



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**KEYLA YUKARI KATAYAMA**

**Efeito do anticolinesterásico Galantamina em parâmetros metabólicos, inflamatórios e de envelhecimento, em portadores de Síndrome Metabólica.**

**SÃO PAULO, SP**

**2017**

**KEYLA YUKARI KATAYAMA**

**Efeito do anticolinesterásico Galantamina em parâmetros metabólicos, inflamatórios e de envelhecimento, em portadores de Síndrome Metabólica.**

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho para obtenção do título de Mestre em Medicina.

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

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosa Maria Affonso Moysés

**SÃO PAULO, SP**

**2017**

Dedico este trabalho aos meus pais que incansavelmente trabalharam para que eu pudesse ter as melhores condições na minha formação profissional e pessoal.



São Paulo, 22 de fevereiro de 2017.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): **KEYLA YUKARI KATAYAMA**

Título da Dissertação: **EFEITO DO ANTICOLINESTERÁSICO GALANTAMINA EM PARÂMETROS METABÓLICOS, INFLAMATÓRIOS E DE ENVELHECIMENTO EM PORTADORES DE SÍNDROME METABÓLICA**

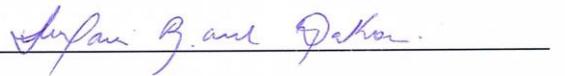
Presidente: PROFA. DRA. FERNANDA MARCIANO CONSOLIM COLOMBO



Membro: PROFA. DRA. LISETE COMPAGNO MICHELINI



Membro: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por todas as bênçãos que recebo diariamente. Agradeço a força que adquiro por meio da fé e por todos os passos que vou trilhando nessa jornada da vida.

Agradeço à minha família, mãe Elisa M. Y. Katayama, pai Eduardo M. Katayama e irmão Alan M. Katayama que sempre lutaram para me ver feliz e para que eu pudesse realizar meus sonhos. Às minhas tias Julia K. Iwamoto, Rosa Katayama e Reico Yamaguti, por todo carinho e cuidado de mãe. Agradeço meu tio Hiromi Iwamoto por todo esforço e ajuda dedicado a mim.

A meu namorado e melhor amigo Sheann J. R. Palmas, que tem me dado todo seu apoio, suporte e carinho nessa nova etapa da vida, além da compreensão e paciência da minha ausência nesse período.

Agradeço à minha orientadora professora Dr<sup>a</sup> Fernanda M. Consolim Colombo que tanto admiro, obrigada por me ensinar com tanta dedicação, paciência e atenção. À professora Dr<sup>a</sup> Rosa Moysés, pelas reuniões, conselhos e por toda ajuda na análise e desenvolvimento do meu trabalho. Ao professor Dr. Cleber P. Camacho pela paciência e ajuda nas diversas reuniões no decorrer do ano sobre análises estatísticas e outras contribuições. À professora Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Dalboni, que me ajudou muito na bancada e análises das amostras da pesquisa.

À Carine Sangaleti, que foi a minha base para entrar no mestrado, obrigada pelo suporte e todo ensinamento. A todos os meus professores que com seus dons de ensinamento puderam participar desse imenso conhecimento que adquiri ao longo dessa pós-graduação.

À universidade Nove de Julho - UNINOVE, que me acolheu e me deu todo apoio para que eu pudesse finalizar o mestrado. À CAPES que me auxiliou com a bolsa PROSUP. Ao Instituto do Coração – InCor que apoiou o projeto e me deu oportunidade de aprender e trabalhar em diferentes equipamentos e técnicas. À FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro no projeto do nosso laboratório.

Aos meus colegas de pesquisa que agora são meus amigos, obrigada por todo companheirismo.

*“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade. Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.”*

*(Marie Curie)*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.2 Modulação do sistema nervoso autônomo: estimulação colinérgica.....	20
1.3 Osteocalcina: a proteína do osso e sua função na regulação do metabolismo energético .....	25
1.4 O biomarcador de envelhecimento – O gene e a proteína Klotho .....	27
1.5 O ligante solúvel do receptor de membrana CD40 – (sCD40L).....	30
2. OBJETIVOS .....	32
2.1 Objetivo Geral .....	32
2.1 Objetivos Específicos.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. Delineamento do estudo .....	33
3.2 Análises específicas do presente projeto.....	35
3.3 Análise estatística .....	35
4. RESULTADOS .....	37
5. DISCUSSÃO .....	48
6. CONCLUSÃO.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
8. ANEXOS .....	77
ANEXO 1 .....	77
ANEXO 2 .....	92
ANEXO 3 .....	93

## Lista de Figuras

FIGURA 1. Reflexo anti-inflamatório colinérgico.....	19
FIGURA 2. Esquema que demonstra a molécula de Osteocalcina.....	23
FIGURA 3A. Correlação do IMC com Leptina antes do tratamento (T <sub>0</sub> ).....	36
FIGURA 3B. Correlação do IMC com índice HOMA antes do tratamento (T <sub>0</sub> )....	36
FIGURA 3C. Correlação da CA com índice HOMA antes do tratamento (T <sub>0</sub> ).....	37
FIGURA 4A. Correlação entre valores de Osteocalcina descarboxilada e componente LF da VFC antes do tratamento (T <sub>0</sub> ).....	37
FIGURA 4B. Correlação entre valores de Osteocalcina descarboxilada e componente HF da VFC antes do tratamento (T <sub>0</sub> ).....	37
FIGURA 4C. Correlação entre valores de Osteocalcina descarboxilada e relação LF/HF da VFC antes do tratamento (T <sub>0</sub> ).....	38
FIGURA 5A. Correlação entre Klotho e LDL antes do tratamento (T <sub>0</sub> ).....	38
FIGURA 5B. Correlação entre Klotho e OCc antes do tratamento (T <sub>0</sub> ).....	38
FIGURA 5C. Correlação entre Klotho e OCd antes do tratamento (T <sub>0</sub> ) .....	39
FIGURA 6. Níveis plasmáticos de sCD40L nos grupos Galantamina e Placebo antes (T <sub>0</sub> ) e após (T <sub>1</sub> ) o tratamento.....	42
FIGURA 7. Valores dos níveis de Osteocalcina descarboxilada nos grupos Galantamina e Placebo, antes (T <sub>0</sub> ) e após o tratamento (T <sub>1</sub> ) .....	42
FIGURA 8A. Correlação entre $\Delta$ Adiponectina e valor do componente $\Delta$ LF da VFC.....	43
FIGURA 8B. Correlação entre $\Delta$ Adiponectina e valor do componente $\Delta$ HF da VFC.....	43
FIGURA 8C. Correlação entre $\Delta$ Adiponectina e valor da relação $\Delta$ LF/HF da VFC.....	43
FIGURA 9A. Correlação entre $\Delta$ Leptina e $\Delta$ sCD40L.....	44

FIGURA 9B. Correlação entre $\Delta$ Adiponectina e $\Delta$ sCD40L.....	44
FIGURA 9C. Correlação entre $\Delta$ Insulina e $\Delta$ sCD40L.....	44
FIGURA 9D. Correlação entre $\Delta$ HOMA e $\Delta$ sCD40L.....	44
FIGURA 9E. Correlação entre $\Delta$ Klotho e $\Delta$ sCD40L.....	44
FIGURA 10 A. Correlação entre $\Delta$ Leptina e $\Delta$ HOMA .....	45
FIGURA 10B. Correlação entre $\Delta$ Leptina e $\Delta$ Insulina.....	45
FIGURA 10C. Correlação entre $\Delta$ Leptina e $\Delta$ Adiponectina.....	45

## **Lista de Tabelas**

TABELA 1. Principais classificações da Síndrome Metabólica.....	18
TABELA 2. Variáveis demográficas, clínicas, metabólicas e de biomarcadores antes do tratamento (T <sub>0</sub> ) dos grupos Galantamina e o Placebo.....	35
TABELA 3. Valores demográficos, hemodinâmicos e metabólicos no momento pré (T <sub>0</sub> ) e pós tratamento (T <sub>1</sub> ) dos grupos Galantamina e Placebo.....	40
TABELA 4. Correlações de Pearson (r) para os valores pré tratamento (T <sub>0</sub> ).....	90
TABELA 5. Correlações de Spearman (rs) para os valores de $\Delta$ .....	91

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

CA – Circunferência abdominal

Ca - Cálcio

CD40 – Receptor CD40

DCV – Doenças cardiovasculares

DM – Diabetes Mellitus

EGIR – Grupo Europeu de estudo sobre resistência à insulina

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FC – Frequência cardíaca

FGF – Fator de crescimento fibroblástico

GLA – Ácido gama carboxiglutâmico

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

HbA1c – Hemoglobina glicada

HF – Componente da VFC de alta frequência

HOMA – modelo de avaliação da homeostase, do inglês *Homeostasis Assessment Model*

IDF – Federação Internacional de Diabetes

IAM – Infarto agudo do miocárdio

IMC – Índice de massa corporal

LF – Componente da VFC de baixa frequência

NCEP: ATP III – *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III*

OB – Osteoblasto

OC – Osteocalcina

OCc – Osteocalcina carboxilada

OCd – Osteocalcina descarboxilada

OMS – Organização Mundial de Saúde

PA – Pressão Arterial

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PAD – Pressão Arterial Diastólica

RCQ – Relação cintura / quadril

RI – Resistência à Insulina

RPM – Repetição por minuto

sCD40L – Ligante solúvel CD40

SM – Síndrome Metabólica

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNS – Sistema Nervoso Simpático

TNF – fator de necrose tumoral

TNFR – Receptor do fator de necrose tumoral

VFC – Variabilidade da Frequência Cardíaca

## RESUMO

A síndrome metabólica (SM) é definida como o agrupamento de fatores de risco que alteram a homeostase, tendo como mecanismo unificador, o processo inflamatório. A fisiopatologia da SM ainda não é totalmente conhecida, mas os fatores que estão relacionados ao acúmulo de gordura visceral e a resistência à Insulina (RI), são característicos dessa condição. A Osteocalcina (OC) tem sido alvo de estudos por ter um papel importante no metabolismo da glicose. Recentemente foi verificado que o tratamento com a Galantamina, modulou o sistema simpato-vagal, além disso, diminuiu os níveis de insulina circulantes e melhorou a RI, aferida pelo índice HOMA. Nosso objetivo foi verificar o efeito desse tratamento sobre marcadores metabólicos, inflamatórios, e de envelhecimento. Verificamos que a administração de Galantamina aumentou os níveis de osteocalcina descarboxilada (OCd) no grupo tratado ( $9,61 \pm 6,79$  vs  $11,33 \pm 7,37$  pg/mL) e a mesma foi correlacionada com a melhora do balanço simpato-vagal ( $R^2=0,075$   $p=0,036$ ), o tratamento também foi capaz de diminuir os níveis de sCD40L no grupo tratado ( $5102,92 \pm 4474,54$  vs  $1756,06 \pm 2542,07$  pg/mL), diminuiu os níveis de Leptina ( $33,34 \pm 23,1$  vs  $25,69 \pm 18,13$  ng/mL) e demonstrou um aumento da Adiponectina ( $8,88 \pm 2,1$  vs  $9,77 \pm 2,64$   $\mu$ g/mL). Demonstramos correlação positiva do klotho com os níveis de OCd ( $R^2=0,100$   $p=0,049$ ). Em conjunto, esses dados demonstram que o aumento da estimulação colinérgica melhora o perfil metabólico, inflamatório e energético em pacientes com SM. Futuros estudos são necessários para elucidar o impacto dessas alterações no desenvolvimento das doenças cardiovasculares e consolidar a estimulação colinérgica como potencial alvo terapêutico na SM.

**Palavras Chave:** Síndrome Metabólica; Anticolinesterásico Galantamina; Klotho; Osteocalcina descarboxilada; sCD40L;

## ABSTRACT

Metabolic syndrome (MS) is defined as the grouping of risk factors that alter homeostasis, having as a unifying mechanism the inflammatory process. The pathophysiology of MS is not yet fully understood, but the factors that are related to the accumulation of visceral fat and Insulin resistance (IR) are characteristic of this condition. Osteocalcin (OC) has been studied because it plays an important role in glucose metabolism. It has recently been found that treatment with Galantamine modulated the sympatho-vagal system, in addition, decreased circulating insulin levels and improved to IR, as measured by the HOMA index. Our objective was to verify the effect of this treatment on metabolic, inflammatory, and aging markers. We found that administration of Galantamine increased undercarboxylated osteocalcin (OCd) levels in the treated group ( $9.61 \pm 6.79$  vs.  $11.33 \pm 7.37$  pg/mL) and correlated with improvement in the sympatho-vagal balance ( $R^2= 0.075$   $p= 0.036$ ), the treatment was also able to decrease sCD40L levels in the treated group ( $5102.92 \pm 4474.54$  vs  $1756.06 \pm 2542.07$  pg/mL), decreased levels of Leptin ( $33.34 \pm 23.1$  vs  $25.69 \pm 18.13$  ng/mL) and showed an increase in Adiponectin ( $8.88 \pm 2.1$  vs  $9.77 \pm 2.64$   $\mu$ g/mL). We demonstrated a positive correlation of klotho with OCd levels ( $R^2= 0.100$   $p= 0.049$ ). Taken together, these data demonstrate that increased cholinergic stimulation improves the metabolic, inflammatory and energetic profile in MS patients. Future studies are needed to elucidate the impact of these changes on the development of cardiovascular diseases and to consolidate cholinergic stimulation as a potential therapeutic target in MS.

**Keywords:** Metabolic Syndrome; Anticholinesterase Galantamine; Klotho; Undercarboxylated osteocalcin; sCD40L;

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doenças cardiovasculares e Síndrome Metabólica

Ano após ano, as doenças cardiovasculares (DCV) vêm se destacando como principal causa de morbimortalidade mundial (American Heart Association, 2011).

No Brasil, as DCV são responsáveis por cerca de 20% de todas as mortes em indivíduos acima de 30 anos (Mansur e cols, 2012). O ônus econômico das DCV cresceu exponencialmente nas últimas décadas. Em 2000, foram responsáveis pela principal alocação de recursos públicos em hospitalizações. Entre 1991 e 2000, os custos hospitalares atribuídos às DCV aumentaram cerca de 176% (Castro e cols, 2004; Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e Diretriz de prevenção de aterosclerose, 2001).

Dados mostram que, aproximadamente, dois milhões de pessoas foram acometidas por eventos cardiovasculares no ano de 2004, os custos anuais totais chegaram a pelo menos 30,8 bilhões (Azambuja e cols, 2008). Segundo o Ministério da Saúde, ocorreram 962.931 mortes em indivíduos com mais de 30 anos no ano 2009. As doenças isquêmicas do coração foram responsáveis por 95.449 mortes e as doenças cerebrovasculares por 97.860 mortes. As causas cardiovasculares atribuíveis à aterosclerose foram responsáveis por 193.309 mortes, às neoplasias por 166.036 mortes, as causas respiratórias responderam por 106.927 mortes, as causas externas por 77.503, as doenças do aparelho digestivo por 53.754 mortes e as do aparelho geniturinário por 21.527 mortes (Mansur e cols, 2012).

Foi estimado em 36 milhões o número de mortes prematuras até o ano de 2015. Com especial atenção aos países em desenvolvimento, que, ao contrário dos desenvolvidos, têm sua população doente cada vez mais jovem, frequentemente com complicações e mortes precoces (Moreira e cols, 2010; OMS, 2005).

Ainda, no Brasil, ocorrem cerca de 720 paradas cardíacas por dia e 300 mil casos ao longo do ano, conforme dados da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo (SOCESP).

Reconhece-se que a base fisiopatológica das DCV está relacionada à complexa interação de um conjunto de disfunções em mecanismos de regulação de funções metabólicas e hemodinâmicas, que culminam com a lesão vascular.

De fato, a Síndrome Metabólica (SM) vem ganhando destaque, pois retrata justamente essa interação de anormalidades metabólicas e hemodinâmicas que elevam o risco de DCV, especialmente em indivíduos que apresentam obesidade (Ando e Fujita, 2009; Eckel e cols, 2005; Reilly e Rader, 2003).

O risco de morbimortalidade por DCV dos indivíduos com SM chega a ser o dobro que a dos indivíduos sem a síndrome (Alexander e cols, 2003), uma vez que a associação de riscos cardiovasculares, típicos desta anormalidade, excede o risco da presença de seus componentes de forma isolada (Ando e Fujita, 2009; Isomaa, 2001; Malik, 2004;).

Um dos principais avanços conceituais no entendimento da patogênese da doença cardiovascular associados à idade, tem sido a percepção de que o estresse oxidativo relacionado à idade pode promover a inflamação vascular, mesmo na ausência de fatores de risco tradicionais associados com a aterosclerose (Csiszar e cols, 2008).

Diversos estudos (Ford e cols, 2002; Hildrum e cols, 2007;) têm demonstrado que a prevalência da SM aumenta com a idade, reforçando a importância do seu diagnóstico devido ao elevado risco de desenvolvimento de DCV.

O conceito de SM demorou a ser estabelecido por retratar um conjunto de complexas interações. Há mais de 250 anos atrás, J.B. Morgagni descreveu uma associação entre a obesidade visceral, hipertensão, gota e apneia obstrutiva do sono (Enzi e cols, 2003). Ele usou apenas suas habilidades e uma faca para dissecação anatômica para fornecer as primeiras observações sobre um conjunto de fatores de risco cardiovasculares, mas foi na década de 20 que foi descrita pela primeira vez a relação entre DCV e a presença simultânea alterações metabólicas (Eckel, 2005).

Primeiro, dois médicos de Viena, Karl Hitzemberger, e Martin Richter-Quittner fizeram observações clínicas durante a I Guerra Mundial que levaram a dois artigos sobre fatores metabólicos, hipertensão, diabetes e doença vascular.

Em seguida, Eskil Kylin, um médico sueco, descreveu uma associação entre a hipertensão, hiperglicemia, obesidade e hiperuricemia. Por fim, William Preble, um médico de Boston, fez observações em 1000 pacientes que o levaram a concluir que albuminúria era comum nos pacientes com sobrepeso e eram mais propensos a morrer de diabetes, doença cardíaca, outras doenças circulatórias e doença renal. Ele também observou que a perda de peso reduziu a pressão arterial (PA) e albuminúria. A resistência à insulina (RI) foi considerada como um fator de risco para diabetes na década de 1930. Em 1940 e 1950, Jean Vague, um médico francês, descreveu uma forte relação entre a distribuição de gordura andróide e diabetes tipo 2, aterosclerose e gota. No final da década de 60, foi descrito a presença simultânea de obesidade, dislipidemia, diabetes e hipertensão. Albrink e Meigs descreveram relações entre obesidade (dobras cutâneas), dislipidemia e disglicemia. Além disso, Avogaro e Crepaldi descreveu a associação entre hiperlipidemia, obesidade, hipertensão, diabetes e doença arterial coronariana, que chamaram a síndrome plurimetabólica (*apud* Lopes e cols, 2016).

Contudo, foi no final da década de 70 que o termo “Síndrome Metabólica” foi utilizado pela primeira vez para descrever a presença simultânea destes quatro componentes (Alexander e cols, 2003).

No final dos anos 80 e início dos anos 90, observações adicionais importantes foram descritas. Reaven descreveu a “Síndrome X” e chamou a atenção para a RI como uma característica central que liga diabetes e intolerância à glicose, triglicerídeos elevados e reduzidos níveis de HDL-colesterol e hipertensão arterial (Reaven, 1988). Kaplan, em seguida, subtraiu os baixos níveis de HDL colesterol dos fatores descritos por Reaven e acrescentou a obesidade abdominal aos fatores que descreviam essa síndrome e a renomeou de “Síndrome do Quarteto Mortal” (hipertensão, resistência à insulina, elevados índices plasmáticos de triglicerídeos e a obesidade abdominal) (Kaplan, 1989).

Em 1991, Ferrannini e cols afirmaram que a causa da presença simultânea destes componentes era o estado de RI e, por isso concluíram que o nome mais apropriado desta anormalidade metabólica era “Síndrome da Resistência à Insulina” (Ferrannini e cols 1991).

Em 1994, Nakamura e cols, propuseram o nome “Síndrome da Gordura Visceral”, considerando os resultados de diversos estudos que apontavam a morbidade associada à gordura visceral (Nakamura e cols, 1994).

Em 1998 a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi a primeira organização a fornecer uma definição unificada da SM (Tabela 1) e novamente houve destaque para investigação da RI, com diabetes ou intolerância à glicose como principal característica clínica. São então, classificados com SM os indivíduos que tivessem, pelo menos, duas outras características clínicas, incluindo hipertensão, hipertrigliceridemia, baixo HDL, obesidade ou elevada relação cintura quadril (RCQ) ou microalbuminúria (Alberti e Zimmet, 1998).

Em 1999, O Grupo Europeu para o Estudo da RI propôs que três dos cinco critérios clínicos são suficientes para definir a SM, incluindo a RI e dois ou mais de obesidade central, triglicérides elevados ou HDL baixo, hipertensão arterial e glicemia de jejum  $\geq 6.1$  mmol / L ( $\geq 110$  mg/dl) (Balkau e Charles, 1999) (Tabela 1).

Em 2001, o *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP: ATP III) lançou a definição de SM que é a mais aceita e utilizada na prática clínica até os dias atuais. Segundo esta, o indivíduo é diagnosticado com portador de SM se tiver três ou mais dos seguintes fatores: obesidade central: circunferência da cintura > 102 cm (homens) > 88 cm (mulheres); HDL colesterol < 40 mg/dl (homens) < 50 mg/dl (mulheres); Glicose sanguínea:  $\geq 100$  mg/dl; Pressão Arterial:  $\geq 130 \times 85$  mmHg; Triglicérides:  $\geq 150$  mg/dl; (Tabela 1).

Devido às inúmeras incertezas do papel central da RI como único e principal mecanismo patogênico envolvido na SM, a definição do NCEP ATP III, diferente da OMS, não exigiu métodos laboratoriais de comprovação da RI. Este é um dos fatores que favoreceram seu uso cotidiano na prática clínica e a realização de estudos epidemiológicos (Oda, 2008).

A Federação Internacional de Diabetes (IDF) (Tabela 1), adotou a medida de circunferência abdominal (CA) definido de acordo com valores de etnias específicas, como uma condição indispensável para o diagnóstico da SM (Alberti e cols, 2005).

**Tabela 1.** Principais classificações da Síndrome Metabólica.

	<b>WHO 1998</b>	<b>EGIR 1999</b>	<b>ATP III (2001/4)</b>	<b>IDF 2005</b>
<b>Resistência à Insulina (RI)</b>	TGD, GJA, DT2; RI + 2 fatores abaixo	Insulina plasmática > percentil 75+ 2 fatores abaixo	----- 3 das 5 abaixo	-----
<b>IMC ou distribuição da gordura corporal</b>	RCQ >0,90 (homens) >0,85 (mulheres) ou IMC >30	CA ≥94cm (homens) ou ≥80cm (mulheres)	CA>102cm (homens) ou >88cm (mulheres)	CA aumentada em pop. específica + 2 fatores abaixo
<b>Lipídeos</b>	TG ≥150mg/dL HDL <35 (homens) ou <39 (mulheres)	TG ≥150mg/dL HDL <39	TG ≥150mg/dL HDL <40 (homens) ou <50 (mulheres)	TG ≥150mg/dL ou Trat. HDL <40 (homens) ou <50 (mulheres) ou em Trat.
<b>Glicose</b>	TGD, GTA, DT2	TGD ou GJA	≥110mg/dL	≥110mg/dL ou DM
<b>Pressão arterial</b>	≥140/≥90	≥140/≥90 ou THAS	≥130/≥85	≥130/≥85 ou THAS
<b>Outro</b>	Proteinúria >20mg/min; RAC >30 mg/g			

OMS: Organização Mundial de Saúde; EGIR: grupo Europeu de estudo sobre a resistência à insulina; IDF: Federação Internacional de Diabetes TGD: tolerância à glicose diminuída; GJA: Glicemia de jejum alterada; DT2: diabetes tipo 2; RI: Resistência à insulina; RCQ: relação cintura/quadril; TG: triglicerídeos; RAC: relação albumina/creatinina; CA: circunferência abdominal; THAS: em tratamento da hipertensão; DM: Diabetes Mellitus; Trat: tratamento farmacológico; Modificado de Lopes HF et al. 2016

A fisiopatologia da SM ainda não é totalmente conhecida, mas os fatores genéticos e ambientais (vida moderna com sedentarismo, consumo calórico excessivo, estresse), que estão diretamente relacionados ao acúmulo de gordura visceral e a RI, são característicos dessa condição clínica.

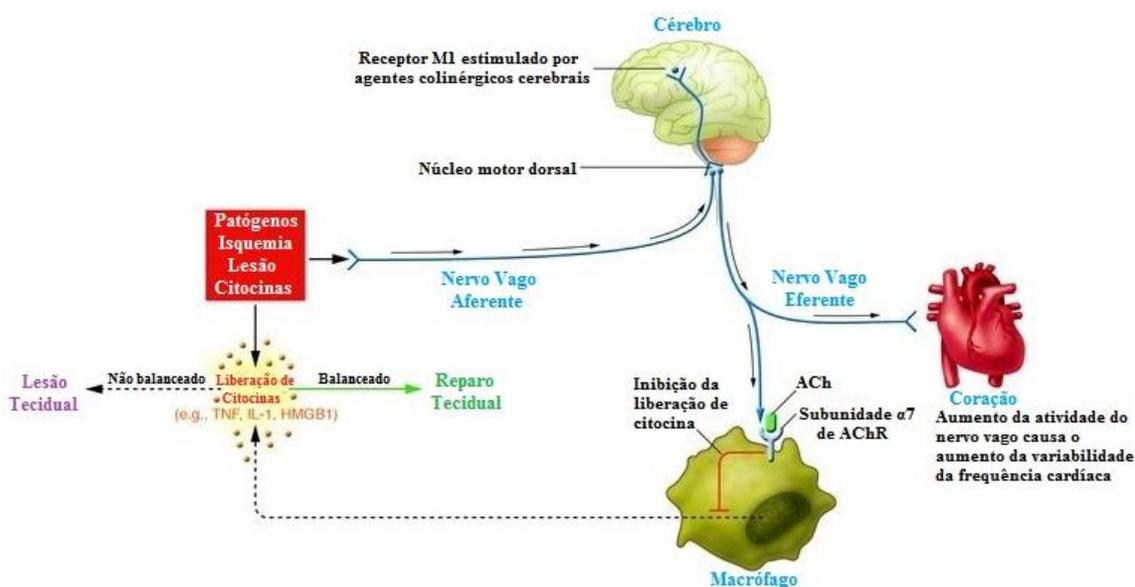
Atualmente, acredita-se que a inflamação e o aumento da atividade simpática, estão no cerne desta condição patológica. Essas alterações aparecem praticamente juntas, o que dificulta a determinação de qual mecanismo inicia essa cascata (Schlaich e cols, 2015).

## 1.2 Modulação do sistema nervoso autônomo: estimulação colinérgica

O sistema nervoso autônomo (SNA) é um importante marcador de prognóstico cardiovascular e está associado ao desenvolvimento e progressão da doença cardiovascular. Atualmente são bem estabelecidos os efeitos da

estimulação simpática sobre a resposta imune e inflamação (Kaye e cols, 1995; Kishi, 2012; Osborn e Kuroki, 2012; Florea e Cohn, 2014). A adrenalina (secretada pela medula adrenal) e a noradrenalina (secretada pelos axônios de terminais simpáticos e pela medula adrenal) modulam a liberação de citocinas, e assim a resposta inflamatória por meio de receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos nas células imunes (Haskó e Szabó, 1998). Além disso, a estimulação simpática descompensada mantém ou aumenta o estado inflamatório, uma vez que há acumulada evidência que os tecidos linfóides são amplamente inervados por terminais simpáticos (Felten e cols, 1987; Pongratz e Straub, 2014).

Em contrapartida, descobriu-se recentemente que a estimulação parassimpática vagal também pode modular a resposta inflamatória e, suprimir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, controlar ou mesmo inibir a inflamação (Figura 1) (Tracey, 2002; Tracey, 2007).



**Figura 1.** Reflexo anti-inflamatório colinérgico.

(Adaptado de Tracey KJ, The JCI, 2007).

No reflexo inflamatório, o vago é o elemento mais importante no braço eferente. O sistema imunológico, vinculado ao sistema nervoso central (SNC), funcionaria como um “sexto sentido”, capaz de detectar a invasão microbiana e outras substâncias inflamatórias, de retransmitir estas informações ao cérebro, e de desencadear respostas que irão interferir no processo inicial (Blalock, 2005).

Mediadores inflamatórios (citocinas) produzidos em tecidos periféricos “notificam” o SNC da presença de inflamação no organismo, por ação direta em áreas centrais ou por estimulação de aferências do nervo vago; nas áreas centrais ocorre a integração dos sinais e desencadeamento da resposta inflamatória global, incluindo a ativação da via eferente do parassimpático, mediado em especial, pelo nervo vago; o nervo vago, cujo neurotransmissor é acetilcolina (via colinérgica) inerva vários componentes ou órgãos do sistema imunológico (sistema retículo endotelial), como linfonodos, fígado e baço; a ativação do vago leva a redução da produção de citocinas pelo baço de forma significativa, e como consequência uma redução intensa da resposta inflamatória (em modelos de inflamação séptica e asséptica) (Tracey, 2002; Tracey, 2007; Rocha, 2013).

Estudos sobre essa nova função da via parassimpática, que é mediada pelo nervo vago, é conhecida como “Via Anti-inflamatória Colinérgica” (Pavlov e cols, 2003). O conceito sobre essa via, também chamada em alguns estudos como “reflexo anti-inflamatório colinérgico”, teve início nos anos 2000, quando Tracey e cols, investigaram 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 intracerebrovascular da CNI-1493 suprimiu a resposta inflamatória de forma mais eficiente que a sua administração sistêmica da droga (Borovikova e cols, 2000a). Os mesmos pesquisadores comprovaram que tais efeitos dependiam da ação do nervo vago, pois com a vagotomia os efeitos anti-inflamatórios não ocorriam e a acetilcolina era o principal neurotransmissor envolvido, por isso o nome “Via Anti-inflamatória Colinérgica. Estudos demonstraram que os efeitos da estimulação vagal se davam preferencialmente pela via colinérgica mediada por receptores nicotínicos do tipo  $\alpha 7$  n AChR (Wang e cols, 2003) e que receptores muscarínicos mediavam ações centrais desta via anti-inflamatória (Pavlov e cols, 2006).

Assim, após as primeiras descrições da via Anti-inflamatória Colinérgica Tracey (2002) propôs um complexo sistema que funcionava como um mecanismo reflexo em resposta a estímulos periféricos inflamatórios. Este sistema compreendia o estímulo inflamatório, especialmente o TNF- $\alpha$ , capaz de acionar a via aferente vagal, nos centros reguladores vagais localizados no SNC

que por sua vez acionavam a via eferente vagal e áreas supra bulbares que inibiam a resposta inflamatória, atuando em células do sistema imune, em especial nos macrófagos. Nesse modelo, por ação da acetilcolina, a estimulação parassimpática (vagal) demonstrou ser capaz de inibir a liberação de TNF, IL-1, IL-6 e IL-8 de macrófagos ativados em estados inflamatórios, sem afetar a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (Borovikova e cols, 2000b).

A estimulação colinérgica vem sendo utilizada como estratégia de intervenção em patologias como artrite reumatóide (Goldstein e cols, 2007), insuficiência cardíaca (Behling e cols, 2003), doenças autoimunes (Nizri e cols, 2006), diabetes (Ali e cols, 2015; Schmatz e cols, 2009), doença de Alzheimer, obesidade e na SM (Satapathy e cols, 2011).

Estudos demonstram que há redução da atividade vagal no contexto da obesidade e na SM. Mostraram que a hipertensão, dislipidemia, obesidade e diabetes estão associados a menor VFC (Richter e cols, 1996; Rissanen e cols, 2001; Koskinen e cols, 2009). Além disso, já foi demonstrado que a atividade da enzima acetilcolinesterase, que modula os efeitos da acetilcolina na fenda sináptica e em suas células alvo após estimulação vagal, está aumentada em estados de RI (Schmatz e cols, 2009).

Recentemente foi verificado a possibilidade de modular o eixo simpato-vagal por intervenções sobre o sistema nervoso periférico e mais especificadamente sobre a atividade vagal. Além da estimulação elétrica do nervo vago, o exercício físico e medicamentos podem ser utilizados para potencializar a ação do nervo. Estudos têm relacionado a hiperatividade parassimpática, obtida por meio de drogas ou pela estimulação direta do nervo vago, como mecanismo contrarregulador da liberação de citocinas e espécies reativas de oxigênio (EROs) durante um processo inflamatório (Tsutsumi e cols, 2008; Wang e cols, 2004).

No contexto da SM, a estimulação colinérgica por meio da inibição da ação da enzima acetilcolinesterase já vem sendo empregada em modelos animais (Das, 2007; Pavlov e cols, 2009). Dentre as drogas que desempenham tal função, destaca-se nesse estudo a Galantamina.

A Galantamina é um inibidor reversível da acetilcolinesterase e uma droga clinicamente aprovada para o tratamento da doença de Alzheimer. Além de inibir a ação da acetilcolinesterase, a Galantamina interage alostericamente com receptores nicotínicos de acetilcolina (ACh), potencializando ainda mais a ação colinérgica (Scott e Goa, 2000). Sua ação, sobre os componentes cognição e memória, está intimamente relacionada aos efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e de sinalização celular da ACh em núcleos centrais. Mesmo administrada por via oral, essa droga é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e desempenhar suas ações centrais (Scott e Goa, 2000; Wilcock, Lilienfeld, Gaens, 2000).

A Galantamina mostrou-se capaz de reduzir significativamente os níveis de séricos de TNF- $\alpha$  em modelos de obesidade em ratos e camundongos. O papel estimulador dessa droga na Via Anti-inflamatória Colinérgica foi demonstrado pela ausência de seu efeito nos níveis séricos de TNF- $\alpha$  em ratos que não apresentavam a  $\alpha 7nAChR$ , a subunidade do receptor nicotínico de acetilcolina responsável por mediar os sinais anti-inflamatórios dessa via (Pavlov e Tracey 2005; Van Maanen, Vervoordeldonk, Tak 2009).

Vale destacar que, em estudo recente, além de suprimir os níveis de TNF- $\alpha$  circulantes em ratos, o tratamento com Galantamina também promoveu a redução do peso corporal, da adiposidade abdominal e da RI (Satapathy e cols, 2011). Ainda, no estudo de Ali e cols (2015) o tratamento de ratos diabéticos com Galantamina resultou em redução de peso corporal, dos valores de glicemia de jejum, da RI medida pelo modelo de avaliação da homeostase (HOMA) e dos os sintomas da hiperglicemia sistêmica como a polidipsia, reduziu ainda os níveis de TNF- $\alpha$  circulantes; melhorou o padrão lipídico e reduziu o estresse oxidativo. Os autores atribuíram parcialmente tais efeitos ao aumento dos mecanismos de sinalização intracelular da insulina promovidos pela Galantamina.

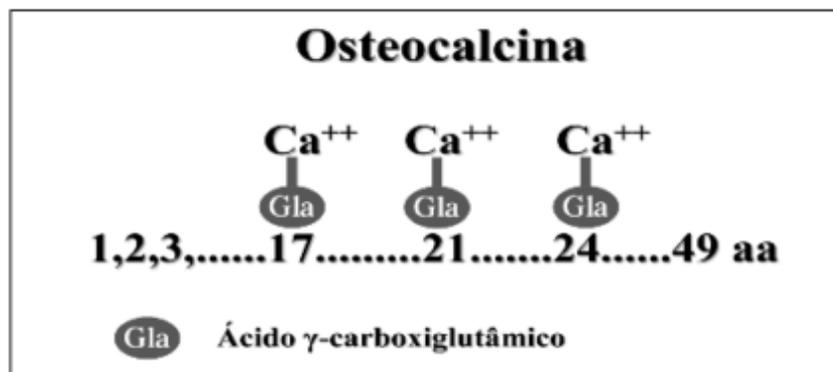
A Galantamina é um medicamento capaz de atravessar barreira hematoencefálica e, sua ação inibidora da acetilcolinesterase em via central já foi demonstrada em estudos experimentais. Dados do nosso laboratório (Sangaleti e cols, 2016) demonstraram que o tratamento com Galantamina em pacientes com SM, é capaz de aumentar a atividade vagal, melhora o

metabolismo da glicose, índice HOMA e atua de forma positiva a relação adiponectina / leptina.

### **1.3 Osteocalcina: a proteína do osso e sua função na regulação do metabolismo energético**

A OC é uma proteína da matriz óssea e que, atualmente, está no foco de grandes estudos devido à suas funções hormonais relacionada à homeostase da glicose e ao metabolismo energético (Lee e cols, 2007; Confavreux e cols, 2009; Ferron e cols, 2010; Booth e cols, 2013; Zanatta e cols, 2014). A Osteocalcina descarboxilada (OCd) é a isoforma hormonalmente ativa e estimula a secreção de insulina diretamente no pâncreas e aumenta a sensibilidade à insulina no tecido adiposo e muscular. A insulina e a leptina, por sua vez, atuam no tecido ósseo modulando a secreção da OC, formando uma alça de retroalimentação tradicional na qual o esqueleto torna-se um órgão endócrino (Zanatta e cols, 2014). Dessa forma, estudos experimentais demonstraram que a Leptina é um potente inibidor do metabolismo ósseo e que sua ação é exclusivamente no SNC e mediada pelo sistema nervoso simpático (SNS) (Ducy e cols, 2000; Elefteriou e cols, 2005). Os resultados apresentados no estudo de Hinoi e cols (2008), demonstraram que a leptina também inibe a secreção de insulina em parte através do osteoblasto que age modulando a atividade da OC.

A OC é uma proteína não colagenosa, de baixo peso molecular, mais abundante da matriz óssea (Wolf, 1996). É sintetizada pelos osteoblastos (OB), e possui seu gene localizado no cromossoma 1 (1q25-q31). A OC é constituída por uma sequência de 49 aminoácidos, cujas posições 17, 21 e 24 são ocupadas pelo ácido  $\gamma$ -carboxiglutâmico (Gla) (Figura 1) que é responsável pela fixação do cálcio (Ca), e também permite que a proteína se ligue a hidroxiapatite carboxilada e assim regular a maturação mineral óssea (Avolio e cols, 2008).



**Figura 2.** Esquema que demonstra a molécula de Osteocalcina. Modificado de Avolio G. e cols. Rev Inst Cienc e Saúde. 2008; 26(3):347–50.

Os ensaios que avaliam OC na circulação diferem quanto a sensibilidade para quantificar OC total ou nas formas carboxilada e descarboxilada. O precursor da OC, também sintetizado pelo OB, é carboxilado na presença da vitamina K resultando em Osteocalcina carboxilada (OCc) que é depois incorporada na matriz óssea. Quando os níveis de vitamina K são insuficientes no osso, a OC não é carboxilada, e a forma descarboxilada (OCd) é secretada pelos OB para a circulação sanguínea. Quando a remodelação óssea está acelerada, o precursor da OC é excessivamente sintetizado e há um aumento dos níveis OCd na circulação (Lopes, 2010).

A capacidade da OC regular a mineralização e remodelação óssea é bem reconhecida, mas o seu papel fora do osso ainda está sendo alvo de estudos (Neve e cols, 2013). Recentemente foi demonstrado em estudos experimentais que a forma descarboxilada da OC age como um hormônio envolvido na homeostase da glicose (Lee e cols, 2007; Confavreux e cols, 2009; Ferron e cols, 2010; Booth e cols, 2013).

Em 1996, Ducy e cols, descreveram que camundongos deficientes em osteocalcina (Osn- / -) apresentaram aumento da gordura visceral e RI quando comparados com animais controles. Em 2007, Lee e cols, procuraram por genes expressos em osteoblastos codificando moléculas sinalizadoras que poderiam afetar o metabolismo energético. Os autores verificaram que ratos com deficiência de OC, surpreendentemente não apresentaram anormalidades esqueléticas evidentes. Ao invés disso, os animais apresentam uma diminuição na proliferação de células  $\beta$  do pâncreas e um aumento da RI. Estes dois estudos pioneiros foram os primeiros a demonstrar a regulação endócrina por uma

molécula reconhecidamente relacionada ao metabolismo energético e a mineralização do esqueleto (Zanatta e cols, 2014).

A OCd, dentre as duas formas, é a que se aceita regular o metabolismo da glicose através de duas vias principais: em primeiro lugar, OCd estimula a expressão e secreção de insulina nas células  $\beta$  do pâncreas; em segundo lugar, a OCd induz a expressão de adiponectina em adipócitos, melhorando assim a sensibilidade à insulina (Srichomkwun e cols, 2016).

Estudos epidemiológicos em humanos têm sido realizados para examinar essa associação entre a OC e vários parâmetros metabólicos, como glicemia, secreção de insulina, perfil lipídico, gordura visceral, IMC e inflamação vascular (Kindblom e cols, 2009; Pittas e cols, 2009; Hwang e cols, 2009; Shea e cols, 2009; Bao e cols, 2011;). Esses estudos adicionaram informações sobre o potencial impacto do esqueleto, via OC, na regulação energética e metabolismo da glicose (Im e cols, 2008; Confavreux, Levine e Karsenty, 2009; Ferron e cols, 2010; Saleem, Mosley e Kullo, 2010; Booth, 2013).

Diferentes métodos são utilizados a fim de mensurar a RI. Entre eles, o *Homeostasis Assessment Model* – modelo de avaliação da homeostase (HOMA), um modelo matemático, que permite obter valores para sensibilidade à insulina e função da célula  $\beta$  (Santos e cols, 2006). Em 2008, Im e cols, investigaram a associação entre OC e índices glicêmicos em 339 mulheres pós-menopáusicas com e sem diabetes. Eles encontraram uma associação significativa entre níveis séricos mais elevados de OC com sensibilidade à insulina (estimada pelo HOMA), baixo índice glicêmico e hemoglobina glicada (HbA1c). Além disso, as concentrações de OC foram significativamente menores nos pacientes com diabetes.

Este novo aspecto endócrino do esqueleto, deve proporcionar novas abordagens visando a melhora do metabolismo da glicose no tratamento da SM.

#### **1.4 O biomarcador de envelhecimento – O gene e a proteína Klotho**

A SM é definida como o agrupamento de fatores de risco que alteram a homeostase, tendo como mecanismo unificador, o processo inflamatório. É reconhecido que portadores de SM apresentam problemas cardiovasculares

precoces, podendo-se inferir que esses indivíduos possuem um envelhecimento antecipado do sistema. Um dos reguladores do processo de envelhecimento a nível molecular é o gene *Klotho*.

O gene *Klotho* foi identificado em 1997, quando em um experimento com camundongos hipertensos, um gene no cromossomo 13 (13q12), foi acidentalmente interrompido, e resultou em um conjunto de características que se assemelham a uma falha prematura de múltiplos órgãos que antecipam ao envelhecimento e mortalidade (Kuro-o e cols, 1997; Takeshita e cols, 2004; Wang e Sun, 2009). Camundongos induzidos à deficiência de *Klotho* manifestaram vários distúrbios relacionados com a idade observada em humanos, incluindo aterosclerose, infertilidade, atrofia da pele, osteoporose, enfisema pulmonar, calcificação ectópica e vida útil curta (Ikushima e cols, 2005). Esse gene recebeu o nome em homenagem a 1 das 3 irmãs *Moiras* da mitologia grega (*Clotho*, *Laquesis* e *Atropos*), filhas de Zeus que determinavam o destino, tanto dos deuses, quanto dos seres humanos, *Clotho* é a irmã que tecia o fio da vida.

O gene *Klotho* sintetiza proteínas denominadas proteínas *Klotho*. Atualmente são identificadas 3 formas, todas reconhecidas como proteínas “anti-envelhecimento”, pois, quando são abundantes, prolongam a vida útil e produzem um atraso no desenvolvimento de doenças relacionadas com mecanismos de degeneração, ou seja, envelhecimento dos tecidos (Kuro-o e cols, 1997).

A forma transmembranar é a que mais caracteriza a proteína *Klotho*, interagindo com o receptor FGF23 (fator de crescimento fibroblástico), que está envolvido na manutenção do metabolismo do fosfato. A segunda forma de *Klotho*, exógena, é uma proteína solúvel que circula na corrente sanguínea e parece controlar a senescência celular, interagindo com o dano induzido pelo aumento do estresse oxidativo através de mecanismos celulares que ainda não estão bem caracterizadas. A terceira forma é normalmente expressa de forma difusa no citoplasma da célula, mas não fora da membrana celular, e, por conseguinte, tem sido sugerido que desempenha um papel importante na determinação da capacidade destas células para suportar o estresse (Wang e cols, 2009).

A proteína Klotho é predominantemente expressa no túbulo distal do rim e no plexo coroide cerebral (Li e cols, 2004). Além desses tecidos, uma baixa expressão é relatada na glândula pituitária, placenta, músculo esquelético, bexiga urinária, aorta, pâncreas, colo, testículos, ovários, paratireoides e células do nodo sinoatrial (Kuro-o e cols, 1997; Shimada e cols, 2004; Takeshita e cols, 2004; Martin e cols, 2012; Martins, 2014).

Yamazaki e cols (2010) verificaram uma forte correlação da proteína Klotho solúvel com a idade, ao quantificar as concentrações em crianças e adultos saudáveis, cuja resposta foi significativamente maior nas crianças.

A deficiência do Klotho é um biomarcador precoce e colaborador da progressão de complicações na doença renal crônica, incluindo calcificação vascular, hipertrofia cardíaca e hiperparatireoidismo secundário (Hu e cols, 2013).

Além de sua conhecida ação antienvhecimento, o gene Klotho serve como um cofator da FGF23 em conferir à mesma especificidade para a ativação do receptor FGF. Os dois juntos desempenham um papel essencial no controle do metabolismo da vitamina D e do fosfato, aumentando a excreção urinária de fosfato e suprimindo a atividade da hidroxilase renal  $1\alpha$  25 OH da vitamina D (Oliveira e cols, 2013).

A proteína Klotho de membrana que é secretado tem uma forte semelhança à família das glicosidases-1, as quais hidrolisam as ligações  $\beta$ -glicosídicas terminais (em sacarídeos glicoproteínas e glicolípídeos), liberando glicose (Tohyama e cols, 2004). Foi sugerido a sua participação sobre a inibição da sinalização da insulina e no fator de crescimento derivado de insulina 1 (IGF1) em culturas de células, além de ligarem-se a múltiplos domínios da via de sinalização usada pelos osteoblastos. Animais knockout para Klotho, mostram extrema sensibilidade insulínica e hipoglicemia quando comparados aos animais normais, contrastando com a resistência insulínica dos animais com superexpressão de Klotho (Kuro-o e cols, 1997; Martins, 2014).

Estudos em ratos induzidos à SM demonstraram que o Klotho atua na melhora da disfunção do endotélio vascular, aumento da produção de óxido nítrico, redução da pressão sanguínea elevada e evita a hipertrofia da média e fibrose perivascular (Kuro-o e cols, 1997; Yamagishi e cols, 2001;). Portanto,

situações que possam modular a expressão genica e a síntese da proteína Klotho são potenciais alvos terapêuticos.

Ambos os compostos OC e Klotho podem ser modulados pelo SNA (simpato-vagal) de forma indireta.

### **1.5 O ligante solúvel do receptor de membrana CD40 – (sCD40L)**

Níveis circulantes do ligante solúvel do receptor de membrana (sCD40L) refletem a ativação do sistema CD40/CD40L. O receptor de membrana CD40, é uma proteína membro da família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), que foi descrita na parede de linfócitos B, inicialmente em estudos imunohistoquímicos (Koho e cols. 1984). Na década de 90 foi descrito o ligante específico para o CD40 e então as funções da sua via de sinalização puderam ser melhor compreendidas (Armitage, 1992). O ligante do receptor CD40 (CD40L) é uma proteína cujo gene é encontrado no cromossomo X (Graf e cols, 1992).

O receptor de membrana CD40 é expresso em células do sistema imune, (linfócitos, macrófagos, células dendríticas) e em células da parede vascular (células endoteliais, musculares lisas). Quando ativado, através de seu ligante CD154 (comumente chamado de CD40L), desencadeia uma série de processos celulares destinados à ativação da resposta imune. A sinalização por meio dessa via é necessária para a maturação e diferenciação, bem como para troca da classe de imunoglobulinas produzidas pelos linfócitos B. Nas células apresentadoras de antígenos, a ativação de CD40 é fundamental para decisão do sistema imune de criar uma resposta eficaz ou tolerância e a disfunção nessa via de sinalização está presente na patogênese de doenças autoimunes, aterosclerose e sepse. Ensaios desenvolvidos para a detecção do CD40L solúvel (sCD40L) foram fundamentais para a compreensão do papel dessa via de sinalização em doenças humanas, pela facilidade de se determinar quantitativamente a expressão dessa molécula em líquidos biológicos, como o plasma, sem a necessidade de métodos mais invasivos (Souza, 2007).

Este sistema CD40/CD40L tem sido implicado na fisiopatologia da aterosclerose, desde o processo de aterogênese precoce até o processo tardio das complicações trombóticas (Francisco e cols, 2006). Entre suas funções, o sistema CD40/CD40L exerce diversos efeitos pró-inflamatórios e pró-trombóticos,

como: a) estimulação da produção de radicais livres nas células endoteliais, os quais antagonizam a produção de óxido nítrico; b) indução da expressão de moléculas de adesão nas células musculares lisas e endoteliais; c) estimulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias; d) aumento da expressão de metaloproteinases, tornando a placa aterosclerótica mais frágil; e) indução da expressão do fator tissular no endotélio e células musculares lisas, promovendo o aumento do potencial trombogênico da placa; e f) participação na ativação plaquetária. Nesse sentido, tem sido demonstrado que o receptor CD40 é expresso da superfície de plaquetas, e sua ligação resulta a ativação plaquetária, a qual promove a formação do trombo (Volp e cols, 2008).

Nossa hipótese é que o tratamento com o anticolinesterásico Galantamina em pacientes com SM, pode modular de forma positiva a OCc, a OCd e o Klotho e diminuir a inflamação por meio da via sCD40L.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito do aumento da atividade vagal, por meio da administração do anticolinesterásico Galantamina, sobre marcadores metabólicos, inflamatórios, e de envelhecimento em uma população de pacientes com Síndrome Metabólica.

### **2.1 Objetivos Específicos**

Avaliar os efeitos do tratamento com Galantamina em portadores de SM, nos parâmetros:

- De modulação autonômica: por meio da análise dos componentes da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) no domínio da frequência (análise espectral);
- De metabolismo da glicose e resistência à insulina: por meio da dosagem de leptina/adiponectina, de osteocalcina carboxilada, osteocalcina descarboxilada séricas e cálculo do índice HOMA;
- Biomarcador de envelhecimento: por meio da dosagem dos níveis séricos da proteína Klotho;
- Biomarcador de inflamação: por meio da dosagem de sCD40L;

Além disso, determinar as correlações entre as variáveis, por meio da análise de Correlações entre os diferentes parâmetros.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Delineamento do estudo

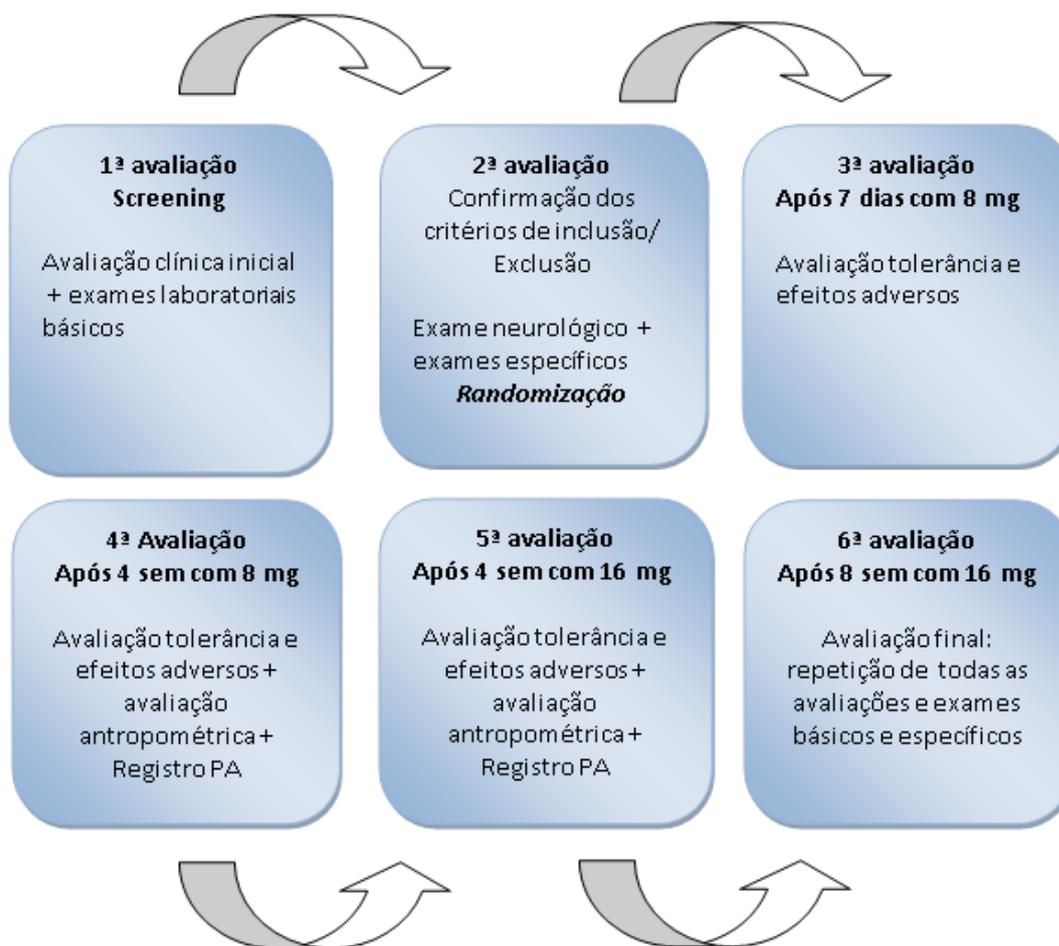
O presente trabalho é um subestudo do projeto “*Efeitos da Galantamina sobre biomarcadores inflamatórios e adipocinas em pacientes com Síndrome Metabólica*” Fapesp (Processo:13/22250-9) e CNPq (Processo: nº 457581/2013-1).

A sua metodologia será descrita brevemente a seguir e a sua descrição na íntegra está apresentada como Anexo 1.

Tratou-se de um estudo prospectivo duplo-cego, composto de 60 indivíduos (30 homens e 30 mulheres) na faixa etária de 18 a 59 anos e portadores de SM de acordo com a classificação da (NCEP: ATP III). Foram randomizados em 2 grupos (Galantamina n=30 sendo 15 homens e 15 mulheres e Placebo n=30, sendo 15 homens e 15 mulheres). A duração de participação dos indivíduos foi de aproximadamente 17 semanas. O tratamento foi composto de: 5 semanas tomando 1 cápsula (Galantamina ou placebo) com 8mg por dia e 12 semanas tomando 2 cápsulas (Galantamina ou placebo), totalizando 16mg por dia.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa o Instituto do Coração (*parecer nº 555.738*), FMUSP/InCor e seguiu as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos conforme a resolução 196/96, formuladas pelo Conselho Nacional de Saúde, estabelecida em outubro de 1996. Foi registrado no *ClinicalTrials.gov* sob o número: NCT02283242.

Os pacientes foram avaliados clinicamente em várias visitas médicas e foram submetidos a uma série de avaliações complementares, descritas na sequência do protocolo (abaixo), como: avaliação neurológica específica, exames de ressonância nuclear magnética de tórax e abdômen, e monitorização ambulatorial da PA (métodos descritos no Anexo 1).



O registro das variáveis hemodinâmicas e dos componentes do controle autônomo foram realizados no laboratório de Pesquisa Clínica da Unidade de Hipertensão da FMUSP e foram coletadas a partir do registro das curvas de pressão arterial, batimento a batimento, pelo método não invasivo com o sistema FINOMETER® (Finometer, Finapres Medical Systems BV, Arnhem, Netherlands).

A modulação autonômica cardíaca foi inferida por meio da análise da variabilidade da FC (VFC) no domínio da frequência (análise espectral) com o software específico CardioSeries (Versão 2.4, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

As amostras de sangue (utilizadas nesse estudo) foram obtidas por meio da punção venosa na região cubital (30 mL) em tubos com EDTA, antes e depois do tratamento e foram utilizadas para as dosagens hormonais, bioquímicas e de marcadores inflamatórios. Para a separação do plasma e preparo dos glóbulos vermelhos, o sangue foi centrifugado, após 30 minutos da coleta, a 3000 rpm por

20 minutos a 4°C. Em seguida, o plasma foi separado em pequenas amostras e armazenado em eppendorfs, congelados em nitrogênio e foram armazenados no freezer a -70°C para as posteriores análises.

### **3.2 Análises específicas do presente projeto**

#### **Dosagem de sCD40L**

A análise do marcador inflamatório sCD40L foi realizada com kit Multiplex pela empresa Genese. Esse kit utiliza a tecnologia Luminex xMAP (Multiple Analyte Profiling, x = variável a ser medida) que envolve um processo que cora microesferas de látex com dois fluoróforos. Utilizando proporções precisas de dois fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas que são identificadas em código de cores pelo instrumento Luminex.

#### **Quantificação da proteína Klotho**

A dosagem foi feita a partir da técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), com ensaio da marca IBL – *Human soluble  $\alpha$ -Klotho* kit: 27998, seguindo as recomendações do fabricante.

#### **Quantificação da Osteocalcina carboxilada e descarboxilada**

A dosagem foi feita a partir da técnica ELISA utilizando kits específicos: Undercarboxylated Osteocalcin (Glu-OC) EIA Kit (MK118) para dosagem da osteocalcina descarboxilada e Human Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (MK128) para dosagem da osteocalcina carboxilada, ambos da marca Takara. Seguindo as recomendações do fabricante.

### **3.3 Análise estatística**

Todas as variáveis foram analisadas e apresentadas em média e desvio padrão. O teste *Kolmogorov-Smirnov* foi utilizado para testar a normalidade dos dados, para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, aplicou-se a transformação logarítmica. A comparação de médias no início do estudo entre

os grupos (Galantamina e Placebo) foram realizados por meio do teste *t* de *Student* para amostras independentes.

As correlações bivariáveis do estudo no tempo pré tratamento ( $T_0$ ) incluíram todos os pacientes com SM ( $n=60$ ), foram calculadas por meio do teste de correlação de *Pearson* ( $r$ ). Em seguida para todas as variáveis contínuas realizamos uma análise de regressão para achar a curva que melhor explica o fenômeno ( $R^2$ ).

Para a avaliação do comportamento das médias das variáveis em dois instantes de avaliação, pré tratamento ( $T_0$ ) e pós tratamento ( $T_1$ ) por grupo de tratamento (Galantamina e Placebo) utilizou-se a análise de variâncias ANOVA com medidas repetidas.

Além disso, realizamos novas análises de correlação para verificar associações a partir da variação no decorrer do tempo, utilizamos assim, a diferença ( $\Delta$ ) do efeito tempo ( $T_1-T_0$ ) entre as variáveis. Para essas variáveis discretas, utilizamos a correlação não paramétrica de Spearman ( $r_s$ ).

Para os testes estatísticos considerou-se um nível de significância de 5% ( $p<0,05$ ). As análises foram realizadas com o uso dos softwares estatísticos IBM SPSS para Windows versão 20.0 (Armonk, NY: IBM Corp) e o software GraphPad Prism versão 6.04 para Windows (Software, La Jolla California USA).

#### 4. RESULTADOS

Como descrito, 60 pacientes com SM foram incluídos, randomizados em 2 grupos, para tratamento com Galantamina (n=30) ou placebo (n=30). As características demográficas, hemodinâmicas, autonômicas, metabólicas e de adipocinas antes do tratamento estão apresentados na Tabela 2, incluindo os novos biomarcadores dosados neste estudo.

**Tabela 2.** Variáveis demográficas, clínicas, metabólicas e de biomarcadores antes do tratamento dos grupos Galantamina e Placebo.

	Galantamina n=30	Placebo n=30	p
<b>Demográficos</b>			
Idade (anos)	40,8±8,8	42,7±8,8	0,398
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	34,3±3,5	33,7±4,3	0,344
CA (cm)	108,3±7,3	107,9±18,8	0,874
<b>Hemodinâmicas</b>			
PAS (mmHg)	123±9,9	128±13,9	0,624
PAD (mmHg)	79±17,5	83±9,3	0,507
<b>Variabilidade da FC</b>			
LF (nu)	54,9±2,7	48,3±17,6	0,118
HF (nu)	45,0±2,8	51,1±3,1	0,149
LF/HF	1,8±1,1	1,4±1,1	0,163
<b>Metabólicas</b>			
Glicose (mg/dl)	102,1±10,7	100,1±10,9	0,746
Triglicerídeos (mg/dl)	181,06±82,6	167,73±72,8	0,820
Colesterol Total (mg/dl)	198,1±39,2	199,2±825,7	0,829
LDL (mg/dl)	124,6±38,1	125,8±40,5	0,820
HDL (mg/dl)	42,4±7,8	42,5±8,8	0,903
Insulina (pg/mL)	17,5±8,5	19,1±20,8	0,805 <sup>†</sup>
HOMA	4,3±2,0	3,8±1,8	0,627
<b>Adipocinas</b>			
Adiponectina (µg/mL)	8,88±2,1	8,89±1,6	0,974
Leptina (ng/mL)	33,34±23,1	25,7±18,3	0,893

---

**Novos biomarcadores**

OCc (ng/mL)	21,6±5,7	19,1±5,3	0,072
OCd (ng/mL)	9,6±6,8	10,8±6,8	0,514
Klotho (pg/mL)	2017,7±824,8	1880,2±437,6	0,423
sCD40L (pg/mL)	4510,5±831,9	2664,7±625,3	0,007 <sup>L*</sup>

IMC: índice de massa corporal; CA: circunferência abdominal; PAS: pressão arterial sistólica PAD: pressão arterial diastólica; LF: componente de baixa frequência; HF: componente de alta frequência; OCc: Osteocalcina carboxilada; OCd: Osteocalcina descarboxilada; sCD40L: Ligante solúvel do receptor CD40; Valores expressos em Média±desvio padrão.

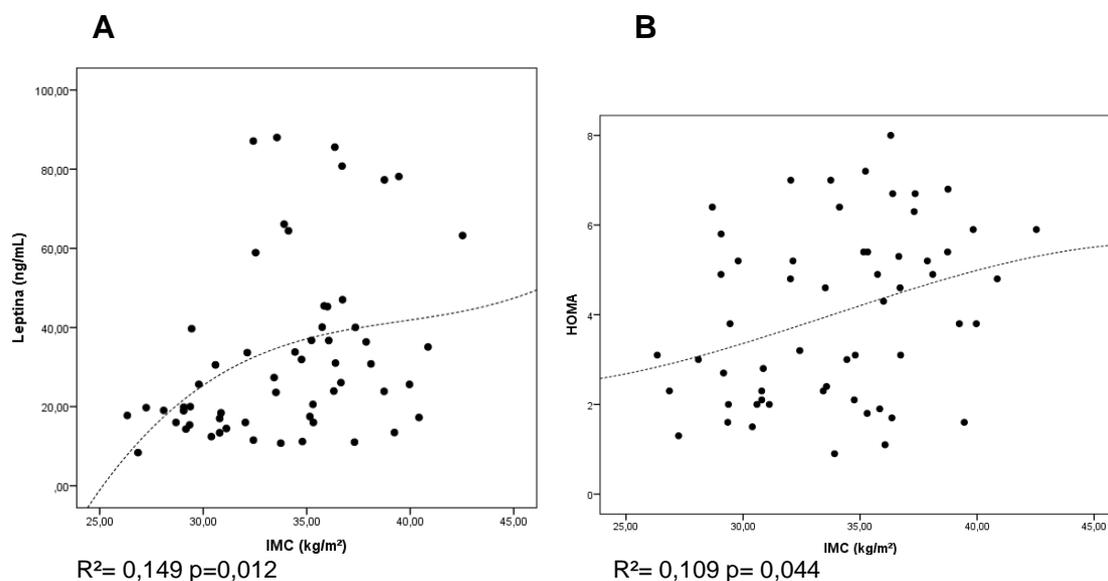
<sup>L</sup>Variáveis na escala logarítmica.

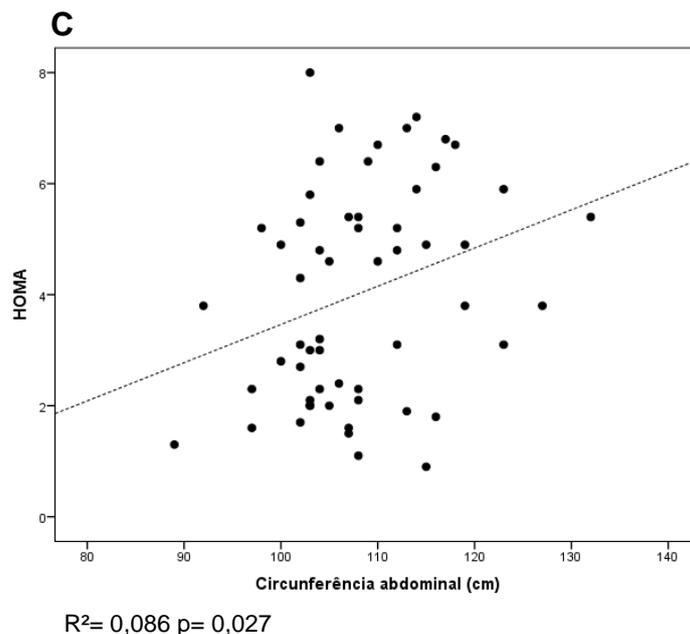
\*  $p < 0,05$  no teste *t*.

Referente aos resultados da Tabela 2, é possível verificar que os grupos estavam pareados em todas as variáveis antes do tratamento, com exceção do marcador pró-inflamatório sCD40L, cujo nível sérico foi mais elevado no grupo Galantamina, quando comparado ao grupo placebo.

Foram feitas também, análises de correlações entre as principais variáveis no estudo antes do tratamento ( $T_0$ ), em todos os pacientes com SM ( $n=60$ ). A tabela de correlação na íntegra com as associações significantes estão apresentadas na Tabela 4 como Anexo 2.

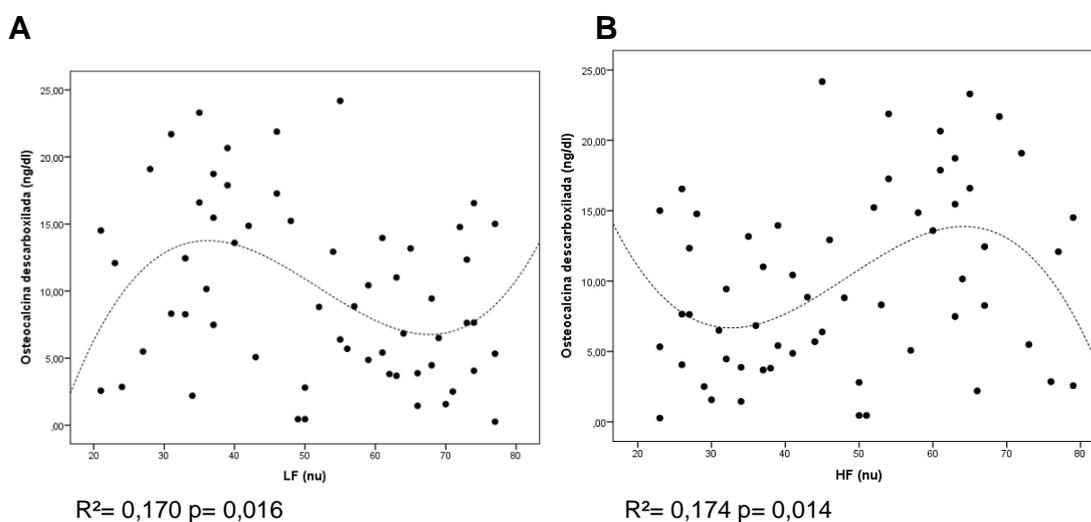
Podemos observar que as variáveis demográficas se correlacionam com marcadores do metabolismo da glicose. Nosso estudo demonstrou os valores de IMC se correlacionou positivamente com que a Leptina (Figura 3. A) e o índice HOMA (Figura 3. B) e CA com índice HOMA (Figura 3. C).

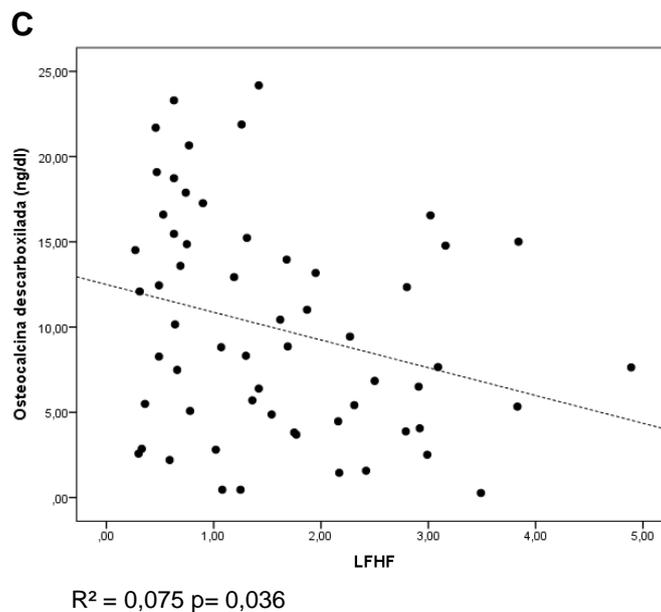




**Figura 3.** Correlação do IMC com Leptina (A) e índice HOMA (B) e CA com HOMA (C) antes do tratamento ( $T_0$ ).

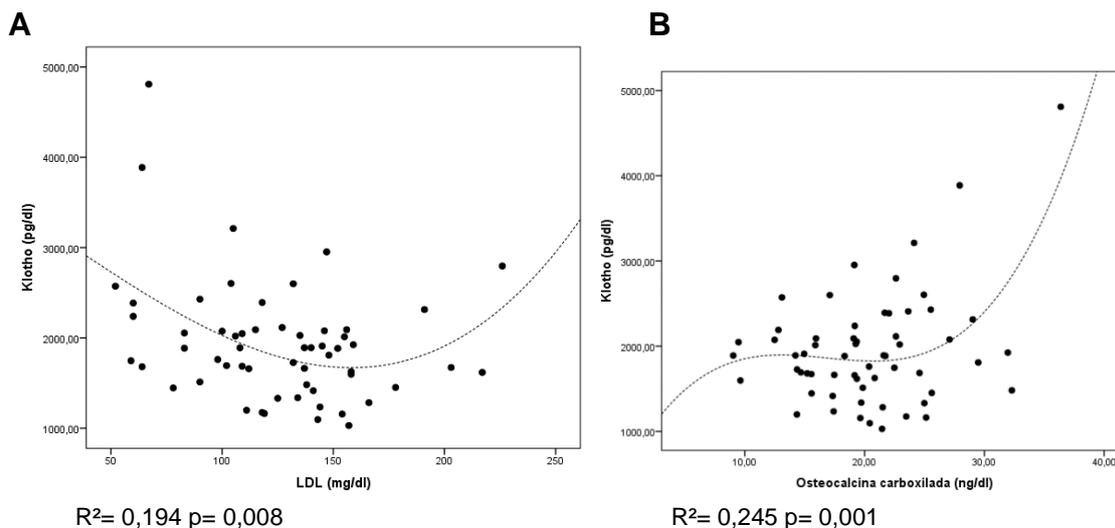
Referente aos dados autonômicos, percebemos que componentes da VFC se correlaciona com a OCd. Mostrando que quanto menor atividade do sistema simpático, representado pelo componente LF da VFC, menores os níveis de OCd (Figura 4. A), quanto maior atividade do sistema parassimpático, representado pelo componente HF da VFC, maior os níveis de OCd (Figura 4. B) e quanto menor valor da relação LF/HF, mais OCd, demonstrando melhor balanço autonômico (Figura 4.C).

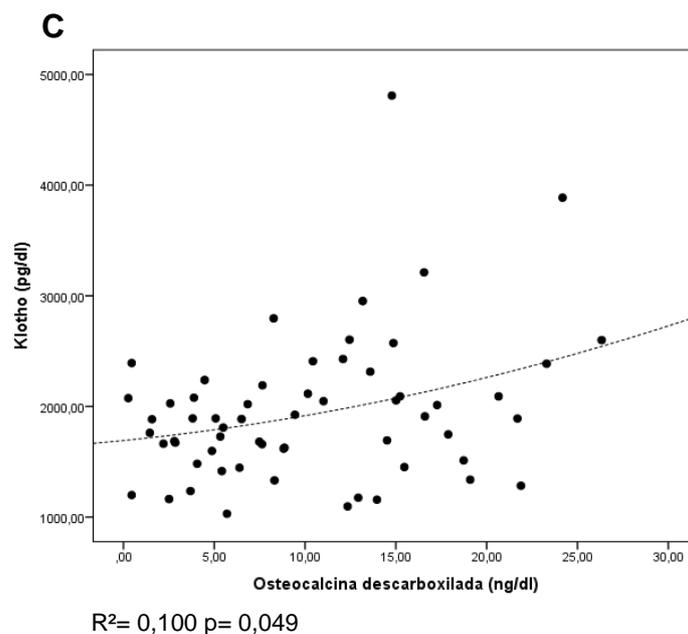




**Figura 4.** Correlações entre valores de Osteocalcina descarboxilada e componente LF da VFC (A), Osteocalcina descarboxilada e componente HF da VFC (B) e Osteocalcina descarboxilada e relação LF/HF da VFC (C) antes do tratamento ( $T_0$ ).

Com relação aos níveis séricos da proteína Klotho, utilizado como marcador de envelhecimento, observamos que quanto menores os níveis de LDL maiores os níveis de Klotho (Figura 5. A), quanto maiores os níveis de OCc maiores os níveis de Klotho (Figura 5.B) e quanto maiores os níveis de OCd maiores os níveis de Klotho (Figura 5. C).





**Figura 5.** Correlação entre Klotho e LDL (A), Klotho e OCc (B) e Klotho e OCd (C) antes do tratamento ( $T_0$ ).

A seguir, são apresentados na Tabela 3 os valores demográficos, hemodinâmicas, autonômicos, metabólicas e de biomarcadores nos grupos Galantamina vs Placebo comparando-se nos tempos pré tratamento ( $T_0$ ) vs pós tratamento ( $T_1$ ).

**Tabela 3.** Valores demográficos, hemodinâmicos e metabólicos no momento pré (T<sub>0</sub>) e pós tratamento (T<sub>1</sub>) dos grupos Galantamina e placebo.

Variáveis	Pré Galantamina	Pós Galantamina	Pré Placebo	Pós Placebo
<b>Peso (kg)</b>	93,18±11,8	92,57±12,5	91,41±13,1	90,73±13,7
<b>CA (cm)</b>	108,27±7,3	106,03±8,0*	107,93±8,8	106,57±8,8#
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	34,28±3,5	34,04±3,8	33,74±4,3	33,49±4,5
<b>PAS (mmHg)</b>	123±9,9	124±13,0	128±13,9	127±18,5
<b>PAD (mmHg)</b>	79±7,5	76±10,5	83±9,3	78±11,1
<b>LF(nu)</b>	54,96±15,58	45,60±14,81*●	48,31±17,63	53,41±16,70
<b>HF(nu)</b>	45,03±15,58	54,40±14,81*●	51,13±17,32	46,58±16,70
<b>LFHF</b>	1,76±1,07	1,11±0,75*●	1,40±1,08	1,61±1,02
<b>HDL</b>	42,36±7,78	42,65±8,42	42,53±8,77	41,96±7,29
<b>LDL</b>	124,65±38,13	115,16±32,92	125,86±40,54	116,78±34,39
<b>Triglicerídeos</b>	181,06±82,65	159,69±77,61	167,73±72,82	158,34±95,86
<b>Colesterol T.</b>	198,06±39,02	186,96±41,82	199,23±25,69	188,37±35,77
<b>Glicose</b>	102±10,75	95±9,58*	100±10,98	99±11,54
<b>Insulina<sup>L</sup></b>	17,54±8,50	11,78±6,53*●	19,11±20,80	23,88±26,17
<b>HOMA</b>	4,26±2,04	2,77±1,57*●	3,79±1,80	6,05±6,46#
<b>Adiponectina</b>	8,88±2,1	9,77±2,64*●	8,89±1,6	7,08±1,55#
<b>Leptina</b>	33,34±23,1	25,69±18,13*●	25,7±18,3	36,94±23,75#
<b>OCc</b>	21,58±5,69	22,98±6,78	18,98±5,33	20,22±6,30
<b>OCd</b>	9,61±6,79	11,33±7,37*	10,76±6,74	10,52±7,35
<b>Klotho</b>	2017,75±824,83	1963,19±839,56	1880,18±437,63	1813,66±559,81
<b>sCD40L<sup>L</sup></b>	5102,92±4474,54+	1756,06±2542,07*●	2323,62±3107,16	4903,79±4489,10#

Valores expressos em média±desvio padrão.

CA: Circunferência abdominal (cm); IMC: índice de massa corporal (kg/m<sup>2</sup>); PAS: Pressão arterial sistólica (mmHg); PAD: Pressão arterial diastólica (mmHg); OCC= osteocalcina carboxilada (ng/mL); OCd= osteocalcina descarboxilada (ng/mL)

<sup>L</sup> Variável na escala logarítmica

\* p<0,05 Galantamina pré tratamento vs pós tratamento

# p<0,05 Placebo pré vs pós

‡ p<0,05 Pré galantamina vs pré placebo

● p<0,05 Pós galantamina vs pós placebo

É possível verificar na Tabela 3 que não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao peso, IMC, PAS e PAD. No entanto, os valores de CA foram reduzidos quando comparados (T<sub>0</sub>) e (T<sub>1</sub>) em ambos os grupos.

Os parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) no domínio da frequência, demonstraram que o tratamento com Galantamina: reduziu o valor absoluto do componente normalizado de baixa frequência (LF) relacionado ao tônus simpático; aumentou o valor absoluto do componente normalizado de alta frequência (HF) relacionado ao tônus vagal; e desta forma, ocorreu significativa melhora do balanço simpato-vagal, que é expresso pela relação entre LF/HF, que se caracteriza pela redução da modulação.

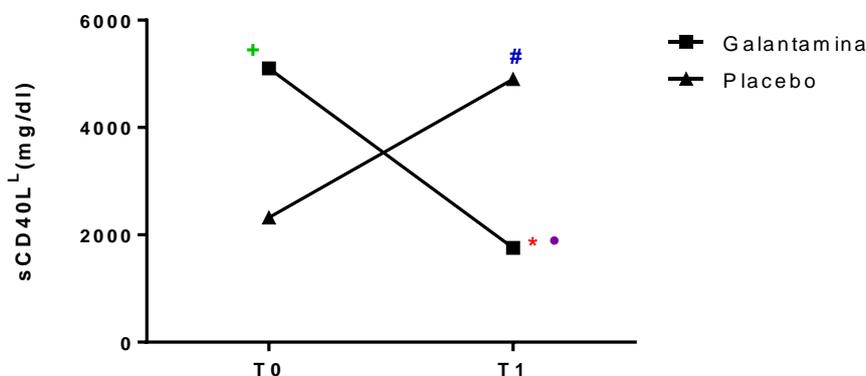
Quanto aos parâmetros metabólicos relacionados à SM destacaram-se os valores relacionadas à glicemia e a RI. Vale ressaltar que o tratamento com Galantamina resultou em redução nos níveis de glicose, de insulina circulantes e melhorou a resistência à insulina, aferida pelo índice HOMA, tanto em relação ao tempo, como na comparação entre grupos.

A Leptina, uma adipocina pró-inflamatória, apresentou redução significativa com o tratamento com Galantamina, quando comparados ao grupo placebo.

Um comportamento inverso ao observado para os níveis de leptina ocorreu com os níveis de adiponectina nos dois grupos. Dessa forma, houve aumento nos níveis de adiponectina entre os participantes que receberam Galantamina.

Quanto ao marcador pró-inflamatório sCD40L (Figura. 6), é possível observar que o tratamento com Galantamina não apenas reduziu seus níveis em relação ao grupo placebo após término do tratamento (T<sub>1</sub>), como reverteu o quadro inflamatório mais acentuado desse grupo, uma vez que seus valores estavam significativamente aumentados em relação ao placebo antes do

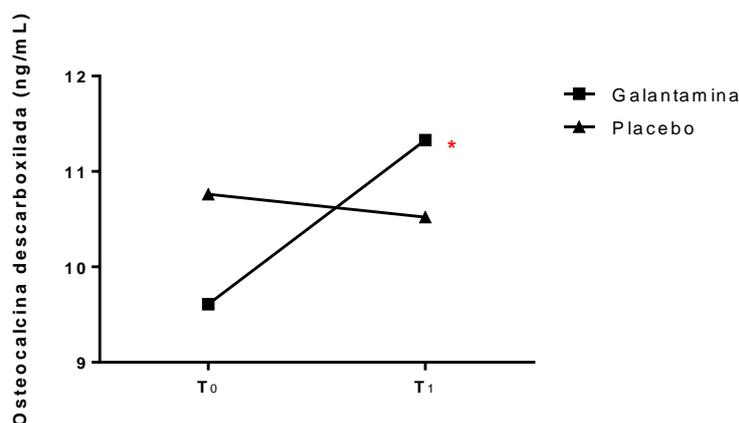
tratamento (T<sub>0</sub>). E em relação ao grupo placebo, houve aumento significativo desse marcador após o término do tratamento (T<sub>1</sub>).



- \*  $p < 0,05$  Galantamina pré tratamento vs pós tratamento
- #  $p < 0,05$  Placebo pré tratamento vs Pós tratamento
- +  $p < 0,05$  Pré galantamina vs pré placebo
- $p < 0,05$  Pós galantamina vs pós placebo
- <sup>L</sup> Variável analisada em escala logarítmica.

**Figura 6.** Níveis plasmáticos de sCD40L nos grupos Galantamina e Placebo antes (T<sub>0</sub>) e após (T<sub>1</sub>) o tratamento.

Com destaque no presente estudo, demonstramos que o tratamento com Galantamina aumenta os níveis séricos de OCd (Figura 7).



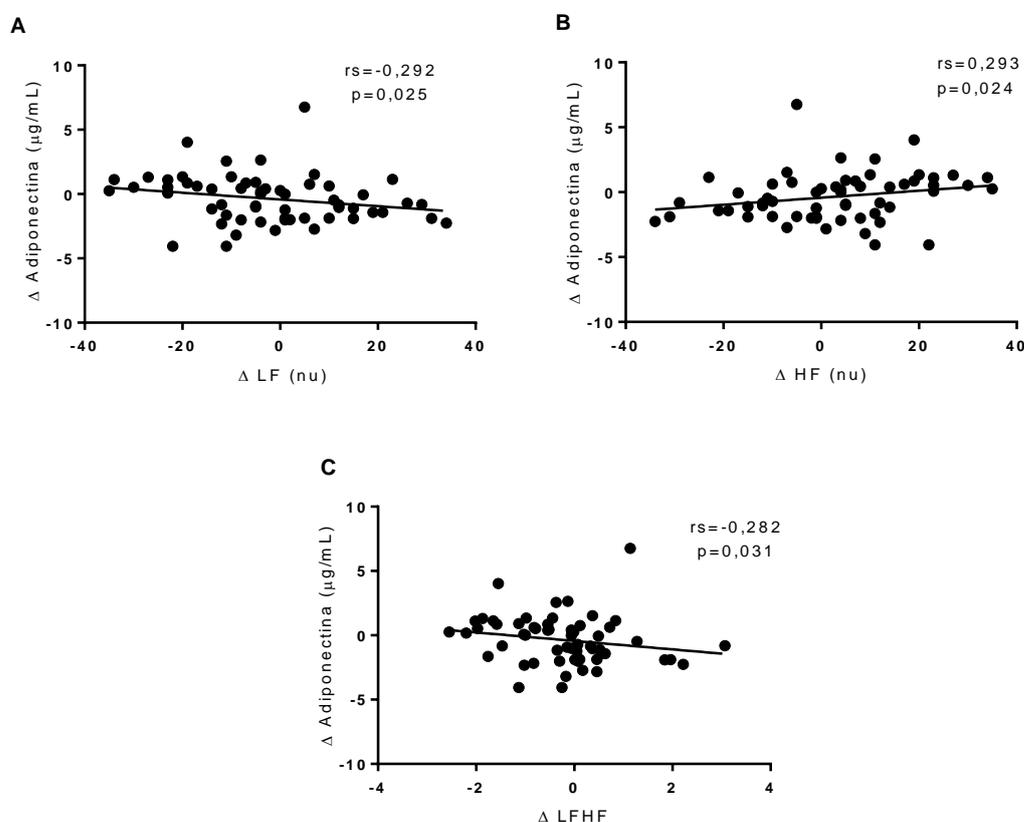
- \*  $p < 0,05$  Galantamina pré tratamento vs pós tratamento

**Figura 7.** Valores dos níveis de Osteocalcina descarboxilada nos grupos Galantamina e Placebo, antes (T<sub>0</sub>) e após o tratamento (T<sub>1</sub>).

Para ampliar a compreensão sobre a interação entre fatores no fenômeno fisiopatológico da SM, realizamos novas correlações da diferença ( $\Delta$ ) do efeito tempo (T<sub>1</sub>-T<sub>0</sub>) com todas as variáveis, para assim verificar associações a partir

da variação no decorrer do tempo. As correlações na íntegra estão descritas na tabela 5 em Anexo 3.

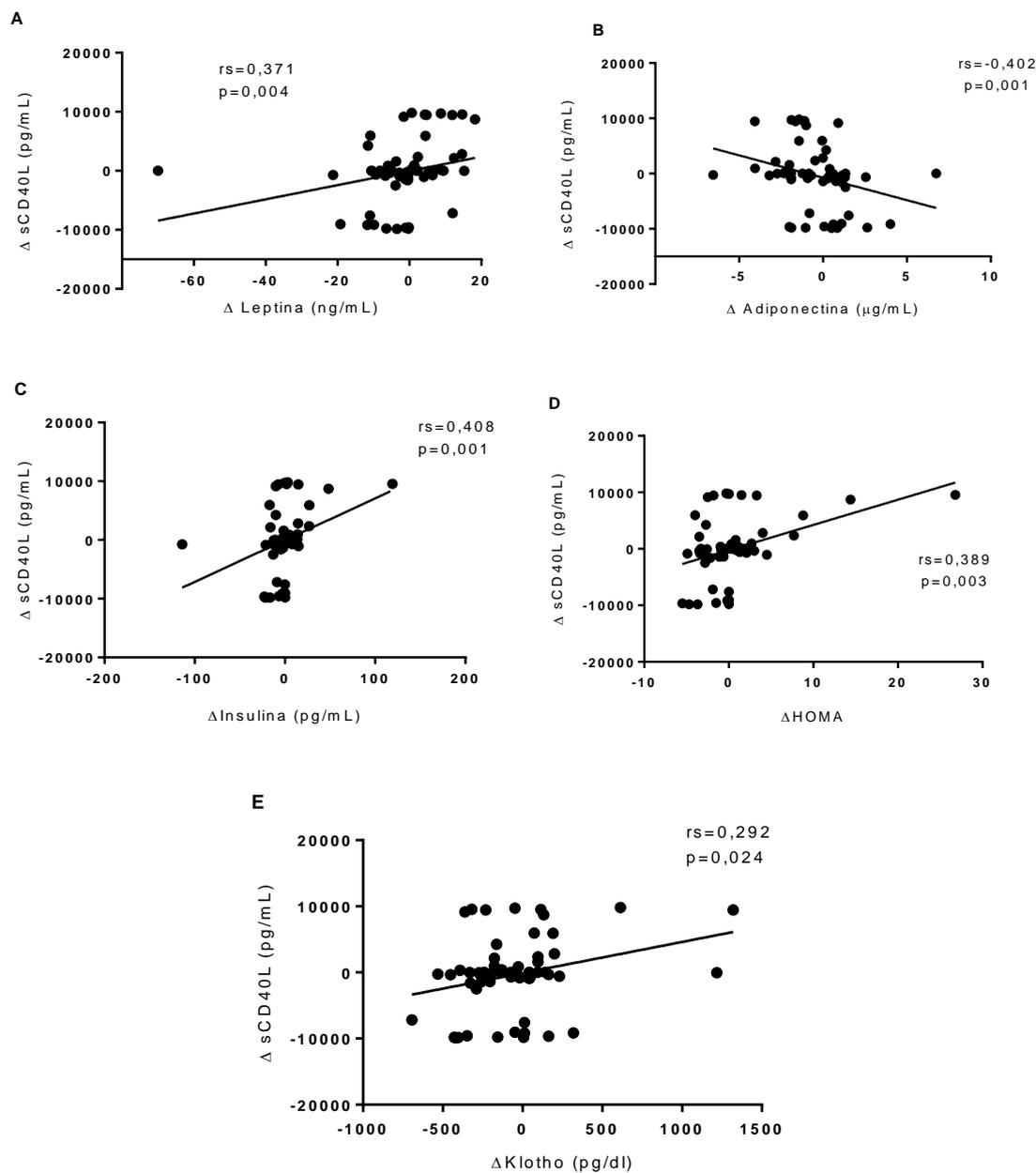
A modulação autonômica, verificada por meio dos componentes da VFC, teve correlação com o valor do  $\Delta$  Adiponectina, mostrando que quanto menor atividade do sistema simpático, representado pelo componente  $\Delta$ LF da VFC, menor os níveis de adiponectina (Figura 8. A), quanto maior atividade do sistema parassimpático, representado pelo componente  $\Delta$ HF da VFC, maior os níveis de adiponectina (Figura 8. B) e quanto mais adiponectina circulante, melhor o balanço autonômico, com menor valor da relação  $\Delta$  LF/HF (Figura 8.C).



**Figura 8.** Correlação (rs) entre  $\Delta$ Adiponectina e valores dos componentes da VFC:  $\Delta$ LF (A),  $\Delta$ HF (B) e  $\Delta$ LFHF (C).

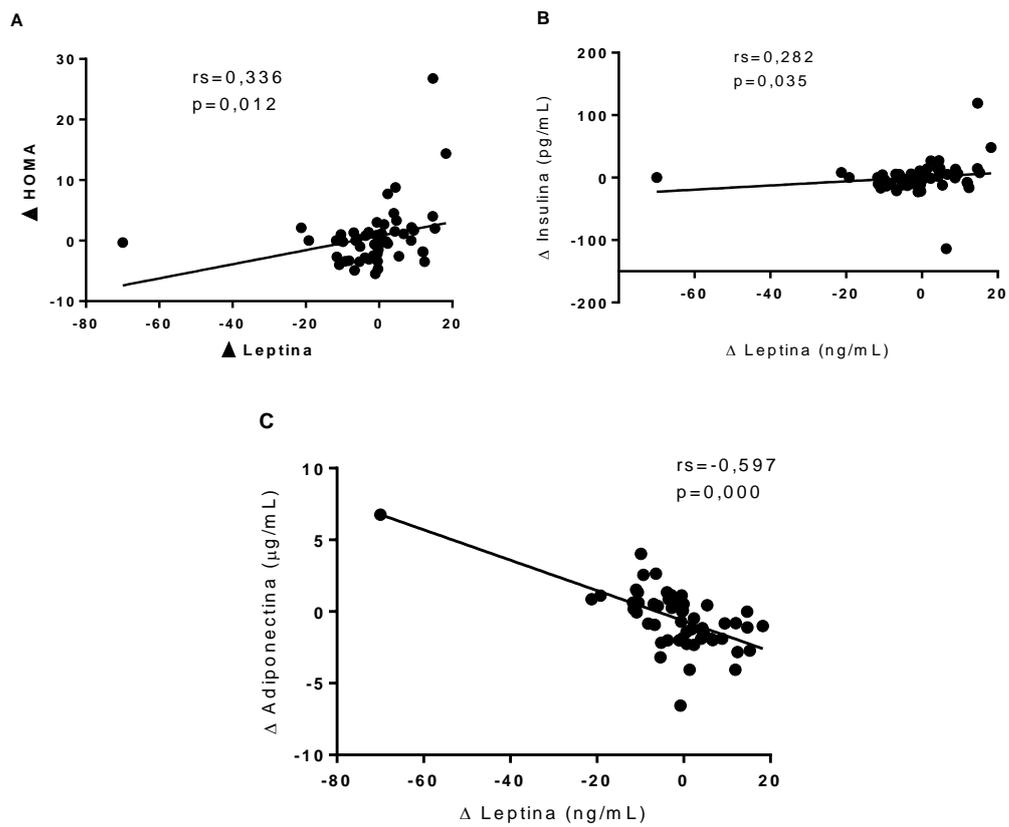
Os valores metabólicos e biomarcadores demonstraram correlação com o marcador inflamatório  $\Delta$  sCD40L. Verificamos que quanto maior os níveis de leptina, maior os níveis de sCD40L (Figura 9. A), de forma inversa, quanto maior os níveis de adiponectina, menor os níveis de sCD40L (Figura 9.B), quanto maior os níveis de insulina, maior os níveis de sCD40L (Figura 9.C), da mesma forma, quanto maior o índice de RI aferida pelo HOMA, maior os níveis de sCD40L

(Figura 9.D), por fim, quanto maior os níveis de Klotho maior os níveis de sCD40L (Figura 9.E).



**Figura 9.** Correlação entre  $\Delta$ Leptina e  $\Delta$ sCD40L (A),  $\Delta$ Adiponectina e  $\Delta$ sCD40L (B),  $\Delta$ Insulina e  $\Delta$ sCD40L (C),  $\Delta$ HOMA e  $\Delta$ sCD40L (D),  $\Delta$ Klotho e  $\Delta$ sCD40L (E).

Demonstramos que quanto maior os níveis de HOMA, maior os níveis de leptina (Figura 10. A), da mesma forma, quanto maior os níveis de leptina, maior os níveis de Insulina (Figura 10. B), de forma inversa, quanto maior os níveis de adiponectina, menor os níveis de leptina (Figura 10. C).



**Figura 10.** Correlação entre  $\Delta$ Leptina e  $\Delta$ HOMA (A),  $\Delta$ Leptina e  $\Delta$ Insulina (B) e  $\Delta$ Leptina e  $\Delta$ Adiponectina (C).

## 5. DISCUSSÃO

O nosso estudo foi o primeiro da literatura a demonstrar que o tratamento com a Galantamina aumenta significativamente os níveis séricos de OCd em portadores de SM. Ainda, demonstramos que houve correlação positiva da OCd com aumento da atividade parassimpática (componente HF da VCF), correlação negativa com a atividade simpática (componente LF da VFC) e melhor balanço simpato-vagal (relação LF/HF da VFC). Entretanto, na população estudada, não foram detectadas diferenças significativas dos níveis da proteína Klotho com o uso de Galantamina. De forma significativa, o uso de Galantamina levou a diminuição dos níveis de sCD40L, utilizado como marcador pró inflamatório e de lesão endotelial.

Análises anteriores do nosso laboratório demonstraram que o tratamento com a Galantamina, em pacientes com SM, diminuiu significativamente os níveis de leptina, aumentou os níveis de adiponectina e também melhorou a RI, pois diminuiu os valores do índice HOMA (Sangaletti e cols, 2016). No presente trabalho, acrescentamos um elemento no elo fisiopatológico (SNA e metabolismo da glicose), a OC, que foi significativamente modulada pelo aumento da atividade parassimpática.

A OC é um peptídeo sintetizado exclusivamente por osteoblastos e armazenados na matriz mineral óssea, e foi inicialmente reconhecido como um marcador de formação óssea, atuando na manutenção da mineralização óssea normal, suprimindo a formação anormal de hidroxiapatita e retardando a mineralização do crescimento da cartilagem (Price e cols, 1976; Pearson, 2007).

Anos depois, os trabalhos de Ducy e cols (1996) e Lee e cols (2007) foram os primeiros a demonstrar que a OC participa da regulação endócrina do metabolismo energético, descrevendo o aumento da gordura visceral e da RI em camundongos com deficiência de OC (*Osn -/-*). Inúmeros trabalhos têm mostrado o papel da OC como um hormônio que regula o metabolismo da glicose (Liang e cols, 2016). Tan e cols (2011) evidenciaram que a OC no diabetes do tipo 2 (DM2) favorece a proliferação de células  $\beta$ , a expressão e secreção de insulina, bem como aumenta a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos (Tan e cols, 2011).

Em estudos com animais, a OC tem sido associada à proliferação de células  $\beta$  no pâncreas e ao aumento da sensibilidade à insulina no tecido adiposo e muscular (Zanatta e cols, 2014). Nos seres humanos, os níveis circulantes de OC foram inversamente associados a medidas de resistência à insulina (insulina em jejum e níveis de glicose e avaliação do modelo de homeostase da resistência à insulina [HOMA-IR]) e adiposidade (IMC e percentual de gordura) (Pittas e cols, 2009; Kindblom e cols, 2009; Kanazawa e cols, 2009).

O gene OC, que é codificado exclusivamente por OB, é responsável pela produção de OC, bem como pelo gene *Gprc6a*, codificado pelas células beta pancreáticas e regula a síntese dos receptores de OC (Zanatta e cols, 2014). O *Gprc6a*, é um membro dos receptores acoplados à proteína G sensíveis à toxina pertussis. Quando ativado, ele é capaz de fosforilar proteínas-chave da via de secreção da insulina nas células  $\beta$  pancreáticas (Pi e cols, 2008).

Pi e cols, observaram em um modelo animal com deleção de *Gprc6a* um fenótipo complexo envolvendo múltiplos sistemas e incluindo osteopenia, esteatose hepática, intolerância à glicose e RI (Pi e cols, 2011). Esses autores postularam que as células  $\beta$  pancreáticas poderiam ter um receptor equivalente, sensível às ações da OCd. A partir de várias experiências utilizando células embrionárias humanas, células  $\beta$  pancreáticas de camundongos e camundongos deficientes em *Gprc6a*, os pesquisadores descobriram que o *Gprc6A* medeia respostas a OC em células  $\beta$  *in vitro* e no pâncreas *in vivo*. Estes dados preliminares sugeriram que o *Gprc6a* como um receptor biologicamente relevante para a OC em células  $\beta$  pancreáticas humanas (Pi, Wu e Quarles, 2011; Liang e cols, 2016).

A OCd é a isoforma hormonalmente ativa da OC e sua interação com o metabolismo da glicose também tem sido amplamente discutida. A OCd é resultado de resíduos de ácido glutâmico da OC nas posições 17, 21 e 24 onde são carboxilados por carboxilase dependente de vitamina K (Liang e cols, 2016). Em modelos animais, a OCd mostrou ser um modulador positivo da secreção de insulina (Ferron e cols, 2008). *In vitro*, a OCd estimula a proliferação de células  $\beta$  pancreáticas e a secreção de insulina e aumenta a produção de adiponectina nas células de gordura, resultando num aumento da sensibilidade à insulina. Em conjunto, essas ações revelam um mecanismo de feedback positivo entre

células  $\beta$  pancreáticas, tecido adiposo e osso, com a insulina favorecendo a produção de OCd, o qual, por sua vez, aumenta a produção e sensibilidade de insulina (Ducy e cols, 1997; Ferron, Karsenty e Ducy, 2008; Zannata e cols, 2014).

Estudos epidemiológicos em humanos demonstraram a correlação da OC com parâmetros metabólicos.

Vários estudos transversais, em populações caucasianas e asiáticas, mostraram que o nível total de OC está correlacionado negativamente com a avaliação da insulina em jejum e com a resistência à insulina (o HOMA) (Kindblom e cols, 2009; Im e cols, 2008). Em 2010, Saleem e cols realizaram um grande estudo observacional em 1.284 afro-americanos e 1.209 indivíduos brancos não-hispânicos, correlacionando OC com adipocinas (leptina e adiponectina) e marcadores de SM, gordura corporal e atividade física. Em ambas as populações, a OC foi inversamente relacionada à leptina e marcadores metabólicos, como IMC, CA, glicemia, insulina e triglicérides e diretamente relacionados à adiponectina e verificaram que quanto pior a gravidade da SM mais baixos eram os níveis de OC, independentemente das alterações glicêmicas. O mesmo foi observado em um estudo na China, com 254 homens e 246 mulheres, os autores demonstraram que o nível total de OC está intimamente associado ao metabolismo da glicose (Zhou e cols, 2009). Bao e cols. (2013) verificaram, em uma coorte de 1768 homens chineses, que o aumento dos níveis séricos da OC foi acompanhado por uma tendência decrescente em todos os índices antropométricos de obesidade, PAS, glicemia, índice de RI, triglicérides, ácidos graxos livres e níveis de proteína C reativa. O estudo também demonstrou que gordura visceral estava inversamente relacionada aos níveis de OC, independentemente da glicemia e gordura corporal total.

Estudos epidemiológicos examinando especificadamente a associação entre os níveis de OCd com parâmetros metabólicos são em menor número e com resultados não uniformes (Yoshida e cols, 2008; Hwang e cols, 2009; Shea e cols, 2009; Kanazawa e cols, 2011; Zannata e cols, 2014).

Hwang e cols, encontraram uma associação significativa de tercís superiores de OCd com índices glicêmicos mais baixos e melhora da

sensibilidade à insulina (Hwang e cols, 2009). Corroborando estes achados, um estudo envolvendo 180 homens diabéticos demonstrou uma correlação inversa entre OCd e glicemia de jejum, HbA1c e gordura visceral. Entretanto, essas associações não foram observadas em um grupo de mulheres na pós-menopausa (Kanazawa e cols, 2011). Schafer e cols, investigaram o tratamento da Osteoporose, e verificaram que influencia nos níveis de OCd, tendo um aumento significativo e teve impacto sobre a gordura corporal e os índices glicêmicos, sendo inversamente relacionada ao peso corporal e massa gorda total após os 12 meses de tratamento e foi diretamente relacionada ao aumento da adiponectina (Schafer e cols, 2011). Nosso estudo demonstrou que a OCd está correlacionada de forma positiva com o balanço simpato vago ( $R^2=0,075$   $p=0,036$ ) e com os níveis de Klotho ( $R^2=0,100$   $p=0,049$ ).

No nosso estudo, não detectamos correlação entre OC e OCd com os parâmetros metabólicos. Isso pode decorrer do fato da população ser muito homogênea quanto às características da SM, ou ser necessário um número mais elevado de indivíduos para se obter essa correlação.

Níveis de OC têm sido também estudados como preditores de risco metabólico.

Um estudo da Suécia avaliou mais de 1.000 homens idosos diabéticos e não diabéticos (com idade média de 75 anos) e verificou que os níveis séricos de OC eram um fator preditor negativo, independente, para as concentrações plasmáticas de glicose (Kindblom e cols, 2009). Uma análise transversal posterior, envolvendo 380 adultos com mais de 65 anos, encontrou correlação negativa entre os parâmetros metabólicos e os níveis de OC (Pittas e cols, 2009). Em um estudo chinês com mais de 500 indivíduos com e sem diabetes, foi observada uma correlação negativa entre os níveis de OC e o metabolismo lipídico (Zhou e cols, 2009). Yeap e cols em 2010, acompanharam 198 pacientes por três anos e aqueles com altos níveis basais de OC, apresentaram menor aumento na glicose plasmática durante o seguimento. Estes resultados foram posteriormente corroborados por um grande estudo de coorte que avaliou mais de 2.760 homens idosos, que apresentaram menores níveis de OC na presença de SM, bem como pior índice glicêmico e de sensibilidade à insulina. Em 2011, García-Martín e cols, realizaram um estudo com 54 mulheres saudáveis não

diabéticas na pós-menopausa para investigar se a OC sérica poderia ser um marcador de risco metabólico. Eles encontraram uma associação positiva entre OC com glicose de jejum, colesterol LDL e obesidade, e também relataram que concentrações séricas de OC inferiores a 13,5 ng/mL têm sensibilidade de 85,7% e especificidade de 63,8% na detecção de risco aumentado de diabetes. Mais recentemente, Onyenekwu e cols (2016) avaliaram a relação entre a OC e controle glicêmico e os parâmetros da SM em pacientes com e sem SM diagnosticados pelos critérios da Federação Internacional de Diabetes, os autores verificaram que os níveis plasmáticos de OC estão inversamente associados a um bom controle glicêmico e a componentes da SM e são menores em indivíduos com DM e nos pacientes com SM. Os autores concluíram que o osso tem um papel vital na regulação da glicose e do metabolismo energético (Onyenekwu e cols, 2016).

Ainda, estudos demonstraram correlações inversas entre a OC e marcadores de DCV, sugerindo a possibilidade da OC ser utilizada como adjuvante no diagnóstico de lesão vascular subclínica.

Kanazawa e cols, demonstraram uma correlação inversa entre níveis mais elevados de OC e marcadores de aterosclerose (menor índice braço-tornozelo e aumento da espessura íntima-média) sugerindo que a OC pode estar implicada na doença aterosclerótica (Kanazawa e cols, 2009). Outro estudo observacional em 102 pacientes menores de 40 anos, identificou uma associação negativa entre níveis de OC e infarto agudo do miocárdio (IAM) (Goliasch e cols, 2011).

A possibilidade da OC ser modulada por meio de diferentes intervenções está sendo investigada.

Em um estudo com um pequeno grupo de mulheres obesas que foram submetidas a intervenção com dieta hipocalórica e / ou atividade física por 16 semanas, Fernández-Real e cols (2009), verificaram a correlação entre os níveis de OC com as intervenções e com a sensibilidade à insulina. Os resultados mostraram que a atividade física proporcionou maiores aumentos da OC sérica quando comparado a dieta sozinha, mesmo com menor perda de peso no primeiro grupo. A redução da gordura visceral foi o melhor preditor independente de alteração nos níveis de OC, o que foi positivamente correlacionado com a

sensibilidade à insulina. Nesse sentido, os resultados sugerem que a atividade física melhora a sensibilidade à insulina ao aumentar os níveis séricos de OC.

Nosso estudo demonstrou que o tratamento com Galantamina é capaz de aumentar os níveis séricos de OCd, melhorar a RI e reduzir os valores de glicose, sugerindo que a Galantamina pode estar atuando no organismo com resultados positivos que se assemelham com a atividade física. Esses estudos envolvem duas intervenções (droga e atividade física) que têm em comum, a atuação sobre o SNA, reduzindo a modulação simpática e aumentando a modulação vagal, aumentando os níveis de OC que reduzem os valores de glicemia e insulina, melhorando o metabolismo energético. Nosso estudo destaca o efeito da Galantamina independente da perda de peso, pois todos os pacientes apresentaram o mesmo IMC e redução na CA no período de tratamento (12 semanas) (Tabela 2).

Fica claro do exposto, que o osso tem emergido como um regulador dos processos metabólicos, em especial, no metabolismo da glicose pela sua capacidade de secretar OC. Entretanto, essa é somente uma parte de um complexo conjunto de sistemas que agem de forma integrada, tendo o sistema nervoso um papel fundamental.

Estudos recentes têm desvendado alguns dos complexos mecanismos pelos quais o osso, o tecido adiposo e o cérebro agem em conjunto para regular o gasto energético e a homeostase da glicose (Lee e cols 2007; Lee e Karsenty, 2008; Kawai e cols, 2009). Os osteoblastos parecem regular o gasto de energia ao secretar substâncias que atuam em adipócitos e células pancreáticas sendo a via da OC a mais estudada (Lee, Hodges e Eastell, 2000). Por sua vez, o tecido adiposo também pode influenciar a remodelação óssea regulando a atividade dos osteoblastos através de adipocinas, incluindo a leptina (Takeda e Karsenty, 2000; Ducy, Schinke e Karsenty, 2000) e a adiponectina (Richard e cols, 2007).

A leptina é uma das principais moléculas secretadas pelos adipócitos e que agem diretamente no SNS modulando a atividade do SNA para diferentes tecidos, incluindo o tecido ósseo e o metabolismo da glicose (Takeda e cols, 2002; Karsenty, 2006).

Dados na literatura demonstram que, a leptina em contraste com a OC, inibe a secreção de insulina, em parte por meio de um efeito direto sobre as células  $\beta$  (Covey e cols, 2006, Morioka e cols, 2007). Além disso, por meio de outros mecanismos denominados indiretos, no qual a leptina atua para reduzir a secreção de insulina. Dentre eles, demonstrou-se que a leptina afeta as funções dos osteoblastos, diminuindo a atividade da OC, e conseqüentemente podendo inibir a secreção de insulina (Friedman e Halaas, 1998, Kieffer e Habener, 2000; Ducy e cols, 2000; Hinoi e cols, 2008). Estudos revelam que a leptina inibe a função endócrina do esqueleto por meio de 3 passos de uma cascata: (1) a leptina aumenta o tônus simpático (2) A atividade simpática aumentada aumenta a expressão do gene *esp* nos osteoblastos (3) a expressão desse gene diminui a bioatividade da OC (Hinoi e cols, 2008).

Estudos clínicos comprovaram a relação entre leptina e distúrbios metabólicos. Bastard e colaboradores em 2006 relatam que a leptina é um importante marcador de massa gordurosa corporal, apresentando associação direta com o IMC. Kajikawa e cols em 2011, estudaram 104 indivíduos (59 homens e 45 mulheres) diagnosticados com SM e verificaram que a Leptina se correlacionou de forma positiva com circunferência da cintura, IMC e HOMA, além disso, o estudo demonstrou que a leptina se associa positivamente com fatores de risco presentes na SM enquanto que os níveis de adiponectina foram negativamente associados à SM. Esteghamati e cols (2008), realizou um estudo com 2309 pacientes iranianos diagnosticados com SM em diferentes graus de obesidade, foram 1.511 indivíduos não obesos, 535 eram moderadamente obesos, 176 eram severamente obesos e 87 eram obesos mórbidos. Nesse estudo foi verificado que o HOMA foi significativamente correlacionada com o IMC em todos os indivíduos. Esses achados corroboram nossos dados que também mostraram correlação positiva da Leptina com os valores de IMC ( $R^2=0,149$   $p=0,012$ ); além disso demonstramos correlação negativa com os níveis de adiponectina.

No nosso estudo, a redução da modulação simpato-vagal foi acompanhada da redução dos níveis de leptina e aumento da adiponectina. Dessa forma, podemos inferir que a redução dos níveis de leptina pode ser decorrente, pelo menos em parte, de alterações na ativação autonômica no

tecido adiposo (redução da atividade simpática). Outro potencial mecanismo, seria a redução da leptina dependente da redução da atividade inflamatória também nesse tecido (atividade parassimpática). Ainda que no nosso estudo não seja possível a distinção desses mecanismos, dados indiretos demonstraram que, de fato, ocorreu redução de marcador inflamatório sistêmico.

O receptor de membrana CD40 é expresso em células do sistema imune e em células da parede vascular. Quando ativado, através de seu ligante CD40L, desencadeia uma série de processos celulares destinados à ativação da resposta imune. Nas células apresentadoras de antígenos, a ativação de CD40 é fundamental para decisão do sistema imune de criar uma resposta eficaz ou tolerância, e a disfunção nessa via de sinalização está presente na patogênese de doenças autoimunes, aterosclerose e sepse. Ensaios desenvolvidos para a detecção do CD40L solúvel (sCD40L) foram fundamentais para a compreensão do papel dessa via de sinalização em doenças humanas (Souza, 2007).

Estudos demonstraram que pacientes com fatores de risco para doença coronariana, como hipercolesterolemia familiar (Semb e cols, 2003) ou diabetes (Varo e cols, 2003), possuem níveis séricos mais elevados de sCD40L. Natal e cols (2008), estudaram 374 indivíduos, sendo 128 diagnosticados com SM e 246 saudáveis e verificaram que a expressão de sCD40L está aumentada em pacientes com SM com relação aos saudáveis. Além disso, monócitos circulantes em pacientes com SM expressam mais CD40 e CD40L do que nos controles. A adiponectina diminui a expressão de CD40L em monócitos e células endoteliais, sugerindo que sistema CD40/CD40L é de relevância fisiopatológica na SM, além disso, sugeriram que a adiponectina tem um novo efeito anti-inflamatório por meio da modulação do sistema CD40/CD40L, tanto em macrófagos quanto em células endoteliais, podendo ser um mecanismo no qual a adiponectina age protegendo a vasculatura. Nossos achados demonstraram correlação positiva do sCD40L com os níveis de insulina ( $r_s=0,408$   $p=0,001$ ) e HOMA ( $r_s= 0,389$   $p= 0,003$ ). Além disso, houve correlação negativa dos níveis de adiponectina com os níveis de sCD40L ( $r_s=-0,402$   $p=0,001$ ), corroborando um efeito protetor da adiponectina.

Estudos sugerem que a regulação dos níveis de sCD40L no tratamento da obesidade (Desideri e Ferri, 2003; Schernthaner e cols 2006) e diabetes (Varo e cols, 2003) podem resultar em menor risco de desenvolvimento de DCV.

Schernthaner e cols (2006) demonstraram que níveis menores de sCD40L circulante, melhoram a resistência à insulina e a inflamação crônica em pacientes com obesidade mórbida após a cirurgia bariátrica. Os níveis circulantes de sCD40L em pacientes com obesidade mórbida foram intimamente relacionados ao HOMA, níveis de insulina, triglicerídeos e aos biomarcadores inflamatórios (MCP-1 e hsCRP) no estado pré-operatório.

No nosso estudo, houve, com a estimulação colinérgica, redução dos níveis de sCD40L ( $5102,92 \pm 4474,54$  vs  $1756,06 \pm 2542,07$  pg/mL) e aumento da adiponectina ( $8,88 \pm 2,1$  vs  $9,77 \pm 2,64$   $\mu$ g/mL), corroborando mais uma vez com os dados da literatura sobre a hipótese da adiponectina ter efeitos sobre a modulação dos níveis de sCD40L, e conseqüentemente, uma ação anti-inflamatória. Podemos enfatizar o papel central da modulação autonômica na modulação da resposta inflamatória na SM. Além disso nosso estudo mostrou correlação positiva da adiponectina com o aumento da atividade parassimpática (componente HF da VFC) ( $r_s=0,293$   $p=0,024$ ), negativa com a atividade simpática (componente LF da VFC) ( $r_s=-0,292$   $p=0,025$ ) e melhor balanço simpato-vagal (relação HF/LF da VFC) ( $r_s=-0,282$   $p=0,031$ ).

É reconhecido que portadores de SM apresentam problemas cardiovasculares precoces, podendo-se inferir que esses indivíduos possuem um envelhecimento antecipado do sistema. Um dos reguladores do processo de envelhecimento a nível molecular é o gene Klotho. O gene Klotho foi identificado quando, em um experimento com camundongos hipertensos, um gene foi acidentalmente interrompido, e resultou em um conjunto de características que se assemelham a uma falha prematura de múltiplos órgãos que antecipam ao envelhecimento e mortalidade (Kuro-o e cols, 1997; Takeshita e cols, 2004; Wang e Sun, 2009). Camundongos induzidos à deficiência de Klotho manifestaram vários distúrbios relacionados com a idade observada em humanos, incluindo aterosclerose, infertilidade, atrofia da pele, osteoporose, enfisema pulmonar, calcificação ectópica e vida útil curta (Ikushima e cols, 2005).

Saito e cols, estudaram o gene *Klotho* utilizando um modelo animal experimental de doença aterosclerótica *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty* (OLETF), que apresentam múltiplos fatores de risco aterogênicos (por exemplo, hipertensão, obesidade, hiperglicemia grave e hipertrigliceridemia) e verificaram que a liberação do gene *klotho* mediada por adenovírus pode (1) melhorar a disfunção endotelial vascular, (2) aumentar a produção de óxido nítrico, (3) reduzir a pressão arterial elevada e (4) prevenir a hipertrofia da média e fibrose perivascular. Com base nestas constatações, concluíram que a expressão do gene *klotho* melhora a disfunção endotelial através de uma via envolvendo óxido nítrico e está envolvida na modulação da função vascular (Saito e cols, 2000).

Arking e cols, aplicaram dois marcadores polimórficos de microssatélites recentemente caracterizados, flanqueando o gene num estudo de associação baseado na população para determinar se a variação no locus *KLOTHO* humano contribui para a sobrevivência. Nesse estudo eles identificaram um alelo, denominado *KL-VS*, contendo seis variantes de sequência em desequilíbrio de ligação completo, dois dos quais resultam em substituições de aminoácidos *F352V* e *C370S* (Arking e cols 2002). Em 2011, Majumdar e Christopher, verificaram a associação dessas variantes do gene *Klotho* (*KL-VS*) com a SM. Verificaram que os portadores do genótipo *VV* da variante *KL-VS* apresentavam risco aumentado para SM, o que poderia estar relacionado com a sua susceptibilidade à hipertensão arterial, à elevada glicemia de jejum e à tendência para hipertrigliceridemia. Juntamente com estes três marcadores da SM, também foi possível estabelecer uma associação da variante com a RI (Majumdar e Christopher, 2011). Embora a avaliação da RI não esteja incluída na definição de SM do NCEP, ela tem sido considerada como uma das principais causas subjacentes da SM, conforme descrito anteriormente. Os achados do estudo de Majumdar e Christopher indicaram que o *Klotho* tem um impacto em múltiplos aspectos da SM, incluindo PA, metabolismo lipídico, bem como RI. Nzietchueng e cols (2011) estudaram um total de 1023 pacientes que participavam de dois grupos de um estudo de coorte, um grupo chamado *STANISLAS* com 1006 famílias sem doenças crônicas ou agudas do centro de medicina preventiva de Vandoeuvre-lès-Nancy do leste da França (indivíduos jovens e supostamente saudáveis) (Visvikis-Siest e Siest, 2008) e o outro grupo

chamado “ERA” selecionados de uma coorte parisiense, contendo 345 homens e 162 mulheres que realizaram exames de saúde na clínica de investigação e prevenção (indivíduos de mais idade). Nesse estudo os autores verificaram que o genótipo KL-VS foi significativamente associado com menor PAS e pressão de pulso (PP) tanto nos indivíduos jovens quanto idosos e que esse genótipo estava relacionado aos níveis de PA ao interagir com o tratamento anti-hipertensivo. Concluindo que esse genótipo KL-VS pode estar associado à diminuição do risco cardiovascular e pode interagir com o tratamento anti-hipertensivo para reduzir a PA, isso possibilitaria identificar subgrupos de hipertensos adultos que poderiam ter uma resposta benéfica com terapias anti-hipertensivas (Nzietchueng e cols, 2011).

Mais recentemente, Kim e cols (2015) realizaram um estudo de revisão sobre o Klotho, no qual reafirmaram que as três formas da proteína Klotho têm funções distintas. A proteína de membrana Klotho funciona como um co-receptor obrigatório para FGF23, que está envolvido no envelhecimento e no desenvolvimento de doenças crônicas através da regulação do fosfato (Pi) e metabolismo da vitamina D. O Klotho secretado (solúvel) funciona como um fator humoral com efeitos pleiotrópicos, incluindo a regulação do estresse oxidativo, a sinalização do fator de crescimento e a homeostase iônica. O Klotho secretado também está envolvido na proteção de órgãos. A forma intracelular de Klotho suprime a inflamação mediada por senescência celular e metabolismo mineral (Kim e cols, 2015). Nos seres humanos, a forma solúvel do Klotho é predominante (Matsumura e cols, 1998) e diminui com a idade (Xiao e cols, 2004).

Um estudo recente com 31 adolescentes polonesas diagnosticadas com anorexia nervosa e 29 controles, verificou correlação positiva entre a proteína Klotho com peso, IMC, insulina e HOMA somente nos pacientes com anorexia nervosa (Oświęcimiska e cols, 2015). Em contrapartida, outro estudo comparou 11 pacientes obesos, 12 pacientes com anorexia nervosa e 11 pacientes saudáveis e verificou níveis mais baixos da proteína Klotho em pacientes obesos e com anorexia nervosa quando comparado ao grupo controle (Amitani e cols 2013). Outros estudos demonstraram que não há correlação do Klotho com IMC

em indivíduos saudáveis tanto adultos quanto crianças (Pedersen e cols 2013; Gkentzi e cols, 2014; Oświęcimska e cols, 2015).

Donate-Correa e cols, verificaram também em um estudo de revisão, que a proteína Klotho, além de seu papel como um regulador da fosfatemia, também está envolvido na manutenção da saúde cardiovascular, sendo associado suas alterações com o desenvolvimento de danos cardiovasculares e aumento da morbimortalidade. Os mecanismos moleculares do Klotho não são bem compreendidos, mas uma área de pesquisa emergente relaciona a deficiência de Klotho com a patologia vascular. Alterações dessa proteína têm sido associadas com complicações cardiovasculares como: inflamação, calcificação vascular e disfunção endotelial (Donate-Correa e cols, 2015).

Maekawa e cols (2009) demonstraram que o mecanismo de regulação da inflamação pela proteína Klotho pode ser baseado na inibição da atividade de NFκB no endotélio.

No nosso estudo, o Klotho não apresentou diferença estatisticamente significativa após o tratamento com Galantamina, no entanto, foi o primeiro da literatura a demonstrar uma correlação positiva com a OCd ( $R^2=0,100$   $p=0,049$ ).

## 6. CONCLUSÃO

A administração de Galantamina, aumentou os níveis circulantes de OCd e reduziu valores de sCD40L, que são considerados, respectivamente, biomarcadores do metabolismo energético, e de inflamação e disfunção endotelial. Podemos inferir que a melhora da RI com uso da Galantamina, previamente demonstrada, pode ser mediada, pelo menos em parte, por modulação nas vias dependentes da OCd e sCD40L. As correlações detectadas entre OCd e sCD40L com diferentes parâmetros autonômicos e metabólicos, e leptina / adiponectina, corroboram o conceito de que há grande inter-relação entre os sistemas: nervoso – tecido adiposo – osso.

Em conjunto, esses dados demonstram que o aumento da estimulação colinérgica melhora o perfil metabólico, inflamatório e energético em pacientes com SM. Futuros estudos são necessários para elucidar o impacto dessas alterações no desenvolvimento das doenças cardiovasculares e consolidar a estimulação colinérgica como potencial alvo terapêutico na SM.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 15, n. 7, p. 539–553, 1998.

ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome - A new worldwide definition. **Lancet**, v. 366, n. 9491, p. 1059–1062, 2005.

ALEXANDER, C. M. et al. NCEP-Defined Metabolic Syndrome, Diabetes, and Prevalence of Coronary Heart Disease Among NHANES III Participants Age 50 Years and Older. **Diabetes**, v. 52, n. 5, p. 1210–1214, 2003.

ALI, M. A. et al. Antidiabetic effect of galantamine: Novel effect for a known centrally acting drug. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–28, 2015.

ANDO, K.; FUJITA, T. Metabolic syndrome and oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 3, p. 213–218, 2009.

ARIZA, D. et al. Dysautonomias in Parkinson's disease: cardiovascular changes and autonomic modulation in conscious rats after infusion of bilateral 6-OHDA in substantia nigra. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 308, n. 3, p. H250–H257, 2015.

ARKING, D. E. et al. Association of human aging with a functional variant of klotho. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 2, p. 856–61, 2002.

ARMITAGE, R. J. et al. Identification of a source of biologically active CD40 ligand. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 8, p. 2071–2076, 1992.

AVOLIO, G. et al. O papel da vitamina D 3 e da osteocalcina no metabolismo ósseo: uma análise necessária para se otimizar a osseointegração. **Revista Inst Ciencia e Saúde**, v. 26, n. 3, p. 347–350, 2008.

AZAMBUJA, M. I. R. et al. Economic burden of severe cardiovascular diseases in Brazil: an estimate based on secondary data. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 91, n. 3, p. 148–155, 2008.

BALKAU, B.; CHARLES, M. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR). **Diabet Med**, v. 16, p. 442–443, 1999.

BAO, Y. et al. Inverse Relationship between Serum Osteocalcin Levels and Visceral Fat Area in Chinese Men. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 98, n. 1, p. 345–351, 2013.

BAO, Y. et al. Serum levels of osteocalcin are inversely associated with the metabolic syndrome and the severity of coronary artery disease in Chinese men. **Clinical Endocrinology**, v. 75, n. 2, p. 196–201, 2011.

BASTARD, J.-P. P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **Eur Cytokine Netw**, v. 17, n. 1, p. 4–12, 2006.

BEHLING, A. et al. Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces ventricular arrhythmia and enhances heart rate variability in heart failure. **Am Heart J**, v.146, n.3, p 494-500, 2003;

BLALOCK, J. E. The immune system as the sixth sense. **Journal of Internal Medicine**, v. 257, n. II, p. 126–138, 2005.

BOOTH, S. et al. The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator?. **Nat Rev Endocrinol**, v. 9, n. 1, p. 43–55, 2013.

BOROVIKOVA, L. V. et al. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 85, n. 1–3, p. 141–147, 2000a.

BOROVIKOVA, L. V et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458–462, 2000b.

CONFAVREUX, C.; LEVINE, R.; KARSENTY, G. A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms. **Mol Cell Endocrinol**, v. 310, p. 21–29, 2009.

COVEY, S. D. et al. The pancreatic  $\beta$  cell is a key site for mediating the effects of leptin on glucose homeostasis. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 4, p. 291–302, 2006.

CSISZAR, A. et al. Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 105, n. 4, p. 1333–41, out. 2008.

DAS, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as markers of low-grade systemic inflammation. **Med Sci Monit**, v. 13, n. 12, p. 214–221, 2007.

DESIDERI, G.; FERRI, C. Effects of obesity and weight loss on soluble CD40L levels. **JAMA**, v. 289, n. 14, p. 1781–1782, 2003.

DONATE-CORREA, J. et al. Klotho in cardiovascular disease: Current and future perspectives. **World journal of biological chemistry**, v. 6, n. 4, p. 351–7, 2015.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1501–1504, 2000.

DUCY, P. et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. **Nature**, v.382, p. 448-452, 1996.

DUCY, P.; ZHANG, R.; RIDALL, A. L. *Osf2 / Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation.* v. 89, p. 747–754, 1997.

DUCY, P. et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. **Cell**, v. 100, n. 2, p. 197–207, 2000.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet**, v. 365, n. 9468, p. 1415–1428, 2005.

ELEFTERIOU, F. et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. **Nature**, v. 434, n. 7032, p. 514–520, 2005.

ENZI, G. et al. Historical perspective: visceral obesity and related comorbidity in Joannes Baptista Morgagni's "De sedibus et causis morborum per anatomen indagata". **International journal of Obesity**, v. 27, n. July 2002, p. 534–535, 2003.

ESTEGHAMATI, A. et al. Metabolic Syndrome and Insulin Resistance Significantly Correlate with Body Mass Index. **Archives of Medical Research**, v. 39, n. 8, p. 803–808, 2008.

Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. **JAMA**, v.285, n.19, p.2486–97, 2001.

FELTEN, D. L.; FELTEN, S. Y.; BELLINGER, D. L. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: Structure and function. **Immunology Review**, v. 100, p. 225–260, 1987.

FERNÁNDEZ-REAL, J. M. et al. The relationship of serum osteocalcin concentration to insulin secretion, sensitivity, and disposal with hypocaloric diet and resistance training. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 1, p. 237–245, 2009.

FERRANNINI, E.; HAFFNER, S.M.; MITCHELL, B.D.; Stern MP. Hyperinsulinaemia: the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. **Diabetologia**. v34, p.416–22, 1991.

FERRON, M. et al. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 13, p. 5266–5270, 2008.

FERRON, M. et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. **Cell**, v. 142, n. 2, p. 296–308, 2010.

FLOREA, V. G.; COHN, J. N. The autonomic nervous system and heart failure. **Circulation Research**, v. 114, n. 11, p. 1815–1826, 2014.

FORD, E. S.; GILES, W. H.; DIETZ, W. H. Prevalence of the Metabolic Syndrome Among US Adults. **JAMA**, v. 287, n. 3, p. 356–359, 2002.

FRANCISCO, G.; HERNÁNDEZ, C.; SIMÓ, R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 369, n. 1, p. 1–16, 2006.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763–770, 1998.

GARCÍA-MARTÍN, A. et al. Osteocalcin as a marker of metabolic risk in healthy postmenopausal women. **Menopause**, v. 18, n. 5, p. 537–41, 2011.

GKENTZI, D. et al. Fibroblast growth factor 23 and Klotho serum levels in healthy children. **Bone**, v. 66, p. 8–14, 2014.

GOLDSTEIN, R. et al. Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway Activity and High High Mobility Group Box-1 (HMGB1) Serum Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Molecular Medicine**, v. 13, n. 3–4, p. 210–215, 2007.

GOLIASCH, G. et al. Markers of bone metabolism in premature myocardial infarction ( $\leq 40$  years of age). **Bone**, v. 48, n. 3, p. 622–626, 2011.

GRAF, D. et al. Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 12, p. 3191–3194, 1992.

HASKÓ, G.; SZABÓ, C. Regulation of cytokine and chemokine production by transmitters and co-transmitters of the autonomic nervous system. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, n. 9, p. 1079–1087, 1998.

HILDRUM, B. et al. Age-specific prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation and the National Cholesterol Education Program: the Norwegian HUNT 2 study. **BMC public health**, v. 7, p. 220, 2007.

HINOI, E. et al. The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. **Journal of Cell Biology**, v. 183, n. 7, p. 1235–1242, 2008.

HU, M.; KURO-O, M.; MOE, O. Klotho and Chronic Kidney Disease. **Contrib Nephrol**, v. 180, p. 47–63, 2013.

HWANG, Y.C. et al. The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced  $\beta$ -cell function in middle-aged male subjects. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 32, n. 30, p. 13–23, 2009.

IKUSHIMA, M. et al. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, n. 3, p. 827–832, 20 jan. 2005.

IM, J. A. et al. Relationship between osteocalcin and glucose metabolism in postmenopausal women. **Clinica Chimica Acta**, v. 396, n. 1–2, p. 66–69, 2008.

ISOMAA, B. et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. **Diabetes care**, v. 24, n. 4, p. 683–9, 2001.

KAJIKAWA, Y. et al. Association of circulating levels of leptin and adiponectin with metabolic syndrome and coronary heart disease in patients with various coronary risk factors. **International heart journal**, v. 52, p. 17–22, 2011.

KANAZAWA, I. et al. Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 1, p. 45–49, 2009.

KANAZAWA, I. et al. Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus. **Osteoporosis International**, v. 22, n. 1, p. 187–194, 2011.

KAPLAN, N. Upper-Body Obesity, Glucose Intolerance, Hypertriglyceridemia, and Hypertension. **Arch Inter Med**, v. 149, p.1514-20, 1989.

KARSENTY, G. Convergence between bone and energy homeostases: Leptin regulation of bone mass. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 5, p. 341–348, 2006.

KAWAI, M.; DEVLIN, M. J.; ROSEN, C. J. Fat targets for skeletal health. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 5, n. 7, p. 365–372, 2009.

KAYE, D. et al. Adverse consequences of high sympathetic nervous activation in the failing human heart. **J Am Coll Cardiol**, v. 26, n. 5, p. 1257–1263, 1995.

KIEFFER, T. J.; HABENER, J. F. The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic  $\beta$ -cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 278, p. E1–E14, 2000.

KIM, J.-H. et al. Biological Role of Anti-aging Protein Klotho. **Journal of lifestyle medicine**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 2015.

KINDBLUM, J. M. et al. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. **Journal of bone and mineral research**, v. 24, n. 5, p. 785–91, 2009.

KISHI, T. Heart failure as an autonomic nervous system dysfunction. **Journal of Cardiology**, v. 59, n. 2, p. 117–122, 2012.

KOHO, H. et al. Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. I. Determination of the selectivity of six antibodies by cell ELISA and immunofluorescence. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 17, p. 165–172, 1984.

KOSKINEN, T. et al. Metabolic syndrome and short-term heart rate variability in young adults. The cardiovascular risk in young Finns study. **Diabet Med**, v. 26, n. 4, p. 354–361, 2009.

KURO-O, M. et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. **Nature**, v. 390, n. 6655, p. 45–51, 1997.

LEE, A. J.; HODGES, S.; EASTELL, R. Measurement of osteocalcin. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 432–446, 2000.

LEE, N. K.; KARSENTY, G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. 5, p. 161–166, 2008.

LEE, N. et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 456–469, 2007.

LI, S. A. et al. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. **Cell structure and function**, v. 29, n. 4, p. 91–99, 2004.

LIANG, Y. et al. Low osteocalcin level is a risk factor for impaired glucose metabolism in a Chinese male population. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 7, n. 4, p. 522–528, 2016.

LOPES, A. Procedimentos e Técnicas em Laboratório de Investigação Médica em Inflamação e Osso. **Dissertação do 2º Ciclo de Mestrado em Ciências Biomédicas**, 63p; 2010.

LOPES, H. F. et al. Visceral adiposity syndrome. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 8, n. 1, p. 40, 2016.

MAEKAWA, Y. et al. Klotho suppresses TNF- $\alpha$ -induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF $\kappa$ B activation. **Endocrine**, v. 35, n. 3, p. 341–346, 2009.

MAJUMDAR, V.; CHRISTOPHER, R. Association of exonic variants of Klotho with metabolic syndrome in Asian Indians. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 11–12, p. 1116–1121, 2011.

MALIK, S. et al. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. **Circulation**, v. 110, n. 10, p. 1245–1250, 2004.

MANSUR, A.; FAVARATO, D. Mortality due to Cardiovascular Diseases in Brazil and in the Metropolitan Region of São Paulo: A 2011 Update. **Arq Bras Cardiol**, v. 99, n. 2, 2012.

MARTINS, Janaina da Silva. Evidências do papel da leptina na regulação da formação óssea em pacientes da hemodiálise crônica. 2014. 99 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/123730>>.

MATSUMURA, Y. et al. Identification of the HumanKlothoGene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and SecretedKlothoProtein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 242, n. 3, p. 626–630, 1998.

Ministério da Saúde. Brasil. Informações em Saúde – Mortalidade. [Online] Disponível em: <http://www.saude.gov.br/inform/indica/indica>. Acesso em outubro de 2016

MOREIRA, T. M. M.; GOMES, E. B.; SANTOS, J. C. DOS. Fatores de risco cardiovasculares em adultos jovens com hipertensão arterial e/ou diabetes mellitus. **Revista Gaúcha Enfermagem**, v. 31, n. 4, p. 662–669, 2010.

MORIOKA, T. et al. Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. **Journal of Clinical**, v. 117, n. 10, p. 2860–8, 2007.

NAKAMURA, T. et al. Contribution of visceral fat accumulation to the development of coronary artery disease in non-obese men. **Atherosclerosis**, v. 107, n. 2, p. 239–246, 1994.

NATAL, C. et al. The proinflammatory mediator CD40 ligand is increased in the metabolic syndrome and modulated by adiponectin. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 6, p. 2319–2327, 2008.

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment

Panel III). Third report of the national cholesterol education program expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. **Circulation**, v.106, p. 3143–421, 2002.

NIZRI, E. et al. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 5, p. 540–547, 2006.

NZIETCHUENG, R. et al. Klotho KL-VS genotype is involved in blood pressure regulation. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 19–20, p. 1773–1777, 18 set. 2011.

ODA, E. The metabolic syndrome as a concept of adipose tissue disease. **Hypertension research**, v. 31, n. 7, p. 1283–1291, 2008.

OLIVEIRA, R. B. et al. Vascular calcification in chronic kidney disease: a review. **J Bras Nefrol**, v. 35, n. 2, p. 147–61, 2013.

ONYENEKWU, C. P. et al. Relationship between plasma osteocalcin , glycaemic control and components of metabolic syndrome in adult Nigerians with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, 2016.

Organização Mundial da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde. Prevenção de doenças crônicas: um investimento vital. Brasília (DF); 2005.

OSBORN, J. W.; KUROKI, M. T. Sympathetic signatures of cardiovascular disease: A blueprint for development of targeted sympathetic ablation therapies. **Hypertension**, v. 59, n. 3, p. 545–547, 2012.

PAVLOV, V. A et al. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 13, p. 5219–23, 2006.

PAVLOV, V. et al. Levels Through the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 1, p. 41–45, 2009.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 19, p. 493–499, 2005.

PAVLOV, V. A et al. The Cholinergic Anti-inflammatory Pathway: A Missing Link in Neuroimmunomodulation. **Molecular Medicine**, v. 9, n. 5–8, p. 125–134, 2003.

PEARSON, D. A. Bone Health and Osteoporosis: The Role of Vitamin K and Potential Antagonism by Anticoagulants. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 22, n. 5, p. 517–544, 2007.

PEDERSEN, L. et al. Soluble serum Klotho levels in healthy subjects. Comparison of two different immunoassays. **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 1079–1083, 2013.

PI, M. et al. GPRC6A Null Mice Exhibit Osteopenia , Feminization and Metabolic Syndrome. v. 3, n. 12, 2008.

PI, M.; WU, Y.; QUARLES, L. D. GPRC6A Mediates Responses to Osteocalcin in  $\beta$ -Cells In Vitro and Pancreas In Vivo. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 7, p. 1680–1683, 2011.

PITTAS, A. G. et al. Association between Serum Osteocalcin and Markers of Metabolic Phenotype. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 3, p. 827–832, 2009.

PONGRATZ, G.; STRAUB, R. H. The sympathetic nervous response in inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 504, p. 1–12, 2014.

PRICE, P. A. et al. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 5, p. 1447–51, 1976.

REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595–1607, 1988.

REILLY, M. P.; RADER, D. J. The metabolic syndrome: More than the sum of its parts? **Circulation**, v. 108, n. 13, p. 1546–1551, 2003.

RICHARDS, J. B. et al. Serum adiponectin and bone mineral density in women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 4, p. 1517–1523, 2007.

RICHTER, W.O. et al. Cardiac autonomic nerve function and insulin sensitivity in obese subjects. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.20. n.10, p.966-969, 1996.

RISSANEN, P.; FRANSSILA-KALLUNKI, A.; RISSANEN, A. Cardiac parasympathetic activity is increased by weight loss in healthy obese women. **Obesity research**, v. 9, n. 10, p. 637–643, 2001.

ROCHA, J. A. Interação da atividade autonômica e resposta imunomoduladora na fase aguda do infarto do miocárdio experimental. **Programa de Cardiologia. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 2013.

SAITO, Y. et al. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 276, n. 2, p. 767–72, 2000.

SALEEM, U.; MOSLEY JR, T.; KULLO, I. Serum Osteocalcin Is Associated With Measures of Insulin Resistance, Adipokine Levels, and the Presence of Metabolic Syndrome. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 7, p. 1474–1478, 2010.

SANTOS, C. R. B. et al. Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas à síndrome metabólica. **Revista de Nutricao**, v. 19, n. 3, p. 389–401, 2006.

SATAPATHY, S. 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, 2011.

SANGALETI, C. T. et al. Improvement of the Adipokines Profile and Insulin Resistance in Metabolic Syndrome Patients Induced by Galantamine Activation of Cholinergic Pathway. **FASEB J**, v. 30, n. 1\_Supplement, p. 766.16-, 1 abr. 2016.

SCHAFER, A. L. et al. Change in Undercarboxylated Osteocalcin Is Associated with Changes in Body Weight, Fat Mass, and Adiponectin: Parathyroid Hormone (1-84) or Alendronate Therapy in Postmenopausal Women with Osteoporosis (the PaTH Study). **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 12, p. 1982–1989, 2011.

SCHERNTHANER, G. H. et al. Soluble CD40L in patients with morbid obesity: Significant reduction after bariatric surgery. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 36, n. 6, p. 395–401, 2006.

SCHMATZ, R. et al. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, n. 1–3, p. 42–48, 2009.

SCHLAICH, M. et al. Metabolic syndrome: A sympathetic disease? **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 3, n. 2, p. 148–158, 2015.

SCOTT, L.J.; GOA, K.L. Galantamine: a review of its use in Alzheimer's disease. **Drugs**, v.60, n.5, p.1095-1122, Nov 2000.

SEMB, A. G. et al. Raised serum levels of soluble CD40 ligand in patients with familial hypercholesterolemia: Downregulatory effect of statin therapy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 41, n. 2, p. 275–279, 2003.

SHEA, M. K. et al.  $\gamma$ -Carboxylation of osteocalcin and insulin resistance in older men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, p. 1230–1235, 2009.

SHIMADA, T. et al. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse. **Circulation**, v. 110, n. 9, p. 1148–1155, 2004.

SMITH, S. C. et al. AHA/ACCF Secondary Prevention and Risk Reduction Therapy for Patients With Coronary and Other Atherosclerotic Vascular Disease: 2011 Update A Guideline From the American Heart Association and American College. **Circulation**, 2011.

SOUZA, H.P. Mechanisms of control of CD40/CD40L signaling pathway. [**thesis for teaching profession**]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 172p, 2007.

SPOSITO AC, CARAMELLI B, FONSECA FA, BERTOLAMI MC, AFIUNE NETO A, SOUZA AD, ET AL; III Diretriz brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol.**, v. 77, n. (suplemento III), p. 2–19, 2001.

SRICHOMKWUN, P. et al. Undercarboxylated osteocalcin is associated with insulin resistance, but not adiponectin, during pregnancy. **Endocrine**, v. 53, n. 1, p. 129–135, 2016.

TAKESHITA, K. et al. Sinoatrial Node Dysfunction and Early Unexpected Death of Mice with a Defect of klotho Gene Expression. **Circulation**, v. 109, n. 14, p. 1776–1782, 2004.

TAKEDA, S. et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. **Cell**, v. 111, n. 3, p. 305–317, 2002.

TAKEDA, S.; KARSENTY, G. Molecular bases of the sympathetic regulation of bone mass. **Bone**, v. 42, n. 5, p. 837–840, 2008.

TAN, A. et al. Low serum osteocalcin level is a potential marker for metabolic syndrome: results from a Chinese male population survey. **Metabolism**, v. 60, n. 8, p. 1186–1192, 2011.

TOHYAMA, O. et al. Klotho Is a Novel  $\beta$ -Glucuronidase Capable of Hydrolyzing Steroid  $\beta$ -Glucuronides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 11, p. 9777–9784, 2004.

TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. **Nature**, v.420, n.6917, p.853-9, 2002.

TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 2, p. 289–296, 2007.

TSUTSUMI, T. et al. Modulation of the myocardial redox state by vagal nerve stimulation after experimental myocardial infarction. **Cardiovascular Research**, v. 77, n. 4, p. 713–721, 2008.

VAN MAANEN, M. A; VERVOORDELDONK, M. J.; TAK, P. P. The cholinergic anti-inflammatory pathway: towards innovative treatment of rheumatoid arthritis. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 5, n. 4, p. 229–32, 2009.

VARO, N. et al. Elevated Plasma Levels of the Atherogenic Mediator Soluble CD40 Ligand in Diabetic Patients: A Novel Target of Thiazolidinediones. **Circulation**, v. 107, p. 2664–2669, 2003.

VISVIKIS-SIEST, S.; SIEST, G. The STANISLAS Cohort: A 10-year follow-up of supposed healthy families. Gene-environment interactions, reference values and evaluation of biomarkers in prevention of cardiovascular diseases. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 6, p. 733–747, 2008.

VOLP, A. C. P. et al. Capacidade dos Biomarcadores Inflamatórios em Predizer a Síndrome Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2008; **52/3:537-549**, v. 52, n. 3, p. 537–549, 2008.

WANG, H. et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 384–388, 2003.

WANG, H. et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. **Nature medicine**, v. 10, n. 11, p. 1216–21, 2004.

WANG, Y.; SUN, Z. Current Understanding of Klotho. **Ageing research reviews**, v. 8, n. 1, p. 43–51, 2009.

WILCOCK, G. K.; LILIENFELD, S.; GAENS, E. Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. Galantamine International-1 Study Group. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 321, n. 7274, p. 1445–9, 2000.

WOLF, G. Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. **Nutrition reviews**, v. 54, n. 10, p. 332–3, 1996.

XIAO, N.M. et al. Klotho is a serum factor related to human aging. **Chin Med J (Engl)**, v.117, n.5, p.742–7, 2004.

YAMAGISHI, T. et al. Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors. **Hypertension Research**, v.24, n. 6, p. 705-709, 2001

YAMAZAKI, Y. et al. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement : Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, n. 3, p. 513–518, 2010.

YEAP, B. B. et al. Reduced serum total osteocalcin is associated with metabolic syndrome in older men via waist circumference, hyperglycemia, and triglyceride levels. **European journal of endocrinology**, v. 163, n. 2, p. 265–72, 2010.

YOSHIDA, M. et al. Effect of Vitamin K Supplementation on Insulin Resistance in Older Men. **Diabetes Care**, v. 31, n. 11, p. 2092–2096, 2008.

ZANATTA, L. C. B. et al. Osteocalcin, energy and glucose metabolism. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 5, p. 444–451, 2014.

ZHOU, M. et al. Serum osteocalcin concentrations in relation to glucose and lipid metabolism in Chinese individuals. **European journal of endocrinology**, v. 161, n. 5, p. 723–9, 2009.

## 8. ANEXOS

### ANEXO 1

Casuística e Métodos do projeto “*Efeitos da Galantamina sobre biomarcadores inflamatórios e adipocinas em pacientes com Síndrome Metabólica*”

#### **Delineamento do Estudo:**

Tratou-se um estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego, placebo-droga (paralelo), e seguiu as recomendações do *CONSORT Statement* para publicação de estudos randomizados controlados ([www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org)). Desta forma, tanto pesquisadores quanto participantes do estudo estavam “cegos”, no que se refere à administração e ao uso de droga ou placebo, na realização e análise dos exames, durante todo o protocolo de pesquisa.

As avaliações clínicas foram realizadas no Ambulatório da Unidade de Hipertensão do InCor (FMUSP) e no Ambulatório de Síndrome Metabólica da Universidade Nove de Julho (UNINOVE).

Os indivíduos participantes do estudo foram informados sobre benefícios dietéticos e de exercícios físicos, mas não foi prescrito um programa específico de atividade física (supervisionada ou não). A duração de participação dos indivíduos foi de aproximadamente 17 semanas.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa o Instituto do Coração (*parecer nº 555.738*), FMUSP/InCor e seguiu as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos conforme a resolução 196/96, formuladas pelo Conselho Nacional de Saúde, estabelecida em outubro de 1996. Além disso, foi registrado no *ClinicalTrials.gov* sob o número: NCT02283242.

Os participantes foram informados sobre o estudo e a participação dos mesmos se deu apenas após leitura, discussão e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) que, por sua vez seguiu as diretrizes

dos estudos desenvolvidos nas unidades da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

**Droga do estudo e diário de uso de medicação:** cápsulas de 8 mg de Bromidrato de Galantamina (fabricação: Janssen Ortho LLC, State Road 933 km 0,1, Mamey Road Gurabo, Porto Rico – EUA; importação e distribuição: Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda; Rodovia Presidente Dutra, km 154 - São José dos Campos, SP), foram utilizadas. As cápsulas de Galantamina, disponíveis comercialmente sob a denominação de Reminyl® ER, foram reencapsuladas em cápsulas gelatinosas por profissionais da farmácia do Hospital das Clínicas da FMUSP, bem como as cápsulas do placebo de modo similar.

As cápsulas foram acondicionadas em local seguro e sob temperatura controlada dentro das instalações da Unidade de Hipertensão do Incor/FMUSP.

Em cada visita dos participantes da pesquisa, foi realizado o inventário do uso da droga (“pill counting”). As informações foram registradas e mantidas nos prontuários individuais. Incluindo datas, quantidades recebidas e fornecidas, lotes, números de série, data da validade e números codificados da droga de investigação e dos indivíduos.

Os indivíduos também receberam um diário para registro de qualquer sintoma que viessem a apresentar e foram instruídos a trazê-los em casa visita, juntamente com as embalagens da medicação (para contagem e monitorização do uso). Qualquer outro medicamento usado durante o estudo foi registrado no diário (início, término do uso, via de administração, dose, posologia e motivo do uso). As informações relevantes do diário foram transcritas para o prontuário do participante.

### **Casuística**

Foram incluídos 60 indivíduos de ambos os sexos, 30 homens e 30 mulheres, na faixa etária de 18 a 59 anos.

## **Cálculo amostral**

Por se tratar do primeiro estudo clínico usando Galantamina em portadores de SM, o cálculo amostral foi realizado considerando estudo sobre o efeito de inibidores da acetilcolinesterase de terceira geração, caso da galantamina, sobre os níveis de citocinas inflamatórias na Doença de Alzheimer (Reale *et al*, 2004). Desta forma a amostra foi composta por 60 indivíduos: 30 pacientes no grupo tratamento e 30 pacientes no grupo placebo para se detectar com um poder de 85% e nível de confiança de 95%, num teste *t* de Student, uma diferença média de 1,2 pg/mL de citocinas inflamatórias, admitindo-se que os grupos placebo e tratamento tenham desvios padrões iguais a 1,5 e médias de 6,0 pg/mL e 4,8 pg/mL, respectivamente.

O cálculo da amostra foi realizado utilizando-se PASS 2008 – Power Analysis and SampleSize - NCSS Statistical Software.

## **Crítérios de Inclusão**

Os indivíduos deviam preencher os critérios listados abaixo:

1. Diagnóstico de Síndrome Metabólica: baseado em três achados anormais de cinco a seguir:
  - circunferência abdominal  $\geq 102$  cm em homens,  $\geq 88$  cm para mulheres;
  - níveis séricos de triglicérides  $\geq 150$  mg/dl;
  - HDL-C  $< 40$  mg/dl em homens,  $< 50$  mg/dl em mulheres
  - Pressão Arterial Sistêmica de consultório: sistólica  $\geq 130$  e/ou diastólica  $\geq 85$  mmHg
  - glicemia de jejum  $\geq 100$ mg/dl
2. Manutenção de peso e dieta estáveis por pelo menos 6 meses até a entrada no estudo;
3. Não apresentar doença crônica que indicasse o uso de medicações;
4. Estar apto a declarar consentimento por escrito e cumprir as etapas do estudo durante toda a duração do mesmo (retornos agendados para avaliação e realização de exames);

### **Critérios de Exclusão**

Não foram incluídos no estudo indivíduos que estavam ou apresentavam:

1. Níveis de triglicerídeos  $\geq 400\text{mg/l}$ , ou em uso de medicação redutora de lipídeos;
2. Níveis de TGO ou TGP  $\geq 200\text{U/L}$ ;
3. Pressão Arterial Sistêmica de consultório  $\geq$  maior ou igual  $160\text{ mmHg}$ , e/ou pressão diastólica em repouso  $\geq 100\text{ mmHg}$ ;
4. Índice de massa corporal (IMC)  $\geq 40\text{ kg/m}^2$ ;
5. Em uso de drogas que apresentam interação conhecida ou provável com a Galantamina: Amitriptilina, Fluoxetina, Fluvoxamina, Cetocoazol, Oxibutinina, Paroxetina, Quinidina, uso de inibidores de recaptação de serotonina;
6. Já participante de programas de exercícios regulares, definidos como 90 minutos de atividade por semana;
7. História médica, diagnóstico prévio, ou exames complementares anteriores que indicassem presenças de arritmias cardíaca, doença coronariana, doença valvar, insuficiência cardíaca, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença hepática aguda ou crônica, insuficiência renal (creatinina sérica  $\geq 2\text{ mg/dl}$ ), distúrbios da tireóide, doenças inflamatórias crônicas, neoplasias, estado de positividade para HIV, outras doenças debilitantes e gestação ou desejo de engravidar no decorrer do período do estudo;
8. Abuso de álcool ou outras substâncias nos 12 meses prévias à entrada no estudo;
9. História de depressão maior ou pacientes com ideação suicida;
10. História pessoal de desordem alimentar.

**Avaliação de inclusão e seguimento:** A anamnese e exame físico dos participantes do estudo foram realizados em todo decorrer do estudo e serviram como fonte de informações referentes ao estado de saúde dos participantes. Tal avaliação incluiu: o registro de dados demográficos, inquérito sobre medicamentos utilizados, resultados de exames prévios e os resultados dos

exames realizados no decorrer do protocolo, avaliação antropométrica e a investigação de sintomas adversos.

Avaliação antropométrica: Circunferência abdominal (cm) – medida na metade da altura entre a crista ilíaca e a borda inferior da costela, utilizando uma fita métrica inextensível. Estatura (m) – medida pelo estadiômetro de marca Sanny. Massa corporal total (kg) – usando balança Filizola. Índice de massa corporal (IMC) – peso (kg)/estatura<sup>2</sup>(m). Para determinação da classificação do IMC foi adotada a classificação da OMS (2006).

Também foi realizado, antes e após o término do tratamento, um exame neurológico minucioso por um especialista (neurologista) que incluiu: avaliação neuropsicológica qualitativa (presença ou não de apatia, indiferença, diminuição no fluxo verbal, diminuição ou ausência de fala espontânea, estereotípias, atividade motora sem propósito e impropriedades sociais como intrusões entre outros) e testes neuropsicológicos.

### **Exames laboratoriais**

Exames laboratoriais foram realizados antes da randomização para uso da medicação e no término do tratamento. Amostras obtidas por meio da punção venosa na região cubital (30 mL de sangue) foram utilizadas para as dosagens hormonais, bioquímicas, de estresse oxidativo e de marcadores inflamatórios.

Exames laboratoriais básicos (bioquímicos e hormonais): perfil lipídico (colesterol total e frações), triglicerídeos, TSH, T<sub>4</sub> livre, TGO, TGP, beta HCG (para as mulheres), glicose, hemoglobina glicada, insulina, creatinina e hemograma completo. Para coleta de amostras de sangue para realizar tais medidas, os participantes foram instruídos a realizar jejum de 12 horas. Os exames foram realizados pela Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP Medicina Diagnóstica).

Marcadores inflamatórios: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, sCD40L, leptina e adiponectina. Para avaliação destes marcadores inflamatórios foi realizada logo após (20 -30 minutos) a coleta de 10 ml de sangue periférico, em tubos contendo EDTA como anti-coagulante, a centrifugação a 3000 rpm por 20 minutos a 4°C. Em seguida, o plasma foi aliquotado em eppendorfs, congelados em nitrogênio líquido e estocados no freezer a -70°C por um período que não ultrapassou 12 meses.

A coleta, centrifugação, aliquotagem e armazenamento também foram realizados pela aluna deste estudo no Laboratório de Pesquisa Clínica da Unidade de Hipertensão do Incor/USP, conforme orientações do protocolo fornecido pela empresa que dosaria as amostras de plasma.

A análise dos marcadores inflamatórios foi realizada com kits Multiplex pela empresa Gênese. Esses kits utilizam tecnologia Luminex xMAP (Multiple Analyte Profiling, x = variável a ser medida) que envolve um processo de quantificação de microesferas de látex com dois fluoróforos específicos. Utilizando proporções precisas desses dois fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas que são identificadas em código de cores pelo instrumento Luminex. Os kits Multiplex foram desenvolvidos com essas microesferas e se fundamentam no processo de “imunoensaio”. Anticorpos de captura específicos para cada analito (substância a ser detectada na amostra) estão imobilizados nas superfícies das microesferas por meio de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito se liga aos anticorpos de captura, a detecção final é feita através de um outro marcador fluorescente (Estreptavidina-Ficoeritrina) ligado ao anticorpo de detecção. O equipamento Luminex 200 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (código de cor para o ensaio), e o segundo feixe de laser quantifica o sinal de reporte de cada microesfera. Cabe destacar que esse método de dosagem de biomarcadores é indicado quando se almeja a análise de um perfil de fatores em interação, num quadro determinado. O método

proporciona assim o reconhecimento de um panorama mais amplo que a ação individual de um elemento isolado.

Marcadores do estresse oxidativo: Foram dosados: atividades de enzimas anti-oxidantes (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase), e os produtos de peroxidação lipídica (TBARS) e proteica (carbonilas). Além disso, foram feitas medidas de nitritos e nitratos.

Para obtenção desses marcadores, seguiram-se as seguintes etapas metodológicas:

Preparo do sangue: Logo após a coleta de 10 ml de sangue venoso periférico em tubo com EDTA, procedeu-se à separação do plasma e preparo dos glóbulos vermelhos com solução de enzimas:

- Centrifugação da amostra em 3000rpm por 20 minutos a 4°C, seguido de separação do plasma e subsequente congelamento em nitrogênio.
- Preparo dos glóbulos vermelhos: após retirada do plasma, 1 ml dos glóbulos foi aspirado e colocado em tubo seco; a seguir foi adicionado 1mL soro fisiológico, o conteúdo foi homogeneizado e colocado novamente na centrifuga por 10 minutos a 3000 rpm. Este procedimento deve ser repetido por 3 vezes, sempre se descartando o sobrenadante e adicionando soro fisiológico em igual quantidade de glóbulos, até que se obtivesse o completo preparo dos glóbulos vermelhos. Para cada 100ul dos glóbulos vermelhos lavados foram acrescentados 1000ul da solução de enzimas (0,240 gramas de Mg SO<sub>4</sub>, 0,029 ml (29ul) de ácido acético glacial, diluídos em 500 ml de H<sub>2</sub>O destilada); alíquotas foram acondicionadas em eppenderfs e armazenados em freezer a -70 °C até o momento das medidas de estresse oxidativo.

### **Atividade de enzimas anti-oxidantes**

**Catalase (CAT)** - A taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade da CAT. Desta forma, o consumo de  $H_2O_2$  pode ser utilizado como uma medida de atividade da enzima CAT. O ensaio consistiu em medir a diminuição da absorbância a 240nm, comprimento de onda onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo. Para a realização das medidas foi usada uma solução tampão constituída de fosfatos a 50 mmol/L em pH 7,4. Foram adicionados 9  $\mu$ L deste tampão e 10  $\mu$ L de amostra de tecido na cubeta do espectrofotômetro, sendo esta mistura descontada contra um branco de tampão fosfato. A seguir foram adicionados 35  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio (0,3 mol/L) e foi monitorada a diminuição da absorbância no espectrofotômetro (Boveris, Chance, 1973).

**Superóxido Dismutase (SOD)** - A técnica utilizada foi baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. Uma vez que não se consegue determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, se utilizou a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm durante 2 minutos. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. No meio de reação, foram utilizados 20  $\mu$ L de homogeneizado, 973  $\mu$ L de tampão Tris-Fosfato a 50 mmol/L (pH 8,2), 8  $\mu$ L de pirogalol a 24 mmol/L, 4  $\mu$ L de CAT a 30  $\mu$ mol/L. Esta curva obtida foi utilizada como branco. Foi também feita uma curva padrão utilizando três concentrações distintas de SOD (0,25U, 0,5U e 1U), através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos (McCord e Fridovich, 1969).

**Dosagem de proteínas** - As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/mL (Lowry et al., 1951).

**Medida de peroxidação lipídica (LPO):** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) - Para a reação, foi adicionado a 150µl de plasma, 150µl de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 8,1% (P/V), 300µl de Ácido Tricloroacético (TCA) (VetecQuimica Fina Ltda.) a 20%(P/V) e 500µl de Ácido Tiobarbitúrico (TBA) (Sigma-Aldrich Corporation). Essa mistura foi incubada por 20-30 minutos a 95°C, formando um composto rosado e em seguida resfriado no gelo. Após este procedimento os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 4000 rpm durante 5 minutos (Eppendorf AG, Alemanha). Retirou-se 200ul do sobrenadante que foi adicionado a um poço de placa de Elisa. A leitura foi feita a 535nm em um leitor de Placa de Elisa (Buege e Austin, 1978).

**Medida de peroxidação proteica - dosagem de carbonilas** - O ensaio para detecção das carbonilas é uma das técnicas utilizadas para a determinação de proteínas modificadas oxidativamente. A técnica se baseia na reação das proteínas oxidadas do plasma sanguíneo com 2,4 dinitrofenil hidrazina (DNPH) em meio ácido, seguido de sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos e incubação final com guanidina. Desta forma, a absorvância das carbonilas foi medida em um espectrofotômetro a 360nm, num meio de reação contendo os seguintes reagentes: guanidina (6M) em ácido clorídrico (HCl) (2,5M) pH= 2,5; 2,4 DNPH em HCl (2,5M); ácido tricloroacético (TCA) 20%; TCA 10%; etanol - acetato de etila 1:1(V/V). Paralelamente foi realizada a curva padrão de proteína, com albumina, com a absorvância lida em 280nm no espectrofotômetro (Reznick, Packer, 1994).

**Nitritos e Nitratos** - Os níveis de nitritos e nitratos no plasma foram medidos pela reação das amostras com o reagente de Griess em microplacas (96 poços) em aparelho leitor de ELISA. Alíquotas de 50 µL de homogeneizado de tecido

foram incubadas com cofatores enzimáticos e nitrato redutase (3U/ml) por uma 30 minutos para conversão de nitrato em nitrito em temperatura ambiente. O total de nitrito tecidual foi então analisado pela reação das amostras com 50 µL de reagente de Griess. O total de nitrito tecidual foi estimado a partir de uma curva padrão de absorvância em 592 nm (Granger et al., 1999).

### **Registro de variáveis hemodinâmicas e da modulação simpato-vagal**

Os registros foram realizados no laboratório de Pesquisa Clínica da Unidade de Hipertensão da FMUSP. Os registros tiveram duração de 15 minutos com os participantes deitados em repouso numa maca, em situação confortável e em ambiente adequado para a aquisição dos sinais (controle de luz e de temperatura). Antes do registro foi verificado se os participantes se encontravam em condições adequadas para a medida da PA.

Para realizar a medida dos parâmetros hemodinâmicos e dos componentes do controle autonômico do sistema cardiovascular (balanço simpato-vagal), utilizou-se inicialmente, o registro das curvas de pressão arterial, batimento a batimento, pelo método não invasivo com o sistema FINOMETER® (Finometer, Finapres Medical Systems BV, Arnhem, Netherlands).

O equipamento utiliza como princípio básico a técnica de fotopletomografia digital, colocando-se um manguito de pressão circundando a falange distal de um dedo da mão esquerda (Wesseling *et al*, 1983). Tendo como base as curvas de pressão arterial e os dados do paciente (idade, sexo, peso e altura), um programa de análise de sinais (software BeatScope) gera dados hemodinâmicos como PA sistólica e diastólica, frequência cardíaca, débito cardíaco e resistência vascular periférica.

Após esta leitura automática das ondas de pressão pelo Beatscope, foi realizada a verificação do sinal gerado, por meio da inspeção visual, para identificar e/ou corrigir alguma marcação não correta. Em seguida, a série temporal de cada sinal a ser estudado foi gerada, isto é, o tacograma (sequência do intervalo de pulso cardíaco) e o sistograma (sequência dos valores da

pressão arterial sistólica). Quando necessário, foi utilizada a interpolação das séries do tacograma e sistograma, para correções das distorções indesejáveis.

As curvas de PA foram registradas (1.000 Hz/seg de amostragem) e armazenadas em outro computador equipado com transdutor de sinais biológicos, para serem utilizados posteriormente na análise da variabilidade da FC (análise espectral) realizada com um software específico (CardioSeries Software, Versão 2.4, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

### **Análise da variabilidade da FC**

A modulação autonômica cardíaca foi inferida por meio da análise da variabilidade da FC (VFC) no domínio da frequência.

A análise no domínio da frequência foi realizada utilizando a Transformada Rápida de Fourier. Para tal foi utilizada uma interpolação de 4 Hz com segmentos de 512 pontos. A potência espectral foi integrada em três faixas de frequência de interesse:

- 1) HF: frequências altas, entre 0,4 e 0,15 Hz – modulação Parassimpática;
- 2) LF: frequências baixas, entre 0,15 e 0,04 Hz – modulação Simpática;
- 3) VLF: frequências muito baixas, menores que 0,04 Hz.

Utilizou-se os valores absolutos e também os valores normalizados (unidades normalizadas), de acordo com o cálculo:

$$\text{LF nu} = \text{power do LF} / (\text{power total} / \text{m}^2 - \text{VLF}) \times 100$$

$$\text{HF nu} = \text{power do HF} / (\text{power total} / \text{m}^2 - \text{VLF}) \times 100$$

A razão entre LF e HF foi calculada para inferir o balanço autonômico, de acordo com a fórmula:  $\text{LF/HF} = \text{LF ms}^2/\text{HF m}^2$

## **Exames de imagem**

Para medidas da gordura abdominal (subcutânea e visceral) e da gordura epicárdica foram realizadas tomografias computadorizadas do abdome e de tórax sem contraste com o equipamento Multidetector Computed Tomography (TC 320 Aquillion One Toshiba, 2013) no Incor/FMUSP. Os detalhes e padronização da técnica estão apresentados no Anexo 7.

## **Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial – MAPA**

Para acessar o comportamento circadiano da PA utilizamos a MAPA com emprego do equipamento Spacelabs Healthcare®, que dispõe do método oscilométrico para aquisição das medidas, com manguito aplicado no braço. O aparelho foi programado para medir a pressão arterial durante 24 horas obtendo, no mínimo, 16 medidas válidas para o período de vigília e 8 para o período de sono.

Foram seguidas as recomendações da IV Diretriz para uso da Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia (Alessi *et al*, 2005) para os protocolos de instalação e retirada do aparelho, número de aferições, recomendações ao paciente, e preenchimento do diário de atividades.

Foram analisadas as médias de PAS e PD dos períodos diurno (vigília) e noturno (sono).

## **Seguimento do estudo**

### **1ª Avaliação / Avaliação inicial - screening**

Os indivíduos convidados a participar do estudo foram informados sobre a pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre esclarecido.

Inicialmente foram avaliados clinicamente de acordo com o descrito previamente, e orientados a comparecerem no dia seguinte em jejum (8-10h)

para serem submetidos à coleta de sangue para realização de testes laboratoriais de rotina.

**2ª Avaliação**– Confirmação dos critérios de inclusão/exclusão e Randomização (dia 0)

Após 7 dias da primeira avaliação (sendo permitido 48h de desvio) os indivíduos realizaram a segunda avaliação, na qual foram confirmados os critérios de inclusão e verificados novamente os critérios de exclusão.

Para os indivíduos com SM confirmada e com possibilidade de permanecer no estudo foram realizados:

- Tomografia computadorizada de abdômen e tórax
- Registro de curvas de PA batimento a batimento para cálculo das variáveis hemodinâmicas e de modulação autonômica (Finometer)
- Avaliação neurológica completa, incluindo os Testes cognitivos
- Coleta de sangue para análise de marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo.
- Monitorização ambulatorial da Pressão Arterial - MAPA

Após a realização desses passos, os participantes foram incluídos no estudo, e receberam as embalagens da medicação de forma randomizada, isto é, contendo droga ou placebo de acordo com sequência numérica previamente gerada por computador. Dessa forma o primeiro participante recebeu a cartela com o número 1 e assim sucessivamente até o número 60. Os pacientes e pesquisadores permaneceram cegos quanto a alocação dos grupos placebo /droga durante todo o período de estudo, e somente no final do protocolo foram abertos os códigos de cada embalagem.

Os participantes receberam medicação para 4 semanas, e foram orientados a tomar uma cápsula ao dia, no mesmo horário todos os dias. Foram

ainda instruídos para retornarem com as cartelas e as cápsulas restantes na avaliação seguinte.

### **3ª Avaliação – Semana 1**

Após 7 dias da randomização (permitido 48h de desvio) os participantes passaram pela 3ª avaliação para verificar especialmente efeitos adversos da droga (conforme riscos potenciais descritos posteriormente). Os indivíduos que não apresentassem efeitos adversos, que justifiquem a interrupção do estudo (descritos posteriormente), foram orientados a continuar a tomar a medicação que foi dispensada na randomização e retornar em 3 semanas com as cartelas que continham a medicação.

### **4ª Avaliação- Semana 4**

Após 4 semanas da randomização (permitido 48 h de desvio) os indivíduos foram avaliados clinicamente, para verificar especialmente efeitos adversos da droga, para registro de dados antropométricos (peso e circunferência abdominal) e de registro das curvas de PA batimento a batimento. Foram dispensadas mais 4 cartelas do medicamento (placebo ou droga ativa), contendo a dose aumentada, ou seja, com duas cápsulas, que deveriam ser ingeridas numa única tomada/dia (total de 16 mg de Galantamina ou placebo). Os participantes foram orientados a retornar em 4 semanas, e trazer as cartelas usadas.

### **5ª Avaliação- Semana 8**

Após 8 semanas da randomização (permitido 48 h de desvio) os indivíduos foram avaliados pela 5ª vez, para verificar especialmente efeitos adversos da droga, para registro de dados antropométricos (peso e circunferência abdominal) e de registro das curvas de PA batimento a batimento. Aqueles que não apresentaram efeitos adversos que justificassem a interrupção do estudo (descritos no anexo 1) foram orientados a continuar a tomar a medicação, na mesma dosagem que o mês anterior (total de 16 mg de Galantamina ou placebo). Foram dispensadas

mais 4 cartelas, com 2 cápsulas de medicamento para serem tomadas 1 x dia. Os pacientes foram então orientados para retornar em 4 semanas em jejum para a avaliação final e para trazerem as cartelas da medicação dispensada.

### **6ª Avaliação – Semana 12**

Os indivíduos passaram pela 6ª avaliação (avaliação final, T1) para verificar especialmente efeitos adversos da droga, para registro de dados antropométricos (peso e circunferência abdominal) e de registro das curvas de PA batimento a batimento.

Nessa visita todos os pacientes realizaram novamente:

- Tomografia computadorizada de abdome e tórax;
- Avaliação neurológica completa, incluindo os Testes cognitivos;
- Coleta de sangue para análise bioquímica geral e de citocinas inflamatórias e marcadores do estresse oxidativo;
- MAPA

### **Financiamento**

O projeto teve suporte financeiro da Fapesp (Processo:13/22250-9) e do CNPq (Processo: nº 457581/2013-1).

## ANEXO 2

Tabela 4. Correlações de Pearson (r) para os valores pré tratamento.

		Peso	CA	IMC	PAS	PAD	Glic	HDLc	TG	LDL	Col	HOMA	sCD40L	Ins	Occ	OCd	Klotho	Adip	Lept	LFnu	HFnu	LFHF																											
Peso	r	1	<b>,809**</b>	<b>,664**</b>	,236	,225	-,075	,102	,156	,000	,010	<b>,299*</b>	-,080	,093	-,114	-,206	,036	,058	,026	,121	-,104	,111																											
	p		<b>,000</b>	<b>,000</b>	,069	,084	,569	,437	,234	1,000	,940	<b>,024</b>	,545	,490	,384	,114	,785	,661	,845	,362	,435	,404																											
CA	r		1	<b>,743**</b>	,042	,140	-,026	,205	,013	,152	,152	<b>,293*</b>	-,008	,094	-,185	-,234	-,062	-,061	,124	,051	-,035	,014																											
	p			<b>,000</b>	,749	,285	,842	,115	,923	,254	,248	<b>,027</b>	,950	,482	,157	,072	,638	,642	,355	,701	,793	,916																											
IMC	r			1	,064	,114	-,053	,300*	-,137	,092	,036	<b>,330*</b>	,034	,138	-,111	-,213	-,110	,050	<b>,366**</b>	-,128	,151	-,147																											
	p				,627	,384	,685	,020	,296	,494	,786	<b>,012</b>	,797	,303	,401	,102	,401	,703	<b>,005</b>	,332	,253	,268																											
PAS	r				1	<b>,802**</b>	-,052	-,031	,173	,118	,163	,041	-,199	<b>,333*</b>	,079	-,147	,061	,120	,051	,184	-,178	,206																											
	p					<b>,000</b>	,694	,813	,187	,377	,213	,760	,127	<b>,011</b>	,550	,261	,642	,359	,701	,164	,177	,117																											
PAD	r						1	,000	,048	,154	,112	,227	,093	-,180	<b>,289*</b>	-,054	-,050	,047	-,034	,134	,129	-,128	,176																										
	p								,998	,716	,239	,403	,081	,490	,169	<b>,028</b>	,684	,706	,720	,799	,315	,332	,334	,183																									
									Hemodinamicos																																								
Glicose	r							1	,063	,140	,093	,158	,030	,090	-,131	-,128	,045	,124	,001	-,110	-,063	,071	-,042																										
	p								,634	,285	,486	,227	,823	,493	,326	,332	,733	,347	,997	,412	,637	,593	,752																										
HDLc	r								1	-,183	-,049	,210	,018	,012	,077	-,260*	-,155	-,167	,132	,126	-,134	,148	-,121																										
	p									,162	,716	,108	,897	,927	,564	,045	,237	,203	,315	,347	,312	,262	,360																										
TG	r									1	,130	<b>,329*</b>	-,065	-,004	-,072	,020	-,069	,199	-,065	-,244	,233	-,238	,251																										
	p										,331	<b>,010</b>	,631	,978	,593	,878	,600	,128	,623	,065	,076	,069	,055																										
LDLc	r										1	<b>,851**</b>	,152	-,006	,110	,034	-,176	-,291*	,008	,039	-,108	,109	-,153																										
	p											<b>,000</b>	,267	,963	,418	,802	,185	<b>,026</b>	,953	,775	,425	,419	,257																										
Col	r												1	,163	-,031	,121	-,075	-,171	-,208	,002	-,061	-,095	,097	-,100																									
	p													,226	,814	,365	,567	,192	,111	,990	,648	,473	,466	,453																									
														Metabólicos																																			
HOMA	r													1	,039	<b>,969**</b>	-,073	-,167	-,052	,130	-,050	-,197	-,218																										
	p														,775	<b>,000</b>	,590	,214	,699	,335	,717	,146	,157	,106																									
sCD40L	r														1	-,037	,138	,008	-,108	,109	,058	-,050	,062	-,138																									
	p															,785	,294	,951	,411	,409	,668	,709	,640	,296																									
Ins	r															1	-,008	-,204	-,066	,120	-,111	-,027	,025	-,094																									
	p																,955	,125	,621	,368	,414	,844	,856	,485																									
Occ	r																1	,044	<b>,312*</b>	-,217	-,003	,075	-,090	,094																									
	p																	,741	<b>,015</b>	,096	,979	,570	,497	,480																									
OCd	r																	1	<b>,314*</b>	-,094	,059	-,288*	<b>,296*</b>	-,274*																									
	p																		<b>,015</b>	,474	,660	<b>,027</b>	<b>,023</b>	<b>,036</b>																									
Klotho	r																		1	-,155	-,161	,074	-,060	,081																									
	p																			,237	,227	,576	,652	,540																									
Adip	r																			1	,082	,037	-,008	-,010																									
	p																				,542	,780	,954	,939																									
Lept	r																				1	-,052	,064	,019																									
	p																					,702	,638	,888																									
																						Marcadores																											
LFnu	r																						1	-,992**	<b>,912**</b>																								
	p																							<b>,000</b>	<b>,000</b>																								
HFnu	r																								1	-,920**																							
	p																									<b>,000</b>																							
																										Autônomicos - VFC																							
LFHF	r																									1																							

\*\*p&lt;0,01 \*p&lt;0,05

## ANEXO 3

Tabela 5. Correlações de Spearman (rs) para os valores de Δ

		ΔPeso	ΔCA	ΔIMC	ΔPAS	ΔPAD	ΔGlic	ΔHDL	ΔTG	ΔLDL	ΔCol	ΔHOMA	ΔsCD40L	ΔIns.	ΔOcc	ΔOCd	ΔKlotho	ΔAdip	ΔLept	ΔLF	ΔHF	ΔLFHF		
ΔPeso	r	1	,175	<b>,997**</b>	,082	-,065	-,107	-,002	<b>,350**</b>	,118	,252	,083	,192	,113	,105	-,030	<b>,260*</b>	,101	,034	-,219	,220	-,228		
	p		,180	<b>,000</b>	,533	,619	,415	,988	<b>,009</b>	,400	,064	,540	,141	,400	,427	,819	<b>,045</b>	,443	,798	,096	,093	,083		
ΔCA	r		1	,183	-,084	-,133	,124	,196	,084	-,162	-,021	,196	,007	,205	-,086	,104	-,036	-,115	,174	,031	-,038	,049		
	p			,161	,522	,310	,345	,151	,541	,246	,877	,144	,957	,123	,511	,429	,787	,383	,192	,815	,778	,713		
ΔIMC	r			1	,067	-,078	-,096	-,014	<b>,359**</b>	,118	,250	,094	,195	,127	,082	-,050	<b>,254*</b>	,088	,040	-,210	,212	-,230		
	p				,610	,554	,464	,922	<b>,007</b>	,399	,066	,488	,136	,341	,532	,707	<b>,050</b>	,503	,768	,110	,107	,080		
ΔPAS	r				1	<b>,521**</b>	<b>-,296*</b>	-,039	,099	-,127	-,081	-,088	,014	-,009	-,039	-,048	,026	-,030	-,083	-,187	,180	-,179		
	p					<b>,000</b>	<b>,022</b>	,778	,474	,365	,557	,513	,915	,946	,768	,716	,842	,820	,536	,157	,172	,176		
ΔPAD	r						1	-,008	-,028	,014	-,072	-,070	-,114	,173	-,087	-,019	,126	,020	-,024	-,041	,018	-,010	,075	
	p							,951	,840	,919	,611	,613	,399	,187	,514	,883	,339	,881	,853	,761	,895	,941	,574	
ΔGlicose	r							1	,038	,040	,186	,205	<b>,274*</b>	,046	,138	-,056	,086	,165	-,106	<b>,334*</b>	,086	-,073	,094	
	p								,781	,774	,181	,132	<b>,039</b>	,728	,303	,673	,512	,208	,422	<b>,010</b>	,519	,583	,479	
ΔHDL	r								1	,170	,189	<b>,501**</b>	-,035	-,012	,000	,098	,044	-,016	,083	-,054	,063	-,049	,097	
	p									,216	,174	<b>,000</b>	,804	,932	,998	,478	,750	,906	,546	,702	,651	,727	,483	
ΔTG	r									1	-,119	<b>,371**</b>	-,022	,018	-,023	,098	-,097	,116	-,124	,189	-,114	,100	-,053	
	p										,397	<b>,005</b>	,876	,898	,867	,476	,483	,398	,369	,176	,412	,470	,703	
ΔLDL	r										1	<b>,762**</b>	,017	,061	,043	,044	-,018	,219	,062	,083	-,051	,068	-,037	
	p											<b>,000</b>	,904	,663	,764	,757	,899	,116	,660	,564	,720	,633	,796	
ΔCol	r												1	,014	,124	,038	,090	,010	,173	,009	,212	-,052	,064	-,020
	p													,922	,367	,782	,512	,943	,207	,949	,128	,711	,645	,887
ΔHOMA	r													1	<b>,389**</b>	<b>,976**</b>	-,042	-,212	,181	-,122	,336*	,169	-,158	,139
	p														<b>,003</b>	<b>,000</b>	,754	,113	,178	,367	,012	,214	,245	,306
ΔsCD40L	r																							
	p																							
ΔIns.	r																							
	p																							
ΔOcc	r																							
	p																							
ΔOCd	r																							
	p																							
ΔKlotho	r																							
	p																							
ΔAdip	r																							
	p																							
ΔLept	r																							
	p																							
ΔLF	r																							
	p																							
ΔHF	r																							
	p																							
ΔLFHF	r																							
	p																							

\*\*p&lt;0,01 \*p&lt;0,05