



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
COORDENAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES DO
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA

Diogo Van Bavel Bezerra

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA SOBRE A
HOMOCISTEÍNA E A FUNÇÃO ENDOTELIAL MICROVASCULAR
SISTÊMICA DE INDIVÍDUOS VEGETARIANOS ESTRITOS**

RIO DE JANEIRO

2016

Diogo Van Bavel Bezerra

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA SOBRE A
HOMOCISTEÍNA E A FUNÇÃO ENDOTELIAL MICROVASCULAR
SISTÊMICA DE INDIVÍDUOS VEGETARIANOS ESTRITOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Cardiovasculares, do Instituto Nacional de
Cardiologia, como pré-requisito à
obtenção do título de Mestre em Ciências
Cardiovasculares

Orientador(es): Dr. Eduardo Tibiriçá
Dr. Roger de Moraes

RIO DE JANEIRO

2016

Bezerra, Diogo Van Bavel

Efeitos da suplementação com creatina sobre a homocisteína e a função endotelial microvascular sistêmica de indivíduos vegetarianos estritos/ Diogo Van Bavel Bezerra – Rio de Janeiro, 2016.

xx f.

Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências Cardiovasculares) Instituto Nacional de Cardiologia – INC

1. Suplementação com Creatina. 2. Homocisteína. 3. Veganismo. 4. Vegetarianismo I. Título.

DIOGO VAN BAVEL BEZERRA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA SOBRE A
HOMOCISTEÍNA E A FUNÇÃO ENDOTELIAL MICROVASCULAR
SISTÊMICA DE INDIVÍDUOS VEGETARIANOS ESTRITOS**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Cardiovasculares, do Instituto
Nacional de Cardiologia,
como pré-requisito à
obtenção do título de Mestre
em Ciências Cardiovasculares

Aprovada por:

Dr^a Annie Bello – Instituto Nacional de Cardiologia (INC)

Dr^a Grazielle Huguenin – Instituto Nacional de Cardiologia (INC)

Dr^o Alessandro Nascimento – Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ)

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dr. Eduardo Tibiriçá e Dr. Roger de Moraes por todos os momentos dedicados ao projeto e a minha formação, além de toda paciência ao longo destes dois anos.

A nutricionista e educadora física Beatriz de Serpa de Moraes por ter se dedicado ao projeto desde o início e por todo empenho em ajudar para a concretização do trabalho.

Ao técnico Márcio Gonzalez pela ajuda nas avaliações e coletas ao longo de todo projeto.

A minha família por estar sempre ao meu lado incentivando e se dedicando sempre na minha formação.

A todos os vegetarianos que participaram do estudo e que puderam dedicar um tempo do seu dia ajudando na construção e conclusão deste projeto.

RESUMO

Fundamentação: A dieta vegetariana vem sendo implementada há décadas em diferentes culturas e mais recentemente foi associada a terapias para redução dos fatores de risco de doença cardiovascular tais como sobrepeso, resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia. Apesar disso, o vegetarianismo impõe inúmeras restrições de micronutrientes relacionadas à exclusão do consumo de alimentos de origem animal, e os tradicionais efeitos cardio-protetores da dieta tem sido questionados em alguns estudos. Neste contexto, deficiências de vitamina B12 e creatina, micronutrientes exclusivamente presentes em alimentos de origem animal, podem elevar o risco cardiovascular particularmente através do aumento dos níveis plasmáticos de homocisteína, molécula capaz de aumentar o estresse oxidativo vascular e promover disfunção de células endoteliais. Assim o estudo visou investigar o efeito da suplementação com creatina sobre a reatividade microvascular e os níveis plasmáticos de homocisteína em indivíduos vegetarianos estritos. **Métodos:** Os voluntários veganos estritos de ambos os sexos foram recrutados através de redes sociais e comunidades de vegetarianos localizadas no Rio de Janeiro e randomicamente alocados nos grupos de suplementação com creatina (Scr, n=27) ou placebo (PLA, n=18). Todos os procedimentos seguiram a mesma sequência, começando com a coleta das amostras de sangue, acompanhada por uma avaliação clínica e física e concluindo com a avaliação da microcirculação por fluxometria laser de contraste de imagem (LCSI) e vídeo-capilaroscopia intravital. Os mesmos procedimentos foram repetidos após três semanas de suplementação com creatina. Os voluntários do grupo suplementado com creatina receberam 5 g diárias de creatina monohidratada micronizada durante três semanas, enquanto os voluntários do grupo suplementado com placebo receberam 5 g por dia de maltodextrina. **Resultados:** Houve redução significativa dos níveis plasmáticos de homocisteína (Hcy) no grupo Scr [12,11 (8,57-17,12) vs. 10,58 (8,15-13,22); p = 0,0199], já a perfusão capilar basal aumentou significativamente após o período de suplementação apenas do grupo Scr (136 ± 8 vs. 147 ± 13 capilares/mm²; p = 0,0001) e o recrutamento capilar após a hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) elevou-se significativamente apenas no grupo Scr (141 ± 9 vs. 155 ± 14 capilares/mm²; p = 0,0001). Após o período de Scr, tanto a perfusão capilar basal quanto aquela observada após a hiperemia, foram significativamente mais elevadas no grupo Scr em relação ao PLA. **Conclusão:** A Scr reduz os níveis de Hcy após três semanas em veganos, sendo mais eficaz quando há presença de indivíduos com hiperhomocisteinemia, além de correlacionar o tempo de vegetarianismo e níveis de Hcy e demonstrar uma relação inversa com níveis de vitamina B12 e Hcy. A Scr por três semanas também mostrou um aumento na perfusão capilar em repouso e após a hiperemia reativa, entretanto não exibiu respostas na reatividade microvascular significativas na fluxometria laser, evidenciando que a Scr pode influenciar na abertura dos esfíncteres pré-capilares sem alterar a dilatação arteriolar.

Palavras-chave: Suplementação com creatina; homocisteína; veganismo; vegetarianismo, fluxo microvascular.

ABSTRACT

Background: The vegetarian diet has been used for decades in different cultures and has been recently associated to treatments aiming at reducing risk factors for cardiovascular diseases such as overweight, insulin resistance, hypertension and dyslipidemia. However, vegetarianism also results in the restriction of the ingestion of micronutrients related to the exclusion of food from animal origin. Thus, the traditional cardioprotective effects of the vegetarian diet have been questioned in some studies. In this context, the dietary restriction of vitamin B12 and creatine, micronutrients which are present only in food from animal origin, can induce pathophysiological alterations that increase cardiovascular risk, mainly through the increase of the plasma levels of homocysteine (Hcy), a molecule capable to increase vascular oxidative stress and induce endothelial cell dysfunction. Thus, the present study investigated the effects of creatine supplementation on the systemic microvascular reactivity and plasma levels of homocysteine in strict (vegan) vegetarian individuals.

Methods: Vegan vegetarian individuals of both sexes were recruited through advertisement in social networking services and vegetarian communities in the State of Rio de Janeiro and randomly allocated to two groups: creatine supplementation (Scr, n=27) or placebo supplementation (PLA, n=18). In the morning of the examinations, peripheral blood was collected after an overnight fasting period, followed by clinical and physical evaluations and finally assessment of the cutaneous microvascular reactivity and density using microvascular flowmetry with laser speckle contrast imaging and intravital video-microscopy. The same procedures were repeated after three weeks of Scr. The volunteers of the Scr group received an oral dose of 5 g of monohydrate micronized creatine, while individual of the PLA group received 5 g of maltodextrin, during three weeks.

Results: There was a significant reduction in the plasma levels of Hcy in the Scr group [12.11 (8.57-17.12) vs. 10.58 (8.15-13.22); p=0.0199]. Basal capillary density also increased significantly in the Scr group (136 ± 8 vs. 147 ± 13 capillaries/mm²; p=0.0001), as well as capillary recruitment during post-occlusive reactive hyperemia (141 ± 9 vs. 155 ± 14 capillaries/mm²; p=0.0001).

Conclusions: Scr induced a reduction of the plasma levels of Hcy in vegan vegetarians, which was greater in individuals presenting with hiperhomocysteinemia. Moreover, there was a correlation between the time of vegetarian diet and plasma levels of Hcy and an inverse correlation between plasma levels of vitamin B12 and Hcy. Scr during three weeks also increased skin capillary perfusion both at rest and after post-occlusive reactive hyperemia. Nevertheless, Scr did not change skin microvascular reactivity, showing that Scr could influence capillary recruitment without changing arteriolar tone.

Key words: creatine supplementation; homocysteine; vegans; vegetarianism; microvascular flow.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da microcirculação	17
Figura 2 - Representação da via de síntese da creatina e os efeitos da suplementação	21
Figura 3 - Representação da via de síntese da metionina/homocisteína.....	23
Figura 4 - Registro do fluxo sanguíneo pela técnica laser speckle contrast imaging	34
Figura 5 - Fluxograma dos pacientes durante cada fase do estudo	39
Figura 6 - Correlação de todos os veganos do estudo em relação aos parâmetros B12 x Hcy, tempo de veganismo x Hcy e tempo de veganismo x B12	42
Figura 7 – Estratificação dos veganos do grupo Scr que apresentaram N-Hcy e HHcy após três semanas de suplementação	43
Figura 8 - Densidade capilar basal e densidade capilar após hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) nos grupos veganos	44
Figura 9 - Recrutamento capilar induzido pela hiperemia reativa pós-oclusiva, expresso em valores absolutos e percentuais nos grupos veganos.....	45
Figura 10 - Efeitos da acetilcolina (ACH) administrada por iontoforese sobre a condutância vascular cutânea	46
Figura 11 - Efeitos da administração de doses crescentes de acetilcolina (ACh) por iontoforese sobre a condutância vascular cutânea.....	47
Figura 12 - Efeitos da hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) no fluxo sanguíneo microvascular: condutância vascular cutânea (CVC)	48
Tabela 1 - Variabilidade temporal (após uma semana) dos parâmetros microvasculares obtidos em voluntários sadios através do uso de fluxometria laser com contraste de imagem.....	36
Tabela 2 – Características obtidas dos voluntários veganos dos grupos placebo e creatina	38
Tabela 3 – Mensurações antropométricas, pressão arterial e frequência cardíaca obtidas em voluntários veganos antes e após a suplementação de três semanas	38
Tabela 4 – Mensurações laboratoriais obtidas em voluntários veganos antes e após a suplementação de três semanas	41
Tabela 5 – Mensuração da homocisteína obtidas nos voluntários veganos dos grupos PLA e Scr que apresentaram níveis elevados antes e após a suplementação de três semanas.....	42
Tabela 6 - Mensuração da homocisteína obtidas nos voluntários veganos dos grupos que apresentaram níveis normais (N-Hcy) e elevados (HHcy) de homocisteína antes e após a suplementação de três semanas com creatina	43

Lista de abreviaturas e siglas

ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
AGAT	Arginina-glicina aminotransferase renal
AUC	Área sob a curva
CK	Creatino Kinase
CVC	Condutância vascular cutânea
DCV	Doenças cardiovasculares
eNOS	Óxido nítrico endotelial
ET-1	Endotelina 1
FC	Frequência Cardíaca
GAMT	Guanidino-metiltransferase hepática
Hb Glic	Hemoglobina glicada
HCM	Hemo. Corpuscular médio
Hcy	Homocisteína
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HHcy	Hiperhomocisteína
HRPO	Hiperemia reativa pós-oclusiva
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
NO	Óxido nítrico
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Protéina C-reativa
PLA	Placebo
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
Scr	Suplementação com creatina
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
UAP	Unidade arbitrária de perfusão
VCM	Volume corpuscular médio
N-Hcy	Normohomocisteinemia
HHcy	Hiperhomocisteinemia
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Hábitos alimentares e Doenças Cardiovasculares.....	11
REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1. Sistema circulatório e doença cardiovascular	14
2.1. Dieta Vegetariana	18
2.2. Deficiência de creatina e Hiperhomocisteinemia.....	19
2.3. Hiperhomocisteinemia e DCV	21
2.4. Vegetarianismo e hiperhomocisteinemia	23
2.5 Protocolos de Suplementação com creatina	25
3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	27
4. OBJETIVOS	29
4.1. Geral	29
4.2. Específicos.....	29
5. METODOLOGIA.....	30
5.1. Indivíduos.....	30
5.2. Desenho da Pesquisa	30
5.3. Medidas Laboratoriais.....	31
5.4. Suplementação oral com creatina e maltodextrina	31
5.5. Avaliação da reatividade microvascular cutânea através de fluxometria com imagens contrastadas de laser speckle	31
5.6. Capilaroscopia por microscopia intra-vital.....	34
5.7. Análise Estatística	35
6. RESULTADOS	36
6.1. Reprodutibilidade da técnica de análise da reatividade microvascular cutânea por LSCI.	36
6.2. Análises das características dos participantes do estudo	36
6.3. Análise das medidas laboratoriais e dos níveis de homocisteína	40
6.4. Avaliação da função microvascular periférica	43
6.4.1. Análise da perfusão capilar por microscopia intra-vital	43
6.4.2. Efeitos da ACh por iontoforese antes e depois da suplementação	45
6.4.3. Resposta microvascular à hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO)	45
7. DISCUSSÃO	49
8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	54
9. CONCLUSÃO.....	55
10. REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO I – Parecer do CEP	73
ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	76
ANEXO III - ANAMNESE.....	78
ANEXO IV – Certificado de Pureza do Suplemento Creatina	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hábitos alimentares e Doenças Cardiovasculares

Nas sociedades modernas, as doenças cardiovasculares (DCV) representam a principal causa de morbidade e mortalidade da população, sendo de alta prevalência em países desenvolvidos e principalmente naqueles em desenvolvimento [1].

Acredita-se que mais de 75% de todas as mortes relacionadas à DCV sejam atribuídas ao infarto agudo do miocárdio e ao acidente vascular cerebral, condições fisiopatológicas que resultam de isquemia tecidual e cuja etiologia depende de aspectos genéticos e ambientais [2].

Neste contexto, após a Revolução Industrial, apesar da redução dos problemas clínicos associados a deficiências nutricionais e doenças infecciosas, observou-se progressiva redução dos níveis de atividade física e aumento na ingestão de alimentos calóricos que contribuem para o desenvolvimento de doenças crônicas como DCV, câncer e diabetes [3].

De fato, são muitas as evidências de que a inatividade física altera a homeostase do organismo e produz alterações metabólicas que contribuem diretamente para resistência à insulina, inflamação crônica e processos degenerativos cardiovasculares e neurológicos que deterioram a qualidade de vida e prejudicam a saúde humana aumentando, aumentando assim o número de mortes causadas por estas doenças ou pela combinação de duas ou mais delas [4-6].

Da mesma forma, o consumo excessivo de calorias provenientes de carboidratos de alto índice glicêmico e gorduras representa uma das mais importantes alterações ambientais que contribuem para epidemia de doenças cardiometabólicas nas sociedades modernas [7].

Nesse sentido, dietas ocidentais são consideradas pró-inflamatórias e pró-aterogênicas, caracterizando-se pela ampla oferta de alimentos de origem animal, grãos refinados, sacarose, sal, gorduras trans ao mesmo tempo em que são extremamente pobres em frutas e vegetais. Estes hábitos alimentares e comportamentais se refletem no aumento de doenças de natureza inflamatória como diabetes, hipertensão, disbiose e demência [8].

Em face do exposto, hábitos alternativos de dieta alimentar têm sido recentemente propostos para reduzir o risco cardiovascular e incluem condutas nutricionais com restrição de calorias e/ou com predomínio de frutas, vegetais, ácidos graxos ômega 3 e azeite de oliva como ocorre na dieta mediterrânea [9], ou de raízes, vegetais, soja e plantas medicinais como a dieta de Okinawa [10].

De forma semelhante, a dieta vegetariana vem sendo implementada há décadas em diferentes culturas e mais recentemente foi associada a terapias para redução dos fatores de risco de DCV como sobrepeso, resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia. De fato, o aumento no número de adeptos desta dieta visa, além do cuidado com os animais, uma forma de melhorar e mudar hábitos alimentares inadequados [11].

Apesar disso, o vegetarianismo também impõe inúmeras restrições de micronutrientes relacionadas à exclusão do consumo de alimentos de origem animal, e os tradicionais efeitos cardio-protetores da dieta tem sido questionados em alguns estudos [12-15]. Neste contexto, deficiências de vitamina B12 e creatina, micronutrientes exclusivamente presentes em alimentos de origem animal, podem induzir alterações fisiopatológicas que elevam o risco cardiovascular, particularmente através do aumento dos níveis plasmáticos de homocisteína, molécula capaz de aumentar o estresse oxidativo vascular e promover disfunção de células endoteliais [16]. Em face deste paradoxo da dieta vegetariana, que por um lado, em comparação com condutas onívoras, se mostra eficaz para aumentar a longevidade humana e reduzir a morbi-mortalidade cardiovascular, e por outro, possibilita paradoxalmente o surgimento de hiperhomocisteinemia (HHcy).

Neste contexto, encontra-se bem evidenciado que a hiperhomocisteinemia compromete a função vascular reduzindo a síntese do óxido nítrico (NO), um gás sintetizado pelos vasos que tem como funções a manutenção da pressão arterial, homeostase do tônus vascular, atividade plaquetária e processos inflamatórios [17, 18].

A hiperhomocisteinemia encontra-se associada a lesões oxidativas e inflamação sistêmica de baixo grau diretamente relacionada a doenças vasculares coronarianas, cerebrais e periféricas podendo neste contexto, contribuir para a perda das funções cognitivas e disfunções renais [19, 20]. Uma vez que a exclusão de produtos de origem animal na dieta de veganos

estritos eleva o risco de hiperhomocisteinemia neste grupo de indivíduos, surge o interesse em investigar os efeitos desta conduta alimentar na função microvascular associando os resultados com parâmetros bioquímicos que avaliem o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Sistema circulatório e doença cardiovascular

O sistema circulatório é dividido nas partes arterial e venosa. Enquanto a primeira é constituída por grandes artérias de condução, vasos de resistência como as pequenas artérias, arteríolas e metarteríolas e de distribuição como os capilares, a segunda é representada pelas veias que possibilitam o retorno de sangue venoso para o coração [21].

Adicionalmente às camadas média e adventícia necessárias respectivamente à manutenção do tônus vascular e fixação tecidual dos vasos, todas as partes do sistema circulatório possuem um conjunto de células que revestem internamente os vasos e se encontra em íntimo contato com o sangue, que é conhecida como endotélio vascular [22].

O endotélio vascular representa um órgão extremamente ativo que apresenta múltiplas funções indispensáveis para homeostasia vascular, cuja importância varia em função da localização no sistema circulatório. Assim, artérias de grande calibre devem preservar suas características de pulsatilidade e condução enquanto arteríolas da microcirculação devem controlar a resistência do fluxo sanguíneo para que sejam atendidas as necessidades metabólicas dos tecidos [23].

Tais características endoteliais são preservadas por intermédio da secreção de substâncias vasoativas que contribuem para o controle do tônus vasomotor, hemostasia do sangue e resposta imune. Neste sentido, o endotélio produz um conjunto de substâncias vasodilatadoras e outro de substâncias vasoconstritoras cujo equilíbrio regula o tônus vascular [24].

As forças geradas pelo fluxo sanguíneo sobre o endotélio são importantes no sentido de permitir liberação contínua de mediadores endoteliais vasoativos e a resposta de vasodilatação dependente mediada por fluxo tem sido descrita em vários leitos vasculares. Em condições fisiológicas normais, o estímulo vasodilatador mediado pelo endotélio prevalece sobre o constritor, mas em estados patológicos a situação pode ser invertida [25].

Neste sentido, a disfunção endotelial é definida como aumento ou diminuição na produção de fatores vasoativos, provocando vasoconstrição ou

vasodilatação anormais, aumento da atividade pró-trombótica e/ ou pró-coagulante além de maior permeabilidade vascular a macromoléculas [26].

Em geral, moléculas vasoconstritoras como a endotelina-1 (ET-1) e o tromboxano predominam na disfunção endotelial juntamente com a redução da disponibilidade de substâncias vasodilatadoras como prostaciclina, fator hiperpolarizante e óxido nítrico (NO), este último, agente vasodilatador e anti-trombótico produzido pela enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) [27].

Doenças como aterosclerose, hipertensão arterial e síndrome metabólica encontram-se diretamente associadas à disfunção endotelial que representa um marco na alteração homeostática vascular característica da DCV. Em geral, a função endotelial é mensurada experimentalmente por métodos que acessam as consequências funcionais da atividade do endotélio, sozinhas ou em complemento com mediadores químicos que modulam a função endotelial [28, 29].

Do ponto de vista clínico, a função endotelial pode ser estimada por modificações no fluxo sanguíneo mensuradas de forma invasiva, mas que tradicionalmente ocorrem de forma não invasiva através de pletismografia por oclusão venosa que é frequentemente realizada através de hiperemia reativa no antebraço do paciente [30]. Mais recentemente, técnicas de avaliação da reatividade microvascular através de sistema de fluxometria laser através de contraste de imagens, permitiram o acesso da capacidade funcional da microcirculação ainda de forma não invasiva, sendo extremamente útil para diagnóstico da disfunção endotelial em portadores de doenças cardiometabólicas [31].

Há mais de 30 anos que já se conhece o papel da célula endotelial na regulação tônus vascular, cujo impacto na manutenção da pressão arterial em humanos é especialmente importante nas arteríolas de resistência com diâmetro inferior a 150 μm e conhecida como microcirculação [32].

As arteríolas encontram-se distribuídas em diferentes níveis do sistema circulatório recebendo denominações igualmente distintas. Localizadas na porção mais proximal, arteríolas de primeira ordem são constituídas por uma espessa camada contínua de músculo liso e à medida que se aproximam das partes mais distais do vaso, originam arteríolas de segunda à quarta ordem que

possuem apenas uma camada descontínua de músculo liso na parede do vaso [22].

Os capilares, por sua vez, possuem diâmetros que variam entre 2 e 9 μm , e apresentam uma única camada de células endoteliais sobre uma membrana basal [33]. São provenientes de ramificações das metarteríolas que podem originar cerca de uma dezena de capilares cada uma, apresentando em suas bifurcações esfíncteres que controlam o fluxo capilar. Tais estruturas, conhecidas como esfíncteres pré-capilares, são também responsáveis por um fenômeno fisiológico de redistribuição do fluxo sanguíneo de um leito capilar a outro (*shunting*) e que colabora decisivamente para nutrição tecidual (figura 1) [34].

Frequentemente o estudo da perfusão de capilares teciduais é realizada através da técnica de capilaroscopia intra-vital, é útil para identificar processos de rarefação capilar presentes em indivíduos hipertensos e diabéticos, e deste modo complementar o diagnóstico de disfunção endotelial [35, 36].

Neste sentido, a identificação da disfunção endotelial e suas consequências negativas sobre a reatividade microvascular e perfusão de capilares, pode representar um fator de risco para doença aterosclerótica. De fato, encontra-se bem evidenciado que a aterosclerose é um processo decorrente da disfunção do endotélio vascular na presença de ambiente pró-aterogênico representado por estresse oxidativo, aumento dos níveis de colesterol total e LDL e redução dos níveis de colesterol HDL [37].

Embora esse fenômeno ocorra predominantemente nas áreas de bifurcação de artérias de condução, poderá existir em qualquer leito vascular desde que coexistam disfunção endotelial e ambiente vascular pró-aterogênico. Neste sentido, são muitas as evidências de que alterações glicêmicas, dislipidemias e também aumentos crônicos da pressão arterial podem contribuir para o desenvolvimento da placa de ateroma e remodelagem vascular que modifica a morfologia e função do leito acometido repercutindo negativamente na condução do fluxo sanguíneo [33].

Diante das evidências de que a função endotelial é indispensável para homeostasia e saúde vascular, muitos estudos tem investigado o impacto da dieta moderna sobre a inflamação e doença arterial e arteriolar cuja prevalência é bastante elevada nas sociedades urbanas [38].

Se considerarmos que a disfunção endotelial e o desenvolvimento da aterosclerose encontram-se parcialmente associados à ingestão alimentar excessiva de gorduras e carboidratos refinados de alta carga glicêmica, dietas baseadas em vegetais e com exclusão de carnes, têm sido consideradas alternativas mais saudáveis ao sistema cardiovascular. Tais procedimentos nutricionais também disponibilizam grandes quantidades de polifenóis derivados das plantas que podem exercer importante efeito neutralizador do estresse oxidativo inerente à disfunção endotelial [39].

Neste contexto, indivíduos que adotam dietas vegetarianas apresentam risco significativamente mais reduzido para desenvolvimento de DCV [40], apresentando em relação a onívoros, menor mortalidade por doença cardíaca isquêmica além de menor incidência de diabetes mellitus tipo 2 [11].

Em relação à média da população onívora, vegetarianos apresentam menores níveis de inflamação vascular, proteína C reativa e exibem melhor sensibilidade à insulina e menores níveis pressóricos que coletivamente contribuem para melhorar a saúde do organismo [41].

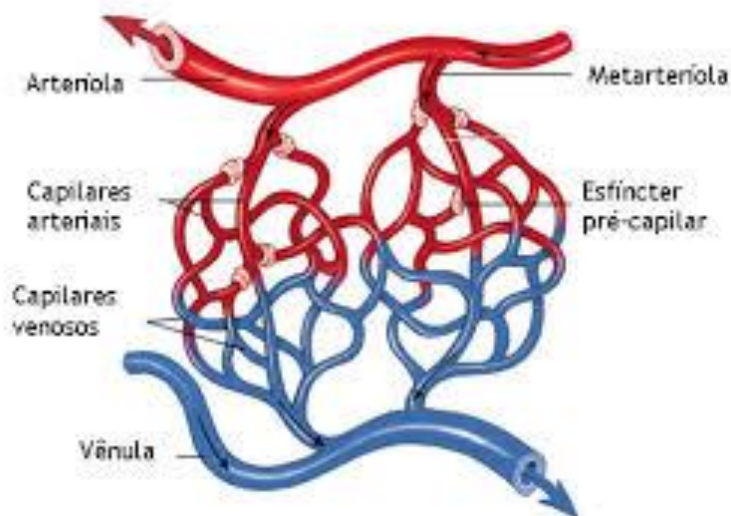


Figura 1: Representação esquemática da microcirculação (The McGraw-Hill Companies, Inc).

2.1. Dieta Vegetariana

A dieta vegetariana é uma conduta alimentar que objetiva a exclusão do consumo de carnes e da maioria dos produtos de origem animal [42]. Tal comportamento emerge de diferentes interesses e motivações e quase sempre incluem benefícios à saúde além de crenças espirituais e conceitos éticos como a preservação ambiental e o respeito à vida de outros animais [43, 44].

Neste sentido, estima-se que a proporção de vegetarianos na população mundial esteja entre 1-10%, tendo países com maior porcentagem a Índia (40%), Alemanha (9%), Israel (8,5%), Canadá (8%), Brasil (8%), Austrália e EUA (3%) [43].

De acordo com grandes estudos como o *Adventist Health Study* [45], *Oxford Vegetarian Study* [46], *Health Food Shoppers Study* [47] e *Heidelberg Study* [48], vegetarianos tendem a apresentar menor índice de massa corporal e risco mais reduzido de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas, além de maior longevidade em relação a onívoros [49].

Diferentemente da dieta ocidental moderna, aquelas de natureza vegetariana possuem menor conteúdo de calorias, gorduras saturadas e colesterol e maiores quantidades de fibras, magnésio, potássio, vitaminas C e E, folato, carotenoides, flavonoides e outros fitoquímicos que coletivamente colaboram para reduzir o risco de dislipidemia e aterosclerose [50]. De fato, vegetarianos, em relação a onívoros, apresentam menor incidência de hipertensão arterial e níveis séricos mais reduzidos de colesterol total e LDL [42].

Entretanto, apesar do menor consumo de nutrientes considerados aterogênicos e da maior oferta de micronutrientes que colaboram para exercer efeitos antioxidante e anti-inflamatório vascular, dietas vegetarianas, em especial aquelas de característica vegana, apresentam também deficiência de outros nutrientes indispensáveis e quase exclusivamente presentes em alimentos de origem animal [51].

Apesar de não existirem evidências de que dietas vegetarianas exerçam efeito adverso à saúde humana, condutas alimentares que privam o organismo de micronutrientes essenciais podem contribuir, em longo prazo, para alterações da fisiologia normal [52]. Neste sentido, algumas condutas nutricionais vegetarianas podem apresentar graves deficiências de metionina,

vitaminas D e B-12 além de zinco, ferro, iodo, cálcio e ácidos graxos ômega-3 [11, 53, 54].

Além disso, indivíduos vegetarianos também apresentam carência de substâncias como carnosina e creatina, predominantemente encontradas no músculo de animais [55]. Neste sentido, a carência de creatina na dieta quando associada à frequente deficiência de vitamina B-12 verificada entre veganos, tem sido considerada fator de risco para hiperhomocisteinemia e disfunção do endotélio vascular [56].

Assim, aumentos crônicos da homocisteína plasmática resultante da privação de alimentos de origem animal, poderiam colaborar, juntamente com outras deficiências nutricionais características da dieta vegana, para inflamação e disfunção do endotélio vascular. Mesmo assim, em virtude da dificuldade de investigação não invasiva da função endotelial, poucos estudos foram realizados para esclarecer esta questão nos vasos de condução e principalmente nos vasos de resistência da microcirculação aonde o acesso é ainda mais restrito.

Apesar disso, conforme mencionamos anteriormente, tecnologia recente de análise de imagens de contraste obtidas por fluxometria laser [31], poderiam representar importante ferramenta de avaliação da função endotelial microvascular de vegetarianos ou de indivíduos que compulsoriamente ou não, restringem certos nutrientes de sua alimentação [57].

2.2. Deficiência de creatina e Hiperhomocisteinemia

Apesar da hiperhomocisteinemia estar tradicionalmente associada a deficiência de vitamina B-12 na dieta, a carência de creatina também colabora para elevar os níveis desta molécula e com isso, exercer impacto pró-inflamatório e prejudicial à função endotelial [58].

A creatina é um tripeptídeo sintetizado à partir dos aminoácidos L-arginina, L-glicina e L-metionina encontrado exclusivamente em carnes de origem animal. No organismo humano, a quantidade de creatina varia entre 120g e 160g estando predominantemente armazenada nos músculos esquelético e cardíaco (95% do estoque total), mas também no tecido nervoso. Apesar disso, cerca de 40% do estoque total de creatina pode ser encontrado em sua forma livre enquanto os outros 60% são fosforiladas para sintetizar a

fosfocreatina, uma importante molécula responsável pela síntese rápida de energia intracelular [59].

Nas últimas duas décadas, o uso de suplementos de creatina vem aumentando entre praticantes de musculação e atletas de diferentes modalidades esportivas [60-63] e mais recentemente, também se estendeu para atender objetivos terapêuticos em doenças metabólicas, do músculo esquelético e neurodegenerativas [64, 65]. Neste contexto, a suplementação com creatina (Scr) tem se mostrado eficaz contra processos inflamatórios provocados pelo exercício extenuante em humanos, já que é capaz de atenuar o consequente aumento de citocinas pró-inflamatórias [63, 66].

Em geral, cerca de 1 g diário de creatina é obtida através da dieta e outra 1 g através da síntese endógena em processo que envolve as enzimas arginina-glicina aminotransferase (AGAT) renal e a guanidino-metiltransferase hepática (GAMT) [67]. No processo de síntese endógena de creatina, o grupamento amidino da arginina é transferido para glicina pela ação da AGAT a fim de originar o composto guanidinoacetato. Este por sua vez, é secretado para circulação sistêmica para que seja metilado no fígado pela GAMT em processo dependente da S-adenosilmetionia (SAM), molécula formada a partir da metionina e capaz de doar o grupamento metil para o guanidinoacetato e originar a molécula de creatina. Ao perder o grupamento metil, a SAM origina a molécula de S-adenosilhomocisteína (SAH) que metabolicamente será convertida em homocisteína (figura 2) [68].

Como a síntese endógena de creatina reduz a disponibilidade hepática de SAM, a Scr também tem sido considerada importante recurso para reduzir a demanda de processos de metilação hepática bem como a síntese de homocisteína. Além disso, a Scr parece capaz de aumentar a disponibilidade de L-arginina para outros processos metabólicos, como por exemplo, para síntese de óxido nítrico [17, 69, 70].

Neste sentido, tem sido proposto que a deficiência de creatina na dieta é capaz de promover aumento da demanda dos processos de síntese endógena da creatina, sobrecarga de reações de metilação e consequente síntese de homocisteína. De fato, a deficiência de creatina, quando associada à deficiência de vitamina B12 pode ser o principal fator responsável pelos

aumentos crônicos dos níveis de homocisteína verificados entre vegetarianos e principalmente naqueles que adotam dietas estritas veganas.

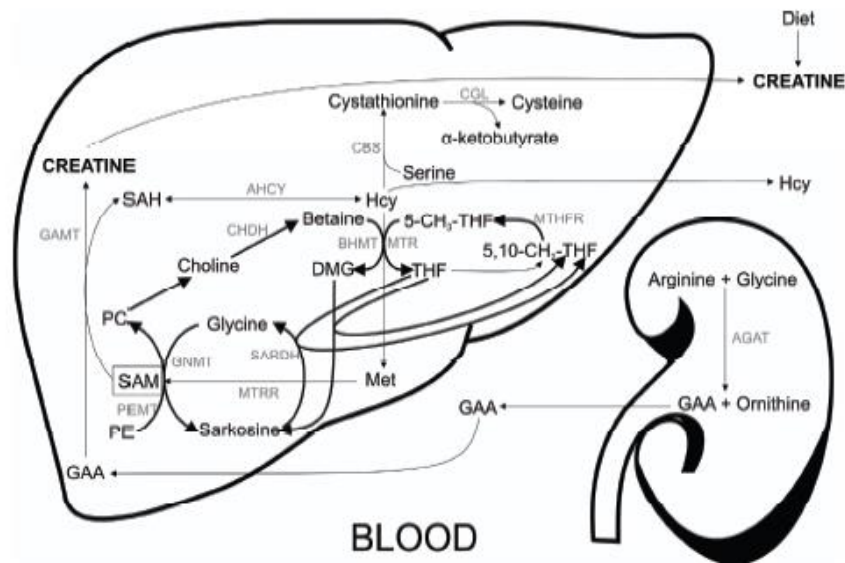


Figura 2. Representação da via de síntese da creatina e os efeitos da suplementação que leva à inibição da síntese endógena nos rins e fígado. GAA, guanidinoacetato; AGAT, arginina-glicina amidinotransferase; GAMT, guanidinoacetato N-metiltransferase; SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosilhomocisteína; Hcy, homocisteína (Petr, Steffl and Kohlikova, 2013).

2.3. Hiperhomocisteinemia e DCV

A homocisteína (Hcy) é uma molécula que contém tiol, sendo formada a partir do aminoácido essencial L-metionina, do ATP e da enzima S-adenosilmetiltransferase. Em condições fisiológicas normais, essa substância pode sofrer transulfuração para, através da ação da enzima cistationina sintetase, e em reação dependente de vitamina B6, formar cisteína. Alternativamente, a Hcy pode ser remetilada a metionina em processo que requer vitamina B12 e folato como co-fatores (figura 3) [71, 72].

O excesso de Hcy sérica é conhecido como hiperhomocisteinemia (HHcy), e representa fator de risco independente para doenças cardiovasculares exercendo impacto semelhante ao proposto para o tabagismo, hipertensão arterial e dislipidemia [73]. Níveis séricos muito elevados de Hcy inibem o crescimento de células endoteliais, reduzem a disponibilidade de NO e promovem desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase endotelial transformando-a em produtora de espécies reativas de

oxigênio (ROS), que exercem efeitos deletérios sobre a manutenção da hemostasia e do tônus vascular [17].

Vários estudos já demonstraram que a hiperhomocisteinemia moderada contribui para aumentar o risco de desenvolvimento de DCV [74, 75]. Neste contexto, acredita-se que para cada aumento de 5 $\mu\text{mol/l}$ na homocisteinemia, eleva-se o risco de DCV em 60% para homens e 80% para mulheres [76, 77]. São muitas as evidências de que excessos de homocisteína no sangue prejudicam a capacidade de dilatação dependente de endotélio nos vasos de resistência coronarianos em mecanismo provavelmente associado ao maior estresse oxidativo [78-80].

De fato, estudos *in vitro* sugerem que o excesso de homocisteína, além de danificar diretamente as células endoteliais e reduzir a biodisponibilidade de NO, aumenta também a proliferação das células do músculo liso vascular e contribui para rigidez arterial [81-83]. Em seres humanos, a hiperhomocisteinemia exerce efeito pró-trombótico [79] e contribui diretamente para prejuízos na reatividade vascular conforme demonstrado através de reduções na resposta de vasodilatação mediadas por fluxo na artéria braquial [84, 85].

Como a hiperhomocisteinemia encontra-se associada a doenças vasculares coronarianas, cerebrais e periféricas [19, 20], estudos clínicos e experimentais têm sugerido que a Scr, por reduzir a demanda de metilação envolvida na síntese endógena da creatina, seja capaz de, em conjunto com a suplementação com vitamina B-12 ou mesmo isoladamente, reduzir os níveis de homocisteína e melhorar a função vascular de portadores de doenças cardiometabólicas [65, 71, 86, 87].

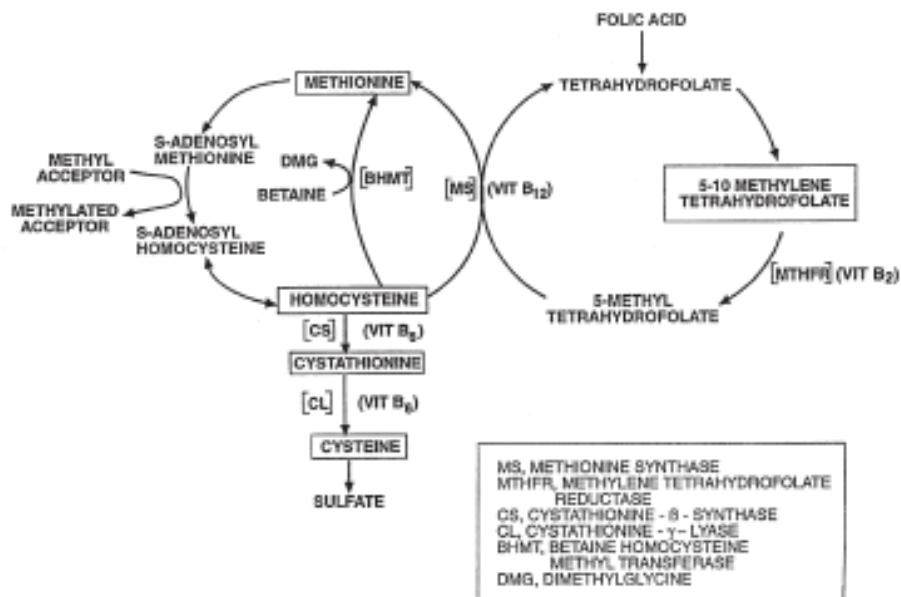


Figura 3. Representação da via de síntese da metionina/homocisteína. (Kaul, Zadeb and Sha, 2006).

2.4. Vegetarianismo e hiperhomocisteinemia

Apesar de determinantes genéticos serem os principais moduladores dos níveis de homocisteína no plasma, fatores nutricionais também são importantes na medida em que o nível total de homocisteína plasmática é inversamente relacionado com os níveis plasmáticos de B12, B6 e folato [88, 89].

Como o consumo de metionina é frequentemente insuficiente entre vegetarianos, a remetilação da homocisteína representa a principal rota de metabolização dessa molécula neste grupo de indivíduos. Entretanto, veganos também apresentam deficiência no aporte nutricional de vitamina B12, tornando a rota de metilação disfuncional em processo que contribui para aumentos significativos de homocisteína no plasma [90].

De fato, vegetarianos representam grupo de risco para deficiência de B12 e hiperhomocisteinemia [91, 92]. Neste sentido, entre vegetarianos, grupos veganos são aqueles que apresentam os maiores níveis séricos de homocisteína e a maior prevalência de hiperhomocisteinemia [93].

Excluindo algumas algas [94], a vitamina B12 é encontrada quase exclusivamente em ovos, leite e, principalmente proteínas de origem animal estando, portanto ausente em dietas veganas [95]. Neste sentido, encontra-se bem evidenciado que veganos necessitam de suplementação dietética que

previna a redução dos níveis de B12 no organismo e suas consequências sobre a remetilação da homocisteína [95].

Além disso, por não ingerirem nenhum tipo de produto de origem animal, veganos também apresentam deficiência de creatina. Tal condição contribui para sobrecarga hepática dos processos de metilação e conforme descrito anteriormente, potencializa a condição de hiperhomocisteinemia [71, 96].

Assim, diante da deficiência alimentar de B12 e creatina e os consequentes aumentos da homocisteína sérica, veganos apresentam fator de risco para disfunção endotelial. Paradoxalmente, estes indivíduos também possuem menor morbidade e mortalidade por DCV em efeito que provavelmente encontra-se associado à restrição de calorias, melhor controle glicêmico, lipídico e ao consumo de substâncias antioxidantes e com menor potencial inflamatório [12].

Depreende-se do exposto que a presença de disfunção no endotélio vascular promovida pela hiperhomocisteinemia pode ser contrabalançada por ambiente vascular antioxidante e com menores níveis de colesterol total e LDL que são característicos de indivíduos veganos. Por outro lado, como a deficiência de creatina exacerba a hiperhomocisteinemia e a Scr parece eficaz em reduzir a demanda de metilação hepática, é possível que esta conduta antagonize os efeitos vasculares deletérios da hiperhomocisteinemia presente em veganos.

Neste contexto, poucos estudos investigaram os efeitos da Scr sobre a reatividade vascular na microcirculação, um leito vascular especializado para a nutrição tecidual e remoção de produtos do metabolismo celular [33, 34]. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a suplementação com 20 g/dia de creatina monohidratada durante uma semana em indivíduos jovens com baixo risco cardio-metabólico, é suficiente para melhorar a densidade e perfusão de capilares teciduais e aumentar a resposta de vasodilatação mediada por fluxo na microcirculação [87]. Tais resultados reforçam o potencial anti-inflamatório e antioxidante da creatina, mas não esclarecem se a Scr é capaz de reduzir os níveis de homocisteína cronicamente elevados em veganos e reverter eventuais prejuízos na função vascular.

2.5 Protocolos de Suplementação com creatina

A creatina desempenha um importante papel no fornecimento de energia rápida durante a contração muscular, pois participa da transferência de energia durante a ressíntese do ATP através de uma reação reversível catalizada pela creatino kinase [97].

Já foram descritos inúmeros protocolos de suplementação com creatina, sendo os mais comuns aqueles que utilizam uma fase de saturação com 20g/dia durante 1 semana seguidos de outra fase de manutenção no qual são ingeridos 5g/dia durante 3 semanas [98].

Em estudo recentemente publicado, nosso grupo implementou a fase de saturação (20g/dia por 1 semana) em jovens saudáveis observando após o período de suplementação aumentos do peso, IMC e melhorias da perfusão capilar [87]. Outro estudo utilizando o mesmo protocolo observou aumentos de 20% na concentração de creatina no músculo e na ressíntese da fosfocreatina após o período de suplementação [99].

Loon, e colaboradores [98] utilizaram o protocolo padrão de Scr com 20g/dia por 5 dias e 2g/dia por 6 semanas estendendo o período de manutenção por mais 3 semanas e comparando os resultados com o grupo placebo que utilizou maltodextrina. Eles observaram que durante os 5 dias de suplementação houve aumentos significativos na creatina livre e total intramuscular, que entretanto, diminuiu após 6 semanas. Mesmo assim, observou-se que melhoras na performance durante sprints de 12 segundos e os aumentos de massa magra eram preservados ao longo do estudo.

Protocolos de Scr com doses entre 5 e 20g também já foram envolvidos na melhora do perfil lipídico contribuindo para reduções nos níveis de colesterol, LDL, triglicérides [87, 100-103]. Apesar disso, Gualano e colaboradores [104] utilizando protocolo padrão de 0,3g/dia por 7 dias mais 0,15g/dia por 11 semanas, observaram em indivíduos jovens e sedentários que após 3 meses de Scr não havia alterações no perfil lipídico, mesmo com o incremento do treinamento aeróbio moderado.

Estudos com protocolos mais longos de Scr também já foram realizados em portadores de diferentes condições fisiopatológicas. Neste sentido, 16 semanas de Scr (20g por 5 dias e 5g por 37 dias) em 15 indivíduos com fibromialgia promoveu aumentos na concentração da fosfocreatina muscular, e

melhora na função contrátil dos membros superiores e inferiores além de redução nos distúrbios do sono causado pela doença [97].

Uma revisão acerca dos efeitos da creatina pontuou os efeitos positivos no aumento da massa magra e na força máxima com uma redução no acúmulo do lactato e conseqüentemente um prolongamento da atividade utilizando um protocolo de 20g/dia por 7 dias [105]. Porém, outros dois estudos usando um volume menor de creatina (5g/dia por 7 dias) e usando o treinamento de força observaram aumentos na força muscular e no volume de treino em 14% e 8% respectivamente comparando com o placebo [106, 107].

Suplementações utilizando doses mais moderadas de creatina (5g/dia por 3 semanas) mostraram melhorias nos testes de força no handgrip e redução da concentração do lactato após a Scr [108]. Já a Scr em jovens com distrofia muscular por 3 meses com 3g/dia comparando com placebo usando maltodextrina na mesma dosagem, observou melhoras na contração muscular voluntária máxima e aumento na densidade mineral óssea após o período de suplementação [109].

Neste sentido, Hultman, e colaboradores [110] sugerem que os aumentos do peso e IMC encontrado na maioria dos estudos deve-se a retenção hídrica provocada pelo aumento da osmolaridade celular e associada à elevação de creatina intramuscular após Scr. Por outro lado, Lugaresi e colaboradores [111] observaram o efeito de 12 semanas de suplementação com creatina, sendo a primeira semana 20g por dia e nas semanas seguintes 5g apenas, em praticantes de treinamento de força com dieta rica em proteína sobre os níveis de creatinina e função renal. Eles observaram que as 12 semanas de suplementação associado a uma dieta hiper-proteica não afetava a função renal.

Um protocolo mais longo utilizando a Scr padrão (20g/dia por 1 semana e 5g/dia por 23 semanas) foi usado em mulheres na fase da menopausa e submetidas treinamento de força. Em comparação com grupo placebo observou-se aumento na massa magra, porém sem melhorias na função muscular e densidade óssea [112].

3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Tendo em vista que vegetarianos não obtém creatina proveniente da dieta, este grupo de indivíduos apresenta-se também com risco de desenvolver hiperhomocisteinemia. De fato, por não consumirem proteínas de origem animal, privam-se de pelo menos dois nutrientes importantes representados pela creatina e pela vitamina B12 que colaboram em conjunto ou isoladamente para o acúmulo de homocisteína no sangue.

Apesar da suplementação com vitamina B12 ser um procedimento relativamente popular entre vegetarianos, a suplementação com creatina não compartilha da mesma popularidade e poucos indivíduos realizam suplementação com este tripeptídeo para atenuar a hiperhomocisteinemia, condição que muitos sequer possuem o adequado conhecimento.

Conforme mencionado anteriormente, demonstramos recentemente que a suplementação com creatina é capaz de aumentar a perfusão microvascular cutânea em indivíduos jovens e fisicamente ativos, sugerindo efeito biológico da creatina sobre a função microvascular [87]. Neste estudo preliminar, observamos que a suplementação oral com creatina (20 g/dia) durante um semana aumenta a densidade e o recrutamento capilar, assim como aumenta a reatividade microvascular sistêmica dependente de endotélio.

Paralelamente, nosso grupo encontra-se envolvido nos últimos três anos na caracterização das influências da dieta vegetariana sobre a função microvascular constatando que estes indivíduos apresentam reatividade microvascular dependente de endotélio significativamente menor que onívoros e diretamente associada com a deficiência de vitamina B12 no plasma e hiperhomocisteinemia.

Como avaliação da reatividade microvascular sistêmica tem mostrado ser essencial na investigação de patologias de doenças cardiovasculares e metabólicas [113]. Além disso, a microcirculação cutânea é considerada agora como uma forma acessível e representativa de avaliação da reatividade e densidade microvascular sistêmica [113, 114]. Neste contexto, o laser speckle contrast imaging (LSCI) apresenta uma abordagem inovadora para a avaliação da função endothelial microvascular sistêmica de forma não invasiva [114, 115]. LSCI já demonstrou ser uma técnica não invasiva de avaliação da reatividade microvascular sistêmica em pacientes que apresentam doenças

cardio-metabólicas [115]. Além do mais, a densidade e reatividade capilar, e a perfusão tecidual, são conhecidas por estarem diretamente associada com doenças cardiovasculares e metabólicas, incluindo hipertensão, diabetes, obesidade e a síndrome metabólica [36, 116, 117].

Considerando que vegetarianos não são capazes de obter creatina da dieta e que a ausência desse nutriente colabora para agravar a hiperhomocisteinemia e considerando as evidências de que a Scr é capaz de atenuar a hiperhomocisteinemia em seres humanos, nosso grupo decidiu investigar os efeitos da suplementação com creatina sobre a reatividade microvascular dependente de endotélio.

Este estudo trará benefícios para a comunidade de vegetarianos que necessitam de mais informações acerca da carência de nutrientes sobre a saúde vascular, que como sabemos apresentam, paradoxalmente, menor risco de desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares. As conclusões deste estudo contribuirão também para o aumento do acervo de conhecimentos existentes sobre a microcirculação e vegetarianismo, o que por si só já representa um avanço científico.

Visto que se desconhece o impacto da Scr em indivíduos vegetarianos estritos, em especial aqueles portadores de hiperhomocisteinemia, em face do exposto, o presente estudo pretende investigar o efeito deste procedimento sobre a homocisteinemia e a reatividade microvascular deste grupo de indivíduos.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Investigar o efeito da suplementação com creatina sobre a reatividade microvascular sistêmica e sobre os níveis plasmáticos de homocisteína em indivíduos vegetarianos estritos.

4.2. Específicos

- Identificar as alterações na função endotelial microvascular sistêmica resultante da suplementação com creatina em indivíduos vegetarianos veganos hiperhomocisteinêmicos ou normohomocisteinêmicos, suplementados com creatina ou placebo, através da técnica de fluxometria microvascular cutânea;
- Descrever as alterações séricas de homocisteína, além de outros marcadores clínicos em veganos hiperhomocisteinêmicos ou normohomocisteinêmicos antes e após suplementação com creatina ou placebo;
- Identificar o efeito da suplementação com creatina sobre a perfusão capilar cutânea em indivíduos veganos hiperhomocisteinêmicos ou normohomocisteinêmicos suplementados com creatina ou placebo.

5. METODOLOGIA

5.1. Indivíduos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), anexo I, do Instituto Nacional de Cardiologia do Rio de Janeiro em setembro de 2012 (CAAE 02471512.4.0000.5272). O estudo foi tornado público através de registro na base de dados do *ClinicalTrials.gov* (registro # NCT02961972). Uma vez considerados elegíveis, todos os voluntários leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo CEP (Anexo II).

Os voluntários veganos estritos de ambos os sexos foram recrutados através de redes sociais e comunidades de vegetarianos localizadas no Rio de Janeiro e randomicamente alocados nos grupos de suplementação com creatina (SCr, n=27) ou placebo (PLA, n=18). O critério para a alocação foi pela ordem de chegada dos voluntários ao local, sendo padronizada a entrega dos suplementos iniciando com a creatina e o segundo com placebo e assim sucessivamente. Foram incluídos indivíduos veganos estritos que não suplementavam a dieta com creatina ou vitamina B12 e que não fizessem uso de medicamentos que alterem a reatividade vascular.

5.2. Desenho da Pesquisa

Todas as avaliações foram feitas pela manhã, entre 8 e 12 horas, após 12 horas de jejum. Também foi solicitado aos voluntários que se abstivessem de fumar e ingerir bebidas com cafeína ou álcool no período de 12 horas antes do estudo. Todos os procedimentos seguiram a mesma sequência, começando com a coleta das amostras de sangue, seguida por uma avaliação clínica e física e concluindo com a avaliação da microcirculação por Fluxometria de Laser Speckle (*laser speckle contrast imaging*, LSCI) e vídeo-capilaroscopia intravital. Os mesmos procedimentos foram repetidos após três semanas de suplementação com creatina.

A avaliação antropométrica foi feita através da obtenção das medidas de peso, altura (balança filizola com estadiômetro, São Paulo, Brasil) e cálculo do índice de massa corporal (kg/m^2) utilizando a fórmula do peso/altura². A pressão arterial sistólica, diastólica e média foi determinada usando um

esfigmomanômetro. A pressão braquial sistólica (PBS) e diastólica (PBD) foi medida duas vezes, com 1 minuto de intervalo, usando um esfigmomanômetro de mercúrio, e a pressão média registrada como a pressão clínica do indivíduo. A pressão arterial média (PAM) foi calculada como $PBD + 1/3 (PBS-PBD)$.

A obtenção de dados como tipo de vegetarianismo, tempo de dieta (em anos), prática ou ausência de atividade física e a regularidade foram feitas pela anamnese entregue no momento em que o voluntário iniciava os procedimentos em nosso laboratório (anexo III).

5.3. Medidas Laboratoriais

Amostras de sangue foram colhidas antes e depois de três semanas de suplementação com creatina ou placebo e entregues ao serviço de patologia clínica do Instituto Nacional de Cardiologia, para as análises dos seguintes elementos: glicemia de jejum, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicerídeos, creatinina, ácido úrico, transaminases, vitaminas B12 e D, ácido fólico, creatino quinase (isoformas muscular esquelética e cardíaca), ureia, lactato desidrogenase, hormônios tireoidianos, sódio, cálcio, magnésio e potássio, proteína C-reativa e homocisteína.

5.4. Suplementação oral com creatina e maltodextrina

Os voluntários do grupo suplementado com creatina receberam 5 g diárias de creatina monohidratada micronizada com 99% de pureza (Biomed, Rio de Janeiro, Brasil – Anexo IV), durante três semanas, em protocolo utilizado para elevar os níveis de creatina intramuscular [62, 118]. Já os voluntários do grupo suplementado com placebo, receberam 5 g por dia de maltodextrina (Bioderm, Farmácia de Manipulação, Rio de Janeiro, Brasil) pelo mesmo período de tempo [119]. Os procedimentos de monitoramento e controle da suplementação foram feitos através de ligações semanais que ocorriam duas vezes na semana, sendo feito o registro do cumprimento da suplementação em cada semana.

5.5. Avaliação da reatividade microvascular cutânea através de fluxometria com imagens contrastadas de laser speckle

Os testes microcirculatórios foram executados após um repouso de 20 minutos em posição de decúbito dorsal, em ambiente com temperatura

controlada ($23\pm 1^\circ\text{C}$). A reatividade microvascular foi avaliada através de sistema de imagens contrastadas por LSCI com comprimento de onda de 785 nm (PeriCam PSI system, Perimed, Järfälla, Suécia) em combinação com iontoforese de acetilcolina (ACh) para uma medição contínua e não invasiva nas alterações da perfusão microvascular cutânea. Os valores foram expressos em unidades arbitrárias de perfusão (UAP) [28, 115].

LSCI é uma tecnologia desenvolvida recentemente, baseada na análise do contraste de granulação de raios laser de baixa intensidade (*laser speckle contrast analysis*, LASCA), que fornece um índice de fluxo sanguíneo microvascular [120]. A teoria do LASCA é fundamentada no seguinte princípio: quando um objeto é iluminado por um feixe de luz coerente, tal como o feixe de luz laser, a luz sofrerá uma dispersão em uma coleção de partículas distribuídas de maneira aleatória, produzindo então um padrão de interferência aleatória conhecido como padrão de dispersão ou granulação (*speckle* em inglês), que consiste em um conjunto de áreas claras e escuras [121]. Se o objeto iluminado estiver imóvel, o padrão de dispersão será estático, ou seja, sem contrastes. Por outro lado, quando existir movimento no objeto, tal como o movimento das hemácias no tecido, o padrão de dispersão vai se modificar ao longo do tempo. O nível da granulação das imagens vai variar em proporção à intensidade do movimento; quanto mais rápido for o movimento maior será o grau de granulação. Finalmente, o nível de granulação vai ser quantificado através da aquisição de imagens, utilizando as medidas de variações de intensidade espaciais no padrão de granulação, criando então mapas das variações relativas de fluxo sanguíneo [121, 122].

Quanto à iontoforese, trata-se de uma técnica que pode ser usada para o transporte de drogas ionizadas através da pele íntegra. A técnica é baseada no princípio de que um potencial elétrico vai fazer com que íons em solução migrem através da pele de acordo com suas cargas elétricas [120].

A taxa de aquisição de imagens foi de 8 imagens por segundo e a distância entre a cabeça do laser e a superfície da pele, fixada em 20cm conforme recomendado no manual do fabricante sendo todas as imagens analisadas através de software fornecido pelo fabricante (PIMSoft, Perimed,

Järfälla, Suécia). Os pontos da pele para o registro do fluxo microvascular foram escolhidos aleatoriamente na superfície ventral do antebraço, evitando pelos, lesões e áreas de hiperpigmentação cutânea e veias visíveis para adequada fixação de eletrodo-adesivo de administração de ACh (LI 611, Perimed, Järfälla, Suécia) em área de aproximadamente 80 mm².

Outra área de dimensão semelhante adjacente ao eletrodo foi selecionada para avaliação da hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO). Uma almofada de vácuo (AB Germa, Kristianstad, Suécia) foi usada para reduzir o registro de interferências gerado por eventuais movimentos do braço. A iontoforese de ACh 2% p/v (Sigma Chemical CO,MO, EUA) foi executada usando o sistema de microfarmacologia (PF 751 Perilont USB Power Supply, Perimed, Suécia) com corrente anódica crescente de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 uA em períodos de 10 segundos separados por um intervalo de 1 minuto (as cargas totais foram de 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 e 1.8 mC, respectivamente) (figura 5).

O eletrodo de dispersão foi posicionado a aproximadamente 15 cm da câmara de iontoforese. Durante o teste HRPO, a oclusão arterial foi feita com pressão suprasistólica (50 mmHg acima da pressão arterial sistólica) usando um esfigmomanômetro por 3 minutos. Seguindo a retirada da pressão, o fluxo máximo foi medido. Medidas do fluxo sanguíneo cutâneo foram divididas pela pressão arterial média para calcular a condutância vascular cutânea (CVC) em UAP/mmHg. A amplitude das respostas HRPO foi expressa pelo pico de CVC menos o CVC basal.

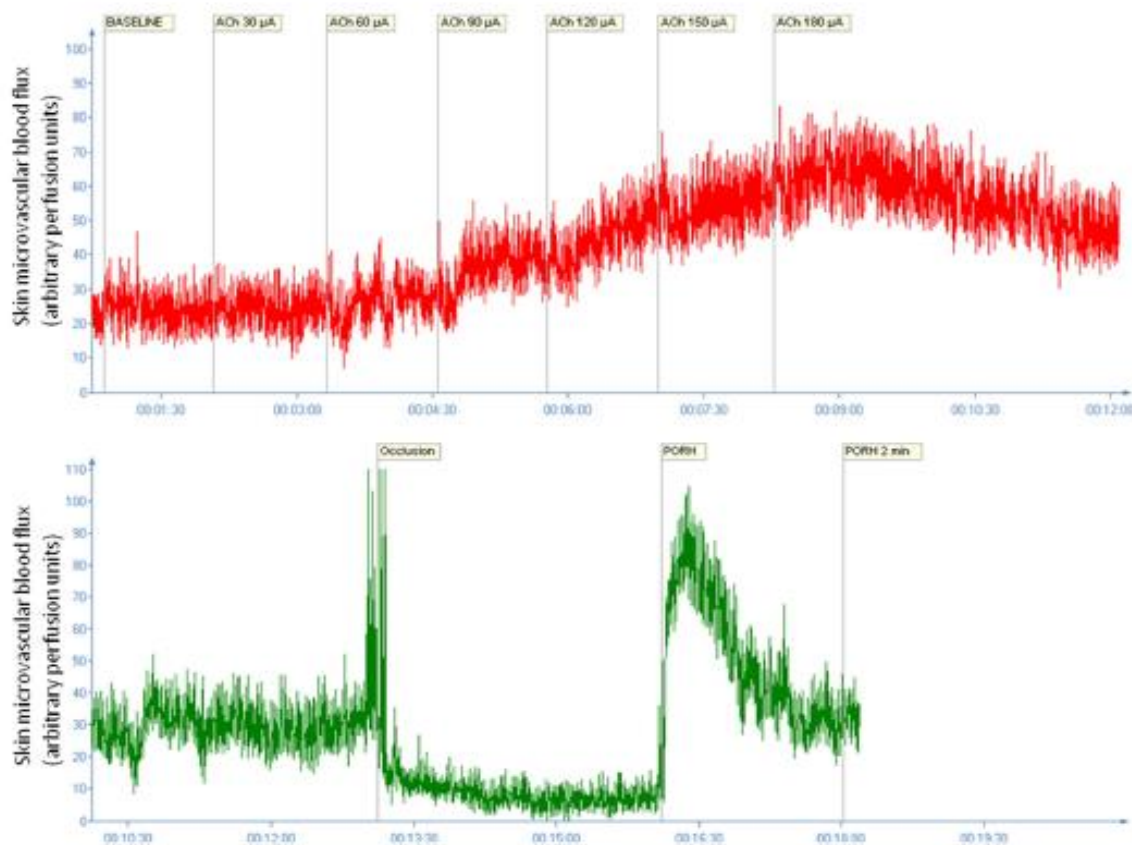


Figura 4. Registro do fluxo sanguíneo pela técnica de laser *speckle contrast imaging* durante a aplicação de 2% de Ach por iontoforese usando aumentos na corrente de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 μA durante 10 segundos de intervalo entre uma dose e outra. Abaixo o gráfico representa a hiperemia reativa pós-oclusiva (Cordovil, et al. 2012).

5.6. Capilaroscopia por microscopia intra-vital

A densidade capilar cutânea média, ou seja, o número de capilares por mm^2 de pele dos pacientes foi avaliada através de microscopia intravital de alta resolução em cores (Moritex, Cambridge, UK), utilizando um sistema de video-microscopia com objetiva de imersão equipada de sistema de epi-iluminação, na pele do dorso da segunda falange do dedo médio da mão não dominante, tal como foi descrito detalhadamente por Antonios e colaboradores [123].

A aquisição assim como o registro em disco e posterior análise das imagens foi realizada através de sistema integrado semi-automático (Microvision Instruments, Evry, France). A contagem do número total de capilares por campo microscópico (1 mm^2) foi realizada através de programa de análise de imagens semi-automático calibrado previamente (Saisam, Microvision Instruments, Evry, France). A densidade capilar média de cada

paciente foi obtida pelo cálculo da média aritmética do número de capilares contados em três campos microscópicos contíguos. A diferenciação entre as alterações funcionais e estruturais envolvidas na redução da densidade capilar dos pacientes foi realizada através da utilização das técnicas descritas previamente [36, 123-125]

5.7. Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Para valores que não seguirem uma distribuição Gaussiana, as medianas (25^o - 75^o percentis) foram apresentadas (teste de normalidade *Shapiro-Wilk*). O teste de análise para comparar os grupos antes e após a suplementação com creatina ou placebo foi o teste t de Student não pareado bicaudal para dados paramétricos ou o teste *Mann-Whitney* para dados não paramétricos.

Para avaliar se haveria alguma relação entre os níveis plasmáticos de B-12 e homocisteína; tempo de dieta e B12 e tempo de dieta e homocisteína, foi usado o teste de correlação de *Spearman* para variáveis não paramétricas. A hipótese nula foi rejeitada em $p < 0,05$, sendo considerados estatisticamente significantes.

6. RESULTADOS

6.1. Reprodutibilidade da técnica de análise da reatividade microvascular cutânea por LSCI.

Com o intuito de testar a reprodutibilidade da técnica de fluxometria através de LSCI, investigamos a resposta de vasodilatação mediada por acetilcolina em estudo piloto com oito voluntários com idade média de 33 ± 9 anos. Conforme evidenciado na tabela 1, os resultados obtidos em duas ocasiões separadas pelo intervalo de tempo de uma semana, demonstram que a técnica é altamente reprodutível.

TABELA 1 – Variabilidade temporal (após uma semana) dos parâmetros microvasculares obtidos em voluntários sadios (n=8) através do uso de fluxometria laser com contraste de imagem.

Parâmetros Hemodinâmicos e microvasculares	Avaliação Basal 1	Avaliação Basal 2	Valores de P
Pressão Arterial Média (mmHg)	84 ± 7	88 ± 9	0,7215
Aumento na CVC induzidos por iontoforese de ACh (UAP/mmHg)	$0,40 \pm 0,1$	$0,37 \pm 0,2$	0,5753
AUC da iontoforese de ACh (UAP/seg)	8.201 ± 3.046	6.150 ± 4.026	0,1836
Valor máximo CVC durante HRPO (UAP /mmHg)	$0,88 \pm 0,2$	$0,85 \pm 0,1$	0,5944
Aumento na CVC durante HRPO (UAP /mmHg)	$0,56 \pm 0,14$	$0,52 \pm 0,11$	0,2645

Os resultados são exibidos como média \pm desvio padrão; Teste-t de Student Pareado. ACh, acetilcolina; UAP, unidade arbitrária de perfusão; AUC, area sob a curva; CVC, condutância vascular cutânea; HRPO, hiperemia reativa pós-oclusiva.

6.2. Análises das características dos participantes do estudo

Dos 61 voluntários iniciais, apenas 49 completaram o estudo, mostrando que houve uma perda de seguimento de 20% (a figura 5 exibe o fluxograma do estudo). Os quatro voluntários do grupo placebo perdidos durante o período de suplementação apresentavam características como idade, peso, IMC e clínicas que estavam de acordo com a média do grupo, assim sendo, não influenciando nos resultados obtidos ao final do estudo.

As características dos participantes veganos como idade, duração da dieta, frequência semanal para a prática de atividade física, número de sedentários e informações clínicas estão demonstrados na tabela 2.

Os grupos PLA e Scr foram semelhantes em relação à idade (32 ± 9 x 34 ± 11 ; $p = 0,7990$), tempo de implementação da dieta vegana, [6 (2-17) x 10 anos (3,5-17); $p = 0,7102$] e dias de realização de atividade física ($3,4 \pm 1,2$ x $3,4 \pm 1,4$ dias; $p = 0,9749$). As atividades físicas realizadas pelos grupos consistiam em musculação, caminhada, corrida e pilates praticadas de forma não sistemática 1, 2 ou nenhuma vez na semana. Cerca de 17% dos voluntários eram sedentários no grupo placebo e 26% no grupo creatina. Os valores clínicos também não apresentaram diferenças significativas para triglicérides ($87,8 \pm 28,1$ x $102,9 \pm 70,1$; $p = 0,8377$), LDL ($82,8 \pm 18,3$ x $90,4 \pm 34,2$; $p = 0,7988$), HDL ($44,2 \pm 11,4$ x $49 \pm 12,4$; $p = 0,0850$), colesterol [146 (126-165) x 152 (135-176); $p = 0,0941$] e as vitaminas B12 [315 (204,8-628,5) x 288 (174,5-377); $p = 0,1646$] e ácido fólico ($13,5 \pm 4,9$ x $13,3 \pm 5,7$; $p = 0,9024$).

Conforme demonstrado na Tabela 03, a adoção do protocolo de três semanas de Scr foi capaz de aumentar o peso ($66,1 \pm 10,3$ x $67 \pm 10,5$; $p = 0,0016$) e o IMC ($23,3 \pm 3,4$ x $23,6 \pm 3,6$; $p = 0,0035$), não existindo entretanto, diferença nestes parâmetros no grupo PLA. Com relação aos parâmetros hemodinâmicos não houve diferença após a Scr ou PLA nos valores da PAS, PAD e PAM. Apesar da randomização preliminar, houve diferença entre os grupos Scr e PLA nos valores de PAD antes (68 ± 5 vs 75 ± 9 , $p = 0,0207$) e após (67 ± 6 vs 74 ± 10 , $p = 0,0082$) a suplementação. Cumpre salientar que esta diferença se manteve mesmo após o período de suplementação, sugerindo que, as intervenções não interferiram na diferença inicial.

TABELA 2 – Características obtidas dos voluntários veganos dos grupos placebo e creatina

Características	Veganos + Placebo (n=18)		Veganos + Creatina (n=27)	
Idade (anos)	32 ± 9		34 ± 11	
Duração da dieta (em anos)	6 (2-17)		10 (3,5-17)	
Homens, n (%)	9 (50)		12 (45)	
Mulheres, n (%)	9 (50)		15 (55)	
Frequência semanal de atividade física (em dias)	3,4 ± 1,2		3,4 ± 1,4	
Sedentários, n (%)	3 (17)		7 (26)	
Triglicerídeos (mg/dl)	87,8 ± 28,1		102,9 ± 70,1	
Colesterol (mg/dl)	146 (126-165)		152 (135-176)	
HDL (mg/dl)	44,2 ± 11,4		49 ± 12,4	
LDL (mg/dl)	82,8 ± 18,3		90,4 ± 34,2	
Ácido fólico (ng/ml)	13,5 ± 4,9		13,3 ± 5,7	
Vitamina B12 (pg/ml)	315 (204,8-628,5)		288 (174,5-377)	
Homocisteína (µmol/l)	11,89 (8,23-15,35)		12,11 (8,57-17,12)	

Os resultados são exibidos como média ± desvio padrão, mediana (25^o - 75^o percentil), teste de normalidade Shapiro-wilk; Teste-t de Student não Pareado ou teste de Wilcoxon. HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade.

TABELA 3 – Mensurações antropométricas, pressão arterial e frequência cardíaca obtidas em voluntários veganos antes e após a suplementação de três semanas.

Características	Veganos + Placebo (n=18)		Veganos + Creatina (n=27)	
	Pré Suplementação	3 semanas	Pré Suplementação	3 semanas
Peso Corporal (Kg)	64,4 ± 13,3	64,3 ± 13,4	66,1 ± 10,3	67 ± 10,5*
IMC (m²/Kg)	22,9 ± 2,7	22,9 ± 2,8	23,3 ± 3,4	23,6 ± 3,5*
PAS (mmHg)	115 ± 12	118 ± 14	118 ± 14	120 ± 15
PAD (mmHg)	68 ± 5	67 ± 6	75 ± 9¶	74 ± 10#
PAM (mmHg)	84 ± 6	84 ± 6	89 ± 9	89 ± 11
FC (bpm)	64 ± 7	64 ± 9	67 ± 11	69 ± 9

Os resultados são exibidos como média ± desvio padrão, medianas (25^o - 75^o percentis), teste de normalidade Shapiro-wilk; Teste-t de Student Pareado ou teste de Wilcoxon.

IMC, índice de massa corporal; PAS, pressão sistólica; PAD, pressão diastólica; PAM, pressão média; FC, Frequência Cardíaca.

*p<0,05 x Pré Scr; ¶ p<0,05 x Pré PLA; #p<0,05 x Pós PLA;

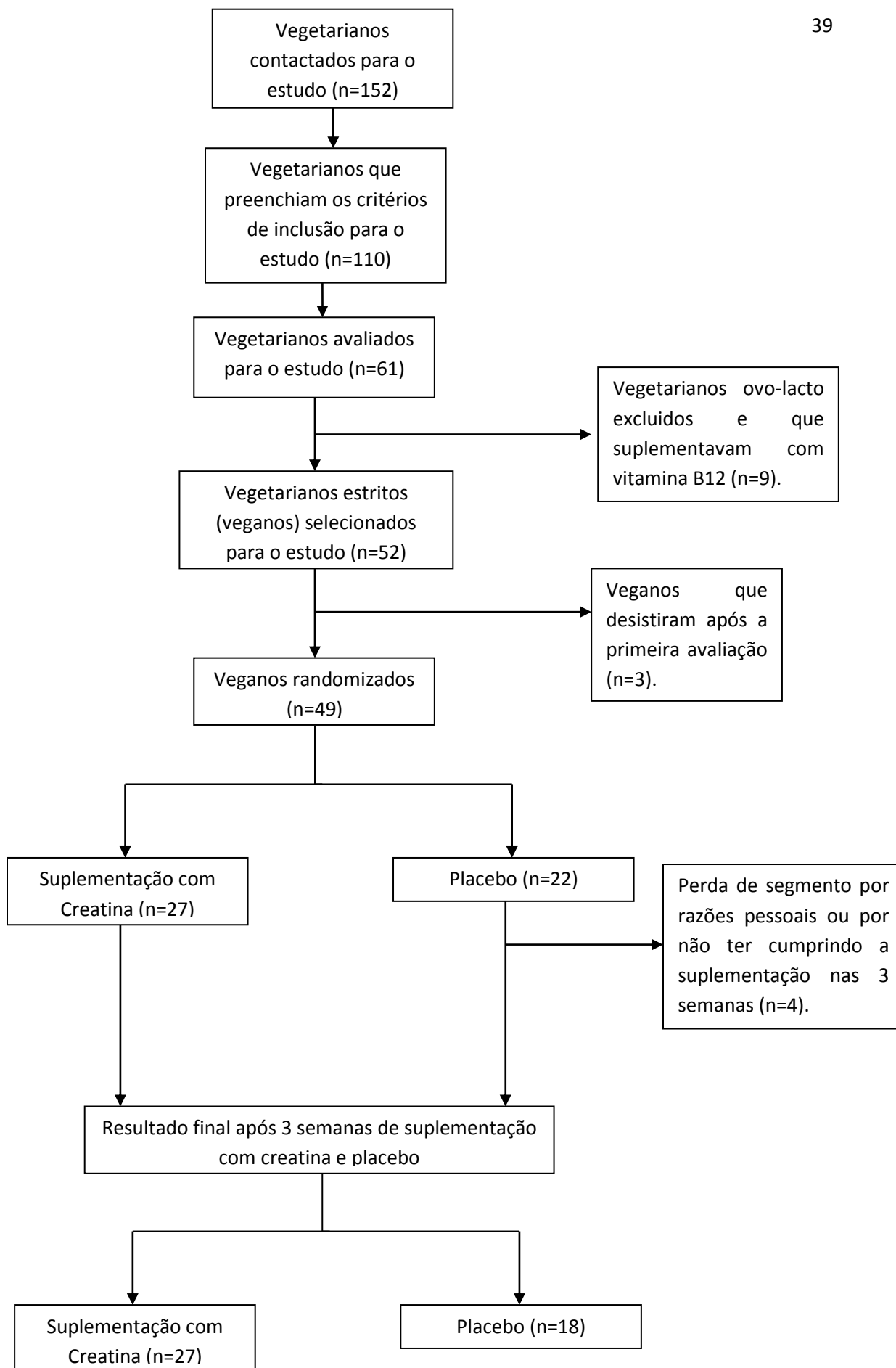


Figura 5. Fluxograma dos pacientes durante cada fase do estudo.

6.3. Análise das medidas laboratoriais e dos níveis de homocisteína

Na tabela 4 são apresentados os valores dos parâmetros bioquímicos dos grupos PLA e Scr antes e após o período de suplementação. Conforme evidenciado, houve redução significativa dos níveis plasmáticos de homocisteína (Hcy) no grupo Scr [12,11 (8,57-17,12) x 10,58 (8,15-13,22); $p = 0,0199$], o mesmo não ocorrendo no grupo PLA [10,58 (8,15-13,22) x 11,23 (8,46-13,32); $p = 0,5169$].

Apesar dos níveis de Hcy do grupo Scr serem considerados normais (5 a 15 $\mu\text{mol/l}$), 42% dos veganos apresentaram hiperhomocisteinemia (HHcy: [Hcy] $>15,00 \mu\text{mol/l}$). Desse grupo, dois foram classificados com HHcy leve (16 a 30 $\mu\text{mol/l}$) e dois com HHcy moderada (31 a 100 $\mu\text{mol/l}$). Após o período de SCr, todos os veganos normalizaram seus níveis de Hcy.

A tabela 5 e 6 apresentam os dados estratificados de veganos hiperhomocisteinêmicos (HHcy) e normohomocisteinêmicos (N-Hcy) que participaram do estudo. Apesar de não exercer efeito significativo em veganos normohomocisteinêmicos, a Scr reduziu em 27% os níveis de homocisteína dos veganos hiperhomocisteinêmicos [18,44 (14,53-27,86) x 13,46 (9,94-17,83), $p = 0,0020$]. O ponto de corte para as estratificações nos grupos placebo e creatina foram os valores de referência clínica superiores a 13,00 $\mu\text{mol/l}$.

Um teste de correlação de *Spearman* foi utilizado para avaliar se haveria correlação entre B-12 x Hcy e tempo de veganismo x B-12 x Hcy (figura 6). O teste mostra que existe correlação positiva entre os níveis de B12 e Hcy ($r = 0,4834$; $p = 0,0008$) e o tempo de veganismo e Hcy ($r = 0,5164$; $p = 0,0069$). Não houve nenhuma associação entre o tempo de veganismo e os níveis de B-12 ($r = 0,1934$; $p = 0,2319$)

Após três semanas de Scr os níveis de creatinina aumentaram significativamente ($0,71 \pm 0,08$ vs $0,91 \pm 0,19$; $p = 0,0001$) não existindo qualquer alteração no grupo PLA ($0,75 \pm 0,15$ vs $0,71 \pm 0,08$; $p = 0,3257$). O mesmo ocorreu com os níveis de ácido fólico apenas após a SCr ($13,3 \pm 5,7$ x $15,8 \pm 6,6$; $p < 0,05$).

Não houve diferença nos outros parâmetros bioquímicos nos grupos PLA e Scr antes e após a suplementação.

TABELA 4 – Mensurações laboratoriais obtidas em voluntários veganos antes e após a suplementação de três semanas.

Características Laboratoriais	Veganos + Placebo (n=18)		Veganos + Creatina (n=27)	
	Pré Suplementação	3 semanas	Pré Suplementação	3 semanas
Hemácias (milhões/mcl)	4,4 ± 0,4	4,4 ± 0,4	4,6 ± 0,3	4,5 ± 0,3
Hemoglobina (g/dl)	13,3 ± 1,4	13,3 ± 1,2	13,5 ± 1,3	13,1 ± 1,1
VCM (fl)	92,27 ± 3,63	92,21 ± 3,71	89,85 (86,48-92,75)	88,65 (86,53-92,02)
HCM (pg)	30,2 ± 1,3	30,1 ± 1,5	29,9 ± 1,9	29,2 ± 2
Hematócrito (%)	40,8 ± 4	41 ± 3,6	41,2 ± 3,6	40,5 ± 3,2
Homocisteína (µmol/l)	11,89 (8,23-15,35)	11,23 (8,46-13,32)	12,11 (8,57-17,12)	10,58 (8,15-13,22)*
PCR (mg/dl)	0,07 (0,04-0,31)	0,05 (0,02-0,13)	0,15 (0,05-1,10)	0,20 (0,07-0,47)#
Hb glic (%)	4,9 ± 0,2	5 ± 0,2	4,9 ± 0,4	5,1 ± 0,1
Sódio	138 ± 1,7	138 ± 1,5	138 ± 1,3	137 ± 1,7
Potássio	4,2 ± 0,3	4,2 ± 0,3	4,3 ± 0,2	4,2 ± 0,3
Magnésio	2 (1,9-2)	2 (1,9-2)	1,9 ± 0,1	2 ± 0,1
Cálcio	9,4 ± 0,2	9,4 ± 0,2	9,1 ± 1,5	9,3 ± 0,2
Glicose (mg/dl)	85 (79,5-88)	87 (82-91)	88 (83-89)	87 (83-93)
Uréia (mg/dl)	17,7 ± 5,5	17,5 ± 6,7	18,8 ± 4,2	19,7 ± 3,9
Creatinina (mg/dl)	0,75 ± 0,15	0,80 ± 0,16	0,71 ± 0,08	0,91 ± 0,19*
Ac. Úrico (mg/dl)	4,9 ± 1,4	4,9 ± 1,2	4,5 ± 1,1	4,2 ± 1,1
TGO (u/l)	20 ± 7	19 ± 3	22 ± 15	19 ± 5
TGP (u/l)	13 ± 4	14 ± 4	16 ± 7	15 ± 6
Creatino Kinase (u/l)	61 (48-76,2)	64,5 (53,2-98,7)	60 (47-104)	58 (48-93)
CK-MB (u/l)	12,4 ± 4,9	10,9 ± 3,5	15,4 ± 12,9	10,7 ± 3,5
Triglicerídeos (mg/dl)	87,8 ± 28,1	76,3 ± 24,5	102,9 ± 70,1	90,2 ± 54,2
Colesterol (mg/dl)	146 (126-165)	143,5 (132-168)	152 (135-176)	152 (133-166)
HDL (mg/dl)	44,2 ± 11,4	47,4 ± 12,4	49 ± 12,4	50 ± 12,6
LDL (mg/dl)	82,8 ± 18,3	88,1 ± 30	90,4 ± 34,2	85,2 ± 29,7
T3 (ng/ml)	1,28 (1,15-1,39)	1,18 (1,07-1,35)	1,16 (1,05-1,36)	1,18 (1,06-1,33)
T4 (ng/dl)	0,889 ± 0,143	0,894 ± 0,141	0,928 ± 0,128	0,933 ± 0,120
Vitamina B12 (pg/ml)	315 (204,8-628,5)	291 (209-602)	288 (174,5-377)	252 (182-364,5)
LDH (u/l)	169,2 ± 27	162,8 ± 24,7	158,7 ± 42,3	151,2 ± 25,1
Vitamina D (ng/ml)	26,7 ± 9,1	26,9 ± 8,8	22,9 ± 9,4	23,9 ± 8
Ácido fólico (ng/ml)	13,5 ± 4,9	15 ± 4,8	13,3 ± 5,7	15,8 ± 6,6*

Os resultados são exibidos como média ± desvio padrão, mediana (25% - 75%); Teste-t de Student Pareado ou teste de Wilcoxon. VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemo. corpuscular médio; PCR: proteína C-reativa; Hb glic: Hemoglobina glicada; TGO: Transaminase glutâmico oxalacética; TGP: Transaminase glutâmico pirúvica; CK-MB: creatino kinase-MB; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; T3: triiodotironina; T4: tiroxina; LDH: Lactato desidrogenase.

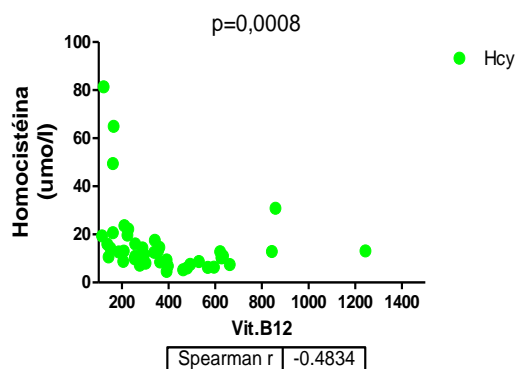
*p<0,05 x Pré Scr; † p<0,05 x Pré PLA; #p<0,05 x Pós PLA;

TABELA 5 – Mensuração da homocisteína obtidas nos voluntários veganos dos grupos PLA e Scr que apresentaram níveis elevados antes e após a suplementação de três semanas.

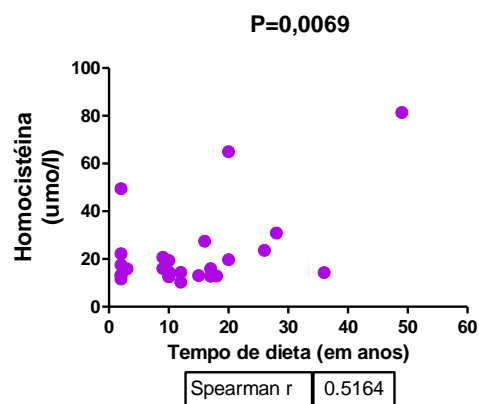
Características Laboratoriais	Veganos + Placebo (n=11)		Veganos + Creatina (n=14)	
	Pré Suplementação	3 semanas	Pré Suplementação	3 semanas
Homocisteína ($\mu\text{mol/l}$)	13,19 (12,78-23,64)	13,12 (11,01-28,90)	18,44 (14,53-27,86)	13,46 (9,94-17,83)*
Vitamina B12 (pg/ml)	430,4 \pm 280,6	348,5 \pm 220,9	216,5 \pm 83,5#	229,8 \pm 88,7

Os resultados são exibidos como média \pm desvio padrão, mediana (25% - 75%); Teste-t de Student Pareado ou teste de Wilcoxon. * $p < 0,0020$ x Pré Scr; # $p < 0,0203$ x Pré PLA

A



B



C

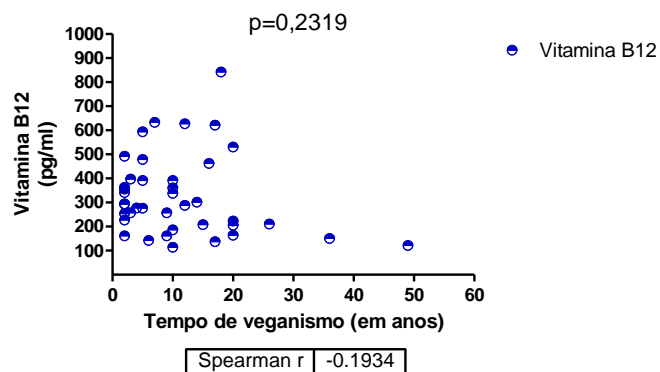


Figura 6. Correlação de todos os veganos (n=44) do estudo em relação aos parâmetros B12 x Hcy (A), tempo de veganismo x Hcy (B) e tempo de veganismo x B12 (C).

TABELA 6 – Mensuração da homocisteína obtidas nos voluntários veganos dos grupos que apresentaram níveis normais (N-Hcy) e elevados (HHcy) de homocisteína antes e após a suplementação de três semanas com creatina.

Características Laboratoriais	Veganos NormoHcy (n=12)		Veganos HHcy (n=15)	
	Pré Suplementação	3 semanas	Pré Suplementação	3 semanas
Homocisteína (µmol/l)	7,8 ± 1,8	8,8 ± 1,9	22,1 ± 16,1	13,4 ± 5,3*
B12 (pg/ml)	392,3 ± 134,5	343,6 ± 137,9	226,1 ± 87,1	240 ± 92,5

Os resultados são exibidos como média ± desvio padrão; Teste-t de Student Pareado. *p<0,05 x Pré Scr;

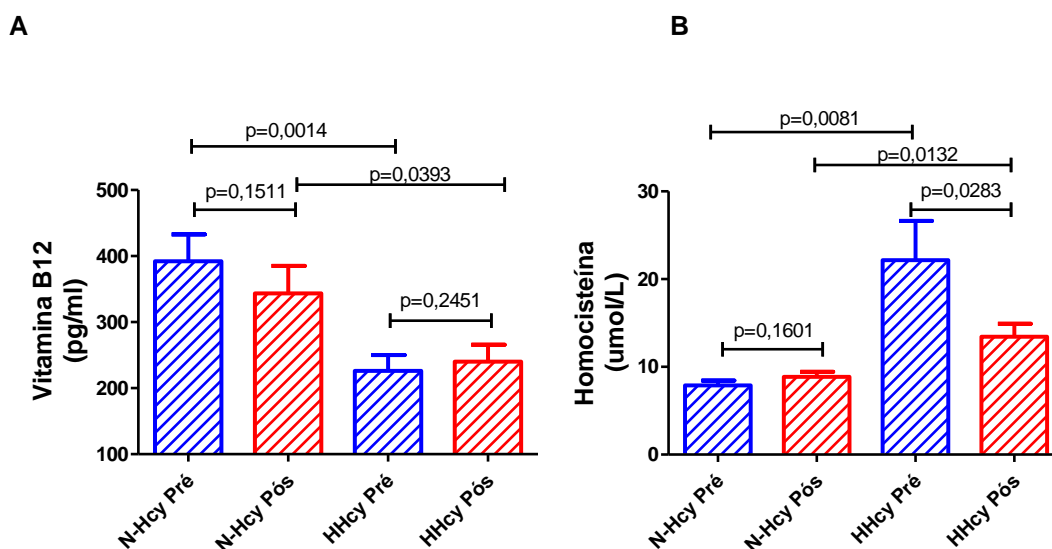


Figura 7. Estratificação dos veganos do grupo Scr que apresentaram N-Hcy (n=12) e HHcy (n=15) após 3 semanas de suplementação, exibindo o efeito da creatina na redução na homocisteína em indivíduos que apresentam níveis alto. N-Hcy: Normohomocisteína; HHcy: Hiperhomocisteinemia.

6.4. Avaliação da função microvascular periférica

6.4.1. Análise da perfusão capilar por microscopia intra-vital

A perfusão capilar basal aumentou significativamente após o período de suplementação apenas do grupo Scr (136 ± 8 x 147 ± 13 capilares/mm²; $p = 0,0001$) (figura 8A). A figura 8B demonstra que o recrutamento capilar após a hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) eleva-se significativamente apenas no grupo Scr (141 ± 9 vs 155 ± 14 capilares/mm²; $p = 0,0001$). Após o período de Scr, tanto a perfusão capilar basal quanto aquela observada após a hiperemia, foram significativamente mais elevadas no grupo Scr em relação ao PLA.

As figuras 9A e 9B exibem o recrutamento capilar induzido pela hiperemia reativa pós-oclusiva, expresso em valores absolutos e percentuais, nos grupos PLA e Scr mostrando que houve aumentos apenas comparando os momentos pós suplementação entre os grupos.

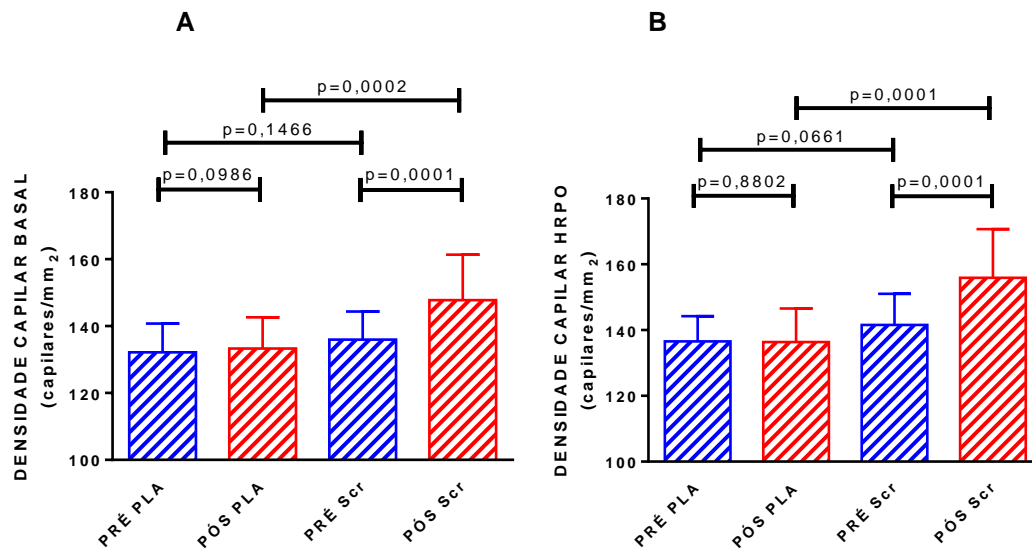


Figura 8. Densidade capilar basal (A) e densidade capilar após hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) (B) nos grupos veganos PLA (n=18) e S-cr (n=27) antes (pré) e após (pós) suplementação. Os valores são exibidos como média \pm desvio padrão e foram analisados usando o teste-t de Student pareado ou não pareado. PLA, placebo; Scr, suplementação com creatina.

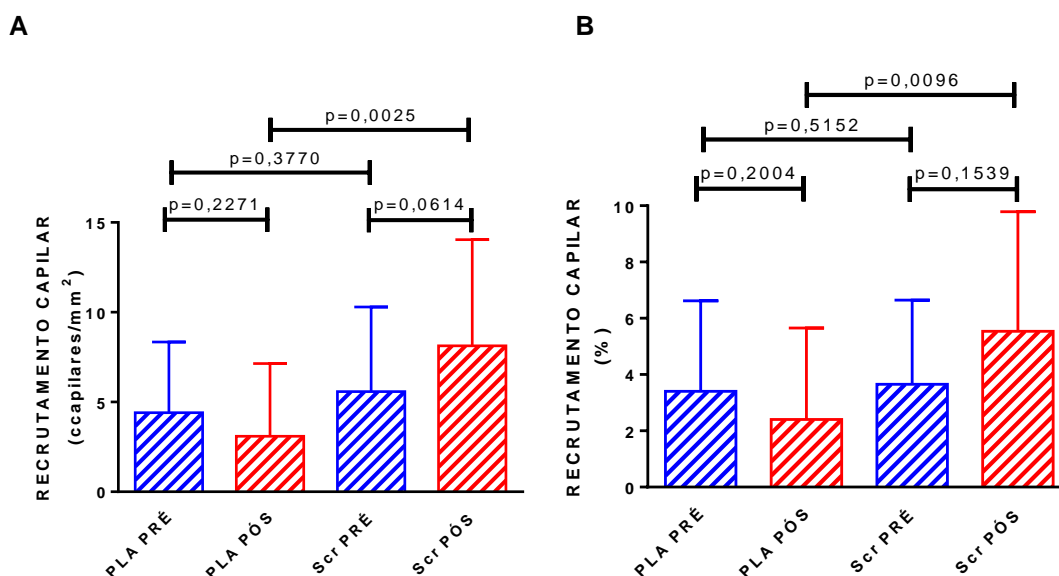


Figura 9. Recrutamento capilar induzido pela hiperemia reativa pós-oclusiva, expresso em valores absolutos (A) e percentuais (B), nos grupos veganos PLA (n=18) e S-cr (n=27) antes (pré) e após (pós) suplementação. Os valores são exibidos como média \pm desvio padrão e foram analisados usando o teste-t de Student pareado ou não pareado. PLA, placebo; Scr, suplementação com creatina.

6.4.2. Efeitos da ACh por iontoforese antes e depois da suplementação

Não existem diferenças em relação aos valores basais da condutância vascular cutânea mediada por ACh (CVC) nos grupos Scr ($21,75 \pm 5,01$ vs $21,83 \pm 4,55$ UAPs/mmHg; $p = 0,4715$) e PLA ($24,60 \pm 3,85$ vs $26,95 \pm 8,08$ UAP/mmHg; $p = 0,0705$) antes e após as 3 semanas de suplementação respectivamente.

A administração de ACh cutânea por iontoforese nos voluntários Scr (figura 10) também não promoveu diferenças no pico máximo do CVC ($0,647 \pm 0,178$ x $0,640 \pm 0,203$ UAPs/mmHg; $p = 0,9415$), na variação do CVC ($0,382 \pm 0,170$ x $0,383 \pm 0,196$ UAPs/mmHg; $p = 0,9922$) e na área sob a curva (7.037 ± 3.758 x 6.732 ± 4.309 UAPs/mmHg; $p = 0,7115$). A figura 11 apresenta a curva de vasodilatação microvascular induzida por ACh antes (fig.11A) e após (fig.11B) a suplementação nos grupos PLA e Scr.

6.4.3. Resposta microvascular à hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO)

Não houve diferença na CVC máxima do HRPO após o período de Scr ($0,888 \pm 0,202$ vs $0,837 \pm 0,279$ UAPs/mmHg; $p = 0,2383$) (Figura 12A). A figura 12B apresenta as variações de CVC HRPO (pico CVC menos o valor basal CVC) após o período de suplementação mostrando que não houve

diferença no grupo Scr ($0,520 \pm 0,174$ vs $0,482 \pm 0,220$ UAPs/mmHg; $p = 0,2623$). Porém, quando comparado com o grupo PLA os valores da CVC delta HRPO pós ($0,644 \pm 0,175$ vs $0,482 \pm 0,220$ UAPs/mmHg; $p = 0,0282$) apresentaram diferença significativa.

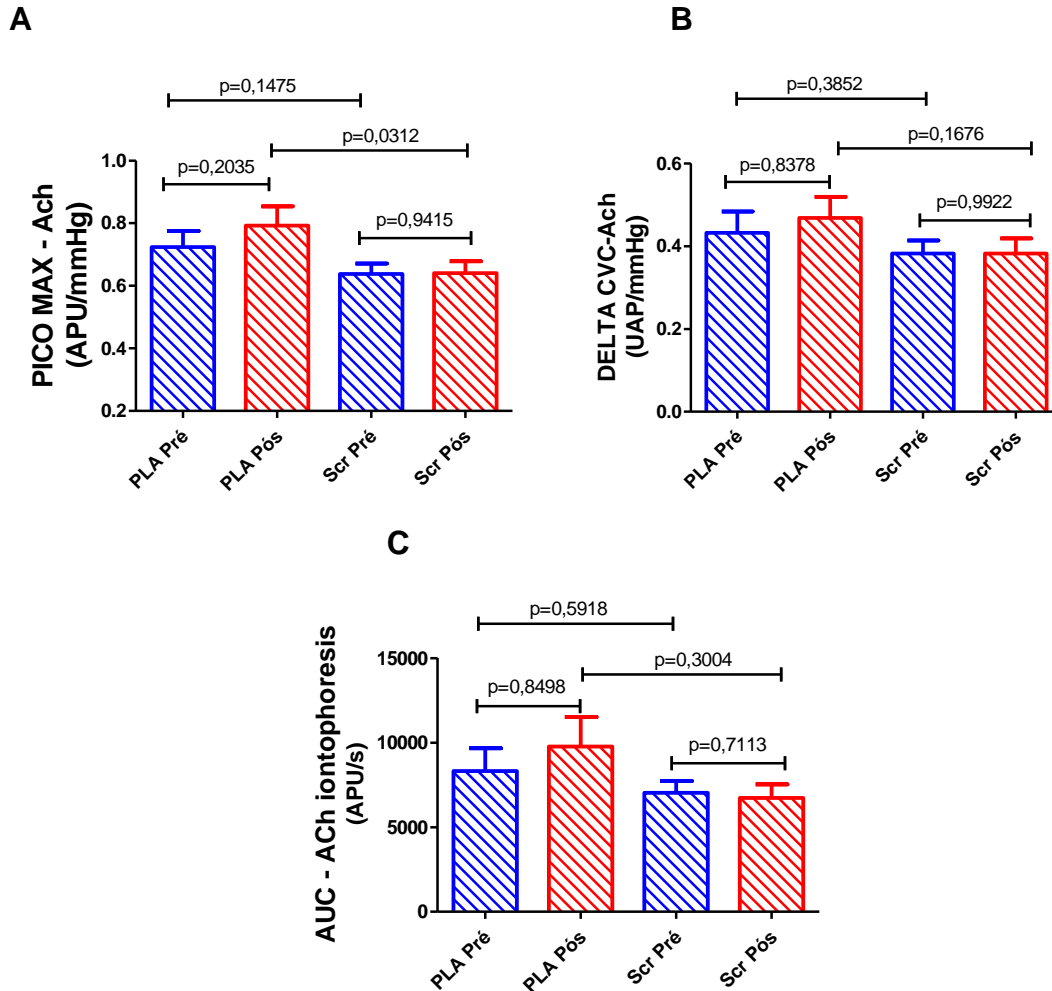
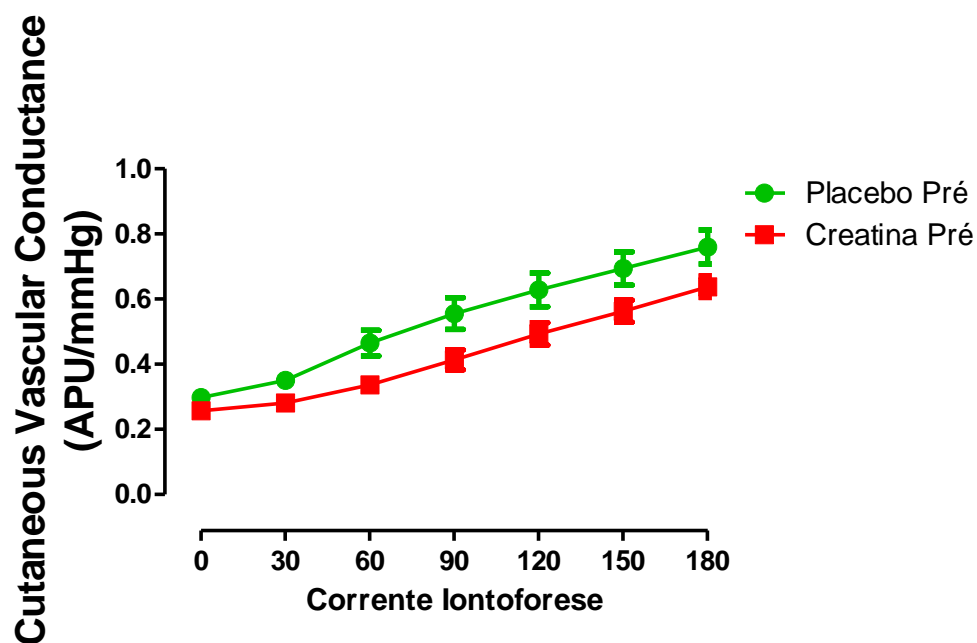


Figura 10. Efeitos da acetilcolina (ACh) administrada por iontoforese sobre a condutância vascular cutânea [CVC, expressos em unidades arbitrárias de perfusão (UAP) divididas pela pressão arterial média, mmHg] nos grupos veganos PLA (n=18) e veganos Scr (n=27) antes (pré) e após (pós) suplementação: (A) valores máximos da CVC, (B) aumentos na CVC (pico CVC menos o valor basal CVC) (B) e a área sob a curva (AUC) da dilatação microvascular induzida pela ACh (C). Os valores são expressos como média \pm desvio padrão e foram analisados usando teste-t de Student pareado ou não pareado. PLA, placebo; Scr, suplementação com creatina.

A



B

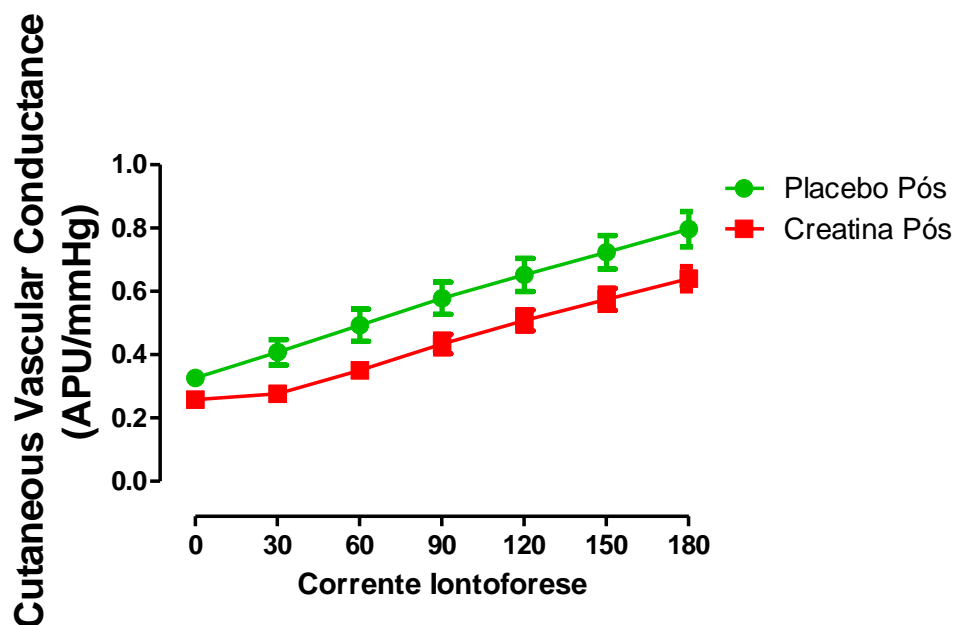


Figura 11. Efeitos da administração de doses crescentes de acetilcolina (ACh) por iontoforese sobre a condutância vascular cutânea (CVC) nos grupos veganos PLA (n=18) e veganos Scr (n=27) antes (pré, A) e após (pós, B) suplementação. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão e foram analisados usando teste-t de Student pareado ou não pareado.

PLA, placebo; Scr, suplementação com creatina.

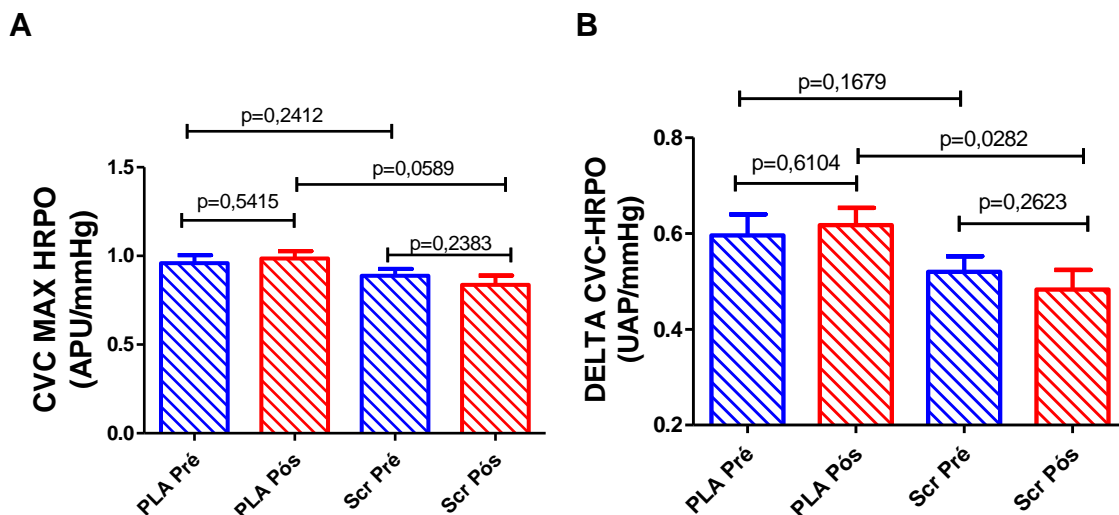


Figura 12. Efeitos da hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) no fluxo sanguíneo microvascular: condutância vascular cutânea (CVC) máxima (A) e delta da CVC (pico CVC menos o valor basal CVC) (B) antes (pré) e após (pós) suplementação. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão e foram analisados usando teste-t de Student pareado ou não pareado. PLA, placebo; Scr, suplementação com creatina.

7. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo revelam que a Scr por três semanas em vegetarianos estritos, reduz os níveis plasmáticos de Hcy e aumenta significativamente a perfusão de capilares nos estados basal e após hiperemia reativa pós-oclusiva.

Apesar da Scr não ter modificado significativamente a resposta de vasodilatação dependente de endotélio na microcirculação cutânea avaliada através de fluxometria Laser Speckle, ela aumentou significativamente o número de capilares perfundidos em repouso e após HRPO nas técnicas de microscopia. Tais resultados são difíceis de conciliar uma vez que tanto a dilatação nas arteríolas como nos esfíncteres pré-capilares parecem ser mediados pela liberação de substâncias vasoativas derivadas do endotélio e em especial através da participação do óxido nítrico [126].

Apesar de especulativo, é possível que o considerável aumento de creatina no interior da célula endotelial após o período de suplementação, influencie positiva e exclusivamente na abertura dos esfíncteres pré-capilares [127]. Neste sentido, já foi sugerido que a Scr, ao elevar os níveis intracelulares de creatina, contribui para ativação da AMPK e da enzima 5'nucleotidase responsável pela desaminação do AMP em adenosina e fosfato em processo mediado pela PKC [87, 128]. Assim, as células endoteliais se mostram capazes de aumentar a concentração de creatina pela Scr e influenciar na síntese de ATP e abertura de canais de potássio responsáveis por processos de vasodilatação de forma independente de óxido nítrico [129].

Ainda não está claro como a Scr poderia influenciar no aumento dos capilares e na melhora da resposta vascular ao aumento do fluxo sanguíneo, porém o efeito da Scr no aumento dos capilares basais e na hiperemia poderia ser pelo fato do endotélio ser um órgão que também possui a capacidade de armazenar creatina e assim, possivelmente, com a Scr o aumento na concentração da creatina no endotélio poderia ajudar na abertura dos canais Kca e na ação do fator hiperpolarizante dependente de endotélio (EDHF) [71].

Devido a este aumento na concentração de creatina pela suplementação nas células endoteliais e uma possível utilização através dos transportadores de creatina, poderia ocorrer um aumento na atividade da CK no endotélio, visto que sua atividade é reduzida neste órgão, poderia aumentar a taxa de

formação de ATP pela ressíntese de ADP elevando o turnover energético endotelial [129].

Porém, um outro fenômeno explicaria porque a Scr não promoveu qualquer alteração na vasodilatação mediada por ACh ou HRPO que sabidamente envolve a liberação de óxido nítrico, mas promoveu aumentos significativos na perfusão de capilares. Interessantemente, a enzima S-adenosil homocisteína hidrolase (SAHH), transforma S-adenosilhomocisteína (SAH) em homocisteína e adenosina sendo predominantemente regulada por seus produtos [130]. Dificuldades no transporte de homocisteína para fora da célula endotelial que ocorrem durante a hiperhomocisteinemia, contribuem para o acúmulo de SAH ao mesmo tempo em que inibem a SAHH [131]. Existem evidências de que o acúmulo de SAH intracelular ou a redução da razão SAM/SAH, (SAM, S-adenosilmetionina) apresenta impacto negativo sobre a função endotelial podendo estar associada a aumento do estresse oxidativo e inflamação de forma independente do aumento dos níveis de homocisteína plasmático [131, 132].

Encontra-se bem evidenciado que a Scr é capaz reduzir a demanda de metilação sobre a SAM, aumentar a razão SAM/SAH intracelular e colaborar para melhoria da função celular [133]. Cumpre salientar que na célula endotelial, as vias cistationina beta-sintetase e da betaína-homocisteína metiltransferase encontram-se muito reduzidas e, portanto, o processo de remetilação é dependente da metionina sintetase cuja atividade depende de vitamina B-12 [16]. Conforme evidenciamos, veganos com níveis de B-12 reduzidos tendem a apresentar níveis de homocisteína elevados. Como a síntese de Hcy se dá paralelamente a de adenosina, é razoável especularmos que a Scr apresente efeitos reduzindo a síntese de homocisteína ao mesmo tempo em que facilita o transporte desta molécula para fora da célula recuperando a atividade da SAHH e a produção de adenosina cujo efeito seria promover relaxamento dos esfíncteres pré-capilares e aumentar a perfusão de capilares [134].

Porém, Derave e colaboradores [135] associam uma possível melhora na função vascular após a Scr pelo menor uso da arginina endogêna, visto que a Scr diminuiu a necessidade deste aminoácido para a síntese da creatina, a arginina poderia ser desviada para outras vias como a síntese de NO, tendo

em vista que o precursor da síntese deste gás é a L-arginina. Assim, poderia ser facilmente dispersada pelo sarcoplasma e estando pronta e acessível para o uso, a arginina poderia estar sendo utilizada na síntese do NO, conseqüentemente na melhora da função vascular e no aumento da capilarização cutânea.

Conforme descrito nos resultados do estudo, a redução da homocisteinemia ocorrida após a Scr parece estar associada aos níveis plasmáticos individuais de Hcy uma vez que indivíduos hiperhomocisteinêmicos apresentaram as maiores reduções de Hcy após a suplementação. Fenômeno semelhante já foi descrito em outros estudos [136, 137] sugerindo que a suplementação de curto prazo com creatina não seja capaz de alterar os níveis de homocisteína de indivíduos normohomocisteinêmicos [87] e, em alguns casos contribuir até para sua elevação [17].

O efeito da Scr na redução da hiperhomocisteinemia de veganos provavelmente envolve a supressão da síntese endógena de creatina, condição que eleva a disponibilidade de SAM como doador de grupamento metil facilitando os processos de remetilação da Hcy em metionina [68].

Corroborando com o proposto por Waldmann e colaboradores [138] que observaram uma correlação inversa entre os níveis séricos de Hcy e de vitamina B12, identificamos forte correlação positiva entre tempo de vegetarianismo e níveis séricos de Hcy e inversa entre níveis séricos de B-12 e Hcy. Sugere-se desta forma, que quanto maior o tempo de dieta, maiores as concentrações plasmática de Hcy e menores os níveis de B-12.

Verificamos também, o aumento dos níveis de ácido fólico após o período de Scr. Embora o ácido fólico seja abundante na dieta vegana, tal condição pode estar associada ao aumento da remetilação da Hcy em face à maior disponibilidade de SAM proporcionada pelo efeito inibidor da Scr sobre a síntese endógena de creatina. Este fenômeno seria capaz de poupar a utilização de ácido fólico nos processos de remetilação [139].

Conforme esperado, a Scr contribuiu para aumentos significativos do peso e do IMC dos voluntários. Tais achados são coerentes com os da literatura [110] [140] e provavelmente relacionados ao efeito osmótico intracelular da creatina. Após três semanas de ingestão de creatina, o protocolo exibiu resultados que confirmam a eficiência da creatina no aumento destes

parâmetros. Este resultado se deve a um aumento da água que ocorre no início pela retenção hídrica e de fluídos causado pelo efeito osmótico que a creatina provoca na célula e posteriormente por um possível aumento na massa magra [110].

Outro trabalho realizado por Roschel, et al [140] observaram um aumento de peso após um período de uma semana de suplementação utilizando uma dosagem igual superior ao presente estudo. Este aumento de peso após a Scr foi atribuído, além do acúmulo de água nas células, por um possível aumento no conteúdo de creatina no músculo, associando que possa ter ocorrido um aumento na concentração de creatina intramuscular [87, 141].

Este aumento pode estar envolvido na síntese protéica e acúmulo das moléculas de creatina e fosfo-creatina no músculo-esquelético [87, 141]. Este acúmulo poderia elevar a expressão de fatores miogênicos regulatórios como a miogenina que é responsável pela proliferação e diferenciação de células satélites ou atuar no crescimento muscular salientando o estado anabólico da célula via IGF-1[142-144].

Entretanto, como o mecanismo de ação ainda não é claro, apesar de ser sugerido que esta retenção de água nas fibras musculares causada pelo potencial osmótico da alta concentração de creatina possa ser um estímulo de sinalização anabólica, é bem provável que este aumento de peso seja pela retenção hídrica causada pelo aumento na concentração de creatina no músculo, visto que não houve qualquer intervenção com exercícios de resistência [64, 145].

A Scr elevou os níveis plasmáticos de creatinina, de forma coerente com a literatura já que após sobrecarga oral com creatina, aumentos da creatinina são esperados pelo fato da última ser produto do metabolismo da primeira [110]. Esse fenômeno parece ser corriqueiro durante os processos de suplementação com creatina e nada tem a ver com eventuais prejuízos da função renal que parece permanecer inalterada frente a longos períodos de suplementação [111, 146, 147].

Neste estudo, observamos também que os vegetarianos estritos que participaram apresentaram hipovitaminose D (os valores de referências clínicos são 30-100 ng/ml), mesmo com todo o controle e cuidados alimentares que os participantes apresentam. Encontra-se bem evidenciado que os baixos níveis

plasmáticos de vitamina D representam um problema de dimensões globais especialmente em populações que restringem deliberadamente o consumo de alimentos de origem animal. Mesmo entre onívoros, estima-se que cerca de 60% da população mundial não apresentem níveis satisfatórios de vitamina D. Concentrações séricas inferiores a 12ng/mL encontram-se fortemente associadas com a mortalidade por doenças cardiovasculares, respiratórias e câncer [148].

Um dos problemas da hipovitaminose D está associado com a presença de doença cardiovascular, hipertensão e síndrome metabólica e encontram-se associados com maior risco de infarto do miocárdio [149]. De fato, a associação independente entre os níveis de vitamina D e mortalidade cardiovascular, se estende também para todas as causas de morte [150].

Níveis séricos reduzidos de vitamina D têm sido associados à inflamação vascular, maior deposição de cálcio nas artérias coronarianas, rigidez arterial e prejuízos na função endotelial [151]. De fato, a vitamina D tem sido diretamente envolvida na vasodilatação dependente de endotélio, atividade anti-coagulante e inibição da resposta inflamatória. Indiretamente pode favorecer a redução da pressão arterial, hipertrofia do miocárdio e arritmias ventriculares [152].

Embora existam evidências de que a pigmentação da pele e a quantidade de exposição solar têm maiores influência nos níveis de vitamina D do que a dieta [153], a maior parte dos estudos sugere que veganos representam grupo de risco para deficiência de vitamina D em grande parte pelo elevado consumo de fitatos e reduzida ingestão de gorduras e alimentos que contenham esta vitamina [154-156].

8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Uma das limitações deste trabalho foi o número pequeno de voluntários que participaram da pesquisa e as perdas de seguimentos nos grupos que participaram do estudo. Outra limitação foi a impossibilidade técnica de analisarmos aumentos na concentração intramuscular de creatina e fosfocreatina.

A ausência de um controle da dieta dos voluntários bem como acompanhamento das alterações na composição corporal também dificultaram algumas análises obtidas ao final do estudo.

9. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a Scr reduz os níveis de Hcy em veganos, sendo mais eficaz na presença de HHcy. Além disso, mostrou que as variações dos níveis individuais de Hcy são dependentes do tempo de vegetarianismo e inversamente relacionados com os níveis plasmáticos de vitamina B12.

Demonstramos também, que a Scr apesar de não alterar a reatividade microvascular avaliada pela técnica de fluxometria pelo Laser Speckle, é capaz de aumentar significativamente a perfusão de capilares em repouso e após a hiperemia reativa, em mecanismo provavelmente independente de óxido nítrico e associado ao efeito vasodilatador local da adenosina nos esfíncteres pré-capilares.

Apesar de mais estudos se fazerem necessários para esclarecer os mecanismos pelo qual a Scr altera a perfusão de capilares, este fenômeno melhora a oferta de nutrientes teciduais e, ao reduzir os níveis de homocisteína podem contribuir para melhoria do estado redox e da função celular.

Também é necessário esclarecer mais detalhadamente, o impacto da carência de micronutrientes na saúde vascular de vegetarianos estritos que como sabemos, por esta condição apresentam risco elevado de disfunção endotelial ao mesmo tempo em que gozam de melhor saúde vascular em relação a indivíduos onívoros. Neste sentido, a Scr pode representar um importante recurso para, através da redução dos níveis de homocisteína, atenuar o estresse oxidativo e inflamatório eventualmente vigentes e, mediante a maior perfusão de capilares, aumentar a oferta de nutrientes teciduais.

10. REFERÊNCIAS

1. Oliveira, G.B., A. Avezum, and L. Roever, Cardiovascular Disease Burden: Evolving Knowledge of Risk Factors in Myocardial Infarction and Stroke through Population-Based Research and Perspectives in Global Prevention. *Front Cardiovasc Med*, 2015. **2**: p. 32.
2. Yeates, K., et al., A Global Perspective on Cardiovascular Disease in Vulnerable Populations. *Can J Cardiol*, 2015. **31**(9): p. 1081-93.
3. Yusuf, S., et al., Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation*, 2001. **104**(22): p. 2746-53.
4. Bousquet-Santos, K., et al., Impaired vascular reactivity in healthy first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes is related to metabolic factors. *Diabetes Care*, 2009. **32**(6): p. e72.
5. Pedersen, B.K., The disease of physical inactivity--and the role of myokines in muscle--fat cross talk. *J Physiol*, 2009. **587**(Pt 23): p. 5559-68.
6. Boyuk, B., et al., Relationship between levels of brain-derived neurotrophic factor and metabolic parameters in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Res*, 2014. **2014**: p. 978143.
7. Lim, S.S., et al., A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 2012. **380**(9859): p. 2224-60.
8. Ng, S.C., Emerging leadership lecture: Inflammatory bowel disease in Asia: emergence of a "Western" disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 2015. **30**(3): p. 440-5.
9. Davis, C., et al., Definition of the Mediterranean Diet; a Literature Review. *Nutrients*, 2015. **7**(11): p. 9139-53.

10. Willcox, D.C., G. Scapagnini, and B.J. Willcox, Healthy aging diets other than the Mediterranean: a focus on the Okinawan diet. *Mech Ageing Dev*, 2014. **136-137**: p. 148-62.
11. Pilis, W., et al., Health benefits and risk associated with adopting a vegetarian diet. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2014. **65**(1): p. 9-14.
12. Kwok, T., et al., Vascular dysfunction in Chinese vegetarians: an apparent paradox? *J Am Coll Cardiol*, 2005. **46**(10): p. 1957-8.
13. Li, D., Effect of the vegetarian diet on non-communicable diseases. *J Sci Food Agric*, 2014. **94**(2): p. 169-73.
14. Mezzano, D., et al., Cardiovascular risk factors in vegetarians. Normalization of hyperhomocysteinemia with vitamin B(12) and reduction of platelet aggregation with n-3 fatty acids. *Thromb Res*, 2000. **100**(3): p. 153-60.
15. Huang, T., et al., Associations of plasma phospholipid fatty acids with plasma homocysteine in Chinese vegetarians. *Br J Nutr*, 2013. **109**(9): p. 1688-94.
16. Elmadfa, I. and I. Singer, Vitamin B-12 and homocysteine status among vegetarians: a global perspective. *Am J Clin Nutr*, 2009. **89**(5): p. 1693S-1698S.
17. Jahangir, E., et al., The effect of l-arginine and creatine on vascular function and homocysteine metabolism. *Vascular Medicine*, 2009. **14**(3): p. 239-248.
18. Wong, G.K. and P.A. Marsden, Nitric oxide synthases: regulation in disease. *Nephrol Dial Transplant*, 1996. **11**(1): p. 215-20.
19. Finch, J.M. and J. Joseph, Homocysteine, cardiovascular inflammation, and myocardial remodeling. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2010. **10**(4): p. 241-5.

20. Albu, E., et al., Hyperhomocysteinemia is an indicator of oxidant stress. *Med Hypotheses*, 2012. **78**(4): p. 554-5.
21. Levy, B.I., et al., Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. *Circulation*, 2008. **118**(9): p. 968-76.
22. Behrendt, D. and P. Ganz, Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol*, 2002. **90**(10C): p. 40L-48L.
23. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
24. Coultas, L., K. Chawengsaksophak, and J. Rossant, Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*, 2005. **438**(7070): p. 937-45.
25. Warabi, E., et al., Shear stress stabilizes NF-E2-related factor 2 and induces antioxidant genes in endothelial cells: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic Biol Med*, 2007. **42**(2): p. 260-9.
26. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **291**(3): p. H985-1002.
27. Boulanger, C.M., Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(4): p. e26-31.
28. Verri, V., A. Brandao, and E. Tibirica, The evaluation of penile microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging in healthy volunteers. *Microvasc Res*, 2015. **99**: p. 96-101.
29. Boulanger, C.M., Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. **31**(1): p. 39-49.
30. Sahni, R., Noninvasive monitoring by photoplethysmography. *Clin Perinatol*, 2012. **39**(3): p. 573-83.

31. Draijer, M., et al., Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion. *Lasers Med Sci*, 2009. **24**(4): p. 639-51.
32. Breier, G., et al., Transforming growth factor-beta and Ras regulate the VEGF/VEGF-receptor system during tumor angiogenesis. *Int J Cancer*, 2002. **97**(2): p. 142-8.
33. Struijker-Boudier, H.A., et al., Assessment of the microcirculation in cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*, 1996. **91**(2): p. 131-9.
34. Vicaut, E., Microcirculation and arterial hypertension. *Drugs*, 1999. **58 Spec No 1**: p. 1-10.
35. Murray, A.K., et al., Abnormal microvascular response is localized to the digits in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(6): p. 1952-60.
36. Debbabi, H., et al., Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients. *Am J Hypertens*, 2006. **19**(5): p. 477-83.
37. Fang, J.C., et al., Circulating autoantibodies to oxidized LDL correlate with impaired coronary endothelial function after cardiac transplantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(12): p. 2044-8.
38. Bogdanski, P., et al., L-Arginine and vitamin C attenuate pro-atherogenic effects of high-fat diet on biomarkers of endothelial dysfunction in rats. *Biomed Pharmacother*, 2015. **76**: p. 100-6.
39. Tusso, P., S.R. Stoll, and W.W. Li, A plant-based diet, atherogenesis, and coronary artery disease prevention. *Perm J*, 2015. **19**(1): p. 62-7.
40. McEwen, B.J., The influence of diet and nutrients on platelet function. *Semin Thromb Hemost*, 2014. **40**(2): p. 214-26.
41. Chen, C.W., et al., Total cardiovascular risk profile of Taiwanese vegetarians. *Eur J Clin Nutr*, 2008. **62**(1): p. 138-44.

42. McEvoy, C.T., N. Temple, and J.V. Woodside, Vegetarian diets, low-meat diets and health: a review. *Public Health Nutrition*, 2012. **15**(12): p. 2287-2294.
43. Ruby, M.B., Vegetarianism. A blossoming field of study. *Appetite*, 2012. **58**(1): p. 141-150.
44. Jabs, J., C.M. Devine, and J. Sobal, Model of the Process of Adopting Vegetarian Diets: Health Vegetarians and Ethical Vegetarians. *Journal of Nutrition Education*, 1998. **30**(4): p. 196-202.
45. Beeson, W.L., et al., Chronic disease among Seventh-day Adventists, a low-risk group. Rationale, methodology, and description of the population. *Cancer*, 1989. **64**(3): p. 570-81.
46. Thorogood, M., et al., Risk of death from cancer and ischaemic heart disease in meat and non-meat eaters. *BMJ*, 1994. **308**(6945): p. 1667-70.
47. Burr, M.L. and P.M. Sweetnam, Vegetarianism, dietary fiber, and mortality. *The American journal of clinical nutrition*, 1982. **36**(5): p. 873-7.
48. Frentzel-Beyme, R., J. Claude, and U. Eilber, Mortality among German vegetarians: first results after five years of follow-up. *Nutr Cancer*, 1988. **11**(2): p. 117-26.
49. Willett, W.C., Convergence of philosophy and science: the third international congress on vegetarian nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, 1999. **70**(3 Suppl): p. 434S-438S.
50. Key, T.J., P.N. Appleby, and M.S. Rosell, Health effects of vegetarian and vegan diets. *Proc Nutr Soc*, 2006. **65**(1): p. 35-41.
51. Trapp, D., W. Knez, and W. Sinclair, Could a vegetarian diet reduce exercise-induced oxidative stress? A review of the literature. *Journal of sports sciences*, 2010. **28**(12): p. 1261-8.

52. McEvoy, C.T., N. Temple, and J.V. Woodside, Vegetarian diets, low-meat diets and health: a review. *Public health nutrition*, 2012. **15**(12): p. 2287-94.
53. Waldmann, A., et al., Dietary intakes and lifestyle factors of a vegan population in Germany: results from the German Vegan Study. *European journal of clinical nutrition*, 2003. **57**(8): p. 947-55.
54. Craig, W.J., Nutrition concerns and health effects of vegetarian diets. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 2010. **25**(6): p. 613-20.
55. Benton, D. and R. Donohoe, The influence of creatine supplementation on the cognitive functioning of vegetarians and omnivores. *British Journal of Nutrition*, 2010. **105**(07): p. 1100-1105.
56. Watt, K.K., A.P. Garnham, and R.J. Snow, Skeletal muscle total creatine content and creatine transporter gene expression in vegetarians prior to and following creatine supplementation. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 2004. **14**(5): p. 517-31.
57. Hambrecht, R., et al., Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure: additional effects of exercise training and oral L-arginine supplementation. *J Am Coll Cardiol*, 2000. **35**(3): p. 706-13.
58. Alves, C.R., et al., Creatine supplementation associated or not with strength training upon emotional and cognitive measures in older women: a randomized double-blind study. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e76301.
59. Wyss, M. and R. Kaddurah-Daouk, Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev*, 2000. **80**(3): p. 1107-213.
60. Gualano, B., et al., In sickness and in health: the widespread application of creatine supplementation. *Amino Acids*, 2012. **43**(2): p. 519-29.

61. Barros, M.P., et al., Effects of acute creatine supplementation on iron homeostasis and uric acid-based antioxidant capacity of plasma after wingate test. *J Int Soc Sports Nutr*, 2012. **9**(1): p. 25.
62. Jager, R., et al., Analysis of the efficacy, safety, and regulatory status of novel forms of creatine. *Amino Acids*, 2011. **40**(5): p. 1369-83.
63. Deminice, R., et al., Effects of creatine supplementation on oxidative stress and inflammatory markers after repeated-sprint exercise in humans. *Nutrition*, 2013. **29**(9): p. 1127-32.
64. Gualano, B., et al., Does creatine supplementation improve the plasma lipid profile in healthy male subjects undergoing aerobic training? *J Int Soc Sports Nutr*, 2008. **5**: p. 16.
65. Wyss, M. and A. Schulze, Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience*, 2002. **112**(2): p. 243-60.
66. Bassit, R.A., R. Curi, and L.F. Costa Rosa, Creatine supplementation reduces plasma levels of pro-inflammatory cytokines and PGE2 after a half-ironman competition. *Amino Acids*, 2008. **35**(2): p. 425-31.
67. Wyss, M., Writing about creatine: is it worth the risk? *Toxicol Lett*, 2004. **152**(3): p. 273-4.
68. Petr, M., M. Steffl, and E. Kohlikova, Effect of the MTHFR 677C/T polymorphism on homocysteinemia in response to creatine supplementation: a case study. *Physiol Res*, 2013. **62**(6): p. 721-9.
69. Wallimann, T., M. Tokarska-Schlattner, and U. Schlattner, The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*, 2011. **40**(5): p. 1271-96.
70. Brosnan, J.T., R.P. da Silva, and M.E. Brosnan, The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino Acids*, 2011. **40**(5): p. 1325-31.

71. Deminice, R., et al., Effects of creatine supplementation on homocysteine levels and lipid peroxidation in rats. *Br J Nutr*, 2009. **102**(1): p. 110-6.
72. Selhub, J., et al., Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. *Ann Intern Med*, 1999. **131**(5): p. 331-9.
73. Jiang, X., et al., Hyperhomocystinemia impairs endothelial function and eNOS activity via PKC activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(12): p. 2515-21.
74. Moat, S.J., et al., Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. *The Journal of nutritional biochemistry*, 2004. **15**(2): p. 64-79.
75. Refsum, H. and P.M. Ueland, Recent data are not in conflict with homocysteine as a cardiovascular risk factor. *Current opinion in lipidology*, 1998. **9**(6): p. 533-9.
76. Boushey, C.J., et al., A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 1995. **274**(13): p. 1049-57.
77. Kaul, S., A.A. Zadeh, and P.K. Shah, Homocysteine hypothesis for atherothrombotic cardiovascular disease: not validated. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **48**(5): p. 914-23.
78. Symons, J.D., et al., Hyperhomocysteinemia evoked by folate depletion: effects on coronary and carotid arterial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(5): p. 772-80.

79. Upchurch, G.R., Jr., G.N. Welch, and J. Loscalzo, Homocysteine, EDRF, and endothelial function. *The Journal of nutrition*, 1996. **126**(4 Suppl): p. 1290S-4S.
80. Weiss, N., Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Curr Drug Metab*, 2005. **6**(1): p. 27-36.
81. Tsai, J.C., et al., Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994. **91**(14): p. 6369-73.
82. Tang, L., et al., The effect of homocysteine on DNA synthesis in cultured human vascular smooth muscle. *Atherosclerosis*, 1998. **136**(1): p. 169-73.
83. Stamler, J.S., et al., Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest*, 1993. **91**(1): p. 308-18.
84. Woo, K.S., et al., Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation*, 2000. **101**(12): p. E116.
85. Tawakol, A., et al., Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation*, 1997. **95**(5): p. 1119-21.
86. Korzun, W.J., Oral creatine supplements lower plasma homocysteine concentrations in humans. *Clin Lab Sci*, 2004. **17**(2): p. 102-6.
87. Moraes, R., et al., Effects of dietary creatine supplementation on systemic microvascular density and reactivity in healthy young adults. *Nutr J*, 2014. **13**(1): p. 115.

88. Krajcovicova-Kudlackova, M., et al., Homocysteine levels in vegetarians versus omnivores. *Annals of nutrition & metabolism*, 2000. **44**(3): p. 135-8.
89. Ueland, P.M., et al., The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *The American journal of clinical nutrition*, 2000. **72**(2): p. 324-32.
90. Ueland, P.M., et al., The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr*, 2000. **72**(2): p. 324-32.
91. Waldmann, A., et al., Homocysteine and cobalamin status in German vegans. *Public health nutrition*, 2004. **7**(3): p. 467-72.
92. Foster, M., et al., Effect of vegetarian diets on zinc status: a systematic review and meta-analysis of studies in humans. *J Sci Food Agric*, 2013. **93**(10): p. 2362-71.
93. Woo, K.S., T.C. Kwok, and D.S. Celermajer, Vegan diet, subnormal vitamin B-12 status and cardiovascular health. *Nutrients*, 2014. **6**(8): p. 3259-73.
94. Baroni, L., et al., Effect of a Klamath algae product ("AFA-B12") on blood levels of vitamin B12 and homocysteine in vegan subjects: a pilot study. *Int J Vitam Nutr Res*, 2009. **79**(2): p. 117-23.
95. Zeuschner, C.L., et al., Vitamin B(1)(2) and vegetarian diets. *Med J Aust*, 2013. **199**(4 Suppl): p. S27-32.
96. McCarty, M.F., Supplemental creatine may decrease serum homocysteine and abolish the homocysteine 'gender gap' by suppressing endogenous creatine synthesis. *Medical hypotheses*, 2001. **56**(1): p. 5-7.
97. Alves, C.R., et al., Creatine supplementation in fibromyalgia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2013. **65**(9): p. 1449-59.

98. van Loon, L.J., et al., Effects of creatine loading and prolonged creatine supplementation on body composition, fuel selection, sprint and endurance performance in humans. *Clin Sci (Lond)*, 2003. **104**(2): p. 153-62.
99. Greenhaff, P.L., et al., Effect of oral creatine supplementation on skeletal muscle phosphocreatine resynthesis. *Am J Physiol*, 1994. **266**(5 Pt 1): p. E725-30.
100. Kreider, R.B., et al., Long-term creatine supplementation does not significantly affect clinical markers of health in athletes. *Mol Cell Biochem*, 2003. **244**(1-2): p. 95-104.
101. Earnest, C.P., A.L. Almada, and T.L. Mitchell, High-performance capillary electrophoresis-pure creatine monohydrate reduces blood lipids in men and women. *Clin Sci (Lond)*, 1996. **91**(1): p. 113-8.
102. Reaven, G.M., Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med*, 1993. **44**: p. 121-31.
103. Walsh, B., et al., The role of phosphorylcreatine and creatine in the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol*, 2001. **537**(Pt 3): p. 971-8.
104. Gualano, B., et al., Effects of creatine supplementation on glucose tolerance and insulin sensitivity in sedentary healthy males undergoing aerobic training. *Amino Acids*, 2008. **34**(2): p. 245-50.
105. Pearlman, J.P. and R.A. Fielding, Creatine monohydrate as a therapeutic aid in muscular dystrophy. *Nutr Rev*, 2006. **64**(2 Pt 1): p. 80-8.
106. Rawson, E.S. and J.S. Volek, Effects of creatine supplementation and resistance training on muscle strength and weightlifting performance. *J Strength Cond Res*, 2003. **17**(4): p. 822-31.

107. Volek, J.S., et al., Creatine supplementation enhances muscular performance during high-intensity resistance exercise. *J Am Diet Assoc*, 1997. **97**(7): p. 765-70.
108. Tarnopolsky, M.A., B.D. Roy, and J.R. MacDonald, A randomized, controlled trial of creatine monohydrate in patients with mitochondrial cytopathies. *Muscle Nerve*, 1997. **20**(12): p. 1502-9.
109. Louis, M., et al., Beneficial effects of creatine supplementation in dystrophic patients. *Muscle Nerve*, 2003. **27**(5): p. 604-10.
110. Hultman, E., et al., Muscle creatine loading in men. *J Appl Physiol* (1985), 1996. **81**(1): p. 232-7.
111. Lugaresi, R., et al., Does long-term creatine supplementation impair kidney function in resistance-trained individuals consuming a high-protein diet? *J Int Soc Sports Nutr*, 2013. **10**(1): p. 26.
112. Gualano, B., et al., Creatine supplementation and resistance training in vulnerable older women: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Exp Gerontol*, 2014. **53**: p. 7-15.
113. Holowatz, L.A., C.S. Thompson-Torgerson, and W.L. Kenney, The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *J Appl Physiol*, 2008. **105**(1): p. 370-2.
114. Roustit, M. and J.L. Cracowski, Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol Sci*, 2013. **34**(7): p. 373-84.
115. Cordovil, I., et al., Evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging. *Microvasc Res*, 2012. **83**(3): p. 376-9.
116. Kaiser, S.E., et al., Antihypertensive treatment improves microvascular rarefaction and reactivity in low-risk hypertensive individuals. *Microcirculation*, 2013. **20**(8): p. 703-16.

117. Serne, E.H., et al., Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome. *Hypertension*, 2007. **50**(1): p. 204-11.
118. Hall, M. and T.H. Trojjan, Creatine supplementation. *Curr Sports Med Rep*, 2013. **12**(4): p. 240-4.
119. Op 't Eijnde, B., et al., Effect of oral creatine supplementation on human muscle GLUT4 protein content after immobilization. *Diabetes*, 2001. **50**(1): p. 18-23.
120. Roustit, M. and J.L. Cracowski, Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation*, 2012. **19**(1): p. 47-64.
121. Briers, J.D. and S. Webster, Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow. *J Biomed Opt*, 1996. **1**(2): p. 174-9.
122. Dunn, A.K., et al., Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001. **21**(3): p. 195-201.
123. Antonios, T.F., et al., Maximization of skin capillaries during intravital video-microscopy in essential hypertension: comparison between venous congestion, reactive hyperaemia and core heat load tests. *Clin Sci (Lond)*, 1999. **97**(4): p. 523-8.
124. Serne, E.H., et al., Impaired skin capillary recruitment in essential hypertension is caused by both functional and structural capillary rarefaction. *Hypertension*, 2001. **38**(2): p. 238-42.
125. Tibirica, E., et al., Impairment of skin capillary recruitment precedes chronic complications in patients with type 1 diabetes. *Rev Diabet Stud*, 2007. **4**(2): p. 85-8.
126. Busse, R., et al., EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci*, 2002. **23**(8): p. 374-80.

127. Node, K., et al., Activation of ecto-5'-nucleotidase by protein kinase C and its role in ischaemic tolerance in the canine heart. *Br J Pharmacol*, 1997. **120**(2): p. 273-81.
128. Ceddia, R.B. and G. Sweeney, Creatine supplementation increases glucose oxidation and AMPK phosphorylation and reduces lactate production in L6 rat skeletal muscle cells. *J Physiol*, 2004. **555**(Pt 2): p. 409-21.
129. Decking, U.K., et al., Functional aspects of creatine kinase isoenzymes in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. **281**(1): p. C320-8.
130. James, S.J., et al., Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *J Nutr*, 2002. **132**(8 Suppl): p. 2361S-2366S.
131. Tehlivets, O., et al., S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and methylation disorders: yeast as a model system. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1832**(1): p. 204-15.
132. Ma, J., et al., A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1999. **8**(9): p. 825-9.
133. Cacciapuoti, G., et al., Homocysteine-induced endothelial cell adhesion is related to adenosine lowering and is not mediated by S-adenosylhomocysteine. *FEBS Lett*, 2007. **581**(24): p. 4567-70.
134. Borowiec, A., et al., Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochim Pol*, 2006. **53**(2): p. 269-78.
135. Derave, W., et al., Plasma guanidino compounds are altered by oral creatine supplementation in healthy humans. *J Appl Physiol (1985)*, 2004. **97**(3): p. 852-7.

136. Deminice, R., et al., Creatine supplementation reduces increased homocysteine concentration induced by acute exercise in rats. *Eur J Appl Physiol*, 2011. **111**(11): p. 2663-70.
137. Bereket-Yucel, S., Creatine supplementation alters homocysteine level in resistance trained men. *J Sports Med Phys Fitness*, 2015. **55**(4): p. 313-9.
138. Waldmann, A., et al., Homocysteine and cobalamin status in German vegans. *Public Health Nutr*, 2004. **7**(3): p. 467-72.
139. Anderson, C.A., et al., Effects of folic acid supplementation on serum folate and plasma homocysteine concentrations in older adults: a dose-response trial. *Am J Epidemiol*, 2010. **172**(8): p. 932-41.
140. Roschel, H., et al., Creatine supplementation spares muscle glycogen during high intensity intermittent exercise in rats. *J Int Soc Sports Nutr*, 2010. **7**(1): p. 6.
141. Adhihetty, P.J. and M.F. Beal, Creatine and its potential therapeutic value for targeting cellular energy impairment in neurodegenerative diseases. *Neuromolecular Med*, 2008. **10**(4): p. 275-90.
142. Willoughby, D.S. and J. Rosene, Effects of oral creatine and resistance training on myosin heavy chain expression. *Med Sci Sports Exerc*, 2001. **33**(10): p. 1674-81.
143. Hespel, P., et al., Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. *J Physiol*, 2001. **536**(Pt 2): p. 625-33.
144. Deldicque, L., et al., Increased IGF mRNA in human skeletal muscle after creatine supplementation. *Med Sci Sports Exerc*, 2005. **37**(5): p. 731-6.

145. Francaux, M. and J.R. Poortmans, Side effects of creatine supplementation in athletes. *Int J Sports Physiol Perform*, 2006. **1**(4): p. 311-23.
146. Gualano, B., et al., Creatine supplementation does not impair kidney function in type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Eur J Appl Physiol*, 2011. **111**(5): p. 749-56.
147. Souza, R.A., et al., Effects of high-dose creatine supplementation on kidney and liver responses in sedentary and exercised rats. *J Sports Sci Med*, 2009. **8**(4): p. 672-81.
148. Schottker, B., et al., Strong associations of 25-hydroxyvitamin D concentrations with all-cause, cardiovascular, cancer, and respiratory disease mortality in a large cohort study. *Am J Clin Nutr*, 2013. **97**(4): p. 782-93.
149. Brondum-Jacobsen, P., et al., 25-hydroxyvitamin d levels and risk of ischemic heart disease, myocardial infarction, and early death: population-based study and meta-analyses of 18 and 17 studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(11): p. 2794-802.
150. Dobnig, H., et al., Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med*, 2008. **168**(12): p. 1340-9.
151. Kunadian, V., et al., Vitamin D deficiency and coronary artery disease: a review of the evidence. *Am Heart J*, 2014. **167**(3): p. 283-91.
152. Carvalho, L.S. and A.C. Sposito, Vitamin D for the prevention of cardiovascular disease: Are we ready for that? *Atherosclerosis*, 2015. **241**(2): p. 729-40.
153. Chan, J., K. Jaceldo-Siegl, and G.E. Fraser, Serum 25-hydroxyvitamin D status of vegetarians, partial vegetarians, and nonvegetarians: the Adventist Health Study-2. *Am J Clin Nutr*, 2009. **89**(5): p. 1686S-1692S.

154. Craig, W.J., Health effects of vegan diets. *Am J Clin Nutr*, 2009. **89**(5): p. 1627S-1633S.
155. Outila, T.A., et al., Dietary intake of vitamin D in premenopausal, healthy vegans was insufficient to maintain concentrations of serum 25-hydroxyvitamin D and intact parathyroid hormone within normal ranges during the winter in Finland. *J Am Diet Assoc*, 2000. **100**(4): p. 434-41.
156. Sanders, T.A. and S. Reddy, Vegetarian diets and children. *Am J Clin Nutr*, 1994. **59**(5 Suppl): p. 1176S-1181S.

ANEXO I – Parecer do CEP

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Instituto Nacional de Cardiologia – INC

PROJETO DE PESQUISA

Título: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA SOBRE A HOMOCISTEINEMIA E FUNÇÃO ENDOTELIAL MICROVASCULAR SISTÊMICA DE INDIVÍDUOS DIABÉTICOS

Área Temática:

Pesquisador: Eduardo Vera Tibiriçá

Instituição: Instituto Nacional de Cardiologia - INC

Versão: 3

CAAE: 02471512.4.0000.5272

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 53301

Data da Relatoria: 03/07/2012

Apresentação do Projeto:

A suplementação de creatina promovendo alterações morfológicas e funcionais no músculo esquelético vem estimulando seu uso cotidiano entre atletas para que melhorem seu rendimento físico-esportivo. Estudos recentes vêm demonstrando o potencial terapêutico deste procedimento dietético em diferentes condições fisiopatológicas como diabetes, miopatias, cardiopatias, doença obstrutiva pulmonar e doenças neurodegenerativas. Os possíveis benefícios clínicos da suplementação com creatina incluem o aumento da captação de glicose pela fibra muscular, ativação dos processos de síntese e supressão das vias de degradação proteica, além de ação anti-oxidante e anti-apoptótica, que preserva a função de diferentes tecidos do organismo humano.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar as alterações na função endotelial microvascular sistêmica provocadas pela suplementação com creatina em indivíduos diabéticos em

comparação com indivíduos saudáveis através da utilização de fluxometria microcirculatória com luz laser.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

No projeto os autores relatam que a suplementação diária durante uma semana com a forma mono-hidratada da creatina nas doses propostas no presente estudo tem se mostrado segura e isenta de efeitos colaterais e refere que os únicos riscos do estudo estão relacionados à coleta de sangue e a pequeno eritema no local da fluxometria a laser, inerentes ao procedimento (eventual formação de coleção de sangue, manchas roxas e dor no local da punção). Em relação ao procedimento de fluxometria laser da microcirculação cutânea, pode haver vermelhidão no local de posicionamento dos eletrodos e formigamento passageiro.

Entretanto medidas preventivas durante a realização dos exames serão tomadas para minimizar qualquer risco ou incômodo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente estudo é pertinente e pretende contribuir para a melhor compreensão da ação da creatina na função endotelial. Entretanto, na proposição inicial, a descrição não fazia menção, tanto na introdução do estudo quanto na referência a possíveis riscos de lesão renal, especialmente tratando-se de sujeitos de pesquisa com Diabetes Mellitus, doença que compromete, em seu desenvolvimento, a função renal, ainda que estudos recentes não demonstrem dano em pacientes diabéticos que não tenham comprometimento renal. O pesquisador, em sua última versão apresentada, fez as ressalvas necessárias e explícitas, como convém.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Na primeira versão do TCLE não se observava, de modo explícito, que pacientes diabéticos com qualquer comprometimento renal não poderiam participar do estudo. O que foi corrigido na última versão apresentada.

Recomendações:

Que os resultados sejam encaminhados ao CEP a cada trimestre para apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Pendências atendidas

Projeto APROVADO

RIO DE JANEIRO, 10 de Julho de 2012

Monica Moura de Vasconcellos

ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação

Título do Projeto: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA SOBRE A HOMOCISTEINEMIA E FUNÇÃO ENDOTELIAL MICROVASCULAR SISTÊMICA DE INDIVÍDUOS VEGETARIANOS ESTRITOS.

Pesquisadores Responsáveis: Diogo Van Bavel, Roger de Moraes e Eduardo Tibiriçá

Instituição a que pertencem os Pesquisadores Responsáveis: Instituto Nacional de Cardiologia

Telefones para contato: (21) 2285-3344 - (21) 9606-6098 (Roger de Moraes) – (21) 98612-9412 (Diogo Van Bavel) - (21) 9914-6075 (Eduardo Tibiriçá)

Nome do voluntário:

Idade: ____ ano de nascimento: / /

R.G. _____

O Senhor (a) está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa “EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA SOBRE A HOMOCISTEINEMIA E FUNÇÃO ENDOTELIAL MICROVASCULAR SISTÊMICA DE INDIVÍDUOS VEGETARIANOS ESTRITOS” de responsabilidade dos pesquisadores Diogo Van Bavel, Roger de Moraes e Eduardo Tibiriçá.

- Objetivo do Estudo:

O Objetivo do estudo é investigar o efeito da suplementação alimentar de três semanas com creatina sobre a sua circulação sanguínea. A creatina é um composto derivado de substâncias proteicas, que interfere no metabolismo da homocisteína, aminoácido que tende a ficar elevado no sangue de indivíduos vegetarianos. A creatina pode reduzir o acúmulo de homocisteína e prover benefícios vasculares importantes que ajudariam a prevenir doenças cardiovasculares.

Para a realização desse estudo os seguintes procedimentos e exames serão realizados:

- Exame físico que incluirá a medição de peso, altura para o cálculo do índice de massa corporal.
- Medição da Pressão arterial
- Coleta de amostra de sangue onde serão examinados os níveis de: glicose, ureia, creatinina, colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, homocisteína, fibrinogênio, proteína C reativa e creatinofosfoquinase. Na coleta de sangue, que será realizada no laboratório do Instituto Nacional de Cardiologia, será necessário realizar uma punção com uma agulhada (material cortante) e você poderá sentir uma fisgada.
- Exame do fluxo microvascular na pele através de fluxometria laser Doppler, com aplicação tópica de vasodilatador (acetilcolina) sem administração sistêmica de medicamentos. Nenhuma substância será injetada e você não sentirá nenhuma dor ou desconforto, o exame exige somente que fique deitado durante 30 minutos sem se movimentar muito para que a medida do funcionamento dos vasos seja feita.
- Exame da perfusão/ densidade capilar da pele do dorso da falange através de microscopia intravital, com aplicação de substância oleosa, inerte, própria para facilitar a visualização dos capilares.

. Você tomará 5g uma vez ao dia durante três semanas e voltará ao hospital para reavaliarmos. As informações obtidas sobre você e os materiais biológicos recolhidos para os fins deste estudo só serão utilizados para os objetivos do estudo.

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Você tem o direito de deixar este estudo em qualquer momento. A recusa em participar ou a interrupção do estudo não resultarão em nenhuma penalidade ou perda de benefícios a que você possui.

Eu, _____, RG nº _____
declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de _____.

Nome e assinatura do Investigador principal

Nome e assinatura do participante

ANEXO III - ANAMNESE

INFORMAÇÕES SOBRE OS VOLUNTÁRIOS
PROJETO: “EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA SOBRE A
HOMOCISTEÍNA E A FUNÇÃO ENDOTELIAL MICROVASCULAR SISTÊMICA DE
INDIVÍDUOS VEGETARIANOS ESTRITOS”

1) DADOS PESSOAIS**Nome:****Data de nascimento:****Sexo:** M () F ()**Telefone:****Celular:****Profissão:****Endereço:****CEP:****Email:****2) INFORMAÇÕES SOBRE A SAÚDE GERAL**

A) Antecedentes Familiares de:

Diabetes: I () II () Não ()

Hipertensão: sim () Não ()

B) Faz uso de algum medicamento?

C) Faz uso de algum suplemento?

D) Possui alguma doença?

E) Já realizou alguma cirurgia?

Antecedentes Pessoais:**Tabagista:** Nunca () Ex-fumante há ____ anos Fumante ()

Etilista: Não () Sim () Se sim: Social () Diário ()

Exercícios Físicos: Sim () Não () Regular () Esporádico ()

Tipo de Atividade:

Qual regularidade:

Duração:

3) INFORMAÇÕES ACERCA DA DIETA

A) Há quanto tempo não consome carne?

B) Consome leite ou derivados?

C) Qual tipo de vegetariano você é?

D) Descreva de um modo geral em que consiste sua dieta.

ANEXO IV – Certificado de Pureza do Suplemento Creatina

FAGRON

CERTIFICADO DE ANÁLISES DO CONTROLE DE QUALIDADE

Pagina 10/27
Impressão 25/05/16 14:39

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.01284-7
Aut. Especial de Funcionamento M.S.: 1.10238-0

NF. 135.294 de 25/05/2016

Insumo: **CREATINA MONOHIDRATADA M 200**

Lote : 16A27-B004-001561 Origem : China Fabric : 15/10/2015
Lote Fab: 20151015 Procedencia : HONG HONG Validade : 14/10/2017
Formula : C4 H9 N3 O2,H2O PM : 149,15 Frac : 1561 11/02/2016
CAS : 6020-87-7


Ensaio	Especificação	Resultado	Referencia
* DESCRIÇÃO	PÓ CRISTALINO BRANCO A QUASE BRANCO	CONFORME	FABRICANTE
* PERDA POR DESSECAÇÃO	MÁXIMO: 12,0 (PESO CONSTANTE/ 105°C)	10,82%	FABRICANTE
* CLARIDADE E COR DA SOLUÇÃO	A SOLUÇÃO É CLARA E INCOLOR	CONFORME	FABRICANTE
* RESÍDUO POR IGNIÇÃO	MÁXIMO: 0,1%	0,08%	FABRICANTE
* SULFATO	MÁXIMO: 0,03 ppm	< 0,003 ppm	FABRICANTE
* CREATININA	MÁXIMO: 100 ppm	12,712 ppm	FABRICANTE
* DICIANAMIDA	MÁXIMO: 20 ppm	17,128 ppm	FABRICANTE
* METAIS PESADOS	MÁXIMO: 10 ppm	< 10 ppm	FABRICANTE
* ARSÊNIO	MÁXIMO: 1 ppm	NÃO DETECTADO	FABRICANTE
* CHUMBO	MÁXIMO: 3 ppm	0,430 ppm	FABRICANTE
* CÁDMIO	MÁXIMO: 1 ppm	0,019 ppm	FABRICANTE
* MERCÚRIO	MÁXIMO: 0,1 ppm	0,074 ppm	FABRICANTE
* TEOR	MÍNIMO: 99,5%	100,0%	FABRICANTE
* MICROBIOLOGIA	CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS: MÁXIMO 1000 UFC/g	< 10 UFC/g	FABRICANTE
* MICROBIOLOGIA	FUNGOS E LEVEDURAS: MÁXIMO 100 UFC/g	< 10 UFC/g	FABRICANTE
* MICROBIOLOGIA	ESCHERICHIA COLI: NEGATIVO	NEGATIVO	FABRICANTE
* MICROBIOLOGIA	SALMONELLA: NEGATIVO	NEGATIVO	FABRICANTE
* MICROBIOLOGIA	STAPHYLOCOCCUS: NEGATIVO	NEGATIVO	FABRICANTE
* MICROBIOLOGIA	COLIFORMES: NEGATIVO	NEGATIVO	FABRICANTE
* DENSIDADE APARENTE	INFORMATIVO (SEM COMPACTAÇÃO)	0,49 h/mL	MÉT. GERAL FB V

NOMENCLATURA : CREATINA MONOHIDRATADA M 200

Ficha de Segurança

SEGURANÇA : ACONDICIONAR EM RECIPIENTES HERMÉTICOS, AO ABRIGO DA LUZ, CALOR E UMIDADE. TEMPERATURA AMBIENTE.

OBS: (*) Os ensaios assinalados foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA CNPJ: 44.015.477/0006-20 e os demais ensaios foram transcritos conforme o Certificado de Análise do Fabricante


 Dra. Shirlei Conti Teruya de Sales
 Farmacêutica Responsável Técnica
 CRF-SP:65.711

Aprovado
 Reprovado

SM EMPREENDIMENTOS FARMACEUTICOS LTDA

R Jose Semiao Rodrigues Agosti,1370 Fone 11 4785-5600
Cep 06833-300 Centro Log. Embu - SP www.fagron.com.br