatinina, colesterol total e frações, triglicerídeos).

Figura 1 Desenho do estudo

Das 43 mulheres triadas, 21 foram excluídas por razões explicadas na figura 2 e 22 foram randomizadas. Na visita 2 (V2) (Figura 1), todas as 22 mulheres foram submetidas ao exame de ultrassonografia hepática (transdutor de tempo real de 3,5 MHz (PHILIPS SD 800) para excluir esteatose e ao teste de calorimetria indireta de repouso após 12 horas em jejum (aparelho Delta Trac) para cálculo do metabolismo basal⁸¹. O resultado da calorimetria foi utilizado para definir o valor calórico total (VCT) diário de cada participante em cada fase do estudo.

As 22 participantes incluídas no estudo foram divididas em dois grupos após a visita 3 (V3) (Figura 1), quando passaram a receber a dieta padrão (Tabela 1) por um período de 2 semanas. A partir da visita 4 (V4) (Figura 1), das 22 mulheres, 18 (pelas razões expostas na figura 2) iniciaram a sequência diferente de dietas nos

grupos GCC e CGG, e 14 completaram o protocolo terminando a fase hipocalórica (Figura 2).

Figura 2. Fluxograma do protocolo

O grupo GCC iniciou dieta rica em gorduras (dieta G) (Tabela 1) isocalórica por 4 semanas. Após este período, trocou para dieta rica em carboidrato (dieta C) (Tabela 1) isocalórica por 4 semanas. Ao final deste período, passou para dieta C hipocalórica por um período de 8 semanas (Figura 1).

O grupo CGG iniciou dieta C isocalórica por 4 semanas. Após este período, trocou para dieta G isocalórica por 4 semanas. Ao final deste período, passou para dieta G hipocalórica por um período de 8 semanas.

Tabela 1. Composição das dietas

	CARBOIDRATO (CH)	GORDURA (G)	PROTEÍNA (P)
	VCT	VCT	VCT
Dieta Padrão	50%	30%	20%
Dieta G	10%	60%	30%
Dieta C	60%	20%	20%

	CARBOIDRATO (CH)	GORDURA (G)	PROTEÍNA (P)
	VCT	VCT	VCT
Refeição-teste Padrão	3%	35%	32%
Refeição-teste G	3%	70% (51g)	27%
Refeição-teste C	84%	13%	3%

Antes e após cada período de dieta, foram avaliados a quantidade de IMCL e a função endotelial através, no mesmo dia pela manhã. No dia seguinte, foram dosados: lipemia, glicemia e insulemia em jejum além de realizado o cálculo do HOMA-IR. Neste mesmo dia, após coleta dos exames em jejum, as participantes receberam uma refeição-teste rica em gordura ou carboidrato (dependendo do tipo de dieta anterior) para avaliação das curvas pós prandiais de 8 horas.

3.4 DIETAS

As dietas foram fornecidas pela Empresa Condieta, Centro de Alimentação Dietética Congelada, São Paulo, SP. As refeições foram entregues em quantidades suficientes para almoço e jantar semanalmente e foram planejadas de acordo com as diferentes fases do protocolo e as necessidades calóricas de cada participante.

A quantidade de calorias de cada dieta (iso ou hipocalórica) foi calculada através dos valores obtidos no teste da calorimetria indireta (Aparelho Delta Trac) de cada participante, realizada na V2. A queima calórica de 24 horas de cada participante foi calculada multiplicando-se o valor do metabolismo de repouso por

um fator 1,2 a 1,4, de acordo com a atividade física diária a fim de obter a quantidade de calorias diárias necessárias para uma dieta isocalórica. Ao comparecer semanalmente para verificação de peso e recebimento das dietas, cada participante foi questionada quanto a adesão à dieta e foram realizados ajustes no VCT da dieta para evitar variações do peso. Elas também receberam orientação nutricional semanal sobre a qualidade e quantidade dos alimentos a serem ingeridos no desjejum e nos lanches, além de esclarecimentos sobre os alimentos permitidos e proibidos em cada fase do estudo.

Foi definido como dieta isocalórica aquela em que a participante mantivesse o seu peso com uma variação $< 2\%$ entre o início e final de cada dieta na fase de manutenção.

A dieta hipocalórica foi definida como aquela em que a participante apresentasse redução de peso $\geq 2\%$ entre V5 e V6. Para cálculo da dieta hipocalórica, foram reduzidos em média 600Kcal por dia do VCT que vinha sendo ingerido na fase de manutenção, e mantido a mesma composição de macronutrientes.

A composição das dietas encontra-se na Tabela 1.

3.5 AVALIAÇÃO DO IMCL POR ESPECTROSCOPIA ^1H EM RESSONÂNCIA MAGNÉTICA (Figura 3)

A quantidade de lipídeos intramiocelular pode ser avaliada de forma invasiva através de biópsia muscular, ou por um método mesno invasivo e validado como a espectroscopia ^1H por ressonância magnética (ERM)^{43,62}. No presente estudo, o IMCL foi mensurado através do exame ERM, realizado no Instituto do Coração do

Hospital das Clínicas da FMUSP. Os exames foram realizados no período da manhã duas horas após a ingestão do café da manhã, que apresentava a mesma composição da dieta do período em que se encontrava a participante (rico em gordura ou carboidrato). Antes do exame de ERM a participante permanecia, no mínimo, 60 minutos em repouso.

Figura 3. Avaliação do IMCL por espectroscopia ^1H em ressonância magnética

Foi determinada, arbitrariamente, a perna direita como padrão para todos os exames de ERM durante o estudo. Foram avaliados os músculos tibial anterior e sóleo de cada participante. Elas permaneceram em posição supina durante o exame e a perna direita foi mantida estática com a ajuda de fitas adesivas e pesos. Para manter

a reprodutibilidade dos exames, a perna direita foi marcada a cinco cm da tuberosidade tibial.

Foi utilizado um sistema de 1,5T (“*General Electronics Medical Systems*”, Milwaukee, WI), com gradientes de alta performance e imagens localizatórias (“*scouts*”) foram obtidas inicialmente para em seguida fazer a mensuração de IMCL. Através das imagens de ressonância previamente adquiridas, foi colocado um *voxel* de 3,0 cm³ nos músculos sóleo e tibial anterior. Os *voxels*, a partir dos quais obtiveram-se os espectros de hidrogênio, foram posicionados nas imagens de ressonância em regiões musculares sem a presença de gordura fascial ou subcutânea visíveis, para evitar superestimar a mensuração de IMCL. A homogeneização volumétrica (“*volumetric shimming*”) foi realizada em cada voxel de ERM antes da aquisição do espectro.

Os sinais adquiridos de ERM foram pós-processados com filtros gaussianos (max 0ms e meio-max 150ms), transformação de Fourier e correção de fase constante e linear. Os sinais obtidos em 1,3 partes por milhão (ppm) são derivados dos lipídeos intramiocelulares, enquanto em 3,0 são derivados da creatina total (Cr_T)⁶². O IMCL foi quantificado usando o sinal da Cr_T como referência⁴³ tanto para o músculo tibial anterior (IMCL/Cr TA) quanto para o músculo sóleo (IMCL/Cr SOL). Ao corrigir o valor de IMCL pelo sinal da creatina evita-se erros na interpretação de mudanças no IMCL quando também há alteração no sinal de creatina por alteração da massa muscular.

3.6 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL POR PLETISMOGRAFIA

(Figura 4)

A função endotelial pode ser avaliada de diversas formas com diferentes metodologias, e a mensuração do fluxo sanguíneo muscular através do exame de pletismografia é uma delas^{76,77}. Neste estudo, os exames de pletismografia foram realizados na Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, logo em seguida ao exame de ERM.

3.6.1 Avaliação do fluxo sanguíneo muscular

A avaliação da resposta vasodilatadora muscular foi realizada a partir da técnica de pletismografia de oclusão venosa durante o exercício físico ou estresse mental. O braço contralateral (aquele que não estava realizando o exercício isométrico) foi elevado acima do nível do coração para garantir uma adequada drenagem venosa. Um tubo silástico preenchido com mercúrio, conectado a um transdutor de baixa pressão e a um pletismógrafo, foi colocado ao redor do antebraço, a cinco cm de distância da articulação úmero-radial e conectado a um pletismógrafo. Um manguito foi colocado ao redor do pulso e outro na parte superior do braço. O manguito do pulso foi inflado a um nível supra-sistólico 1 minuto antes de serem iniciadas as medidas. Em intervalos de 15 segundos, o manguito do braço foi inflado acima da pressão venosa por um período de 7 a 8 segundos. O aumento em tensão no tubo silástico reflete o aumento de volume do antebraço e,

consequentemente, o fluxo sanguíneo muscular. O sinal da onda de fluxo muscular foi adquirido em tempo real em um computador através do programa AT/CODAS, numa frequência de 500Hz.

Figura 4. Avaliação da função endotelial por pletismografia

3.6.1.1 Protocolo de exercício isométrico (Figura 4)

Após a participante ser colocada em posição supina, ela realizou preensão máxima de mão (“*handgrip*”) para determinação da força de contração voluntária máxima. A força de contração voluntária máxima foi determinada pela média de três tentativas de contração máxima (no antebraço dominante) em um dinamômetro de preensão de mão, antes do início do protocolo. Após três minutos de repouso com registros basais, a participante realizava três minutos de exercício isométrico moderado a 30% da contração voluntária máxima, seguidos por três minutos de recuperação.

Durante o protocolo de exercício isométrico, foram realizados os registros simultâneos de pressão arterial e frequência cardíaca. A pressão arterial foi medida a

cada minuto no membro inferior esquerdo pelo método oscilométrico (monitor automático de pressão arterial - Dixtal, modelo DX 2710) e a frequência cardíaca foi obtida através do registro eletrocardiográfico. Foram colocados três eletrodos no tórax da participante (posição bipolar) para registro da derivação MC5. Este sinal foi capturado em um computador e, em seguida, analisado por um programa específico (AT/CODAS), numa frequência de 500Hz.

3.6.1.2 Protocolo de estresse mental

O teste de estresse mental foi realizado através do teste de cores (“stroop color word test”). Ele consiste em uma tabela com vários nomes de cores, escritos com uma tinta diferente daquela do significado da palavra. Foi pedida a participante para identificar a cor da tinta e não ler o significado da palavra. Através do teste de cores, elas foram estimuladas a dizer a cor em voz alta, o mais rápido possível, sendo advertidas quando erravam as palavras. Este procedimento foi realizado da seguinte maneira: três minutos de registro basal, seguidos de três minutos de teste de cores e três minutos de recuperação. Ao final do teste foi perguntado a cada indivíduo o grau de dificuldade do teste de cores através de uma tabela padrão (Tabela 2).

Tabela 2. Escala de dificuldade no teste de estresse mental

0	1	2	3	4
não estressante	pouco estressante	estressante	muito estressante	extremamente estressante

Durante o protocolo de estresse mental, foram realizados os registros simultâneos de pressão arterial e frequência cardíaca da mesma forma descrita no protocolo de exercício isométrico.

3.7 AVALIAÇÃO DOS LIPÍDEOS/GLICEMIA/INSULINEMIA E RESISTÊNCIA À INSULINA

As a dosagens de lipemia, glicemia e insulinemia foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica número 10 (LIM 10) na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.7.1 Coleta do Material Biológico

Ao início e final de cada fase, cada participante compareceu em jejum de 12 horas no LIM 10 para coleta de exames de sangue. Após venóclise, foi coletado sangue em jejum em tubos contendo EDTA 0,1% (10 µL/mL de sangue) para dosagem de glicemia, insulinemia, CT, HDL-C, LDL-C e TG e em seguida oferecida a refeição teste. Após ingestão desta, foram dosados glicemia, insulinemia e TG nos tempos 2, 4, 6 e 8 horas. A composição da refeição teste seguiu a composição da refeição da fase anterior (ex: após dieta rica em gordura, a refeição teste foi rica em gordura). O plasma foi obtido após centrifugação do sangue a 3000 x g, durante 20 minutos, a 4°C, em centrífuga refrigerada. Ao plasma foram adicionadas as seguintes soluções conservantes: benzamidina 2 mmol/L (5 µL/mL); gentamicina 0,5% e cloranfenicol 15 mmol/L (20 µL/mL); fluoreto de fenilmetil sulfonila 0,5 mmol/L em

DMSO (0,5 µL/mL); e aprotinina (10 µL/mL). As amostras de plasma de todos os tempos foram estocadas em ultracongelador (-70°C). O sangue para dosagem de glicose foi colhido com fluoreto de sódio (12,5 mg) e oxalato de potássio (10 mg).

3.7.2 Dosagem de glicemia e insulinemia

A concentração plasmática de glicose foi determinada em analisador automático (COBAS MIRA, Roche, Basileia – Suíça), pelo método enzimático colorimétrico (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG-Brasil).

A insulina foi dosada pelo método radioimunoensaio (Linco Research, St Charles, Missouri, USA).

3.7.3 Cálculo da resistência à insulina

Utilizou-se como indicador para resistência à insulina o HOMA- IR (*index of homeostasis model assessment*), através da seguinte fórmula⁷⁹.

$\frac{\text{Insulina (mU/mL)} \times \text{glicemia (mmol/L)}}{22,5}$
--

Este cálculo estima a resistência à insulina, no estado de equilíbrio, através dos valores de glicemia e insulina em jejum. O HOMA-IR apresenta boa correlação com resultados do “*clamp*” euglicêmico-hiperinsulinêmico⁷⁹ com a vantagem do baixo custo e a menor manipulação do paciente.

3.7.4 Dosagem de Lipídeos

Para a obtenção das HDL-C foi utilizado o método de precipitação de lipoproteínas que não contém apo B. Adicionou-se ao plasma o agente precipitante composto de solução de sulfato de dextrana e cloreto de magnésio 2M (1:1) (50µL/500 µL de plasma). O plasma foi agitado no vortex, mantido à temperatura ambiente por 10 minutos e imediatamente centrifugado, durante 30 minutos, a 700 x g a 4°C, em centrífuga refrigerada marca Sorvall (modelo RT 6000B, Du Pont Company, Newtown, CT, EUA). Separou-se o sobrenadante e foi desprezado o precipitado. Aliquotas de aproximadamente 500 µL foram estocadas a -70°C.

As medidas de triglicerídeos, colesterol total e HDL-C foram feitas por método enzimático colorimétrico (Roche, Basileia –Suíça), de modo automatizado, (COBAS MIRA, Roche, Basileia -Suíça). O LDL colesterol (LDL-C) foi avaliado pela fórmula de Friedewald⁸².

3.7.5 Curvas de Triglicerídeos, Glicemia e Insulinemia de 8 horas

Foram construídas curvas de cinco pontos para triglicerídeos, glicemia e insulinemia correspondentes às 8 horas pós prandiais à refeição-teste. Em seguida, foi calculada a área sob a curva correspondente a área entre a linha traçada pela sucessão dos cinco pontos pós prandiais e pelo eixo das abscissas.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação entre os grupos em relação a variáveis quantitativas foi considerado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Para comparações dentro de um mesmo grupo, em relação a diferentes tempos de avaliação, foi considerado o teste não-paramétrico de Wilcoxon.

Para avaliação da fase manutenção de peso, foram consideradas duas formas análises:

- 1) Por tipo de dieta reunindo todas as participantes que receberam dieta G ou C.
- 2) Por grupo (GCC e CGG), a fim de reduzir a influência da dieta anterior ao compararmos dieta G ou C com dieta padrão na primeira fase de manutenção de cada grupo.

No intuito de avaliar o efeito de cada dieta sobre a resposta vasodilatadora muscular, foram calculados os deltas do primeiro, segundo e terceiro minutos em relação ao valor inicial de fluxo, além da comparação dos valores iniciais em cada fase. Ao usar o delta, procurou-se evitar erros na interpretação de mudanças no valor do fluxo do primeiro, segundo ou terceiro minuto de uma fase para outra quando também ocorreu mudança no valor de fluxo inicial.

Na análise da curva de TG, além dos valores de jejum e área sob a curva, foi utilizado o delta de TG de 4h (em relação ao valor de jejum) como variável de comparação entre os diferentes momentos, enquanto nas curvas de glicemia e insulinemia, foi utilizado o pico de 2h.

Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

4. RESULTADOS

Ambos os grupos apresentavam características metabólicas semelhantes ao início do estudo (tabela 3).

4.1 PESO

Houve uma redução média de peso significativa em ambos os grupos GCC e CGG (tabelas 4 e 5), sem diferença significativa entre o peso final dos dois grupos.

Tabela 3: Características iniciais

	GCC	CGG	p
n	11	11	
Idade	30,6 ± 6,9	32 ± 6,1	0,7
Peso Kg	70,45 ± 6,87	71,95 ± 7,52	0,71
IMC Kg/m²	27,4 ± 1,6	27,3 ± 1,3	0,7
CT mg/dL	168,0 ± 18,17	156,17 ± 24,29	0,36
LDL-C mg/dL	112,14 ± 22,22	100,63 ± 23,12	0,42
HDL-C mg/dL	38,0 ± 10,48	37,50 ± 5,09	0,63
TG mg/dL	89,30 ± 33,99	90,17 ± 38,29	0,87
Glicemia mg/dL	91,0 ± 12,01	89,83 ± 4,26	0,71
Insulinemia µU/mL	12,82 ± 3,89	10,61 ± 4,01	0,36
HOMA-IR	2,80 ± 0,71	2,38 ± 1,01	0,44
IMCL TA/Cr	2,68 ± 1,17	2,06 ± 1,27	0,36
IMCL SOL/Cr	4,34 ± 5,66	6,16 ± 3,69	0,36

Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, p<0,05

Tabela 4. Peso nas diferentes fases do protocolo

GCC	Basal	Após G Isoc	Após C Isoc	Após C Hipoc
Peso Kg	70,45 ± 6,87	69,86 ± 7,17	69,56 ± 7,07	64,47 ± 8,37
CGG	Basal	Após C Isoc	Após G Isoc	Após G Hipoc
Peso Kg	71,95 ± 7,52	71,15 ± 7,53	70,55 ± 7,67	66,55 ± 5,56

Tabela 5. Redução do peso em cada fase

	% perda peso	% perda peso	Perda kg
Grupo	Fase de Manutenção	Fase Perda Peso	Fase Perda de Peso
GCC	0,01 ± 0,01	4,34 ± 1,94	2,88 ± 1,18
CGG	0,02 ± 0,01	5,45 ± 3,03	4,0 ± 2,69

4.2 IMCL

Houve um aumento significativo no IMCL do músculo tibial anterior do grupo CGG ($2,06 \pm 1,27$ vs. $3,52 \pm 1,92$, $p=0,04$) após 4 semanas de dieta rica em carboidrato, mantendo-se o peso (Figura 5). Por outro lado, não houve mudança no IMCL do músculo sóleo neste período de manutenção de peso, assim como após a fase de perda de peso em ambos os músculos nos dois grupos (figura 5). Também não foi observada alteração no IMCL quando as participantes foram avaliadas em conjunto durante a fase de manutenção de peso, independente da dieta (Figura 6).

Figura 5. IMCL em cada grupo após manutenção e perda de peso

Teste não-paramétrico de Wilcoxon, * $p < 0,05$

Figura 6. IMCL por tipo de dieta após manutenção de peso

Teste não-paramétrico de Wilcoxon, * $p < 0,05$

4.3 FUNÇÃO ENDOTELIAL

Nenhuma mudança foi observada na função endotelial, medida pelo fluxo muscular sanguíneo, ao avaliarmos os deltas de fluxo do primeiro, segundo e terceiro minutos antes e após cada tipo de dieta (dieta G ou C) em cada grupo durante as

fases de manutenção e perda de peso (Tabela 6) , assim como na análise em conjunto de todas as participantes por tipo de dieta (dieta G ou C) na fase de manutenção de peso (Tabela 7). Os resultados foram semelhantes tanto no protocolo de exercício isométrico, como no protocolo de estresse mental (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Delta de fluxo sanguíneo muscular em cada grupo após manutenção e perda de peso

EXERCÍCIO ISOMÉTRICO								
	GCC				CGG			
	Basal	Após G iso	Após C iso	Após C hipo	Basal	Após C iso	Após G iso	Após G hipo
Delta 1´	0.27 ± 0.21	0.39 ± 0.36	0.21 ± 0.15	0.24 ± 0.26	0.15 ± 0.17	0.7 ± 1.01	0.66 ± 0.72	0.41 ± 0.54
Delta 2´	0.4 ± 0.29	0.47 ± 0.44	0.27 ± 0.25	0.28 ± 0.17	0.28 ± 0.19	0.75 ± 0.56	0.71 ± 0.61	0.56 ± 0.75
Delta 3´	0.57 ± 0.43	0.55 ± 0.55	0.33 ± 0.23	0.37 ± 0.13	0.63 ± 0.8	1.05 ± 0.63	0.82 ± 0.68	0.72 ± 0.57
ESTRESSE MENTAL								
	GCC				CGG			
	Basal	Após G iso	Após C iso	Após C hipo	Basal	Após C iso	Após G iso	Após G hipo
Delta 1´	1.27 ± 1.22	0.93 ± 0.63	0.38 ± 0.48	0.42 ± 0.37	1.24 ± 1.09	1.39 ± 0.92	0.82 ± 0.41	1.13 ± 1.1
Delta 2´	1.06 ± 1.32	0.59 ± 0.46	0.33 ± 0.39	0.39 ± 0.30	1.12 ± 0.87	1.20 ± 0.86	0.88 ± 0.79	0.97 ± 0.73
Delta 3´	0.85 ± 0.86	0.55 ± 0.41	0.40 ± 0.43	0.42 ± 0.44	1.41 ± 0.63	0.93 ± 1.03	0.82 ± 0.88	0.66 ± 0.82

Teste não-paramétrico de Wilcoxon, *p<0,05

Tabela 7. Delta de fluxo sanguíneo muscular por tipo de dieta após manutenção de peso

EXERCÍCIO ISOMÉTRICO				
	Pré G iso	Após G iso	Pré C iso	Após C iso
Delta 1´	0,45 ± 0,69	0,50 ± 0,53	0,28 ± 0,31	0,42 ± 0,69
Delta 2´	0,55 ± 0,45	0,57 ± 0,51	0,38 ± 0,35	0,47 ± 0,46
Delta 3´	0,77 ± 0,56	0,66 ± 0,60	0,58 ± 0,64	0,64 ± 0,56
ESTRESSE MENTAL				
	Pré G iso	Após G iso	Pré C iso	Após C iso
Delta 1´	1,32± 1,06	0,88± 0,53	1,06± 0,84	0,81± 0,85
Delta 2´	1,12± 1,11	0,71± 0,61	0,81± 0,69	0,47 ± 0,76
Delta 3´	0,88± 0,90	0,66± 0,64	0,91± 0,66	0,63± 0,76

Teste não-paramétrico de Wilcoxon, *p<0,05

4.4 GLICEMIA E INSULINEMIA EM JEJUM/ RESISTÊNCIA À INSULINA

Na avaliação por tipo de dieta, após 4 semanas de dieta C mantendo-se o peso, foi observado o aumento da insulinemia em jejum ($11,55 \pm 4,43$ vs. $14,03 \pm 5,23$, $p=0,04$), com tendência a aumento do HOMA-IR ($2,66 \pm 1,12$ vs. $3,27 \pm 1,40$, $p= 0,055$), e sem alterações na glicemia em jejum (Figura 7). Não houve mudança nestas três variáveis estudadas quando analisadas por grupo de tratamento (GCC ou CGG) tanto durante a fase de manutenção, quanto após perda de peso (Figura 8).

Figura 7. Glicemia, insulinemia e resistência à insulina por tipo de dieta após manutenção de peso

Teste não-paramétrico de Wilcoxon, * $p<0,05$

Figura 8. Glicemia, insulinemia e resistência à insulina em cada grupo após manutenção e perda de peso

Teste não-paramétrico de Wilcoxon, * $p < 0,05$

4.5 LIPÍDIOS EM JEJUM

Após 4 semanas de dieta G isocalórica, ocorreu aumento do HDL-C em jejum no grupo GCC, enquanto houve redução dos triglicerídeos em jejum no grupo CGG, sem modificação do CT ou LDL-C (Figura 9). A dieta C isocalórica não causou mudanças nos valores dos lipídios em jejum. Na análise da fase de manutenção por tipo de dieta (Figura 10) não foram observadas mudanças nos valores de lipídeos em jejum. Depois de 8 semanas de perda de peso média de 5%, não foram vistas

alterações significativas nas variáveis lipídicas estudadas, independente do tipo de dieta (Figura 9)

Figura 9. Lipídeos em jejum em cada grupo após manutenção e perda de peso

Teste não-paramétrico de Wilcoxon, *p<0,05

Figura 10. Lipídeos em jejum por tipo de dieta após manutenção de peso

Teste não-paramétrico de Wilcoxon, $*p<0,05$

4.6 CURVAS DE GLICEMIA, INSULINEMIA E TRIGLICERÍDEOS DE 8 HORAS

Foi observada redução da insulinemia de 2 horas, com tendência à redução da área sob a curva de insulina após refeição-teste com sobrecarga de gordura, logo após 4 semanas de ingestão de dieta G, sem alteração do peso corporal (Tabela 8). Em contrapartida, a refeição-teste com sobrecarga de carboidrato logo após 4 semanas de dieta C, mantendo peso, mostrou redução do delta de 4 horas de TG e o mesmo padrão de resposta foi visto após a perda de peso com dieta C hipocalórica (Tabela 8).

Tabela 8. Glicemia, insulinemia e TG após refeição-teste G ou C na fase de manutenção e perda de peso

MANUTENÇÃO DE PESO				
	GCC		CGG	
	Após Padrão	Após G iso	Após Padrão	Após C iso
Glicemia 2h mg/dL	89,60 ± 8,80	93,56 ± 5,39	85,17 ± 10,83	95,67 ± 15,72
AUC Glicemia	707,20 ± 46,23	716,0 ± 34,23	708,0 ± 31,34	745,67 ± 59,79
Insulinemia 2h µU/mL	26,36 ± 8,36	15,49 ± 5,59*	14,98 ± 5,99	18,75 ± 12,32
AUC Insulina	115,38 ± 38,55	89,63 ± 30,23	79,94 ± 23,78	91,46 ± 42,14
Delta TG 4h	5,5 ± 29,34	32,20 ± 37,91	19,33 ± 11,34	0,33 ± 5,28*
AUC TG	751,38 ± 175,41	823,25 ± 205,58	776,83 ± 320,06	816,0 ± 259,99
PERDA DE PESO				
	GCC		CGG	
	Após C Iso	Após C Hipo	Após G Iso	Após G Hipo
Glicemia 2h mg/dL	85,70 ± 7,89	91,0 ± 10,84	93,0 ± 8,32	90,0 ± 10,26
AUC Glicemia	691,90 ± 43,05	699,20 ± 47,58	727,67 ± 46,68	689,67 ± 85,02
Insulinemia µU/mL	15,47 ± 5,95	14,53 ± 6,87	12,68 ± 4,59	11,69 ± 4,53
AUC Insulina	113,38 ± 58,16	83,74 ± 21,63	74,89 ± 27,90	64,22 ± 23,12
Delta TG 4h	10,60 ± 13,91	4,33 ± 7,99*	29,33 ± 37,11	31,33 ± 23,80
AUC TG	727,90 ± 114,01	731,0 ± 130,24	703,17 ± 244,21	741,17 ± 252,42

Teste não-paramétrico de Wilcoxon, *p<0,05. AUC:área sob a curva

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos da dieta rica em gordura ou carboidrato, durante semanas mantendo ou perdendo peso, em uma população de mulheres com sobrepeso metabolicamente saudáveis. Foi observado que a dieta isocalórica rica em carboidrato proporcionou aumento no IMCL do músculo tibial anterior e na insulinemia em jejum, com tendência a aumento na resistência à insulina (HOMA-IR) durante a fase de manutenção de peso.

O músculo tibial anterior apresenta uma mistura de fibras musculares tipo I e II, enquanto o músculo sóleo apresenta predominantemente fibras tipo I, que possuem alta capacidade oxidativa⁴⁶. A diferente composição dos músculos confere aos mesmos diferentes características quanto à metabolização dos substratos de energia (glicose e gordura). Assim, os músculo tibial anterior é mais glicolítico, enquanto o sóleo é mais oxidativo. De acordo com Randle e colaboradores⁴⁴, a captação de glicose pelo músculo depende da competição entre os substratos glicose e ácidos graxos livres. Randle especula que o aumento da oxidação de gordura intramiocelular é responsável pela resistência à insulina associada à obesidade^{44,83,84}. O fato se deve ao aumento da concentração de ácido graxo intracelular, que resulta em elevação intramitocondrial da razão acetil CoA/CoA e NADH/NAD⁺, com subsequente inativação da piruvato desidrogenase. Isto causa aumento da concentração de citrato, levando a inibição da fosfofrutoquinase. Aumentos subsequentes da concentração intracelular de glicose-6-fosfato irão inibir a atividade da hexoquinase II, o que resultará em aumento da concentração intracelular de glicose e redução da captação muscular de glicose⁴⁴. Entretanto, Shulman e

colaboradores propuseram um mecanismo alternativo para a resistência à insulina no músculo esquelético induzida por ácido graxo⁴⁵. O aumento na oferta de ácido graxo para o músculo ou a diminuição no metabolismo de ácido graxo intracelular leva a um aumento nos metabólitos de ácidos graxos intracelulares como o diacilglicerol, *fatty acil* CoA e ceramidas. Estes metabólitos ativam a cascata serina/treonina (possivelmente iniciada pela proteínaquinase), levando a fosforilação dos sítios de serina/treonina no substrato de receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2), o que reduz a capacidade do IRS-1/2 de ativar a PI-3 quinase. Como consequência, a atividade de transporte de glicose dependentes da cascata de sinalização do receptor de insulina, fica reduzida⁴⁵. Em nosso estudo, encontramos um aumento no IMCL do músculo tibial anterior após dieta rica em carboidrato, mantendo peso, apenas no grupo CGG, no qual não houve influência de dieta rica em gordura anteriormente. Este resultado pode ser decorrente de uma maior oferta de carboidrato versus gordura para um músculo que preferencialmente usa glicose como substrato energético. Stettler e colaboradores compartilham com nosso resultado onde também mostram aumento no IMCL após dieta rica em carboidrato⁵⁵.

Em contrapartida, não observamos mudanças no IMCL do músculo SOL e isto pode ter sido influenciado por fatores metodológicos. Por exemplo, a reprodutibilidade da ¹H –ERM foi descrita ser 10-15% para o músculo SOL, enquanto 5-10% para o músculo TA^{57,85,86}. Além disso, como o músculo SOL apresenta maior quantidade basal de IMCL por ser um músculo principalmente oxidativo, faz-se necessário alterações absolutas maiores para verificarmos um significativo aumento ou redução de IMCL neste músculo^{48,85,86}.

A dieta rica em gordura não proporcionou modificações no IMCL de ambos os músculos avaliados independente da manutenção ou perda de peso, diferente de outros resultados na literatura⁴⁶⁻⁴⁸, porém deve-se ressaltar que nestes relatos a população estudada era de obesos e diabéticos, enquanto em nosso estudo avaliamos mulheres metabolicamente saudáveis.

Não sabemos se o aumento de lipídeos no músculo TA modificou a resistência muscular periférica à insulina avaliada por “*clamp*” euglicêmico insulinêmico, pois este exame não foi realizado em nosso estudo, porém foi observado um aumento significativo da insulinemia em jejum e uma tendência a aumento do HOMA-IR, considerado como um método validado para verificação de resistência á insulina⁷⁹

Neste estudo, um dos objetivos foi avaliar o efeito crônico de cada tipo de dieta sobre a função endotelial através da resposta vasodilatadora muscular, e por este motivo a pletismografia foi realizada após semanas de cada tipo de dieta, e não imediatamente após a ingestão da mesma. Com esta metodologia, observamos que tanto na fase de manutenção, quanto na fase de perda de peso, não houve alterações significativas na função endotelial, independente do tipo de dieta. Diferentemente de nossos resultados, outras publicações demonstram uma redução da reatividade vascular após ingestão de dieta gordurosa, entretanto devemos ressaltar que a ingestão foi aguda, houve associação com hipertrigliceridemia pós prandial^{87,88} e a população era representada por idosos e pessoas com doenças metabólicas⁸⁹⁻⁹¹. Este é o primeiro estudo a avaliar a função endotelial de uma população de mulheres saudáveis após semanas de dieta rica em gordura ou carboidrato, mantendo ou perdendo peso. Assumindo que a lesão crônica do endotélio é consequência do

equilíbrio entre fatores agressores do endotélio versus a capacidade do organismo de reparar os danos agudos, podemos levantar a hipótese de que não houve mudanças crônicas na função endotelial de nossa população pelo fato dela ser extremamente saudável, e se por algum momento houve um dano agudo, este foi reparado, não refletindo em dano crônico. É possível que esta população tenha a capacidade de lidar e metabolizar sobrecarga crônica de gordura ou carboidrato, sem apresentar alteração na vasodilatação muscular.

Quanto aos lipídeos, vimos que durante a fase de manutenção, a dieta rica em gordura proporcionou aumento no HDL-C e redução dos triglicerídeos, semelhantes a outros trabalhos^{8,13,14}. O aumento do HDL-C foi visto tanto no grupo GCC quanto na avaliação de todos os indivíduos após dieta rica em gordura, mas a redução dos triglicerídeos foi observada apenas no grupo CGG. Este resultado se deve provavelmente à influência da dieta anterior rica em carboidrato no grupo CGG, pois houve um aumento de TG em relação à dieta padrão, que apesar de não ter sido estatisticamente significativa (90.17 ± 38.29 vs. 102.83 ± 34.10 , $p=0.22$), foi suficiente para mostrar uma redução significativa ao mudar de dieta rica em carboidrato para dieta rica em gordura. A redução não significativa (89.30 ± 33.99 vs 84.60 ± 32.84 , $p=0.38$) de triglicerídeo no grupo GCC após dieta rica em gordura isocalórica, deve-se possivelmente à valores iniciais muito normais desta população, onde um delta de apenas 6mg/dL não foi suficiente para mostrar significância estatística com este tamanho de amostra. O aumento de HDL-C e redução de triglicerídeo após dieta rica em gordura têm sido demonstrado em diversos estudos na literatura após perda de peso e população de obesos e diabéticos, as quais normalmente apresentam hipertrigliceridemia e baixo HDL-C^{7,8,12,13}. Contudo, neste

trabalho, mostramos o mesmo efeito da dieta rica em gordura no HDL-C e TG em uma população saudável, sem perda de peso.

Analisando a variável peso, vimos que uma redução média de 5% não foi capaz de causar variação em nenhum dos parâmetros metabólicos avaliados. A não alteração dos valores de lipídeos com perda de peso difere de outros dados da literatura, entretanto vale ressaltar a diferença entre as populações estudadas, visto que lidamos com mulheres metabolicamente normais^{7,8,12,13}. Em relação ao IMCL após perda de peso, alguns trabalhos também não mostram mudanças no IMCL quando realizado apenas programa de dieta^{58,91}, enquanto Tamura e colaboradores⁵⁸ demonstram redução do IMCL após perda de peso com dieta e exercício em diabéticos. Como neste estudo não foi realizado nenhum programa de atividade física, também não evidenciamos alterações no IMCL após perda de peso apenas com dieta. Quanto a resposta vascular e perda de peso, Philips e colaboradores demonstram uma melhora da reatividade vascular após dieta pobre em gordura comparada à dieta rica em gordura após semelhante redução de peso em uma população de obesos⁹². Este estudo, entretanto, é o primeiro a mostrar os efeitos da exposição, por semanas, à dieta rica em gordura ou carboidrato em uma população de mulheres saudáveis. Provavelmente não encontramos variação na função endotelial em nosso grupo por este apresentar um fluxo vascular normal desde o início.

Na avaliação do comportamento metabólico após sobrecarga de gordura ou carboidrato com refeição-teste, observou-se que a sobrecarga de gordura comparada à refeição-teste padrão reduziu a insulinemia de 2 horas, com tendência à redução da área sob a curva de insulina, provavelmente por um menor estímulo a secreção de insulina devido menor aporte de carboidrato na refeição. Por outro lado, a refeição-

teste com sobrecarga de carboidrato demonstrou redução do delta de TG em 4 horas e o mesmo padrão de resposta foi visto após a perda de peso com dieta C hipocalórica. Este resultado mostrou que não somente a proporção de gordura/carboidrato da dieta é importante para o delta de TG (fase de manutenção: refeição-teste padrão versus refeição-teste C), assim como a variação de peso (fase de perda de peso: refeição-teste C versus refeição-teste C).

Considerações Finais:

Mesmo com técnicas modernas e validadas para avaliar IMCL e função endotelial, como a ¹H-ERM e pletismografia, uma limitação de nosso estudo foi o tamanho da amostra. Encontramos resultados significativos para algumas avaliações, porém mais estudos com amostragem maior são necessários para continuar a investigação sobre este assunto ainda controverso.

Quanto a implicação clínica de nossos resultados, mostramos que dieta rica em gordura aumentou HDL-C e reduziu TG mesmo em população de mulheres saudáveis mantendo peso, mostrando algum benefício metabólico desta dieta; enquanto a dieta rica em carboidrato causou aumento da insulinemia em jejum e depósito de gordura intramiocelular em músculo glicolítico, o que pode ser relevante pelo fato de tais alterações serem fatores predisponentes a patologia Diabetes Mellito.

Evidentemente mais estudos são necessários para podermos compreender melhor o papel da qualidade das dietas nos parâmetros estudados.

6. CONCLUSÕES

Em mulheres jovens metabolicamente saudáveis com sobrepeso:

7.1 A dieta isocalórica rica em carboidrato, por um período de quatro semanas, proporcionou aumento no IMCL do músculo tibial anterior e na insulinemia em jejum, com tendência a aumento da resistência à insulina.

7.2 A dieta isocalórica rica em gordura, por um período de quatro semanas, proporcionou aumento no HDL-C e redução dos triglicerídeos em jejum.

7.3 A dieta hipocalórica rica em gordura ou carboidrato, por oito semanas, associada a perda média de 5% do peso corpóreo, não causou alterações no IMCL dos músculos sóleo e tibial anterior, na função endotelial, na resistência à insulina e nos valores de lipídeos, glicemia e insulinemia em jejum.

7. REFERÊNCIAS *

1. Grundy SM. Metabolic complications of obesity. *Endocrine*. 2000; 13(2): 155-65
2. Bray GA, Popkin BM. Dietary fat intake does affect obesity! *Am J Clin Nutr* 1998; 68(6):1157-73.
3. Jéquier E, Bray GA. Low-fat diets are preferred. *Am J Med* 2002; 113: Suppl:41S-46S.
4. Willett WC, Leibel RL. Dietary fat is not a major determinant of body fat. *Am J Med* 2002; 113: Suppl: 47S-59S.
5. Freedman MR, King J, Kennedy E. Popular diets: a scientific review. *Obes Res* 2001; 9: Suppl:1S-40S
6. Manzoni GM, Castelnovo G, Molinari E. Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med*. 2008 Nov 13; 359(20):2170-2.
7. Porta N, Vallée L, Boutry E, Auvin S. The ketogenic diet and its variants: State of the art. *Rev Neurol (Paris)*. 2008 Nov 20.
8. Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I, Golan R, Fraser D, Bolotin A, Vardi H, Tangi-Rozental O, Zuk-Ramot R, Sarusi B, Brickner D, Schwartz Z, Sheiner E, Marko R, Katorza E, Thiery J, Fiedler GM, Bluhner M, Stumvoll M, Stampfer MJ. Weight Loss with a Low-Carbohydrate, Mediterranean, or Low-Fat Diet. *N Engl J Med*. 2008 Jul 17; 359(20):229.
9. Hill JO, Lin D, Yakubu F, Peters JC. Development dietary obesity in rats: influence of amount and composition of dietary fat. *Int J Obes* 1992; 16: 321 - 33.

10. Horton TJ, Douglas H, Brachey A, Reed GW, Peters JC, Hill JO: Fat and carbohydrate overfeeding in humans: Different effects on energy storage. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 19 – 29.
11. Skov AR, Toubro S, Rønn B, Holm L, Astrup A. Randomized trial of protein vs carbohydrate in ad libitum fat reduced diet for the treatment of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23: 528-36.
12. Brehm BJ, Seeley RJ, Daniels SR, D'Alessio DA. A randomized trial comparing a very low carbohydrate diet and a calorie-restricted low fat diet on body weight and cardiovascular risk factors in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1617-23.
13. Foster GD, Wyatt HR, Hill JO, et al. A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity. *N Engl J Med* 2003; 348: 2082-90.
14. Samaha FF, Iqbal N, Seshadri P, et al. A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *N Engl J Med* 2003; 348: 2074-81.
15. Yancy WS Jr, Olsen MK, Guyton JR, Bakst RP, Westman EC. A low-carbohydrate ketogenic diet versus a low-fat diet to treat obesity and hyperlipidemia: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2004; 140: 769-77.
16. Volek J, Sharman M, Gómez A, et al. Comparison of energy-restricted very lowcarbohydrate and low-fat diets on weight loss and body composition in overweight men and women. *Nutr Metab (Lond)* 2004; 1: 13.
17. Due A, Toubro S, Skov AR, Astrup A. Effect of normal-fat diets, either medium or high in protein, on body weight in overweight subjects: a randomised 1-year trial. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 1283-90.

18. Gardner CD, Kiazand A, Alhassan S, et al. Comparison of the Atkins, Zone, Ornish, and LEARN diets for change in weight and related risk factors among overweight premenopausal women: the A to Z Weight Loss Study: a randomized trial. *JAMA* 2007; 297: 969-77. [Erratum, *JAMA* 2007; 298: 178.]
19. Noakes M, Keough JB, Foster PR, Clifton PM. Effect of an energy-restricted, high-protein, low-fat diet relative to a conventional low-fat, high-carbohydrate diet on weight loss, body composition, nutritional status, and markers of cardiovascular health in obese women. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 1298-306.
20. McLaughlin T, Carter S, Lamendola C, et al. Effects of moderate variations in macronutrient composition on weight loss and reduction in cardiovascular disease risk in obese, insulin-resistant adults. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 813-21.
21. McMillan-Price J, Petocz P, Atkinson F, et al. Comparison of 4 diets of varying glycemic load on weight loss and cardiovascular risk reduction in overweight and obese young adults: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2006; 166: 1466-75.
22. Das SK, Gilhooly CH, Golden JK, et al. Long-term effects of 2 energy-restricted diets differing in glycemic load on dietary adherence, body composition, and metabolism in CALERIE: a 1-y randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2007; 85:1023-30.
23. Lecheminant JD, Gibson CA, Sullivan DK, et al. Comparison of a low carbohydrate and low fat diet for weight maintenance in overweight or obese adults enrolled in a clinical weight management program. *Nutr J* 2007; 6: 36.

24. Stern L, Iqbal N, Seshadri P, et al. The effects of low-carbohydrate versus conventional weight loss diets in severely obese adults: one-year follow-up of a randomized trial. *Ann Intern Med* 2004; 140: 778-85.
25. Keogh JB, Luscombe-Marsh ND, Noakes M, Wittert GA, Clifton PM. Longterm weight maintenance and cardiovascular risk factors are not different following weight loss on carbohydrate-restricted diets high in either monounsaturated fat or protein in obese hyperinsulinemic men and women. *Br J Nutr* 2007; 97: 405-10.
26. Dansinger ML, Gleason JA, Griffith JL, Selker JP, Schaefer EJ. Comparison of the Atkins, Ornish, Weight Watchers, and Zone diets for weight loss and heart disease risk reduction: a randomized trial. *JAMA* 2005; 293: 43-53.
27. Ornish D, Scherwitz LW, Billings JH, et al. Intensive lifestyle changes for reversal of coronary heart disease. *JAMA* 1998; 280: 2001-7. [Erratum, *JAMA* 1999;281: 1380.]
28. Barnard ND, Cohen J, Jenkins DJ, et al. A low-fat vegan diet improves glycemic control and cardiovascular risk factors in a randomized clinical trial in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29: 1777-83.
29. Turner-McGrievy GM, Barnard ND, Scialli AR. A two-year randomized weight loss trial comparing a vegan diet to a more moderate low-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 2007;15: 2276-81.
30. Nicolosi RJ, Stucchi AF, Kowala MC, Hennessy LK, Hegsted DM, Schaefer E. Effect of dietary fat saturation and cholesterol on LDL composition and metabolism. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 119-28.
31. Grundy SM. Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *Am J Clin Nutr* 1994; 60 (suppl): 986S-990S.

32. Daumerie Cm, Woollett La, Dietschy Jm. Fatty acids regulate hepatic low-density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 10797-801.
33. Bennett Aj, Billett Ma, Salter Am, Mangiapane Eh, Bruce Js, Anderton Kl, Marenah Cb, Lawson N, White Da. Modulation of hepatic apolipoprotein B 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coA reductase and low-density lipoprotein receptor mRNA and plasma lipoproteins concentrations by defined dietary fats. *Biochem J* 1995; 311: 167-73.
34. Zhou YP, Grill VE. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acid inhibits glucose - induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* 1994; 93: 870 – 76.
35. Sako Y, Grill VE. A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and β cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinology* 1990; 127: 1580 – 9.
36. Kayala KJ, Prigeon RL, Kahn SE, Woods SC, Portier D, Schwarz MW. Reduced beta-cell function contributes to impaired glucose tolerance in dogs made obese by high-fat feeding. *Am J Physiol* 1999; 277: E 659 – 67.
37. Zhou Y, Grill V. Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1584 – 1590.
38. Zilverman DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 1979; 60(3): 473-85.
39. Camera A, Hopps E, Caimi G, . Metabolic syndrome: from insulin resistance to adipose tissue dysfunction. *Minerva Med.* 2008 Jun; 99(3): 307-21

40. Després JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodés-Cabau J, Bertrand OF, Poirier P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Jun; 28(6): 1039-49. Epub 2008 Mar 20.
41. Koyama K, Chen G, Lee Y, Unger RH. Tissue triglycerides, insulin resistance, and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *Am J Physiol* 1997; 273 (4 Pt 1): E708-13.
42. Greco AV, Mingrone G, Giancaterini A, Manco M, Morroni M, Cinti S, Granzotto M, Vettor R, Camastra S, Ferrannini E. Insulin resistance in morbid obesity: reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes* 2002; 51(1): 144-51.
43. Virkamaki A, Korshennikova E, Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Goto T, Halavaara J, Hakkinen AM, Yki-Jarvinen H. Intramyocellular lipid is associated with resistance to in vivo insulin actions on glucose uptake, antilipolysis, and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle. *Diabetes* 2001; 50: 2337 - 43.
44. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle; its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1963; 1: 785-9
45. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000; 106: 171-6.
46. Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, Pagliato E, Battezzati A, Arcelloni C, Vaanzulli A, Testolin G, Pozza G, Del Maschio A, Luzi C.L: Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans. *Diabetes* 1999; 48: 1600 – 6.

47. Malenfant P, Tremblay A, Doucet E, Imbeault P, Simoneau JA, Joanisse DR. Elevated intramyocellular lipid concentration in obese subjects is not reduced after diet and exercise training. *Am J Physiol Endo Metab* 2001; 280: 632-39.
48. Malenfant P, Joanisse DR, Thériault R, Goodpaster BH, Kelley DE, Simoneau JA. Fat content in individual muscle fibers of lean and obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001 Sep;25(9): 1316-21.
49. Dubé JJ, Amati F, Stefanovic-Racic M, Toledo FG, Sauers SE, Goodpaster BH. Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 May;294(5): E882-8. Epub 2008 Mar 4.
50. Felber JP, Ferrarannini E, Golay A, Meyer HU, Theibaud D, Curchod B, Maeder E, Jequier E, DeFronzo RA. Role of lipid oxidation in pathogenesis of insulin resistance of obesity and type II diabetes. *Diabetes* 1987; 56: 1341 – 50.
51. Schutz Y, Flatt JP, Jequier E. Failure of dietary fat intake to promote fat oxidation: a factor favoring the development of obesity. *Am J Clin Nutr* 1989; 50: 307 – 14.
52. Flatt JP, Ravussin E, Acheson KJ, Jequier E. Effect of dietary fat on post-prandial substrate oxidation and on carbohydrate and fat balances. *J Clin Invest* 1985; 76: 1019 -24.
53. Bennett C, Reed GW, Peters JC, Abumrad NN, Sun M, Hill JO. Short term effects of dietary-fat ingestion on energy expenditure and nutrition balance. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 1071 – 7.
54. Bachmann OP, Dahl DB, Brechtel K, Machann J, Haap M, Maier T, Loviscach M, Stumvoll M, Claussen CD, Schick F, Haring HU, Jacob S. Effects of intravenous

and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 2001; 50(11): 2579-84.

55. Stettler R, Ith M, Acheson KJ, Decombaz J, Boesch C, Tappy L, Binnert C. Interaction between dietary lipids and physical inactivity on insulin sensitivity and intramyocellular lipids in healthy men. *Diabetes Care* 2005 (28):1404-9.

56. Schrauwen-Hinderling VB, Kooi ME, Hesselink MKC, Monen-Kornips E, Schaart G, Mustard KJ, Hardie DG, Saris WHM, Nicolay K, Schrauwen P. Intramyocellular lipid content and molecular adaptations in response to 1-week high-fat diet. *Obes Res* 2005; (13): 2088-94.

57. Goodpaster BH, Theriault R, Watkins SC, Kelley DE. Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metab* 2000; 49: 467-72.

58. Tamura Y, et al. Effect of diet and exercise on muscle and liver intramyocellular lipid contents and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3191 – 6.

59. White LJ, Ferguson MA, McCoy SC, Kim H. Intramyocellular Lipid Changes in Men and Women during Aerobic Exercise: A ¹H-Magnetic Resonance Spectroscopy Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5638 – 43.

60. Szczepaniak LS, Babcock EE, Schick F, Dobbins RL, Garg A, Burns DK, McGarry D, Stein DT. Measurement of intracellular triglyceride stores by ¹H spectroscopy: validation in vivo. *Am J Physiol* 1999; 276 (5 pt1): E977 - E989.

61. Boesch C, Slotboom J, Hopeller H, Kreis R. In vivo determination of intramyocellular lipids in human muscle by means of localized ¹H-MR spectroscopy. *Magn Res Med* 1997; 37: 484 – 93.

62. Boesch C, Kreis R. Observation of intramyocellular lipids by ¹H-magnetic resonance spectroscopy. *Ann NY Acad Sci* 2000; 904: 25 - 31.
63. Pette D. Metabolic heterogeneity of muscle fibers. *J Exp Biol* 1985; 115: 179-189
64. Brown AA, Hu FB. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(4): 673-86.
65. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12: 383 – 9.
66. Hennig B, Toborek M, McClain CJ, Diana JN. Nutritional implications in vascular endothelial cell metabolism. *J Am Coll Nutr* 1996; 15(4):345-58.
67. Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, Graham J, Morris K, Jackson SK, Lewis MJ, Rees A, Frenneaux MP. The relationships between postprandial lipaemi, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients wit type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2001; 154: 475-83.
68. Bae JH, Bassenge E, Kim KB, Kim YN, Lee HJ, Moon KC, Lee MS, Park KY, Schwemmer M. Postprandial hipertriglyceridemia impairs endothelial function by enhanced oxidant stress. *Atherosclerosis* 2001; 155: 517-23.
69. Mckeone BJ, Patsch JR, Ownall HJ. Plasma triglycerides determine low density lipoproteincomposition, physical properties, and cell-specific binding in cultured cells. *J Clin Invest* 1993; 91: 1926-33.
70. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* 2005; 135: 969-72.

71. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol* 1997; 79: 350 – 4.
72. Lundman P, Eriksson M, Schenk-Gustafsson K, Tornvall P. Transient triglyceridemia decreases vascular reactivity in young, healthy men without risk factors for coronary heart disease. *Circulation* 1997; 96: 3266-8.
73. Reil TD, Barnard RJ, Kashyap VS, Roberts CK, Gelabert HA. Diet-induced changes in endothelial-dependent relaxation of the rat aorta. *J Surg Res* 1999; 85(1): 96-100.
74. Ong PJJ, Dean TS, Hayward CS, Monica PLD, Sanders TAB, Collins P. Effect of fat and carbohydrate consumption on endothelial function. *Lancet* 1999; 354 (9196): 2134.
75. Uijtdehaage SH, Shapiro D, Jaquet F. Effects of carbohydrate and protein meals on cardiovascular levels and reactivity. *Biol Psychol* 1994; 38(1): 53-72.
76. Stroop JR. Studies of interference in serial verbal reactions. *J Exper Psychol* 1935; 18: 643-62.
77. Middlekauff HR, Nguyen AH, Negrao CE, Nitzsche EU, Hoh CK, Natterson BA, Hamilton MA, Fonarow GC, Hage A, Moriguchi JD. Impact of acute mental stress on sympathetic nerve activity and regional blood flow in advanced heart failure. *Circulation* 1997; 96: 1835-42.
78. Pereira JA, Lazarin MACT, Carvalho OMF, Pareja JC, Geloneze B, Chain EA, Muscellin E. Evaluation of insulin sensitivity in morbid obese patients due to euglycemic hyperinsulinemic clamp. *Arq Brás Endocrinol.* 1999; 43 (Suppl 2): S60.
79. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose

clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity . *Diabetes Care* 2000; 23: 57-63.

80. http://www.diabetes.org.br/Colunistas/Diabetes_Hoje/index.php?id=873.

81. Haugen HA, Chan LN, Li F. Indirect calorimetry: a practical guide for clinicians. *Nutr Clin Pract* 2007; 22(4): 377-88.

82. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DR. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.

83. Randle, P.J., Garland, P.B., Newsholme, E.A., and Hales, C.N. The glucose fatty-acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus. *Ann. NY Acad. Sci.* 1965; 131: 324–33.

84. Randle, P.J., Newsholme, E.A., and Garland, P.B. Regulation of glucose uptake by muscle. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan, diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem. J.* 1964; 93:652–65.

85. Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5755-61.

86. Thamer C, Machann J, Bachmann O, Haap M, Dahl D, Wietek B, Tschritter O, Niess A, Brechtel K, Fritsche A, Claussen C, Jacob S, Schick F, Haring HU, Stumvoll M. Intramyocellular lipids: anthropometric determinants and relationships

with maximal aerobic capacity and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1785-91

87. Gokce N, Duffy SJ, Hunter LM, Keaney JF, Vita JA. Acute hypertriglyceridemia is associated with peripheral vasodilation and increased basal flow in healthy young adults. *Am J Cardiol* 2001; 88: 153-9.

88. Marchesi S, Lupattelli G, Schilacci G, Pirro M, Siepi D, Roscini AR, Pasqualin L, Mannarino E. Impaired flow-mediated vasoactivity during post-prandial phase in young healthy men. *Atherosclerosis* 2000; 153: 397-402.

89. Skilton MR, Lai NT, Griffiths KA, Molyneaux LM, Yue DK, Sullivan DR, Celermajer DS. Meal-related increases in vascular reactivity are impaired in older and diabetic adults: insights into roles of aging and insulin in vascular flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: 1404-10.

90. Zhao SP, Liu L, Gao M, Zhou QC, Li YL, Xia B. Impairment of endothelial function after a high-fat meal in patients with coronary artery disease. *Coronary Artery Dis* 2001; 12: 561-5.

91. Giannattasio C, Zoppo A, Gentile G, Failla M, Capra A, Maggi FM, Catapano A, Mancina G. Acute effect of high-fat meal on endothelial function in moderately dyslipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 406-10.

92. Phillips SA, Jurva JW, Syed AQ, Syed AQ, Kulinski JP, Pleuss J, Hoffmann RG, Gutterman DD. Benefit of low-fat over low-carbohydrate diet on endothelial health in obesity. *Hypertension*. 2008; 51(2): 376-82. Epub 2008 Jan 14.

* De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.