

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

Tércio Lemos de Moraes

Efeitos da estimulação elétrica transcutânea do nervo vago  
sobre marcadores autonômicos, hemodinâmicos, metabólicos e  
inflamatórios em pacientes com Síndrome Metabólica

SÃO PAULO  
2020

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

Tércio Lemos de Moraes

Efeitos da estimulação elétrica transcutânea do nervo vago sobre marcadores autonômicos, hemodinâmicos, metabólicos e inflamatórios em pacientes com Síndrome Metabólica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de “Doutor em Ciências da Saúde”.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Marciano Consolim-Colombo

SÃO PAULO

2020

Morais, Tércio Lemos de.

Efeitos da estimulação elétrica transcutânea do nervo vago sobre marcadores autonômicos, hemodinâmicos, metabólicos e inflamatórios em pacientes com síndrome metabólica. / Tércio Lemos de Moraes. 2020.

124 f.

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

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Marciano Consolim-Colombo.

1. Síndrome metabólica. 2. Estimulação elétrica. 3. Nervo vago.



São Paulo 23 de janeiro de 2020

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno: **TERCIO LEMOS DE MORAIS**

Titulo da dissertação: **EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA DO NERVO VAGO SOBRE MARCADORES AUTONÔMICOS HEMODINÂMICOS, METABÓLICOS E INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA.**

Presidente: PROFA. DRA. FERNANDA MARCIANO C. COLOMBO Fernanda Colombo.

Membro: PROFA. DRA. KÁTIA DE ANGELIS Katia de Angelis

Membro: PROFA. DRA. IVANI CREDIDIO TROMBETTA Ivani Trombetta

Membro: PROFA. DRA. DALMO ANTONIO RIBEIRO MOREIRA Dalmo Antonio Ribeiro Moreira

Membro: PROF. DR. FRANCISCO ANTÔNIO HELFENSTEIN FONSECA Francisco Antonio Helfenstein Fonseca

## DEDICATÓRIA

*“Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, por ser essencial em minha vida”.*

*Aos meus pais, **Adesilva Lemos Alves** e **Luís Carlos Vaer**, as minhas irmãs, **Yvana Lemos Vaer** e **Thecilia Lemos da Silva**, ao meu companheiro de vida, **Edevaldo Daniel** e a minha filha, **Alícia Tomé Lemos**, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.”*

## AGRADECIMENTOS

*Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer a minha orientadora **Profa. Dra. Fernanda Marciano Consolim-Colombo**, por toda a paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientou neste trabalho e em todos aqueles que realizei durante o Doutorado. Muito obrigada por me ter corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar.*

*Desejo igualmente agradecer a todos os meus alunos de Iniciação Científica, especialmente a **Dannielly Cabral, Natalia Cristina Mesquita de Albuquerque, Felipe Pires, Emerson Gabriel dos Santos e Sarah Barboza Marins**, pela dedicação.*

*Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em especial, **Dra. Maria Aparecida Dalboni, Dra. Ivani Trombeta; Dr. Cleber Camacho, Dra. Katia De Angelis e Dra. Maria Claudia C. Irigoyen.***

*Agradeço imensamente ao meu grande amigo, **Fernando Oliveira Costa** cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos.*

*Agradeço aos funcionários do Programa de Pós-Graduação de Mestrado e Doutorado da Universidade Nove de Julho - UNINOVE, que foram sempre prestativos, em especial a **Daniela Nunes de Medeiros e Camila Camarão Esteves.***

## RESUMO

MORAIS, T.L. **Efeitos da estimulação elétrica transcutânea do nervo vago sobre marcadores autonômicos, hemodinâmicos, metabólicos e inflamatórios em pacientes com Síndrome Metabólica.** Tese de Doutorado. São Paulo: Programa de Pós-Graduação Doutorado em medicina, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), 2020.

**INTRODUÇÃO:** A Síndrome Metabólica (SM) consiste no agrupamento das condições: obesidade central, níveis aumentados de glicose, dislipidemia (aumento de triglicerídeos e baixos níveis de HDL-colesterol) e aumento da pressão arterial, sendo a inflamação crônica o principal elemento fisiopatológico comum. Na última década, inúmeros estudos demonstraram que a estimulação parassimpática (vagal ou colinérgica) pode reduzir de forma reflexa a resposta inflamatória em diferentes cenários. Esse reconhecimento levou à proposição do termo “reflexo colinérgico anti-inflamatório” para esse mecanismo. A ativação do reflexo anti-inflamatório pode ser obtida por estimulação vagal direta ou com uso de fármacos. Drogas anticolinesterásicas podem ser eficazes, mas alternativas de menor custo e com menos efeitos colaterais merecem investigação, em especial a estimulação elétrica transcutânea do nervo vago (EETNV). **OBJETIVO:** investigar os efeitos agudos (após 1 sessão de 30 minutos) e crônicos (após 8 sessões) da EETNV nos componentes da modulação autonômica cardiovascular e em parâmetros hemodinâmicos, e na fase crônica, também em variáveis metabólicas e inflamatórias, em portadores de SM. **MÉTODOS:** Estudo prospectivo, aberto, randomizado 2:1 (respectivamente, grupo tratamento, GT e grupo controle, GC), em pacientes de ambos os sexos, com idade entre 18-60 anos, que preenchiam os critérios para SM. Todos os pacientes foram amplamente avaliados para se excluírem condições que pudessem interferir no estado inflamatório, e também gravidez. Trinta pacientes foram incluídos e randomizados; 20 no GT receberam EETNV utilizando um dispositivo NEMOS® uma vez por semana durante oito semanas, por 30 minutos; 10 pacientes incluídos no GC foram avaliados no início do estudo e após 2 meses de acompanhamento. A região estimulada foi a cymba conchae da orelha esquerda. O estímulo elétrico constou de uma largura de pulso de 500ms e uma frequência de estimulação de 25 Hz. As variáveis analisadas foram: dados antropométricos, pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM), frequência cardíaca (FC), débito cardíaco (DC), resistência periférica total (RPT), avaliadas batimento-a-batimento com o Finometer®. A VFC foi analisada no domínio do tempo (VARR e RMSSD) e da frequência por meio da análise espectral (avaliação dos componentes LF%, HF%, LF(nu), HF(nu) e razão LF/HF). As amostras de sangue foram coletadas para análise bioquímicas e quantificação de marcadores celulares endoteliais, monócitos (Citometria de fluxo – FACS) e quantificação de citocinas (ELISA). **ESTATÍSTICA:** A análise dos resultados foi realizada com o programa IBM SPSS (Statistical Package for the Social Science) 20.0. A normalidade dos dados foi testada com o teste de Kolmogorov-Smirnov (KS). Foi aplicado o teste t Student para analisar amostras pareadas e não pareadas. Utilizamos o teste ANOVA de medidas repetidas para análise entre os grupos, seguido pelo teste post hoc de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes se  $p \leq 0,05$ . Os dados paramétricos foram apresentados em média e desvio padrão. **RESULTADOS:** Após uma única sessão de EETNV o GT apresentou: uma redução significativa na FC de consultório ( $72 \pm 7$

vs  $69 \pm 8$ ;  $p=0,022$ ) e obtida batimento-a-batimento ( $70 \pm 8$  vs  $67 \pm 8$ ;  $p=0,011$ ); e uma melhora no balanço simpato vago, caracterizada pelo aumento significativo do componente HF(nu) ( $50 \pm 13$  vs  $55 \pm 15$ ;  $p=0,035$ ) e redução do componente LF(nu) ( $50 \pm 13$  vs  $45 \pm 15$ ;  $p=0,040$ ) e do balanço autonômico LF/HF ( $1,4 \pm 0,9$  vs  $1,1 \pm 0,7$ ;  $p=0,010$ ). Na avaliação crônica, comparando-se os momentos basal e após 8 semanas, houve significativa diferença no comportamento das seguintes variáveis entre os GT e GC (interação com  $p<0,05$ ). No GT houve redução significativa nas medidas de consultório e batimento-a-batimento, respectivamente, da PAS ( $137 \pm 21$  vs  $121 \pm 11$ ;  $p=0,001$  e  $138 \pm 20$  vs  $127 \pm 14$ ;  $p=0,017$ ), da PAD ( $81 \pm 10$  vs  $77 \pm 8$ ;  $p=0,012$  e  $78 \pm 8$  vs  $74 \pm 7$ ;  $p=0,031$ ) e da FC ( $72 \pm 7$  vs  $68 \pm 8$ ;  $p=0,024$  e  $70 \pm 8$  vs  $66 \pm 8$ ;  $p=0,009$ ). Ocorreu aumento significativo do componente HF% ( $34 \pm 14$  vs  $43 \pm 19$ ;  $p=0,026$ ) e HF(nu) ( $50 \pm 13$  vs  $60 \pm 15$ ;  $p=0,008$ ), redução significativa do componente LF% ( $32 \pm 7$  vs  $26 \pm 8$ ;  $p=0,025$ ) e LF(nu) ( $50 \pm 13$  vs  $40 \pm 15$ ;  $p=0,008$ ), e da razão LF/HF ( $1,4 \pm 0,9$  vs  $0,8 \pm 0,6$ ;  $p=0,026$ ), além de redução do componente LF (%) da VPA ( $36 \pm 13$  vs  $28 \pm 13$ ;  $p=0,013$ ); evidenciou-se aumento no percentuais médios de CD14% ( $24 \pm 17$  vs  $52 \pm 17$ ;  $p=0,049$ ), CD31% ( $42 \pm 19$  vs  $63 \pm 14$ ;  $p=0,035$ ) e CD309% ( $1,2 \pm 0,9$  vs  $2,4 \pm 1,0$ ;  $p=0,045$ ), e redução significativa de CD16% ( $27 \pm 11$  vs  $13 \pm 5$ ;  $p=0,003$ ), indicando uma modulação em células imunes e endoteliais circulantes. Nenhuma variação significativa foi observada comparando-se os dois momentos de análise no GC ( $p>0,05$ ). Os valores médios de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) e a relação linfócito/neutrófilos não apresentaram variações significativas ( $p<0,05$ ). Porém, houve redução significativa nos valores de triglicerídeos ( $141 \pm 38$  vs  $124 \pm 32$ ;  $p=0,014$ ) no GT. **CONCLUSÃO:** A EETNV aguda foi capaz de modular parâmetros hemodinâmicos e autonômicos de pacientes com SM, e uma sessão semanal de EETNV, por um período de 8 semanas acentuou as alterações descritas e também promoveu o recrutamento de células imunes circulantes periféricas (monócitos clássicos e não clássicos) e endoteliais (circulantes e progenitoras) nesses pacientes.

**Palavras chaves:** Síndrome metabólica; Estimulação elétrica; Nervo vago.

## ABSTRACT

MORAIS, TL. **Effects of Electric Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation on Autonomic, Hemodynamic, Metabolic and Inflammatory Markers in Patients with Metabolic Syndrome.** Thesis. São Paulo:Post-Graduation Program in Medicine, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), 2020.

**INTRODUCTION:** Metabolic Syndrome (MetS) is a cluster of conditions: central obesity, augmented glucose levels, dyslipidemia (elevated triglycerides, low HDL-C) and high blood pressure; chronic inflammation is the main physiopathological component. In the last decade, many studies have demonstrated that vagal, cholinergic parasympathetic stimulation reduces the inflammatory response in different scenarios. This knowledge led to the proposition of the concept of the “cholinergic anti-inflammatory reflex” as a mechanism. Activation of this anti-inflammatory reflex can be acquired pharmacologically or by direct vagal stimulation. Although anticholinesterase agents may be effective, less expensive alternatives with fewer side effects are worth investigating, especially transcutaneous electrical stimulation of the vagus nerve (TESVN). **OBJECTIVE:** to investigate the acute (after 1 single 30-minute session) and chronic (after 8 sessions) effects of TESVN on the components of cardiovascular autonomic modulation and hemodynamic parameters, and in the chronic phase, also on metabolic and inflammatory variables, in patients with MetS. **METHODS:** This is a prospective, open, randomized 2:1 (treatment group and control group, respectively) interventional clinical study, with both sexes included and aged 18 - 60 years, who present MetS criteria. All patients were formally evaluated to exclude different conditions playing a role in the inflammatory state, pregnancy included. A total of 30 patients were included and randomized; 20 patients (treatment group, TG) received 30-minute TESVN (NEMOS® device) once a week for 8 weeks; 10 patients (control group, CG) were evaluated at the beginning of the study and after 2 months. The region stimulated was the cymba conchae of the left ear. The electrical stimulus consisted of a pulse width of 500ms and a stimulation frequency of 25 Hz. The variables analyzed were anthropometric data, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), cardiac output (CO), total peripheral resistance, beat-to-beat evaluated with Finometer®. Heart Rate Variability (HRV) was analyzed in the time domain (SDRR - Standard deviation of RR intervals and RMSSD- Root mean square of successive RR interval differences) and in the frequency domain spectral analysis (components LF%, HF%, LF (nu), HF (nu) and LF / HF ratio). Blood samples were collected for biochemical analysis and quantification of endothelial cell markers, monocytes (flow cytometry - FACS) and cytokine quantification (ELISA). **STATISTICS:** The results were analyzed using the IBM SPSS program (Statistical Package for the Social Science) 20.0. The normality of the data was tested with the Kolmogorov-Smirnov (KS) test. The Student t test was applied to analyze paired and unpaired samples. For the between groups analysis, the ANOVA test of repeated measures, followed by the Bonferroni post hoc test were used. The differences were considered statistically significant if  $p \leq 0.05$ . Parametric data were presented as mean and standard deviation. **RESULTS:** after one single session of TESVN the TG showed a decreased HR both in the consultation measurement ( $72 \pm 7$  vs  $69 \pm 8$ ;  $p=0,022$ ) and in the beat-by-beat measurement ( $70 \pm 8$  vs  $67 \pm 8$ ;  $p=0,011$ ); a better sympathovagal balance characterized by an augmented HF (nu) ( $50 \pm 13$  vs  $55 \pm 15$ ;  $p=0,035$ ) and by a reduced LF(nu) ( $50 \pm 13$  vs  $45 \pm 15$ ;  $p=0,040$ ) along with a

reduced LF/HF ( $1,4 \pm 0,9$  vs  $1,1 \pm 0,7$ ;  $p=0,010$ ). In the chronic evaluation, comparing the basal versus the after 8 weeks moments, there was a significant difference in the behavior of the following variables between the TG and CG (interaction  $p < 0.05$ ). In the TG, a reduction in consultation and beat-by-beat measurements of, respectively: SBP ( $137 \pm 21$  vs  $121 \pm 11$ ;  $p=0,001$  and  $138 \pm 20$  vs  $127 \pm 14$ ;  $p=0,017$ ), DBP ( $81 \pm 10$  vs  $77 \pm 8$ ;  $p=0,012$  and  $78 \pm 8$  vs  $74 \pm 7$ ;  $p=0,031$ ) and HR ( $72 \pm 7$  vs  $68 \pm 8$ ;  $p=0,024$  and  $70 \pm 8$  vs  $66 \pm 8$ ;  $p=0,009$ ). An augmented HF% ( $34 \pm 14$  vs  $43 \pm 19$ ;  $p=0,026$ ) and HF(nu) ( $50 \pm 13$  vs  $60 \pm 15$ ;  $p=0,008$ ), a decreased LF% ( $32 \pm 7$  vs  $26 \pm 8$ ;  $p=0,025$ ) and LF(nu) ( $50 \pm 13$  vs  $40 \pm 15$ ;  $p=0,008$ ), and a reduction in the LF/HF ratio ( $1,4 \pm 0,9$  vs  $0,8 \pm 0,6$ ;  $p=0,026$ ), besides a reduction in the LF (%) [Blood Pressure Variability] ( $36 \pm 13$  vs  $28 \pm 13$ ;  $p=0,013$ ); there was an increase in the average percentages of CD14% ( $24 \pm 17$  vs  $52 \pm 17$ ;  $p = 0.049$ ), CD31% ( $42 \pm 19$  vs  $63 \pm 14$ ;  $p = 0.035$ ) and CD309% ( $1.2 \pm 0.9$  vs  $2.4 \pm 1.0$ ;  $p = 0.045$ ), and significant reduction of CD16% ( $27 \pm 11$  vs  $13 \pm 5$ ;  $p = 0.003$ ), indicating a modulation in circulating immune and endothelial cells. No significant variation was observed when comparing the two moments of analysis in the CG ( $p > 0.05$ ). The mean values of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) and the lymphocyte / neutrophil ratio did not show significant variations ( $p < 0.05$ ). There was a significant reduction in triglyceride values ( $141 \pm 38$  vs  $124 \pm 32$ ;  $p = 0.014$ ) in the TG. **CONCLUSION:** Acute TESVN modulated hemodynamic and autonomic parameters of patients with MS, and a weekly session of TESVN, for a period of 8 weeks, accentuated the changes described, also promoting the recruitment of peripheral circulating immune (classic and non-classic monocytes) and endothelial (circulating and progenitor) cells in these patients.

**Keywords:** Metabolic syndrome; Electrical stimulation; Vagus nerve.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Fisiopatologia da Síndrome metabólica

**Figura 2** - Esquema simplificado da inflamação do TAB na obesidade e seus efeitos

**Figura 3** - Sequência de eventos no processo da angiogênese.

**Figura 4** – Processo de substituição de células endoteliais.

**Figura 5** - A origem e diferenciação dos monócitos do sangue periférico.

**Figura 6**- Reflexo inflamatório.

**Figura 7** - Dispositivo (forquilha) para estimulação elétrica não invasiva dos nervos vagos cervicais.

**Figura 8** - Mapeamento do Ramo Auricular no Nervo Vago

**Figura 9** - Ramo auricular do nervo vago.

**Figura 10** - Áreas de distribuição do ramo auricular do nervo vago

**Figura 11** - Aparelho e eletrodos personalizados compatíveis para RM utilizado no estudo e locais de estimulação.

**Figura 12** - Mapas de ativação para os eletrodos A, B, C e D

**Figura 13** – Gates utilizados para marcação de células endoteliais (Células progenitoras endoteliais e Células Endoteliais circulantes).

**Figura 14** - Monitorização dos parâmetros hemodinâmicos com o monitor Finometer®

**Figura 15** - Manguito de pressão circundando a falange média do segundo dedo da mão esquerda

**Figura 16**- Tela do Finometer®

**Figura 17** - A) Dispositivo NEMOS®. B) Eletrodo posicionado no ramo auricular (cymba conchae).

**Figura 18** - Comparação das médias da FC de consultório no momento basal e após 30 minutos de EE.

**Figura 19** – Comparação das médias da FC no momento basal e após 30 minutos de EE, avaliada batimento-a-batimento através do FINOMITER.

**Figura 20** – Comparação das médias no momento basal e após 30 minutos de EE das variáveis LF(nu), HF (nu) e razão LF/HF da avaliação aguda.

**Figura 21** – Comparação das médias da PAS entre os momentos pré e pós de ambos os grupos (GC e GT).

**Figura 22** – Comparação das médias da PAD entre os momentos pré e pós de ambos os grupos (GC e GT).

**Figura 23** – Comparação das médias da FC entre os momentos pré e pós de ambos os grupos (GC e GT).

**Figura 24** – Comparação das médias da FC (pré e pós) do GC e do GT avaliada batimento-a-batimento.

**Figura 25** – Comparação das médias da variável autonômica de LF% (ms<sup>2</sup>)(pré e pós) do GC e do GT.

**Figura 26** – Comparação das médias da variável autonômica de HF% (ms<sup>2</sup>)(pré e pós) do GC e do GT.

**Figura 27** – Comparação das médias da variável autonômica de LFnu(ms<sup>2</sup>)(pré e pós) do GC e do GT.

**Figura 28** – Comparação das médias da variável autonômica de HFnu (ms<sup>2</sup>)(pré e pós) do GC e do GT.

**Figura 29** - Comparação das médias da razão LF/HF (balanço simpato-vagal) (pré e pós) do GC e do GT.

**Figura 30** – Comparação das médias da variável autonômica de HFnu (ms<sup>2</sup>)(pré e pós) do GC e do GT.

**Figura 31** – Comparação das médias dos percentuais de CD31 entre os momentos pré e pós de ambos os grupos (GC e GT).

**Figura 32** – Comparação das médias dos percentuais de CD309 entre os momentos pré e pós de ambos os grupos (GC e GT).

**Figura 33** – Comparação das médias dos percentuais de CD14 entre os momentos pré e pós de ambos os grupos (GC e GT).

**Figura 34** - Comparação das médias dos percentuais de CD16 entre os momentos pré e pós de ambos os grupos (GC e GT).

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Critérios para diagnóstico da SM segundo ATP III revisado

**Tabela 2** – Descrição dos anticorpos utilizados na marcação das células endoteliais e imunes.

**Tabela 3** - Perfil antropométrico, clínico e laboratorial dos pacientes do GT e GC no momento da inclusão (momento basal).

**Tabela 4** – Comparação das médias de PAS, PAD e FC de consultório e dos parâmetros hemodinâmicos (batimento-a-batimento) dos pacientes do GT na fase aguda (momento basal e após 30 minutos de EE)

**Tabela 5** – Comparação dos parâmetros autonômicos do GT na fase aguda (momento basal e após 30 minutos de EE).

**Tabela 6** – Comparação dos dados antropométricos e clínicos do GC no momento basal e após 2 meses sem tratamento e GT no momento basal e após 8 sessões de EE.

**Tabela 7** – Comparação das médias dos exames laboratoriais (perfil metabólico, lipídico, endócrino e inflamatório) do GC no momento basal e após 2 meses sem tratamento e do GT (momento basal e após 8 sessões de EE).

**Tabela 8** - Comparação dos parâmetros hemodinâmicos do GC (basal e após 2 meses) e GT (basal e após 8 sessões de EE).

**Tabela 9** - Comparação dos parâmetros autonômicos do GC (basal e após 2 meses) e do GT (basal e após 8 sessões de EE).

**Tabela 10** - Comparação dos marcadores imunológicos, de células endoteliais, micropartículas de origem endotelial do GC (basal e após 2 meses) e GT (basal e após 8 sessões de EE).

**Tabela 11** - Comparação das citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6) e relação linfócito/neutrófilos do GC (basal e após 2 meses) e do GT (basal e após 8 meses de EE)

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAA – Aneurismas da Aorta Abdominal

AACE - American Association of Clinical Endocrinologists

ACTH – Adrenocorticotropic hormone (Hormônio adrenocorticotrófico)

ADA – American Diabetes Association

AGL - Ácidos Graxos Livres

AHA/NHLBI - American College of Cardiology/American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute

ALT – Aspartato transaminase

ANOVA – Análise de Variância

AST – Alanina Transaminase

ATP - Adenosine Triphosphate (Adenosina Trifosfato)

Bpm – Batimento por minuto

CA – Circunferência abdominal

CECs – Células endoteliais circulantes

CPEs – Células progenitoras endoteliais

CyC - Cymba Conchae

DAC – Doença arterial coronariana

DC – Débito cardíaco

DCs – Dendritic cells (Células dendríticas)

DCV – Doença Cardiovascular

DMT2 – Diabetes Mellitus tipo 2

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DRC – Doença renal crônica

EE – Estimulação Elétrica

EET – Estimulação elétrica transcutânea

EETNV – Estimulação elétrica transcutânea do nervo vago

EGIR - European Group for the Study of Insulin Resistance

eNOS – endothelial Nitric Oxide Synthase (Oxido Nítrico Sintase endotelial)

ENV – Estimulação do nervo vago

EROs – Espécies reativas de oxigênio

EUA – Estados Unidos da América

FC – Frequência Cardíaca

FDA - Food and Drug Administration

FEVE – Fração de ejeção do ventrículo esquerdo

FGF – Fibroblast Growth Factor (Fator de crescimento de fibroblastos)

GC – Grupo controle

GLUT4 – Transportador de Glicose 4

GT – Grupo Tratamento

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

HDL – High Density Lipoprotein)

HF – High Frequency

HIV – Human Immunodeficiency Virus (Vírus da imunodeficiência humana)

HOMA – Homeostatic Model Assessment

Hz – Hertz

ICV – Intracerebrovascular

IDF – International Diabetes Federation

IkK - Ikappa kinase

IL – Interleucina

IMC - Índice de massa corporal

IP – Intervalo de pulso

IRS-1 - insulin receptor substrate 1

IRS-2 - insulin receptor substrate 2

JNK - c-jun N-terminal kinase

KS – Kolmogorov - Smirnov

LC – Locus-coeruleus

LDL – Low Density Lipoprotein

LF – Low Frequency

LPS - Lipopolysaccharide (Lipopolissacarídeo)

mA – Miliampere

MC – Monócito clássico

MCP-1 - Monocyte Chemoattractant Protein–1

mmHg - milímetro de mercúrio

MNC – Monócito não clássico

MP - Micropartículas

MPE – Micropartículas endoteliais

Ms – Milissegundos

NCEP/ATP III – National Cholesterol Education Programme Adult

NECTAR-HF - Resultados da Terapia Cardíaca Neural para Insuficiência Cardíaca

NF-kB – Factor kappa

NHANES - National Health and Nutrition Examination Survey

NK – Natural Killer

NO – Nitric Oxide (Óxido Nítrico)

NTS – Núcleo do trato solitário

NTS – Núcleo do Trato Solitário

NV – Nervo vago

NYHA - New York Heart Association

NYHA – New York Heart Association

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAD – Pressão Arterial Diastólica

PAF – Platelet Activating Factor (Fator ativador de Plaquetas)

PAI-1 -Plasminogen Activator Inhibitor-1

PAM – Pressão Arterial Média

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PCR – Proteína C Reativa

PDGF – Platelet Derived Growth Factor (Fator de crescimento derivado de plaquetas)

PI3K - Phosphatidylinositol 3-Kinase

PI3q – Fosfatidilinositol 3-quinase

RBP4 - Retinol-Binding Protein 4

RI – Resistência a insulina

RM – Ressonância Magnética

RPT – Resistência periférica total

SI – Sistema Imunológico

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida

SM – Síndrome metabólica

SN – Sistema Nervoso

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

TAB – Tecido Adiposo Branco

TAM – Tecido adiposo Marrom

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TENS - Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea

TLR-4 - Toll Like Receptors 4

TNF – Tumor Necrosis Factor

TNFR1 - Tumor Necrosis Factor Receptor 1

TNFR2 - Tumor Necrosis Factor Receptor 2

Treatment Panel III

VFC – Variabilidade de Frequência Cardíaca

VLDL - Very Low-density Lipoprotein

VLF – Very Low Frequency

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	19
1.1 Definição e caracterização da Síndrome Metabólica .....	19
1.2 Inflamação, disfunção endotelial e Doença Cardiovascular .....	30
1.3 Reflexo colinérgico inflamatório .....	40
1.4 Estimulação do nervo vago.....	46
1.5 Hipótese do estudo .....	57
2. Objetivos .....	58
2.1 Objetivo geral .....	58
2.2 Objetivo específico .....	58
3. Casuística e métodos .....	60
3.1 Características do estudo.....	60
3.2 Pacientes.....	60
3.3 Critérios de Seleção.....	61
3.4 Métodos.....	63
3.5 Sequência do estudo .....	71
3.6 Análises estatísticas.....	72
4 Resultados.....	73
4.1. Fluxograma do estudo.....	74
5. Discussão.....	94
6. Conclusão.....	110
7. Referências bibliográficas.....	111

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 – Definição e caracterização da Síndrome Metabólica

A Síndrome Metabólica (SM) tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos. Foi descrita no final da década de 1980 por Reaven como Síndrome X, e em 1991 esse termo foi substituído por Síndrome de Resistência à Insulina. No entanto, somente na década de 1990, recebeu a denominação atual (1). A SM é caracterizada pelo agrupamento de diversas anormalidades, tais como a obesidade, dislipidemia, hiperglicemia e a hipertensão arterial e está independentemente associada ao Diabetes Mellitus tipo II (DM2) e às Doenças Cardiovasculares (DCV). Sugere-se que a resistência à insulina (RI) possa ser o elo entre as alterações presentes na SM, podendo estar relacionada ao aumento da deposição de gordura visceral (2).

Desde então, várias definições de SM surgiram ao longo dos anos, apresentando algumas variações com relação aos critérios e valores de referência dos parâmetros metabólicos envolvidos na síndrome e, atualmente, existem pelo menos 7 critérios: Organização Mundial da Saúde (OMS), European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR), National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP: ATP III) original, American Association of Clinical Endocrinologists (AACE), NCEP-ATP III modificada, International Diabetes Federation (IDF) e American Heart Association and the National Heart Lung and Blood Institute (AHA/NHBLI)(3).

Em 1999, com o propósito de introduzir a investigação da SM na prática clínica, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu os critérios de seu diagnóstico. Novamente houve destaque para a investigação da RI, apontada na

definição da OMS como o principal fator de risco para a SM. Tanto a obesidade visceral quanto a corporal, medida pelo índice de massa corporal (IMC), também foram propostas como componentes diagnósticos (3).

O National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP: ATP III) lançou a definição de SM que até então tem sido a mais aceita e utilizada na prática clínica. Segundo esta, o indivíduo é diagnosticado como portador de SM se tiver três ou mais dos seguintes fatores (Tabela 1) (2).

**Tabela 1 – Critérios para diagnóstico da SM segundo ATP III revisado (Presença de 3 ou mais dos seguintes fatores)**

PARÂMETROS	NÚMERO DE ALTERAÇÕES ≥ 3 DE:
Glicose	≥ 100 mg/dL
HDL – colesterol	Homens: < 40 mg/dL Mulheres: < 50 mg/dL
Triglicérides	≥ 150 mg/dL
Obesidade	Circunferência abdominal (CA) ≥ 102 cm para homens ou ≥ 88 cm para mulheres
Hipertensão arterial	≥ 130 x 85 mmHg

Adaptado de Grundy *et al*, 2005 (2).

A existência de múltiplas definições para o diagnóstico da SM tem dificultado a determinação de suas taxas de frequência, bem como a comparação desses valores entre os estudos existentes (4). Por isso, alguns trabalhos tiveram como objetivo a comparação da frequência de SM por diferentes diretrizes (5,6).

A prevalência de SM tem aumentado para proporções epidêmicas nos Estados Unidos da América (EUA), em países urbanizados e em países em desenvolvimento (7). Como exemplo, a SM afeta mais de 50 milhões de americanos (8). Apesar de um mecanismo fisiopatológico unificador subjacente à SM ainda não ter sido determinado, a adiposidade abdominal (obesidade), a RI e a inflamação parecem centrais para SM e para os componentes individuais. Além disso, pensa-

se que o estado pró-inflamatório associado à SM é um possível mecanismo para as consequências adversas da desordem (7,9,10).

A abordagem terapêutica da SM inclui mudanças no estilo de vida como exercícios físicos e dieta, que podem ser benéficos. Em muitos casos, no entanto, as modificações no estilo de vida não são possíveis ou são difíceis de manter pelos pacientes, especialmente com o passar da idade e o aumento da morbidade, que impedem tais abordagens (11).

As opções farmacológicas para tratamento da SM são limitadas quanto ao controle dos componentes individuais. Entretanto, mais do que tratar cada componente da SM separadamente, seria altamente benéfico e menos dispendioso se uma única medicação, atuando num mecanismo fisiopatológico comum, pudesse ser usada no tratamento dessa complexa desordem (11).

### **Aspectos fisiopatológicos da SM**

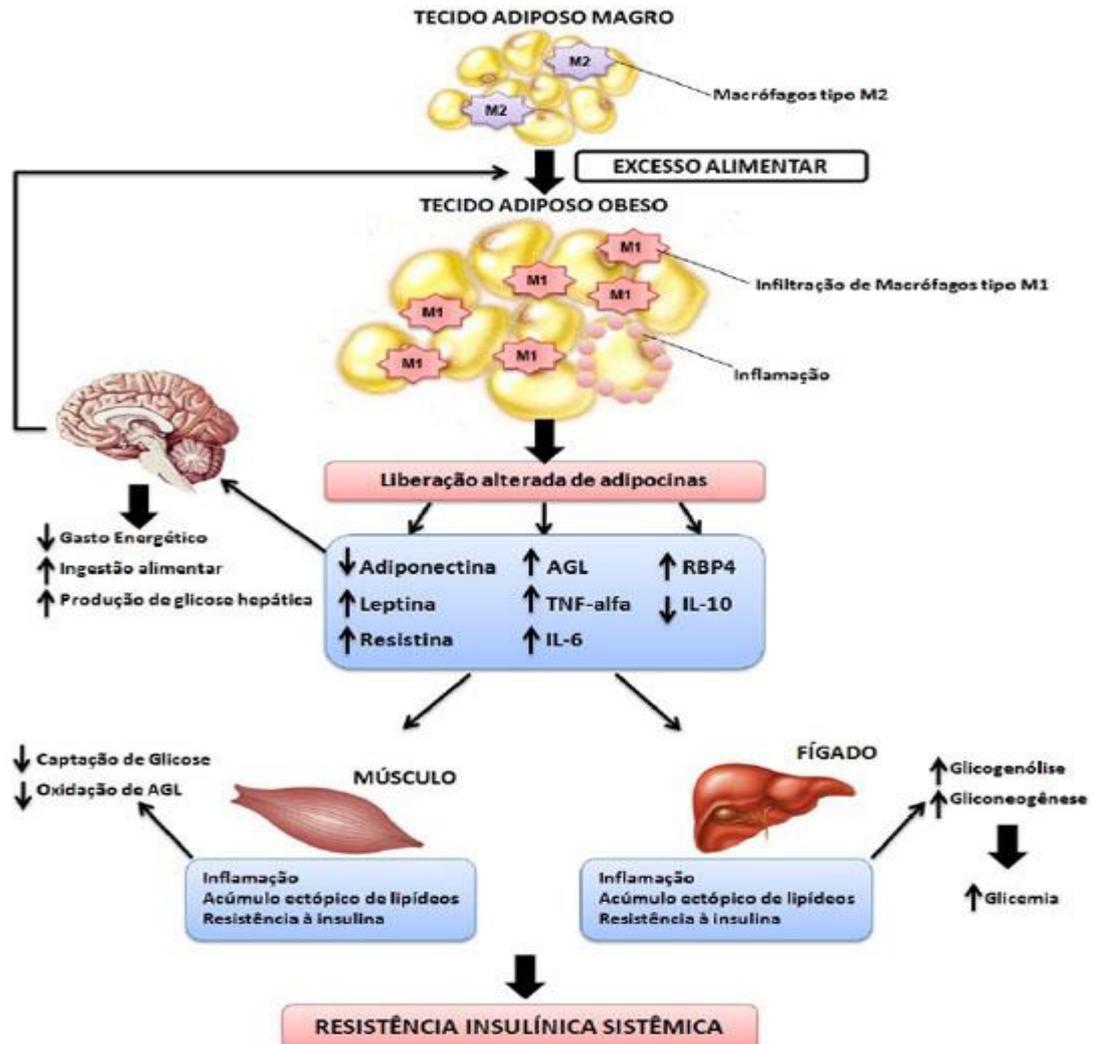
Vários fatores genéticos e ambientais intervêm na SM, tornando a sua patogênese bastante complexa e não muito clara (12). A fisiopatologia da SM pode ter três hipotéticos aspectos clínicos. Uma combinação de excessos alimentares, inatividade física, genética e outros fatores que interagem para produzir um estado de desregulação metabólica que leva à resistência à insulina, deposição lipídica, obesidade e outras disfunções celulares (13).

A obesidade, sobretudo a abdominal, é importante, uma vez que o tecido adiposo secreta substâncias que podem favorecer o aparecimento de um estado pró-inflamatório, de resistência à insulina e provocar danos ao endotélio. São gerados ácidos graxos livres (AGL) não esterificados, que aumentam no plasma e promovem o aumento da gliconeogênese. Como consequência do aumento dos

AGL, o fígado vai aumentar a produção de triglicérides e secreção de VLDL, resultando numa redução de HDL-colesterol e aumento de LDL-colesterol (14).

O aumento das células adiposas e a infiltração dos macrófagos no tecido adiposo causam secreção de citocinas pró-inflamatórias que geram a resistência à insulina (Figura 1). A insulina promove a captação de glicose no músculo, gordura, e células do fígado e pode influenciar a lipólise e a produção de glicose por hepatócitos (15).

Com a deposição de tecido adiposo, há a estimulação da utilização de AGL como fonte de energia em vez da glicose. O aumento da produção de glicose e a sua não utilização por parte do corpo como fonte de energia vai gerar uma hiperglicemia; o pâncreas passa a produzir mais insulina para manter a glicemia basal em níveis normais, provocando uma hiperinsulinemia. Como consequência da hiperglicemia e hiperinsulinemia, pode ainda haver um aumento da reabsorção de sódio e da atividade do sistema nervoso simpático, contribuindo para o desenvolvimento de hipertensão arterial (14). As consequências da RI por uma utilização ineficaz da glicose e dos ácidos graxos leva ao desenvolvimento do Diabetes Mellitus tipo II (16)



**Figura 1 - Fisiopatologia da Síndrome metabólica.** Legendas: M1: Macrófago tipo 2; AGL: Ácido Graxo livre; TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral-alfa; IL-6: Interleucina 6; IL-10: Interleucina 10; RBP4: Proteína Ligadora de Retinol 4 (16)

A hiperinsulinemia e os marcadores inflamatórios como as citocinas desempenham um papel importante no desenvolvimento do perfil anormal de lipídios, hipertensão e disfunção endotelial vascular, que pode levar ao desenvolvimento de doença cardiovascular aterosclerótica (16).

A SM também pode estar presente na origem da doença cardíaca coronária através de vários mecanismos, como aumento da trombogenicidade do sangue circulante. Neste caso pode dever-se ao aumento do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e dos níveis de adipocinas, o que provoca uma disfunção endotelial. Pode

também aumentar o risco de desenvolver problemas cardiovasculares, através do aumento da rigidez arterial. O estresse oxidativo tem também sido associado a diversos componentes da SM (15).

### **Obesidade e inflamação na Síndrome metabólica**

A origem desse conceito apoia-se no fato de que o nível circulante de muitas citocinas e proteínas de fase aguda associadas à inflamação apresenta-se elevado em pacientes obesos (17,18).

Durante décadas, o tecido adiposo foi considerado como um órgão com papel crucial apenas na regulação da homeostase dos ácidos graxos do organismo. Em períodos de abundância de calorias, os AGL são armazenados na forma de triacilglicerol através da sua esterificação com glicerol e, em tempos de escassez de energia, estes são liberados de volta para a circulação (19).

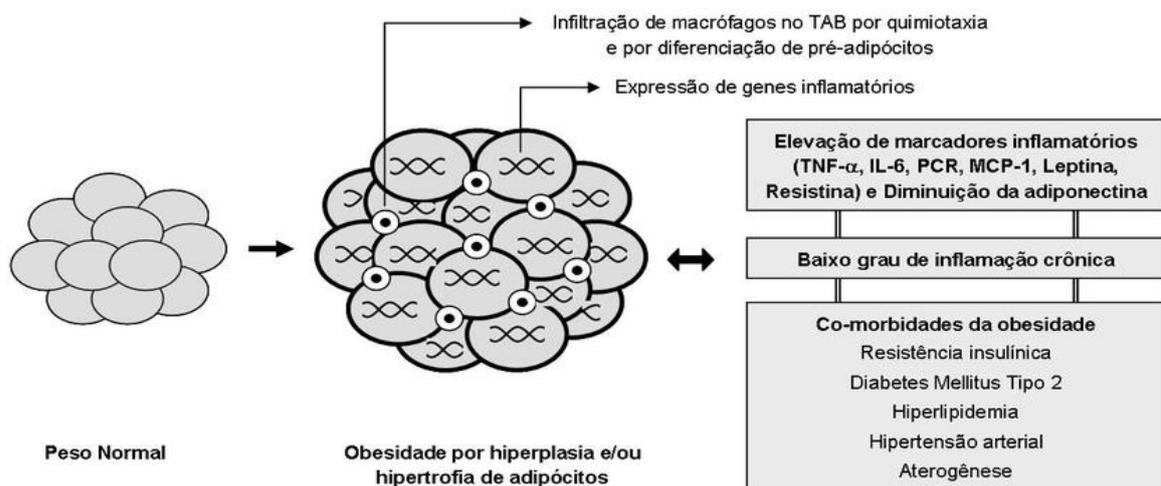
Foi com a descoberta da leptina, hormônio regulador da ingestão de alimentos e do balanço energético, e a confirmação da secreção de proteínas envolvidas na regulação do metabolismo, como o TNF-alfa, identificada como um regulador negativo da transdução do sinal de insulina, que o tecido adiposo branco (TAB) passou a ser considerado um órgão secretor (19). Sabe-se hoje que o tecido adiposo possui, além da capacidade de regulação do armazenamento e da distribuição de gordura, comunicação com o sistema nervoso central e o trato gastrointestinal, desempenhando importante papel na resposta inflamatória em condições tanto autócrinas quanto parácrinas ou endócrinas (20).

Atualmente, mais de cinquenta produtos derivados dos adipócitos já foram isolados e caracterizados. Nesse sentido, estudos experimentais mostraram que ratos obesos aumentam não apenas os níveis de TNF- $\alpha$ , mas também de outras adipocinas pró-inflamatórias incluindo as interleucinas 6 e 1- $\beta$ , quimiocina ligante CC 2 (CCL2), entre outras (19). Em contrapartida, ratos obesos diminuem os níveis de adipocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (20).

A localização da gordura corporal também tem implicações significativas para os riscos à saúde, sendo que riscos maiores estão associados à obesidade abdominal. Este aumento é infindo, podendo ultrapassar a capacidade de suprimento de sangue para estas células, com a possibilidade de interação com monócitos atraídos a partir da medula óssea (20). Estudos recentes mostram que a hipertrofia dos adipócitos, isto é, o aumento do volume da célula adiposa, decorrente do acúmulo excessivo de triacilgliceróis, é altamente correlata com a obesidade e acarreta uma infiltração e ativação de macrófagos no tecido adiposo. Isso, por sua vez, culmina no aumento do processo inflamatório crônico de baixa intensidade (20).

A hipertrofia dos adipócitos, especialmente os viscerais, que são mais ativos, está relacionada com a resistência ao efeito antilipolítico da insulina e aumento da ação das catecolaminas. Isso se deve ao aumento da expressão de beta-adrenoreceptores (beta-3) e à diminuição da expressão de alfa-2-adrenoreceptor, aumentando o fluxo dos ácidos graxos não esterificados para o fígado, via sistema porta, culminando em maior produção de glicose hepática, redução da degradação de Apolipoproteína B e aumento da produção de triacilgliceróis. Todas essas alterações descritas (alteração nos mecanismos de síntese e oxidação de lipídios, bem como sua função secretória) são fatores que indicam o envolvimento do tecido adiposo com a fisiopatologia da SM (21).

A hipertrofia dos adipócitos induz à infiltração de macrófagos e alteração do fenótipo do tipo M2 para M1 pró-inflamatório, resultando em um aumento da inflamação com produção aumentada de adipocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa e IL-6. Isso é acompanhado por um aumento da liberação de ácidos graxos livres e desregulação da secreção de leptina, adiponectina, resistina e proteína ligante de retinol (RBP4). Juntas, essas substâncias derivadas dos adipócitos e macrófagos podem agir de forma parácrina ou autócrina, agravando a inflamação do tecido adiposo (21) (Figura 2).



**Figura 2 – Esquema simplificado da inflamação do TAB na obesidade e seus efeitos.** Legendas: TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose tumoral alfa; PCR: Proteína C Reativa; MCP-1: Proteína-1 Quimiotática de monócitos 1; TAB: Tecido Adiposo Branco (22)

Em nível sistêmico, a secreção alterada de adipocinas pode levar ao aumento na ingestão alimentar e à redução do gasto energético através de ações no hipotálamo. Além disso, a sensibilidade à insulina diminui no músculo e no fígado através do aumento ectópico da deposição de lipídios associado ao desenvolvimento da inflamação crônica de baixa intensidade, na obesidade (21).

Vale destacar que dentre as citocinas, o TNF- $\alpha$  e a IL-6 são as mais estudadas e diretamente apontadas como desencadeadoras das respostas pró-

inflamatórias (23). Outro fato importante de destaque, é que o TNF- $\alpha$  é produzido tanto por adipócitos, quanto macrófagos infiltrados no tecido adiposo e, que apesar das concentrações do TNF serem maiores ao nível tecidual (24), seus níveis sistêmicos também são capazes de representar um estado inflamatório. Outro ponto importante é que o TNF- $\alpha$  é mais secretado pelo tecido adiposo visceral quando comparado ao tecido subcutâneo (25), e está envolvido na produção e na liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6.

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória associada com obesidade, RI e hiperinsulinemia na SM. Pode ser considerada como citocina endócrina e é secretada tanto por adipócitos como por macrófagos do tecido adiposo e seus níveis circulantes aumentam conforme o nível de adiposidade corporal (26). A secreção da IL-6 é de 2 a 3 vezes maior nos depósitos de gordura visceral do que nos subcutâneos (27). Pesquisadores demonstram que níveis de IL-6 estão aumentados em hipertensos e em indivíduos com RI (28,29). Já em indivíduos magros, a liberação de IL-6 desempenha importantes ações benéficas na regulação do balanço energético (30).

A IL-1 $\beta$ , é outra interleucina que está relacionada a SM, que também apresenta uma ação pró-inflamatória e está envolvida no processo de aterogênese. Essa interleucina também mantém íntima relação com os níveis de TNF- $\alpha$  e a IL-6 e, num complexo de ações conjuntas, tais citocinas são capazes de manter o estado inflamatório e levar a resistência periférica dos tecidos a insulina (31). A IL-1 $\beta$  também estimula a produção de IL-6 por células musculares lisas e aumenta a expressão de macrófagos, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), que se associam ao processo inflamatório e de aterogênese (32).

Com relação às alterações metabólicas e estado inflamatório na SM, alguns estudos vêm demonstrando que os níveis de interleucina 10 (IL-10), reconhecida como citocina com ações anti-inflamatórias por inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias e outros fatores de lesão endotelial, podem estar reduzidos na SM (33, 34).

Além das citocinas liberadas pelos adipócitos e células do sistema imunológico infiltradas do tecido adiposo, substâncias denominadas “adipocinas” modulam a função do sistema imune de forma a prolongar ou amenizar estado inflamatório característico da SM (35).

Mesmo sendo classificada como peptídeo hormonal envolvido com a regulação do metabolismo energético, a leptina favorece a produção de citocinas inflamatórias como a Proteína C Reativa (PCR), IL-6 e outros marcadores produzidos por monócitos e macrófagos, e aumenta a adesão e atividade fagocitária. Além disso, a expressão da leptina é aumentada em resposta à hipóxia, favorecendo as propriedades de quimiotaxia dos macrófagos no TAB. Acredita-se, então, que a leptina, dentre outros papéis desempenhados no organismo (reprodução, angiogênese, osteogênese, controle da pressão sanguínea), contribua para o quadro de inflamação crônica associado à obesidade e à SM (36).

Os adipócitos também produzem e liberam a adipocina denominada de adiponectina, cujos efeitos sobre o metabolismo da glicose e citocinas pró-inflamatórias são contrários aos da leptina. A adiponectina exerce efeitos anti-inflamatórios protetores benéficos para manutenção da sensibilidade dos tecidos à insulina e contra a lesão vascular. No entanto, apesar de ser produzida pelos adipócitos, sua liberação está reduzida na obesidade visceral (37).

Estudo publicado em 2001, demonstrou que o TNF- $\alpha$  é um importante inibidor da adiponectina e que níveis dessa adipocina estão reduzidos no Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (38) e outro estudo em modelo animal (39), demonstrou que os níveis de adiponectina se correlacionaram fortemente com a sensibilidade à insulina pois, quanto maiores os níveis de adiponectina, menor a RI.

### **Resistência à insulina associada a obesidade**

Cerca de 55% dos casos de DM2 são atribuídos à obesidade (40), devido a uma relação direta entre o excesso de tecido adiposo e a inflamação sistêmica com desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas (41). Excesso de peso é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de RI (42), uma disfunção metabólica que causa diminuição da captação de glicose nos tecidos (músculo, fígado, tecido adiposo) resultando num estado hiperglicêmico e, conseqüentemente, DM2 (43, 44).

A insulina é um hormônio anabólico secretado pelas células-beta do pâncreas, sua síntese sendo estimulada pelo aumento da glicose sanguínea após refeições. Suas funções metabólicas além da captação de glicose, incluem aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, reduzindo a produção hepática de glicose, lipólise e proteólise (45).

Os mecanismos para o desenvolvimento da RI relacionados à obesidade são caracterizados por alterações em etapas específicas na sinalização da insulina (46). Além do excesso de glicose, o excesso de AGL também afeta diretamente o metabolismo celular, influenciando no desenvolvimento da RI; os AGL circulantes

ativam proteínas de membrana plasmática denominados TLR-4 (*toll-like receptors 4*) desencadeando a ativação de vias inflamatórias que vão interferir na captação de glicose pela sinalização da insulina (47, 48, 49).

Estudos em humanos obesos e que apresentam RI, mostram que um tratamento farmacológico que inibe TNF $\alpha$  diminui inflamação sistêmica e conseqüentemente melhora a sensibilidade à insulina (50,51). O mecanismo em que TNF $\alpha$  induz o desenvolvimento de RI é o da ligação de TNF $\alpha$  aos seus receptores na membrana plasmática TNFR1 e TNFR2 (52); também o exercício físico possui efeitos anti-inflamatórios por suprimir proteínas que causam prejuízos na captação de glicose, contribuindo para melhorar a sensibilidade à insulina, como mostram estudos recentes (52, 53).

## **1.2 - Inflamação, disfunção endotelial e doença cardiovascular.**

Atualmente, as Doenças Cardiovasculares (DCV) atingem mais de 83,6 milhões de americanos, sendo estimados gastos públicos por volta de 300 bilhões de dólares ao ano. No Brasil, as DCV estão entre as principais causas de morte. Em 2007, a mortalidade atribuível a essas doenças foi em torno de 250 por 100 mil pessoas, maior do que nos EUA, de 179 por 100 mil. Um dos fatores de risco para o desenvolvimento de DCV é a SM, que provoca disfunção endotelial, levando a lesão vascular e aparecimento de placas ateromatosas (2).

O endotélio é uma camada que reveste a parte interna dos vasos sanguíneos, sendo um extenso tecido celular que recobre toda a malha vascular, desde grandes veias e artérias até pequenos vasos, arteríolas e capilares. Contribui para a

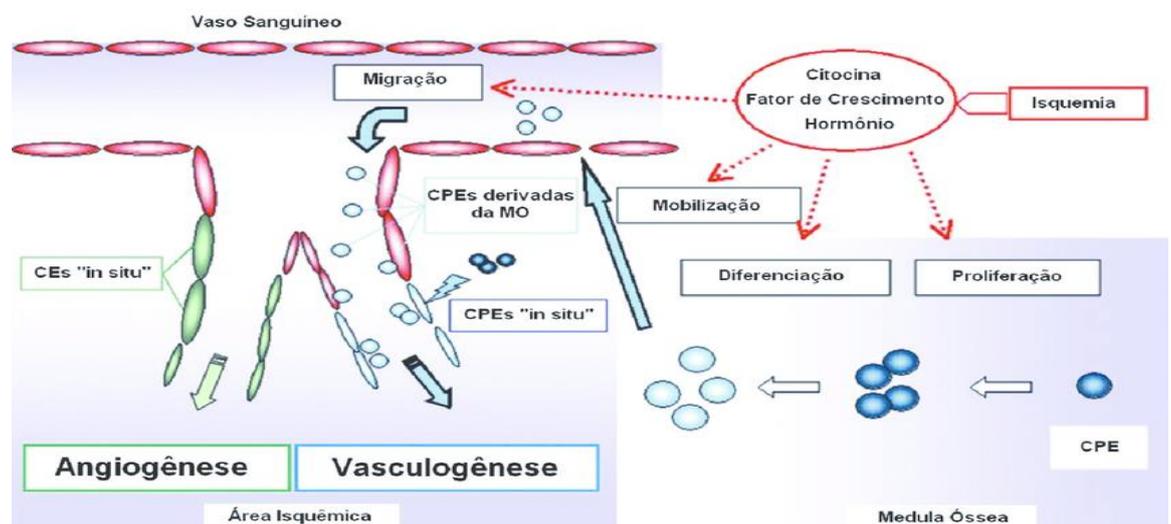
homeostase vascular e possui múltiplas funções endócrinas, autócrinas e parácrinas; é responsável pela síntese de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras (54). O endotélio regula o fluxo e o tônus vascular pela liberação de vasodilatadores como óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e vasoconstritores como endotelina e fator ativador de plaquetas (PAF). A regulação do tônus vascular ocorre especialmente em resposta à estimulação mecânica promovida pelas forças pulsátil e da pressão de arrasto hemodinâmico da corrente sanguínea. A falta de NO nos vasos ateroscleróticos associa-se a maior proliferação de células musculares lisas e adesão de monócitos ao endotélio (55).

Agressões ao endotélio geram respostas inflamatórias locais e sistêmicas, aumentando a disfunção endotelial e/ou lesão endotelial, criando um ciclo vicioso que leva ao enrijecimento da parede vascular, formação da placa aterosclerótica, proliferação de camada muscular lisa e inflamação local. A detecção dessas alterações pode ser um marcador precoce de risco para DCV (56).

Estados inflamatórios (ex. presença de fatores de risco clássico para DCV, como aumentos de LDL, glicemia, pressão arterial, tabagismo) “ativam” as células endoteliais, mudando seu fenótipo de comportamento e determinando desbalanço nas respostas de vaso reatividade, hemostasia, inflamação e proliferação celular. Mais recentemente, verificou-se que este estado inflamatório crônico característico da aterosclerose não apenas causa disfunção endotelial, como também reduz a mobilização de células progenitoras endoteliais (CPEs), impedindo o desenvolvimento de vasos colaterais para regiões isquêmicas e dificultando a própria reparação do endotélio vascular (57).

Durante muito tempo, acreditou-se que a regeneração vascular ocorresse exclusivamente pela proliferação de células endoteliais maduras, residentes na

parede dos vasos, um processo que é conhecido por angiogênese. Porém, em estudo publicado na *Science*, em 1997, foi realizado o isolamento de CPEs do sangue periférico utilizando o anticorpo anti-CD34 conjugado a esferas magnéticas. Após cultivo, foi observado que essas células migravam da medula óssea para áreas de isquemia, podendo se diferenciar em um fenótipo endotelial; comprovou-se, assim, a formação de novos vasos sanguíneos por meio do recrutamento de células progenitoras provenientes da medula óssea, processo chamado vasculogênese (58). (Figura 3).



**Figura 3 - Sequência de eventos no processo da angiogênese (59).** Legendas: CEs: Células endoteliais; CPEs: Células progenitoras endoteliais; MO: Medula óssea.

As CPEs são células derivadas da medula óssea com características similares a células-tronco, porém através de hormônios de crescimento específico para endotélio, só podem se diferenciar em células endoteliais. CPEs podem ser recrutadas através de vários estímulos como citocinas, fármacos como estatinas, estrógenos, eritropoietina, atividade física, dentre outros, e tem papel fundamental na manutenção na integridade do endotélio (60). As CPEs podem ser identificadas e caracterizadas por técnicas sensíveis como citometria de fluxo, por meio da expressão dos marcadores de superfície celular CD34, CD309 (KDR) e CD133, e a

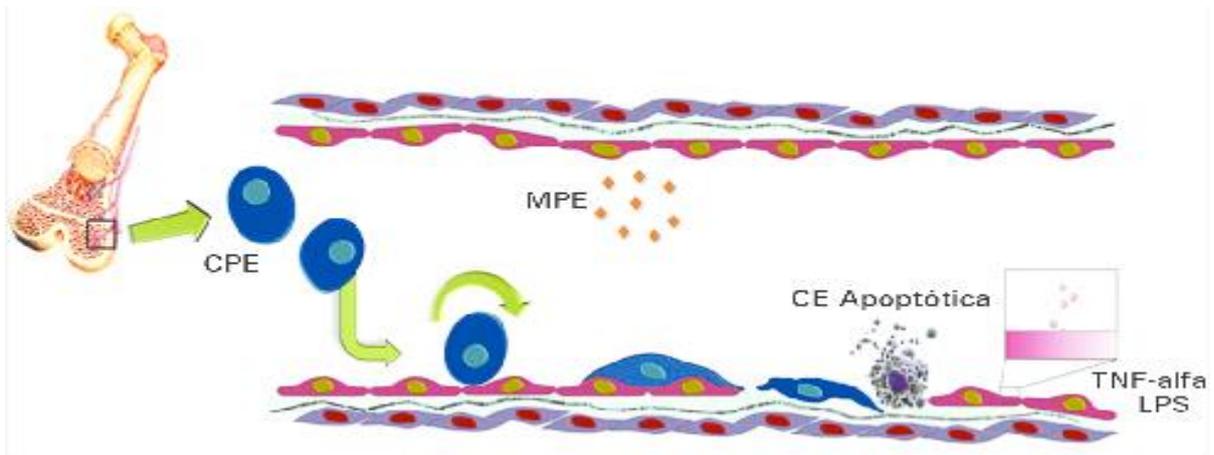
combinação de pelo menos dois deles define CPE (61). Após diferenciação em células endoteliais maduras, elas deixam de expressar o CD133 e expressam marcadores como CD51, CD105, CD146, CD144, dentre outros, sendo também necessária a utilização de pelo menos dois marcadores para caracterizar a célula endotelial diferenciada (62).

O recrutamento de CPEs, principalmente a partir da medula óssea, é fundamental para a reconstituição e homeostase vascular. A mensuração dessas células no sangue periférico pode ser considerada um preditor de risco e extensão da aterosclerose, pois indivíduos com reduzido número de CPEs na corrente sanguínea possuem maior risco para desenvolver disfunção endotelial, uma vez que ocorre comprometimento da vasculogênese (63). A relação entre doença cardiovascular e redução na capacidade migratória de CPE vem sendo descrita há alguns anos. Estudo desenvolvido por Werner *et al.* (2005), mostraram que o número de eventos cardiovasculares avaliados em um ano foi inversamente proporcional ao número de CPEs, em pacientes com doença arterial coronária (208). Além disso, fatores de risco cardiovascular como diabetes, idade, tabagismo, sedentarismo e uremia estão negativamente relacionados com os níveis de CPE. Há vários trabalhos mostrando a importância da atividade física no recrutamento de CPEs. Estudos demonstraram que em homens idosos a atividade física aumentou a capacidade de regeneração vascular por meio de CPEs e promoveu melhora da função endotelial. (64).

Outros biomarcadores, que quando associados às CPEs podem ser considerados úteis como marcadores de DCV, por estarem diretamente relacionados à homeostase endotelial, são as micropartículas (MPs) e as células endoteliais circulantes (CECs) (64,65).

O termo micropartículas (MP) é utilizado para descrever pequenas vesículas liberadas por diferentes tipos celulares (células endoteliais, plaquetas e monócitos) após ativação ou apoptose (Figura 4), contendo material celular como proteínas, mRNA, lipoproteínas e debris, que são importantes para a identificação no sangue periférico através da identificação de antígenos presentes na superfície, por métodos específicos como citometria de fluxo (64). As micropartículas endoteliais (MPEs) representam uma menor população de MP presentes no plasma, porém têm sido associadas a DCV, especialmente à disfunção endotelial (66). Há trabalhos mostrando a importância das MPEs na proliferação e diferenciação de CPEs, que são fundamentais na regeneração vascular (67), indicando uma possível função protetora relacionada a regeneração, reparo e proteção vascular (68).

Alguns estudos mostraram que portadores de SM possuem aumento nos níveis de MP comparados a indivíduos saudáveis e que elas estão relacionadas à disfunção endotelial, por diminuição na expressão de Oxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS) e aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (69). Em conclusão, o aumento de MPs está diretamente relacionado à disfunção endotelial e, conseqüentemente, com a progressão da aterosclerose. Assim, a relação MP/CPE pode indicar o grau de desequilíbrio entre dano endotelial e capacidade de reparo (64).



**Figura 4 - Processo de substituição de células endoteliais (64).** Legendas: CPE: Célula progenitora endotelial; MPE: micropartícula endotelial; CE: Célula endotelial; TNF-alfa: Fator de necrose tumoral alfa; LPS: Lipopolissacarídeo.

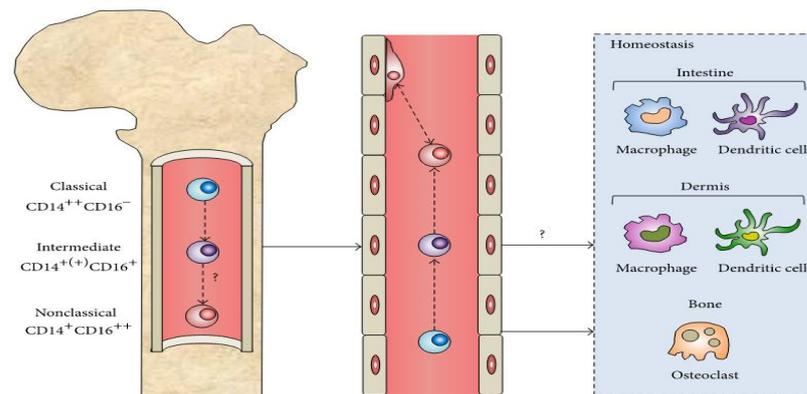
As células endoteliais circulantes (CECs) compõem uma população de células não hematopoiéticas raras, presentes no sangue periférico. A precisão de sua identificação requer o emprego de um método sensível e específico. Os métodos atualmente utilizados para a identificação das CECs são a citometria de fluxo e a separação imunomagnética. As células endoteliais presentes na circulação podem ser oriundas da parede vascular (CECs) ou da medula óssea, denominadas CPEs. A diferenciação entre CPEs e CECs pode ser feita pela análise funcional e/ou fenotípica, por marcadores de membrana (70,71). Outra questão importante reside na identificação da origem anatômica. O marcador CD36 é utilizado para determinar se a CEC é oriunda da micro ou macro circulação. Quando positivo, indica a origem da microcirculação, como descrito na anemia falciforme e em pacientes com câncer. Nas doenças isquêmicas coronarianas esse marcador foi negativo, sugerindo que as CECs são de origem dos grandes vasos, ou seja, macro circulação (69, 71).

Devido ao número das CECs ser muito baixo em indivíduos normais, números elevados representam um marcador não invasivo para documentar alterações endoteliais em uma base quantitativa (71).

Portanto, a literatura evidencia claramente que as CECs podem ser consideradas marcadores para avaliar a lesão endotelial mural, além de representar uma oportunidade para estudar o fenótipo e as funções do endotélio, e explorar suas alterações.

### **Monócitos clássicos, intermediários e não clássicos na inflamação**

Monócitos são leucócitos circulantes que são atores-chave na homeostase e imunidade dos tecidos. Eles são formados na medula óssea e entram continuamente na circulação sanguínea, onde contribuem com 4% da população total de leucócitos em camundongos e 10% em humanos (72). No sangue periférico humano, três subpopulações funcionalmente diferentes de monócitos foram identificadas e caracterizadas com base na expressão dos marcadores de superfície CD14 e CD16 (72). A principal subpopulação de monócitos, responsável por aproximadamente 90% da população total de monócitos, expressam altos níveis de marcadores CD14 e nenhum de CD16 (CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup>), e essas células são chamadas de monócitos clássicos. Os monócitos que expressam CD16 podem ser ainda divididos em duas subpopulações distintas: monócitos intermediários que expressam níveis relativamente altos de CD14 e alguns CD16 (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) e monócitos não clássicos que expressam baixos níveis de CD14 e altos níveis de CD16 (CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup>) (73) (Figura 5).



**Figura 5 - A origem e diferenciação dos monócitos do sangue periférico.** Produção na medula óssea (esquerda) e na corrente sanguínea (média) em resposta a diferentes sinais microambientais(72).

Embora as subpopulações de monócitos sejam funcionalmente diferentes, o agrupamento hierárquico e o perfil de expressão gênica mostraram que as subpopulações representam estágios em uma sequência de desenvolvimento, com monócitos clássicos diferenciando-se em monócitos intermediários e não clássicos (74,75). Uma das funções mais conhecidas dos monócitos é, no entanto, como um reservatório sistêmico de células precursoras para a renovação de várias populações de macrófagos teciduais, células dendríticas (CDs) e osteoclastos (76,77). (Figura 5). No estado estacionário, a função precursora está associada principalmente aos monócitos clássicos; a questão de se os monócitos intermediários e não clássicos puderem funcionar como precursores de células imunes na homeostase ainda não está clara (77).

Os monócitos são recrutados sequencialmente para locais de inflamação como parte da resposta imune protetora do hospedeiro. Em resposta ao interferon produzido por célula natural killer (NK) (IFN- $\gamma$ ), os monócitos se diferenciam localmente em macrófagos inflamatórios e CDs e substituem eficientemente os fagócitos mononucleares residentes (72). O tráfego da subpopulação de monócitos é controlado por diferentes mecanismos e pelo menos duas fases sequenciais de

recrutamento de monócitos para locais de inflamação foram identificadas (78). De forma semelhante ao que acontece no IAM, monócitos clássicos também são recrutados em estados inflamatórios como inflamação da gordura perivascular e inflamação da gordura visceral abdominal (72).

### **Propriedades funcionais de subpopulações de monócitos humanos**

Os monócitos clássicos ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ) expressam níveis elevados de CCR2 e CD62L (L-selectina), e baixos níveis de CX3CR1. Sua principal função é a fagocitose. Exibem alta atividade de peroxidase e produzem altos níveis de IL-10 e baixos níveis de TNF- $\alpha$  em resposta ao LPS (79). A análise do perfil de expressão gênica indica que os monócitos clássicos humanos expressam preferencialmente genes envolvidos na angiogênese, na cicatrização de feridas e na coagulação. Monócitos humanos intermediários ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ) exibem função inflamatória. Essa subpopulação possui baixa atividade de peroxidase, porém, maior capacidade de produzir e liberar IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  em resposta a produtos microbianos, por exemplo: LPS, principal endotoxina das bactérias Gram Negativas (79).

Os monócitos não clássicos ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ) humanos, patrulham a parede do vaso e migram para o tecido pela interação de um par de moléculas expressas CX3CR1 / CCL3. Essas subpopulações de monócitos liberam IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  em resposta ao DNA, partículas de RNA, implicando o papel patológico em doenças autoimunes, como a artrite reumatoide (80).

Nas DCV humanas e nas condições inflamatórias, o número de monócitos inflamatórios intermediários ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ) está aumentado. No entanto, a

alteração do número de monócitos não clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) é inconsistente. Por exemplo, está aumentado (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) na doença renal crônica (DRC), aneurismas da aorta abdominal (AAA), sepse, hepatite B, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e tuberculose, mas diminuído na insuficiência cardíaca congestiva e no acidente vascular cerebral (80). Quanto à SM, num elegante estudo recente, foi demonstrado pela primeira vez que reduções nos níveis de HDL-colesterol contribuem para um aumento significativo na subpopulação de monócitos não clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) ao mesmo tempo em que diminuem a porcentagem de monócito clássico (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) em pacientes com a síndrome e *in vitro*, quando estimulados com LPS. Além disso, um HDL-colesterol reduzido induziu um aumento nos níveis de produção de IL-1 $\beta$  por monócitos humanos estimulados por LPS e associou-se a um aumento da IL-1 $\beta$  em pacientes com SM. Afirmam os autores que estes achados dão suporte à noção de que a disfunção metabólica tem um papel pivô na resposta sistêmica inflamatória mediada por mudanças dinâmicas nas subpopulações monocitárias (81).

Alguns estudos enfatizam o papel inflamatório dos monócitos não clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) devido à produção de citocinas inflamatórias. No entanto, muita atenção tem sido focada nas alterações do número de monócitos intermediários (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) em pacientes com doenças inflamatórias (79). Como o aumento do número de monócitos intermediários (CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup>) está, de maneira consistente, associado a doenças inflamatórias agudas e crônicas em humanos, isto faz dessa subpopulação um biomarcador para essas doenças (79).

O papel dos monócitos como precursores de várias células imunes maduras está bem estabelecido. À medida que nossa compreensão da heterogeneidade de

monócitos melhora, seu papel intrigante como células precursoras está se tornando cada vez mais importante, e o direcionamento de subpopulações específicas de monócitos para controlar a diferenciação e a função das células imunes derivadas de monócitos surge como uma abordagem terapêutica atraente. O papel putativo dos monócitos clássicos, intermediários e não clássicos como células precursoras distintas durante a inflamação é de particular interesse para a pesquisa imunológica, mas nosso conhecimento é limitado e vários aspectos importantes ainda são desconhecidos. Isso se deve em parte ao fato de os dados coletados até agora consistirem principalmente em observações *in vitro* e, infelizmente, poucos estudos investigaram a correlação entre uma população precursora afetada e o desenvolvimento de células imunes a jusante não convencional durante a inflamação. A definição das distintas diferenciações nas subpopulações de monócitos em diferentes condições inflamatórias permitirá um direcionamento mais preciso das células imunológicas e proporcionará uma melhor compreensão da fisiopatologia da inflamação (72).

### **1.3 – Reflexo colinérgico inflamatório**

O conhecimento dos mecanismos homeostáticos pelos quais o sistema nervoso controla a função dos órgãos foi originalmente aplicado aos sistemas cardiovascular, gastrointestinal, musculoesquelético e outros sistemas do corpo (82).

Sabe-se atualmente que diversos estímulos provenientes do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) podem modular a ação de células do sistema imunológico, bem como a liberação de substâncias envolvidas na resposta imunológica (82).

No sentido homeostático, o SNC e o sistema imunológico (SI) interagem na resposta do organismo para enfrentar mecanismos estressores, entendidos aqui como fatores patológicos. Quando a interação é equilibrada, a homeostase é mantida; quando desajustada, há comprometimento na homeostase (82).

Os efeitos da estimulação simpática sobre a resposta imune e inflamação são bem compreendidos. Já é claro que a adrenalina (secretada pela medula adrenal) e noradrenalina (secretada pelos axônios de terminações simpáticas e pela medula adrenal) modulam produção e liberação de citocinas, e assim a resposta inflamatória, por meio de receptores adrenérgicos acoplados à proteína G, denominados receptores  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  adrenérgicos nas células imunes (83). Além disso, há acumulada evidência de que os tecidos linfoides são amplamente inervados por terminais simpáticos, o que explica que a estimulação descompensada mantenha ou aumente o estado inflamatório (83).

Recentemente descobriu-se que a estimulação parassimpática vagal também pode modular a resposta inflamatória e, suprimindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, controlar ou até mesmo inibir a inflamação (84).

Essa nova função da via parassimpática mediada pelo nervo vago, é denominada de “Via Anti-inflamatória colinérgica” (85). O conceito sobre essa via teve início há quase 20 anos com o grupo de *Tracey e cols.*, que investigavam os efeitos supressivos de uma droga, denominada CNI-1493, sobre a inflamação induzida pela aplicação de um agente irritante na pata de ratos. Nesse estudo, a administração intraventricular cerebral (IVC) da CNI-1493 suprimiu a resposta inflamatória de forma mais eficiente que a administração sistêmica da droga (86). Os mesmos pesquisadores comprovaram que tais efeitos dependiam da ação do nervo vago, pois com a vagotomia os efeitos anti-inflamatórios não ocorriam.

Em um modelo de endotoxemia letal, também em ratos, a estimulação elétrica da via eferente vagal, mimetizou os efeitos da injeção IVC da CNI-1493. Como efeitos anti-inflamatórios ocorreram: diminuição dos níveis séricos e hepáticos de TNF- $\alpha$ , atenuação do desenvolvimento de hipotensão severa e choque sistêmico nos animais expostos à endotoxina, com aumento da sobrevivência dos mesmos (87). Em outros estudos do mesmo grupo, a eletroestimulação desta via vagal também resultou em redução significativa nos níveis sistêmicos de TNF-  $\alpha$  e atenuou o desenvolvimento do estado de choque em ratos submetidos a lesão cardíaca de isquemia-reperfusão, que é outro modelo de inflamação sistêmica (88,89). Tais resultados comprovaram que os efeitos da estimulação vagal eferente apresentavam ação imunomodulatória de caráter sistêmico. Essa via vagal eferente é chamada de Via Anti-inflamatória Colinérgica.

Os estudos citados sobre a Via Anti-inflamatória Colinérgica comumente acessam o componente inflamatório pelos níveis da citocina TNF-  $\alpha$ , por ser considerado um mediador necessário e suficiente de resposta inflamatória (90,91).

Estudos que seguiram o paradigma da Via Anti-inflamatória Colinérgica foram elucidando outros componentes dessa via. Wang *et al.* (2003) demonstraram que os efeitos periféricos da estimulação eferente vagal dependiam de receptores nicotínicos de acetilcolina do tipo  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$  nAChR) (92). Pavlov *et al.* (2006) mostraram que antagonistas muscarínicos não eram capazes de suprimir com a mesma eficácia os efeitos anti-inflamatórios, e que apenas o bloqueio central dos receptores muscarínicos surtia efeito parcial sobre a via (93).

Em conjunto, esses dados demonstraram: 1. Que a acetilcolina era o principal neurotransmissor envolvido, por isso o nome “Via Anti-inflamatória Colinérgica”; 2. Que os efeitos da estimulação vagal se davam preferencialmente pela via

colinérgica mediada por receptores nicotínicos do tipo  $\alpha 7nAChR$ ; 3. Que receptores muscarínicos são mediadores centrais desta via anti-inflamatória (93).

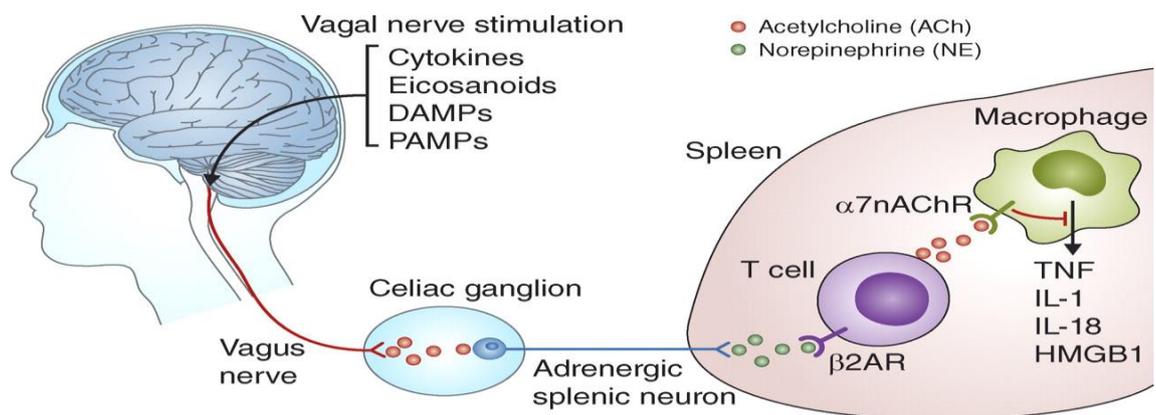
Assim, após as primeiras descrições da via Anti-inflamatória Colinérgica, Tracey (2002) propôs um sistema que funcionava como um mecanismo complexo em resposta a estímulos periféricos inflamatórios com os seguintes componentes: o estímulo inflamatório, especialmente o TNF-  $\alpha$ , capaz de acionar a via *aferente* vagal até os núcleos vagais no SNC, e uma via *eferente* vagal inibitória da resposta inflamatória, atuando em células do sistema imune, em especial nos macrófagos (84).

Nesse modelo, a estimulação vagal (parassimpática), com liberação de acetilcolina, foi capaz de inibir a liberação de TNF-  $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8 de macrófagos ativados com lipopolissacarídeo (LPS) (mimetizando um estado inflamatório), sem afetar a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (84,87). Além disso, os sinais aferentes vagais também podem ser retransmitidos a áreas do SNC como a formação reticular bulbar, locus ceruleus e hipotálamo, causando liberação de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e inibindo o funcionamento de células imunes.

No reflexo inflamatório (Figura 6), um circuito neural, produtos moleculares exógenos e endógenos da inflamação ativam potenciais de ação aferentes que viajam através do nervo vago ao núcleo do trato solitário (NTS), que retransmite os sinais neuronais para outros núcleos cerebrais localizados no hipotálamo e tronco cerebral. Sinais eferentes viajam do núcleo ambíguo e do núcleo motor dorsal para o nervo vago eferente, que termina nos gânglios celíacos. A estimulação do nervo vago ativa os neurônios esplênicos adrenérgicos no gânglio celíaco, que viajam para o baço e terminam em estruturas parecidas com sinapses adjacentes às células T. A noradrenalina liberada dos neurônios esplênicos (terminações simpáticas) se liga ao

receptor adrenérgico  $\beta 2$  expresso na superfície da membrana de um subgrupo de células T sintetizadoras de acetilcolina. A estimulação de células T aumenta significativamente a capacidade dessas células para produzir acetilcolina. As células T produtoras de acetilcolina também são encontradas nos linfonodos e nas placas de Peyer (82).

A acetilcolina liberada por essas células T esplênicas liga-se a receptores nicotínicos de acetilcolina do tipo  $\alpha 7$  ( $\alpha 7nAChR$ ) expressos na superfície da membrana de macrófagos produtores de citocinas. Assim, a transdução de sinal do  $\alpha 7nAChR$  suprime a síntese e a liberação de TNF, IL-1, IL-18 e outras citocinas, funcionando como uma potente via anti-inflamatória (82).



**Figura 6 – Reflexo inflamatório (82).** Legendas: DAMPs: Padrões moleculares associados a danos; DAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos; ACh: Acetilcolina; NE: Norepinefrina;  $\beta 2AR$ : Receptor de Adrenalina Beta 2;  $\alpha 7nAChR$ : Receptor de acetilcolina alfa 7 nicotínico; TNF: Fator de necrose tumoral; IL 1 -18: Interleucina 1 – 18; HMGB1: High Mobility Group Box Protein 1 (Proteína 1 da caixa de grupo de alta mobilidade).

Este novo paradigma comporta uma interação entre neurociência e imunologia: mostra que passos específicos da imunidade são modulados por circuitos neurais distintos, que sinalizam através de mecanismos moleculares definidos. Conseqüentemente, é razoável propor que vias neurais adicionais serão identificadas e mapeadas. Isto pode ser conseguido a partir de uma abordagem de cima para baixo ou de baixo para cima, porque os reflexos exigem tanto os sinais aferentes da interação do sistema imune com o sistema nervoso, quanto mensagens

eferentes para o sistema imune a partir do sistema nervoso. O mapeamento desses circuitos anatomofuncionais pode fornecer informações importantes sobre a rede de compartilhamento de informações entre dois elaborados sistemas de defesa e memória altamente evoluídos (82).

### **Estimulação colinérgica e SM**

Estudos recentes têm evidenciado a ligação entre SNA e inflamação. Na última década, o grupo de *Tracey e cols.*, vem contribuindo para a compreensão de que a resposta inflamatória, em diferentes situações, é modulada pelo SNA (86,87,89). Nesse cenário, o nervo vago tem um papel de destaque, como importante mediador de respostas anti-inflamatórias. Vários estudos experimentais demonstraram que a estimulação direta ou indireta do vago reduz a resposta inflamatória em situações sépticas ou assépticas (84,94,95). Além disso, o uso de drogas que atuam na via colinérgica (como ex., os anticolinesterásicos) tem efeito em modelos animais de doença cardiovascular e em situações que mimetizam a SM (96,97,98).

Estudos pré-clínicos e clínicos identificaram uma inflamação crônica de baixo grau, manifestada pelo aumento dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e outras citocinas pró-inflamatórias e níveis alterados de adipocinas (como leptina e adiponectina) e resistência à insulina, como componentes importantes de mecanismos fisiopatológicos subjacentes à SM. O desequilíbrio do SNA, com aumento de índices de atividade simpática e diminuição da atividade do nervo vago, também foram observadas nessa condição clínica (23,99). Sendo assim, foi estabelecida uma

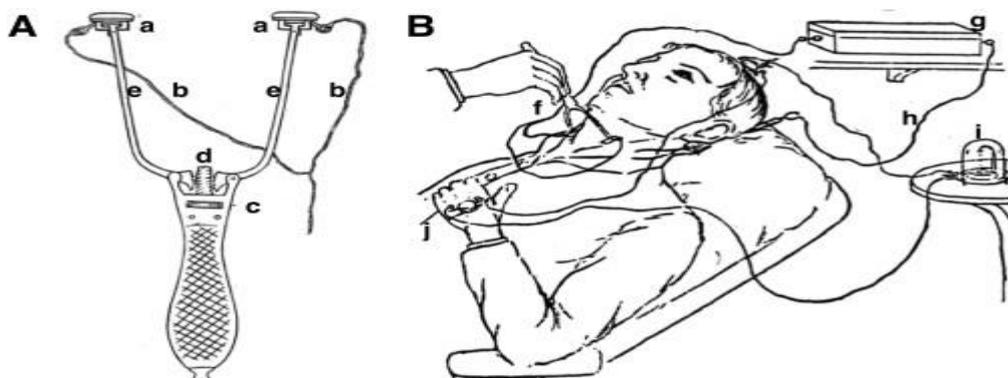
conexão positiva entre inflamação, disfunção autonômica e o desenvolvimento de DCV em portadores de SM (99). Portanto, os seguintes desafios propostos são: reduzir a inflamação crônica, reduzir a resistência à insulina e melhorar a função autonômica (100). Recentemente, avaliamos o mesmo conceito da estimulação vagal com uso de fármaco em portadores de SM. Pudemos demonstrar que o conceito de aumento da atividade vagal associada a redução de marcadores inflamatórios pode ser detectado em humanos. Além disso, houve impacto da redução da inflamação sobre o metabolismo da glicose (98).

A estimulação do nervo vago e ativação do reflexo anti-inflamatório têm sido exploradas com sucesso em estudos clínicos de distúrbios caracterizados por inflamação associada à sepse e situações assépticas, como desregulação metabólica, doença inflamatória intestinal, e DCV (insuficiência cardíaca e infarto agudo do miocárdio, IAM) (101). Como destacado, nosso grupo, utilizando um inibidor de acetilcolinesterase (Galantamina) de ação central aprovada para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer, demonstrou que o aumento da atividade vagal melhora componentes importantes da patogênese da SM. Este foi o primeiro estudo em humanos com SM que demonstrou uma redução nos níveis plasmáticos de moléculas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e leptina) e aumento das moléculas anti-inflamatórias (adiponectina e IL-10) em comparação com o grupo placebo. A Galantamina também reduziu significativamente os valores de insulina plasmática e HOMA-IR, e alterou a VFC (98). O uso de drogas anticolinesterásicas pode ser eficaz, mas alternativas de uso mais fácil, de menor custo e poucos ou nenhum efeito colateral, como a estimulação elétrica vagal, merecem investigação.

#### **1.4. Estimulação do nervo vago**

A estimulação elétrica direta do nervo vago em humanos é usada há anos em portadores de epilepsia e depressão. A indicação vem se expandindo para pacientes em condições de inflamação crônica, como portadores de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e artrite reumatoide (AR). Os resultados têm-se mostrado promissores (102,104).

No século XIX o neurologista norte-americano James Corning, foi o primeiro a introduzir a ideia da estimulação do nervo vago no tratamento de doenças. Inicialmente ele utilizou um dispositivo semelhante a uma forquilha (Figura 7), conectado a fios elétricos, que por meio destes conduzia uma corrente elétrica contínua até o pescoço do paciente com diagnóstico de epilepsia, na tentativa de reduzir o fluxo sanguíneo cerebral e a frequência cardíaca (94). O autor chamou de eletrização de nervos simpáticos e pneumogástricos com a compressão bilateral das carótidas. Acreditava-se que a epilepsia era causada por fluxo sanguíneo cerebral excessivo e que sua redução possibilitaria o tratamento. Apesar da falta de efeito clínico, Corning introduziu a hipótese de estimulação do nervo vago (ENV) (94).



**Figura 7 - Dispositivo (forquilha) para estimulação elétrica não invasiva dos nervos vagos cervicais (105). A: Forquilha; B: Posicionamento da forquilha no pescoço.**

Anos depois, surgiram vários outros estudos experimentais com modelos animais onde aplicaram a técnica e demonstraram a potencial propriedade antiepiléptica da ENV (106,107).

Após o sucesso em vários estudos utilizando modelos animais, o interesse foi deslocado para as potenciais aplicações desta técnica em humanos. Assim, na década de 90, um estudo piloto demonstrou uma redução significativa das crises convulsivas de pacientes epilépticos, considerados clinicamente intratáveis, por meio da estimulação do nervo vago (103). Alguns anos depois, um estudo multicêntrico, randomizado e duplo cego, apresentou resultados semelhantes, quando evidenciou uma redução significativa na frequência de convulsões após 14 semanas de eletroestimulação do nervo vago em 67 pacientes com convulsões parciais refratárias (108).

Assim, a agência norte-americana responsável pela regulamentação de alimentos e medicamentos (FDA - Food and Drug Administration), no ano de 1997, aprovou e recomendou a implantação do dispositivo de estimulação do nervo vago cervical esquerdo, para o tratamento da epilepsia refratária. Oito anos depois, essa mesma agência aprovou o uso do dispositivo de estimulação direta do nervo vago para o tratamento da depressão crônica resistente ao tratamento farmacológico (109,110,111,112).

No método de estimulação direta do nervo vago, um pequeno gerador de estímulos elétricos, movido a bateria, é implantado subcutaneamente na parede torácica e fornece um fio unidirecional que se conecta a eletrodos que envolvem o nervo vago na região do pescoço. O gerador envia uma corrente elétrica intermitente, estimulando o vago de acordo com protocolos (intensidade, amplitude de corrente, intervalo) pré-estabelecidos. Esses estímulos percorrem o nervo vago

em direção ao SNC; chegam ao tronco cerebral e atingem áreas importantes, incluindo o núcleo do trato solitário (NTS), núcleo bilateral trigeminal (NBT), núcleos da rafe, locus-coeruleus (LC), área parabraquial contralateral, amígdala e núcleo accumbens. As interações entre esses núcleos, que fornecem estímulos noradrenérgicos e serotoninérgicos, são potencialmente relevantes para explicar os mecanismos de ação da eletroestimulação nas doenças neurológicas descritas (109, 110).

A partir do conhecimento da existência de inervação parassimpática para o coração, a ideia de utilizar a eletroestimulação para regular a função cardíaca foi também estudada. Em modelo animal foi possível demonstrar que a eletroestimulação vagal do coração é capaz de prevenir a fibrilação ventricular e morte súbita em cães com infarto agudo do miocárdio. Estudos posteriores permitiram detectar melhora significativa na função cardíaca e nos sintomas da insuficiência cardíaca após a eletroestimulação do nervo vago em modelos experimentais de disfunção ventricular (113,114,115,116,117,118).

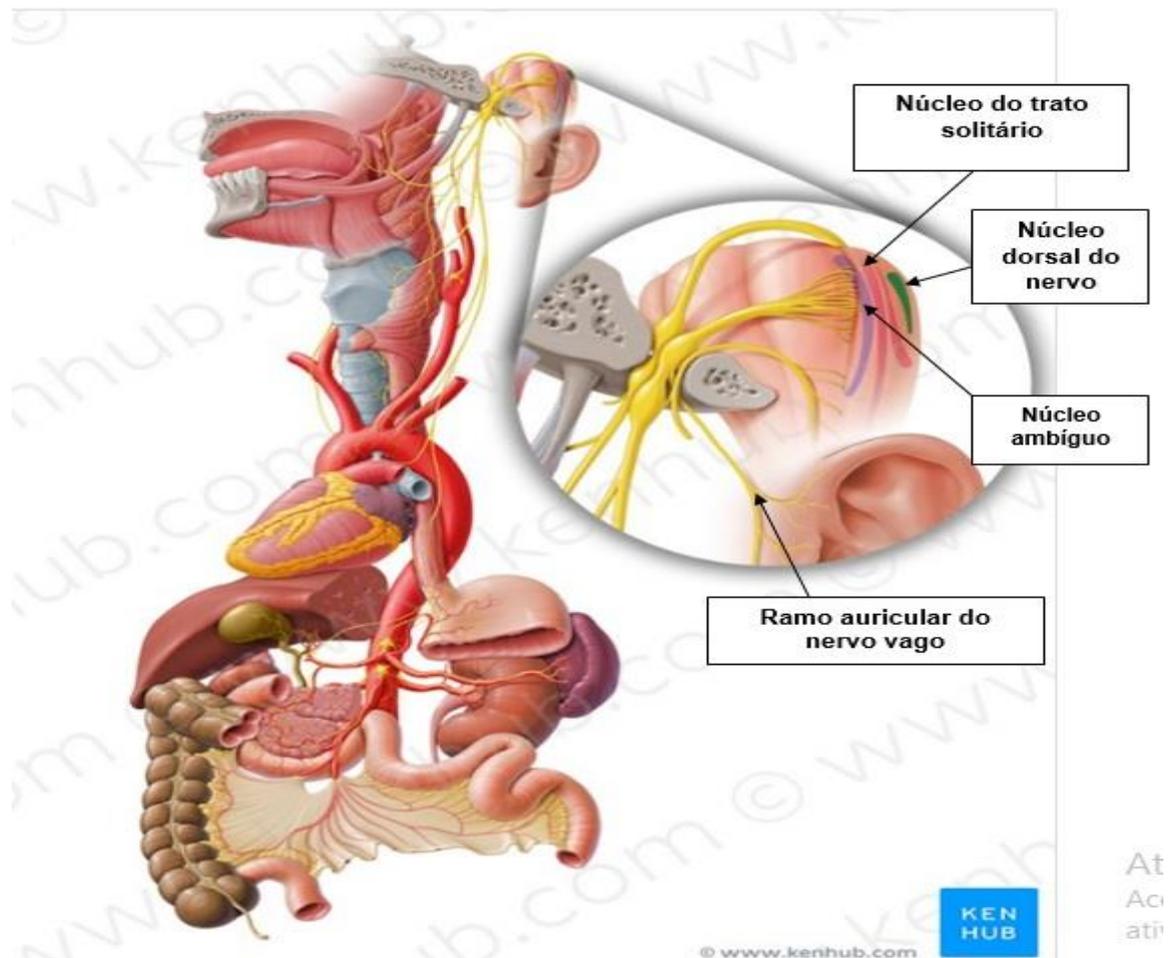
Após todos estes resultados positivos e favoráveis utilizando animais, foram iniciados estudos em humanos, avaliando-se a eficácia e segurança do método de eletroestimulação do nervo vago em pacientes com insuficiência cardíaca. Os resultados do primeiro estudo demonstraram que a eletroestimulação vagal melhorou a capacidade funcional dos pacientes de acordo com a classificação da New York Heart Association (NYHA) (119). Os dados de estudos clínicos em portadores de ICC são controversos, dependendo de vários fatores. A estimulação do nervo vago do estudo de Resultados da Terapia Cardíaca Neural para Insuficiência Cardíaca (NECTAR-HF) falhou em demonstrar um efeito significativo nas medidas primárias e secundárias de remodelação cardíaca e capacidade funcional em pacientes com

insuficiência cardíaca sintomática, mas as medidas de qualidade de vida mostraram melhora significativa. Quando o ANTHEM-HF e o NECTAR-HF foram comparados, foram observadas melhoras superiores à linha de base no ANTHEM - HF no desvio padrão em intervalos R - R normais ( $94 \pm 26$  a  $111 \pm 50$  vs.  $146 \pm 48$  a  $130 \pm 52$  ms;  $P < 0,001$ ), fração de ejeção do ventrículo esquerdo ( $32 \pm 7$  a  $37 \pm 0,4$  vs.  $31 \pm 6$  a  $33 \pm 6$ ;  $P < 0,05$ ) e questionário de Minnesota (escore médio ( $40 \pm 14$  a  $21 \pm 10$  vs.  $44 \pm 22$  a  $36 \pm 21$ ;  $P < 0,002$ )). Quando comparado com o INOVATE - HF, foi observada uma melhora maior na distância de caminhada de 6 minutos no ANTHEM - HF ( $287 \pm 66$  a  $346 \pm 78$  vs.  $304 \pm 111$  a  $334 \pm 111$  m;  $P < 0,04$ ). Nesta análise de post-hoc, foram observadas diferenças na demografia dos pacientes e podem ter causado respostas diferenciais nos sintomas e funções observados em associação com a ENV. Estudos adicionais estão em andamento em um estudo controlado randomizado com essas considerações em mente (120,121).

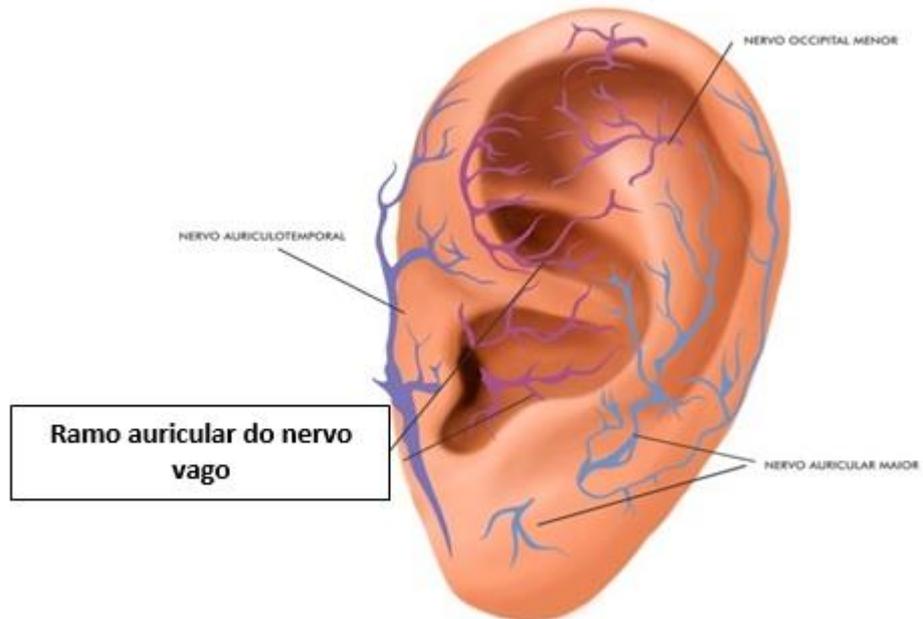
Apesar dos resultados positivos obtidos com o método invasivo, podem ocorrer possíveis complicações pós-cirúrgicas como lesão do nervo, rouquidão, infecção e dispneia; a vida útil do dispositivo também é limitada (122). Diante do exposto, verificou-se a necessidade de um novo método de eletroestimulação do nervo vago de uma forma não invasiva, sendo assim, foi desenvolvido um aparelho de estimulação elétrica transcutânea do nervo vago (EETNV) para estimulação vagal (123,124).

A EETNV consiste na aplicação de estímulos elétricos com eletrodos modificados de superfície, para passar uma corrente elétrica através da pele ou por meio de eletroacupuntura (125,126) em locais muito específicos.

O nervo vago é considerado um nervo profundo, de difícil acesso (Figura 8). No entanto, o ramo auricular do nervo vago (RANV) (Figura 9) pode ser acessado em locais como o tragus, a concha e a cymba conchae (Figura 10), para a estimulação periférica do nervo vago (127).



**Figura 8 – Mapeamento do Ramo Auricular no Nervo Vago.** Adaptado: Fonte: <https://www.kenhub.com/pt/library/anatomia/nervo-vago>. Acesso: 24/10/2019



**Figura 9** – Ramo auricular do nervo vago. Adaptado: **Fonte:** Neves (2011, p.14).



**Figura 10** – Áreas de distribuição do ramo auricular do nervo vago onde é possível a eletroestimulação (área destacada). **T** – Tragus; **CyC** - Cymba Conchae; **C** – Concha. (127).

Independentemente da técnica de estimulação, a maioria dos estudos com estimulação elétrica não invasiva do nervo vago surgiram a partir dos resultados positivos da eletroestimulação invasiva em distúrbios neurológicos e psiquiátricos. Porém, considerando-se o efeito benéfico da estimulação vagal sobre a modulação

da inflamação sistêmica (efeito anti-inflamatório) em doenças sistêmicas infecciosas (sepses) e não infecciosas (artrite reumatoide), há um interesse crescente em investigar se a EETNV poderia ter efeitos benéficos na redução da resposta inflamatória em outros modelos, como DCV e metabólicas (128)

Em um estudo com cães anestesiados, a estimulação crônica de baixa amplitude do tragus reverteu o remodelamento atrial e inibiu a indução de fibrilação atrial, provocada previamente por 3 horas de estimulação atrial rápida (128).

Outro estudo subsequente, utilizando EETNV em cães conscientes com infarto cicatrizado do miocárdio, demonstrou uma melhora da função cardíaca, redução da fibrose e atenuação do remodelamento ventricular esquerdo (129).

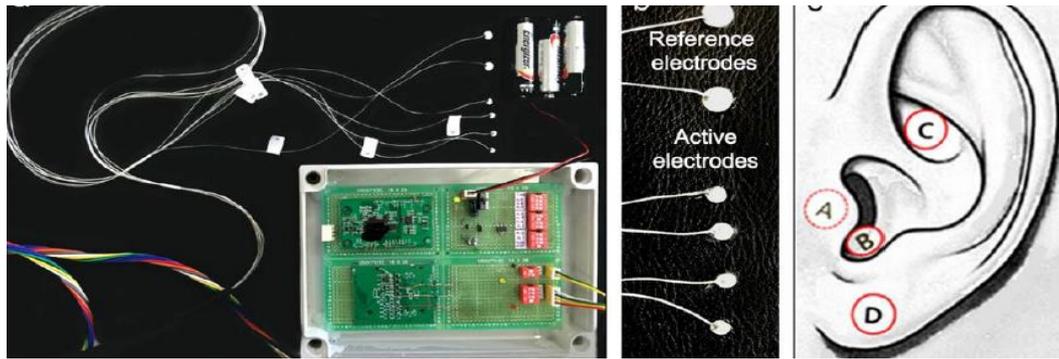
Também foi possível observar em humanos efeitos cardíacos benéficos após a EETNV. Os estudos de maior relevância clínica foram realizados em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e angina que foram submetidos a cirurgia de revascularização do miocárdio. Foi realizada eletroacupuntura para estimular as terminações do nervo vago, localizadas na concha de ambas as orelhas, por 15 minutos, durante 10 dias consecutivos. Observou-se uma redução da incidência de angina, melhora na evolução clínica no pós-operatório, e redução do tempo de tratamento com drogas vasodilatadoras (130,131).

Em outro estudo, também com pacientes com DAC, realizou-se a EETNV auricular com corrente elétrica de baixa frequência através de eletrodos posicionados na superfície interna do tragus por 10 dias. Neste estudo pode-se observar que quase 2/3 dos pacientes apresentaram uma redução significativa na intensidade dos ataques de angina, além de uma diminuição significativa no balanço simpato-vagal (relação LF/HF) para o coração (132).

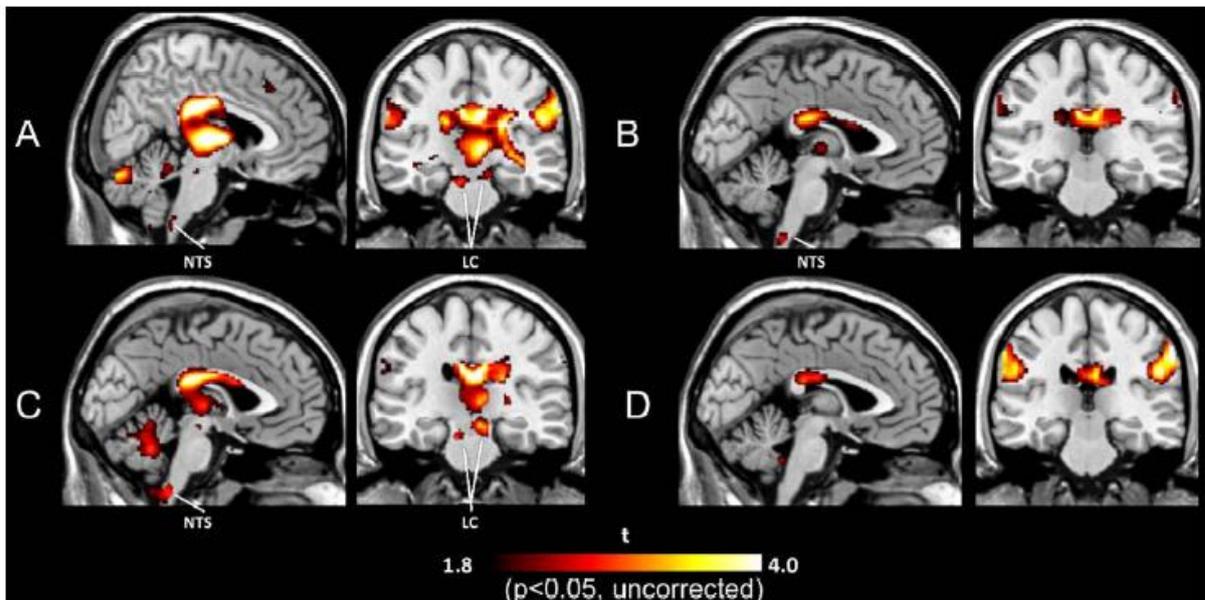
Estudo publicado recentemente demonstrou o potencial efeito terapêutico da EETNV em indivíduos com fibrilação atrial paroxística. Pacientes foram submetidos à EETNV de baixa amplitude, continuamente por 1 hora, e tiveram uma diminuição da duração da fibrilação atrial e redução significativa das concentrações séricas de citocinas inflamatórias num período de seguimento de uma hora (133).

O efeito da estimulação do RANV pode ir além da estimulação parassimpática. De fato, em um recente estudo de Clancy e cols. (127), observou-se que a estimulação elétrica dessa região também pode influenciar a atividade do sistema nervoso simpático. Em indivíduos saudáveis, sem histórico de doença cardiovascular (DCV), a EETNV auricular na superfície do tragus melhorou significativamente a VFC (balanço simpato-vagal para o coração), bem como reduziu consideravelmente a atividade simpática periférica, aferida com a técnica de microneurografia do nervo fibular (127).

Estudo realizado por *Yakunina N. e cols* (2016) em indivíduos saudáveis, utilizando Ressonância Magnética funcional (RMf) para comparar os efeitos da EETNV auricular em quatro locais diferentes da orelha esquerda (Figura 11) e identificar a localização mais eficaz para a terapia com eletroestimulação transcutânea, concluíram que a região *Cymba Conchae* (C) pode ser a localização mais adequada para a terapia com eletroestimulação transcutânea, quando comparada ao Meato Acústico Externo (B) e Face Interna do Tragus (A), porque a estimulação nesse local resultou na ativação mais forte da via aferente vagal no tronco encefálico (Figura 12). A estimulação no Lobo da Orelha (D), que é reconhecida por ser relativamente livre de inervação vagal, foi realizada como uma estimulação simulada (134).



**Figura 11** – Aparelho e eletrodos personalizados compatíveis para RM utilizado no estudo e locais de estimulação. **A:** Superfície interna do tragus; **B:** Meato acústico externo; **C:** Cymba conchae; **D:** Lobo da orelha (134).



**Figura 12** – Mapas de ativação para os eletrodos A, B, C e D (134). Legendas: NTS: Núcleo do trato solitário; LC: Locus coeruleus.

Em outro estudo publicado recentemente (em 2019), foram avaliadas as respostas autonômicas cardíacas e periféricas ao estresse ortostático durante a EETNV auricular em indivíduos saudáveis. Este estudo demonstrou que a EETNV auricular reduz a FC e regula a modulação autonômica cardíaca e periférica, a modulação simpática direcionada ao coração e aos vasos, respectivamente. Assim, esses achados sugerem que a avaliação da resposta do sistema nervoso autônomo

ao estresse ortostático durante a EETNV auricular pode ser recomendada principalmente na triagem de possíveis eventos cardiovasculares adversos (135).

Os parâmetros programáveis utilizados nos aparelhos de estimulação transcutânea do nervo vago, como a intensidade de estimulação (mA), a largura de pulso (duração do pulso elétrico, ms), a frequência de pulso (Hz), e a relação on/off do ciclo de estímulo (medido em segundos ou minutos) são ajustados para otimizar eficácia e tolerabilidade, porém ainda é um assunto a ser debatido (136).

Pesquisadores relatam a escassez de dados na literatura que possam definir parâmetros de forma mais precisa, dados apontam que a estimulação de baixa frequência (entre 0,5 e 10 Hz) ativa o sistema simpático, ao passo que frequências mais altas (20-25 Hz) seriam mais adequadas para a ativação vagal. Também debatem que manter a largura de pulso entre 200-500 ms, demonstra ser um limite razoável (137).

Como as fibras eferentes do nervo vago modulam a função cardiovascular, existe uma preocupação quanto ao uso terapêutico da estimulação vagal em relação à segurança cardíaca, já que os ramos eferentes vagais localizados no lado direito são pensados em estimular diretamente áreas cardíacas. A fim de evitar os efeitos cardíacos secundários, a colocação do eletrodo invasivo é realizada no lado esquerdo para o tratamento de doenças do SNC (138,139). Enquanto isso, a EETNV estimula as fibras aferentes do nervo vago, enviando estímulos ao NTS para integração da informação e, em seguida, serem projetados à superfície do coração através dos nervos vagais eferentes bilaterais (140).

Considerando o exposto, estudos que investiguem o impacto da EETNV auricular em condições clínicas caracterizadas por um processo inflamatório crônico, como exemplo, em portadores de SM, podem trazer importantes informações quanto

ao papel da estimulação vagal na modulação da inflamação dessas doenças, bem como ampliar a capacidade de abordagem terapêutica de forma minimamente invasiva e de baixo custo no tratamento desses pacientes.

### **1.5 – Hipótese do estudo**

A hipótese do nosso estudo é que por meio da EETNV auricular em pacientes com diagnóstico de SM, alcançaremos agudamente (após uma única sessão de EE) uma melhora significativa nos parâmetros hemodinâmicos e autonômicos. E de que, cronicamente (após 8 sessões, 1 vez por semana, durante 30 minutos, por 8 semanas) verificaremos uma melhora nos mesmos parâmetros, além de outros, como: perfil metabólico, marcadores inflamatórios sistêmicos (citocinas), e mobilização de células endoteliais (progenitoras, circulantes e micropartículas) e imunes (monócitos clássicos, CD14<sup>+</sup> e não clássicos, CD16<sup>+</sup>).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da EETNV auricular sobre marcadores autonômicos, hemodinâmicos, metabólicos, inflamatórios e de células endoteliais em pacientes com SM.

### 2.2 – Objetivos específicos

A) Avaliar em um grupo de pacientes portadores de SM, os efeitos de uma única sessão (agudo) (30 minutos) de EETNV auricular sobre:

- Parâmetros hemodinâmicos – registro da pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC), débito cardíaco (DC) e resistência periférica total (RPT).
- Parâmetros autonômicos – variabilidade da frequência cardíaca nos domínios do tempo de da frequência, balanço simpato-vagal e variabilidade da pressão arterial.

B) Avaliar os efeitos de uma série de sessões, efeito crônico, (1 x por semana – 30 minutos cada, durante um total de 8 semanas) da EETNV auricular em pacientes portadores de SM.

- Parâmetros hemodinâmicos – registro da pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC), débito cardíaco (DC) e resistência periférica total (RPT).

- Parâmetros autonômicos – variabilidade da frequência cardíaca nos domínios do tempo e da frequência, balanço simpato-vagal e variabilidade da pressão arterial
- Parâmetros metabólicos – níveis séricos de glicose, insulina, colesterol total e frações (HDL-c, LDL-c), cálculo do índice HOMA
- Parâmetros inflamatórios – relação neutrófilos / linfócitos e monócitos (clássicos e não clássicos) do sangue periférico; dosagem de PCR, e de citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, IL-6)
- Células endoteliais – Células progenitoras endoteliais (CPE); Células endoteliais circulantes (CEC) e Micropartículas (MP).

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1. Características do estudo**

Trata-se de um estudo randomizado 2:1, com um total de 30 pacientes. Para o cálculo amostral do estudo de intervenção, consideramos obter uma diferença de 20% entre os grupos nas variáveis %LF e LF/HF (balanço autonômico). Esperando um erro de 5% e intervalo de confiança de 95%. O número de pacientes para cada grupo foi de 20 para o GT e de 10 para o GC. O cálculo amostral foi baseado em estudos já realizados do próprio grupo de pesquisa, utilizando as mesmas variáveis.

Considerando-se a necessidade de implementar a nova técnica no nosso serviço, optamos por incluir um maior número de indivíduos no GT para ter um poder de efeito da estimulação e detectar eventuais desconfortos, tolerabilidade, efeitos adversos, em uma população muito específica de estudo.

#### **Método de randomização**

A randomização foi realizada por meio de sorteio de cartões já previamente identificados (10 cartões GC e 20 cartões GT).

#### **3.2. Pacientes**

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, com idade de 18 a 60 anos (o que exclui menores de idade), da cidade de São Paulo, que apresentaram os critérios de inclusão descritos abaixo. Os voluntários foram recrutados do Ambulatório de Pesquisa de Síndrome Metabólica da Universidade Nove de Julho – UNINOVE. Os interessados em participar do estudo foram submetidos a uma entrevista pelo pesquisador responsável, e os que preencheram os critérios de

seleção foram então convidados a participar do estudo. Todos os indivíduos foram admitidos no estudo após lerem e assinarem o TCLE aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho sob número **2.621.640** e disponível para acesso na Plataforma Brasil sob número **83127318.0.0000.5511** e Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (REBEC) - **REQ: RBR-7thswq**

### **3.3 – Critérios de Seleção**

A avaliação inicial foi realizada no ambulatório da Universidade Nove de Julho – UNINOVE. Os pacientes foram submetidos a um completo exame clínico e físico, onde dois especialistas (médicos) vinculados ao projeto verificaram se havia alguma contraindicação específica para a inclusão no presente estudo.

### **Critérios de Inclusão**

Os indivíduos elegidos preencheram todos os critérios listados abaixo:

- Diagnóstico de SM baseado nos critérios recentemente estabelecidos (NCEP: ATP III - 2015) - três achados anormais de cinco qualificam uma pessoa para o diagnóstico de SM
  - ✓ Aumento circunferencial da cintura ( $\geq 102\text{cm}$  em homens,  $\geq 88\text{cm}$  em mulheres)
  - ✓ Aumento de triglicérides ( $\geq 150\text{ mg/dL}$ )
  - ✓ HDL-c reduzido ( $\leq 40\text{mg/dL}$  mol/L em homens,  $\leq 50\text{mg/dL}$  em mulheres)
  - ✓ Pressão arterial aumentada (sistólica  $\geq 130$  e/ou diastólica  $\geq 85\text{mm Hg}$ )

✓ Glicemia de jejum elevada ( $\geq 100\text{mg/dL}$ ).

- Declaração pelo paciente de peso e dieta estáveis por pelo menos 6 meses até a entrada no estudo
- Função renal normal
- Função tireoidiana normal
- Apto a declarar consentimento por escrito e cumprimento com as tributações do estudo durante a duração do estudo

### **Crítérios de Exclusão**

Os indivíduos não eram elegíveis para participar do estudo caso apresentassem qualquer um dos critérios de exclusão listados abaixo:

- Em uso de insulina ou com HbA1c  $> 8,0$ ;
- Níveis de triglicérides  $\geq 400\text{mg/dL}$  ou em uso de medicação redutora de lipídeos;
- Níveis séricos de alanina transaminase (AST) e/ou aspartato transaminase (ALT)  $>200\text{U/L}$
- Pressão sistólica em repouso  $\geq 160$  mm Hg; Pressão diastólica em repouso  $\geq 100$  mm Hg;
- Em uso de anti-hipertensivos que interferissem (beta bloqueadores) com a VFC;
- Antecedentes de doenças crônicas debilitantes
- gestação

- Voluntários que apresentarem: qualquer neoplasia em atividade; lesão cutânea e/ou déficit de sensibilidade do pavilhão auricular esquerdo; estar em tratamento com radioterapia e/ou quimioterapia e imunossuppressores, pacientes com doenças infecciosas crônicas (incluindo hepatites, SIDA.)

### **3.4 – MÉTODOS**

#### **Anamnese e exame físico**

A anamnese e o exame físico dos envolvidos no estudo seguiram a normatização universal e convencional, de uso corrente, conforme a prática médica contemporânea.

Foi realizado antes de cada sessão de EE um exame físico minucioso do pavilhão auricular esquerdo para descartar qualquer foco de infecção ou lesão cutânea e/ou perda da sensibilidade da pele, o que cancelaria o procedimento.

#### **Avaliação antropométrica**

A avaliação antropométrica consta dos seguintes itens: Circunferência abdominal (cm) – passando na altura da cicatriz umbilical, utilizando uma fita métrica metálica de marca Sanny. Estatura (m) – medida pelo estadiômetro de marca Sanny. Massa corporal total (kg) – balança Filizola. Índice de massa corporal (IMC) –  $\text{peso(kg)}/\text{estatura}^2(\text{m})$ . Para determinação da classificação do IMC foi adotada a classificação do NCHS. CDC (2000).

## Exames laboratoriais

Uma punção venosa (aproximadamente 20 ml) foi realizada para retirada de uma amostra de sangue para dosagem dos exames pertinentes ao estudo. O processamento das amostras foi realizado de acordo com método padronizado e de rotina no laboratório de análises clínicas, e específico para cada substância:

Proteína C-reativa (PCR), Perfil lipídico (colesterol total), Lipoproteínas de alta densidade (HDL-colesterol), Lipoproteínas de baixa densidade (LDL), Triglicérides, Testes de função tireoidiana (TSH e T4 livre), Função hepática (TGO e TGP), glicose e insulina em jejum. Mulheres com potencial para engravidar fizeram teste de gravidez.

A dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6) foi realizada através de ensaios imunoenzimáticos (Quantikine HS ELISA – High Sensitivity), utilizando-se kits comerciais (R&D Systems a biotechne brand).

## Citometria de fluxo

O sangue dos pacientes foi coletado em tubo com EDTA, então transferido 100 $\mu$ L para tubos de citometria de acordo com os grupos de anticorpos anti-CD14 (monócito Clássico); anti-CD16 (Monócito não clássico); anti-CD31 (Célula endotelial circulante); anti-CD144 (Micropartículas) e anti-CD309 (Célula progenitora endotelial). Foi pipetado 2 $\mu$ L dos anticorpos em seus respectivos grupos e incubado, no escuro e a 4°C, por 30 minutos. Após a incubação, foi feito a lise de hemácias de acordo com o protocolo do reagente BD FACS Brand Lysing Solution (Nº Catálogo 349202), seguido por centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em 2mL de BSA, centrifugado novamente por

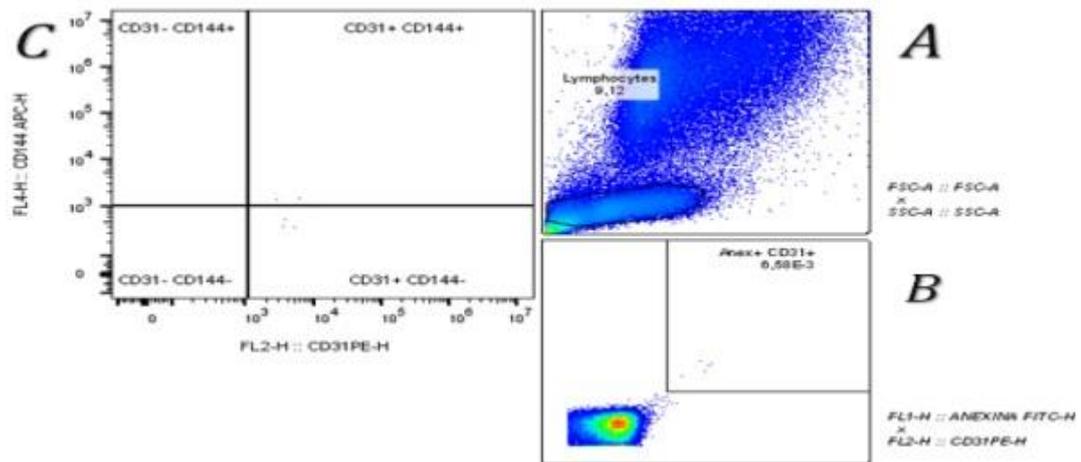
2.500 rpm durante 10 minutos para o processo de lavagem. O sobrenadante foi desprezado e o pellet final ressuspendido em 200µL de BSA. Observe na **tabela 2** a descrição dos anticorpos utilizados.

**Tabela 2 – Descrição dos anticorpos utilizados na marcação das células endoteliais e células imune.**

<b>Painel</b>	<b>Marcador</b>	<b>Concentração</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Fabricante/Catálogo</b>
<i>Tubo 1</i>	<i>Só células</i>	-	-	-
<b>Tubo 2</b>	CD3	2µL	PerCP	BD - 347344
<b>Tubo 2</b>	CD31	2µL	PE	BD – 555446
<b>Tubo 2</b>	CD144	2 µL	APC	BD – 561567
<b>Tubo 3</b>	CD309	2 µL	PE	BD – 560494
<b>Tubo 4</b>	CD14	2 µL	FITC	BD – 560996
<b>Tubo 4</b>	CD16	2 µL	APC CY7	BD - 557831

Para a caracterização do anticorpo CD309<sup>+</sup> (intracelular), após a lise celular e centrifugação foi pipetado 1mL de PermWash, em seguida o anticorpo (Catálogo BD – 560494) foi incubado no escuro por 30 minutos a 4°C. Após a incubação foi realizada centrifugação a 2.500 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionado 1mL de CytoFix, incubado por 10 minutos. Após a incubação, foi feita centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* final ressuspendido em 200µL de BSA. O marcador de CD3<sup>+</sup> foi utilizado para a formação dos *Gates* da citometria, para a identificação das células endoteliais uma vez que possuem um tamanho muito parecido com os linfócitos.

Para a análise no citometro BD Accuri C6, foram adquiridos 1x10<sup>6</sup> eventos/células para cada paciente e condição de marcação com os anticorpos. Abaixo a **Figura 13** demonstra um exemplo de como foram realizadas as marcações e detecções dos respectivos anticorpos para caracterização das células endoteliais.



**Figura 13** – Gates utilizados para marcação de células endoteliais (Células progenitoras endoteliais e Células Endoteliais circulantes). (A) - Gate na população de linfócitos. Linfócitos e células endoteliais possuem tamanho parecido, por isso utilizamos esse gate como primeira etapa na caracterização. (B) - Gráfico do tipo *dot plot* Anexina V x CD31+. Foi realizado um gate na dupla marcação. (C) - Gráfico do tipo *dot plot* CD31+ x CD144+ para a análise de MPE. As micropartículas de origem endotelial expressaram marcadores CD31+CD144+. **Fonte: Próprio (2019).**

### Registro da curva de pressão arterial batimento a batimento e das variáveis hemodinâmicas.

Os registros das variáveis hemodinâmicas, pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM), frequência cardíaca (FC), débito cardíaco (DC) e resistência periférica total (RPT) foram efetuados de maneira contínua e não invasiva, batimento a batimento, com o monitor de pressão Finometer® (Figura 14) (141).



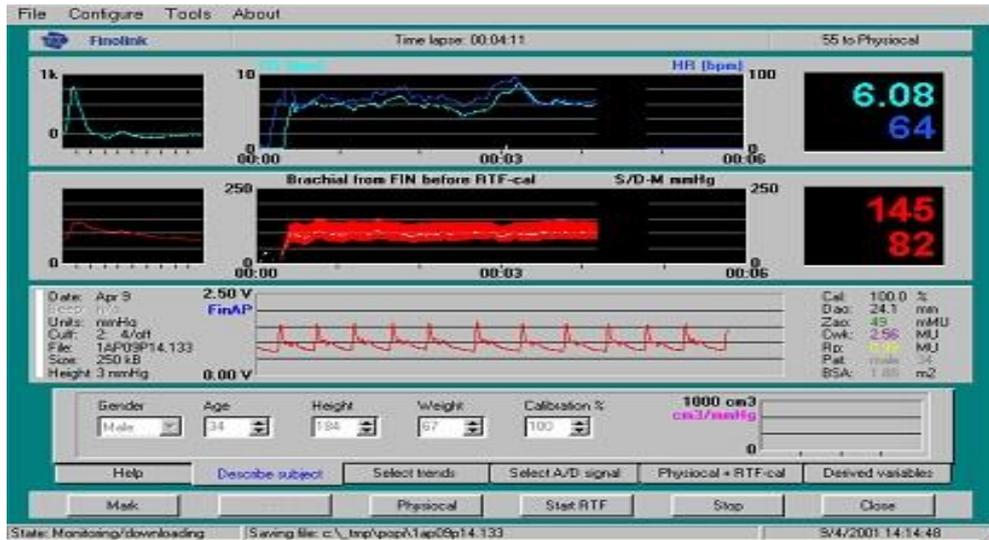
**Figura 14:** Monitorização dos parâmetros hemodinâmicos com o monitor Finometer® Finometer, FMS, Finapres Medical System, Holland) (141).

O equipamento utilizado tem como princípio básico a técnica de fotopleletismografia digital, gerando curvas de pressão arterial derivadas da pulsação da artéria digital, colocando-se um manguito de pressão circundando a falange média do segundo dedo da mão esquerda (Figura 15), conforme descrito por Penaz e desenvolvido por Wesseling (141).



**Figura 15:** Manguito de pressão circundando a falange média do segundo dedo da mão esquerda, com o princípio básico da técnica de fotopleletismografia digital, gerando curvas de pressão arterial derivadas da pulsação da artéria digital.

O equipamento é provido de um programa (Software BeatScope®) capaz de gerar os dados de Pressão Arterial Sistólica, Pressão Arterial Média, Pressão Arterial Diastólica, Débito Cardíaco e Resistência Periférica Total (PAS, PAM, PAD, DC e RPT) tendo como base valores derivados da curva de pressão arterial e informações sobre idade, sexo, peso e altura (Figura 16). Ainda que esses valores sejam indiretos, existem informações na literatura sobre a validação do método com medidas diretas e invasivas, tendo boa acurácia e valores sobreponíveis à curva de pressão da artéria braquial (141).



**Figura 16:** Tela do Finometer® durante um exame em tempo real, mostrando acima, à direita, os valores de DC, e FC e abaixo, à direita, a PAS e a PAD. No centro, destacado em vermelho, observa-se a curva de PA após calibração.

### Análise da VFC e da PAS

- **Variabilidade no Domínio do Tempo:** A série temporal da FC foi obtida por meio da determinação do intervalo de pulso (IP) do sinal da PA, e analisada no domínio do tempo por meio da análise da variância do intervalo dos batimentos normais (NN).
- **Variabilidade no Domínio da Frequência (Análise Espectral).** Inicialmente foi realizada a edição manual dos sinais através da detecção dos eventos sistólicos (pico) do sinal da PAS batimento a batimento. O intervalo de pulso (IP) foi estimado pelo intervalo entre sístoles consecutivas. Após inspeção visual de todas as séries obtidas foi realizada a regularização da periodicidade por interpolação *spline* cúbica ( $f_i=250$  Hz) e, após isto, a redução do número de pontos por decimação (18 vezes). Em seguida cada batimento cardíaco foi identificado através da utilização de algoritmo através do programa Matlab<sup>MT</sup> (método de Welch), que realizou a detecção automática dos eventos sistólicos da onda de pressão, gerando o resultado da análise espectral com as respectivas faixas de interesse. A potência espectral foi integrada em três faixas de frequência de interesse (HF, LF, VLF) e foi realizada a razão entre duas delas (LF/HF) para se avaliar o balanço autonômico. O componente LF da VPA foi

utilizado como uma representação da modulação simpática do tônus vascular (142).

- Frequências altas (**HF**) entre 0,4 e 0,15 Hz – Parassimpático
- Frequências baixas (**LF**) entre 0,15-0,40 Hz – Simpático
- Frequências muito baixas (**VLF**) menores que 0,04 Hz.
- Balanço autonômico: **LF/HF**

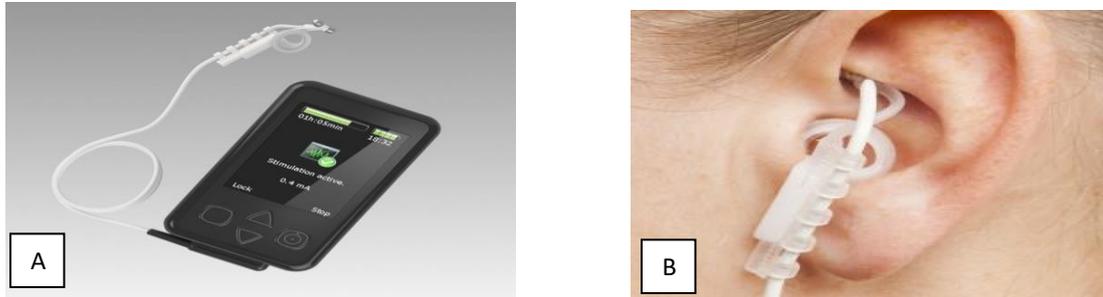
Os componentes da variabilidade da FC no domínio da frequência foram analisados e apresentados em valores absolutos (abs), porcentagem (%) e na sua forma normalizada (nu); ou seja:

- LF absoluto ( $\text{ms}^2$ )
- HF absoluto ( $\text{ms}^2$ )
- $\text{LF \%} = 100 \cdot \text{LF} / (\text{LF} + \text{HF})$
- $\text{HF \%} = 100 \cdot \text{HF} / (\text{LF} + \text{HF})$
- $\text{LF nu} = \text{potência de LF} / (\text{potência total } \text{ms}^2 - \text{VLF}) \times 100$
- $\text{HF nu} = \text{potência de HF} / (\text{potência total } \text{ms}^2 - \text{VLF}) \times 100$
- $\text{LF/HF} = \text{relação LF } \text{ms}^2 / \text{HF } \text{ms}^2$

### **Protocolo de Estimulação Elétrica Transcutânea do Nervo Vago Auricular**

A EETNV foi realizada utilizando um dispositivo (NEMOS®; Cerbomed, Erlangen, Alemanha) (Figura 17A), que estimula a *cymba conchae*, por ser uma região que apresenta uma maior capacidade de estimulação do nervo vago de forma transcutânea, porque a estimulação desta localização resulta na ativação mais forte da via aferente vagal no tronco encefálico (134). O estímulo elétrico tem uma largura de pulso de 500ms; frequência de estimulação de 25 Hz e amplitude em miliAmpère

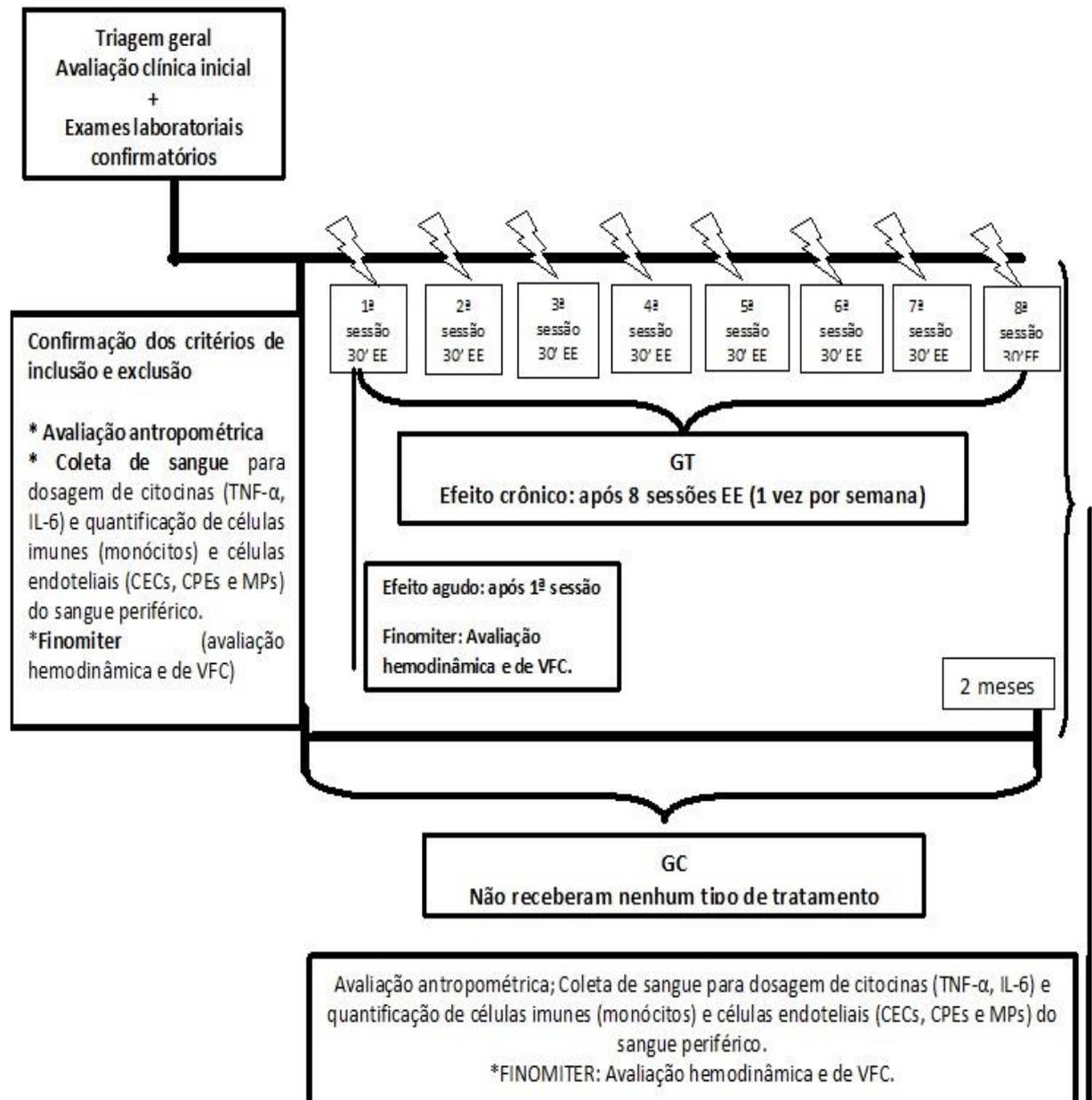
(mA) que varia de 0.1 a 5.0 mA. A estimulação foi realizada na orelha esquerda de todos os pacientes (143).



**Figura 17** – A) Dispositivo NEMOS®. B) Eletrodo posicionado cymba conchae (ramo auricular nevo vago) (135)

Durante a EETNV, o eletrodo foi posicionado na *cymba conchae* (Figura 17B). O período de estimulação foi de 30 minutos cíclicos (30 segundos, On e 30 segundos, Off). Nos pacientes do GT, o eletrodo foi ligado e a amplitude foi sendo aumentada ( 0.1 - 6.0 mA) até que o sujeito identificasse o estímulo de maneira confortável e receberam uma sessão por semana por 8 semanas (135). No GC os pacientes não receberam nenhum tipo de tratamento.

### 3.5 – Sequência do estudo



### 3.6 - Análise Estatística

A análise dos resultados foi realizada com o programa **GraphPad Prism 8 (2019)**. A normalidade dos dados foi testada com o teste de Kolmogorov-Smirnov (KS). O teste t Student foi aplicado para analisar amostras pareadas.

Utilizamos o teste ANOVA de medidas repetidas para análise entre os grupos, seguido pelo teste post hoc de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes se  $p \leq 0,05$ . Os dados paramétricos foram apresentados em média e desvio padrão.

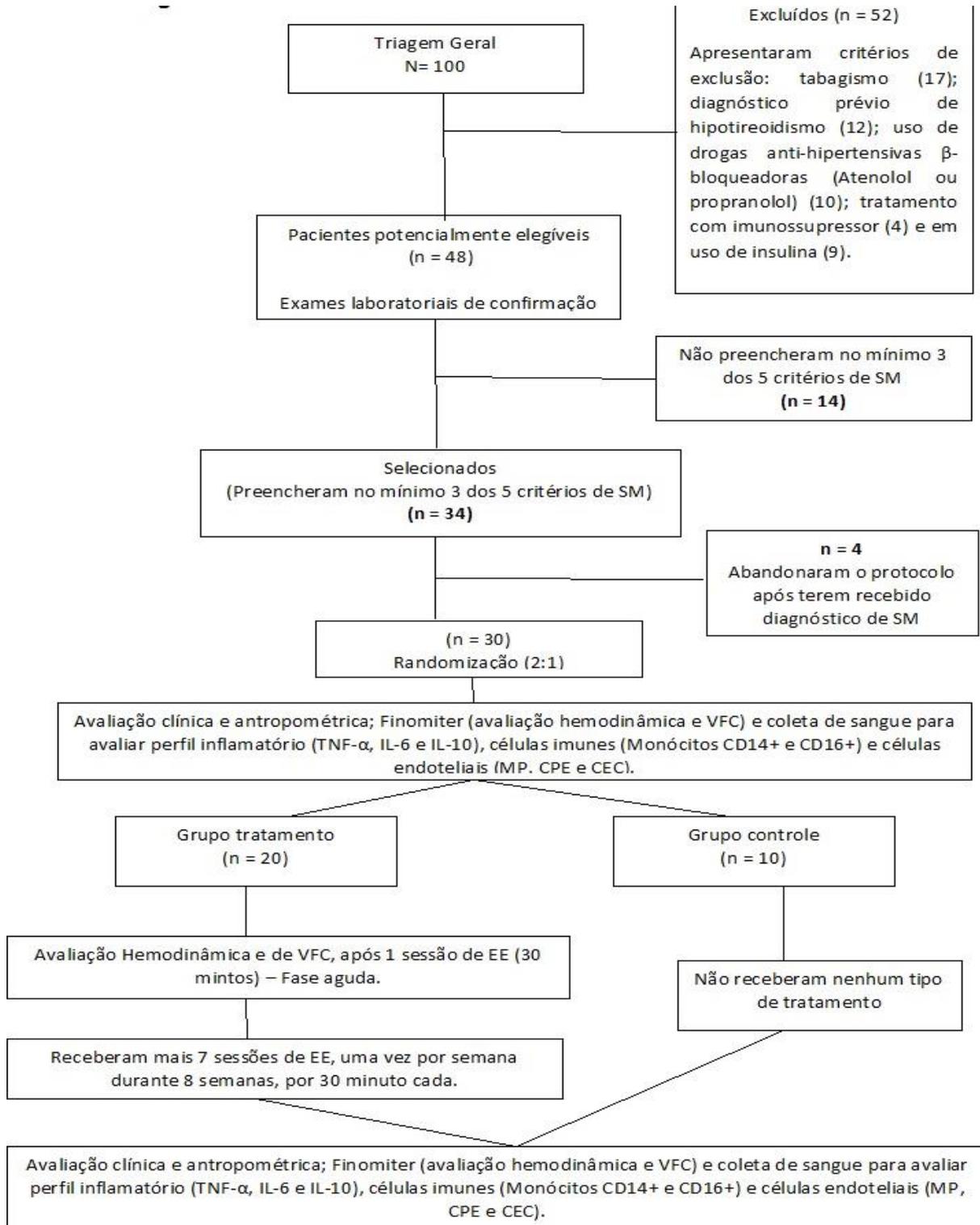
## 4. RESULTADOS

Os resultados deste estudo serão apresentados segundo a sequência dos objetos propostos

### **Seleção dos participantes e caracterização da amostra**

No período de maio a dezembro de 2018, foi realizada uma busca ativa de potenciais participantes em mutirões realizados em centros comunitários na cidade de São Paulo (fase de *screening*). Inicialmente foram avaliados 100 voluntários, destes 52 foram excluídos por apresentarem critérios de exclusão, e 48 potencialmente elegíveis realizaram exames laboratoriais de confirmação. Destes 14 não preencheram no mínimo 3 dos 5 critérios de SM. Trinta e quatro pacientes foram selecionados, porém, quatro abandonaram o protocolo na fase inicial restando apenas 30. Os 30 que permaneceram no protocolo foram randomizados em dois grupos conforme descrito no fluxograma do estudo abaixo.

#### 4.1. Fluxograma do estudo



O conjunto de todos os componentes que preenchem os critérios de SM de acordo com os critérios do ATP III (2015) esteve presente somente em 5 pacientes (16,6%). Os demais pacientes apresentaram 3 ou 4 componentes da SM, em combinações variadas.

De forma individual, a “circunferência abdominal (CA) aumentada” foi o único componente que esteve presente nos 30 pacientes (prevalência de 100%). O segundo fator mais prevalente foi a “PA elevada” presente em 25 pacientes (83,3%), seguido de “HDL-colesterol baixo” em 22 (73,3%), “glicemia elevada” 15 (50%) e “triglicerídeos elevados” em 8 (26,6%) dos pacientes.

Nenhum paciente apresentou efeitos adversos ao método de EETNV auricular ou desistiu do protocolo em andamento.

Apresentamos, na Tabela 3, os dados iniciais obtidos no momento de inclusão no estudo, o perfil antropométrico, clínico e laboratorial que são resultados cruciais para diagnóstico de SM. Tais resultados, portanto, referem-se aos pacientes incluídos no GT (n=20) e no GC (n=10). A média das idades do GT foi de  $43 \pm 9$  anos (7 homens e 13 mulheres), e do GC foi de  $46 \pm 10$  anos (3 homens e 7 mulheres). Os grupos são comparáveis nessas variáveis.

**Tabela 3 – Perfil antropométrico, clínico e laboratorial dos pacientes do GT e GC no momento da inclusão (momento basal).**

	<b>GT (n=20)</b> <b>(Média/DP)</b>	<b>GC (n=10)</b> <b>(Média/DP)</b>	<b>P</b>
<b>Sexo (M/F)</b>	7/13	3/7	0,093
<b>Idade</b>	43 ± 9	46 ± 10	0,473
<b>Peso (Kg)</b>	105 ± 18	104 ± 22	0,960
<b>CA (cm)</b>	119 ± 12	122 ± 13	0,544
<b>CC (cm)</b>	42 ± 5	40 ± 4	0,477
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	37 ± 5	37 ± 6	0,854
<b>PAS (mmHg)</b>	137 ± 21	135 ± 21	0,844
<b>PAD (mmHg)</b>	81 ± 10	80 ± 10	0,719
<b>FC (bpm)</b>	72 ± 7	74 ± 10	0,659
<b>Glicose (mg/dL)</b>	100 ± 14	105 ± 17	0,875
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	197 ± 42	201 ± 49	0,832
<b>HDL-c (mg/dL)</b>	46 ± 10	48 ± 12	0,611
<b>LDL-c (mg/dL)</b>	123 ± 39	125 ± 43	0,946
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>	141 ± 38	130 ± 42	0,936
<b>TGO (U/L)</b>	23 ± 9	24 ± 8	0,791
<b>TGP (U/L)</b>	25 ± 7	28 ± 14	0,520
<b>TSH (uIU/mL)</b>	2,3 ± 1,6	2,2 ± 1,0	0,822
<b>T4 livre (uIU/mL)</b>	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,697
<b>Insulina (mUI/mL)</b>	17 ± 7	15 ± 7	0,438
<b>PCR (mg/dL)</b>	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,4	0,916
<b>HOMA-IR</b>	4,2 ± 1,7	3,7 ± 2,0	0,754

\*p<0,05 = estatisticamente significativa. Valores expressos em média e desvio padrão. M: masculino; F: feminino; CA: Circunferência abdominal; CC: Circunferência cervical; IMC: índice de massa corpórea; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica; FC: Frequência cardíaca; HDL: *High Density Lipoproteins*; LDL: *Low Density Lipoproteins*; TGO: Transaminase glutâmico oxalacética; TGP: Transaminase glutâmico-pirúvica; TSH: *Thyroid-stimulating hormone*; T4: Tiroxina; PCR: Proteína C Reativa; HOMA-IR: *Index Homeostatic Model Assessment*. **Test t Student.**

Os valores médios da circunferência abdominal (CA); Índice de Massa Corpórea (IMC) e Circunferência da cervical dos dois grupos são semelhantes, ambos acima do normal. Pela classificação do IMC os pacientes de ambos os grupos apresentam Obesidade Grau II. A PAS e PAD aferidas no consultório dos

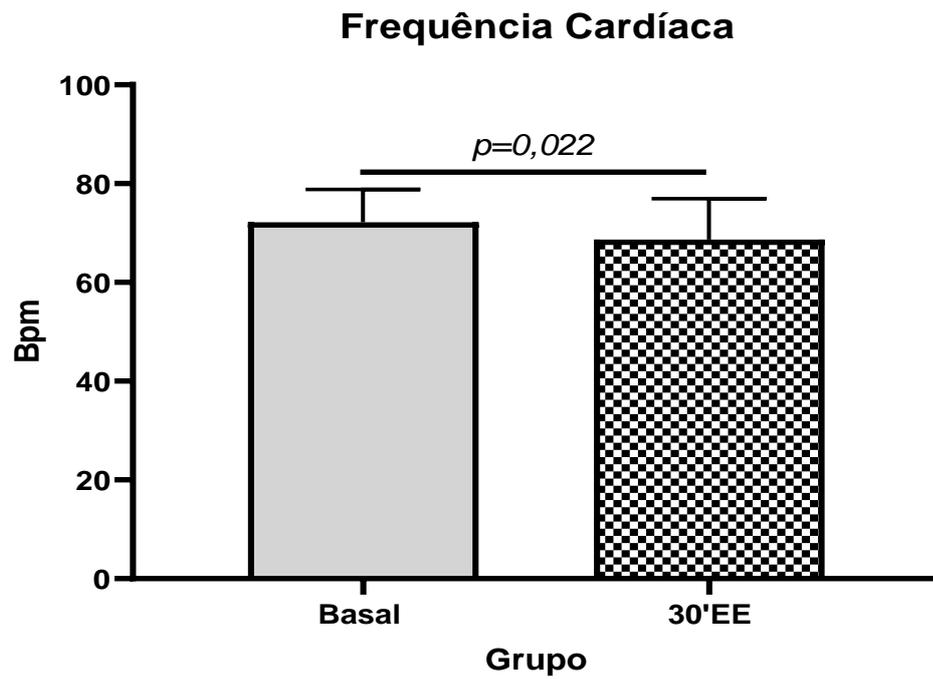
dois grupos são semelhantes, e em ambos estão acima do normal. Com relação ao perfil laboratorial podemos observar que não houve diferenças no perfil metabólico, lipídico, endócrino e de inflamação entre os grupos no momento basal ( $p>0,05$ ). Os grupos são comparáveis para estas variáveis no mesmo momento.

A tabela 4 apresenta a comparação das médias (basal e após 30 minutos de EE) das medidas de PAS, PAD e FC de consultório e parâmetros hemodinâmicos (batimento-a-batimento) dos pacientes do GT na fase aguda do tratamento. Observamos que não houve diferenças significantes nas médias das medidas de PAS e PAD de consultório e batimento-a-batimento quando comparadas ao momento basal ( $p>0,05$ ). No entanto, a FC de consultório (Figura 18) e a FC batimento-a-batimento (Figura 19) apresentaram uma redução de aproximadamente 3 batimentos por minuto após 30 minutos de EE quando comparadas ao momento basal ( $p=0,022$  e  $p=0,011$ , respectivamente). As demais variáveis dos parâmetros hemodinâmicos (DC e RPT) não apresentaram variações significantes nas médias ( $p>0,05$ ).

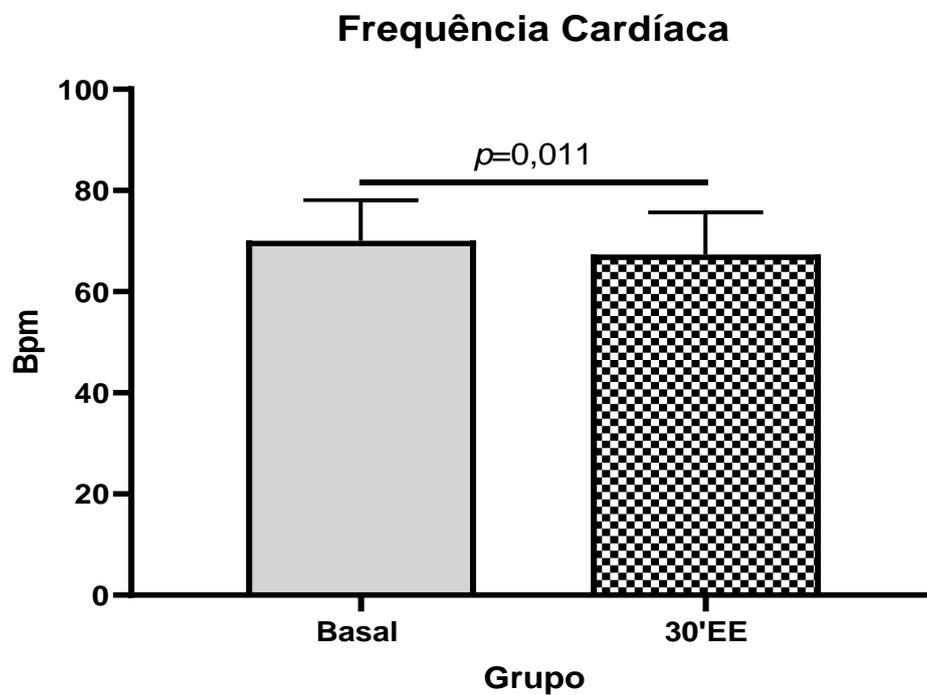
**Tabela 4 – Comparação das médias das medidas de PAS, PAD e FC de consultório e dos parâmetros hemodinâmicos (batimento-a-batimento) dos pacientes do GT na fase aguda (momento basal e após 30 minutos de EE).**

<b>GT (n=20)</b>			
<b>Medidas de consultório</b>	<b>Basal</b>	<b>Pós 30'EE</b>	<b>p</b>
PAS (mmHg)	137 ± 21	136 ± 22	0,859
PAD (mmHg)	81 ± 10	80 ± 10	0,825
FC (bpm)	72 ± 7	69 ± 8	0,022*
<b>Parâmetros Hemodinâmicos</b>			
PAS (mmHg)	138 ± 20	135 ± 23	0,267
PAD (mmHg)	78 ± 8	78 ± 9	0,755
PAM (mmHg)	102 ± 13	101 ± 14	0,6
FC (bpm)	70 ± 8	67 ± 8	0,011*
DC (L/min)	7,5 ± 1,4	7,2 ± 1,4	0,161
RPT (NU)	0,843 ± 0,2	0,877 ± 0,2	0,335

\* $p<0,05$  = estatisticamente significativa. Valores expressos em média e desvio padrão. PAS: Pressão arterial sistólica; PAD; Pressão arterial diastólica; FC: Frequência cardíaca; DC: Débito cardíaco; RPT: Resistência periférica total. **Test t Student.**

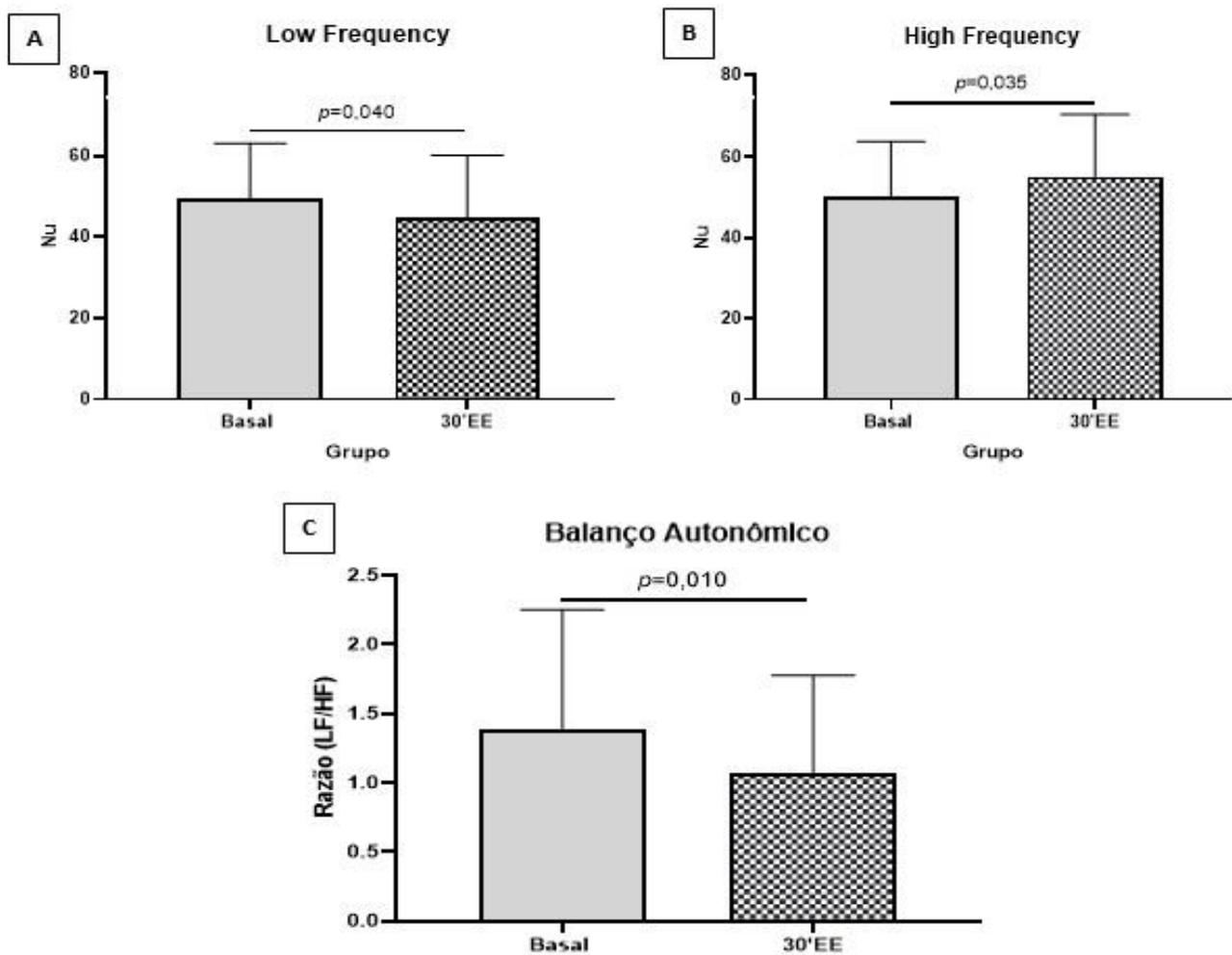


**Figura 18** – Comparação das médias da FC de consultório no momento basal e após 30 minutos de EE. Test.t pareado. **Test t Student.**



**Figura 19** – Comparação das médias da FC no momento basal e após 30 minutos de EE, avaliada batimento-a-batimento através do FINOMITER. **Test t Student.**

A tabela 5 apresenta a comparação entre as médias dos parâmetros autonômicos do GT na fase aguda. Quando analisamos as variações entre os dois momentos (basal e após 30' de EE), observamos que os parâmetros de VFC no domínio do tempo (VARR e RMSSD) não sofreram alterações significantes ( $p > 0,05$ ). Na análise dos parâmetros da VFC no domínio da frequência observamos que os componentes LF (nu) (simpático) (Figura 20A) e a razão LF/HF (modulação simpato-vagal) (Figura 20C) diminuíram e o componente HF (nu) (vago) (Figura 20B) aumentou estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). E as demais variáveis no domínio da frequência não apresentaram variações significantes ( $p > 0,05$ ).



**Figura 20** – Comparação das médias no momento basal e após 30 minutos de EE das variáveis: **A)** LF(nu); **B)** HF (nu); **C)** balanço autonômico (razão LF/HF) da avaliação aguda. **Test t Student**.

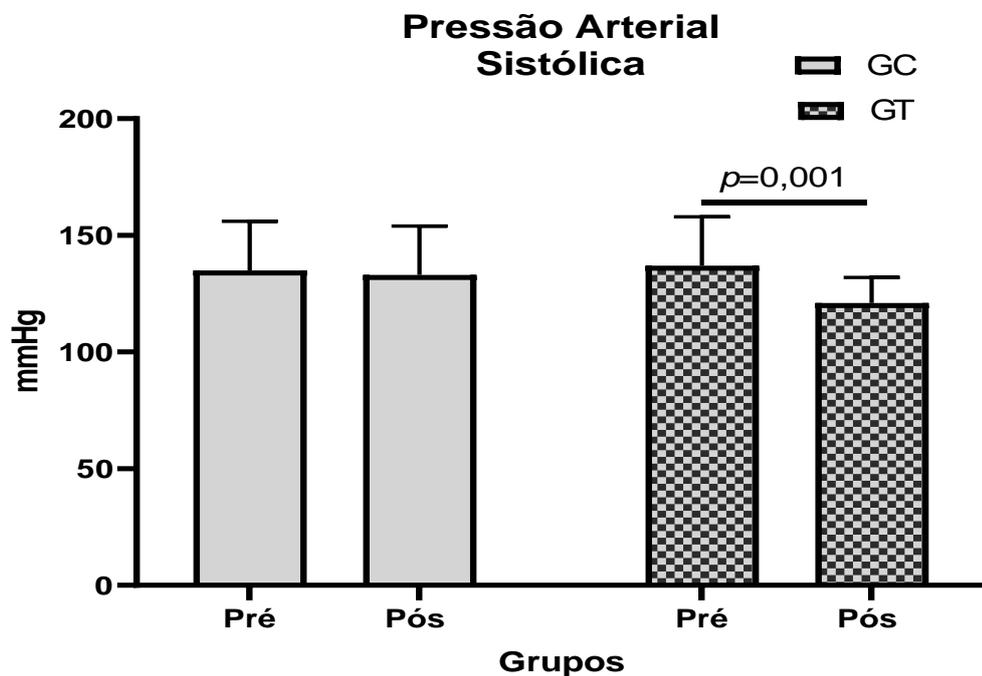
**Tabela 5** - Comparação dos parâmetros autonômicos do GT na fase aguda (momento basal e após 30 minutos de EE).

GT (n=20)			
	Basal	Pós 30' EE	p
<b>VARR (ms<sup>2</sup>)</b>	2749 ± 2793	3643 ± 4791	0,192
<b>RMSSD (ms)</b>	41 ± 28	48 ± 42	0,196
<b>LF abs (ms<sup>2</sup>)</b>	772 ± 839	1015 ± 1756	0,347
<b>HF abs (ms<sup>2</sup>)</b>	896 ± 1362	1372 ± 2228	0,149
<b>LF%</b>	32 ± 7	29 ± 8	0,246
<b>HF%</b>	34 ± 14	38 ± 18	0,126
<b>LF (nu) (ms<sup>2</sup>)</b>	50 ± 13	45 ± 15	0,040*
<b>HF (nu) (ms<sup>2</sup>)</b>	50 ± 13	55 ± 15	0,035*
<b>LF/HF</b>	1,4 ± 0,9	1,1 ± 0,7	0,010*

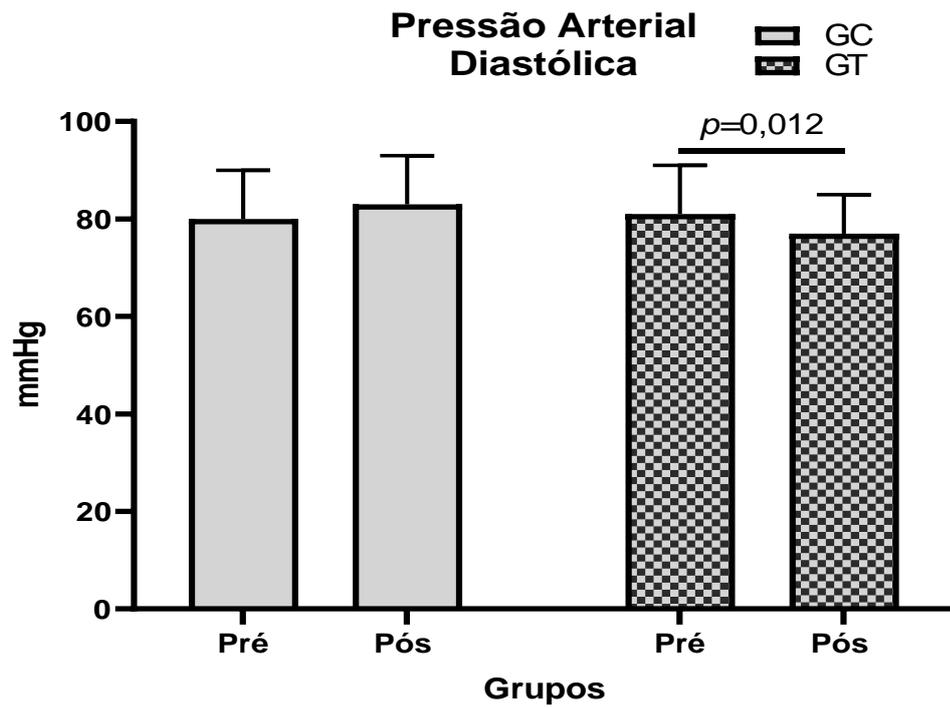
\*p<0,05 = estatisticamente significativa. Valores expressos em média e desvio padrão. VARR: Variação intervalos R-R; RMSSD: Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos R-R normais; LF: Low frequency; Abs: absoluto; HF: High frequency; Nu: Normalizado; %: porcentagem; LF/HF: Ratio Low frequency/ High frequency. **Test t Student**.

A seguir, apresentamos os resultados das médias no momento basal e após 8 semanas sem nenhum tipo de tratamento (GC) e do (GT) que recebeu EETNV.

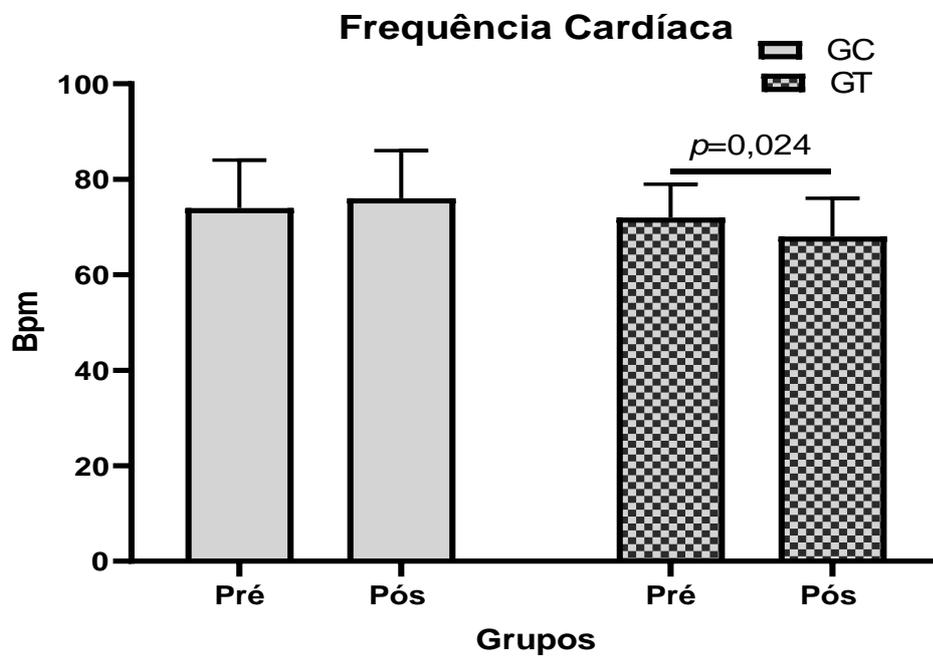
Como pode ser observado na Tabela 6, não houve diferenças significantes na interação entre o tempo versus grupos ( $p > 0,05$ ), assim como na comparação dos momentos (pré e pós) em ambos os grupos nas medidas antropométricas, como: Peso, CA, CC e IMC. Quanto as medidas de PAS, PAD e FC de consultório, observamos que houve uma interação entre o tempo versus grupos ( $p < 0,05$ ). E quando aplicamos o teste Post Hoc para identificar onde estava a diferença, observamos que as médias de PAS (Figura 21), PAD (Figura 22) e FC (Figura 23) apresentaram uma redução após 8 sessões de EE quando comparadas ao momento basal do GT ( $p < 0,05$ ).



**Figura 21:** Comparação das médias da PAS entre os momentos pré e pós de ambos os grupo (GC e GT). Teste *post hoc* de Bonferroni.



**Figura 22:** Comparação das médias da PAD entre os momentos pré e pós de ambos os grupos (GC e GT). Teste *post hoc* de Bonferroni.



**Figura 23:** Comparação das médias da FC entre os momentos pré e pós de ambos os grupos (GC e GT). Teste *post hoc* de Bonferroni.

**Tabela 6 – Comparação dos dados antropométricos e clínicos do GC no momento basal e após 2 meses sem tratamento e GT no momento basal e após 8 sessões de EE.**

	GC (n=10)		GT (n=20)		p
	Pré	Pós	Pré	Pós	
<b>Peso (Kg)</b>	104 ± 22	103 ± 22	105 ± 18	105 ± 18	0,172
<b>CA (cm)</b>	122 ± 13	119 ± 15	119 ± 12	118 ± 11	0,332
<b>CC (cm)</b>	40 ± 4	41 ± 4	42 ± 5	42 ± 5	0,774
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	37 ± 6	36 ± 6	37 ± 5	37 ± 5	0,126
<b>PAS (mmHg)</b>	135 ± 21	133 ± 21	137 ± 21	121 ± 11 <sup>#</sup>	0,028*
<b>PAD (mmHg)</b>	80 ± 10	83 ± 10	81 ± 10	77 ± 8 <sup>#</sup>	0,007*
<b>FC (bpm)</b>	74 ± 10	76 ± 10	72 ± 7	68 ± 8 <sup>#</sup>	0,034*

\*p<0,05 = estatisticamente significativa. Valores expressos em média e desvio padrão. Valor de p da interação entre grupos e tempos. CA: Circunferência abdominal; CC: Circunferência cervical; IMC: índice de massa corpórea; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD; Pressão arterial diastólica; FC: Frequência cardíaca. **#GT=pré vs pós; p<0,05 (Bonferroni)**

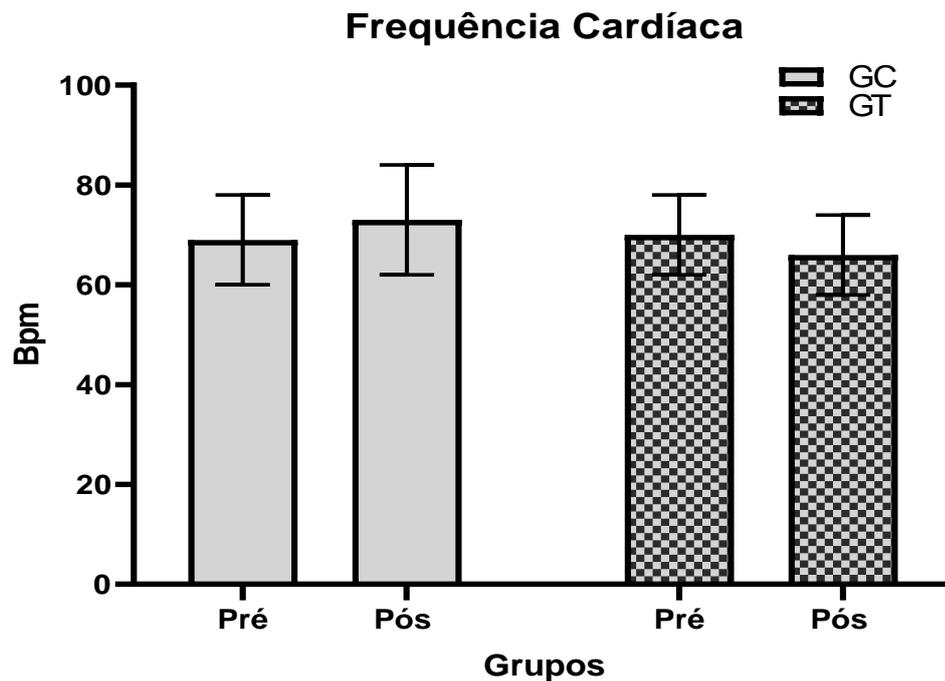
A tabela 7 apresenta os resultados dos exames laboratoriais (perfil metabólico, lipídico, endócrino e inflamatório), do GC e GT avaliados nos dois momentos (pré e pós). Não houve indícios de que as médias foram diferentes comparando os momentos (pré e pós) nos dois grupos (p>0,05), e na interação tempo versus grupos (p>0,05).

**Tabela 7 – Comparação das médias dos exames laboratoriais (perfil metabólico, lipídico, endócrino e inflamatório) do GC no momento basal e após 2 meses sem tratamento e do GT (momento basal e após 8 sessões de EE).**

	GC (n=10)		GT (n=20)		p
	Pré	Pós	Pré	Pós	
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	101 ± 11	105 ± 17	102 ± 16	100 ± 14	0,732
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	201 ± 49	204 ± 45	197 ± 42	187 ± 32	0,535
<b>HDL-c (mg/dL)</b>	48 ± 12	50 ± 13	46 ± 10	45 ± 9	0,832
<b>LDL-c (mg/dL)</b>	125 ± 43	130 ± 39	123 ± 39	118 ± 33	0,432
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>	130 ± 42	123 ± 34	141 ± 38	124 ± 32	0,262
<b>TGO (U/L)</b>	24 ± 8	23 ± 7	23 ± 9	27 ± 16	0,632
<b>TGP (U/L)</b>	28 ± 14	30 ± 17	25 ± 7	27 ± 9	0,635
<b>TSH (uIU/mL)</b>	2,2 ± 1,0	2,4 ± 0,8	2,3 ± 1,6	2,1 ± 1,3	0,835
<b>T4 livre (uIU/mL)</b>	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,135
<b>Insulina (mUI/mL)</b>	15 ± 7	16 ± 6	17 ± 7	16 ± 7	0,535
<b>Homa-IR</b>	3,7 ± 2,0	4,2 ± 1,9	4,2 ± 1,7	4,0 ± 1,8	0,436
<b>PCR (mg/dL)</b>	0,6 ± 0,4	0,9 ± 1,1	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,4	0,738

\*p<0,05 = estatisticamente significativa. Valores expressos em média e desvio padrão. HDL: *High Density Lipoproteins*; LDL: *Low Density Lipoproteins*; TGO: Transaminase glutâmico oxalacética; TGP: Transaminase glutâmico-pirúvica; TSH: *Thyroid-stimulating hormone*; T4: Tiroxina; PCR: Proteína C Reativa; HOMA-IR: *Index Homeostatic Model Assessment*.

A comparação das variáveis hemodinâmicas, obtidas em repouso de forma não invasiva (batimento-a-batimento), estão apresentadas na tabela 8. Realizamos a análise entre os momentos (pré e pós) de cada grupo e não observamos nenhuma diferença estatística nos valores médios de PAS, PAD, PAM, DC e RPT. Na análise da FC observamos que houve uma interação estatisticamente significativa (p<0,05) do tempo versus grupos, e quando analisamos por meio do teste Post Hoc (Bonferroni) identificamos que no GT houve uma queda de aproximadamente 4 batimentos por minuto (Figura 24) em que o valor de p>0,05.



**Figura 24** - Comparação das médias da FC (pré e pós) do GC e do GT avaliada batimento-a-batimento. Teste *post hoc* de Bonferroni.

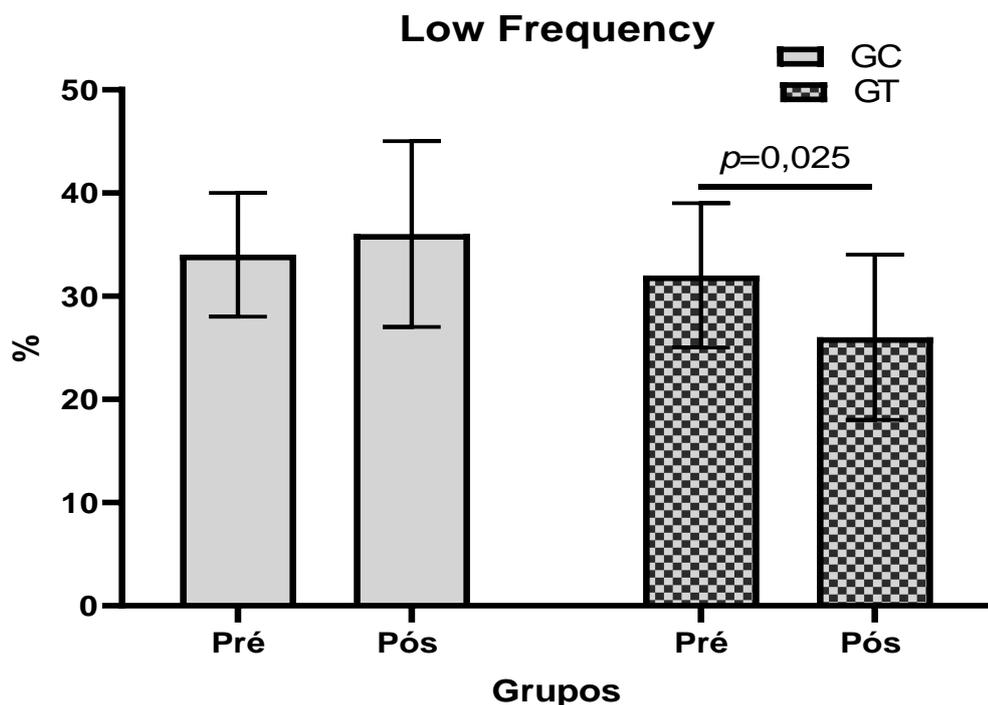
**Tabela 8** – Comparação dos parâmetros hemodinâmicos do GC (basal e após 2 meses) e GT (basal e após 8 sessões de EE).

	GC (n=10)		GT (n=20)		p
	Pré	Pós	Pré	Pós	
<b>PAS (mmHg)</b>	137 ± 23	132 ± 26	138 ± 20	127 ± 14	0,328
<b>PAD (mmHg)</b>	75 ± 9	72 ± 9	78 ± 8	74 ± 7	0,586
<b>PAM (mmHg)</b>	103 ± 17	98 ± 15	102 ± 13	95 ± 10	0,775
<b>FC (bpm)</b>	69 ± 9	73 ± 11	70 ± 8	66 ± 8 <sup>#</sup>	0,002*
<b>DC (L/min)</b>	8 ± 1,9	8,3 ± 1,9	7,5 ± 1,4	7 ± 1,2	0,121
<b>RPT (NU)</b>	0,821 ± 0,2	0,734 ± 0,2	0,843 ± 0,2	0,813 ± 0,2	0,746

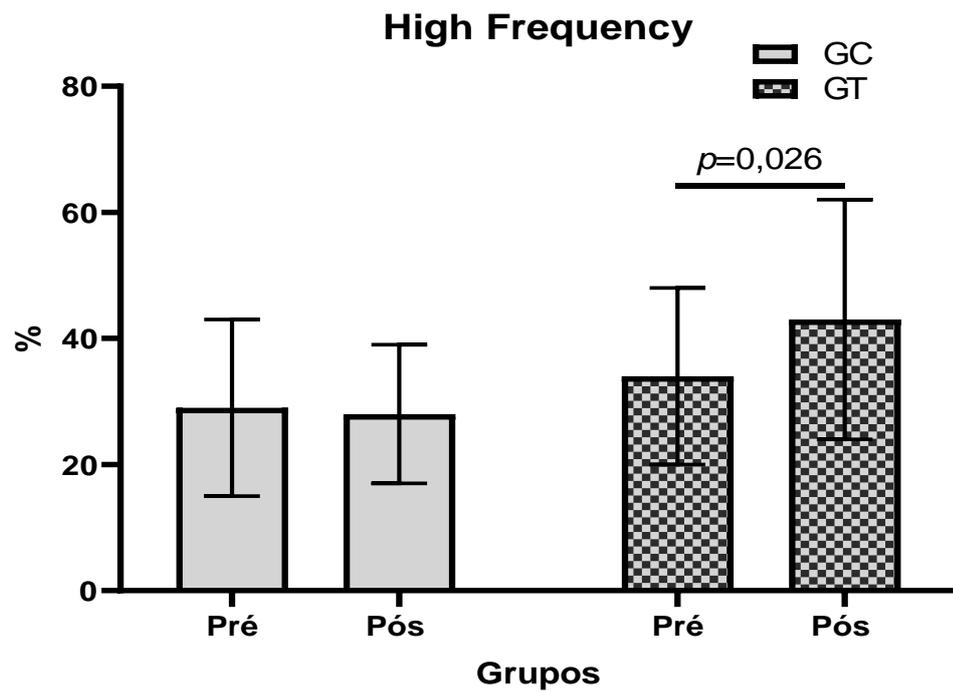
\*p<0,05 = estatisticamente significativa. Valores expressos em média e desvio padrão. PAS: Pressão arterial sistólica; PAD; Pressão arterial diastólica; FC: Frequência cardíaca; PAM: Pressão arterial média; DC: Débito cardíaco; RPT: Resistencia periférica total. **#GT=pré vs pós; p<0,05 (Bonferroni).**

A tabela 9, apresenta as médias dos parâmetros de VFC no domínio do tempo e no domínio da frequência do GC e GT no momento pré e pós de ambos os grupos. Após analisarmos a interação do tempo versus grupos por meio do teste

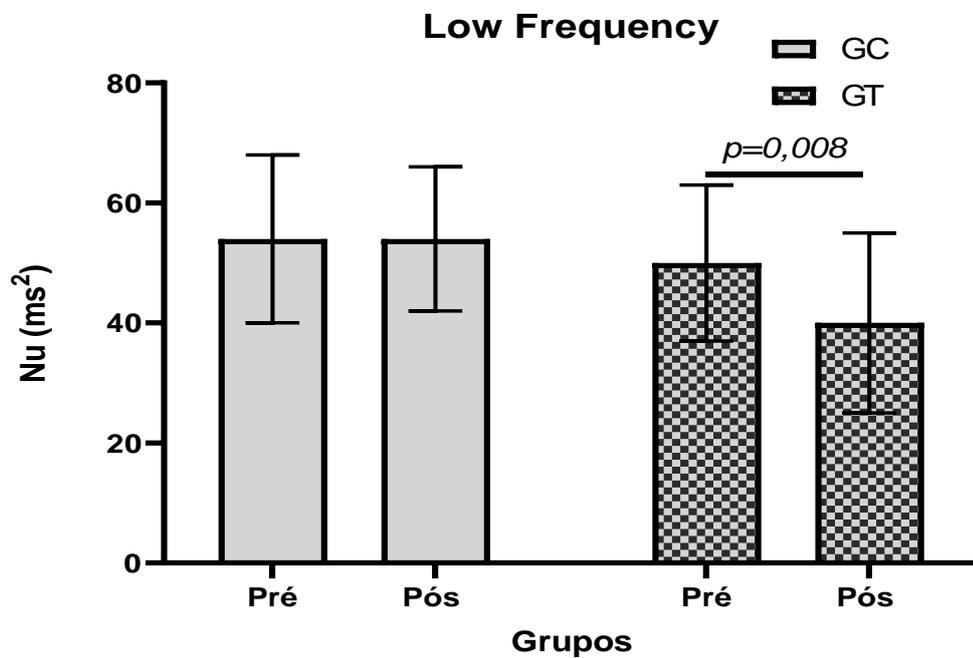
ANOVA de medidas repetidas observamos que as variáveis LF%, HF%, LF(nu), HF(nu) e LF/HF apresentaram interação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Quando aplicamos o teste POST HOC notamos que no GT, as médias das variáveis LF% (Figura 25) e LFnu (simpático) (Figura 26) e razão LF/HF (balanço autonômico) (Figura 27) foram inferiores quando comparadas ao momento basal (pré) e a variável HF% (Figura 28) e HFnu (vago) (Figura 29) tiveram médias superiores quando comparadas às médias do momento basal (pré) ( $p < 0,05$ ). Esses dados sugerem que ocorreu um incremento da modulação vagal para o coração após as 8 sessões de EETNV. Nas demais variáveis no domínio do tempo e no domínio da frequência não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ).



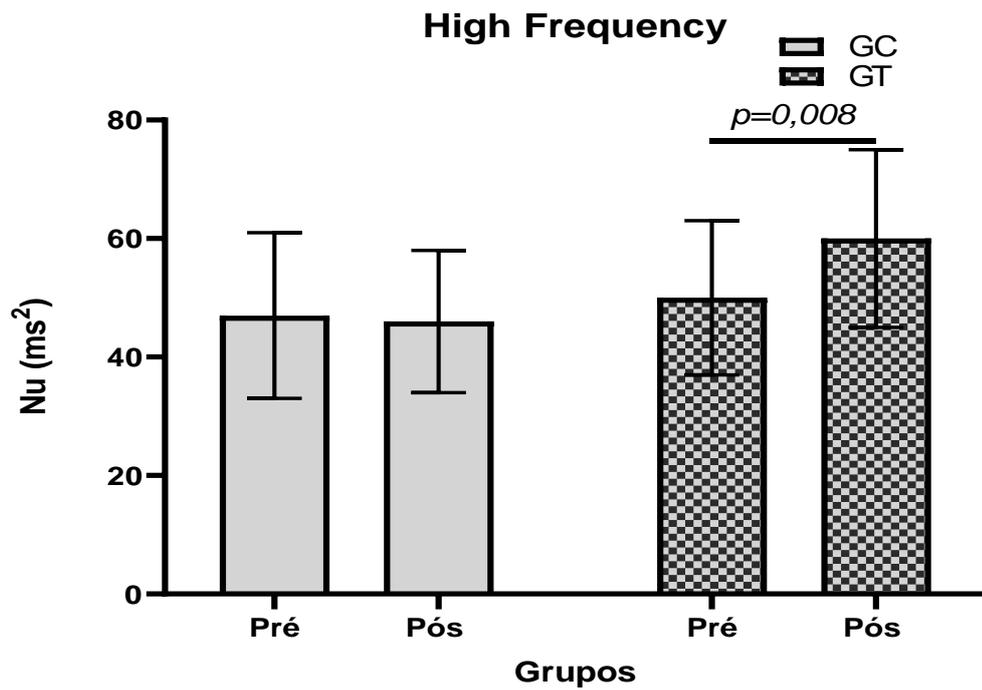
**Figura 25** - Comparação das médias da variável autonômica de LF% ( $ms^2$ )(pré e pós) do GC e do GT. Teste *post hoc* de Bonferroni.



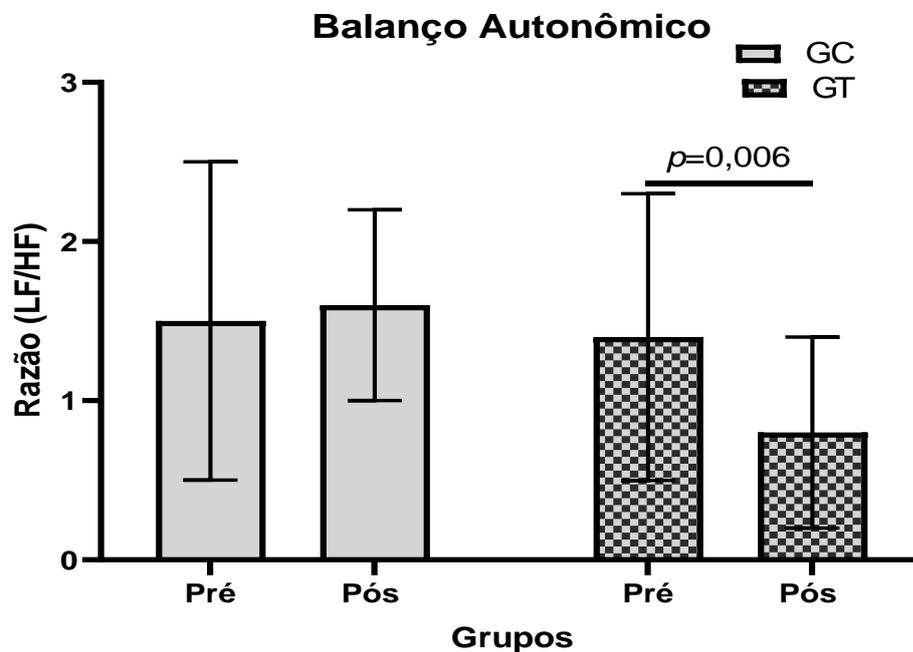
**Figura 26** - Comparação das médias da variável autonômica de HF% ( $ms^2$ )(pré e pós) do GC e do GT. Teste *post hoc* de Bonferroni.



**Figura 27** - Comparação das médias da variável autonômica de LFnu( $ms^2$ )(pré e pós) do GC e do GT. Teste *post hoc* de Bonferroni.



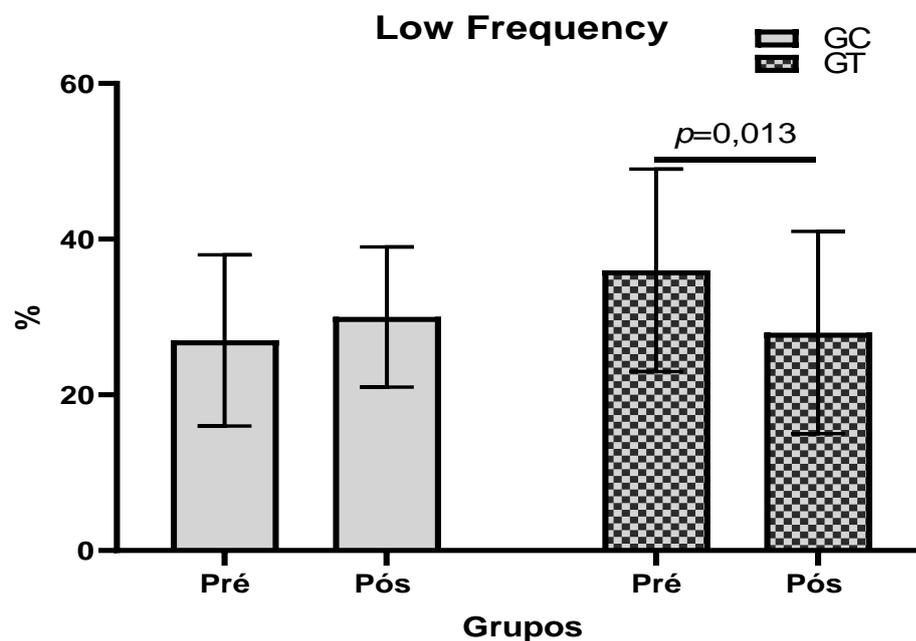
**Figura 28** - Comparação das médias da variável autonômica de HFnu (ms<sup>2</sup>)(pré e pós) do GC e do GT. Teste *post hoc* de Bonferroni.



**Figura 29** - Comparação das médias da razão LF/HF (balanço simpato-vagal) (pré e pós) do GC e do GT. Teste *post hoc* de Bonferroni.

Na análise da Variabilidade da pressão arterial (VPA) (Tabela 9), quando analisamos a interação tempo versus grupos, observamos que o componente da

VPA no domínio da frequência LF% ( $\text{ms}^2$ ), apresentou interação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Quando analisamos as variações das médias entre os momentos (pré e pós) de cada grupo (teste POST HOC) notamos que no GT, após 8 sessões de EETNV (pós) houve uma redução significativa deste componente autonômico (Figura 30) comparado ao momento basal (pré) ( $p < 0,05$ ). Esse achado evidencia que a EETNV reduz a atividade nervosa simpática dos vasos.



**Figura 30** - Comparação das médias da variável autonômica LF% da VPA (pré e pós) do GC e do GT. Teste *post hoc* de Bonferroni.

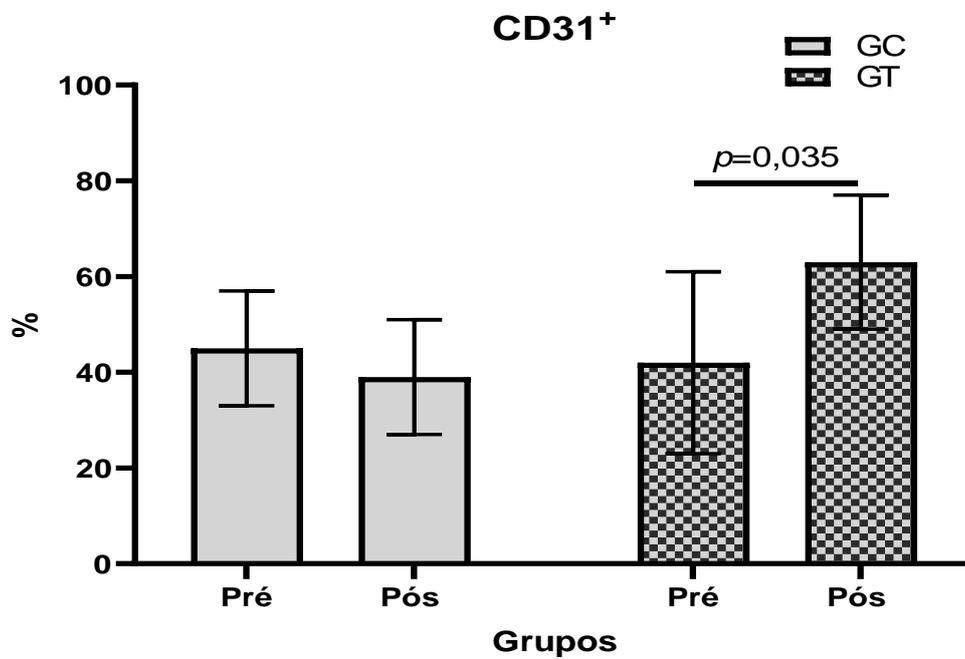
**Tabela 9 – Comparação dos parâmetros autonômicos do GC (basal e após 2 meses) e do GT (basal e após 8 sessões de EE).**

VFC	GC (n=10)		GT (n=20)		p
	Pré	Pós	Pré	Pós	
<b>VARR</b>	2137 ± 1988	2060 ± 2065	2749 ± 2793	3621 ± 4092	0,279
<b>RMSSD (ms)</b>	34 ± 21	33 ± 24	41 ± 28	51 ± 41	0,181
<b>LF abs (ms<sup>2</sup>)</b>	666 ± 662	576 ± 666	772 ± 839	710 ± 846	0,889
<b>HF abs (ms<sup>2</sup>)</b>	595 ± 594	560 ± 677	896 ± 1362	1530 ± 2485	0,154
<b>LF%</b>	34 ± 6	36 ± 9	32 ± 7	26 ± 8 <sup>#</sup>	0,037*
<b>HF%</b>	29 ± 14	28 ± 11	34 ± 14	43 ± 19 <sup>#</sup>	0,046*
<b>LF (nu) (ms<sup>2</sup>)</b>	54 ± 14	54 ± 12	50 ± 13	40 ± 15 <sup>#</sup>	0,040*
<b>HF (nu) (ms<sup>2</sup>)</b>	47 ± 14	46 ± 12	50 ± 13	60 ± 15 <sup>#</sup>	0,040*
<b>LF/HF</b>	1,5 ± 1,0	1,6 ± 0,6	1,4 ± 0,9	0,8 ± 0,6 <sup>#</sup>	0,032*
<b>VPA</b>					
<b>Mean</b>	132 ± 27	127 ± 25	137 ± 18	131 ± 16	0,905
<b>SD</b>	7 ± 2	5 ± 2	5,6 ± 2,1	5,6 ± 1,3	0,118
<b>Variance</b>	51 ± 34	32 ± 24	36 ± 28	33 ± 16	0,204
<b>LF abs (ms<sup>2</sup>)</b>	8 ± 9	9 ± 9	13 ± 11	7 ± 6	0,575
<b>LF %</b>	27 ± 11	30 ± 9	36 ± 13	28 ± 13 <sup>#</sup>	0,037*

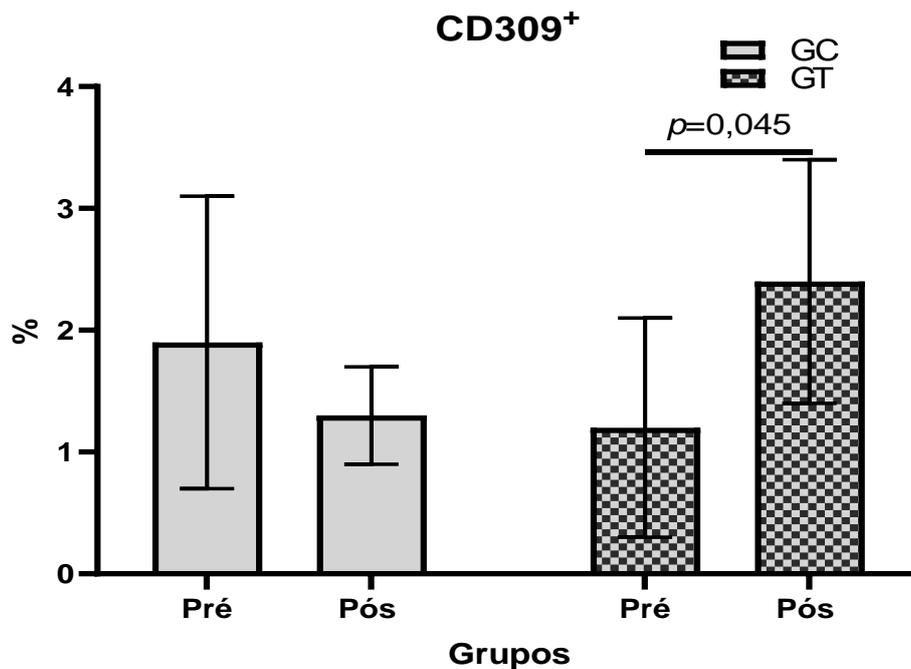
\*p<0,05 = estatisticamente significativa. Valores expressos em média e desvio padrão. VFC: Variabilidade da frequência cardíaca; VARR: Variação intervalos R-R; RMSSD: Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos R-R normais; LF: Low frequency; Abs: absoluto; HF: High frequency; Nu: Normalizado; %: porcentagem; LF/HF: Ratio Low frequency/ High frequency; VPA: Variabilidade da Pressão arterial; Mean: Média; SD: Desvio padrão; Variance: Variância. **#GT=pré vs pós; p<0,05 (Bonferroni).**

A tabela 10 apresenta as médias dos marcadores imunológicos de monócitos circulantes (CD14<sup>+</sup>, monócito clássico e CD16<sup>+</sup>, monócito não clássico), CPEs, CECs e MPEs nos momentos pré e pós de ambos os grupos (GC e GT). Na análise de interação tempo versus grupos observamos que as porcentagens de CD31<sup>+</sup> (CECs), CD309<sup>+</sup>(CPEs), CD14<sup>+</sup> (monócitos clássicos) e CD16<sup>+</sup> (monócitos não clássicos) apresentaram interação estatisticamente significativa (p<0,05). Quando aplicamos o teste POST HOC para identificar onde obtivemos diferenças, notamos que no GT após as 8 sessões de EETNV houve um aumento nas médias das porcentagens de CD31<sup>+</sup>(Figura 31), CD309<sup>+</sup> (Figura 32) e CD14<sup>+</sup> (Figura 33) e redução na média da porcentagem de CD16<sup>+</sup> (Figura 34) quando comparadas ao momento basal (pré) (p<0,05). Isso não foi observado no percentual de MPEs. No

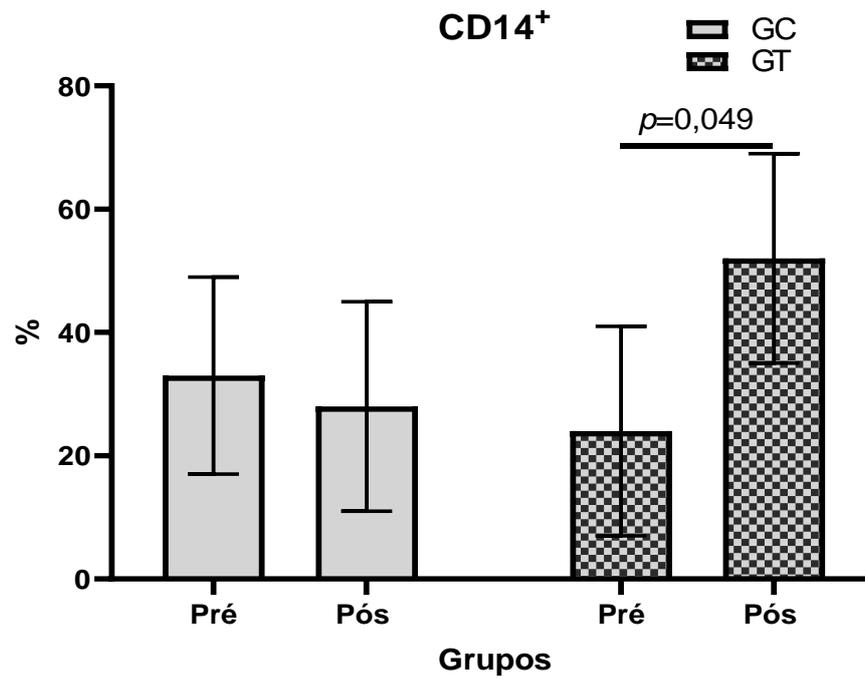
GC não foram observadas variações significativas na interação tempo versus grupos e na comparação entre os momentos pré e pós das mesmas variáveis ( $p>0,05$ ).



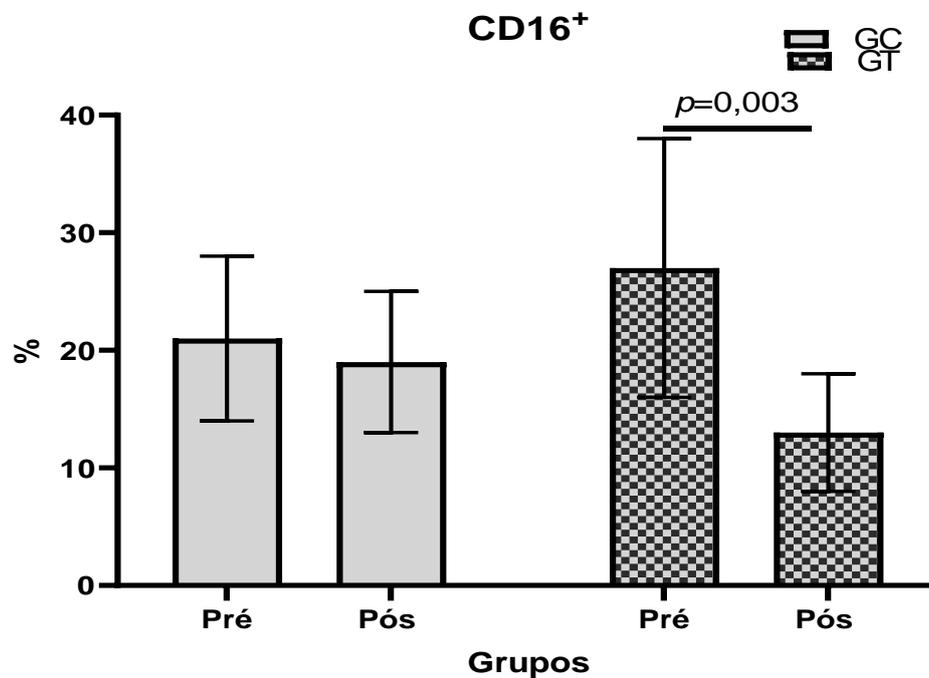
**Figura 31** – Comparação das médias dos percentuais de CD31<sup>+</sup> (Células endoteliais circulantes) entre os momentos pré e pós de ambos os grupos (GC e GT). Teste *post hoc* de Bonferroni.



**Figura 32** – Comparação das médias dos percentuais de CD309<sup>+</sup> (Células progenitoras endoteliais) entre os momentos pré e pós de ambos os grupos (GC e GT). Teste *post hoc* de Bonferroni.



**Figura 33** – Comparação das médias dos percentuais de CD14<sup>+</sup> (Monócitos clássicos) entre os momentos pré e pós de ambos os grupos (GC e GT). Teste *post hoc* de Bonferroni.



**Figura 34** – Comparação das médias dos percentuais de CD16<sup>+</sup> entre os momentos pré e pós de ambos os grupos (GC e GT). Teste *post hoc* de Bonferroni.

**Tabela 10 – Comparação dos marcadores imunológicos, de células endoteliais, micropartículas de origem endotelial do GC (basal e após 2 meses) e GT (basal e após 8 sessões de EE).**

	GC (n=9)		GT (n=15)		p
	Pré	Pós	Pré	Pós	
<b>CD31<sup>+</sup> (CECs) %</b>	45 ± 12	39 ± 12	42 ± 19	63 ± 14 <sup>#</sup>	0,015*
<b>CD31<sup>+</sup>/CD144<sup>+</sup> (MPEs) %</b>	2,9 ± 1,9	3,3 ± 1,3	2,0 ± 0,8	3,1 ± 1,0	0,360
<b>CD309<sup>+</sup> (CPEs) %</b>	1,9 ± 1,2	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,9	2,4 ± 1,0 <sup>#</sup>	0,048*
<b>CD14<sup>+</sup> (Monócitos clássicos) %</b>	33 ± 16	28 ± 17	24 ± 17	52 ± 17 <sup>#</sup>	0,025*
<b>CD16<sup>+</sup> (Monócitos não clássicos) %</b>	21 ± 7	19 ± 6	27 ± 11	13 ± 5 <sup>#</sup>	0,023*

\*p<0,05 = estatisticamente significativa. Valores expressos em média e desvio padrão. GC: grupo controle; GT: grupo tratamento; CECs: células endoteliais circulantes; MPEs: micropartículas endoteliais; CPEs: células endoteliais circulantes. <sup>#</sup>GT=pré vs pós; p<0,05 (Bonferroni).

A tabela 11 apresenta as médias das variáveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL6) e a relação linfócito/neutrófilo do GC e GT. Na análise de interação tempo versus grupos não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa (p>0,05).

**Tabela 11 – Comparação das citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6) e relação linfócito/neutrófilos do GC (basal e após 2 meses) e do GT (basal e após 8 meses de EE)**

	GC (n=10)		GT (n=15)		p
	Pré	Pós	Pré	Pós	
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	0,59 ± 0,40	0,68 ± 0,44	0,57 ± 0,32	0,72 ± 0,85	0,892
<b>IL-6 (pg/mL)</b>	0,31 ± 0,12	0,40 ± 0,53	0,30 ± 0,09	0,31 ± 0,07	0,506
<b>Linfócito/Neutrófilo (mm<sup>3</sup>)</b>	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,212

\*p≤0,05 = estatisticamente significativa. Valores expressos em média e desvio padrão.

## 5. DISCUSSÃO

Os principais resultados do nosso estudo demonstram que a EETNV auricular, aplicada em uma única sessão (estimulação aguda) ou 8 sessões semanais (estimulação crônica), foi capaz de modular parâmetros hemodinâmicos e autonômicos, em especial, reduzir a FC e aumentar a modulação parassimpática de pacientes com SM. De forma significativa, a EETNV auricular crônica promoveu, nessa população, um recrutamento de células imunes periféricas (aumento no percentual de monócitos clássicos, CD14<sup>+</sup> e redução no percentual de monócitos não-clássicos, CD16<sup>+</sup>) e marcadores endoteliais circulantes (aumento no percentual de CECs e CPE) no sangue periférico.

A ideia de se usar a estimulação elétrica do nervo vago (EENV) para o tratamento de doenças surgiu no século XIX, com o neurologista norte-americano James Corning. Esse médico desenvolveu e utilizou um dispositivo semelhante a uma forquilha, conectado a fios elétricos, que conduzia uma corrente elétrica contínua até o pescoço do paciente com diagnóstico de epilepsia, na tentativa de reduzir as crises. A hipótese nesse período era de que as convulsões estariam associadas ao aumento de fluxo cerebral, e a estimulação do vago reduziria esse aumento (94). Anos depois, surgiram vários estudos em modelos animais (105,106,107) investigaram o tema, comprovando essa propriedade antiepilética (144), e demonstrando que a estimulação das aferências vagais poderiam modular a atividade cortical independentemente de alterações cardiovasculares (144). Os primeiros estudos para o tratamento de epilepsia com a estimulação direta (invasiva) do nervo vago foram realizados no final dos anos 80 (145). Estudos prospectivos, randomizados e multicêntricos mostraram que o tratamento é seguro, bem tolerado

e eficaz na redução das crises (146, 147). Os efeitos antidepressivos da ENV foram observados pela primeira vez em pacientes com epilepsia refratária. A melhora do humor também foi observada, mesmo naqueles pacientes que apresentaram pouca ou nenhuma alteração na frequência das crises (148). Assim, o uso da ENV foi ampliado, tendo sido aprovado para o tratamento da depressão resistente, nos EUA (148).

Desde então, pode-se documentar os efeitos cardiovasculares decorrentes da EENV de forma invasiva. Estudos em animais evidenciaram bradicardia (definida com redução maior que 10% da FC basal) variando de 5 a 16% (149). Estudos em humanos evidenciaram que a intensidade de bradicardia é discreta, e é diferente dependendo do lado estimulado: há maior redução da FC em pacientes que receberam estimulação no nervo vago cervical direito ( $-2,22 \pm 0,13$  bpm), e menor redução nos pacientes com estimulação do lado esquerdo ( $-0,60 \pm 0,08$  bpm). Segundo os autores, a ENV cervical direito ou esquerdo pode modular de forma consistente o sistema nervoso autônomo (150).

No presente estudo, utilizamos a estimulação elétrica transauricular do nervo vago esquerdo (EETNV), e comparando com os dados de estudos de estimulação invasiva, evidenciamos uma queda semelhante da FC (2 bpm) tanto após uma única sessão, quanto após 8 semanas de EETNV. Porém, houve efeito mais intenso quando avaliamos os pacientes após 8 sessões semanais: ocorreu queda de 16 mmHg na PAS aferida no consultório e de 11 mmHg na avaliação batimento-a-batimento, e de 4 mmHg na PAD nas duas avaliações. Ainda, a queda da FC foi de 4 bpm em ambas as avaliações. Deve ser ressaltado que nenhum paciente mudou dose de medicamentos nesse período, nem apresentou sintomas de que sugerissem

hipotensão arterial. Assim, 8 semanas de EETNV tem benéfico no aparelho cardiovascular.

Existem poucos estudos na literatura abordando aspectos semelhantes. Um estudo de 2014 envolvendo voluntários saudáveis, investigou os efeitos da EETNV auricular (largura de pulso, 200  $\mu$ s e frequência de estimulação, 30 Hz) na função autonômica cardiovascular, medida na VFC, e microneurografia para registrar a atividade simpática muscular; a conclusão foi que a EETNV auricular pode aumentar a VFC e reduzir a atividade simpática muscular, o que é interessante em condições caracterizadas por atividade nervosa simpática aumentada, como na SM, IC e Hipertensão arterial (127). Eleonora T. et al. (2019), avaliaram as respostas cardíacas e periféricas ao estresse ortostático durante a EET do ramo auricular do NV em indivíduos saudáveis. Testando a hipótese de que a EETNV auricular reduz a FC e altera a responsividade do SNA ao estresse ortostático. Os principais resultados do estudo demonstraram que a EETNV auricular aguda: reduz a FC (3 batimentos por minuto) quando comparada à linha de base; diminui a modulação simpática cardíaca e periférica na condição de repouso e aumenta a responsividade da modulação vasomotora simpática à mudança ortostática nos jovens saudáveis (135). Outro estudo de 2019 avaliou os potenciais benefícios da EETNV auricular diária em uma população de indivíduos com 55 anos ou mais, tendo por justificativa que o envelhecimento está associado à função autonômica diminuída. Os autores demonstraram que a EETNV aplicada por 15 minutos diariamente por duas semanas melhorou que a VFC, sensibilidade barorreflexa, qualidade de vida, humor e sono foram avaliados (186).

Nosso estudo acrescenta dados importantes de impacto na PA e estimulações por períodos mais prolongados em pacientes com SM.

Um importante aspecto, recentemente descrito, é o impacto da ENV cervical nos níveis metabolismo da glicose. A estimulação seletiva do nervo vago cervical aferente (obtida pela estimulação da extremidade craniana do nervo vago cervical seccionado) causou um aumento acentuado e sustentado dos níveis de glicose, parcialmente mediado pela insulina. Em contraste, a estimulação eferente do nervo vago (distal a sessão) estimulou a secreção pancreática de glucagon, o que indica que a ENV eferente seletiva pode potencialmente ser eficaz no tratamento do Diabetes Tipo 2 (151). De fato, estudos em diferentes modelos animais sugerem que a estimulação crônica de outros ramos vagais (nervos vagais subdiafragmáticos) pode ter efeitos benéficos no metabolismo da glicose (152,153).

No nosso estudo não observamos nenhuma alteração nos valores médios de glicose, da HbA1c glicosilada e insulina no grupo de pacientes tratados por 8 semanas com EETNV auricular comparados ao momento basal. A estimulação transauricular tem um efeito comprovado por ressonância magnética em área de controle vagal centrais, afetando de forma significativa as fibras aferentes vagais, porém, não se pode descartar uma ação também nas fibras eferentes vagais (153). Considerando esses fatos, poderíamos esperar uma piora nos níveis de glicose e insulina dos pacientes por nós avaliados. Entretanto, o efeito neutro da EETNV no nosso estudo pode refletir que o número das estimulações não foram frequentes o suficiente para causar alterações nesses parâmetros (ocorreram uma vez por semana, durante 8 semanas). Essa hipótese é corroborada pela observação de que pacientes epiléticos que recebem estimulação elétrica vagal (EEV) os níveis de glicose no sangue variam de acordo com o tempo de estimulação programado no aparelho (*on*) em relação com o de não estimulação (*off*), ou seja: os valores de glicose aumentaram em pacientes com períodos longos *on* (mais que 25 seg) e

curtos períodos *off*, enquanto a glicose no sangue ficou inalterada nos pacientes estimulados com períodos curtos *on* e longos *off*. Futuros estudos são necessários para definir se uso mais frequente de EETNV teria uma ação efetiva no metabolismo da glicose (180).

Gil K et.al investigaram o efeito da ENV subdiafragmáticos com baixa frequência nas concentrações séricas de lipídios, comportamento alimentar e apetite em ratos alimentados com dieta hiper lipídica. Os níveis de peptídeos reguladores do apetite também foram avaliados. A ENV crônica (42 dias) diminuiu significativamente a ingestão de alimentos e ganho de peso corporal; reduziu as concentrações totais de colesterol no plasma e os níveis de triglicerídeos. A concentrações séricas de nesfatina-1 foram elevadas, os níveis de leptina diminuíram e os níveis de grelina permaneceram inalterados após a ENV. O estudo demonstra que a ENV crônica exerce efeitos anorexígenos, diminuindo a concentração sanguínea de lipídios (154).

No presente estudo observamos que as médias dos triglicerídeos do grupo tratamento foram significativamente menores após 8 sessões de EETNV auricular quando comparadas ao momento basal.

A estimulação do nervo vago implantado (VNS) para obesidade foi recentemente aprovada pelo FDA. No entanto, sua eficácia e mecanismos de ação permanecem incertos. Uma revisão recente (154) sintetiza os efeitos clínicos e pré-clínicos da ENV no comportamento alimentar e no balanço energético. A ENV cervical clínica para tratar a epilepsia ou depressão produziu efeitos mistos na perda de peso como efeito colateral, em análises de estudos retrospectivos não controlados. Por outro lado, os estudos pré-clínicos (de estimulação NV cervical e subdiafragmática) relatam principalmente diminuição da ingestão de alimentos e

diminuição do ganho ou perda de peso. Estudos clínicos mais recentes relatam perda de peso em resposta ao SNV dependendo da frequência de estimulação aplicada no vago subdiafragmático, embora ocorra um grande efeito placebo. No geral, os parâmetros de estimulação carecem de exploração, otimização e justificativas baseadas em resultados terapêuticos específicos. O nervo vago transduz, transmite e integra importantes informações neurais (aférentes e eférentes), humorais, energéticas e inflamatórias entre o intestino e demais vísceras e o cérebro. Assim, uma melhor compreensão da biofísica, eletrofisiologia e fisiopatologia tem o potencial de avançar na ENV como uma terapia eficaz para uma ampla gama de doenças. (181).

Recentemente a ENV também foi apontada como uma terapia potencial para uma ampla gama de condições, incluindo insuficiência cardíaca (121;114), inflamação crônica (155, 156), dor crônica (157, 158), e obesidade (159,160).

A insuficiência cardíaca (IC) é acompanhada por um desequilíbrio autonômico caracterizado pelo aumento da atividade simpática e pela redução da atividade vagal. Além disso níveis plasmáticos elevados de noradrenalina também foram demonstrados na IC. Valores aumentados ocorrem de forma precoce, até mesmo em casos de pacientes com disfunção assintomática do VE, tendo correlação direta com a gravidade da disfunção do VE e com o prognóstico (115). Ainda, analisando a disfunção na sensibilidade do baroreflexo e aumentos na FC pode-se evidenciar que esses parâmetros são marcadores de maior taxa de mortalidade após o infarto do miocárdio (115). Nesse contexto, estudos experimentais demonstraram efeitos positivos da estimulação crônica do NV na reversão das alterações autonômicas, no remodelamento cardíaco e na sobrevivência a longo prazo em modelos animais de ICC (114) (115) (161). Em 2009 foram relatados os primeiros estudos de IC em humanos

com a nova tecnologia de ENV (162). Anos depois, De Ferrari et.al (2011) publicaram os resultados iniciais de um estudo multicêntrico, em pacientes com ICC sintomática: num período curto de observação (1 ano) ocorreram eventos adversos graves e não graves, em significativa proporção de pacientes; houve melhoras significativas na FEVE, redução no volume da câmara do VE e melhorias na classe funcional dos pacientes (120). O estudo ANTHEM-HF, publicado mais recentemente, investigou se há diferenças no implante do estimulador no nervo vago cervical esquerdo ou no nervo vago cervical direito. A estimulação em ambos os lados foi semelhante quanto a presença de efeitos adversos, ao restabelecimento do equilíbrio autonômico, a recuperação mesmo que discreta da FEVE (de 32,4% para 37,2%), e a melhora da capacidade funcional dos pacientes (121).

Com relação aos possíveis mecanismos subjacentes aos efeitos da ENV na IC evidências atuais são propostas: maior liberação de acetilcolina contribuindo para a melhora do controle autonômico, inibição da atividade do SRAA, e modulação da inflamação pela estimulação da via anti-inflamatória colinérgica (115).

No nosso trabalho, os pacientes eram adultos jovens, sem queixas de IC, mas mesmo assim, a estimulação aguda e após 8 sessões semanais foram associadas a aumento da modulação vagal e da sensibilidade baroreflexa quando comparamos os valores com a condição basal dos pacientes. Ou seja, ocorreu uma significativa melhora em marcadores de morbi-mortalidade cardiovascular. De fato, a condição de SM tem como característica fisiopatológica o aumento da atividade simpática, e menor sensibilidade baroreflexa (155). Distúrbios na modulação autonômica são ainda cogitados como mecanismos desencadeadores do estado inflamatório sub-clínico e das demais características clínicas, como aumento dos valores de PA, distúrbios no metabolismo da glicose e dos lípidos, presentes nos portadores de SM

(155). Demonstramos nos pacientes que receberam ETTNV redução significativa dos valores de PAS e PAD, tanto na aferição da PA de consultório quanto na avaliação contínua batimento-a-batimento, com apenas 8 semanas de acompanhamento. Assim a EETNV demonstrou-se eficaz para reduzir a atividade simpática aumentar a modulação do vago e a sensibilidade baroreflexa, com redução na PA de forma segura, sem apresentar efeitos adversos (quer sejam graves ou discretos).

De fato, está bem estabelecido que reflexos neurais regulam a inflamação, e que a ENV elétrica é capaz de reduzir de forma significativa a inflamação em modelos de doença inflamatória. Inúmeros estudos usaram a neuroestimulação para o tratamento para doenças caracterizadas por inflamação excessiva incluindo choque séptico, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal (DII) e doença cardiovascular (DCV) (155,163). A EENV é muito eficaz na recuperação da modulação simpato-vagal, na redução de citocinas inflamatórias e na mortalidade nesses modelos (159, 164). Recentemente, comparou-se os efeitos anti-inflamatórios e as reações adversas da ENV cervical comparada a ENV abdominal em modelo experimental de inflamação intestinal. A ENV abdominal reduziu de forma vários marcadores de inflamação, e apresentou menos eventos adversos cardíacos e respiratórios, sendo sugerida como potencial opção de tratamento para distúrbios inflamatórios, como a doença de Crohn (156).

No presente estudo, quantificamos os níveis séricos de TNF- $\alpha$  , mas, devido a problemas técnicos os ensaios não tiveram a sensibilidade esperada. Estudos posteriores deverão avaliar sistematicamente a relação entre inflamação sistêmica e ETTNV em diferentes cenários clínicos.

Alguns estudos têm destacado o papel do nervo vago no desenvolvimento da obesidade e como a ENV ou fármacos podem ser direcionados como tratamento terapêutico da obesidade. O nervo vago que inerva o intestino desempenha um papel importante no controle do metabolismo. Ele comunica informações periféricas sobre o volume e o tipo de nutrientes entre o intestino e o cérebro. Dependendo do estado nutricional, os neurônios aferentes vagais expressam dois fenótipos neuroquímicos diferentes que podem inibir ou estimular a ingestão de alimentos. A ingestão crônica de dietas ricas em calorias reduz a sensibilidade dos neurônios aferentes vagais a sinais periféricos. Essa interrupção da sinalização aferente vagal é suficiente para gerar hiperfagia e obesidade (158).

Além disso, existem evidências de que os neurônios vagais aferentes desenvolvem resistência à leptina no início do desenvolvimento da obesidade (165, 166), e que a resistência à leptina nos neurônios aferentes vagais coincide com o início da hiperfagia (166). Juntos, esses dados apoiam a ideia de que a interrupção da sensibilização vagal dos sinais periféricos se desenvolve na obesidade e que pode ser responsável pelo consumo excessivo de alimentos (167).

Trabalho de Val-Laillet e cols. mostrou que a estimulação bilateral do nervo vago em mini porcos obesos resultou em diminuição do ganho de peso, menor ingestão de alimentos e menor desejo por alimentos doces. Em humanos, Burneo e cols. (2002), identificaram que pacientes que tinham implantado o dispositivo de ENV para controlar a epilepsia, 62% apresentaram uma perda de peso significativa (168). Bodenlos et.al, descreveram que a ENV cervical esquerdo resultou em um desejo reduzido por comida em adultos deprimidos (169). Estudo realizado por Ikramuddin e cols. mostrou o efeito da ENV como adjuvante no tratamento de pacientes com obesidade mórbida. No estudo, a perda de peso foi maior nos

pacientes que realizaram a cirurgia bariátrica e foram também submetidos à ENV, quando comparados aos pacientes que também realizaram a bariátrica e não foram submetidos a ENV (171).

As implicações desses estudos são convincentes, mas o mecanismo pelo qual a ENV influencia a perda de peso ainda é desconhecido. Algumas hipóteses incluem: alterações no metabolismo; diminuições nos estoques de gordura ou alterações na sinalização da saciedade. Outro potencial mecanismo proposto para o efeito da ENV no peso corporal é a absorção intestinal reduzida de calorias. Essa hipótese tem como base as evidências de que a modulação do tônus vagal pode alterar os peptídeos que interferem na motilidade e absorção intestinais. Esses resultados preliminares incentivam pesquisas mais extensas sobre a ENV, o impacto da modulação do controle autonômico e da sinalização hipotalâmica e suas interações com o sistema nervoso entérico (159).

Assim, pacientes com SM compõem uma população onde o reestabelecimento da modulação vagal torna-se altamente desejável, em especial, por esta condição ser o pilar para as demais alterações observadas nesta síndrome.

No presente estudo também avaliamos o peso (kg) antes e após 8 sessões semanais de EETNV auricular, e não observamos nenhuma redução significativa no grupo tratado. No entanto, os pacientes relatavam que sentiam menos desejo por comida e/ou estavam comendo em menor quantidade (dados não apresentados). Outros estudos devem ser feitos com maior frequência de estimulações (ex., diárias) e maior período de tratamento para se determinar o efeito da EETNV no peso de pacientes.

Há relação direta entre obesidade central e inflamação. Há infiltração de células imunes no tecido adiposo branco abdominal, secundária à ativação da inflamação iniciada pela morte de adipócitos e medicada pela produção de citocinas locais (101,172,173). Tanto os adipócitos disfuncionais quanto as células imunes infiltradas, em especial os macrófagos, mantêm um ciclo vicioso de inflamação, pois aumentam a liberação de citocinas pró-inflamatórias (173). Assim, são descritas em pacientes com SM alterações como: maiores concentrações de macrófagos com perfil pro-inflamatório (M1) no tecido gorduroso; maiores concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias e leptina; diminuição dos níveis de óxido nítrico endotelial (eNO) e adiponectina; e alteração nos peptídeos hipotalâmicos e nos hormônios gastrointestinais que regulam a saciedade, a fome e a ingestão de alimentos (incretinas e colecistocinina) e a liberação de mediadores inflamatórios (por exemplo, citocinas e quimiocinas) (173,174,175).

Como foi demonstrado que a ENV reduz a inflamação em diferentes cenários, propõe-se que a ENV também possa ter um benefício significativo no tratamento da SM por meio da modulação de células imunes (macrófagos) e (28).

O reflexo colinérgico inflamatório pode ser estimulado pela Galantamina, fármaco colinérgico de ação central, inibidor da acetilcolinesterase (183). A Galantamina alivia a inflamação e os distúrbios metabólicos em um modelo de obesidade e SM induzido por dieta hiperlipídica (97). Com base nos achados pré-clínicos, a eficácia da Galantamina no alívio da inflamação e resistência à insulina, juntamente com outros índices metabólicos em pessoas com SM, o nosso grupo foi o primeiro recentemente a realizar um estudo randomizado, controlado por placebo, duplo-cego. O tratamento relativamente curto (por 12 semanas) com Galantamina em doses clinicamente aprovadas para a doença de Alzheimer, reduziu

significativamente os níveis plasmáticos de TNF e leptina e aumentou os níveis de IL-10 e adiponectina. O tratamento com Galantamina versus placebo também modulou a regulação neural autonômica, conforme determinada pela análise da variabilidade da frequência cardíaca, em direção à predominância parassimpática (vagal) (98). Além disso, também descrevemos, em modelo de ratos infartados, que a estimulação colinérgica com a piridostigmina (anticolinesterásico de ação periférica) modula a mobilização de células imunes para o local isquêmico (macrófagos e linfócitos no coração) e também na circulação periférica (linfócitos citotóxicos e reguladores): aumenta a quantidade de células imunes com perfil anti-inflamatório tanto no coração quanto na circulação.

Quanto ao recrutamento de células imunológicas, especificamente monócitos, um estudo em animais em modelo de camundongos com endotoxemia, demonstraram que a estimulação do nervo vago reduziu a proporção de células dendríticas além de diminuir a expressão de células da linhagem monocitária, particularmente monócitos M1, sabidamente secretores de TNF, IL-6 e IL-12 e reduzidas quantidades de IL-10 (190). Muito do nosso conhecimento recente sobre a geração de heterogeneidade de mononucleares durante processos inflamatórios, incluindo a aterogênese, deriva de estudos em camundongos geneticamente modificados. As observações em humanos são escassas e começaram a apoiar a relevância dos conceitos que emergiram do estudo dos ateromas experimentais para os seres humanos (181).

No nosso estudo, em humanos com SM, observamos um aumento do percentual de monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) e diminuição do percentual de monócitos não clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>), após 8 sessões de EETNV auricular.

Cada uma destas subpopulações apresenta diferentes funções imunológicas. As subpopulações de monócitos não clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> - MNC) produzem grandes quantidades de interleucina IL-1 $\beta$  em condições basais ou em resposta à estimulação de lipopolissacarídeo (LPS), o que levou a uma postulação de que o MNC exerce as funções inflamatórias mais importantes na circulação (191,192). Assim, a produção de IL-1  $\beta$  é considerada um marcador da atividade inflamatória em monócitos não clássicos humanos. Por outro lado, os monócitos clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> - MC) participam na adesão endotelial e na migração celular, expressando preferencialmente receptores de quimiocinas sem mostrar papéis inflamatórios importantes, sendo considerados como tendo um perfil anti-inflamatório (192,193,194). Assim, demonstramos que a EETNV melhorou o perfil dos monócitos circulantes, caracterizado pelo aumento da relação monócitos clássicos/não-clássicos (MC/MNC).

Dados recentes mostram que alterações dinâmicas nas subpopulações de monócitos podem ser influenciadas não apenas por agentes imunológicos, mas também por diferentes condições fisiopatológicas, como a obesidade (191,195). De fato, Devevre e cols. mostraram que um aumento no índice de massa corporal (IMC) é capaz de diminuir a porcentagem de MC e aumentar o número de MNC, ao comparar controles de peso normal com pacientes obesos mórbidos (191). Também foi demonstrado uma relação direta entre o ganho de peso corporal e aumento do percentual de MNC, e revelou que esta subpopulação de células imunes parece ser a principal fonte de IL-1  $\beta$  em indivíduos obesos. Estudos adicionais relataram consistentemente um aumento da porcentagem de MNC em indivíduos com IMC > 30 kg/m<sup>2</sup> em comparação com indivíduos com peso normal, o que trouxe à tona a associação entre subpopulações de monócitos e obesidade (197).

No entanto, é um fato bem conhecido que a inflamação mediada pela obesidade está fortemente ligada ao desenvolvimento das demais anormalidades metabólicas que caracterizam a SM (198). Em um estudo publicado recentemente, monócitos humanos foram cultivados em concentrações baixas ou elevadas de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) e estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). Observaram que baixa concentração de HDL-colesterol reduziu a percentagem MC, enquanto aumentou a porcentagem de MNC e secreção IL-1  $\beta$  nos monócitos tratados com LPS. O efeito do LPS foi abolido quando os monócitos foram cultivados em concentrações elevadas de HDL-colesterol. Comparando com os resultados *in vitro*, valores séricos IL-1 $\beta$  aumentaram significativamente nos pacientes com SM com níveis baixos de HDL-colesterol, em comparação com pacientes com SM sem redução de HDL-colesterol. Os dados demonstram que o HDL-colesterol modula diretamente subpopulações de monócitos na SM (81).

No nosso estudo, podemos inferir que a alteração na relação de MC/MNC no sangue periférico ocorreu de forma independente das concentrações de HDL-colesterol. Focando a fisiopatologia das Doenças Cardiovasculares é clássico o descrito Contínuo Cardiovascular, de 1991 de autoria de Dzau and Braunwald, em que se aponta para um relação entre vasos e coração (182). Em 2016, esse conceito foi revisitado, sendo incluídos novos elementos: sistema nervoso autônomo, sistema hematopoiético (ossos) e sistema imune (baço, macrófagos, células dendríticas e linfócitos) (181).

Fica claro nesse conceito que o sistema nervoso autônomo participa de forma significativa no processo, e resta determinarmos se a estimulação colinérgica é capaz de modular alguns elementos nesse processo. O aumento da atividade

simpática atua nos órgãos imunes e na medula óssea estimulando a circulação de células com perfis pró-inflamatórios. Nossa abordagem foi verificar se o aumento da atividade colinérgica poderia se contrapor a esse perfil.

Além da quantificação de monócitos, também analisamos a mobilização de células que marcam a função vascular, as células progenitoras endoteliais (CPEs), isoladas da medula óssea, vasos umbilicais e sangue periférico de adultos, com capacidade de circular, proliferar e diferenciar-se em células endoteliais maduras. As CPEs circulam no sangue e parecem residir preferencialmente nos locais de lesão vascular ou tecidual, contribuindo significativamente para a reendotelização e a neoangiogênese (30,31). Schmidt-Lucke e cols.. mostraram que os níveis de CPEs foram preditores independentes de eventos cardiovasculares e progressão da aterosclerose em uma população mista de indivíduos saudáveis e pacientes cardiovasculares (187). Em um estudo maior, Werner et al. (2005), relataram que a contagem de CPEs previa eventos cardiovasculares e morte cardiovascular durante um período de 12 meses em 519 pacientes com doença arterial coronariana (DAC) (188). Assim, parece importante que o número e a atividade funcional das CPEs sejam investigados. Há relação direta entre CPE e função endotelial periférica, indicando que a presença de CPE pode ser um mecanismo que o organismo está utilizando para recuperar o endotélio disfuncional.

No que diz respeito a SM, existem poucos dados sobre o número e funcionalidade das CPEs (189). Encontramos dois estudos que analisaram diretamente o número de CPEs em pacientes com SM (sem outras comorbidades, como diabetes ou doenças cardiovasculares) e controles pareados. No estudo de Westerweel et al., foi mostrado que os níveis circulantes de CPEs foram reduzidos em quase 40% em homens obesos com SM em comparação com homens não

obesos (189). Embora tenha sido um pequeno estudo que incluiu 19 pacientes com SM, é importante enfatizar que, neste estudo, eles excluíram pacientes com DCV clínica ou diabetes.

No nosso estudo, observamos que após 8 sessões de EETNV auricular os pacientes com SM do grupo tratado apresentaram um aumento na média do percentual das CPEs comparadas ao momento basal. No grupo controle, houve uma redução na média do percentual após dois meses comparada ao momento basal, mas não sendo estatisticamente significativa. Desta forma, podemos inferir que a EETNV auricular promoveu um recrutamento de CPEs da medula óssea para a circulação sanguínea. O que sugere que a melhora na modulação simpato-vagal pode ter alterado a liberação dessas células pelo sistema hematopoiético, favorecendo os mecanismos reparadores do endotélio e sistema vascular.

O impacto funcional na mobilização dessas células deverá ser avaliado em futuros estudos, que foquem função endotelial e complacência vascular e pacientes com SM.

## **6. CONCLUSÃO**

Podemos concluir que a aplicação da EETNV auricular aguda foi capaz de modular parâmetros hemodinâmicos e autonômicos, e a aplicação semanal por curto período de tempo acentuou as mesmas alterações hemodinâmicas e autonômicas observadas, e mobilizou monócitos com perfil anti-inflamatório e células progenitoras endoteliais, indicando um efeito benéfico para o contínuo cardiovascular, em pacientes com SM.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - REAVEN, G. M. et al. Role of Insulin Resistance in Human Disease. **Diabetes**, [s.l.], v. 37, n. 12, p. 1595-1607, 1 dez. 1988. American Diabetes Association.
- 2 - GRUNDY et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. **An American Heart Association/national Heart**,, Palestina, v. 112, p. 285-290, nov. 2005.
- 3 - ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P.; SHAW, J. Metabolic syndrome-a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. **Diabetic Medicine**, v. 23, n. 5, p. 469–480, maio 2006.
- 4 - ALBERTI, G. Introduction to the metabolic syndrome. **European Heart Journal Supplements**, v. 7, n. suppl\_D, p. D3–D5, 1 jun. 2005.
- 5 - ALBERTI, K. G. M. M., et al. «Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity». **Circulation**, vol. 120, n. 16, Outubro de 2009, pp. 1640–45.
- 6 - NISHIMURA, S; MANABE, I; NAGAI, R. Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome. **Discovmed**, [s.l.], v. 41, n. 8, p.55-60, set. 2009.
- 7 - CORNIER, M.-A. et al. The Metabolic Syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 7, p. 777–822, 1 dez. 2008.
- 8 - GRUNDY, S. M. Metabolic Syndrome Pandemic. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 4, p. 629–636, abr. 2008.
- 9 - HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, dez. 2006.
- 10 - SUTHERLAND, J. P.; MCKINLEY, B.; ECKEL, R. H. The Metabolic Syndrome and Inflammation. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 2, n. 2, p. 82–104, jun. 2004.
- 11 - OLEFSKY, J. M.; GLASS, C. K. Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. **Annual Review of Physiology**, v. 72, n. 1, p. 219–246, 17 mar. 2010.
- 12 - BONOMINI, F.; RODELLA, L. F.; REZZANI, R. Metabolic Syndrome, Aging and Involvement of Oxidative Stress. **Aging and Disease**, v. 6, n. 2, p. 109, 2015.
- 13 - RUDERMAN, N. B., & SHULMAN, G. I. (2015). Metabolic Syndrome. In **Endocrinology: Adult and Pediatric** (Seventh Ed, pp. 752–769.e7).
- 14 - KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, jun. 2004.
- 15 - S. WANG, S. (2014). Metabolic syndrome. **Retrieved March 29, 2015.**

- 16** - FERRI, F. F. (2015). Metabolic Syndrome. In **Ferris's Clinical Advisor 2016** (1st ed., pp. 793- Ferris, F. F. (2015). Metabolic Syndrome. In **Ferris's Clinical Advisor 2016** (1st ed., pp. 793– 794).
- 17** - POPKIN, B. M.; ADAIR, L. S.; NG, S. W. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 1, p. 3–21, jan. 2012.
- 18** - BRAY, G. A. et al. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation: Position Paper. **Obesity Reviews**, v. 18, n. 7, p. 715–723, jul. 2017.
- 19** - GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 415–445, 23 abr. 2011.
- 20** - HEBER, D. An integrative view of obesity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 1, p. 280S-283S, 1 jan. 2010.
- 21** - DESPRÉS, J.-P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity, and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 881–887, dez. 2006.
- 22** - RODRIGUEZ, C-A.; et al. Obesity: a risk for Alzheimer's disease? I. Common molecular mechanisms. **An Real Acad Farm** Vol. 82, Nº 3, pp. 303-316; 2016.
- 23** - ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **The Lancet**, v. 365, n. 9468, p. 1415–1428, abr. 2005.
- 24** - KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, jun. 2004.
- 25** - TSIGOS, C. et al. Circulating tumor necrosis factor alpha concentrations are higher in abdominal versus peripheral obesity. **Metabolism**, v. 48, n. 10, p. 1332–1335, out. 1999.
- 26** - WISSE, B. E. The Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 11, p. 2792–2800, 1 nov. 2004.
- 27** - FAIN, J. N. et al. Comparison of the Release of Adipokines by Adipose Tissue, Adipose Tissue Matrix, and Adipocytes from Visceral and Subcutaneous Abdominal Adipose Tissues of Obese Humans. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2273–2282, maio 2004.
- 28** - DAS, U. N. Vagus nerve stimulation as a strategy to prevent and manage metabolic syndrome. **Medical Hypotheses**, v. 76, n. 3, p. 429–433, mar. 2011.
- 29** - BAUTISTA, L. E. et al. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF- $\alpha$ ) and essential hypertension. **Journal of Human Hypertension**, v. 19, n. 2, p. 149–154, fev. 2005.
- 30** - VOLP et al. Capacidade dos Biomarcadores Inflamatórios em Predizer a Síndrome Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 52/3, 2008.

- 31 - DEBORAH H.M.B.; et al. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab**.vol.53, n.5, pp.646-656,2009.
- 32 - FRANCISCO, G.; HERNÁNDEZ, C.; SIMÓ, R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 369, n. 1, p. 1–16, jul. 2006.
- 33 - ESPOSITO, K. et al. Association of Low Interleukin-10 Levels with the Metabolic Syndrome in Obese Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 3, p. 1055–1058, mar. 2003.
- 34 - CHOI, K. M. et al. Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 75, n. 2, p. 235–240, fev. 2007.
- 35 - KREIER, F. et al. Inervação parassimpática seletiva da gordura subcutânea e intra-abdominal - implicações funcionais. **Journal of Clinical Investigation** , v. 110, n. 9, p. 1243–1250, 1º de novembro 2002.
- 36 - UNO, K. Neuronal Pathway from the Liver Modulates Energy Expenditure and Systemic Insulin Sensitivity. **Science**, v. 312, n. 5780, p. 1656–1659, 16 jun. 2006.
- 37 - MATSUZAWA, Y. et al. Adiponectin and Metabolic Syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 1, p. 29–33, jan. 2004.
- 38 - MAEDA, N. et al. PPAR Ligands Increase Expression and Plasma Concentrations of Adiponectin, an Adipose-Derived Protein. **Diabetes**, v. 50, n. 9, p. 2094–2099, 1 set. 2001.
- 39 - LINDSAY, R. S. et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. **The Lancet**, v. 360, n. 9326, p. 57–58, jul. 2002.
- 40 - OLOKOBA, A. B.; OBATERU, O. A.; OLOKOBA, L. B. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. **Oman Medical Journal**, v. 27, n. 4, p. 269–273, 16 jul. 2012.
- 41 - HAN, M. S. et al. JNK Expression by Macrophages Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance and Inflammation. **Science**, v. 339, n. 6116, p. 218–222, 11 jan. 2013.
- 42 - DEFRONZO, R. A.; TRIPATHY, D. Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. suppl\_2, p. S157–S163, 1 nov. 2009.
- 43 - AVOGARO, A.; DE KREUTZENBERG, S. V. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. **Clinica Chimica Acta**, v. 360, n. 1–2, p. 9–26, out. 2005.
- 44 - CASTRO, G. et al. Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the amygdala of rats. **FEBS Open Bio**, v. 3, n. 1, p. 443–449, 1 jan. 2013.
- 45 - LIN, H. V. et al. Diabetes in Mice With Selective Impairment of Insulin Action in Glut4-Expressing Tissues. **Diabetes**, v. 60, n. 3, p. 700–709, mar. 2011.
- 46 - MAYER, C. M.; BELSHAM, D. D. Central insulin signaling is attenuated by long-term insulin exposure via insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation,

proteasomal degradation, and lysosomal insulin receptor degradation. **Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 75–84, jan. 2010.

**47** - BARMA, P. et al. Lipid induced overexpression of NF-kappaB in skeletal muscle cells is linked to insulin resistance. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1792, n. 3, p. 190–200, mar. 2009.

**48** - ZHANG, X. et al. Selective inactivation of c-Jun NH2-terminal kinase in adipose tissue protects against diet-induced obesity and improves insulin sensitivity in both liver and skeletal muscle in mice. **Diabetes**, v. 60, n. 2, p. 486–495, fev. 2011.

**49** - JIANG, S.; MESSINA, J. L. Role of inhibitory kB kinase and c-Jun NH2-terminal kinase in the development of hepatic insulin resistance in critical illness diabetes. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 301, n. 3, p. G454–G463, set. 2011.

**50** - STANLEY, T. L. et al. TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 1, p. E146-150, jan. 2011.

**51** - STAGAKIS, I. et al. Anti-tumor necrosis factor therapy improves insulin resistance, beta cell function and insulin signaling in active rheumatoid arthritis patients with high insulin resistance. **Arthritis Research & Therapy**, v. 14, n. 3, p. R141, 12 jun. 2012.

**52** - FERNÁNDEZ-VELEDO, S. et al. c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor-alpha induces insulin resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: reversal by liver X receptor agonists. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 9, p. 3583–3593, set. 2009.

**53** - AUSTIN, R. L. et al. siRNA-mediated reduction of inhibitor of nuclear factor-kappaB kinase prevents tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in human skeletal muscle. **Diabetes**, v. 57, n. 8, p. 2066–2073, ago. 2008.

**54** - TEIXEIRA, B. C. et al. Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 13, n. 2, p. 108–115, jun. 2014.

**55** - FUSTER, V. et al. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). **The New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 5, p. 310–318, 30 jan. 1992.

**56** - STORCH, A. S. et al. Methods of Endothelial Function Assessment: Description and Applications. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 3, p. 262–273, jun. 2017.

**57** - VERMA, S. et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 109, n. 17, p. 2058–2067, 4 maio 2004.

**58** - ASAHARA, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 275, n. 5302, p. 964–967, 14 fev. 1997.

- 59 - TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853–859, dez. 2002.
- 60 - MINHAJAT, R.; NILASARI, D.; BAKRI, S. The Role of Endothelial Progenitor Cell in Cardiovascular Disease Risk Factors. **Acta Medica Indonesiana**, v. 47, n. 4, p. 340–347, out. 2015.
- 61 - LAMBIASE, P. D. et al. Circulating humoral factors and endothelial progenitor cells in patients with differing coronary collateral support. **Circulation**, v. 109, n. 24, p. 2986–2992, 22 jun. 2004.
- 62 - SÖLDER, E. et al. Isolation and characterization of CD133+CD34+VEGFR-2+CD45- fetal endothelial cells from human term placenta. **Microvascular Research**, v. 84, n. 1, p. 65–73, jul. 2012.
- 63 - WERNER, N. et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 10, p. 999–1007, 8 set. 2005.
- 64 - FRANÇA, C.N.; et al. Micropartículas e células progenitoras: novos marcadores da disfunção endotelial. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**.;23(4):33-39, 2013.
- 65 - LANUTI, P. et al. Endothelial progenitor cells, defined by the simultaneous surface expression of VEGFR2 and CD133, are not detectable in healthy peripheral and cord blood. **Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 89, n. 3, p. 259–270, mar. 2016.
- 66 - FAURE, V. et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. **Journal of thrombosis and haemostasis: JTH**, v. 4, n. 3, p. 566–573, mar. 2006.
- 67 - HRISTOV, M. et al. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. **Blood**, v. 104, n. 9, p. 2761–2766, 1 nov. 2004.
- 68 - DIGNAT-GEORGE, F.; BOULANGER, C. M. The many faces of endothelial microparticles. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 1, p. 27–33, jan. 2011.
- 69 - MARTÍNEZ, M. C. et al. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 3, p. H1004-1009, mar. 2005.
- 70 - LANUTI, P. et al. Endothelial progenitor cells, defined by the simultaneous surface expression of VEGFR2 and CD133, are not detectable in healthy peripheral and cord blood. **Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 89, n. 3, p. 259–270, mar. 2016.
- 71 - DIGNAT-GEORGE, F. et al. Circulating endothelial cells: realities and promises in vascular disorders. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 33, n. 5–6, p. 495–499, dez. 2003.

**72** - SPRANGERS, S.; DE VRIES, T. J.; EVERTS, V. Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.

**73** - JONG, E. DE et al. The phenotype and function of preterm infant monocytes: implications for susceptibility to infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 102, n. 3, p. 645–656, 2017.

**74** - YONA, S. et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 79–91, 24 jan. 2013.

**75** - VAROL, C. et al. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 1, p. 171–180, 22 jan. 2007.

**76** - QU, C. et al. Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 19, p. 1–5, fev. 2014.

**77** - RIVOLLIER, A. M. C. et al. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 1, p. 139–155, 2012.

**78** - VAN DER LAAN, A. M. et al. Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. **European Heart Journal**, v. 35, n. 6, p. 376–385, fev. 2014.

**79** - YANG, J. et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker Research**, v. 2, n. 1, p. 1, 7 jan. 2014.

**80** - CROS, J. et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. **Immunity**, v. 33, n. 3, p. 375–386, 24 set. 2010.

**81** - GRÜN, J. L. et al. High-Density Lipoprotein Reduction Differentially Modulates to Classical and Nonclassical Monocyte Subpopulations in Metabolic Syndrome Patients and in LPS-Stimulated Primary Human Monocytes In Vitro. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 1–12, 2018.

**82** - ANDERSSON, U.; TRACEY, K. J. Neural reflexes in inflammation and immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 6, p. 1057–1068, 4 jun. 2012.

**83** - PONGRATZ, G.; STRAUB, R. H. The sympathetic nervous response in inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 6, p. 504, 12 dez. 2014.

**84** - TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853–859, dez. 2002.

**85** - PAVLOV, V. A. et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. **Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 9, n. 5–8, p. 125–134, ago. 2003.

- 86** - BOROVIKOVA, L. V. et al. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 85, n. 1–3, p. 141–147, 20 dez. 2000a.
- 87** - BOROVIKOVA, L. V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458–462, 25 maio 2000b.
- 88** - BERNIK, T. R. et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 6, p. 781–788, 18 mar. 2002.
- 89** - PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 19, n. 6, p. 493–499, nov. 2005.
- 90** - TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853–859, dez. 2002.
- 91** - NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846–852, 19 dez. 2002.
- 92** - WANG, H. et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 384–388, 23 jan. 2003.
- 93** - PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. 6, p. 1037–1040, 1 dez. 2006.
- 94** - LANSKA, D. J. J.L. Corning and vagal nerve stimulation for seizures in the 1880s. **Neurology**, v. 58, n. 3, p. 452–459, 12 fev. 2002.
- 95** - VAN WESTERLOO, D. J. The vagal immune reflex: a blessing from above. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 160, n. 5–6, p. 112–117, mar. 2010.
- 96** - AVLOV, V. A. et al. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 1, p. 41–45, jan. 2009.
- 97** - SATAPATHY, S. K. et al. Galantamine Alleviates Inflammation and Other Obesity-Associated Complications in High-Fat Diet-Fed Mice. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 7–8, p. 599–606, jul. 2011.
- 98** - CONSOLIM-COLOMBO, F. M. et al. Galantamine alleviates inflammation and insulin resistance in patients with metabolic syndrome in a randomized trial. **JCI Insight**, v. 2, n. 14, p. e93340, 20 jul. 2017.
- 99** - THAYER, J. F.; YAMAMOTO, S. S.; BROSSCHOT, J. F. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. **International Journal of Cardiology**, v. 141, n. 2, p. 122–131, maio 2010.
- 100** - SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169–2180, maio 2007.
- 101** - PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The vagus nerve and the inflammatory reflex—linking immunity and metabolism. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 12, p. 743–754, dez. 2012.

- 102** - CLANCY, J. A.; DEUCHARS, S. A.; DEUCHARS, J. The wonders of the Wanderer: The wonders of the wanderer. **Experimental Physiology**, v. 98, n. 1, p. 38–45, jan. 2013.
- 103** - SHAFIQUE, S.; DALRING, M. C. Vagus Nerve Stimulation Therapy for Treatment of Drug-Resistant Epilepsy and Depression. **Perspectives in Vascular Surgery and Endovascular Therapy**, v. 18, n. 4, p. 323–327, 1 dez. 2006.
- 104** - YUAN, H.; SILBERSTEIN, S. D. Vagus Nerve and Vagus Nerve Stimulation, a Comprehensive Review: Part II. Headache: **The Journal of Head and Face Pain**, v. 56, n. 2, p. 259–266, fev. 2016.
- 105** - YUAN, H.; SILBERSTEIN, S. D. Vagus Nerve and Vagus Nerve Stimulation, a Comprehensive Review: Part I: Headache. **Headache: The Journal of Head and Face Pain**, v. 56, n. 1, p. 71–78, jan. 2016.
- 106** - BAILEY, P.; BREMER, F. A sensory cortical representation of the vagus nerve: with a note on the effects of low blood pressure on the cortical electrogram. **Journal of Neurophysiology**, v. 1, n. 5, p. 405-412, 1938.
- 107** - ZANCHETTI, A.; WANG, S. C.; MORUZZI, G. The effect of vagal afferent stimulation on the EEG pattern of the cat. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 4, n. 3, p. 357–361, ago. 1952.
- 108** - BEN-MENACHEM, E. et al. Vagus Nerve Stimulation for Treatment of Partial Seizures: 1. A Controlled Study of Effect on Seizures. **Epilepsia**, v. 35, n. 3, p. 616–626, maio 1994.
- 109** - TERRY, R. S.; TARVER, W. B.; ZABARA, J. The implantable neurocybernetic prosthesis system. **Pacing and Clinical Electrophysiology**, v. 14, n. 1, p. 86-93, 1991.
- 110** - GEORGE, M. S.; ASTON-JONES, G. Noninvasive techniques for probing neurocircuitry and treating illness: vagus nerve stimulation (VNS), transcranial magnetic stimulation (TMS) and transcranial direct current stimulation (tDCS). **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 301-16, Jan 2010.
- 111** - MORRIS, G. L. et al. Evidence-based guideline update: Vagus nerve stimulation for the treatment of epilepsy Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, v. 81, n. 16, p. 1453-1459, 2013.
- 112** - AIHUA, L. et al. A controlled trial of transcutaneous vagus nerve stimulation for the treatment of pharmacoresistant epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 39, p. 105-10, Oct 2014.
- 113** - VANOLI, E. et al. Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. **Circ Res**, v. 68, n. 5, p. 1471-81, May 1991.
- 114** - LI, M. et al. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. **Circulation**, v. 109, n. 1, p. 120-4, Jan 6 2004.

**115** - ZHANG, Y. et al. Chronic vagus nerve stimulation improves autonomic control and attenuates systemic inflammation and heart failure progression in a canine high-rate pacing model. **Circ Heart Fail**, v. 2, n. 6, p. 692-9, Nov 2009.

**116** - SABBAH, H. N. et al. Vagus nerve stimulation in experimental heart failure. **Heart Fail Rev**, v. 16, n. 2, p. 171-8, Mar 2011.

**117** - HAMANN, J. J. et al. Vagus nerve stimulation improves left ventricular function in a canine model of chronic heart failure. **Eur J Heart Fail**, v. 15, n. 12, p. 1319-26, Dec 2013.

**118** - KUSUNOSE, K. et al. Impact of Vagal Nerve Stimulation on Left Atrial Structure and Function in a Canine High-Rate Pacing Model. *Circulation*. **Heart failure**, v. 7, n. 2, p. 320-326, 01/07 2014.

**119** - SCHWARTZ, P. J. et al. Long term vagal stimulation in patients with advanced heart failure: first experience in man. **Eur J Heart Fail**, v. 10, n. 9, p. 884-91, Sep 2008.

**120** - ZANNAD, F. et al. Chronic vagal stimulation for the treatment of low ejection fraction heart failure: results of the NEural Cardiac TherApy foR Heart Failure (NECTAR-HF) randomized controlled trial. **European Heart Journal**, v. 36, n. 7, p. 425–433, 14 fev. 2015.

**121** - PREMCHAND, R. K. et al. Autonomic regulation therapy via left or right cervical vagus nerve stimulation in patients with chronic heart failure: results of the ANTHEM-HF trial. **J Card Fail**, v. 20, n. 11, p. 808-16, Nov 2014.

**122** - KRAUS, T. et al. CNS BOLD fMRI effects of sham-controlled transcutaneous electrical nerve stimulation in the left outer auditory canal - a pilot study. **Brain Stimul**, v. 6, n. 5, p. 798-804, Sep 2013.

**123** - VENTUREYRA, E. C. G. Transcutaneous vagus nerve stimulation for partial onset seizure therapy. **Child's Nervous System**, v. 16, n. 2, p. 101–102, 9 fev. 2000.

**124** - HOWLAND, R. H. New developments with vagus nerve stimulation therapy. **Journal of psychosocial nursing and mental health services**, v. 52, n. 3, p. 11-14, 2014.

**125** - CAPONE, F. et al. The effect of transcutaneous vagus nerve stimulation on cortical excitability. **Journal of Neural Transmission**, v. 122, n. 5, p. 679–685, maio 2015.

**126** - VAN LEUSDEN, J. W. R.; SELLARO, R.; COLZATO, L. S. Transcutaneous Vagal Nerve Stimulation (tVNS): a new neuromodulation tool in healthy humans? **Frontiers in Psychology**, v. 6, 10 fev. 2015.

**127** - CLANCY, J. A. et al. Non-invasive vagus nerve stimulation in healthy humans reduces sympathetic nerve activity. **Brain Stimul**, v. 7, n. 6, p. 871-7, Nov-Dec 2014.

**128** - YU, L. et al. Low-level transcutaneous electrical stimulation of the auricular branch of the vagus nerve: a noninvasive approach to treat the initial phase of atrial fibrillation. **Heart Rhythm**, v. 10, n. 3, p. 428-35, Mar 2013.

- 129** - WANG, Z. et al. Unilateral low-level transcutaneous electrical vagus nerve stimulation: A novel noninvasive treatment for myocardial infarction. **Int J Cardiol**, v. 190, p. 9-10, 2015.
- 130** - ZAMOTRINSKY, A. et al. Effects of electrostimulation of the vagus afferent endings in patients with coronary artery disease. **Coron Artery Dis**, v. 8, n. 8-9, p. 551-7, Aug-Sep 1997.
- 131** - ZAMOTRINSKY, A. V.; KONDRATIEV, B.; DE JONG, J. W. Vagal neurostimulation in patients with coronary artery disease. **Autonomic Neuroscience**, v. 88, n. 1–2, p. 109–116, abr. 2001.
- 132** - POPOV, S. V. et al. Drug-free correction of the tone of the autonomic nervous system in the management of cardiac arrhythmia in coronary artery disease. **International Journal of Biomedicine**, v. 3, p. 74-77, 2013.
- 133** - STAVRAKIS, S. et al. Low-level transcutaneous electrical vagus nerve stimulation suppresses atrial fibrillation. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 65, n. 9, p. 867-875, 2015.
- 134** - 151 – YAKUNINA, N.; KIM, S. S.; NAM, E.-C. Optimization of Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation Using Functional MRI: TRANSCUTANEOUS VNS OPTIMIZATION USING fMRI. **Neuromodulation: Technology at the Neural Interface**, v. 20, n. 3, p. 290–300, abr. 2017.
- 135** - TOBALDINI, E. et al. Cardiac and Peripheral Autonomic Responses to Orthostatic Stress During Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation in Healthy Subjects. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 4, p. 496, 11 abr. 2019.
- 136** - HOWLAND, R. H. Vagus Nerve Stimulation. **Curr Behav Neurosci Rep**, v. 1, n. 2, p. 64-73, Jun 2014.
- 137** - DIETRICH, S. et al. A novel transcutaneous vagus nerve stimulation leads to brainstem and cerebral activations measured by functional MRI. **Biomed Tech (Berl)**, v. 53, n. 3, p. 104-11, Jun 2008.
- 138** - NEMEROFF, C. B. et al. VNS therapy in treatment-resistant depression: clinical evidence and putative neurobiological mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 7, p. 1345-55, Jul 2006.
- 139** - KREUZER, P. M. et al. Transcutaneous vagus nerve stimulation: retrospective assessment of cardiac safety in a pilot study. **Front Psychiatry**, v. 3, p. 70, 2012.
- 140** - CHEN, M. et al. The right side or left side of noninvasive transcutaneous vagus nerve stimulation: Based on conventional wisdom or scientific evidence? **Int J Cardiol**, v. 187, p. 44-5, May 6 2015.
- 141** - WESSELING K.H, WIT B, WEBER J.A.P, SMITH N.T. A simple device for the continuous measurement of cardiac output. **Adv. Cardiovasc. Phys.**; v. 5, p.16-52, 1983.
- 142** - WELCH, P. The use of fast Fourier transform for the estimation of power spectra: A method based on time averaging over short, modified periodograms. **IEEE Transactions on Audio and Electroacoustics**, v. 15, n. 2, p. 70–73, jun. 1967.

- 143** - ELLRICH, J. Transcutaneous Auricular Vagus Nerve Stimulation: **Journal of Clinical Neurophysiology**, v. 36, n. 6, p. 437–442, nov. 2019.
- 144** - SCHWEITZER, A.; WRIGHT, S. The action of eserine and related compounds and of acetylcholine on the central nervous system. **The Journal of Physiology**, v. 89, n. 2, p. 165–197, 5 mar. 1937.
- 145** - TERRY, R.; TARVER, W. B.; ZABARA, J. An Implantable Neurocybernetic Prosthesis System. **Epilepsia**, v. 31, n. s2, p. S33–S37, jun. 1990.
- 146** - DEGIORGIO, C. M. et al. Prospective Long-Term Study of Vagus Nerve Stimulation for the Treatment of Refractory Seizures. **Epilepsia**, v. 41, n. 9, p. 1195–1200, set. 2000.
- 147** - MORRIS, G. L.; MUELLER, W. M. Long-term treatment with vagus nerve stimulation in patients with refractory epilepsy. **Neurology**, v. 53, n. 8, p. 1731–1731, 1 nov. 1999.
- 148** - HARDEN, C. L. et al. A Pilot Study of Mood in Epilepsy Patients Treated with Vagus Nerve Stimulation. **Epilepsy & Behavior**, v. 1, n. 2, p. 93–99, abr. 2000.
- 149** - YOO, P. B. et al. Modulation of heart rate by temporally patterned vagus nerve stimulation in the anesthetized dog. **Physiological Reports**, v. 4, n. 2, p. e12689, jan. 2016.
- 150** - NEARING, B. D. et al. Acute Autonomic Engagement Assessed by Heart Rate Dynamics During Vagus Nerve Stimulation in Patients With Heart Failure in the ANTHEM-HF Trial. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, v. 27, n. 9, p. 1072–1077, 2016.
- 151** - YOO, P. B. et al. Modulation of heart rate by temporally patterned vagus nerve stimulation in the anesthetized dog. **Physiological Reports**, v. 4, n. 2, p. e12689, jan. 2016.
- 152** - MALBERT, C.-H. et al. Obesity-Associated Alterations in Glucose Metabolism Are Reversed by Chronic Bilateral Stimulation of the Abdominal Vagus Nerve. **Diabetes**, v. 66, n. 4, p. 848–857, abr. 2017.
- 153** - LI, S. et al. Therapeutic Effect of Vagus Nerve Stimulation on Depressive-Like Behavior, Hyperglycemia and Insulin Receptor Expression in Zucker Fatty Rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112066, 3 nov. 2014.
- 154** - GIL, K. et al. Chronic vagus nerve stimulation reduces body fat, blood cholesterol and triglyceride levels in rats fed a high-fat diet. **Folia Medica Cracoviensia**, v. 52, n. 3–4, p. 79–96, 2012.
- 155** - CARAVACA, A. S. et al. An Effective Method for Acute Vagus Nerve Stimulation in Experimental Inflammation. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 877, 27 ago. 2019.
- 156** - PAYNE, S. C. et al. Anti-inflammatory Effects of Abdominal Vagus Nerve Stimulation on Experimental Intestinal Inflammation. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 418, 8 maio 2019.

- 157** - LANGE, G. et al. Safety and Efficacy of Vagus Nerve Stimulation in Fibromyalgia: A Phase I/II Proof of Concept Trial. **Pain Medicine**, v. 12, n. 9, p. 1406–1413, set. 2011.
- 158** - BARBANTI, P. et al. Non-invasive vagus nerve stimulation for acute treatment of high-frequency and chronic migraine: an open-label study. **The Journal of Headache and Pain**, v. 16, n. 1, p. 61, dez. 2015.
- 159** - JOHNSON, R. L.; WILSON, C. G. A review of vagus nerve stimulation as a therapeutic intervention. **Journal of Inflammation Research**, v. 11, p. 203–213, 2018.
- 160** - ROSLIN, M.; KURIAN, M. The Use of Electrical Stimulation of the Vagus Nerve to Treat Morbid Obesity. **Epilepsy & Behavior**, v. 2, n. 3, p. S11–S16, jun. 2001.
- 161** - UEMURA, K. et al. Early Short-Term Vagal Nerve Stimulation Attenuates Cardiac Remodeling After Reperfused Myocardial Infarction. **Journal of Cardiac Failure**, v. 16, n. 8, p. 689–699, ago. 2010.
- 162** - SCHWARTZ, P. J.; DE FERRARI, G. M. Vagal stimulation for heart failure: Background and first in-man study. **Heart Rhythm**, v. 6, n. 11, p. S76–S81, nov. 2009.
- 163** - NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871–882, mar. 2010.
- 164** - KESSLER, W. et al. The Role of the Vagus Nerve: Modulation of the Inflammatory Reaction in Murine Polymicrobial Sepsis. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. 1–9, 2012.
- 165** - DE LARTIGUE, G. et al. Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in vagal afferent neurons. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 1, p. E187–E195, jul. 2011.
- 166** - DE LARTIGUE, G. et al. Leptin Resistance in Vagal Afferent Neurons Inhibits Cholecystokinin Signaling and Satiety in Diet Induced Obese Rats. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e32967, 7 mar. 2012.
- 167** - DE LARTIGUE, G. Role of the vagus nerve in the development and treatment of diet-induced obesity: The role of the vagus nerve in obesity. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 20, p. 5791–5815, 15 out. 2016.
- 168** - BURNEO, J. G. et al. Weight loss associated with vagus nerve stimulation. **Neurology**, v. 59, n. 3, p. 463–464, 13 ago. 2002.
- 169** - BODENLOS, J. S. et al. Vagus nerve stimulation acutely alters food craving in adults with depression. **Appetite**, v. 48, n. 2, p. 145–153, mar. 2007.
- 170** - VAL-LAILLET, D. et al. Chronic vagus nerve stimulation decreased weight gain, food consumption and sweet craving in adult obese minipigs. **Appetite**, v. 55, n. 2, p. 245–252, out. 2010.
- 171** - IKRAMUDDIN, S. et al. Effect of Reversible Intermittent Intra-abdominal Vagal Nerve Blockade on Morbid Obesity: The ReCharge Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 312, n. 9, p. 915, 3 set. 2014.

- 172** - ENGIN, A. The Pathogenesis of Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. In: ENGIN, A. B.; ENGIN, A. (Eds.). . **Obesity and Lipotoxicity**. Cham: Springer International Publishing, 2017. v. 960p. 221–245.
- 173** - CHANG, E. H.; CHAVAN, S. S.; PAVLOV, V. A. Cholinergic Control of Inflammation, Metabolic Dysfunction, and Cognitive Impairment in Obesity-Associated Disorders: Mechanisms and Novel Therapeutic Opportunities. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 263, 5 abr. 2019.
- 174** - CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826–837, dez. 2010.
- 175** - OLOFSSON, P. S.; METZ, C. N.; PAVLOV, V. A. The Neuroimmune Communicatome in Inflammation. In: CAVAILLON, J.-M.; SINGER, M. (Eds.). . **Inflammation - From Molecular and Cellular Mechanisms to the Clinic**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017. p. 1485–1516.
- 176** - SERHAN, C. N.; LEVY, B. D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 7, p. 2657–2669, 2 jul. 2018.
- 177** - CHAVAN, S. S.; TRACEY, K. J. Essential Neuroscience in Immunology. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 9, p. 3389–3397, 1 maio 2017.
- 178** - ZANOS, T. P. et al. Identification of cytokine-specific sensory neural signals by decoding murine vagus nerve activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 21, p. E4843–E4852, 22 maio 2018.
- 179** - ROSAS-BALLINA, M. et al. Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 98–101, 7 out. 2011.
- 180** - STAUSS, H. M. et al. Effect of vagus nerve stimulation on blood glucose concentration in epilepsy patients – Importance of stimulation parameters. **Physiological Reports**, v. 7, n. 14, jul. 2019.
- 181** - LIBBY, P.; NAHRENDORF, M.; SWIRSKI, F. K. Leukocytes Link Local and Systemic Inflammation in Ischemic Cardiovascular Disease: An Expanded “Cardiovascular Continuum”. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 67, n. 9, p. 1091–1103, 8 mar. 2016.
- 182** - DZAU, V.; BRAUNWALD, E. Resolved and unresolved issues in the prevention and treatment of coronary artery disease: A workshop consensus statement. **American Heart Journal**, v. 121, n. 4, p. 1244–1263, abr. 1991.
- 183** - PHAM, G. S.; WANG, L. A.; MATHIS, K. W. Pharmacological potentiation of the efferent vagus nerve attenuates blood pressure and renal injury in a murine model of systemic lupus erythematosus. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 315, n. 6, p. R1261–R1271, 1 dez. 2018.

- 184** - SEICOL, B. J. et al. Neuromodulation of metabolic functions: from pharmaceuticals to bioelectronics to biocircuits. **Journal of Biological Engineering**, v. 13, n. 1, p. 67, dez. 2019.
- 185** - BEN-MENACHEM, E. Vagus-nerve stimulation for the treatment of epilepsy. **The Lancet Neurology**, v. 1, n. 8, p. 477–482, dez. 2002.
- 186** - BRETHERTON, B. et al. Effects of transcutaneous vagus nerve stimulation in individuals aged 55 years or above: potential benefits of daily stimulation. **Aging**, v. 11, n. 14, p. 4836–4857, 30 jul. 2019.
- 187** - SCHMIDT-LUCKE, C. et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. **Circulation**, v. 111, n. 22, p. 2981–2987, 7 jun. 2005.
- 188** - WERNER, N. et al. Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcomes. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 10, p. 999–1007, 8 set. 2005.
- 189** - WESTERWEEL, P. E. et al. Haematopoietic and endothelial progenitor cells are deficient in quiescent systemic lupus erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 66, n. 7, p. 865–870, 1 jul. 2007.
- 190** - VALDES-FERRER, S. et al. Vagus Nerve Stimulation Produces an Anti-Inflammatory Monocyte Phenotype in Blood. (138.25). **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 1 Supplement, p. 138.25-138.25, 1 abr. 2010.
- 191** - DEVÈVRE, E. F. et al. Profiling of the Three Circulating Monocyte Subpopulations in Human Obesity. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 8, p. 3917–3923, 15 abr. 2015.
- 192** - MUKHERJEE, R. et al. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 13886, nov. 2015.
- 193** - ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74–e80, 21 out. 2010.
- 194** - SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 762–774, nov. 2011.
- 195** - GHANIM, H. et al. Circulating Mononuclear Cells in the Obese Are in a Proinflammatory State. **Circulation**, v. 110, n. 12, p. 1564–1571, 21 set. 2004.
- 196** - FRESNO, M.; ALVAREZ, R.; CUESTA, N. Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 117, n. 3, p. 151–164, jul. 2011.
- 197** - DE MATOS, M. A. et al. The effect of insulin resistance and exercise on the percentage of CD16 + monocyte subset in obese individuals: Monocyte Frequency in Insulin-Resistant Obese Individuals. **Cell Biochemistry and Function**, v. 34, n. 4, p. 209–216, jun. 2016.
- 198** - HAN, T. S.; LEAN, M. E. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **JRSM Cardiovascular Disease**, v. 5, p. 204800401663337, 21 mar. 2016.