

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

DOUTORADO EM MEDICINA

JOSÉ ANTÔNIO JANUÁRIO NEVES

**AUMENTO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE LEUCOTRIENO B4 EM
INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 E NEUROPATIA AUTONÔMICA
CARDIOVASCULAR**

SÃO PAULO

2020

JOSÉ ANTÔNIO JANUÁRIO NEVES

**AUMENTO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE LEUCOTRIENO B4 EM
INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 E NEUROPATIA AUTONÔMICA
CARDIOVASCULAR**

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho –
UNINOVE, para obtenção do título de Doutor em
Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa
Giannella.

SÃO PAULO

2020

Neves, José Antônio Januário.

Aumento das concentrações plasmáticas de leucotrieno B4 em indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 e neuropatia autonômica cardiovascular. / José Antônio Januário Neves. 2020.

75 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella.

1. Neuropatia Autonômica Cardiovascular. 2. Diabetes Mellitus.
3. Complicações Crônicas. 4. Inflamação. 5. Leucotrieno B4.

I. Corrêa-Giannella, Maria Lúcia Cardillo. II. Título.

CDU 616



São Paulo 24 de março de 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: **JOSÉ ANTÔNIO JANUÁRIO NEVES**

Titulo da tese: **AUMENTO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE LEUCOTRIENO B4 EM INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 E NEUROPATIA AUTÔNOMICA CARDIOVASCULAR.**

Presidente: **PROFA. DRA. MARIA LÚCIA CARDILLO CORRÊA GIANNELLA**

Membro: **PROFA. DRA. MÁRCIA SILVA QUEIROZ**

Membro: **PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI**

Membro: **PROFA. DRA. MARCIA NERY**

Dedico esse trabalho:

- ◆ Ao Oziel Mendes de Paiva Júnior, por todo suporte nesse período de dedicação aos estudos e por me estimular a vencer as dificuldades de maneira tão carinhosa e companheiro de todas as horas.
- ◆ Ao meu Pai, Sebastião Januário Neves, por sempre ter sido meu maior incentivador para os estudos e trabalho sérios. A alegria dele em cada pequena vitória sempre foi um ânimo à mais para eu continuar sempre.
- ◆ À minha Mãe, Maria da Penha Neves (*in memoriam*), pelo Amor incondicional e amizade que só um coração materno pode ter.
- ◆ Às minhas Tias muito amadas, que sempre foram meu suporte e carinho sem limites.
- ◆ Aos Primos mais próximos, em especial Sandra, Tom, Taís, Robson, e os seus filhos, que são minha alegria.
- ◆ À Kátia, amiga e irmã de todas as horas, e à família que construímos juntos.
- ◆ Aos amigos, em especial aqueles que passaram a fazer parte da minha família do coração.
- ◆ Ao Professor Dr. Daniel Giannella Neto (*in memoriam*), por ter me apresentado um mundo que, antes, parecia ser inalcançável e ter acreditado em mim. Sinto falta das nossas conversas, regadas com café, quando falávamos de ciências da saúde, sociais e com uma grande pitada de bom humor e saborosas risadas.
- ◆ A Deus, “inteligência suprema, causa primária de todas as coisas” (Alan Kardec).

Agradecimentos

- ◆ À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella, que foi um exemplo de *expertise* científico com muito carinho e palavras de estímulo nos momentos mais difíceis.
- ◆ À minha amiga e, agora, doutora, Mozânia Reis de Matos, que me auxiliou e foi meu suporte na pesquisa.
- ◆ À Professora Sônia Jancar e à Dra. Theresa Ramalho, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela dosagem do leucotrieno e das citocinas, fundamental para a realização desse projeto.
- ◆ À Dra. Daniele Pereira Santos-Bezerra, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela realização das análises estatísticas.
- ◆ À Universidade Nove de Julho, UNINOVE, que sempre deu condições para um trabalho de pesquisa de qualidade de qualidade excepcional.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica complexa que se associa a elevadas taxas de morbidade e mortalidade devido às suas complicações crônicas, que envolvem, entre outras coisas, uma inflamação crônica de baixo grau. Dentre as complicações crônicas, a neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) caracteriza-se pelo comprometimento do controle autonômico cardiovascular secundariamente ao dano nas fibras autonômicas responsáveis pela inervação do coração e dos vasos sanguíneos. Essa complicação aumenta a incidência de desfechos cardiovasculares desfavoráveis. Devido à importância do sistema nervoso autonômico na modulação da inflamação (o reflexo inflamatório é um mecanismo fisiológico pelo qual o nervo vago regula a função imunológica e inibe a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias) e dada a participação da inflamação no desenvolvimento das complicações crônicas do DM, o presente projeto teve o objetivo primário de avaliar se as concentrações plasmáticas de fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)10 (IL10), IL1 β e leucotrieno B4 (LTB4) diferiam entre indivíduos com DM2 com diferentes graus de NAC. O objetivo secundário foi correlacionar as concentrações desses marcadores inflamatórios com o grau de controle glicêmico e de resistência à insulina. Um total de 129 indivíduos (62% de mulheres com idade mediana [intervalo interquartil] de 63 [59-67] anos com duração de doença de 8 [4-15] anos e HbA1c de 7,3 [6,3-9,1] %) foram selecionados e divididos em três grupos: 44 sem NAC, 41 com NAC incipiente (dois grupos considerados sem NAC instalada) e 44 indivíduos com NAC instalada. Dados demográficos, clínicos e bioquímicos foram levantados, e amostras de sangue foram coletadas para a dosagem de TNF, IL10, IL1 β e LTB4 por ensaio imuno enzimático. O *Lipid accumulation product* (LAP) foi calculado como um “surrogate marker” da resistência à insulina. O diagnóstico de NAC foi realizado pelos Testes de Ewing combinados com a análise espectral da Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC). Houve um aumento das concentrações plasmáticas de TNF e de LTB4 no grupo de indivíduos com NAC instalada em comparação aos sem NAC instalada, enquanto a citocina anti-inflamatória IL10 foi menor no grupo de indivíduos com NAC instalada. Essas diferenças perderam a significância estatística para o TNF e para a IL10 após o ajuste para outras variáveis, mas não para o LTB4 (média \pm desvio-padrão: 63,1 \pm 16,4 *versus* 71,5 \pm 15,7; $P=0,016$; sem NAC instalada *versus* com NAC instalada, respectivamente). As concentrações plasmáticas de LTB4

apresentaram uma fraca correlação, no limite da significância estatística, com o índice LAP apenas no sexo feminino. Em conclusão, as concentrações plasmáticas de LTB4 foram significativamente maiores em indivíduos com DM tipo 2 com NAC instalada em comparação àqueles sem NAC instalada.

Palavras-chave: Neuropatia Autonômica Cardiovascular; Diabetes Mellitus; Complicações Crônicas; Inflamação; Leucotrieno B4.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a complex chronic disease associated with high morbidity and mortality due to its chronic complications, which involve, among other things, low-grade chronic inflammation. Among the chronic complications, cardiovascular autonomic neuropathy (NAC) is characterized by impairment of the cardiovascular autonomic control secondary to damage to the autonomic fibers responsible for the innervation of the heart and blood vessels. This complication increases the incidence of unfavorable cardiovascular outcomes. Due to the importance of the autonomic nervous system in the modulation of inflammation (the inflammatory reflex is a physiological mechanism by which the vagus nerve regulates the immune function and inhibits the excessive production of pro-inflammatory cytokines) and given the participation of inflammation in the development of diabetes chronic complications, the present project had the primary objective of evaluating whether plasma concentrations of tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL) 10 (IL10), IL1 β and leukotriene B4 (LTB4) differed between individuals with Type 2 diabetes (T2D) with different degrees of NAC. The secondary objective was to correlate the concentrations of these pro-inflammatory markers with the degree of glycemic control and insulin resistance. A total of 129 individuals (62% women with a median age [interquartile range] of 63 [59-67] years with a disease duration of 8 [4-15] years and HbA1c of 7.3 [6.3-9.1]%) were selected and divided into three groups: 44 without NAC, 41 with incipient NAC (two groups considered without definitive NAC) and 44 individuals with definitive NAC. Demographic, clinical, and biochemical data were collected, and blood samples were taken to measure TNF, IL10, IL1 β and LTB4 by enzyme immunoassay. The Lipid accumulation product (LAP) was calculated as a surrogate marker of insulin resistance. The diagnosis of CAN was performed by the Ewing Tests combined with the spectral analysis of Heart Rate Variability (HRV). There was an increase in plasma concentrations of TNF and LTB4 in the group of individuals with definitive NAC compared to those without definitive NAC, while the anti-inflammatory cytokine IL10 was lower in the group of individuals with definitive NAC. These differences lost statistical significance for TNF and IL10 after adjusting for other variables, but not for LTB4 (mean \pm standard deviation: 63.1 \pm 16.4 *versus* 71.5 \pm 15.7; $P = 0.016$; without definitive NAC *versus* with definitive NAC, respectively). Plasmatic concentrations of LTB4 presented a weak borderline correlation with LAP only in

women. In conclusion, LTB₄ plasmatic concentrations were significantly higher in individuals with T2D with definitive NAC compared to those without definitive NAC.

Key words: Cardiovascular Autonomic Neuropathy; Diabetes Mellitus; Chronic Complications; Inflammation; Leukotriene B₄.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A relação do <i>status</i> inflamatório com a etiopatogenia do DM	19
Figura 2. Via anti-inflamatória colinérgica	26
Figura 3. Concentrações plasmáticas de fator de necrose tumoral (TNF) em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 de acordo com o <i>status</i> de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC).	46
Figura 4. Concentrações plasmáticas de interleucina 10 (IL10) em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 de acordo com o <i>status</i> de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC).	46
Figura 5. Concentrações plasmáticas de interleucina 1 β (IL1 β) em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 de acordo com o <i>status</i> de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC). Os dados estão expressos em log na base 10.	47
Figura 6. Concentrações plasmáticas de leucotrieno B4 (LTB4) em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 de acordo com o <i>status</i> de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC)	48
Figura 7. Correlação entre os valores do índice <i>Lipid accumulation product</i> (LAP) e as concentrações plasmáticas de leucotrieno (LTB4) em mulheres com diabetes mellitus tipo 2 com ou sem neuropatia autonômica cardiovascular.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais manifestações clínicas da neuropatia autonômica cardiovascular (adaptado de Gastoł J e cols., 2019).	23
Tabela 2. Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 participantes do estudo.	42
Tabela 3. Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 classificados de acordo com o <i>status</i> da neuropatia autonômica cardiovascular (NAC).	43
Tabela 4. Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 classificados de acordo com o <i>status</i> da neuropatia autonômica cardiovascular (NAC).	44
Tabela 5. Concentrações dos marcadores inflamatórios de acordo com o <i>status</i> da neuropatia autonômica cardiovascular (NAC).	45
Tabela 6. Valores de <i>P</i> das concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios entre os grupos de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 com e sem neuropatia autonômica cardiovascular instalada.	48
Tabela 7. Correlações entre os marcadores inflamatórios e variáveis relacionadas à resistência à insulina e ao controle glicêmico.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ACh	Acetilcolina
AGEs	Produtos Finais de Glicação Avançada
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CA	Circunferência Abdominal
DCV	Doença Cardiovascular
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DRD	Doença Renal Diabética
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESF	Estratégia Saúde da Família
EUA	Estados Unidos da América
FLAP	Proteína ativadora da lipoxigenase
GAPDH	gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidade
HF	<i>High frequency</i>
HIPERDIA	Hipertensão e Diabetes
HO	Hipotensão Ortostática
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IC	intervalo de confiança
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IL	Interleucina
IL1RN	Antagonista do receptor da IL1
IMC	Índice de Massa Corpórea
IRS1	Substrato 1 do receptor de insulina
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LAP	<i>Lipid accumulation product</i>
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LF	<i>Low frequency</i>
LOX5	5-lipoxigenase
LPA	<i>Lipid accumulation product</i>
LTA4	Leucotrieno A4
LTB4	Leucotrieno B4
α -MSH	hormônio estimulador de melanócitos
NAC	Neuropatia Autonômica Cardiovascular
ND	Neuropatia Diabética

NDS	Escore de Comprometimento Neuropático
NFkB	Fator Nuclear kappa B
NK	<i>Natural Killer</i>
NSS	Escore de Sintomas Neuropáticos
O ₂ ⁻	ânion superóxido
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	Proteína C-reativa
PKC	Proteína cinase C
PSD	Polineuropatia Simétrica Distal
RD	Retinopatia Diabética
sICAM	Molécula de adesão intercelular solúvel
SNP	Sistema Nervoso Parassimpático
SNS	Sistema Nervoso Simpático
TAB	Tecido Adiposo Branco
Th	<i>T helper</i>
TNFR	Receptor de TNF
UBS	Unidade Básica de Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TFGe	Taxa de Filtração Glomerular Estimada
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UNINOVE	Universidade Nove de Julho
VLF	<i>Very low frequency</i>
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
°	grau
g	gramas
=	igual a
<	menor que
>	maior que
≤	menor ou igual a
≥	maior ou igual a
cm	centímetro
Kg	quilogramas
mmHg	milímetros de mercúrio
mg	miligrama
mL	mililitro
Hz	Hertz

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Etiopatogenia do DM2.....	18
1.2. Complicações crônicas do DM.....	20
1.2.1. Etiopatogenia	20
1.2.2. Complicações microvasculares	21
1.3. Neuropatia autonômica cardiovascular	22
1.3.1. Neuropatia autonômica cardiovascular e inflamação	25
1.4. Citocinas pró-inflamatórias.....	27
1.4.1. Fator de Necrose Tumoral.....	27
1.4.2. Interleucina 1 β e Interleucina 10	28
1.4.3. Leucotrienos.....	28
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo primário	32
3.2. Objetivo secundário	32
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	33
4.1. Casuística	33
4.2. Métodos	34
4.2.1. Variáveis coletadas	34
4.2.2. Diagnóstico de neuropatia autonômica cardiovascular	36
4.2.3. Metodologia de dosagens dos marcadores inflamatórios.....	38
4.2.4. Análises estatísticas	39

5. RESULTADOS	41
5.1. Características da população de acordo com o status de NAC	41
5.2. Concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios de acordo com o status de NAC.....	45
5.2.1. Fator de necrose tumoral	45
5.2.2. Interleucina 10.....	46
5.2.3. Interleucina 1 β	47
5.2.4. Leucotrieno B4	47
5.3. Correlações entre os marcadores inflamatórios e variáveis relacionadas à resistência à insulina e ao controle glicêmico.....	49
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÕES.....	56
8. BIBLIOGRAFIA	57
9. APÊNDICES	63
9.1. Apêndice 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE 63	
10. ANEXOS	69
10.1. Anexo 1 – Parecer Consubstanciado do CEP da UNINOVE.	69
10.2. Anexo 2 – Parecer Consubstanciado do CEP da Secretaria Municipal de Saúde da Cidade de São Paulo.....	70

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica complexa desencadeada por fatores ambientais, genéticos (doença poligênica), imunológicos e epigenéticos que possuem importante papel na patogênese, no curso clínico e no aparecimento das complicações crônicas^{1, 2, 3}.

O DM cursa com hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina associados ou não a resistência à ação deste hormônio. A classificação atual considera quatro tipos de DM: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), DM gestacional e outros tipos específicos de DM. O DM1 é a principal causa de DM na infância, mas pode ocorrer em qualquer idade. Ele cursa com deficiência absoluta ou quase absoluta de insulina e requer insulinoterapia. O DM2, por sua vez, resulta da deficiência de insulina associada à resistência a ação desse hormônio é o responsável por cerca de 90% dos casos de DM^{1, 2}.

O DM2 se constitui em um importante problema de saúde pública em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. A prevalência do DM continua aumentando globalmente e, em muitos países considerados menos desenvolvidos, sua taxa subiu para 10% na população geral².

Segundo a 9ª edição do *International Diabetes Federation Diabetes Atlas*, o DM é uma das emergências de saúde no mundo que mais crescem no século XXI. Estimou-se que 463 milhões de pessoas tinham DM em 2019, e esse número deverá atingir 578 milhões em 2030 e 700 milhões em 2045. O Brasil ocupa o quinto lugar entre os países com maior número de pessoas adultas (20 a 79 anos) portadoras de DM, 16,8 milhões, e estima-se que esse número aumente para 21,5 milhões em 2030 e para 26 milhões em 2045².

Além dos enormes gastos com saúde, o DM está associado a elevadas taxas de morbidade e mortalidade, devido às suas complicações crônicas. Foi estimado que 4,2 milhões de adultos no mundo, com idades entre 20 e 79 anos (faixa etária profissionalmente ativa), morreram como resultado do DM e de suas complicações em 2019, o equivalente a uma morte a cada oito segundos. O DM foi associado a 11,3% das mortes globais por todas as causas entre as pessoas nessa faixa etária,

no mesmo período. Essa taxa de mortalidade é muito maior nos países mais pobres, sendo o DM o principal determinante de óbito por doença cardiovascular (DCV)².

1.1. Etiopatogenia do DM2

A resistência à insulina desempenha papel primordial no desenvolvimento do DM2 e já se encontra presente antes de seu diagnóstico, mas para que essa condição clínica se estabeleça também é necessária a disfunção na secreção de insulina pelas células-beta pancreáticas. A resistência à insulina está intimamente associada com a obesidade visceral, enquanto a disfunção da célula-beta é considerada o componente herdado do DM2⁴.

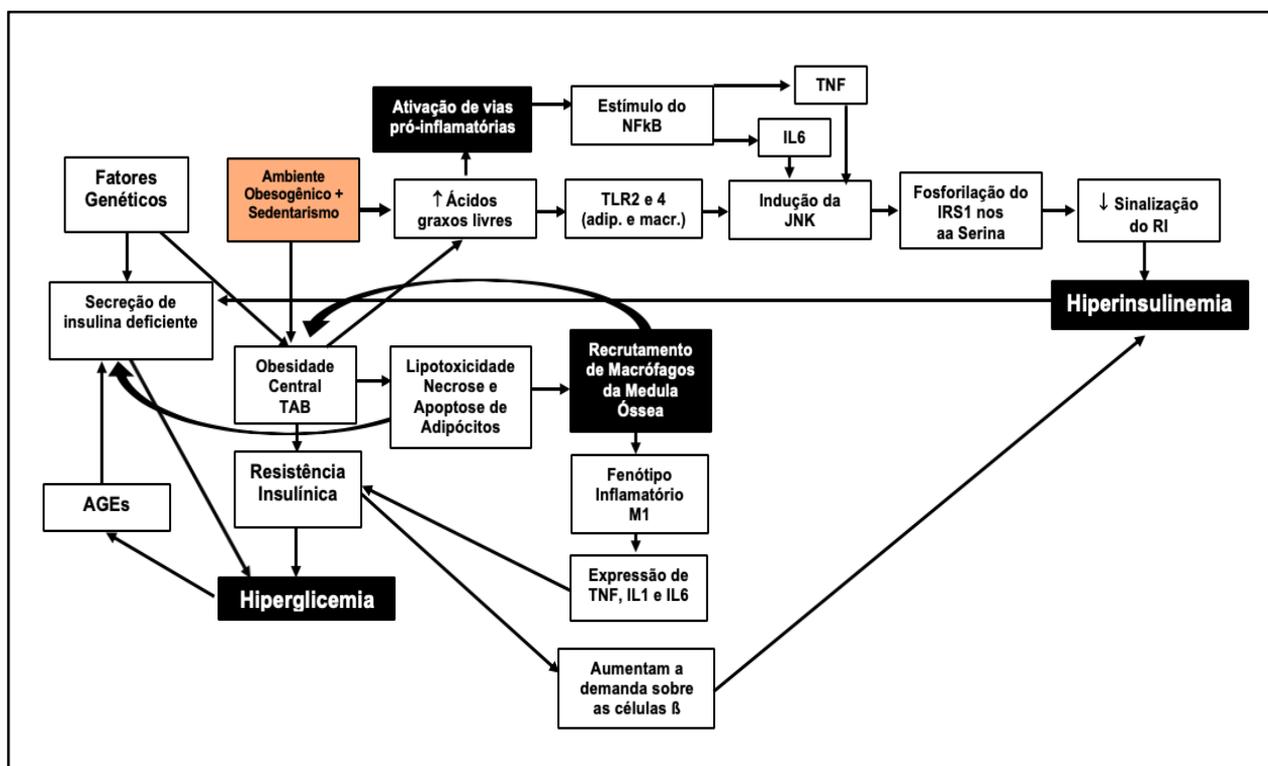
A exposição a um ambiente obesogênico, com consumo excessivo crônico de nutrientes e com gasto energético insuficiente, excede a capacidade de armazenamento de glicogênio e triglicerídeos pelos tecidos responsáveis pela metabolização destas substâncias, como fígado, músculo e tecido adiposo branco (TAB). Com isso, outros tecidos são expostos a concentrações suprafisiológicas desses nutrientes, onde exercem efeitos deletérios. Os ácidos graxos saturados, por exemplo, podem se ligar a receptores que participam do reconhecimento de patógenos e imunidade inata, os receptores *Toll-like* (TLR) 2 e 4, especialmente em adipócitos e macrófagos. A consequente indução da c-Jun N-terminal kinase (JNK) resulta na fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS1) nos aminoácidos serina (em vez da tirosina, que é fosforilada sob condições fisiológicas), diminuindo a sinalização do receptor de insulina. A ativação da via pró-inflamatória também estimula o fator de transcrição pró-inflamatório Fator nuclear kappa B (NFkB), resultando na produção de citocinas inflamatórias, como o Fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina (IL) 6. Essas citocinas amplificam a via de sinalização de JNK e contribuem ainda mais para a sinalização prejudicada através do receptor de insulina^{5, 6, 7} (Figura 1).

Simultaneamente, a expansão do TAB secundária ao aumento da ingestão calórica, leva à necrose/apoptose de adipócitos hipertróficos e à liberação de grandes gotículas de gordura, que são tóxicas para as células circundantes e que estimulam o recrutamento de macrófagos da medula óssea, levando a um aumento significativo

dessas células no TAB de indivíduos obesos. Esses macrófagos, provavelmente estimulados por detritos celulares, assumem um fenótipo inflamatório, também conhecido como clássico ou M1, caracterizado pela expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL1 e IL6), que agravam a resistência à insulina⁵. Portanto, a etiopatogenia do DM2 está intimamente relacionada ao aumento da inflamação^{6, 7}.

A resistência à insulina aumenta a demanda sobre as células-beta pancreáticas, o que explica a hiperinsulinemia compensatória. No entanto, a disfunção secretória geneticamente determinada, especialmente em indivíduos com história familiar de DM2, acaba por cursar com redução na secreção de insulina e hiperglicemia⁸ (Figura 1).

Figura 1. A relação do *status* inflamatório com a etiopatogenia do DM.



AGEs: Produtos de Glicação Avançada; IL: Interleucina; IRS1: Substrato 1 do receptor de insulina; NFKB: Fator Nuclear kappa B; JNK: c-Jun N-terminal kinase; TLR: Receptor Toll-like; TAB: Tecido Adiposo Branco; TNF: Fator de Necrose Tumoral; RI: Receptor de Insulina. Adaptado de: Visceral adiposity syndrome, Lopes HF e cols.; AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift, Vlassara H e cols. e Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, Brownlee M.

1.2. Complicações crônicas do DM

A hiperglicemia crônica está associada ao desenvolvimento das complicações crônicas no DM, que afetam:

- Os vasos de grande calibre (macroangiopatia), causando as DCV (infarto agudo do miocárdio [IAM], acidente vascular cerebral [AVC] e doença vascular periférica)⁷ e,

- Os vasos de pequeno calibre (microangiopatia), causando retinopatia, doença renal e neuropatia diabéticas⁴.

1.2.1. Etiopatogenia

O controle glicêmico e a duração do DM são os mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento da microangiopatia diabética, mas o desenvolvimento e a progressão dessas complicações também são influenciados pela presença de outros fatores de risco, como a hipertensão arterial sistêmica (HAS), a dislipidemia, o tabagismo e o etilismo. Adicionalmente, a predisposição genética também desempenha um importante papel na suscetibilidade às complicações microvasculares⁹.

Quatro vias bioquímicas explicam o dano celular induzido pela hiperglicemia crônica: a via dos poliois, a via da hexosamina, a ativação da proteína cinase C (PKC) e a formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Essas vias são resultantes de “desvios” de compostos da via glicolítica, os quais se acumulam devido à inativação parcial de uma das enzimas dessa via, a gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH). Essa inibição é resultado do excesso de ânion superóxido (O_2^-), o qual é produzido secundariamente à sobrecarga mitocondrial imposta pela hiperglicemia. Portanto, a hiperglicemia resulta em estresse oxidativo, o qual é diretamente responsável pela ativação das vias acima mencionadas nas células mais suscetíveis às complicações crônicas, dentre elas as células endoteliais e as células mesangiais renais¹⁰.

As quatro vias bioquímicas mencionadas acima desencadeiam as complicações crônicas por vários mecanismos interrelacionados, dentre os quais,

piora do estresse oxidativo, produção de fatores de crescimento relacionados à neogênese e à expansão de matriz extracelular, produção de proteínas vasoconstritoras e pró-fibrinogênicas e ativação de vias pró-inflamatórias, como aquelas desencadeadas pelo aumento da expressão do fator de transcrição NFkB¹⁰ e pela ativação do inflamassoma NLRP3, que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias¹¹.

1.2.2. Complicações microvasculares

Todas as complicações crônicas do DM devem ser rastreadas no momento do diagnóstico do DM2, uma vez que, em muitos casos, não é possível saber a data do início da hiperglicemia, que pode permanecer assintomática por vários anos¹².

A doença renal diabética (DRD) é a segunda causa de terapia de reposição renal no Brasil (31%)¹³ e se caracteriza por modificações funcionais e estruturais desencadeadas pelo DM^{1, 12}. A retinopatia diabética (RD) é a principal causa de amaurose em indivíduos entre 16 e 64 anos. Estima-se que a RD afete cerca de 35 a 40% dos indivíduos com DM.

A neuropatia diabética (ND) é definida como “a presença de sintomas e/ou sinais de disfunção do nervo periférico em pessoas com DM após exclusão de outras causas”^{1, 12}. Embora a ND seja considerada a complicação microvascular mais comum, há uma dificuldade em estimar sua real prevalência. As possíveis causas para essa dificuldade são o fato de ser assintomática, de apresentar amplo espectro clínico e de não existir homogeneidade nos critérios diagnósticos¹.

A polineuropatia simétrica distal (PSD), uma das principais causas de úlceras nos pés diabéticos, é a forma mais prevalente de neuropatia periférica, variando de 16% a 87% em indivíduos com DM2 em diferentes estudos^{2, 14}, com maior prevalência quando indivíduos assintomáticos são considerados (45%)¹⁵. Os sintomas sensitivos são os mais comuns (queimação, parestesias, hiperestesia ou dor) e podem apresentar piora noturna. Eles se iniciam na parte distal dos membros inferiores, evoluindo de maneira ascendente, podendo, mais raramente, acometer membros superiores (padrão “bota e luva”). Sintomas negativos, como insensibilidade, não

costumam ser relatados pelos pacientes e estima-se que 50% dos pacientes acometidos sejam assintomáticos¹⁴.

A neuropatia periférica também pode atingir o sistema nervoso autonômico que inerva o trato gastrointestinal, o trato genitourinário e o sistema cardiovascular, além de poder causar disfunção sudomotora (diminuição da sudorese nas extremidades e aumento da sudorese, especialmente no rosto, pescoço e tronco), disfunção metabólica (diminuição da resposta simpática durante a hipoglicemia) e disfunção pupilar (redução da resposta reflexa da pupila)¹².

1.3. Neuropatia autonômica cardiovascular

A organização do controle fisiológico das funções do sistema nervoso autonômico depende da divisão em dois ramos principais, o sistema nervoso simpático (SNS) e o sistema nervoso parassimpático (SNP). A estimulação do SNS medeia respostas fisiológicas de luta e fuga que se manifestam como aumentos na frequência cardíaca (FC) e na pressão arterial (PA), mobilização de reservas de energia e aumento da excitação. Em contraste, a estimulação do SNP tende a produzir efeitos, em geral, opostos, como redução da FC e da contratilidade cardíaca¹⁶.

Os barorreceptores são importantes na função cardiovascular, pois percebem o estiramento na aorta com o aumento da PA e enviam sinais através do componente sensorial do nervo vago para o núcleo do trato solitário, na medula. A partir desse ponto, as fibras pré-sinápticas do SNS se projetam para o núcleo ventrolateral da medula, enquanto os neurônios pré-sinápticos do SNP se projetam para o núcleo ambíguo, também na medula. Portanto, o disparo coordenado de ambos os braços do sistema nervoso autonômico é necessário para responder às mudanças na PA^{16, 17}.

A neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) caracteriza-se pelo comprometimento do controle autonômico cardiovascular na presença do DM, após exclusão de outras causas¹⁸. Nessa condição ocorre dano nas fibras autonômicas responsáveis pela inervação do coração e dos vasos sanguíneos, levando à disfunção no controle da FC e na dinâmica vascular. Em geral, a NAC cursa com comprometimento inicial do SNP que, em estágios avançados, evolui para o comprometimento do SNS⁷.

Um dos primeiros nervos acometidos no curso da NAC é o nervo vago, responsável por 75% da atividade parassimpática de todo o organismo, inclusive da musculatura cardíaca. Assim, os sinais iniciais decorrem da predominância do SNS, como taquicardia e redução da variabilidade da FC. Conforme a neuropatia progride e o SNS também é afetado, o paciente pode desenvolver sintomas decorrentes da não adaptação da FC ao exercício (intolerância ao exercício) e, nas formas avançadas, sintomas de hipotensão ortostática (HO). Na Tabela 1 pode-se observar as principais manifestações clínicas da NAC⁷.

Tabela 1. Principais manifestações clínicas da neuropatia autonômica cardiovascular (adaptado de Gastol J e cols., 2019)¹⁹.

-
1. Taquicardia em repouso
 2. Intolerância ao esforço
 3. Sintomas de hipotensão ortostática
 4. Instabilidade cardiovascular em cirurgias
 5. Menor variabilidade da frequência cardíaca
 6. Disfunção do ventrículo esquerdo
 7. Isquemia miocárdica silenciosa
 8. Prolongamento do intervalo QT com predisposição a arritmias e morte súbita
-

Além disso, já se demonstrou que a predominância simpática crônica no início do quadro contribui para a remodelação e disfunção dos miócitos, que é um mecanismo independente para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca em pacientes com DM^{7, 20}.

A NAC pode estar presente ao diagnóstico do DM2 e sua prevalência aumenta com a idade e com a duração do DM. Dados sobre sua prevalência já no pré-diabetes são muito escassos. De acordo com um estudo epidemiológico com uma abordagem diagnóstica confiável (um dos problemas com esses estudos é o uso de critérios não estabelecidos), a prevalência em indivíduos com glicemia de jejum alterada e

tolerância à glicose diminuída combinados foi de 11,4%. Há dados que estimam que a prevalência da NAC em indivíduos com DM2 aumenta de 4,6% a 6% ao ano²¹.

A NAC aumenta o risco de mortalidade e de morbidade cardiovascular em indivíduos com DM2. Maser e cols. (2003) em um estudo de meta-análise (com artigos publicados em inglês de 1966 a 2001) que teve o objetivo de avaliar a relação entre NAC e risco de mortalidade em indivíduos com DM, encontraram uma associação entre a NAC e o aumento do risco de mortalidade, com um risco relativo de 3,45 (intervalo de confiança [IC] 95% 2,66-4,47; $p < 0,001$) (22). Em um estudo para determinar o valor preditivo de isquemia miocárdica silenciosa e NAC, em pacientes portadores de DM assintomáticos e com fatores de risco cardiovasculares adicionais, Valensi e cols. (2001) demonstraram que a presença de isquemia miocárdica silenciosa isoladamente não se associou ao aumento de eventos cardíacos graves em relação aos pacientes sem isquemia miocárdica silenciosa. No entanto, os pacientes com NAC tiveram frequência de eventos cardíacos graves significativamente maior que os pacientes sem NAC (8 de 33 vs. 3 de 42 pacientes; $P = 0,04$). Quando foi feito o ajuste para isquemia miocárdica silenciosa, houve associação significativa entre NAC e os principais eventos cardíacos ($P = 0,04$). Esses dados evidenciam que a NAC, isoladamente, é um importante fator preditivo de eventos cardíacos graves em indivíduos com DM²³.

A NAC está diretamente relacionada ao grau de controle glicêmico e associa-se com a PSD, com as demais complicações microangiopáticas e com a DCV. Idade mais avançada, obesidade e tabagismo são fatores de risco para redução da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) no DM2²⁴. A HAS e a dislipidemia também são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento da NAC¹⁴.

Para o diagnóstico e estadiamento da NAC, são utilizados testes não-invasivos que são sensíveis tanto para o SNS (acometimento mais tardio) quanto para o SNP (acometimento mais precoce) e que apresentam boa reprodutibilidade. A combinação dos Testes de Ewing com a avaliação da VFC por sistema computadorizado é reconhecida como bastante adequada para o diagnóstico de NAC²⁴.

A *American Diabetes Association* (ADA) recomenda três testes ambulatoriais, dos cinco classicamente descritos por Ewing, que são: teste de respiração profunda; teste de Valsalva e teste ortostático. Eles apresentam boa reprodutibilidade,

especificidade acima de 91% e sensibilidade de 93% (respiração profunda e ortostático) a 98% (Valsalva)¹².

O fato da NAC prever morbimortalidade evidencia a importância de reconhecer essa complicação nos indivíduos com DM, especialmente quando ela ainda está em sua fase incipiente, onde existe uma janela de oportunidade para o controle agressivo de todos os fatores de risco associados a essa complicação, frequentemente negligenciada¹⁶.

1.3.1. Neuropatia autonômica cardiovascular e inflamação

Conforme previamente mencionado, a inflamação desempenha um importante papel na etiopatogênese do DM²⁵ bem como no desenvolvimento das complicações crônicas¹⁰.

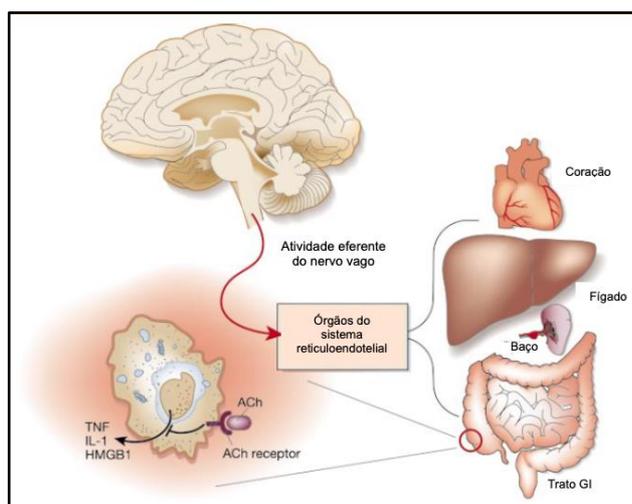
Embora a inflamação possa causar danos extensos aos tecidos, ela também é essencial para a proteção do hospedeiro e é um mecanismo de defesa contra trauma, infecções e estresse, entre outros agentes provocadores. No entanto, fisiologicamente, mecanismos contra-regulatórios altamente conservados limitam a resposta inflamatória aguda e previnem que os mediadores inflamatórios se disseminem para a circulação sistêmica. Alguns desses mecanismos são endócrinos, como os glicocorticoides e o hormônio estimulador de melanócitos (α -MSH), que inibem a síntese de citocinas e a transdução de sinal intracelular. Há ainda a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL10 e o fator de crescimento transformante β , que inibem especificamente a liberação de TNF e de outros mediadores pró-inflamatórios²⁵.

Um mecanismo de controle da inflamação menos conhecido na endocrinologia é aquele que envolve o sistema nervoso autonômico, conhecido como “via anti-inflamatória anticolinérgica”, no qual a ativação de macrófagos é inibida pelo SNP, por meio da acetilcolina, o principal neurotransmissor parassimpático. O nervo vago inerva os principais órgãos, inclusive aqueles que contêm o sistema retículo-endotelial (fígado, pulmão, baço, rins e intestino). O arco aferente da via anti-inflamatória anticolinérgica consiste em nervos que detectam compostos inflamatórios nos tecidos afetados. Esses nervos transmitem o sinal para o núcleo do trato solitário, onde haverá

a ativação da atividade eferente vagal, que resulta em liberação de acetilcolina nos órgãos do sistema retículo-endotelial. A acetilcolina interage com seus receptores nos macrófagos teciduais, e inibe a liberação de TNF, IL1 e outras citocinas (Figura 2). Essa via foi corroborada por experimentos que mostraram que a ativação do SNP por estimulação elétrica direta do nervo vago eferente inibia a síntese de TNF no fígado, baço e coração e reduzia as concentrações séricas de TNF durante a endotoxemia. Por outro lado, a vagotomia exacerba significativamente as respostas do TNF a agentes inflamatórios²⁵.

Há descrições na literatura da associação entre disfunção autonômica e inflamação de baixo grau em indivíduos com DM1, evidenciada por concentrações séricas mais altas de proteína C-reativa (PCR)²⁶ e por uma correlação negativa entre IL6 e a razão expiração: inspiração da VFC, o que reflete a função parassimpática²⁷. Em nosso meio, Santos Bezerra e cols. também encontraram um aumento das concentrações séricas de leucotrieno em indivíduos com DM1 e NAC instalada²⁸. Estudando indivíduos com DM2, Herder e cols. reportaram maiores concentração séricas de IL18 e de molécula de adesão intercelular solúvel (sICAM) naqueles com menor atividade vagal²⁹.

Figura 2. Via anti-inflamatória colinérgica.



A atividade eferente no nervo vago leva à liberação de acetilcolina (ACh) nos órgãos do sistema retículo-endotelial, incluindo fígado, coração, baço e trato gastrointestinal. A acetilcolina interage com os receptores nicotínicos nos macrófagos teciduais, que inibem a liberação de Fator de Necrose tumoral (TNF), Interleucina-1 (IL1), *High Mobility Group B1* (HMGB1) e outras citocinas. Adaptado de "The inflammatory reflex", Tracey KJ.

1.4. Citocinas pró-inflamatórias

1.4.1. Fator de Necrose Tumoral

O TNF é uma citocina pleiotrópica que é ativada transcricionalmente em resposta a uma variedade de estímulos durante a inflamação, infecção e estresse. É produzido principalmente por fagócitos mononucleares, mas também é expresso por neutrófilos, linfócitos, células *natural killers* (NK), células endoteliais e fibroblastos³⁰.

O receptor de TNF (TNFR) 1 é expresso em quase todas as células nucleadas e a expressão do receptor TNFR2 é restrita às células do sistema imunológico. O envolvimento desses receptores inicia vias de sinalização intracelular que levam à transcrição de genes responsivos ao TNF, que por sua vez, regulam a proliferação e apoptose celular ou induzem mediadores pró-inflamatórios. Após ligar-se a seus receptores, o TNF vai estimular a transcrição e a produção da enzima I κ B cinase, o que resultará em ativação do NF κ B. Esse fator de transcrição ativado irá induzir a produção de diversas proteínas envolvidas nas respostas inflamatória e imunológica responsáveis pelas principais ações biológicas do TNF³⁰.

Entre as várias citocinas pró-inflamatórias, o TNF é um dos mediadores pró-inflamatórios mais importantes envolvidos no desenvolvimento da resistência à insulina, desencadeada pela obesidade visceral⁵, e na patogênese do DM2. Concentrações elevadas de TNF induzem resistência às ações metabólicas da insulina em seus tecidos-alvo, por prejudicarem a fosforilação do IRS1 nos resíduos tirosina e, assim, comprometer a sinalização através do receptor de insulina³¹. Uma meta-análise mostrou que concentrações elevadas de TNF também estão presentes em indivíduos com DM1 em comparação a controles saudáveis³².

A via do TNF também parece estar envolvida na etiopatogenia da DRD. Em um estudo com índios americanos com DM2, Pavkov e cols. (2015) mostraram que concentrações plasmáticas elevadas de TNFR1 e TNFR2 estão fortemente associadas ao aumento do risco de doença renal terminal³³.

1.4.2. Interleucina 1 β e Interleucina 10

A IL1 exerce funções autócrinas, parácrinas e/ou endócrinas. Existem duas formas de IL1: a IL1 α e a IL1 β , com atividades biológicas quase indistinguíveis. Os 11 membros da família de genes da IL1 incluem os genes que codificam a IL pró-inflamatória-1 β (IL1 β) e seu regulador, o antagonista do receptor da IL1 (IL1RN)³⁴. A IL1 β é induzida por sinais inflamatórios em vários tipos celulares do sistema imune e causa não apenas febre, anorexia e outros sintomas constitucionais, mas também danos à remodelação dos tecidos. IL1 β e a IL18 são as únicas citocinas que são processadas pela caspase-1 após ativação mediada por inflamassoma³⁵.

A IL10 é um mediador anti-inflamatório, que atua garantindo a proteção contra respostas exacerbadas a patógenos, enquanto desempenha papéis importantes em outros contextos, como cicatrização estéril de feridas, auto-imunidade, câncer e homeostase. O seu envolvimento em muitos estados de doença foi demonstrado, tanto em modelos animais quanto em seres humanos, com mutações no eixo IL10 e seu receptor. Essa IL é a principal supressora da resposta imune³⁶.

A IL10 foi inicialmente denominada como fator inibidor da síntese de citocinas. Ela é derivada de células T *helper* (Th) 2 e inibe a ativação e produção de citocina de células Th1. Ela é secretada por células imunes inatas (monócitos/macrófagos, células dendríticas e células NK) e células imunes adaptativas, incluindo células T e células B, para evitar respostas inflamatórias exacerbadas³⁷. Uma função não clássica atribuída a IL10 refere-se a sua regulação no tecido adiposo. Estudos relacionam uma baixa produção de IL10 à síndrome metabólica e ao DM2. No entanto, em modelos animais, a ablação da IL10 não suportou uma função anti-obesidade para essa citocina³⁶.

1.4.3. Leucotrienos

Os leucotrienos ("leuco" dos glóbulos brancos; e "trienos", três ligações duplas conjugadas)³⁸ são mediadores lipídicos cuja produção está aumentada em condições inflamatórias. Eles pertencem à família de compostos formados a partir de ácidos eicosanóides, da cascata do ácido araquidônico. A síntese dos leucotrienos ocorre em leucócitos, plaquetas e macrófagos, por meio da via das lipoxigenases e em resposta

a estímulos imunológicos ou não. O leucotrieno B₄ (LTB₄) é produzido pelas ações sequenciais da 5-lipoxigenase (LOX5), da proteína ativadora da lipoxigenase (FLAP) e da hidrolase do leucotrieno A₄ (LTA₄), presentes nas células inflamatórias³⁹. O LTB₄ apresenta potente atividade biológica como mediador de doenças inflamatórias, e seus principais efeitos são observados sobre os sistemas respiratório, microvascular, leucocitário e gastrointestinal³⁹.

O LTB₄ foi inicialmente reconhecido por seu envolvimento no recrutamento de neutrófilos e é um dos agentes quimiotáticos mais potentes conhecidos até o momento. Há dois receptores para LTB₄, o receptor de alta afinidade BLT1 e o receptor de baixa afinidade BLT2. O LTB₄ desempenha um papel significativo em muitas doenças inflamatórias crônicas, como artrite, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença cardiovascular, câncer e, mais recentemente, desordens metabólicas⁴⁰.

Desordens metabólicas, como DM, gota e aterosclerose envolvem inflamação crônica de baixo grau⁴¹. Como essa inflamação é desencadeada por substâncias endógenas, e não por patógenos, ela é chamada de "inflamação estéril". Essa inflamação crônica pode ser desencadeada pelo acúmulo de produtos metabólicos, como ácido úrico, glicose, colesterol e ácidos graxos livres na circulação. Essas substâncias podem induzir a inflamação por dois mecanismos distintos: envolvimento de TLR e ativação de complexo proteicos intracelulares conhecidos como inflamassomas, que promovem a ativação da caspase-1⁴². Essa enzima cliva a pró IL1 β em sua forma ativa, a qual vai atuar sobre seu receptor, culminando na ativação do NF κ B. Assim, nas doenças metabólicas com inflamação crônica de baixo grau, o NF κ B parece estar continuamente ativado⁴¹.

Estudos recentes sugerem que, além dos mecanismos expostos acima, o LTB₄ também participe da inflamação estéril que ocorre nas doenças metabólicas. Por exemplo, a inibição da síntese de leucotrienos ou o antagonismo de seus receptores cursa com redução das concentrações séricas de IL6 e de TNF no DM2 e com redução da ativação de NF κ B⁴¹.

Além de estudos em animais, alguns estudos clínicos mostraram que mediadores lipídicos bioativos, como os eicosanoides, podem ser produzidos como consequência da hiperglicemia. Um estudo usando a abordagem metabolômica

baseada em espectrometria de massa observou alterações na via metabólica da síntese de eicosanoides em indivíduos com DM1⁴³. Em nosso meio, Santos-Bezerra e cols. observaram entre indivíduos com DM1 que as concentrações plasmáticas de LTB4 foram significativamente maiores naqueles com pior controle glicemia (hemoglobina glicada mediana de 8,6%) em relação àqueles com melhor controle glicêmico (hemoglobina glicada mediana de 7,9%)²⁸.

2. JUSTIFICATIVA

Na síndrome metabólica e no DM2 existe uma inflamação de baixo grau mediada por um grande número de ligantes exógenos e endógenos, em combinação com alterações nos sistemas nervosos central e autonômico. A perda do controle autonômico com redução da atividade parassimpática, que é a marca registrada da perda do equilíbrio autonômico no DM, inicia uma cascata de respostas inflamatórias que podem culminar em morbidade e mortalidade consideráveis. Portanto, função autonômica e inflamação apresentam uma íntima relação^{7, 16, 17, 20}.

Tendo em vista a importância do sistema nervoso autonômico na modulação da inflamação e a participação da inflamação no desenvolvimento das complicações crônicas do DM, o presente projeto vai abordar a associação entre marcadores inflamatórios e NAC em indivíduos com DM2.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo primário

Avaliar se as concentrações plasmáticas de TNF, IL10, IL1 β e LTB4 diferem entre indivíduos com DM2 e diferentes graus de NAC.

3.2. Objetivo secundário

Correlacionar as concentrações desses marcadores inflamatórios com o grau de controle glicêmico e de resistência à insulina.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Casuística

Um total de 129 indivíduos foram selecionados a partir de uma casuística de 551 indivíduos com DM2 que participaram do estudo intitulado “Prevalência de Polineuropatia Simétrica Distal e de Neuropatia Autonômica Cardiovascular em Indivíduos com Diabetes Mellitus Tipo 2 Acompanhados em um Serviço de Atenção Primária”. Esses indivíduos eram acompanhados nos Grupos de hipertensão e diabetes (HIPERDIA) da Unidade Básica de Saúde (UBS) da Estratégia de Saúde da Família Dr^a Ilza Weltman Hutzler, situada na Rua Coronel Walfrido de Carvalho- 14 – Vila Nova Cachoeirinha – São Paulo – SP.

Todos os participantes receberam explicação a respeito dos objetivos e dos procedimentos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido TCLE (Apêndice 1). O estudo principal (e esse subestudo) foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Nove de Julho – UNINOVE (parecer número 3.050.387, Anexo 2) e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Secretaria de Saúde do Município de São Paulo (parecer número 3.141.417).

Os critérios de inclusão do estudo foram:

- Ter tido diagnóstico de DM2,
- Idade > 18 anos;
- Hemoglobina glicada (HbA1c) > 5,7%;
- Aceitar participar do estudo e assinar o TCLE;
- Glicemia capilar \leq 180 mg/dL no dia da avaliação;
- Jejum de 8 horas no dia da avaliação;
- Não ter fumado no dia da avaliação;
- Não ter usado medicação para controle da HAS nas últimas 12 horas.

Os critérios de não inclusão do estudo foram:

- Indivíduos restritos ao leito ou ao lar;

- Indivíduos com déficit cognitivo.

Os critérios de exclusão foram:

- Indivíduos com HO como único teste alterado dentre os Testes de Ewing;

Os 129 indivíduos foram selecionados de maneira a formar três grupos: indivíduos sem NAC, indivíduos com NAC em sua forma incipiente e indivíduos com NAC instalada. No momento da seleção, indivíduos sem NAC e com NAC incipiente foram agrupados (grupo sem NAC instalada) e comparados aos indivíduos com NAC instalada; esses dois grupos deveriam ser pareados quanto às principais características demográficas, clínicas e bioquímicas, especialmente idade, sexo, etnia, duração do DM e grau do controle glicêmico. Esses critérios de seleção permitiram a inclusão de 85 indivíduos no grupo sem NAC instalada (44 sem NAC e 41 com NAC incipiente) e de 44 indivíduos no grupo com NAC instalada.

4.2. Métodos

4.2.1. Variáveis coletadas

As variáveis coletadas por consulta ao prontuário e às prescrições e por questionário direto ao indivíduo foram: data de nascimento, etnia auto referida, duração do DM2, presença de comorbidades (HAS, hipercolesterolemia), tabagismo atual, medicamentos orais utilizados para HAS, dislipidemia e DM e uso ou não de insulina NPH e regular.

Os dados antropométricos coletados foram peso, estatura e circunferência abdominal (CA, menor medida entre o rebordo costal e a espinha ílica ântero-superior)⁴⁴. O peso e a estatura foram empregados para o cálculo do índice de massa corpórea (IMC), dividindo-se o peso (kg) pela estatura ao quadrado (m²). A PA foi determinada com o indivíduo em decúbito dorsal após 15 minutos de repouso e antes da avaliação da VFC. Em seguida, a PA foi novamente mensurada após 5 minutos, nos quais o indivíduo permaneceu em decúbito dorsal para realização da análise da VFC, e finalmente, a PA foi mensurada após manobra ortostática. Hipertensão foi definida como uso de medicação anti-hipertensiva e/ou PA sistólica (PAS) ≥ 140 mmHg e/ou PA diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg⁴⁵. Hipercolesterolemia foi definida como

concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL) ≥ 100 mg/dL ou uso de estatina⁴⁶.

Os exames laboratoriais coletados são alguns daqueles rotineiramente solicitados no seguimento de indivíduos com DM2 e incluíram dosagens sanguíneas de HbA1c, creatinina, ácido úrico, colesterol total, LDL, lipoproteínas de alta densidade (HDL) e triglicérides. A creatinina plasmática foi empregada para o cálculo da TFGe, pela fórmula do CKD-EPI⁴⁷.

O grau de resistência à insulina foi estimado pelo índice *Lipid accumulation product* (LPA); quanto mais alto o valor do LPA, maior a resistência à insulina. As fórmulas para o cálculo do LPA são as seguintes, nas quais a CA deve estar em cm e as concentrações de triglicérides em mmol/L:

Sexo masculino: $(CA - 65) \times \text{triglicérides}$

Sexo feminino: $(CA - 58) \times \text{triglicérides}$ ^{48, 49}

A PSD foi diagnosticada pela soma do *Neuropathy Symptom Score* (NSS) e do *Neuropathy Disability Score* (NDS). O NSS é um questionário validado em português que avalia o número de sintomas neuropáticos que, somados, vão indicar o grau de sintomas apresentado pelo paciente (3 e 4 pontos = leve; 5 e 6 pontos = moderado e 7 a 9 pontos = grave). O NDS avalia e pontua o reflexo aquileu e as sensibilidades dolorosa, térmica e vibratória. A soma dos exames vai indicar a intensidade dos sinais (3 e 4 pontos = leve; 5 e 6 pontos = moderado e 7 a 10 pontos = grave). Os critérios mínimos para o diagnóstico de PSD são: sinais moderados com ou sem sintomas ou sinais leves com sintomas moderados. Sinais leves isoladamente ou com sintomas leves não dão o diagnóstico de PSD⁵⁰. Indivíduos com amputações prévias foram considerados portadores de PSD.

O monofilamento de Semmes-Weinstein também foi utilizado para o diagnóstico de PSD, conforme preconizado pelo *International Working Group on the Diabetic Foot*. A sensibilidade ao monofilamento foi testada em três sítios diferentes nos dois pés (na superfície plantar do hálux e na cabeça do 1º e do 5º metatarsos). O teste foi realizado três vezes em cada local, sendo uma das três aplicações "falsa" (ou seja, o monofilamento não era aplicado). A sensibilidade protetora foi considerada presente em cada sítio quando o indivíduo respondia corretamente as duas

aplicações. Os dois pés foram avaliados e a alteração em um único ponto já fazia o diagnóstico de PSD⁵¹.

4.2.2. Diagnóstico de neuropatia autonômica cardiovascular

O diagnóstico de NAC foi realizado pelos Testes de Ewing combinados com a análise espectral da VFC. Esses exames são capazes de avaliar tanto a função simpática, quanto a parassimpática. Os resultados desses testes foram analisados pelo programa Poly-Spectrum, versão 4.8.143.s.

4.2.2.1. Testes de Ewing^{52, 53}

- Variação da FC à respiração profunda

A variação da FC durante a respiração é dependente da inervação parassimpática. O indivíduo é colocado em decúbito dorsal, permanece em repouso e é monitorado eletrocardiograficamente. O indivíduo é, então, orientado a inspirar e expirar profundamente durante 5 segundos e durante esses períodos a variação da FC é aferida. Durante a inspiração (I), há a ativação do simpático e, durante a expiração (E), ocorre a contrarregulação pelo parassimpático. A razão E:I é obtida pela divisão da FC máxima pela FC mínima.

- Razão da FC sob a manobra de Valsalva

Essa manobra permite a avaliação da alternância da ativação das fibras parassimpáticas e simpáticas. Em indivíduos saudáveis, a resposta à manobra de Valsalva consiste em taquicardia e vasoconstrição periférica durante a manobra, seguida de bradicardia após o final do procedimento. O indivíduo é colocado em decúbito dorsal, permanece em repouso e é monitorado eletrocardiograficamente, sendo, a seguir, orientado a manter uma expiração constante durante 15 segundos (valor de 40 mmHg aferido por um manômetro). Em condições normais, ocorre taquicardia (que é máxima em torno do 14^o segundo) seguida de uma bradicardia

reflexa (durante os 30-45 segundos seguintes à taquicardia). A razão de Valsalva é a relação entre a taquicardia e a bradicardia máximas.

- *Relação 30:15 após ortostase*

Em indivíduos saudáveis, o SNS determina um aumento da FC em resposta à ortostase que é máxima ao redor do 15º batimento após a mudança de posição. Este aumento é seguido por uma bradicardia relativa, que é máxima ao redor do 30º batimento após a mudança de posição (atuação do SNP). O indivíduo é colocado em decúbito dorsal, permanece em repouso e é monitorado eletrocardiograficamente; ele é, então, solicitado a se levantar. A avaliação da razão da FC nesses dois momentos é chamada de relação 30:15.

- *Avaliação do comportamento da PA*

A PA é aferida com o indivíduo em decúbito dorsal e, a seguir, em ortostase, no 3º minuto após a mudança de postura. Uma queda da PAS > 20 mmHg após a mudança de postura é considerada hipotensão postural.

4.2.2.2. Avaliação da VFC

A VFC é avaliada pelo cálculo dos índices dos intervalos R-R, sob a forma de análise em função do tempo (*time-domain analyses*) ou em função da frequência (*frequency-domain analysis*), para a qual se utiliza a análise espectral de uma matriz, que envolve a decomposição, por abordagens matemáticas, de uma série de intervalos R-R em uma soma de funções sinusoidais de diferentes frequências e amplitudes. O resultado é exibido como a magnitude da VFC, que reflete a amplitude das flutuações da FC presentes em diferentes oscilações de frequência. O espectro da VFC é composto por três picos predominantes²⁴:

- *Componente de muito baixa frequência (Very Low Frequency, VLF)*, abaixo de 0,4Hz e associado às flutuações no tônus vasomotor relacionado com termorregulação (reflete atuação do SNS);

- *Componente de baixa frequência (Low Frequency, LF)*, ao redor de 0,1Hz e mediado pelo SNS, com modulação parassimpática;
- *Componente de alta frequência (High Frequency, HF)*, ao redor de 0,25Hz, relacionado à atividade respiratória e mediado pelo SNP.

Os Testes de Ewing e a análise espectral foram realizados pela manhã em ambiente tranquilo. Os indivíduos estavam em jejum e não haviam ingerido café, fumado ou tomado medicamentos com potencial de alterar a FC por pelo menos 8 horas. Os indivíduos também não realizaram os exames se estivessem apresentando hipoglicemia (glicemia < 70 mg/dL) ou hiperglicemia > 180 mg/dL.

Os resultados obtidos nos Testes de Ewing e na análise espectral foram comparados com resultados de uma população saudável de idade e sexo pareados⁵⁴.

Os sete testes descritos acima (quatro Testes de Ewing e componentes VLF, LF e HF da análise espectral) foram utilizados para o diagnóstico de NAC:

- Ausência de NAC: nenhum ou um teste alterado;
- NAC incipiente: dois dos sete testes alterados;
- NAC instalada: pelo menos três dos sete testes alterados²⁴.

4.2.3. Metodologia de dosagens dos marcadores inflamatórios

Aproximadamente 10 mL de sangue periférico foram coletados em tubo BD Vacutainer CPT tubes (BD, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) pela manhã (os indivíduos não estavam em jejum) e permaneceram no gelo até serem centrifugados a 1.500 g durante 20 minutos a 5° C. O plasma foi armazenado a -80° C até posterior utilização. Quando todas as coletas foram finalizadas, alíquotas de plasma foram utilizadas para as dosagens dos marcadores inflamatórios que se seguem.

4.2.3.1. Fator de necrose tumoral

O TNF foi mensurado por ensaio imuno enzimático, com o uso do estojo comercial BD OptEIA ELISA Kit II para essa citocina (BD Biosciences, São Diego, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O limite de detecção do ensaio é de 15,6 pg/mL.

4.2.3.2. Interleucina 10

A IL10 foi mensurada por ensaio imuno enzimático, com o uso do estojo comercial BD OptEIA ELISA Kit II para essa citocina (BD Biosciences, São Diego, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O limite de detecção do ensaio é de 15,6 pg/mL.

4.2.3.3. Interleucina 1 β

A IL1 β foi mensurada por ensaio imuno enzimático, com o uso do estojo comercial BD OptEIA ELISA Kit II para essa citocina (BD Biosciences, São Diego, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O limite de detecção do ensaio é de 7,8 pg/mL.

4.2.3.4. Leucotrieno

O LTB4 foi mensurado por imunoensaio enzimático, com o uso do estojo comercial LTB4 ELISA (Cayman Chemical, Michigan, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O limite de detecção do ensaio é de 13 pg/mL.

4.2.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas no *software* JMP, versão 8.0 (SAS Institute, Cary, EUA). Para a comparação das características clínicas e bioquímicas entre os grupos, foram utilizados o Teste de Mann-Whitney para amostras

independentes para as variáveis contínuas e o Teste de χ^2 de Pearson para as variáveis categóricas. Para análise das concentrações dos marcadores inflamatórios entre os grupos, foi utilizado Teste de Wilcoxon Kruskal-Wallis seguido por pós -teste de Tukey e análise de regressão logística com ajuste para variáveis confundidoras. As análises de correlação foram realizadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Características da população de acordo com o *status* de NAC

As características demográficas, clínicas e bioquímicas da população estudada estão mostradas na Tabela 2. A amostra foi constituída de 62% de mulheres com idade mediana (intervalo interquartilico) de 63 (59-67) anos que apresentava duração de doença de 8 (4-15) anos e HbA1c de 7,3 (6,3-9,1) %. O IMC era de 29,1 (26,4 – 33,6) kg/m², a CA era de 103 (96-114) cm, 77,5% dos indivíduos apresentavam HAS e 11,6% eram tabagistas. Apenas 26% usavam estatinas (mas os indivíduos que tomavam estatinas e/ ou apresentavam LDL \geq 100 mg/dL representavam 83% da população estudada).

Em relação às complicações do DM, 14,3% dos indivíduos apresentavam TFG_e < 60 mL/min/1,73m²; 6,9% apresentavam PSD avaliada pela soma do NSS e NDS ou pela presença de amputação não traumática de membros inferiores e 12,4% apresentavam PSD diagnosticada pelo exame de monofilamento de Semmes-Weinstein.

As características dos participantes de acordo com o status da NAC (ausente, incipiente ou instalada) estão demonstradas na Tabela 3. As três variáveis que diferiram entre os grupos foram (1) a TFG_e, que foi significativamente maior no grupo com NAC instalada (87,3 mL/min) em relação ao grupo com NAC incipiente (73,8 mL/min); (2) as concentrações de triglicérides, que foram significativamente maiores no grupo com NAC instalada (184 mg/dL) em relação ao grupo sem NAC (156 mg/dL) e (3), o índice LAP, que foi significativamente maior no grupo com NAC instalada (80,5) em relação ao grupo sem NAC (67,1).

A Tabela 4 mostra as características dos participantes divididos em dois grupos, aqueles sem NAC instalada (ou seja, que não tinham NAC ou tinham a forma incipiente desta complicação) e aqueles com NAC instalada. As três variáveis que apresentaram diferenças no limite da significância estatística entre os dois grupos foram (1) a TFG_e, que foi maior no grupo com NAC instalada (87,3 mL/min) em relação ao grupo sem NAC instalada (78,1 mL/min); (2) as concentrações de triglicérides, que foram maiores no grupo com NAC instalada (184 mg/dL) em relação ao grupo sem

NAC instalada (144 mg/dL) e (3) o índice LAP, que foi maior no grupo com NAC instalada (80,5) em relação ao grupo sem NAC instalada (71,1).

Tabela 2. Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 participantes do estudo.

Características Demográficas, Clínicas e Bioquímicas	População Geral (n=129)
Idade (anos)	62 (59 – 67)
Sexo (% feminino)	62
Etnia (Caucasianos/Negros/Asiáticos) (%)	70/27/3
Altura (cm)	160 (153 – 168)
Índice de Massa Corporal (Kg/m ²)	29,1 (26,4 – 33,6)
Circunferência da Cintura (cm)	103 (96 – 114)
Hipertensão Arterial (%)	77,5
Tabagismo (%)	11,6
TFGe (mL/min/1,73m ²)	78,1 (63,5 – 93,9)
Colesterol Total (mg/dL)	196 (167 – 233)
HDL (mg/dL)	46 (36 – 53)
LDL (mg/dL)	115 (94 – 150)
Triglicerídeos (mg/dL)	156 (116 – 212)
<i>Lipid accumulation product</i>	74,8 (55,9 – 114,9)
Status do Diabetes	
Duração do Diabetes (anos)	8 (4 – 15)
HbA _{1c} (%)	7,3 (6,3 – 9,1)
TFGe < 60 mL/min/1,73m ² (%)	14,3
Neuropatia Simétrica Distal pela soma do NSS e NDS (%)	6,9
Neuropatia Simétrica Distal pelo monofilamento de Semmes-Weinstein (%)	12,4
Medicamentos	
Metformina (%)	79
Sulfonilureia (%)	39,5
Insulina NPH (%)	23,3
Insulina Regular (%)	7,8
Estatinas (%)	26
Inibidores da ECA (%)	31,7
Bloqueadores dos Receptores de Angiotensina II (%)	17
Fibratos (%)	6

Valores expressos em mediana e intervalo interquartilico e em percentual (%). ECA: Enzima conversora da angiotensina; NSS, Escore de Sintomas Neuropáticos (*Neuropathy Symptom Score*); NDS, Escore de Comprometimento Neuropáticos (*Neuropathy Disability Score*); TFGe, Taxa de filtração glomerular estimada.

Tabela 3. Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 classificados de acordo com o *status* da neuropatia autonômica cardiovascular (NAC).

Características Demográficas, Clínicas e Bioquímicas	Ausência de NAC (n=44)	NAC incipiente (n=41)	NAC instalada (n=44)	Valor de P
Idade (anos)	64 (62 – 66)	63 (57 – 68)	62 (58 – 67)	0,41
Sexo (% feminino)	50	70	65	0,11
Etnia (Caucasianos/Negros/Asiáticos) (%)	77/20/3	60/35/5	73/27/0	0,44
Altura (cm)	161 (156 – 169)	160 (152 – 169)	160 (152 – 165)	0,50
Índice de Massa Corporal (Kg/m ²)	29,5 (27,2 – 33,3)	29,8 (26 – 35,9)	28,8 (25,9 – 33,3)	0,62
Circunferência da Cintura (cm)	103 (97 – 115)	106 (94 – 116)	102 (96 – 110)	0,99
Hipertensão Arterial (%)	68	80,5	84	0,17
Tabagismo (%)	11,4	9,8	13,6	0,85
TFGe (mL/min/1,73m ²)	78,6 (67,2 – 95,3)	73,8 (58,5 – 81,9)	87,3 (66,4 – 97,1)	0,02
Colesterol Total (mg/dL)	188 (160 – 228)	208 (173 – 246)	203 (167 – 233)	0,11
HDL (mg/dL)	47 (42 – 54)	46 (33 – 58)	44 (35 – 52)	0,28
LDL (mg/dL)	113 (87 – 148)	119 (100 – 152)	113 (89 – 147)	0,45
Triglicerídeos (mg/dL)	156 (116 – 212)	179 (120 – 230)	184 (132 – 212)	0,0046
<i>Lipid accumulation product</i>	67,1 (43,8 – 103,9)	75,9 (63,1 – 125,6)	80,5 (60,1 – 151,4)	0,01
Status do Diabetes				
Duração do Diabetes (anos)	8 (4 – 14)	8 (5 – 13)	9 (4 – 20)	0,59
HbA _{1c} (%)	7,1 (6,2 – 9,5)	7,9 (6,3 – 9,1)	7,5 (6,4 – 9,1)	0,85
TFGe < 60 mL/min/1,73m ² (%)	15,8	16,7	11	0,71
Neuropatia Simétrica Distal pela soma do NSS e NDS (%)	4,5	9,7	6,8	0,64
Neuropatia Simétrica Distal pelo monofilamento de Semmes-Weinstein (%)	9	14,6	13,6	0,70
Medicamentos				
Metformina (%)	79,5	78	79,5	0,98
Sulfonilureia (%)	29,5	43,9	45,5	0,24
Insulina NPH (%)	22,7	26,8	20,5	0,78
Insulina Regular (%)	13,6	7,3	2,3	0,13
Estatinas (%)	30	31,7	18	0,38
Inibidores da ECA (%)	25	36,5	34	0,47
Bloqueadores dos Receptores de Angiotensina II (%)	20,5	17,1	13,6	0,69
Fibratos (%)	6,8	4,8	6,8	0,91

Valores expressos em mediana e intervalo interquartil e em percentual (%). NSS, Escore de Sintomas Neuropáticos (*Neuropathy Symptom Score*); NDS, Escore de Comprometimento Neuropáticos (*Neuropathy Disability Score*); TFGe, Taxa de filtração glomerular estimada. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os números em negrito mostram as diferenças que alcançaram significância estatística.

Tabela 4. Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 classificados de acordo com o *status* da neuropatia autonômica cardiovascular (NAC).

Características Demográficas, Clínicas e Bioquímicas	Ausência de NAC instalada (n=85)	NAC instalada (n=44)	Valor de P
Idade (anos)	63 (60 – 67)	62 (58 – 67)	0,43
Sexo (% feminino)	60	65	0,56
Etnia (Caucasianos/Negros/Asiáticos) (%)	68/28/4	73/27/0	0,60
Altura (cm)	161 (155 – 169)	160 (152 – 165)	0,35
Índice de Massa Corporal (Kg/m ²)	29,6 (26,4 – 35,7)	28,8 (25,9 – 33,3)	0,35
Circunferência da Cintura (cm)	103 (97 – 115)	102 (96 – 110)	0,91
Hipertensão Arterial (%)	74	84	0,19
Tabagismo (%)	10,6	13,6	0,61
TFGe (mL/min/1,73m ²)	78,1 (63,5 – 93,9)	87,3 (66,4 – 97,1)	0,05
Colesterol Total (mg/dL)	193 (165 – 234)	203 (167 – 233)	0,60
HDL (mg/dL)	47 (38 – 56)	44 (35 – 52)	0,16
LDL (mg/dL)	118 (94 – 150)	113 (89 – 147)	0,52
Triglicerídeos (mg/dL)	144 (111 – 218)	184 (132 – 212)	0,051
<i>Lipid accumulation product</i>	71,1 (54,4-110,4)	80,5 (60,1-151,4)	0,06
Status do Diabetes			
Duração do Diabetes (anos)	8 (4 – 13)	9 (4 – 20)	0,34
HbA _{1c} (%)	7,3 (6,2 – 9,2)	7,5 (6,4 – 9,1)	0,94
TFGe < 60 mL/min/1,73m ² (%)	16	11	0,57
Neuropatia Simétrica Distal pela soma do NSS e NDS (%)	7	6,8	0,95
Neuropatia Simétrica Distal pelo monofilamento de Semmes-Weinstein (%)	11,7	13,6	0,75
Medicamentos			
Metformina (%)	79	79,5	0,92
Sulfonilureia (%)	36,5	45,5	0,32
Insulina NPH (%)	24,7	20,5	0,58
Insulina Regular (%)	10,6	2,3	0,09
Estatinas (%)	30	18	0,28
Inibidores da ECA (%)	30,6	34	0,68
Bloqueadores dos Receptores de Angiotensina II (%)	18,8	13,6	0,45
Fibratos (%)	5,9	6,8	0,83

Valores expressos em mediana e intervalo interquartil e em percentual (%). NSS, Escore de Sintomas Neuropáticos (*Neuropathy Symptom Score*); NDS, Escore de Comprometimento Neuropáticos (*Neuropathy Disability Score*); TFGe, Taxa de filtração glomerular estimada. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os números em negrito mostram as diferenças que ficaram no limite da significância estatística.

5.2. Concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios de acordo com o *status* de NAC

As concentrações plasmáticas dos quatro marcadores inflamatórios, de acordo com o *status* da NAC, estão mostradas na Tabela 5.

Tabela 5. Concentrações dos marcadores inflamatórios de acordo com o *status* da neuropatia autonômica cardiovascular (NAC).

Marcador inflamatório	Ausência de NAC	NAC incipiente	NAC instalada	Valor de <i>P</i>	Ausência de NAC instalada	NAC instalada	Valor de <i>P</i>
TNF (pg/mL)	1,0 ± 1,9	2,9 ± 11,3	7,4 ± 36,0	< 0,0001	1,9 ± 7,9	7,4 ± 36,0	0,001
IL10 (pg/mL)	4,6 ± 10,3	7,0 ± 16,3	3,8 ± 14,2	0,008	5,5 ± 13,5	3,8 ± 14,2	0,002
IL1β (pg/mL)	8,4 ± 25,9	45,5 ± 163,5	9,2 ± 18,1	0,6	23,6 ± 106,3	9,2 ± 18,1	0,32
LTB4 (pg/mL)	57,0 ± 13,9	69,7 ± 16,6	71,5 ± 15,7	< 0,0001	63,1 ± 16,4	71,5 ± 15,7	0,006

Valores expressos em média ± desvio-padrão. IL: Interleucina; LTB4: Leucotrieno B4, TNF: Fator de necrose tumoral. *P* <0,05 foi considerado estatisticamente significante.

5.2.1. Fator de necrose tumoral

As concentrações de TNF diferiram de forma significativa entre os grupos de indivíduos sem NAC, com NAC incipiente e com NAC instalada após o Teste de Wilcoxon Kruskal-Wallis (Tabela 5). No entanto, a realização do Pós-teste de Tukey não evidenciou diferenças entre os grupos. Quando foram comparados os grupos com e sem NAC instalada, o grupo com NAC instalada apresentou concentrações de TNF significativamente maiores (Tabela 5 e Figura 3). Após ajustes para variáveis de confusão, a diferença entre os grupos com e sem NAC instalada perdeu a significância estatística (Tabela 6).

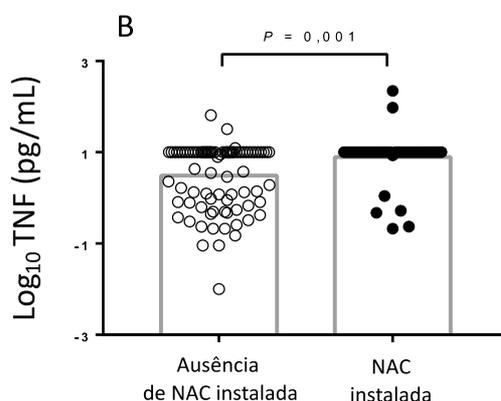


Figura 3. Concentrações plasmáticas de fator de necrose tumoral (TNF) em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 de acordo com o *status* de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC). Os dados estão expressos em log na base 10.

5.2.2. Interleucina 10

As concentrações de IL10 diferiram de forma significativa entre os grupos de indivíduos sem NAC, com NAC incipiente e com NAC instalada após o Teste de Wilcoxon Kruskal-Wallis (Tabela 5). No entanto, a realização do Pós-teste de Tukey não evidenciou diferenças entre os grupos. Quando foram comparados os grupos com e sem NAC instalada, o grupo com NAC instalada apresentou concentrações de IL10 significativamente menores (Tabela 5 e Figura 4). Após ajustes para variáveis de confusão, a diferença entre os grupos com e sem NAC instalada perdeu a significância estatística (Tabela 6).

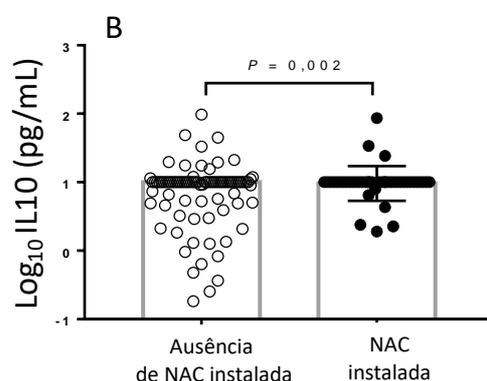


Figura 4. Concentrações plasmáticas de interleucina 10 (IL10) em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 de acordo com o *status* de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC). Os dados estão expressos em log na base 10.

5.2.3. Interleucina 1 β

As concentrações de IL1 β não diferiram de forma significativa entre os grupos de indivíduos sem NAC, com NAC incipiente e com NAC instalada (Tabela 5) ou entre os grupos com e sem NAC instalada (Tabela 5 e Figura 5). Após ajustes para variáveis de confusão, as concentrações de IL1 β permaneceram sem apresentar diferenças significantes entre os grupos com e sem NAC instalada (Tabela 6).

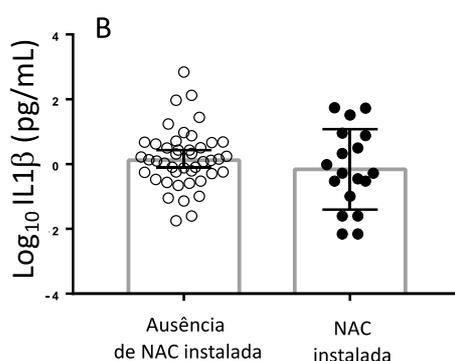


Figura 5. Concentrações plasmáticas de interleucina 1 β (IL1 β) em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 de acordo com o *status* de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC). Os dados estão expressos em log na base 10.

5.2.4. Leucotrieno B4

As concentrações de LTB4 foram significativamente maiores nos grupos de indivíduos com NAC incipiente e com NAC instalada *versus* o grupo sem NAC (Tabela 5 e Figura 6A). Quando foram comparados os grupos com e sem NAC instalada, o grupo com NAC instalada apresentou concentrações de LTB4 significativamente maiores (Tabela 5 e Figura 6B). Após ajustes para variáveis de confusão, a diferença entre os grupos com e sem NAC instalada não perdeu a significância estatística (Tabela 6).

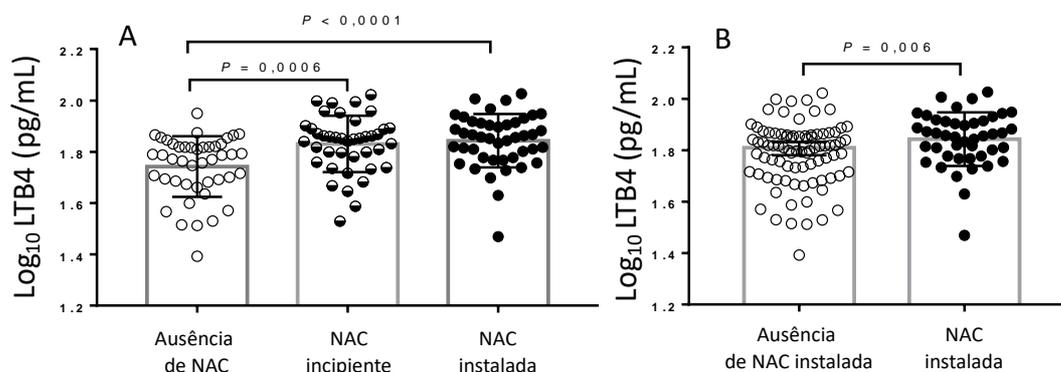


Figura 6. Concentrações plasmáticas de leucotrieno B4 (LTB4) em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 de acordo com o *status* de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC). Os dados estão expressos em log na base 10.

Tabela 6. Valores de *P* das concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios entre os grupos de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 com e sem neuropatia autonômica cardiovascular instalada.

		Fator de necrose tumoral	Interleucina 10	Interleucina 1 β	Leucotrieno
Modelo 1	Não ajustado	<i>P</i> = 0,001	<i>P</i> = 0,002	<i>P</i> = 0,32	<i>P</i> = 0,006
Modelo 2	Ajustado para idade e sexo	<i>P</i> = 0,18	<i>P</i> = 0,47	<i>P</i> = 0,51	<i>P</i> = 0,006
Modelo 3	Ajustado para para idade, sexo e índice de massa corpórea (IMC)	<i>P</i> = 0,83	<i>P</i> = 0,32	<i>P</i> = 0,60	<i>P</i> = 0,001
Modelo 4	Ajustado para idade, sexo, IMC e circunferência abdominal (CA)	<i>P</i> = 0,17	<i>P</i> = 0,54	<i>P</i> = 0,93	<i>P</i> = 0,016
Modelo 5	Ajustado para idade, sexo, IMC, CA, tempo de diabetes, HbA1c, colesterol, triglicérides, hipertensão arterial sistêmica, TFGe e uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina	<i>P</i> = 0,67	<i>P</i> = 0,29	<i>P</i> = 0,30	<i>P</i> = 0,013

TFGe: Taxa de filtração glomerular estimada. *P* < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os valores que alcançaram significância estatística estão mostrados em negrito.

5.3. Correlações entre os marcadores inflamatórios e variáveis relacionadas à resistência à insulina e ao controle glicêmico

As concentrações dos marcadores inflamatórios não apresentaram correlação com os valores do índice LAP, com os valores de triglicérides ou com os valores de HbA1c (Tabela 7) na população total. Quando a população foi separada por sexo, houve uma fraca correlação, no limite da significância estatística, entre as concentrações de LTB4 e o índice LAP apenas no sexo feminino ($\rho = 0.200$; $P = 0.082$) (Figura 7).

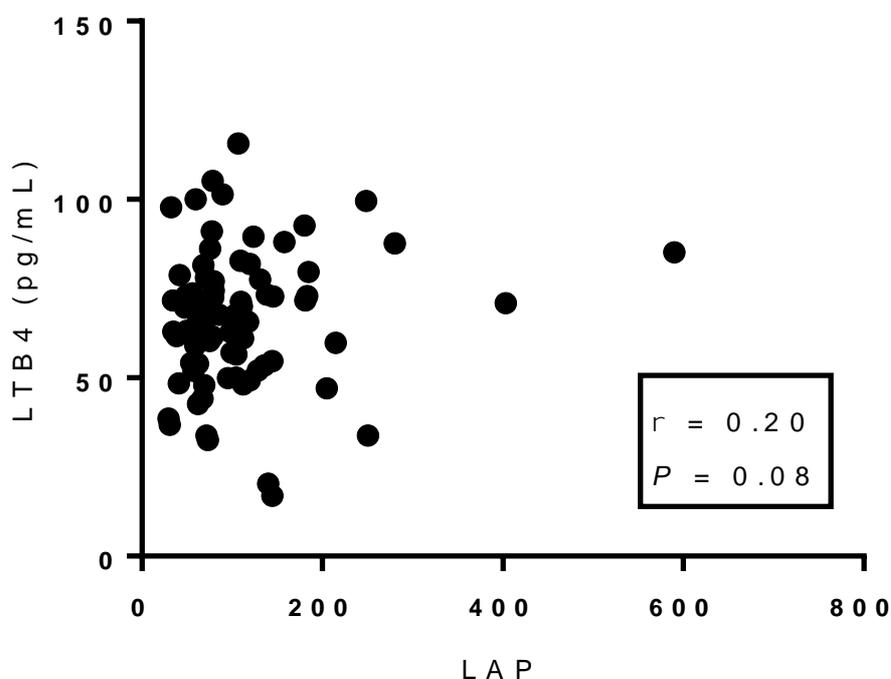


Figura 7. Correlação entre os valores do índice *Lipid accumulation product* (LAP) e as concentrações plasmáticas de leucotrieno (LTB4) em mulheres com diabetes mellitus tipo 2 com ou sem neuropatia autonômica cardiovascular.

Tabela 7. Correlações entre os marcadores inflamatórios e variáveis relacionadas à resistência à insulina e ao controle glicêmico.

Variável	Variável	Valor de ρ	Valor de P
LAP	LTB4	-0,0953	0,2985
LAP	TNF	- 0,0096	0,9168
LAP	IL10	- 0,0633	0,4902
LAP	IL1 β	0,1662	0,2210
TG	LTB4	0,082	0,3592
TG	TNF	-0,0073	0,9354
TG	IL10	-0,344	0,701
TG	IL1 β	0,0919	0,4848
HbA1c	LTB4	-0,015	0,867
HbA1c	TNF	0,0975	0,2753
HbA1c	IL10	0,0793	0,3753
HbA1c	IL1 β	0,0616	0,6401

HbA1c: Hemoglobina glicada; IL: Interleucina; LAP: *Lipid product accumulation*; LTB4: Leucotrieno B4; TG: Triglicérides; TNF: Fator de necrose tumoral.

6. DISCUSSÃO

Uma inflamação crônica de baixo grau está presente na obesidade e está intimamente associada à etiopatogenia da resistência à insulina e, conseqüentemente, do DM2. Dentre as citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células imunes do tecido adiposo em indivíduos com obesidade visceral estão o TNF, a IL1 β e a IL6, em contraposição à condição normal (indivíduos eutróficos), na qual as células imunes do tecido adiposo secretam citocinas anti-inflamatórias, como a IL10⁵⁵. Estudos mais recentes realizados em roedores também implicaram o LTB4 na resistência à insulina deflagrada pela obesidade⁵⁶.

A inflamação também está implicada na etiopatogenia das complicações crônicas do DM. TNF e IL6 são produzidos por células endoteliais, mesangiais e leucócitos, já tendo sido associados com o desenvolvimento e a progressão da DRD e da macroangiopatia diabética⁵⁷. No que se refere a ND, a PSD e a NAC eram tradicionalmente consideradas como neuropatias “não-inflamatórias”, em contraponto à poliradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória crônica, cuja fisiopatologia envolve a participação de células do sistema imunológico (macrófagos e linfócitos T e B) e de citocinas, como o TNF, o interferon-gama e a IL6, dentre outras⁵⁸.

Mais recentemente, no entanto, estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado a participação da inflamação, especialmente a produção de citocinas e quimiocinas, na patogênese da PSD e da NAC, em um processo complexo que envolve a ativação do NF κ B, um fator de transcrição ativado por inúmeros estímulos, dentre os quais hiperglicemia, estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias. Estudos em modelos animais reportaram aumento das concentrações de TNF no nervo ciático de roedores diabéticos que se associaram com disfunção de fibras nervosas finas e grossas⁵⁹.

Um estudo clínico realizado com indivíduos com DM reportou aumento das concentrações séricas de marcadores inflamatórios naqueles com ND, tais como TNF e PCR⁶⁰. Em um segundo estudo clínico, concentrações séricas elevadas de IL6 e IL10 em indivíduos com pré-diabetes e DM correlacionaram-se com marcadores de dano axonal em fibras nervosas sensoriais e sensitivas e com sinais de desmielinização no nervo motor⁶¹.

Herder e cols. identificaram o TNF e a IL6 como fatores de risco para a PSD após o ajuste para sexo, idade e fatores de confusão antropométricos e metabólicos em uma população idosa composta por indivíduos com tolerância normal ou diminuída à glicose e com DM2⁶². No presente estudo, não encontramos associações entre os marcadores inflamatórios e o *status* da PSD (dados não mostrados), mas isso pode decorrer do pequeno tamanho da amostra de indivíduos com diagnóstico de PSD (n=16 quando considerado o diagnóstico pelo monofilamento).

Estudos abordando a relação entre a NAC e a inflamação são escassos e a relação entre essas duas condições é mais complexa, por ser bidirecional. A inflamação aguda é capaz de modificar o equilíbrio entre a atividade simpática e a atividade parassimpática e reduzir a VFC. Por outro lado, a redução da atividade do SNP que ocorre na NAC pode predispor ao aumento da inflamação⁵⁸.

A inflamação aumentada em consequência da redução da atividade parassimpática é explicada pelo reflexo inflamatório, que é um mecanismo fisiológico pelo qual o nervo vago regula a função imunológica e inibe a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias. Esse reflexo consiste em um mecanismo fisiológico centralmente integrado no qual a sinalização do nervo vago aferente, ativada por citocinas ou produtos derivados de patógenos e mediada por vias eferentes vagais, regula a produção de citocinas pró-inflamatórias e a inflamação. A ausência desse reflexo secundariamente a lesões neurais, por exemplo, resulta em resposta imune inata excessiva e em produção aumentada de citocinas⁶³. De fato, estudos realizados em indivíduos saudáveis, com DCV, com tolerância à glicose diminuída e com doença renal crônica evidenciaram uma correlação inversa entre a VFC e marcadores inflamatórios (IL6 e PCR), sugerindo uma interação entre a inflamação e o SNP⁶⁴.

No presente estudo, observamos um aumento das concentrações plasmáticas de dois marcadores pro-inflamatórios no grupo de indivíduos com NAC instalada, o TNF e o LTB4, enquanto a citocina anti-inflamatória IL10 foi menor nesse grupo de indivíduos. No entanto, essas diferenças perderam a significância estatística para o TNF e a IL10 após o ajuste para outras variáveis que podem interferir nas concentrações dessas citocinas, tais como fatores antropométricos (IMC e CA) e metabólicos (controle glicêmico, expresso pela HbA1c, e dislipidemia). No estudo de Herder e cols.²⁹, que avaliou 352 indivíduos com DM2, as concentrações elevadas de

PCR e IL6 que se associaram com disfunção autonômica cardiovascular no modelo não ajustado também perderam a significância estatística após o ajuste para variáveis antropométricas (dentre as quais a CA) e metabólicas (como o controle glicêmico e a dislipidemia), evidenciando que as condições de base dos indivíduos com DM2 (obesidade visceral, hiperglicemia e dislipidemia) por si só já estão associadas a uma inflamação subclínica. No estudo de Herder e cols., as concentrações plasmáticas de IL18 permaneceram associadas a uma menor atividade vagal após a análise ajustada²⁹, sugerindo a participação do SNP no aumento da atividade inflamatória de indivíduos com NAC.

Santos-Bezerra e cols.²⁸ avaliaram 164 indivíduos com DM1 e encontraram um aumento das concentrações de LTB4 naqueles com NAC instalada em comparação aos sem NAC instalada, mesmo após ajuste para variáveis de confusão. No estudo de Santos-Bezerra, as concentrações de LTB4 também foram mais elevadas no grupo de indivíduos com pior controle glicêmico (mediana de HbA1c de 8,6%) em relação ao grupo com melhor controle glicêmico (mediana de HbA1c de 7,9%). Ainda, menores concentrações de LTB4 foram observados nos indivíduos que faziam uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina. Esses dois últimos achados justificam porque, no Modelo 5 de ajuste (Tabela 5), a HbA1c e o uso de inibidores da enzima conversora foram incluídos como variáveis confundidoras.

Na presente análise, não observamos maiores concentrações de LTB4 naqueles indivíduos com pior controle glicêmico (dados não mostrados) ou correlação significativa entre as concentrações de LTB4 e os valores de HbA1c. Esses dados são compatíveis com aqueles encontrados por Boizel e cols. em um pequeno estudo que mensurou as concentrações urinárias de LTE4 em 19 indivíduos com DM2 antes e três meses após tratamento intensivo e não observaram redução nas concentrações desse marcador inflamatório, mesmo após redução de quase três pontos percentuais na HbA1c, diferentemente dos indivíduos com DM1, nos quais as concentrações de LTE4 diminuíram com a melhora do controle glicêmico⁶⁵.

Observamos, no entanto, na população do sexo feminino, uma correlação fraca e no limite da significância estatística entre as concentrações de LTB4 e o índice LAP, variável que é considerada um “surrogate marker” de resistência à insulina.

Na última década, a relação entre LTB4 e resistência à insulina tem sido abordada na literatura; Spite e cols. reportaram que a deficiência do receptor de LTB4 protegeu contra a resistência à insulina em roedores com obesidade induzida por dieta rica em gorduras. Esse achado corrobora hipóteses previamente levantadas de que há um aumento das concentrações de LTB4 no tecido adiposo de roedores obesos, o qual ativaria seu receptor, e, via NFκB, induziria os macrófagos a produzir citocinas, como a IL6, contribuindo para a resistência à insulina⁶⁶.

Mothe-Satney e cols. observaram aumento das concentrações de LTB4 no tecido adiposo de animais e seres humanos obesos e propuseram que os leucotrienos representariam um novo alvo na inflamação e na resistência à insulina associadas à obesidade⁶⁷.

Li e cols. mostraram que, em camundongos obesos, os mais importantes órgãos-alvo da ação metabólica da insulina, músculo, fígado e tecido adiposo apresentam concentrações elevadas de LTB4 em comparação com os camundongos magros. A inibição genética ou farmacológica do receptor de LTB4 resultou em um fenótipo anti-inflamatório, qual seja, menor acúmulo de macrófagos no tecido adiposo e menores concentrações plasmáticas de citocinas. Adicionalmente, também se observou proteção contra a resistência à insulina e contra a esteatose hepática. Suportando esses achados, o tratamento *in vitro* com LTB4 estimulou vias inflamatórias em macrófagos, reduziu a captação de glicose por miócitos e, em hepatócitos, promoveu lipogênese, aumentou a gliconeogênese e reduziu a magnitude da supressão da produção hepática de glicose pela insulina. Os autores desse trabalho concluíram que o LTB4 e seu receptor participam da resistência à insulina secundária à obesidade⁶⁸.

Bäck e cols. mensuraram as concentrações urinárias de leucotrieno E4 (LTE4) em 46 indivíduos obesos sem DM diagnosticado previamente e observaram uma associação com a relação cintura-quadril, mesmo após ajuste para variáveis de confusão⁶⁹. Não encontramos, no entanto, estudos realizados em indivíduos com DM2 que tenham associado concentrações de leucotrienos com marcadores de resistência à insulina.

Estudos adicionais em casuísticas maiores são necessários para investigar a relação entre as concentrações plasmáticas de LTB₄ e a resistência à insulina e confirmar se, de fato, existe o dismorfismo sexual observado no presente trabalho.

Em resumo, o principal achado desse estudo é a maior concentração plasmática de LTB₄ no grupo de indivíduos com DM2 e NAC instalada em comparação àqueles sem NAC instalada. Concentrações aumentadas de LTB₄ em indivíduos com NAC podem contribuir para o aumento da morbi-mortalidade cardiovascular imposta por essa complicação crônica, uma vez que estudos *in vitro* e em animais sugerem que o LTB₄ e outros leucotrienos participam do desenvolvimento da aterosclerose³⁸.

7. CONCLUSÕES

As concentrações plasmáticas de LTB₄ foram significativamente maiores em indivíduos com DM2 com NAC instalada em comparação àqueles sem NAC instalada. As concentrações desse marcador inflamatório correlacionaram-se fracamente com a resistência à insulina, estimada pelo índice LPA, apenas nas mulheres.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes 2019-2020. 2019. 19-25.
2. International Diabetes Federation. IDF Diabetes atlas 9th edition. 2019; 13-15. Disponível em: <https://www.diabetesatlas.org/en/resources/>
3. Cardona A, Day FR, Perry JRB, Loh M, Chu AY, Lehne B, e cols. Epigenome-wide association study of incident type 2 diabetes in a british population: epic-norfolk study. *Diabetes*. 2019 Dec; 68: 2315–26.
4. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet*. 2017 Feb 9; 1-13.
5. Lopes HF, Corrêa-Giannella ML, Consolim-Colombo FM, Egan BM. Visceral adiposity syndrome. *Diabetol Metab Syndr*. 2016 Jul 19; 8(40): 1-8.
6. Vlassara H, Striker GE. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat Rev Endocrinol*. 2013 Jul 11; 7(9): 526–39.
7. Vinik AI, Erbas T, Casellini CM. Diabetic cardiac autonomic neuropathy, inflammation and cardiovascular disease. *J Diabetes Invest*. 2013 Jan; 4(1): 4-18.
8. Cecilia C, Wang L, Hess CN, Hiatt WR, Goldfine AB. Atherosclerotic cardiovascular disease and heart failure in type 2 diabetes – mechanisms, management, and clinical considerations. *Circulation*. 2017 Jun 14; 2459–502.
9. Corrêa-Giannella ML, Vieira SM. A predisposição genética para o desenvolvimento da microangiopatia no DM1. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008; 52(2): 375-86.
10. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec; 414:(6865): 813-20.
11. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*. 2010 Feb; 11(2): 136–40.
12. American Diabetes Association. Microvascular complications and foot care: Standards of Medical. *Diabetes Care*. 2019; 42(Suppl. 1): S124–S38.
13. Thomé FS, Sesso RC, Lopes AA, Lugon JR, Martins CT. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2017. *Braz. J. Nephrol. (J. Bras. Nefrol.)*. 2019; 41(2): 208-14.
14. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, Zochodne DW, Wright DE, Bennett DL, e cols. Diabetic neuropathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2019; 5(41): 1-18.
15. International Diabetes Federation. IDF Diabetes atlas 7th edition. 2015; 28-9.

16. Vinik AI. The conductor of the autonomic orchestra. *Front Endocrinol.* June 2012; 3(Article 71): 1-13.
17. Kaufmann H, Norcliffe-Kaufmann L, Palma JA. Baroreflex dysfunction. *N Engl J Med.* 2020 Jan 9; 382(2): 163-78.
18. Spallone V, Ziegler D, Freeman R, Bernardi L, Frontoni S, Pop-Busui R, e cols and Neuropathy, Toronto Consensus Panel on Diabetic. Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011; 27: 639–53.
19. Gastoł J, Pawliński L, Kieć-Wilk B. Cardiovascular autonomic neuropathy in the course of diabetes – the review of actual knowledge. *Postępy Biochemii.* 2019; 65(4): 1-7.
20. Mala S, Potockova V, Hoskovcova L, Pithova P, Brabec M, Kulhankova J, e cols. Cardiac autonomic neuropathy may play a role in pathogenesis of atherosclerosis in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017 Oct; 1-18.
21. Spallone V. Update on the impact, diagnosis and management of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: what is defined, what is new, and what is unmet. *Diabetes Metab J.* 2019; 43: 3-30.
22. Maser RE, Mitchell BD, Vinik AI, Freeman R. The association between cardiovascular autonomic neuropathy and mortality in individuals with diabetes. *Diabetes Care.* 2003 Jun; 26(6): 1895-901.
23. Valensi P, Sachs RN, Harfouche B, Lormeau B, Paries J, Cosson E, e cols. Predictive value of cardiac autonomic neuropathy in diabetic patients with or without silent myocardial ischemia. *Diabetes Care.* 2001 Feb; 24(2): 339-43.
24. Vinik AI, Ziegler D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Circulation.* 2007; 115: 387-97.
25. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002 Dec; 420: 853-9.
26. Lanza GA, Pitocco D, Navarese EP, Sestito A, Sgueglia GA, Manto A, e cols. Association between cardiac autonomic dysfunction and inflammation in type 1 diabetic patients: effect of beta-blockade. *Eur Heart J.* 2007; 28: 814–20.
27. Gonzalez-Clemente JM, Vilardell C, Broch M, Megia A, Caixas A, Gimenez-Palop O, e cols. Lower heart rate variability is associated with higher plasma concentrations of IL - 6 in type 1 diabetes. *Eur J Endocrinol.* 2007 Jul; 157(1): 31-8.
28. Santos-Bezerra DP, Filgueiras LR, Monteiro MB, Admoni SN, Perez RV, Cavaleiro AM, Machado CG, Machado UF, Passarelli M, Jancar S, Correa-Giannella ML. Cardiovascular autonomic neuropathy and poor glycemic control are associated with leukotriene pathway activation in individuals with type 1 diabetes. *Mediators Inflamm.* No prelo 2019.

29. Herder C, Schamarek I, Nowotny B, Carstensen-Kirberg M, Straßburger K, Nowotny P, e cols. Inflammatory markers are associated with cardiac autonomic dysfunction in recent-onset type 2 diabetes. *Heart*. 2017; 103: 63–70.
30. Byng-Maddick R, Turner CT, Pollara G, Ellis M, Guppy NJ, Bell LCK, e cols. Tumor necrosis factor (TNF) bioactivity at the site of an acute cell-mediated immune response is preserved in rheumatoid arthritis patients responding to anti-TNF therapy. *Front Immunol*. 2017 Aug; 8(932): 1-13.
31. Akash MSH, Rehman K, Liaqat A. Tumor necrosis factor-alpha role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Cell Biochem*. 2017 Jun; 119(1): 1-16.
32. Qiao Y-c, Chen Y-l, Pan Y-h, Tian F, Xu Y, Zhang X, e cols. The change of serum tumor necrosis factor alpha in patients with type 1 diabetes mellitus A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017 Apr; 12(4): 1-14.
33. Pavkov ME, Weil EJ, Fufaa GD, Nelson RG, Lemley KV, Knowler WC, e cols. Tumor necrosis factor receptors 1 and 2 are associated with early glomerular lesions in type 2 diabetes. *Kidney Int*. 2015 Sep 23; 1-9.
34. Dinarello CA. Interleukin-1 β and the autoinflammatory diseases. *N Engl J Med*. 2009 Jun; 360(23): 2467-70.
35. Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 Beta - a friend or foe in malignancies? *Int J Mol Sci*. 2018; 19(2155): 1-34.
36. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 2019 Oct; 1-19.
37. Bedkea T, Muscate F, Soukoua S, Gaglianina N, Hubera S. IL-10-producing T cells and their dual functions. *Semin Immunol*. 2019 Nov; 1-9.
38. Peters-Golden M, Henderson Jr. WR. Leukotrienes. *N Engl J Med*. 2007; 357: 1841-54.
39. Wan M, Tang X, Stsiapanava A, Haeggström JZ. Biosynthesis of leukotriene B₄. *Semin Immunol*. 2017; 33: 3-15.
40. Subramaniana BC, Majumdar R, Parenta CA. The role of the LTB₄-BLT1 axis in chemotactic gradient sensing and directed leukocyte migration. *Semin Immunol*. 2017; 33: 16-29.
41. Filgueiras LR, Serezani CH, Jancar S. Leukotriene B₄ as a potential therapeutic target for the treatment of metabolic disorders. *Front Immunol*. 2015 Oct; 6: 1-4.
42. Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Oct; 2-23.

43. Dutta T, Chai HS, Ward LE, Ghosh A, Persson XM, Ford GC, e cols. Concordance of changes in metabolic pathways based on plasma metabolomics and skeletal muscle transcriptomics in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2012 May; 61(5): 1004-16.
44. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome — a new worldwide definition. *Lancet*. 2005; 366: 1059-62.
45. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 2005; 28: S4-36.
46. Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, Bianco HT, Chacra APM, Bertoluci MC, e cols. Diretriz brasileira baseada em evidências sobre prevenção de doenças cardiovasculares em pacientes com diabetes: posicionamento da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD); da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) e da Sociedade Brasileira de Endocrinol. *Diabetol metab syndr*. 2017 Jul 14; 13-8.
47. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, e cols; CKD-EPI. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Inter Med*. 2009; 150(9): 604-612.
48. HS, Kahn. The "lipid accumulation product" performs better than the body mass index for recognizing cardiovascular risk: a population-based comparison. *BMC Cardiovasc Disord*. 2005; 5(26): 1-10.
49. Fiorentino TV, Marini MA, Succurro E, Andreozzi F, Sesti G. Relationships of surrogate indexes of insulin resistance with insulin sensitivity assessed by euglycemic hyperinsulinemic clamp and subclinical vascular damage. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2019 Nov; 7(e000911): 1-8.
50. Moreira RO, Castro A P, Papelbaum M, Appolinário JC, Ellinger VCM, Coutinho WF. e cols. Translation into portuguese and assessment of the reliability of a scale for the diagnosis of diabetic distal polyneuropathy. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2005 Dec; 49(6): 944-50.
51. International working Group on the Diabetic Foot (IWGDF), IWGDF Practical guidelines on the prevention and management of diabetic foot disease. The International working Group on the Diabetic Foot (IWGDF). [Online] 2019. [Acesso em: Fevereiro 4-22, 2020.] Disponível em: www.iwgdfguidelines.org.
52. Ewing DJ, Clarke BF. Diagnosis and management of diabetic autonomic neuropathy. *Br Med J*. 1982; 285: 916-8.
53. Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care*. 2003; 26(5): 1553-79.
54. Agelink MW, Malessa R, Baumann B, Majewski T, Akila F, Zeit T, Ziegler D. Standardized tests of heart rate variability: normal ranges obtained from 309 healthy humans, and effects of age, gender, and heart rate. *Clin Auton Res*. 2001; 11(2): 99-108.

55. Yu L, Li Y, Du C, Zhao W, Zhang H, Yang Y, e cols. Pattern recognition receptor-mediated chronic inflammation in the development and progression of obesity-related metabolic diseases. *Mediators Inflamm*. 2019 Sep 8; 1-14.
56. Rosen CE, Palm NW. Functional classification of the gut microbiota: the key to cracking the microbiota composition code. *Bioessays*. 2017 Sep; 39(9): 1-12.
57. Domingueti CP, Dusse LMSA, Carvalho MG, Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes Mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *J Diabetes Complications*. 2016; 30: 738–45.
58. Herder C, Roden M, Ziegler D. Novel insights into sensorimotor and cardiovascular autonomic neuropathy from recent-onset diabetes and population-based cohorts. *Trends Endocrinol Metab*. 2019 May; 30(5): 286-98.
59. Pop-Busui R, Ang L, Holmes C, Gallagher K, Feldman EL. Inflammation as a therapeutic target for diabetic neuropathies. *Curr Diab Rep*. 2016; 16(29): 1-10.
60. Doupis J, Lyons TE, Wu S, Gnardellis C, Dinh T, Veves A. Microvascular reactivity and inflammatory cytokines in painful and painless peripheral diabetic neuropathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94(6): 2157–63.
61. Duksal T, Tiftikcioglu BI, Bilgin S, Kose S, Zorlu Y. Role of inflammation in sensory neuropathy in prediabetes or diabetes. *Acta Neurol Scand*. 2016 May; 133(5): 384–90.
62. Herder C, Kannenberg JM, Huth C, Carstensen-Kirberg H, Rathmann W, Koenig W, e cols. Proinflammatory cytokines predict the incidence and progression of distal sensorimotor polyneuropathy: KORA F4/FF4 Study. *Diabetes Care*. 2017 Apr; 40(4): 569-76.
63. Pavlov VA, Tracey KJ. The vagus nerve and the inflammatory reflex -linking immunity and metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Dec; 8(12): 743–54.
64. Haensel A, Mills PJ, Nelesen RA, Ziegler MG, Dimsdale JE. The relationship between heart rate variability and inflammatory markers in cardiovascular diseases. *Psychoneuroendocrinology*. 2008 Nov; 33(10): 1305-12.
65. Boizel R, Bruttman G, Benhamou PY, Halimi S, Stanke-Labesque F. Regulation of oxidative stress and inflammation by glycaemic control: evidence for reversible activation of the 5-lipoxygenase pathway in type 1, but not in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2010 Sep; 53(9): 2068-70.
66. Spite M, Hellmann J, Tang Y, Mathis SP, Kosuri M, Bhatnagar A, e cols. Deficiency of the leukotriene B4 receptor, BLT-1, protects against systemic insulin resistance in diet-induced obesity. *J Immunol*. 2011 Aug; 187(4): 1942-9.

67. Mothe-Satney I, Filloux C, Amghar H, Pons C, Bourlier V, Galitzky J, e cols. Adipocytes secrete leukotrienes: contribution to obesity-associated inflammation and insulin resistance in mice. *Diabetes*. 2012 Sep; 61(9): 2311-9.
68. Li P, Oh DY, Bandyopadhyay G, Lagakos WS, Talukdar S, Osborn O, e cols. LTB4 promotes insulin resistance in obese mice by acting on macrophages, hepatocytes and myocytes. *Nat Med*. 2015 Mar; 21(3): 239-47.
69. Bäck M, Avignon A, Stanke-Labesque F, Boegner C, Attalin V, Leprieur E, Sultan A. Leukotriene production is increased in abdominal obesity. *PLoS One*. 2014 Dec; 9(12): 1-11.
70. Nyström T, Holzmann MJ, Eliasson B, Svensson AM, Kuhl J, Sartipy U. Estimated glucose disposal rate and long-term survival in type 2 diabetes after coronary artery bypass grafting. *Heart Vessels*. 2017; 32: 269-78.
71. Aksentijevich I, Masters SL, Ferguson PJ, e cols. An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *N Engl J Med*. 2009 Jun; 360: 2426-37.
72. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, Mariotti SP. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Orga*. 2004 Nov; 82(11): 844-51.

9. APÊNDICES

9.1. Apêndice 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE PARTICIPANTE DO ESTUDO OU RESPONSÁVEL LEGAL

Nome _____ do _____ paciente _____ (voluntário):

Sexo: M F Data de Nascimento: ____/____/____ Etnia: _____

Email: _____ Endereço: _____

____ APTO: _____ Bairro: _____ Cidade: _____

____ CEP _____ TELEFONE: (____) _____

Convite para participar do estudo: Você está sendo convidado a responder questionários e realizar exames que estarão descritos abaixo neste termo. Estes, fazem parte de um estudo que tem o objetivo de avaliar se a utilização do telefone celular poderá ser eficaz como forma de educação em saúde, no cuidado e prevenção da úlcera do pé diabético.

As informações apresentadas neste termo de consentimento foram fornecidas pela MSc Mozânia Reis de Matos. Após o senhor(a) aceitar o convite, estará autorizando sua participação neste estudo por vontade própria tendo o conhecimento das perguntas e intervenções(exames) que serão feitas e dos riscos aos quais o Sr.(a) se submeterá, podendo desistir em qualquer etapa da pesquisa.

As medidas de peso e altura, para avaliação do índice de massa corpórea (IMC) serão realizadas em local reservado, para evitar possíveis constrangimentos aos participantes da pesquisa.

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título da pesquisa Experimental:

“Avaliação da eficácia da ferramenta digital em cuidados e prevenção do pé de risco em pacientes com diabetes”.

2. Objetivo da pesquisa: Avaliar a eficácia de uma ferramenta digital na prevenção da úlcera do pé diabético. Para melhor entendermos como você se trata e como o diabetes afeta a sua vida, também serão aplicados dois questionários: um sobre práticas diárias de cuidado com o pé diabético (no início e ao final do estudo) e o outro sobre os sentimentos que o diabetes desperta em você. Além disso, também será

realizada uma comparação entre três formas de diagnosticar a neuropatia diabética, que é uma complicação do diabetes que acomete os nervos. Também será avaliado a prevalência de neuropatia periférica e de neuropatia autonômica cardiovascular em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

3. Justificativa: Entender se o telefone celular pode ajudar na prevenção de úlcera nos pés e pode abrir caminho para novas estratégias de tratamento que possam melhorar a evolução de indivíduos com diabetes. Conhecer melhor a forma como os pacientes se trata no dia a dia e como o diabetes afeta suas vidas pode aumentar o conhecimento dos profissionais de saúde sobre essa doença e resultar em mudanças na forma de abordá-la.

5. Riscos e benefícios esperados: Riscos: os pacientes estão submetidos a constrangimentos ao responder questionários e ao retirar a camisa para realização do eletrocardiograma. O risco de tontura após realização do teste de respiração profunda e teste de Valsalva (soprar forte por 15 segundos) e risco de queda ao realizar o teste ortostático (aferir a pressão arterial deitado e se levantar da maca para aferir novamente de pé).

Os pacientes também terão como riscos no local onde será inserido a agulha para coleta de sangue: dor, vermelhidão, hematoma (lesão roxa na pele) e inflamação. Também poderá sentir medo, ter episódio de desmaio e ansiedade.

Para minimizar estas ocorrências, a coleta de sangue será feita por profissional treinado com anos de experiência em coleta de sangue, em um local calmo e tranquilo, explicando ao paciente todo o procedimento. Para aqueles que tem medo de agulha e sofrem de ansiedade a coleta será realizado deitado para evitar desmaios. Todos os materiais serão estéreis e descartáveis para evitar infecção.

-Não será realizada tricotomia (retirada de pêlos, neste caso, do tronco) para a exame de eletrocardiograma.

Para minimizar os riscos de queda por tontura, antes do paciente se levantar da maca, será explicado novamente a ele este risco e terá um profissional de saúde para ajudá-lo a se levantar e permanecer ao seu lado por 2 minutos, evitando a queda, caso a tontura persista será realizado atendimento médico e de enfermagem, na Unidade de Saúde onde estará ocorrendo a pesquisa.

Benefícios: Essa investigação poderá beneficiar os indivíduos com diabetes, pois permitirá ampliar estratégias que visem a prevenção da úlcera do pé diabético. Além disso, o estudo aumentará o conhecimento dos profissionais de saúde sobre o

impacto que o diabetes tem na vida dos pacientes, o que também pode resultar em melhora no tratamento desta doença.

6. Coleta de dados: A pesquisa terá duas fases, na primeira, todos os pacientes participantes da pesquisa responderão a questionários e participarão de avaliação clínica. As respostas aos questionários terão duração de 10 minutos. Serão 3 questionários, um com 17 questões, outro com 10 e um último com 6 questões, totalizando 33 questões. Na fase de avaliação clínica, com duração de 10 minutos para cada um dos participantes serão medidos peso, estatura, pressão arterial e a glicemia capilar (dextro), será realizado um exame nos pés para identificar se o paciente tem risco para desenvolver feridas nos pés. O paciente também fará eletrocardiograma, teste de respiração profunda, teste do sopro (manobra de Valsalva) e aferida a pressão arterial deitado e de pé. Exames laboratoriais como coleta de sangue e urina serão realizados no início e ao final da pesquisa, o tempo para realização do exame será de 10 minutos.

Após a avaliação de dados clínicos e aplicação de questionário, inicia-se a segunda fase da pesquisa, onde, serão enviadas mensagens de texto aos celulares, apenas, dos participantes que foram selecionados através de um procedimento chamado de randomização, este procedimento selecionará os pacientes que participarão de um grupo chamado intervenção, de maneira justa, todos poderão ter a possibilidade de participar deste grupo. Os que não forem selecionados para o grupo intervenção, participarão do grupo controle. As mensagens serão semanais durante um ano. Serão três tipos de mensagem, 1: **Abordando o autocuidado (como você mesmo se cuida):** Orientando o paciente a inspecionar seus pés todos os dias e as medidas para diminuir o risco de feridas. 2. **abordando calçados adequados:** Será orientado quanto aos cuidados com sapatos, como eles devem ser e quais cuidados devem ser tomados antes de calça-los; 3. **abordando cuidados gerais:** Serão enviadas mensagem sobre os cuidados gerais para o paciente diabético, ex: uso correto das medicações, alimentação saudável, continuar observando os pés e sinais de risco de ferida

Em ambos os grupos os pacientes terão uma consulta de enfermagem no início da pesquisa, uma segunda, após 6 meses desta primeira consulta e uma terceira e última, um ano após a primeira, no final da pesquisa. Cada consulta terá tempo de duração de 20 minutos, em todas as consultas serão medidos peso, estatura, pressão

arterial e a glicemia capilar. Também será verificado se houve alguma mudança no tratamento do Diabetes mellitus e o surgimento de alguma úlcera ou amputação.

Durante a coleta de dados será orientado a todos os pacientes, independente a que grupo pertencem que o surgimento de qualquer lesão no pé (ferida, arranhão ou vermelhidão), procurar a unidade de saúde que foi feita a consulta de enfermagem no início da pesquisa, imediatamente, para avaliação e tratamento. E se for o caso de não está próximo de casa, procurar qualquer serviço de saúde mais próximo. Todo tratamento da lesão poderá ser feito na unidade que foi feita a primeira consulta de enfermagem.

Quanto aos procedimentos da pesquisa, o único que não será realizado a todos os participantes e sim, apenas ao grupo intervenção, será o envio da mensagem de texto.

7. Duração da pesquisa: 1 ano

8. Retirada de consentimento ou não participação no estudo: É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento. O Sr(a) pode deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento no posto de saúde; Ou também poderá não iniciar sua participação no estudo, o senhor poderá tanto não iniciar sua participação, quanto se retirar do estudo a qualquer momento. Seu atendimento continuará sendo realizado na Unidade Básica de Saúde Dra Ilza Weltman Hutzler, de rotina normalmente, sempre que achar necessário.

9. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, o Sr(a) poderá ter acesso aos profissionais responsáveis por ele, para esclarecimento e retirar dúvidas relacionadas ao estudo que o senhor está fazendo parte. O principal investigador e responsável pelo estudo é a MSc. Mozânia Reis de Matos, que poderá ser encontrada no endereço: Rua Vergueiro, 235, Liberdade São Paulo, telefone para contato da responsável pelo estudo é (11) 98034-4210 e o MSc. José Antônio Januário Neves, que poderá ser encontrado no endereço: Rua Vergueiro, 235, Liberdade São Paulo, telefone para contato: (11) 96057-0099. Já caso o senhor tenha dúvidas quanto as questões éticas do estudo, ou gostaria de realizar alguma denúncia quanto o mesmo, o senhor poderá entrar em contato com o **CEP/SMS pelo e-mail: smscep@gmail.com, ou pelo telefone 11-33972464.** Ou também poderá entrar em contato com **Comitê de Ética da Uninove: Rua. Vergueiro nº 235/249 – 12º andar - Liberdade – São Paulo – SP CEP. 01504-001 Fone: 3385-9010 comitedeetica@uninove.br**

10. Garantia de sigilo: Conforme **Resolução 466/12, IV3e**. Firmamos o compromisso de garantir o sigilo dos dados de identificação de todos os participantes do estudo.

Os dados (nome, data de nascimento, endereço, e-mail e telefone) serão utilizados para identificação do pacientes, laudar os exames e testes que serão feitos e entrar em contato para informar futuros resultados.

11. Custos: Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há pagamentos de nenhuma forma por sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será paga pelo orçamento da pesquisa. É compromisso de o pesquisador utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

12. Local da pesquisa: Será desenvolvida na Universidade Nove de Julho - UNINOVE. A coleta de dados será realizada, voluntariamente com os pacientes da Unidade Básica de Saúde - Dr^a Ilza Weltman Hutzler, localizada na Rua Coronel Walfrido de Carvalho, S/N. (11) 3981-3127.

13. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos participantes de pesquisas em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento das pesquisas dentro dos padrões éticos (Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa envolvendo Seres Humanos – Res. CNS nº 466/12). O Comitê de Ética é responsável pela avaliação e acompanhamento dos protocolos de pesquisa no que corresponde aos aspectos éticos. **Endereço do Comitê de Ética da Uninove: Rua. Vergueiro nº 235/249 – 12º andar - Liberdade – São Paulo – SP CEP. 01504-001 Fone: 3385-9010 comitedeetica@uninove.br**

14. Eventuais intercorrências que vierem a surgir no decorrer da pesquisa poderão ser discutidas com a MSc. Mozânia Reis de Matos e o MSc. José Antônio Januário Neves.

Se houver o surgimento de qualquer lesão no pé (ferida, úlcera, arranhão e/ou vermelhidão), que seja lesiva ao paciente tanto no grupo controle quanto no grupo intervenção, os mesmos receberão o devido encaminhamento, orientação e/ou tratamentos necessários, sem prejuízo a sua saúde.

15. Consentimento Pós-Informação:

Eu, _____, após ter sido devidamente esclarecido concordo em participar do estudo.

_____ Data __/__/__

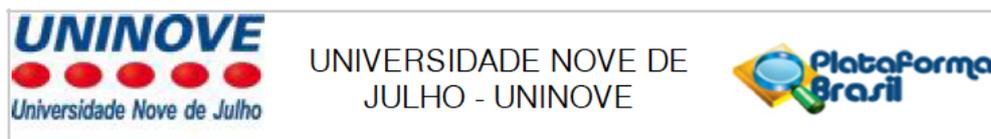
Assinatura paciente/representante legal

_____ Data __/__/__

Pesquisador Responsável

10. ANEXOS

10.1. Anexo 1 – Parecer Consubstanciado do CEP da UNINOVE.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA FERRAMENTA DIGITAL EM CUIDADOS E PREVENÇÃO DO PÉ DE RISCO EM PACIENTES COM DIABETES

Pesquisador: Mozania Reis de Matos

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 81249417.1.0000.5511

Instituição Proponente: ASSOCIACAO EDUCACIONAL NOVE DE JULHO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.050.387

Apresentação do Projeto:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1017591.pdf	11/09/2018 00:41:22		Aceito
Orçamento	orcamento.docx	11/09/2018 00:40:57	Mozania Reis de Matos	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	11/09/2018 00:38:13	Mozania Reis de Matos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	11/09/2018 00:36:58	Mozania Reis de Matos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.docx	11/09/2018 00:35:32	Mozania Reis de Matos	Aceito
Outros	ciencia.pdf	09/06/2018 12:48:10	Mozania Reis de Matos	Aceito
Outros	Ementa.docx	09/06/2018 12:40:38	Mozania Reis de Matos	Aceito
Outros	autorizacao.pdf	23/11/2017 15:33:43	Mozania Reis de Matos	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	23/11/2017 15:08:23	Mozania Reis de Matos	Aceito

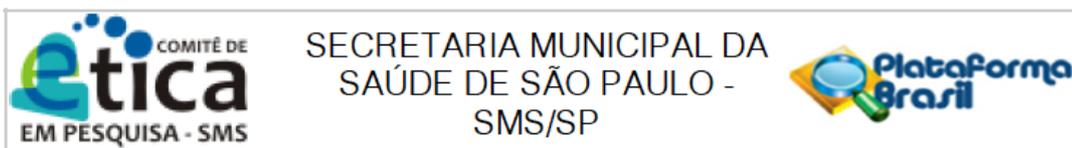
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

10.2. Anexo 2 – Parecer Consubstanciado do CEP da Secretaria Municipal de Saúde da Cidade de São Paulo.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA FERRAMENTA DIGITAL EM CUIDADOS E PREVENÇÃO DO PÉ DE RISCO EM PACIENTES COM DIABETES

Pesquisador: Mozania Reis de Matos

Área Temática:

Versão: 2

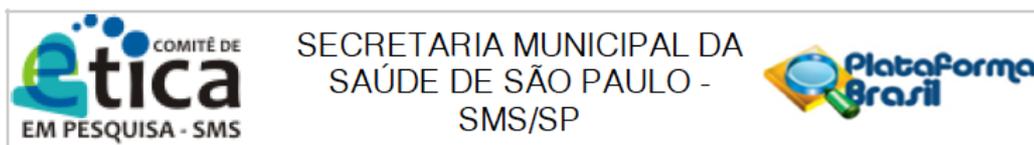
CAAE: 81249417.1.3001.0086

Instituição Proponente: SECRETARIA MUNICIPAL DA SAUDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.141.417



Continuação do Parecer: 3.141.417

Justificativa de Ausência	tcle.docx	11/09/2018 00:35:32	Mozania Reis de Matos	Aceito
Outros	ciencia.pdf	09/06/2018 12:48:10	Mozania Reis de Matos	Aceito
Outros	Ementa.docx	09/06/2018 12:40:38	Mozania Reis de Matos	Aceito
Outros	autorizacao.pdf	23/11/2017 15:33:43	Mozania Reis de Matos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 11 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
SIMONE MONGELLI DE FANTINI
(Coordenador(a))