



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**INVESTIGAÇÃO DE PARÂMETROS DE INFLAMAÇÃO E  
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DIABETES  
MELLITUS TIPO 2 USUÁRIOS E NÃO USUÁRIOS DE  
INSULINOTERAPIA**

**KAINÁ KIFFER PAIVA**

**VITÓRIA, ES**

**2017**



**Kainá Kiffer Paiva**

**INVESTIGAÇÃO DE PARÂMETROS DE INFLAMAÇÃO E  
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DIABETES  
MELLITUS TIPO 2 USUÁRIOS E NÃO USUÁRIOS DE  
INSULINOTERAPIA**

Dissertação apresentada à  
Universidade de Federal do  
Espírito Santo, como requisito  
parcial para a obtenção do título  
de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas, do Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas

**Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem**

**Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves**

**VITÓRIA, ES**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Paiva, Kainá Kiffer, 1990 -

P142i      Investigação de parâmetros de inflamação e estresse oxidativo em  
pacientes com diabetes mellitus tipo 2 usuários e não usuários de insulino-terapia /  
Kainá Kiffer Paiva – 2017.

109 f. : il.

Orientador: Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem.

Coorientador: Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Diabetes Mellitus Tipo 2. 2. insulina. 3. inflamação. 4. Estresse Oxidativo. I. Guimarães do Bem, Daniela Amorim Melgaço. II. Gonçalves, Rita de Cássia Ribeiro. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 615

---

**Kainá Kiffer Paiva**

**INVESTIGAÇÃO DE PARÂMETROS DE INFLAMAÇÃO E  
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DIABETES  
MELLITUS TIPO 2 USUÁRIOS E NÃO USUÁRIOS DE  
INSULINOTERAPIA**

Vitória, 22 de fevereiro de 2017

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Karina Braga Gomes / UFMG

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Lívia Carla de Melo Rodrigues / UFES

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem  
(orientadora) / UFES

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar todos os meus passos até a realização dessa conquista.

Ao meu pai Kássio Barreiros Paiva, a minha mãe Maria Emilia Silva Paiva e meu irmão Kemmy Kiffer Paiva pelo apoio e amor incondicional, por serem a minha base, e a toda minha família por torcerem muito para o meu sucesso. Agradeço em especial a minha mãe por sempre ser meu ombro amigo e saber as palavras certas nas horas que mais preciso.

Ao meu namorado Euzebio Glauder Zandonadi por sempre me incentivar e entender as minhas ausências quando necessário, e que com certeza tornou essa jornada mais leve, obrigada por me ouvir e ser tão compreensivo.

A minha orientadora Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem, sou muito grata por ter sido sua aluna, aprendi muito com você nesses dois anos. Mesmo quando as coisas não davam certo sempre tinha um sorriso no rosto me deixando tranquila. Que sempre conduziu o projeto de mestrado de forma dedicada, atenciosa e competente. Obrigada pela oportunidade de crescimento profissional e acadêmico, e por me auxiliar em todas as etapas dessa jornada.

A minha coorientadora Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves. Coorientação é pouco para descrever a sua contribuição para elaboração e execução desse estudo. Obrigada por toda a assistência nesses dois anos. É um prazer trabalhar ao lado de uma professora tão capacitada e dedicada.

Aos professores Rebeca Caldeira Machado Berger e João Alexandre Três Pancoto pelas contribuições e apontamentos na banca de qualificação do estudo, enriquecendo e melhorando o conteúdo do trabalho, agradeço também pelo protocolo de extração de DNA e protocolo de genotipagem do TNF- $\alpha$  gentilmente cedidos pelo professor João.

Aos pacientes que aceitaram voluntariamente participar do estudo. E a todos os funcionários das Unidades Básicas de Saúde envolvidos no projeto,

principalmente as farmacêuticas Nadmy Arrivabene e Vívian Viana, as técnicas Karina, Ludmila e Bruna que realizaram as coletas de sangue e a todas as agentes de saúde. Sem a ajuda de vocês esse estudo não teria acontecido.

A todos os alunos do laboratório de Bioquímica Clínica e Biologia Molecular, Luana Colatto e Rafael Eliziário por me auxiliarem nos experimentos. A Maíra Mendes que realizou em conjunto comigo a investigação do polimorfismo. A Grazieli Canal por estar presente em todos os dias de coleta auxiliando na aplicação dos questionários, além dos ensaios e a Angélica Marchesi e Mayara Santos, por toda a ajuda na realização dos ensaios e pela companhia no dia a dia do laboratório, sou imensamente grata a todos.

Por último mas não menos importante, agradeço imensamente a todos os meus amigos que sempre me ofereceram palavras de apoio e confiança, e em especial a Augusto Borges e Igor Simões, por toda a paciência e ensinamentos e a Tamara, por sempre estar presente e disponível para me ajudar.

A todos os colegas do PPGCFAR (André Martins, Brenna Ramos, Juliana Custódio, Natália Cortelette) que se tornaram amigos e fizeram tudo ter sido mais divertido. Sentirei falta da convivência diária com todos.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste projeto, meu muito obrigado.

Por fim, agradeço à fundação financiadora FAPES pela bolsa cedida a mim.

## RESUMO

A diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma desordem metabólica resultante da hiperglicemia e resistência à insulina que está caracterizada por aumento na produção de espécies reativas levando ao estresse oxidativo e alterações inflamatórias. O objetivo deste estudo foi investigar se o uso de insulino terapia em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 influencia os níveis de marcadores de inflamação e estresse oxidativo. Trata-se de um estudo clínico onde foram selecionados 80 pacientes diagnosticados com DM2 (40 em utilização de insulina e 40 sem utilização de insulina) e 40 pacientes controles (sem DM2). A adesão ao tratamento foi avaliada pelo teste de Morisky-Green. O controle metabólico foi avaliado por meio dos exames de glicemia de jejum, hemoglobina glicada e perfil lipídico. O estresse oxidativo foi investigado por meio dos níveis de óxido nítrico (NO), peroxidação lipídica (Malondialdeído - MDA) e da superóxido dismutase (SOD). A avaliação da inflamação foi realizada por meio dos marcadores: fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), proteína C reativa ultra sensível (PCRus) e fibrinogênio. Além disso, foi realizada a investigação do polimorfismo -308 G/A na região promotora do gene do TNF $\alpha$  e sua correlação com seus níveis plasmáticos. Neste estudo, foi encontrado um controle glicêmico inadequado dos pacientes com DM2 usuários de insulino terapia e uma baixa adesão ao tratamento em ambos os grupos com DM2 (aproximadamente 50% dos pacientes). O grupo DM2 com insulino terapia apresentou menores níveis de NO e SOD, maiores níveis de fibrinogênio e TNF- $\alpha$ , e níveis inferiores de PCRus que o grupo DM2 sem insulino terapia. Na peroxidação lipídica ambos os grupo de pacientes com DM2 apresentaram níveis mais elevados de MDA que o grupo controle. Não houve correlação do polimorfismo -308 G/A na região promotora do gene do TNF- $\alpha$  com seus níveis plasmáticos em pacientes com DM2. Em conclusão, os pacientes com DM2, usuários e não de insulino terapia, possuem aumento do estresse oxidativo e da inflamação, que podem, conseqüentemente, contribuir nas diversas complicações da doença.

Palavras chave: diabetes mellitus tipo 2, insulina, controle metabólico, inflamação, estresse oxidativo.



## ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (DM2) is a metabolic disorder resulting from hyperglycemia and insulin resistance which is characterized by increased production of reactive species leading to oxidative stress and inflammatory changes. The goal of this study was to investigate whether the use of insulin therapy in patients with Type 2 Diabetes Mellitus influences levels of inflammatory markers and oxidative stress. It is a clinical study in which 80 patients diagnosed with T2DM (40 in insulin therapy and 40 without insulin therapy) and 40 in the control group (without DM2) were selected. Adherence to treatment was assessed by the Morisky-Green test. Metabolic control was evaluated through tests of fasting glycemia, glycated hemoglobin and lipid profile. Oxidative stress was investigated through levels of nitric oxide (NO), lipid peroxidation (Malondialdehyde - MDA) and superoxide dismutase (SOD). The inflammation evaluation was performed through the markers: tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), ultra sensitive C reactive protein (CRP) and fibrinogen. In addition, the -308 G / A polymorphism was investigated in the promoter region of the TNF $\alpha$  gene and its correlation with its plasma levels. In this study, an inadequate glycemic control was found in patients with DM2 who were on insulin therapy and a low adherence to treatment in both DM2 groups (approximately 50% of the patients). The DM2 group with insulin therapy had lower levels of NO and SOD, higher levels of fibrinogen and TNF- $\alpha$ , and lower levels of CRP than the DM2 group without insulin therapy. In lipid peroxidation both groups of patients with DM2 had higher levels of MDA than controls. There was no correlation of the -308 G / A polymorphism in the promoter region of the TNF- $\alpha$  gene with its plasma levels in patients with T2DM. In conclusion, patients with DM2, who are users or not of insulin therapy, have increased oxidative stress and inflammation, which may contribute to the various complications of the disease.

Key words: diabetes mellitus type 2, insulin, metabolic control, inflammation, oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Mecanismos que contribuem para a fisiopatologia da diabetes.....  | 21 |
| Figura 2: Vias envolvidas nas complicações da DM2. ....   | 25 |
| Figura 3: Reações envolvidas no ensaio colorimétrico nitrato/nitrito.....   | 48 |
| Figura 4: Princípio do ensaio da SOD (superóxido dismutase).....  | 49 |
| Figura 5: Reações envolvidas no ensaio da peroxidação lipídica. ....  | 50 |
| Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção do polimorfismo (-308 G/A) na região promotora do gene do TNF- $\alpha$ , através da técnica de PCR alelo específica .....  | 75 |
| Gráfico 1: Gráfico de barras representando a adesão ao tratamento medicamentoso dos pacientes dos grupos controle e DM2 com e sem insulinoterapia, classificados segundo a metodologia de Morisky Green. ....   | 65 |
| Gráfico 2: Gráfico Box-plots correspondentes aos níveis plasmáticos de NO ( $\mu$ M), SOD (U/mL) e MDA ( $\mu$ M), dos participantes dos grupos DM2 sem insulinoterapia, DM2 com insulinoterapia e controle, com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10°, 25°, 50°, 75° e 90° percentis. * Valor de p significativo ( $p < 0,05$ ) .....                   | 70 |
| Gráfico 3: Gráficos Box-plots correspondentes aos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ (pg/mL), PCRus (mg/dL) e fibrinogênio (mg/dL), dos participantes dos grupos DM2 sem insulinoterapia, DM2 com insulinoterapia e controle, com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10°, 25°, 50°, 75° e 90° percentis. * Valor de p significativo ( $p < 0,05$ ) ..... | 74 |

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Quadro 1: Iniciadores utilizados na PCR para detecção do polimorfismo (-308 G/A) do gene do TNF- $\alpha$ .....  | 56 |
| Quadro 2: Concentrações de reagentes utilizados na PCR para detecção do polimorfismo (-308 G/A) na região promotora do gene do TNF- $\alpha$ .....   | 57 |
| Quadro 3: Programa de PCR, com perfil dos ciclos para detecção do polimorfismo (-308 G/A) na região promotora do gene do TNF- $\alpha$ , utilizado no termociclador .....  | 58 |
| Tabela 1: Características sociodemográficas dos participantes dos grupos controle e DM2 com e sem insulino-terapia .....   | 62 |
| Tabela 2: Características clínicas dos participantes dos grupos controle e DM2 com e sem insulino-terapia .....  | 63 |
| Tabela 3: Tipo e frequência de medicamentos em uso pelos participantes dos grupos controle e DM2 com e sem insulino-terapia .....  | 64 |
| Tabela 4: Parâmetros bioquímicos dos participantes dos grupos controle e DM2 com e sem insulino-terapia expressos como mediana, intervalo interquartil e valor p. ....   | 67 |
| Tabela 5: Níveis plasmáticos dos marcadores dos níveis de óxido nítrico, superóxido dismutase e peroxidação lipídica nos grupos controle e DM2 com e sem insulino-terapia expressos como médias, desvios padrão, mediana, intervalo interquartil e valor p. .... | 69 |
| Tabela 6: Níveis plasmáticos dos marcadores de inflamação TNF- $\alpha$ , PCRus e fibrinogênio nos grupos controle e DM2 com e sem insulino-terapia expressos como médias, desvios padrão, mediana, intervalo interquartil e valor p .....                       | 73 |
| Tabela 7: Frequências genotípica e alélica do polimorfismo -308G/A do gene do TNF- $\alpha$ .....  | 76 |
| Tabela 8: Níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ dos indivíduos nos grupos controle e DM2 estratificados por genótipos e valores p .....  | 77 |
| Tabela 9: Medidas descritivas dos novos grupos, segundo a adesão .....   | 78 |
| Tabela 10: Análise estatística dos novos grupos, segundo adesão .....  | 79 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                     |  |
|---------------------|--|
| ABC                 | Complexo Avidina Biotina Peroxidase                            |
| ABESO<br>Metabólica | Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome |
| ADA                 | American Diabetes Association                                  |
| AGE                 | Produtos finais de glicação avançada                           |
| ANOVA               | Análise de Variância   |
| CAT                 | Catalase   |
| CT                  | Colesterol total   |
| DAG                 | Diacilglicerol   |
| DCCT                | The Diabetes Control and Complications Trial Research Group    |
| DM                  | Diabetes mellitus  |
| DM1/2               | Diabetes mellitus tipo 1/2                                     |
| DNA                 | Ácido desoxirribonucleico                                      |
| EDTA                | Ácido etilenodiaminotetracético                                |
| ELISA               | Ensaio de imunoabsorção enzimática                             |
| ERK                 | Quinase regulada por sinal extracelular                        |
| ERO                 | Espécies reativas de oxigênio                                  |
| ERN                 | Espécies reativas de nitrogênio                                |
| EDHF                | Fator hiperpolarizante dependente do endotélio                 |
| GFAT                | Enzima glutamina- frutose-6 amidotransferase fosfato           |
| GJ                  | Glicemia de jejum  |
| GLP-1               | Glucagon like peptídeo-1                                       |
| GPx                 | Glutathione peroxidase   |
| HAS                 | Hipertensão arterial sistêmica                                 |
| HbA1c               | Hemoglobina glicada  |
| HDL                 | Lipoproteína de alta densidade                                 |
| HRP                 | Horseshoe peroxidase   |
| HUCAM               | Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes                 |
| ICAM-1              | Molécula de adesão intercelular -1                             |
| IDF                 | International Diabetes Federation                              |
| IFN- $\gamma$       | Interferon gama  |
| IL                  | Interleucina   |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| IMC                     | Índice de massa corporal                                 |
| IRS-1                   | Receptor de insulina                                     |
| LABIOM                  | Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares      |
| LDL                     | Lipoproteína de baixa densidade                          |
| LESTAT                  | Laboratório de estatística da UFES                       |
| MCP1                    | Proteína quimioatrativa de monócitos 1                   |
| MDA                     | Malondialdeído   |
| MAPK                    | Proteína quinase ativada por mitogênio                   |
| NADH                    | Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida       |
| NFkB                    | Fator nuclear kappa B                                    |
| NO                      | Óxido nítrico  |
| NLRP3                   | Proteína receptora do tipo NOD 3                         |
| PAI-1                   | Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1             |
| PBS                     | Tampão fosfato-salino                                    |
| PCR                     | Reação em cadeia da polimerase                           |
| PCRus                   | Proteína C reativa ultra sensível                        |
| PKC                     | Proteína quinase C                                       |
| PMV                     | Prefeitura Municipal de Vitória                          |
| RI                      | Resistência a insulina                                   |
| SBD                     | Sociedade Brasileira de Diabetes                         |
| SDS                     | Dodecil sulfato de sódio                                 |
| SGLT2                   | Cotransportador de sodio-glicose-2                       |
| SOD                     | Superóxido dismutase                                     |
| TG/TGD                  | Triglicerídeos   |
| TGF- $\alpha$ e $\beta$ | Fator de crescimento transformante alfa e beta           |
| TMB                     | 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina                            |
| TNF- $\alpha$           | Fator de necrose tumoral alfa                            |
| TNF-R                   | Receptor de TNF  |
| UKPDS                   | U.K. Prospective Diabetes Study                          |
| USF                     | Unidade de Saúde da Família                              |
| VLDL                    | Lipoproteína de muito baixa densidade                    |
| WHO                     | Organização Mundial de Saúde (World Health Organization) |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 14 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA .....  | 16 |
| 2.1 DIABETES MELLITUS.....   | 16 |
| 2.2 TRATAMENTO DA DIABETES MELLITUS TIPO 2 .....                           | 17 |
| 2.3 FISIOPATOLOGIA DA DIABETES MELLITUS TIPO 2.....                        | 20 |
| 2.3.1 Disfunção endotelial.....  | 22 |
| 2.4 COMPLICAÇÕES DA DIABETES MELLITUS TIPO 2.....                          | 24 |
| 2.4.1 Vias envolvidas nas complicações da diabetes mellitus tipo 2 .....   | 25 |
| 2.4.1.1 Ativação das vias dos polióis .....                                | 25 |
| 2.4.1.2 Aumento da formação dos produtos finais da glicação avançada ..... | 26 |
| 2.4.1.3 Ativação da proteína quinase C (PKC) .....                         | 27 |
| 2.4.1.4 Ativação da via das hexosaminas.....                               | 27 |
| 2.5 ESTRESSE OXIDATIVO E DIABETES MELLITUS TIPO 2.....                     | 28 |
| 2.6 INFLAMAÇÃO E DIABETES MELLITUS TIPO 2 .....                            | 34 |
| 2.6.1 Polimorfismo -308 G/A no gene do TNF- $\alpha$ .....                 | 39 |
| 3 OBJETIVOS .....  | 40 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL .....   | 40 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 40 |
| 4 METODOLOGIA.....   | 41 |
| 4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO .....  | 41 |
| 4.1.1 Critérios de inclusão .....  | 41 |
| 4.1.2 Critérios de não inclusão .....                                      | 42 |
| 4.2 AMOSTRA BIOLÓGICA.....   | 42 |

|  |    |
|--|----|
| 4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS E ANTROPOMÉTRICOS .....                                | 43 |
| 4.4 AVALIAÇÃO DA ADESÃO AO TRATAMENTO .....  | 43 |
| 4.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS .....   | 44 |
| 4.5.1 Perfil Glicêmico .....   | 44 |
| 4.5.1.1 <i>Determinação da hemoglobina glicada (HbA1c)</i> .....                             | 44 |
| 4.5.1.2 <i>Determinação da glicose (glicemia de jejum)</i> .....                             | 44 |
| 4.5.2 Perfil Lipídico .....  | 45 |
| 4.5.2.1 <i>Determinação de triglicérideo</i> .....   | 45 |
| 4.5.2.2 <i>Determinação de colesterol total</i> .....  | 45 |
| 4.5.2.3 <i>Determinação de colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade)</i> .....        | 46 |
| 4.5.2.4 <i>Determinação de colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade)</i> .....         | 46 |
| 4.5.2.5 <i>Determinação de colesterol VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade)</i> ..... | 46 |
| 4.6 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO .....  | 47 |
| 4.6.1 Dosagem de nitrito e nitrato.....  | 47 |
| 4.6.2 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase .....                         | 48 |
| 4.6.3 Avaliação da peroxidação lipídica.....   | 49 |
| 4.7 AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO.....   | 50 |
| 4.7.1 Determinação da Proteína C Reativa ultra sensível (PCRus).....                         | 51 |
| 4.7.2 Determinação de fibrinogênio .....   | 51 |
| 4.7.3 Dosagem de citocinas.....  | 51 |
| 4.7.3.1 <i>Determinação de interleucina 1 beta (IL 1 <math>\beta</math>)</i> .....           | 51 |
| 4.7.3.2 <i>Determinação do fator de necrose tumoral (TNF-<math>\alpha</math>)</i> .....      | 52 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.8 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO -308 G/A do gene do TNF- $\alpha$ .....  | 54  |
| 4.8.1 Extração de DNA genômico.....                                    | 54  |
| 4.8.2 Detecção do polimorfismo -308 G/A do gene do TNF- $\alpha$ ..... | 55  |
| 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....  | 58  |
| 5 RESULTADOS .....   | 60  |
| 5.1 PERFIL CLÍNICO E SÓCIODEMOGRÁFICO .....                            | 60  |
| 5.2 PERFIL BIOQUÍMICO.....   | 65  |
| 5.3 PERFIL DE MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO .....                   | 67  |
| 5.4 PERFIL DE MARCADORES DA INFLAMAÇÃO.....                            | 71  |
| 5.5 PERFIL GENÉTICO .....  | 75  |
| 5.6 ANÁLISE POR GRUPO SEGUNDO A ADESÃO.....                            | 77  |
| 6 DISCUSSÃO .....  | 80  |
| 7 CONCLUSÃO.....   | 95  |
| 8 REFERÊNCIAS.....   | 96  |
| ANEXO 1 – Aprovação CEP .....  | 106 |



## 1. INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas resultantes de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Os efeitos da DM incluem danos a longo prazo, disfunção e falha de vários órgãos (WHO,1999). A diabetes mellitus tipo 2 (DM2) representa 90 a 95% dos casos e a maioria dos pacientes com essa forma de DM apresenta sobrepeso ou obesidade (WHO, 2016; ADA, 2016; SBD, 2016).

Atualmente, estima-se que a população mundial com diabetes seja da ordem de 415 milhões e que alcance 642 milhões em 2040. Em 2014, existiam 11,9 milhões de pessoas, na faixa etária de 20 a 79 anos, com DM no Brasil, podendo alcançar 19,2 milhões em 2035 (IDF, 2016; SBD, 2016).

As características da DM2 incluem sensibilidade reduzida à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo, e um declínio progressivo na função das células- $\beta$  do pâncreas que levam à diminuição na secreção de insulina, resultando em hiperglicemia (CORNELL, 2015).

O tratamento da doença consiste em modificações de estilo de vida, alimentação e atividade física, juntamente com a terapia farmacológica, que são os antidiabéticos orais ou insulina (SBD, 2016). Durante o curso da doença e com o declínio da função da célula  $\beta$ , pode ser necessário o tratamento com insulina, tendo como objetivo mimetizar seu perfil fisiológico (KARALLIEDDE e GNUDI, 2016).

Nos pacientes com DM a associação de resistência à insulina (RI), obesidade e hiperglicemia, resulta em alterações inflamatórias, incluindo a produção de citocinas, moléculas de adesão e espécies reativas de oxigênio que são tóxicas para o endotélio e podem levar ao dano vascular (FONSECA, 2007).

Há um aumento de interleucinas IL-6, IL-1 e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) nos pacientes com esta doença (FRANCÉS et al., 2013). A exposição prolongada de células- $\beta$  a estes fatores resulta na produção excessiva e

liberação de espécies reativas e ativação de caspases, que inibem a secreção de insulina e aumentam a apoptose das células- $\beta$  (CIESLAK et al., 2015).

Vários são os mecanismos subjacentes à secreção de insulina defeituosa e respostas na DM2 como glicotoxicidade, lipotoxicidade e estresse oxidativo. A contribuição relativa de cada mecanismo ainda não está clara. Porém, todos são associados a respostas inflamatórias (DONATH, 2014).

O estresse oxidativo desempenha um papel importante no desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares. O acúmulo de espécies reativas no endotélio vascular de pacientes com DM é responsável pela ativação de vias bioquímicas prejudiciais que contribuem para a inflamação vascular e geração de mais espécies reativas de oxigênio (PANENI et al., 2013). A ativação de cascatas celulares sensíveis ao estresse levam a formação de produtos de genes, que causam lesão celular, levando a complicações diabéticas a longo prazo (LOPES et al., 2008).

O número de pessoas com DM2 é crescente devido ao aumento da prevalência da obesidade, suscetibilidade genética, urbanização e envelhecimento (SBD, 2016). Estudos demonstram que a terapia com insulina diminui os níveis de citocinas pró-inflamatórias e reduz a produção de espécies reativas (MONNIER et al., 2010; JANSEN et al., 2013).

Levando-se em conta que a diabetes é uma doença de caráter multifatorial e que os fatores genéticos e adquiridos associados a ela podem variar em diferentes populações, seria importante conduzir um estudo em pacientes da nossa população, uma vez que os mecanismos patogênicos da doença ainda não estão totalmente esclarecidos.

Dessa forma, investigar se os marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo são influenciados pelo uso da insulino terapia em pacientes com DM2 contribui para aumentar o conhecimento da doença e do uso da insulino terapia, bem como de suas possíveis vantagens no portador da DM2. As informações coletadas servirão para um melhor entendimento da doença e suas comorbidades.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. DIABETES MELLITUS

A Diabetes mellitus (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, e ocorre ou quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o corpo não pode usar a insulina que produz de modo eficaz (SBD, 2016; WHO, 2016), levando ao desenvolvimento de complicações específicas (GIACCO e BROWNLEE, 2010).

É uma doença crônica complexa, que exige assistência médica contínua com estratégias de redução de risco além do controle glicêmico do paciente. A educação e apoio são fundamentais para prevenir complicações agudas e reduzir o risco de complicações a longo prazo (ADA, 2016).

De acordo com a *American Diabetes Association* (ADA) a diabetes inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Existem ainda duas categorias, glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída, que são consideradas pré-diabetes e são fatores de risco para o desenvolvimento de DM (ADA, 2016; SBD, 2016).

A DM2 é a forma verificada em 90 a 95% dos casos. Nela, o corpo é capaz de produzir insulina, mas torna-se resistente, de modo que a insulina é ineficaz. Ocorre uma perda progressiva da secreção de insulina, e seus níveis podem tornar-se insuficientes. Tanto a resistência à insulina (RI) quanto a deficiência levam a hiperglicemia. Geralmente ocorre em adultos, mas está sendo cada vez mais observada em crianças e adolescentes. É causada por uma interação de fatores genéticos e ambientais. Os fatores de risco mais importantes são o excesso de peso, sedentarismo e má nutrição (ADA, 2016; SBD, 2016; IDF, 2016).

A RI e o defeito na função das células  $\beta$  estão presentes na fase pré-clínica da doença. São fatores de risco também para DM2 a hipertensão e dislipidemia (SBD, 2016; KARALLIEDDE e GNUDI, 2016). Estima-se que há 318 milhões

de adultos com tolerância à glicose diminuída, o que os coloca em risco elevado de desenvolver a doença no futuro (IDF, 2016).

A diabetes é uma das maiores emergências de saúde global do século 21. Atualmente, estima-se que a população mundial com diabetes seja da ordem de 415 milhões e que alcance 642 milhões em 2040, aumentando a prevalência de 1 em cada 11 adultos para 1 em cada 10 adultos no mundo. Em 2014, existiam 11,9 milhões de pessoas, na faixa etária de 20 a 79 anos, com diabetes no Brasil, podendo alcançar 19,2 milhões em 2035 (IDF, 2016; SBD, 2016). A diabetes é uma das principais causas de cegueira, insuficiência renal, ataques cardíacos, acidentes vasculares cerebrais e amputação dos membros inferiores (WHO, 2016).

O número de diabéticos está aumentando em virtude do crescimento e envelhecimento populacional, maior urbanização, aumento da obesidade e sedentarismo (SBD, 2016). Na tentativa de melhorar o acesso aos cuidados de diabetes e reduzir sua prevalência, políticas e programas foram introduzidos pelo governo brasileiro, tais como o programa Farmácia Popular e os esforços preventivos, como o programa Hiperdia. No entanto, ainda existe a falta de dados sobre as desigualdades no acesso aos medicamentos e serviços de cuidados a saúde (BERTOLDI et al., 2013).

Em um estudo realizado no Brasil, foi estimado que o custo total de atendimento ambulatorial do paciente diabético durante o período de 1 ano foi de US\$ 2108. Com a progressão da doença e na presença de complicações crônicas, os custos aumentam, ressaltando a necessidade e melhoria nas intervenções da DM e suas complicações (BAHIA et al., 2011). Além disso, a dor, ansiedade e perda de qualidade de vida também apresentam grande impacto na vida das pessoas com diabetes e seus familiares (SBD, 2016).

## **2.2. TRATAMENTO DA DIABETES MELLITUS TIPO 2**

O tratamento de pacientes com diabetes requer informações bem definidas, a fim de obter os benefícios máximos. É um processo colaborativo e

multiprofissional que envolve paciente, médico, farmacêutico e outros profissionais e tem como objetivos redução dos níveis de glicemia, evitando complicações micro e macrovasculares (ALHABIB et al., 2014; SBD, 2016).

O tratamento deve levar em consideração as preferências do paciente, custo e efeitos colaterais dos medicamentos, os efeitos no peso corporal e o risco de hipoglicemia. Devem ser feitas modificações de estilo de vida, alimentação e atividade física, juntamente com a terapia farmacológica (SBD, 2016).

Antidiabéticos orais são substâncias que têm a finalidade de baixar a glicemia e mantê-la normal. De acordo com o mecanismo de ação, são divididos em quatro categorias, com finalidade prática: os que aumentam a secreção de insulina (hipoglicemiantes), os que não a aumentam (anti-hiperglicemiantes), os que aumentam a secreção de insulina de maneira dependente de glicose, além de promover a supressão do glucagon e os que promovem glicosúria (sem relação com a secreção de insulina)). A metformina é o antidiabético oral de escolha para início do tratamento de DM2 (ADA, 2016; SBD, 2016).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a adesão pode ser definida como o envolvimento ativo e voluntário do paciente no manejo de sua doença, seguindo um curso de tratamento mutuamente acordado e dividindo a responsabilidade entre o paciente e os profissionais de saúde (WHO, 2003). Devido às diversas alterações do estilo de vida impostas aos pacientes com DM, a adesão ao tratamento é um grande desafio (PONTIERI e BACHION, 2010).

Agentes hipoglicemiantes são os secretagogos de insulina e compreendem as sulfonilureias (clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glipizida e glimepirida). Agentes anti-hiperglicemiantes possuem risco reduzido de hipoglicemia, e fazem parte desse grupo o inibidor da alfa-glicosidase, que reduz a velocidade de absorção intestinal de glicose, representado pela acarbose, o grupo biguanida, com maior ação anti-hiperglicemiante, que reduz a produção hepática de glicose e compreende a metformina e a pioglitazona, que sensibiliza a ação da insulina produzida pelo próprio paciente. Agentes que aumentam a secreção de insulina são os inibidores da DPP-4 (dipeptil

peptidase-4) (gliptinas) cujo mecanismo é a estabilização do GLP-1 (glucagon like peptídeo-1) pela inibição da enzima que o degrada, a DPP-4. E os agentes que promovem glicosúria impedem a reabsorção de glicose via inibição das proteínas SGLT2 (cotransportador de sódio-glicose-2), nos túbulos proximais dos rins, e são a dapagliflozina, empagliflozina e canagliflozina (SBD, 2016).

Pacientes com DM2 podem variar entre um fenótipo de RI, mas com reserva de células  $\beta$  suficiente para permanecer independente de insulina e aqueles que podem exigir o tratamento precoce de insulina durante o curso da doença (KARALLIEDDE e GNUDI, 2016).

Os testes de glicemia de jejum e HbA1c (hemoglobina glicada) são utilizados para acompanhar se o paciente está obtendo um controle adequado da glicemia. A dificuldade de manter a HbA1c no nível desejado decorre do declínio progressivo da função da célula  $\beta$ . Se o valor de referência de HbA1c (< 7%) não é alcançado após 3 meses, deve ser considerada uma combinação de metformina a outros antidiabéticos, ou insulina (SBD, 2016).

A insulina pode reduzir a HbA1c aos níveis desejáveis, sendo o objetivo do tratamento mimetizar seu perfil fisiológico. É importante destacar que a insulinoterapia pode ser necessária a qualquer tempo durante a evolução natural do DM2, e deve ser iniciada quando não se consegue atingir e manter um controle glicêmico adequado com associação de dois ou três medicamentos orais nas suas dosagens máximas e em recém-diagnosticados, com poliúria, polidipsia, perda de peso e astenia (ADA, 2016; SBD, 2016).

No entanto, o uso da insulina está associado ao desconforto, devido as injeções diárias no tecido subcutâneo, afetando a qualidade de vida dos pacientes, que se mostra melhor quando não ocorre o uso da insulinoterapia (domínio psicológico e relações sociais), podendo-se supor que a insulinoterapia pode ser um fator desfavorável por estar associada a um controle metabólico inadequado (SOUZA e ZANETTI, 2000; FRANCO et al., 2013).

### 2.3. FISIOPATOLOGIA DA DIABETES MELLITUS TIPO 2

A fisiopatologia da DM2 envolve vários órgãos e tecidos, incluindo o pâncreas, fígado, músculo esquelético, tecido adiposo, cérebro, trato gastrointestinal e rim (CORNELL, 2015). A RI no músculo e no fígado e a falha das células  $\beta$  são os defeitos fisiopatológicos fundamentais na DM2 (DEFRONZO, 2009). A insulina tem como ações acelerar o transporte de glicose no tecido muscular e adiposo, regular a transcrição de genes e atividades de enzimas. A secreção de insulina é regulada principalmente pela concentração de glicose no plasma (TAYLOR et al., 1994).

A deficiência de insulina é definida como uma condição patológica na qual há uma diminuição inadequada na velocidade em que células  $\beta$  secretam insulina (TAYLOR et al., 1994). E a resistência à insulina e a sensibilidade reduzida à insulina, tornando deficiente a utilização de glicose mediada por ela (CORNELL, 2015).

Indivíduos em risco de DM2 têm um estado inicial de RI compensada pela hipersecreção de insulina pelas células  $\beta$ , resultando em tolerância normal à glicose. Porém a RI excede a capacidade funcional das células  $\beta$ , sendo incapaz de suprir a secreção de insulina necessária. A sensibilidade reduzida à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo, e um declínio progressivo na função das células- $\beta$  levam à diminuição da secreção de insulina, resultando em hiperglicemia e DM2 (DEFRONZO, 2009; ZACCARDI et al., 2016; CORNELL, 2015).

Sendo assim, a progressão da diabetes pode ser dividida em fases, sendo a primeira fase a compensatória, quando ocorre aumento na secreção da insulina para manter a normoglicemia diante da RI e/ou diminuição de massa de células  $\beta$ . A próxima fase ocorre quando os níveis de glicose começam a aumentar, com a perda de massa de células  $\beta$ , interrompendo sua função normal. O último período é caracterizado pela descompensação grave com um rápido aumento nos valores de glicose com detecção da diabetes (TABÁK et al., 2009).

Embora a contribuição relativa de disfunção das células  $\beta$  e a RI possa variar para cada indivíduo, mudanças na sensibilidade à insulina, na secreção de insulina e nos níveis de glicose podem preceder o diagnóstico clínico de diabetes em 3 a 6 anos (TABÁK et al., 2009).

Dentre os mecanismos que contribuem para a fisiopatologia da diabetes estão a disfunção das células- $\beta$ ; defeitos da sinalização de insulina no cérebro, músculos esqueléticos, e fígado; lipólise acelerada levando ao aumento da produção de ácidos graxos; ação e produção desregulada das incretinas e hormônios do intestino; aumento na secreção de glucagon; produção de mediadores pró inflamatórios causando inflamação subclínica; aumento da produção de glicose, e o estresse oxidativo (SAAD et al., 2015), como mostrado na figura 1.

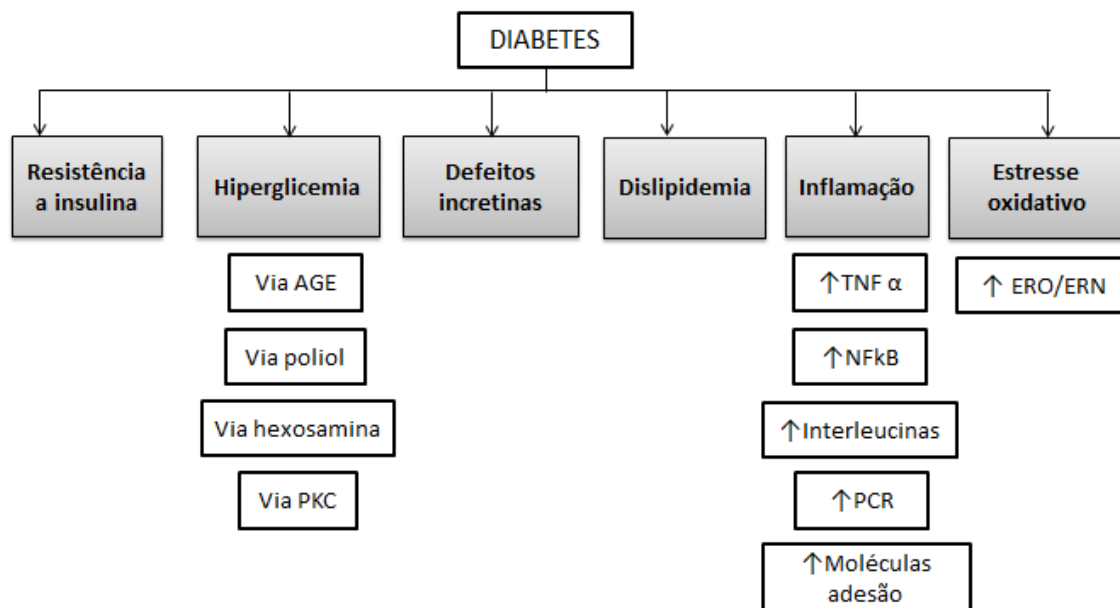


Figura 1: Mecanismos que contribuem para a fisiopatologia da diabetes. Adaptada de: SAAD et al., 2015.

AGE: produtos finais de glicação avançada; PKC: proteína quinase C; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; NFkB: fator nuclear kappa B; PCR: proteína C reativa; ERO: espécies reativas de oxigênio; ERN: espécies reativas de nitrogênio.

Reações pró-inflamatórias na ilhota pancreática estão intimamente relacionados com a deposição amilóide e perda de células  $\beta$ . A deposição



amilóide ativa uma reação inflamatória, produzindo substâncias inflamatórias para liberar inflamassomas, um complexo multiproteico que atua na ativação da caspases e estimula a produção de interleucina 1 $\beta$  para danificar as células  $\beta$  (YAGIHASHI et al., 2012).

Embora a progressão da insuficiência de insulina possa ser atribuída à morte celular, tem sido relatado que a perda de massa de células  $\beta$  é devido a sua desdiferenciação. Estudos mostram que células  $\beta$  maduras que produzem insulina se desdiferenciam para células progenitoras do sistema endócrino que não produzem insulina. Patologias celulares, como apoptose, autofagia, estresse oxidativo, e sobrecarga de nutrientes podem afetar tanto a função quanto a massa celular (KANETO et al., 2016; CINTI et al., 2016).

Entre os potenciais mecanismos que podem levar à disfunção das células- $\beta$ , sugere-se que o estresse de células  $\beta$  pode estimular a inflamação local e modificar o equilíbrio entre a massa e a função de células  $\alpha$  e  $\beta$  dentro de ilhotas de Langerhans. Além disso, os mecanismos de glicotoxicidade e lipotoxicidade (ambos envolvendo aumento do estresse oxidativo e apoptose) conduzem a uma deficiência e perda acelerada de células  $\beta$  (ZACCARDI et al., 2016; CORNELL, 2015).

### **2.3.1. Disfunção endotelial**

O endotélio vascular possui funções como regulação da integridade do vaso, crescimento vascular e remodelação, crescimento e metabolismo dos tecidos, respostas imunes, adesão celular, angiogênese, hemostasia e permeabilidade vascular. Como principal regulador da homeostase vascular, mantém o equilíbrio entre vasodilatação e vasoconstrição, inibição e promoção da migração e proliferação de células musculares lisas, fibrinólise e trombogênese, e prevenção e estimulação da adesão e agregação de plaquetas. A disfunção endotelial caracteriza um desequilíbrio desse processo e pode ser desencadeada por vários fatores como colesterol LDL elevado, colesterol HDL baixo, triglicerídeos elevados, hipertensão, proteína C-reativa e fibrinogênio elevados e hiperglicemia (SENA; PEREIRA; SEIÇA, 2013).

Diversas substâncias são liberadas pelas células endoteliais, que podem ter ação vasodilatadora ou vasoconstritora. Os vasodilatadores derivados do endotélio são o óxido nítrico (NO), prostaciclina e fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHFs). O NO possui diversas ações importantes para a manutenção da homeostase vascular. Além de causar vasodilatação, tem propriedades anti-proliferativas, antioxidantes e anti-inflamatórias que inibem a aterogênese. Opostas a essas ações há vários vasoconstritores derivados do endotélio, sendo os principais: endotelina-1, angiotensina-II e prostaglandinas vasoconstritoras (CAHILL e REDMOND, 2016).

Na diabetes, a hiperglicemia desencadeia processos como a lesão vascular, o estresse oxidativo, a inflamação e as alterações crônicas no equilíbrio hemodinâmico, ocorrendo disfunção endotelial, levando a um quadro de vasculopatia que favorece um estado pró-inflamatório/trombótico que, em última instância, leva à aterosclerose e formação de trombo arterial (PANENI et al., 2013; DOMINGUETI et al., 2016).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica na qual a parede da artéria se torna mais espessa como resultado do acúmulo de colesterol, macrófagos e células musculares lisas, restringindo o fluxo sanguíneo através da artéria (CAHILL e REDMOND, 2016).

Durante o processo aterosclerótico ocorre oxidação do LDL, que estimula a expressão de várias moléculas de adesão, secreção de fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e quimiocinas, além de promover a ligação seletiva de leucócitos e diferenciação de monócitos em macrófagos, que fagocitam o excesso de LDL oxidada e se transformam em células de espuma, formando estrias gordurosas. Quando essa placa de ateroma se rompe há exposição de fatores altamente trombogênicos, como o fator de von-Willebrand e fator tecidual, o que favorece a migração de plaquetas e o crescimento rápido do trombo (DOMINGUETI et al., 2016).

## 2.4. COMPLICAÇÕES DA DIABETES MELLITUS TIPO 2

As complicações representam a maior parte dos custos relacionados a essa enfermidade. Estima-se que pacientes com diabetes apresentam custos de hospitalização duas a quatro vezes maiores que pacientes não diabéticos. E essas complicações são menos frequentes e menos graves em pessoas com os níveis de glicemia bem controlados (PORTERO et al., 2003; MCLELLAN, 2006). As principais complicações agudas da DM incluem cetoacidose diabética, hiperglicemia hiperosmolar, coma diabético hipoglicêmico, infecções e doenças periodontais (ULLAH et al., 2015).

Além disso, pessoas com DM estão em maior risco de complicações macro e microvasculares, que são consideradas complicações crônicas (ADLER et al., 2010). As complicações microvasculares mais prevalentes são nefropatia, retinopatia e neuropatia; já dentre as macrovasculares destacam-se a doença arterial coronariana, que pode levar ao infarto do miocárdio, o acidente vascular cerebral e a doença arterial obstrutiva periférica (SOARES et al., 2010).

As complicações micro e macrovasculares diabéticas ocorrem principalmente devido à exposição prolongada à hiperglicemia, juntamente com outros fatores de risco como hipertensão arterial, dislipidemia e susceptibilidade genética (PANENI et al., 2013).

Como consequência da patologia microvascular na retina, glomérulo renal e nervo periférico, a diabetes é uma das principais causas de cegueira, doença renal terminal e uma variedade de neuropatias debilitantes. Além disso, os pacientes com diabetes têm um risco maior de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e amputação de membros devido à associação da DM com doenças macrovasculares ateroscleróticas que afetam artérias que suprem o coração, cérebro e extremidades inferiores (BROWNLEE, 2001).

Os estudos UKPDS (U.K. Prospective Diabetes Study, 1998) e DCCT (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993) estabeleceram que a hiperglicemia é o início da causa do dano no tecido do paciente com diabetes. Em 10 anos de acompanhamento, o estudo UKPDS

(1998) mostrou que um controle da glicose e melhora na pressão sanguínea reduzem o risco de complicações diabéticas. E o estudo DCCT (1993) mostrou que em 6,5 anos de acompanhamento, uma terapia intensiva com antidiabéticos orais ou insulina retardou o início e diminuiu a progressão de complicações.

### 2.4.1. Vias envolvidas nas complicações da diabetes mellitus tipo 2

Para explicar como a hiperglicemia provoca complicações diabéticas, complexos mecanismos bioquímicos têm sido propostos. Entre eles podemos citar, o fluxo aumentado na via dos polióis; aumento da formação dos produtos finais da glicação avançada (AGE); ativação das isoformas da proteína quinase C (PKC); e aumento de fluxo da via de hexosamina (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005).

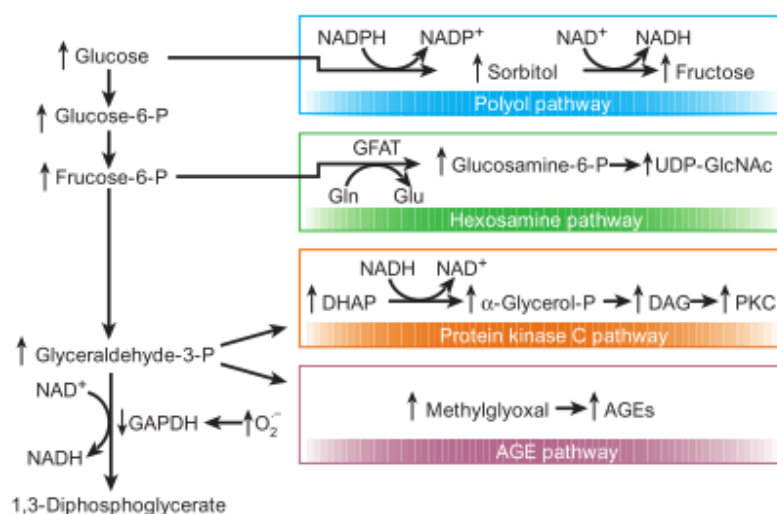


Figura 2: Vias envolvidas nas complicações da DM2. Retirada de: BROWNLEE, 2001.

#### 2.4.1.1. Ativação da via dos polióis

A via dos polióis é constituída por duas enzimas. A primeira enzima, aldose redutase, normalmente reduz os aldeídos tóxicos a álcoois inativos na célula,

reduzindo a glicose a sorbitol com o auxílio de NADPH, e a segunda enzima, sorbitol desidrogenase, converte sorbitol em frutose, com  $\text{NAD}^+$  (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005).

O aumento da atividade da aldose redutase tem sido correlacionado com a formação de catarata, retinopatia, nefropatia e neuropatia, ressaltando assim a sua importância em diversos tipos de células (EVANS et al., 2002; NIEDOWICZ E DALEKE, 2005).

#### *2.4.1.2. Aumento da formação dos produtos finais da glicação avançada*

A formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) é lenta e constante no organismo normal, mas a sua produção é significativamente aumentada no diabetes (KATARIA et al., 2015). A hiperglicemia intracelular é o acontecimento primário determinante para a formação de AGEs intra e extracelular (BROWNLEE, 2001; KATARIA et al., 2015). Os AGEs são dificilmente degradados e permanecem um longo tempo em tecidos diabéticos, mesmo quando ocorre o controle glicêmico (YAMAGISHI et al., 2012).

AGEs são formados a partir da reação não-enzimática dos dicarbonilos intracelulares reativos (glioxal, metilglioxal e 3-desoxiglicosona) com grupos amino livres de proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e açúcares redutores (BROWNLEE, 2001; KATARIA et al., 2015).

Os AGEs podem desempenhar papel negativo na patogênese de várias complicações diabéticas, como observado na retinopatia, nefropatia e neuropatia (KATARIA et al., 2015; PITOCCO et al., 2013), via expressão aumentada de moléculas de adesão, assim como aumento da permeabilidade vascular (MOTAWI et al., 2013).

A produção intracelular de precursores AGEs causam danos às células alvo por modificação de proteínas intracelulares envolvidas na regulação da transcrição de genes; os componentes da matriz extracelular modificados por precursores AGEs causam disfunção celular; as proteínas plasmáticas modificadas por precursores AGEs se ligam a receptores de AGE nas células

endoteliais, mesangiais e macrófagos, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio, que ativa o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), causando alterações patológicas na expressão gênica (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005; GIACCO E BROWNLEE, 2010).

#### *2.4.1.3. Ativação da proteína quinase C (PKC)*

A PKC é uma proteína de membrana periférica através dos quais alguns sinais mediados por lípidos são transmitidos (NIEDOWICZ e DALEKE, 2005), e faz parte de uma família de treonina quinases serina que consiste em 15 isoformas (KATARIA et al., 2015). A enzima fosforila várias proteínas alvo. A atividade das isoformas clássicas é dependente de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfatidil-serina e está bastante aumentada pelo segundo mensageiro lipídico diacilglicerol (DAG) (BROWNLEE, 2001; GIACCO e BROWNLEE, 2010).

A estimulação de PKC afeta a vasoconstrição, o crescimento do músculo liso, a permeabilidade da célula endotelial, entre outros processos. A PKC ativada regula várias funções vasculares, tais como a contratilidade, a proliferação celular e a síntese de proteínas de matriz extracelular (NIEDOWICZ E DALEKE, 2005; KATARIA et al., 2015). Na diabetes, a PKC está envolvida na retinopatia e na neuropatia (PITOCCO et al., 2013).

#### *2.4.1.4. Ativação da via das hexosaminas*

Em um ambiente de hiperglicemia no interior de uma célula, parte da frutose-6-fosfato se desvia da via glicolítica para uma via de sinalização com a enzima glutamina- frutose-6 amidotransferase fosfato (GFAT) convertendo o fosfato de frutose-6 a uridina difosfato N-acetil glucosamina, no qual são adicionados resíduos de serina e treonina de fatores de transcrição, resultando em alterações patológicas na expressão gênica (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005; GIACCO e BROWNLEE, 2010).

A inibição da GFAT bloqueia aumentos induzidos por hiperglicemia na transcrição de citocinas como fator de crescimento transformante alfa e beta (TGF- $\alpha$  e  $\beta$ ) e PAI-1 (inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1), que levam a

danos aos vasos sanguíneos diabéticos quando tem sua expressão aumentada (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005; GIACCO e BROWNLEE, 2010; PITOCCO et al, 2010).

Esta via também tem um importante papel na hiperglicemia e na RI induzida por um excesso de oxidação de ácido graxo, contribuindo para a patogênese de complicações diabéticas (BROWNLEE, 2001; PITOCCO et al, 2010).

Todos esses mecanismos celulares refletem um processo único induzido pela hiperglicemia, que é a superprodução de superóxido pela cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005; PANENI et al., 2013). Portanto, uma hipótese importante para explicar o aparecimento de complicações diabéticas induzida pela hiperglicemia é um aumento do estresse oxidativo (NIEDOWICZ e DALEKE, 2005).

## **2.5. ESTRESSE OXIDATIVO E DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Os sistemas biológicos que funcionam em condições aeróbicas são expostos a oxidantes, gerados intencionalmente ou como subprodutos (BASHAN et al., 2009; PITOCCO et al., 2013). Esses oxidantes ocorrem em duas categorias, as espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo mais conhecidos o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil e espécies reativas de nitrogênio (ERN), em que as mais comuns são o óxido nítrico e peroxinitrito (BASHAN et al., 2009; PITOCCO et al., 2010; PITOCCO et al., 2013). Estas espécies contêm um ou mais elétrons desemparelhados e são instáveis e de curta duração (TANGVARASITTICHAJ, 2015; ASMAT et al., 2015).

As espécies reativas são importantes para a ativação de diferentes vias de sinalização que alteram a expressão de genes dentro da célula, como proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (BASHAN et al., 2009; PITOCCO et al., 2013; ASMAT et al., 2015). Dentre os efeitos fisiológicos em que ocorre a participação de espécies reativas estão o tônus vascular, adesão celular, angiogênese, respostas imunes em

macrófagos e neutrófilos, crescimento celular e ação hormonal (LOPES et al., 2008; PITOCCO et al., 2013; ASMAT et al., 2015).

A produção de espécies reativas ocorre em resposta a estímulos intracelulares e extracelulares. Os fatores extracelulares atuam através de receptores de membrana plasmática, tais como hormônios e fatores de crescimento, insulina, citocinas pró-inflamatórias, e fatores ambientais e físicos. Estímulos intracelulares incluem o metabolismo dos nutrientes, a transferência de elétrons mitocondrial, sistemas enzimáticos em que ERO são gerados (lipoxigenase, xantina oxidase) e mecanismos de desintoxicação (sistema P-450) (BEDARD e KRAUSE, 2007; BASHAN et al., 2009; PITOCCO et al., 2013).

A produção em excesso das espécies reativas, ou a sua eliminação comprometida, pode resultar em um desequilíbrio e danos ao organismo. As espécies reativas podem reagir com vários componentes celulares, podendo destruir ou alterar sua função. Por isso, vem sendo identificados como os principais contribuintes que danificam organismos biológicos, com envolvimento no processo de envelhecimento, câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, obesidade e diabetes (BEDARD e KRAUSE, 2007; LOPES et al., 2008; PITOCCO et al., 2010; PITOCCO et al., 2013).

Para controlar os efeitos das espécies reativas, quando geradas em excesso, o corpo produz antioxidantes endógenos, ou adquire antioxidantes exógenos pela dieta (ASMAT et al., 2015; TANGVARASITTICHAJ, 2015). O termo antioxidante se refere a qualquer substância que retarda a oxidação de um substrato (ASMAT et al., 2015).

O sistema antioxidante sanguíneo enzimático é representado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), que atuam diretamente nos oxidantes, convertendo-os em porções não oxidantes (CAT), ou para as espécies menos reativas (SOD), ou neutralizando (GPx). O sistema antioxidante não enzimático é formado por substâncias como a glutathione, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e  $\beta$ -caroteno (VASCONCELOS et al., 2007; BASHAN et al., 2009). Assim, os sistemas antioxidantes



endógenos são fundamentais para manter a função celular adequada (EVANS et al., 2002).

Ao contrário das demais espécies reativas, o ânion superóxido é inativo, porém, auxilia na produção do radical hidroxil e tem importância fundamental para as células de defesa contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos, por gerar produtos que possuem forte atividade antimicrobiana, como ácido hipocloroso, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito (BARRREIROS e DAVID, 2006).

A hiperglicemia pode aumentar, inibir, ou manter o nível de expressão de enzimas antioxidantes em animais com diabetes. Estas discrepâncias podem surgir devido a variações na idade, duração da diabetes, tecidos examinados, atividade enzimática ao longo do tempo, podendo ser compensatória em resposta ao estresse oxidativo (DAL et al., 2015).

O estresse oxidativo é designado como o desequilíbrio significativo entre a produção de espécies reativas e defesas antioxidantes, levando a uma potencial lesão tecidual (LOPES, 2008). Níveis excessivamente elevados de espécies reativas causam danos aos componentes celulares vitais, tais como proteínas, lipídeos da membrana e ácidos nucleicos e pode levar à morte da célula (MOTAWI, 2013; ASMAT et al., 2015). Devido a essa capacidade de danos, o estresse oxidativo é sugerido como um mecanismo da diabetes e suas complicações (LOPES, 2008; GIACCO e BROWNLEE, 2010; MOTAWI, 2013).

No paciente diabético o estresse oxidativo é decorrente da hiperglicemia que causa indução de mecanismos celulares como a via do poliol e de hexosamina, os AGEs e ativação da PKC (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005; PANENI et al., 2013).

A ativação da via do poliol contribui para o estresse oxidativo pois causa a depleção de NADPH e conseqüente decréscimo nos níveis de glutathione intracelular (PITOCCO et al., 2013). Em um ambiente de hiperglicemia, a aldose redutase reduz glicose a sorbitol, que é posteriormente oxidada a

frutose. No processo de redução do alto teor de glicose intracelular, a aldose-reductase consome o cofator NADPH. Porém, NADPH é também o cofator essencial para a regeneração do antioxidante intracelular glutathione (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005).

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) são observados principalmente em proteínas estruturais mas também são comumente formados em proteínas da hemoglobina, catalase e SOD, alterando suas funções normais (NIEDOWICZ E DALEKE, 2005). A formação de AGEs depende de processos oxidativos e provoca a geração de estresse oxidativo em vários tipos de células, através da interação com o seu receptor, causando alterações inflamatórias e trombogênicas, que contribuem para o desenvolvimento das complicações vasculares em diabetes (NIEDOWICZ E DALEKE, 2005; YAMAGISHI et al., 2012).

A hiperglicemia induzida pela ativação de proteína quinase C (PKC) contribui para a produção de ânions superóxido em células do endotélio vascular (CERIELLO, 2003; PANENI et al., 2013). O ambiente hiperglicêmico induz uma elevação crônica dos níveis de diacilglicerol em células endoteliais com a translocação para membrana de isoformas de PKC. A PKC fosforila a NADPH oxidase, estimulando a produção de superóxido, fornecendo assim um meio de propagação do estresse oxidativo (NIEDOWICZ e DALEKE, 2005; PANENI et al., 2013).

Na DM2, as principais fontes de estresse oxidativo são as mitocôndrias (ASMAT et al., 2015). O aumento da geração de espécies reativas mitocondriais tem sido implicado como um mediador entre hiperglicemia e suas consequências patológicas nos vasos, rins, neurônios e retina (BASHAN et al., 2009). A glicose pode estimular diretamente a superprodução de ERO, e a hiperglicemia por sua vez, ativa várias cascatas enzimáticas nas mitocôndrias, incluindo a ativação da NADPH oxidase, desacoplamento de NO sintases e estimulação da xantina oxidase (GIACCO e BROWNLEE, 2010; PITOCCHO et al., 2013).

Uma das espécies reativas formadas através da disfunção mitocondrial, considerada crítica para RI, é o radical hidroxil (FRANCÉS et al., 2013). O radical hidroxil é altamente reativo e lesivo, e sua geração é acelerada pela hiperglicemia. O organismo humano não possui mecanismo de defesa, devido a sua meia vida muito curta, causando modificação no DNA, danos a proteínas e inativação enzimática e peroxidação lipídica (BARREIROS e DAVID, 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

A peroxidação lipídica é causada pelo ataque do radical hidroxil, que abstrai um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado, deixando um elétron desemparelhado, caracterizando a etapa de iniciação. Este radical é estabilizado por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado, que reage com oxigênio e forma o radical peroxila, capaz de abstrair elétrons de moléculas de lipídeos adjacentes, caracterizando a reação em cadeia. A terminação instala-se com a neutralização dos radicais formados por ação de antioxidantes lipossolúveis ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno), ou pela reação de dois radicais lipídicos formando produtos não radicalares (VASCONCELOS et al., 2007).

No desenvolvimento de diabetes, a hiperglicemia desencadeia reações oxidativas que causam mudanças nas propriedades das membranas, alterando sua fluidez e permeabilidade, com expansão do líquido intracelular e risco de ruptura das membranas da célula e das organelas, levando a sua destruição (VASCONCELOS et al., 2007; TANGVARASITTICHAJ, 2015).

Dentre as espécies endógenas que desempenham um papel na defesa antioxidante e podem ser considerados como biomarcadores do estresse oxidativo pode-se citar a SOD, que fornece a primeira linha de defesa contra a lesão celular mediada por espécies reativas, catalisando a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, além de reagir rapidamente com o óxido nítrico (NO), reduzindo sua bioatividade e produzindo o radical peroxinitrito (TIWARI et al., 2013).

A produção de óxido nítrico (NO) possui um papel central na modulação da função endotelial, por ter papel no sistema imune inato e ser altamente

expresso em vários estados inflamatórios, incluindo a aterosclerose (BASHAN et al., 2009; PITOCCO et al., 2013; LUNDBERG et al., 2015).

O NO é um agente crucial para a homeostase intravascular e se forma a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina por meio da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Existem três isoformas da óxido nítrico sintase: os tipos constitutivos, de cérebro (bNOS) e endotelial (eNOS), e o tipo induzido (iNOS) (CERIELLO, 2003; SENA; PEREIRA; SEIÇA, 2013). Dentre as ações benéficas do NO estão a vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, hipotensão, inibição da agregação e adesão das plaquetas, redução da proliferação do músculo liso (TODA et al., 2010). A disfunção endotelial se refere a um desequilíbrio na liberação de NO ou outros fatores vasodilatadores e substâncias vasoconstritoras, e está relacionada com a patologia da diabetes e desordens cardiovasculares (OUVIÑA et al., 2001).

Na diabetes a disfunção endotelial leva a um aumento da degradação de NO, levando a sua deficiência e aumento na resistência vascular promovendo a aterogênese. A redução na biodisponibilidade de NO vascular relaciona-se com a sua inativação por ERO, sendo assim o NO pode ser um biomarcador do estresse oxidativo na diabetes (PITOCCO et al., 2010).

Com o aumento da produção vascular de superóxido causado pela diabetes, o NO pode reagir formando o peroxinitrito que leva à nitração de proteínas, peroxidação lipídica, danos ao DNA e morte celular, contribuindo para as patologias cardiovasculares como a aterosclerose. Portanto, o NO pode agir com potencial fisiológico ou patológico (CAHILL e REDMOND, 2016).

A ativação de PKC também interfere com a síntese de NO, através da diminuição da eNOS, promovendo o aumento da vasoconstrição e agregação de plaquetas. Além disso, estimula a síntese de matriz extracelular, e promove uma resposta inflamatória através ativação de citocinas e moléculas de adesão (BROWNLEE, 2001; PANENI et al., 2013; GIACCO e BROWNLEE, 2010; DOMINGUETI et al., 2016).

Como já mencionado, para pacientes com DM2 pode ser necessário o uso de insulina e estudos com pacientes demonstram que a insulina exógena possui um efeito inibitório sobre o estresse oxidativo em pacientes com DM2, em comparação com pacientes com DM2 que só utilizam hipoglicemiantes orais, reduzindo a produção de espécies reativas. Além disso, dados sugerem que a insulina possui efeitos antiaterogênicos, reduzindo a progressão da aterosclerose (MONNIER et al., 2010; DANDONA et al., 2007).

No entanto, insulina em doses elevadas também pode promover o estresse oxidativo, através do potencial efeito pró-oxidante das maiores oscilações glicêmicas. O excesso de insulina exógena num estado de RI pode aumentar a estimulação da via metabólica mediada através da atividade da farnesil-transferase ou MAPK, levando a proliferação de células e a ativação do processo inflamatório (MONNIER et al., 2010).

## **2.6. INFLAMAÇÃO E DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Classicamente a inflamação era definida somente como uma resposta imune protetora. Porém, os estados de inflamação prolongados ou desregulados são associados a doenças crônicas, como a DM2 (MARCHETTI, 2016). A inflamação crônica subclínica parece ser um fator de risco para o desenvolvimento de DM2, independente do grau inicial de RI e obesidade (ESSER et al., 2014). Em um estudo foi encontrado que ilhotas pancreáticas na DM2 apresentam sinais de infiltração de células imunes, predominantemente macrófagos (KAMATA et al., 2014).

Na DM2, as desordens progressivas na atividade das células  $\beta$  e a progressiva diminuição no seu número estão relacionadas com o aumento da concentração sanguínea de citocinas, quimiocinas e ácidos graxos livres, assim como a hiperglicemia crônica (CIESLAK, 2015).

Níveis elevados de glicose possuem capacidade para ativar a via do fator nuclear kappa B (NFkB) e estimular a expressão de moléculas de adesão (MUNIANDY, 2009; FRANCÉS, 2013). NF-kB pertence a uma família de fatores de transcrição, que a partir de um sinal que ativa a inflamação, entra no núcleo e estimula a produção de uma variedade de proteínas inflamatórias como citocinas, enzimas e moléculas de adesão (FONSECA, 2007).

O NFkB estimula a expressão de genes que codificam citocinas, como TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), IL (interleucina), IL-1, IL-6, IL-2, IL-12, moléculas de adesão celular, receptores de quimiocinas e enzimas induzíveis. Além de aumentar a expressão de moléculas envolvidas na regulação da proliferação celular, apoptose e progressão do ciclo celular (FRANCÉS, 2013).

O aumento da atividade da PKC e a formação de AGEs decorrentes da hiperglicemia crônica estão envolvidos na resposta que induz as células endoteliais a entrar num estado pró-inflamatório, com aumento de várias moléculas de adesão e levando a produção de citocinas inflamatórias (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005; GIACCO e BROWNLEE, 2010; PITOCCHO et al., 2013).

A inflamação subclínica na DM2 é caracterizada por níveis elevados de proteína C-reativa (PCR), TNF- $\alpha$  e citocinas, que interagem com receptores diferentes que convergem em seus mediadores finais que aumentam o estresse oxidativo e ativam NF-kB, levando a disfunção endotelial (SAAD et al., 2015).

A resposta de fase aguda é uma reação sistêmica, caracterizada pelo aumento na concentração de proteínas de fase aguda como a PCRus, complemento, soro amilóide A, haptoglobina e fibrinogênio. As proteínas de fase aguda são principalmente sintetizadas no fígado, e sua produção é estimulada por citocinas da resposta imune inata, principalmente IL-6 e TNF $\alpha$  (PICKUP et al., 2004).

A PCRus faz parte da resposta imune à lesão e infecção. Possui funções imunorreguladoras como o aumento da reatividade dos leucócitos, fixação do

complemento, e a modulação da ativação de plaquetas (GROSSMAN et al., 2015).

Os níveis de PCRus estão aumentados em estágios de disfunção de célula  $\beta$  e RI. A aterosclerose é considerada como o resultado de uma resposta inflamatória nas paredes arteriais, e citocinas pró-inflamatórias, incluindo quimiocinas, moléculas de adesão e de fase aguda, tais como PCR e fibrinogênio, são sugeridos como marcadores para a aterosclerose. Assim, a PCRus é um marcador de inflamação, usado para avaliar a presença de risco cardiovascular em pacientes com DM2. (LIMA et al., 2007; SAAD et al., 2015).

O fibrinogênio, além de marcador de coagulação é também considerado um marcador de inflamação e está associado com hiperviscosidade sanguínea e ativação da coagulação (AZAD et al., 2014). Além disso, ele participa na formação da placa aterosclerótica por modulação da função e proliferação de células do músculo liso e a migração endotelial, sugerindo que o fibrinogênio tem um papel nas fases iniciais de formação de placa e as complicações tardias da doença cardiovascular (KOCH et al., 2008). Nos pacientes com DM2 ocorre aumento dos níveis plasmáticos de fibrinogênio (PICKUP, 2004; LEPEDDA et al., 2016).

Portanto, a inflamação crônica pode preceder o desenvolvimento do DM2 e valores elevados dos marcadores inflamatórios como PCRus e fibrinogênio podem identificar uma população de alto risco para desenvolver DM2, com o potencial de prevenir doença aterosclerótica e DM2 (FESTA et al., 2002).

Uma das principais citocinas liberadas nos processos inflamatórios é o TNF- $\alpha$ , produzido principalmente por macrófagos e monócitos, que pode ativar as vias de sinalização associadas com a sobrevivência celular, apoptose, resposta inflamatória e diferenciação celular, bem como contribuir para a fisiopatologia de muitas doenças (CORDA et al., 2001; SAAD et al., 2015).

O TNF- $\alpha$  exerce os seus efeitos através da sua ação sobre os seus receptores TNF-R1 e TNF-R2. A ligação do TNF- $\alpha$  ao TNF-R1 promove a ativação de NF $\kappa$ B, mediando a transcrição de várias citocinas envolvidas na sobrevivência

e proliferação, resposta inflamatória, adesão celular e fatores apoptóticos. Os níveis altos de TNF- $\alpha$  são encontrados em pacientes DM2 e está associado a várias complicações da diabetes (FRANCÉS, 2013; DOMINGUETI et al., 2016).

O TNF- $\alpha$  pode promover a RI nos tecidos e pode contribuir para a autoimunidade de células  $\beta$  na DM2, através da ativação de células T, células B e macrófagos, aumento da expressão de antígenos de células  $\beta$  e subsequente apoptose de células  $\beta$  (GROSSMAN et al., 2015). Além disso, estimula a liberação e a expressão de moléculas pró-coagulante e inibe a expressão de moléculas anticoagulantes (DOMINGUETI et al., 2016).

Com o aumento de peso e hipertrofia dos adipócitos acredita-se que ocorre compressão dos vasos sanguíneos no tecido adiposo branco, levando a hipóxia local e morte de alguns adipócitos, desencadeando a cascata da resposta inflamatória e angiogênese. No tecido adiposo branco de obesos a expressão de TNF- $\alpha$  se encontra modificada, reprimindo a expressão de genes envolvidos na captação e armazenamento de ácidos graxos livres e glicose; suprimindo genes de fatores de transcrição envolvidos na lipogênese; diminuindo a expressão da adiponectina e aumentando a da IL-6 e proteínas de fase aguda (LEITE et al., 2009).

A IL-1 $\beta$  é uma das citocinas pró-apoptóticas e pro-inflamatórias mais importantes, intimamente relacionada à patogênese da DM2 devido à diminuição da secreção e diminuição do número de células  $\beta$  e por afetar vias necessárias para a expressão do gene que codifica a iNOS (CIESLAK, 2015).

A exposição prolongada de células  $\beta$  do pâncreas a concentrações elevadas de glicose e ácidos graxos livres aumenta a atividade metabólica das células das ilhotas, levando a formação de ERO, promovendo a ativação de inflamassoma NLRP3 (proteína receptora do tipo NOD 3) e caspase 1, permitindo assim a produção de IL-1 $\beta$  madura. A IL-1 $\beta$  sofre autoestimulação, que amplifica ainda mais a inflamação, gerando um ciclo vicioso. Esta potente citocina ativa então várias células do sistema imune, promovendo a resistência à insulina (DONATH, 2014).



A inflamação das ilhotas e aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  contribuem para a perda da função e massa de células  $\beta$  na DM2. A maior fonte de produção de IL-1 $\beta$  nas ilhotas parece ser o macrófago, e essa produção pode ser induzida por vários fatores, incluindo a angiotensina II, glicose, ácidos graxos e possivelmente outros fatores que ainda não foram identificados (MARZBAN, 2015). Ao antagonizar o sistema de IL-1 ocorre melhora na função secretora de células  $\beta$ , podendo prevenir ou retardar o aparecimento de DM2 (DONATH, 2014).

A citocina IL-6 é liberada para a circulação em abundância durante os processos inflamatórios, e é produzida por células endoteliais, leucócitos, adipócitos e células mesangiais. Ela regula vários processos fisiológicos, incluindo a resposta de fase aguda, inflamação, resposta imunitária, mecanismos de defesa do hospedeiro, hematopoiese e o crescimento celular. Os relatos da literatura indicam a sua ação tanto pró-inflamatória e protetora (CIESLAK, 2015; DOMINGUETI et al., 2016). A IL-6 induz a produção de um número de proteínas de fase aguda, tais como soro amilóide A e proteína C reativa (ATAIE-KACHOIE et al., 2014).

Estudos que examinaram os efeitos de intensiva terapia com insulina na função imune e fatores inflamatórios demonstraram que os níveis de citocinas pró-inflamatórias sistêmicas diminuem após a administração de insulina (JANSEN et al., 2013). Em contraste com a glicose, a insulina suprime a expressão de NF $\kappa$ B, a geração de espécies reativas e aumenta a produção de NO e inibe processos inflamatórios (MUNIANDY, 2009).

No entanto, outro estudo, realizado em animais em um modelo de DM2 induzida por estreptozotocina, demonstrou que o tratamento com insulina por uma ou quatro semanas não conduziu a uma diminuição da inflamação aguda associada com o estresse oxidativo e não reduziu a infiltração de macrófagos nos fígados dos ratos (DAL et al., 2015).

### **2.6.1. Polimorfismo -308G/A no gene de TNF- $\alpha$**

Como exposto anteriormente, a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas na patogênese da DM2 e suas complicações. Polimorfismos em genes de citocinas são geralmente localizados em suas regiões reguladoras e afetam os níveis da sua expressão (RODRIGUES et al., 2015). Dessa forma, polimorfismos em genes de citocinas vêm sendo estudados em complicações relacionadas à DM2.

Dentre os polimorfismos relacionados à diabetes destaca-se o descrito para a região promotora do gene de TNF- $\alpha$  (-308G/A), sugerindo sua ação no aumento da RI, na patogênese e nas complicações diabéticas (DUTTA et al., 2013). Esse polimorfismo se caracteriza por apresentar uma variação conhecida como polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), que nesse caso envolve a substituição de uma guanina por uma adenina (GUZMÁN-FLORES et al., 2011).

O polimorfismo no gene de TNF- $\alpha$  na posição 308 tem demonstrado afetar diretamente a expressão desta citocina. A substituição da guanina pela adenina está relacionada a um fenótipo de maior produção de TNF- $\alpha$  (TUGLULAR et al., 2003). Estudos indicam que carreadores do alelo A apresentam maior RI e aumento na porcentagem de gordura corporal (FERNÁNDEZ-REAL et al., 1997; FONTAINE-BISSON et al., 2007). Um estudo recente encontrou associação entre o alelo A do polimorfismo -308 e um aumento no risco de retinopatia em pacientes com DM2 (SESTI et al., 2015). Porém, outros estudos demonstram que o polimorfismo não é um fator de risco importante para a obesidade e doença cardiovascular, não tendo associação com a DM2 (HEDAYATI et al., 2011; GUZMÁN-FLORES et al., 2011).

Portanto, verifica-se a importância de avaliar o estresse oxidativo e inflamação, em pacientes com DM2 que estão ou não em insulino-terapia, podendo-se observar um possível benefício dessa terapia nesses parâmetros.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL:

Investigar se o uso ou não de insulino terapia em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 influencia marcadores de inflamação e estresse oxidativo.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a influência do uso de insulino terapia em pacientes com DM2 em marcadores:

- De estresse oxidativo: peroxidação lipídica, óxido nítrico e atividade da superóxido dismutase;
- De inflamação: IL-1  $\beta$ , TNF $\alpha$ , fibrinogênio e proteína C reativa ultrasensível;
- Bioquímicos: glicemia de jejum, hemoglobina glicada (A1C) e perfil lipídico.

- Avaliar a adesão ao tratamento medicamentoso;

- Correlacionar o polimorfismo -308 G/A na região promotora do gene do TNF $\alpha$  com seus níveis plasmáticos em pacientes com DM2.

## 4. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo clínico transversal do tipo caso controle realizado com pacientes atendidos em unidades de saúde da Região de Saúde de Maruípe, Vitória-ES. O estudo foi realizado com a participação de indivíduos com diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), que utilizam ou não insulina, e indivíduos sem diabetes mellitus (controle).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (parecer 1.673.452, em anexo). Todos os indivíduos foram convidados a participar do estudo em caráter voluntário. Aqueles que aceitaram participar assinaram um termo de consentimento escrito (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) após receber as informações sobre o projeto e responderam ao questionário de pesquisa.

### 4.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Como população de estudo tem-se pacientes diagnosticados com DM2, de ambos os sexos, na faixa etária de 40 a 75 anos, e pacientes controle, vinculados às equipes de saúde.

Os participantes foram classificados nos grupos:

- Grupo 1 (n=40): pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), sem uso de insulino terapia;
- Grupo 2 (n=40): pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), com uso de insulino terapia
- Grupo 3 (n=40): indivíduos sem diabetes mellitus (controle).

#### 4.1.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos no total 120 indivíduos adultos, de ambos os sexos, na faixa etária de 40 a 75 anos, cadastrados e atendidos na USF, e que concordassem em participar do estudo. Para os grupos DM2 foram incluídos indivíduos com

diagnóstico clínico e laboratorial de diabetes mellitus tipo 2 e para o grupo controle, foram incluídos indivíduos sem histórico de diabetes mellitus.

#### **4.1.2. Critérios de não inclusão**

Foram excluídos pacientes que sofreram trombose, infarto ou acidente vascular cerebral recentes, além de câncer, doença autoimune e infecções agudas.

## **4.2. AMOSTRA BIOLÓGICA**

A coleta de sangue foi iniciada em fevereiro e ocorreu até dezembro de 2015. Foi solicitado aos participantes que respeitassem um período de 12 horas de jejum antes da coleta, que foi feita por punção venosa, no posto de coleta da unidade de saúde.

Para as dosagens bioquímicas, glicemia de jejum (GJ), hemoglobina glicada (HbA1c), colesterol total (CT), HDLc, LDLc, VLDLc e proteína C reativa ultra sensível (PCRus), foram coletados de cada paciente 4,0 mL de sangue venoso em tubos com anticoagulante EDTA e 4,0 mL de sangue venoso em tubos sem anticoagulante. Estas amostras seguiram para as dosagens que foram realizadas pelo Laboratório Central da Prefeitura Municipal de Vitória.

Para a extração do DNA, foram aliqüotados 650 µL em duplicata retirados do sangue venoso com anticoagulante EDTA. As amostras obtidas foram identificadas e armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA no laboratório de Bioquímica Clínica da UFES.

Para as dosagens do estresse oxidativo, foram coletados 4mL de sangue venoso em tubo com anticoagulante EDTA. As amostras obtidas em EDTA foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos, para obtenção das amostras de plasma, e foram aliqüotadas, identificadas e armazenadas a -80°C até o momento da avaliação no laboratório de Bioquímica Clínica da UFES.

Para as dosagens dos marcadores de inflamação, foram coletados 4,0 mL de sangue venoso em tubos com citrato de sódio. As amostras obtidas em citrato

foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 20 minutos, para obtenção das amostras de plasma, e foram aliqüotadas, identificadas e armazenadas a -80°C até o momento das dosagens no laboratório de Bioquímica Clínica da UFES.

#### **4.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS E ANTROPOMÉTRICOS**

Os parâmetros sexo, idade, profissão, estado civil, escolaridade, tabagismo, alcoolismo, índice de massa corporal (IMC), tempo de diagnóstico, tempo de início da insulino terapia, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e medicamentos em uso foram medidos e/ou obtidos no momento da realização do questionário respondido pelos pacientes e por meio das informações contidas no prontuário eletrônico de cada paciente.

#### **4.4. AVALIAÇÃO DA ADESÃO AO TRATAMENTO**

A adesão ao tratamento foi avaliada utilizando o teste de Morisky-Green, adaptado para o português (BLOCH et al., 2008). O teste consiste em 4 perguntas feitas ao paciente:

1. Você às vezes tem problemas em se lembrar de tomar a sua medicação?
2. Você às vezes se descuida de tomar seu medicamento?
3. Quando está se sentindo melhor, você às vezes pára de tomar seu medicamento?
4. Às vezes, se você se sentir pior ao tomar a medicação, você pára de tomá-la?

O paciente é considerado aderente quando responde não para todas as perguntas.

## 4.5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os parâmetros bioquímicos foram analisados pelo Laboratório Central da Prefeitura Municipal de Vitória (PMV) e permitiram traçar os perfis glicêmico e lipídico.

### 4.5.1. Perfil Glicêmico

Valores de referência recomendados pela American Diabetes Association. Standards of Medical in Diabetes. Diabetes Care Vol. 38, Supplement 1, January 2015.

#### 4.5.1.1. Determinação de hemoglobina glicada (HbA1C)

A determinação da hemoglobina glicada foi feita por cromatografia líquida de alta precisão em coluna de troca iônica, seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes.

Valor de referência:

- Normal: < 5,7%
- Prediabetes: 5,7 a 6,4%
- Diabetes Mellitus (DM):  $\geq$  6,5%
- Recomendado para adultos com DM ou DM gestacional: < 7%
- Maior risco de complicações microvasculares em adultos com DM: > 7%
- Recomendado para crianças, adolescentes e idosos com DM: < 7,5%

#### 4.5.1.2. Determinação de glicose (glicemia de jejum)

As concentrações de glicose foram determinadas por ensaio colorimétrico enzimático com hexoquinase, utilizando o método enzimático automatizado, seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes.

Valor de referência:

- Adultos: 70 a 99 mg/dL
- Gestantes (24 a 28 sem): < 92 mg/dL
- Glicemia de jejum alterada: 100 a 125 mg/dL

- Diabetes Mellitus (DM):  $\geq 126$  mg/dL
- Recomendado para adultos com DM: 80 a 130 mg/dL
- Recomendado para crianças, adolescentes e idosos com DM: 90 a 130 mg/dL

#### **4.5.2. Perfil Lipídico**

Valores de referência recomendados pela V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2013).

##### *4.5.2.1. Determinação de triglicerídio*

As concentrações de triglicerídio foram determinadas pelo método glicerol fosfato oxidase, seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes.

Valor de referência:

- Desejável:  $< 150$  mg/dL
- Limítrofe: 150 a 200 mg/dL
- Alto: 200 a 499 mg/dL
- Muito Alto:  $\geq$  a 500 mg/dL

##### *4.5.2.2. Determinação de colesterol total*

As concentrações de colesterol total foram determinadas por método enzimático colorimétrico automatizado, seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes.

Valor de referência:

- Adultos  $> 20$  anos:
- Desejável:  $< 200$  mg/dL
- Limítrofe: 200 a 239 mg/dL
- Alto:  $\geq$  a 240 mg/dL



#### 4.5.2.3. *Determinação de colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade)*

Os níveis plasmáticos de colesterol LDL foram determinados através da equação do Friedwald, sabendo da dificuldade de dosar os valores de LDLc quando os níveis de triglicerídios são superiores a 400 mg/dL, na presença de quilomícrons e hiperproteinemia tipo 3 (Fredrickson).

$$\text{Equação de Friedewald: LDLc} = \text{CT} - (\text{HDLc} + \text{VLDLc})$$

Valor de referência:

- Ótimo: < 100 mg/dL
- Desejável: 100 a 129 mg/dL
- Limítrofe: 130 a 159 mg/dL
- Alto: 160 a 189 mg/dL
- Muito Alto:  $\geq$  190 mg/dL

#### 4.5.2.4. *Determinação de colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade)*

As dosagens de colesterol HDL foram realizadas pelo método detergente seletivo acelerador, seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes.

Valor de referência:

- Desejável: > 60 mg/dL
- Baixo: < 40 mg/dL

#### 4.5.2.5. *Determinação de colesterol VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade)*

Os níveis plasmáticos de colesterol VLDL foram determinados através da equação do Friedwald.

$$\text{VLDLc} = \text{TG}/5 \quad (\text{para TG} < 400 \text{ mg/dL})$$

Valor de referência:

- Inferior a 30 mg/dL

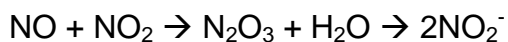
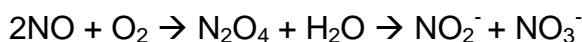
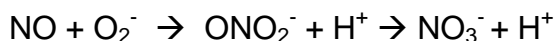
## 4.6. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

A avaliação do estresse oxidativo foi realizada através da dosagem dos níveis de óxido nítrico, superóxido dismutase e peroxidação lipídica.

### 4.6.1. Dosagem de nitrito e nitrato

A quantificação de óxido nítrico foi feita indiretamente através da medida de nitrito e nitrato no plasma pela reação de Griess. Para isto, foi utilizado o kit Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical Company®, Michigan, USA) baseado no método colorimétrico.

O NO sofre uma série de reações com diversas moléculas presentes em fluidos biológicos, que são:



O produto final do NO *in vivo* são nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). A proporção é variável, e a melhor forma de se obter o nível total de produção de NO é a soma de nitrato e nitrito.

O ensaio foi dividido em duas etapas, na primeira, foi adicionado 40  $\mu\text{L}$  de plasma dos pacientes diluídos com 40  $\mu\text{L}$  de tampão. A essa mistura foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de cofator da enzima e 10  $\mu\text{L}$  da nitrato redutase. A placa foi coberta e incubada por 1 hora para que ocorresse a conversão do nitrato para nitrito.

Na segunda etapa, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  dos reagentes de Griess 1 e 2, que após 10 minutos convertem o nitrito a um composto azo púrpura. A medida colorimétrica da absorbância a partir do composto cromóforo determina a concentração total de nitrito, que foi lido em um comprimento de onda de 540 nm.

Para realização do ensaio foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão para formação do branco e foi realizada uma curva padrão. O resultado final foi expresso pela soma da concentração de nitrato e nitrito em  $\mu\text{M}$ .

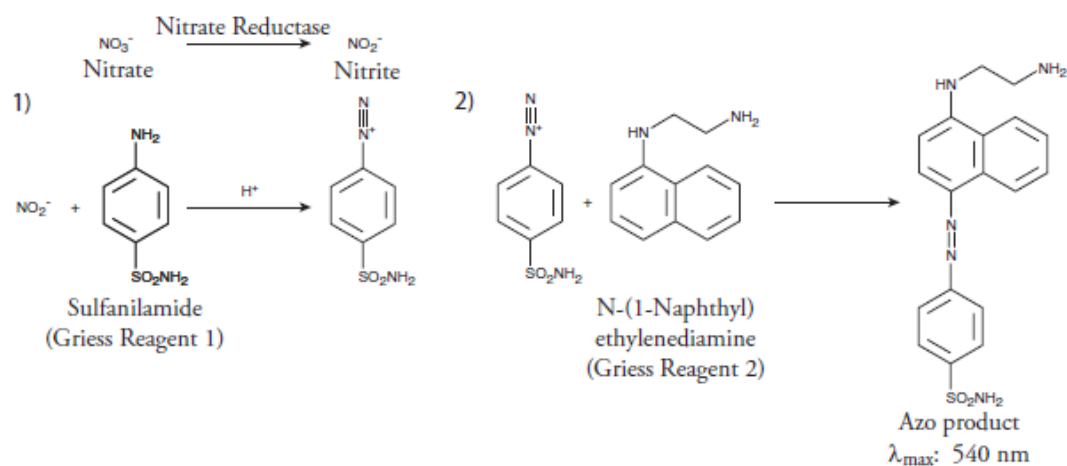


Figura 3: Reações envolvidas no ensaio colorimétrico nitrato/nitrito.

Fonte: Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman.

#### 4.6.2. Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase foi medida por meio do kit SOD determination kit (Sigma-Aldrich®, Buchs, Switzerland) no plasma. Este kit utiliza um sistema de geração de ânions superóxido, xantina e xantina oxidase, e avalia a capacidade da solução teste em inibir a reação do ânion superóxido com o WST-1 (2- (4-iodofenil) - 3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, sal monossódico). Esta reação forma um composto denominado formazan, cuja intensidade de cor pode ser lida à 450 nm. Quanto maior a quantidade de SOD, menor será a formação do formazan.

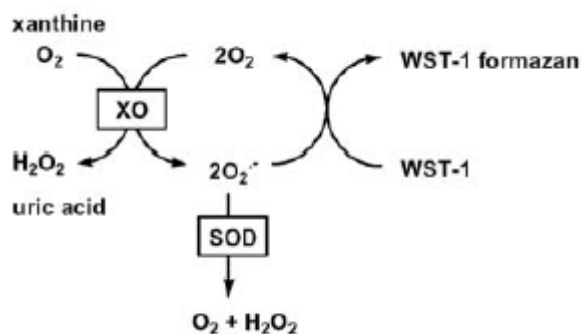


Figura 4: Princípio do ensaio da SOD (superóxido dismutase).

Fonte: kit SOD determination kit, Sigma.

( $O_2^-$ ): ânion superóxido; XO: xantina oxidase; SOD: superóxido dismutase; WST-1: (2- (4-iodofenil) - 3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, sal monossódico).

O ensaio consiste em poços com amostra, branco 1 (descontar atividade enzima), 2 (descontar cor da amostra) e 3 (descontar cor da solução de trabalho WST). Para realização do ensaio foram adicionados 20  $\mu$ L de plasma em amostra e branco 2, e 20  $\mu$ L de água destilada no branco 1 e 3. Em seguida foram adicionadas 20  $\mu$ L da solução de trabalho WST em todos os poços, 20  $\mu$ L de tampão de diluição no branco 2 e 3, 20  $\mu$ L da solução de trabalho da enzima nas amostras e branco 1, misturando vigorosamente. A placa foi incubada a 37°C por 20 min, e a leitura foi realizada a 450 nm.

O resultado foi expresso pela quantidade de SOD plasmática (U/ml) a partir da curva padrão.

#### 4.6.3. Avaliação da peroxidação lipídica

Para avaliar a o nível de peroxidação lipídica foi determinada a concentração de hidroperóxidos lipídicos, que resultam da ação de espécies reativas sobre ácidos graxos saturados e insaturados. O ensaio determina as concentrações de hidroperóxidos em amostras de plasma e foi adaptado de Buege e Aust (1978). O aparecimento da coloração ocorre devido à presença do malondialdeído e outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico.

Para este ensaio, 50  $\mu\text{L}$  de plasma foram colocados em tubo falcon e em seguida, foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de SDS 10% (Ludwig Biotecnologia®, Rio Grande do Sul, Brasil), e homogeneizado. Logo após foi adicionado 250  $\mu\text{L}$  do reagente de cor que consistia em ácido tiobarbitúrico 0,037% (Merck Millipore®, Darmstadt, Germany) + ácido tricloroacético 15% (Sigma-Aldrich®, Buchs, Switzerland) + ácido clorídrico 0,25M (Sigma-Aldrich®, Buchs, Switzerland). A solução foi agitada e levada a banho fervente por 15 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo por 5 minutos.

Após centrifugação a 3500 rpm a 4°C, alíquotas da fase superior foram colocadas na placa para leitura em ELISA em duplicatas de 200  $\mu\text{L}$  e lidas espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 540 nm, descontando o branco que consistia no reagente de cor.

A partir do kit TBARS Assay (Cayman Chemical Company®, Michigan, USA) foi realizada a curva padrão e o nível de malondialdeído (MDA) foi expresso em  $\mu\text{M}$ .

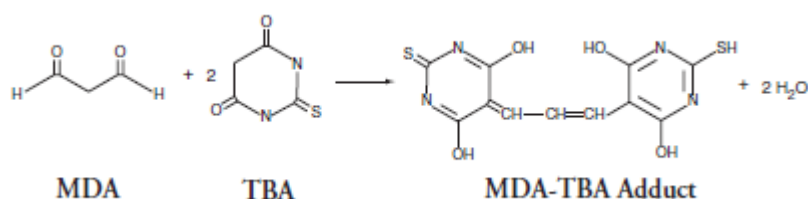


Figura 5: Reações envolvidas no ensaio da peroxidação lipídica.

Fonte: kit TBARS Assay, Cayman.

MDA: Malondialdeído; TBA: ácido tiobarbitúrico.

#### 4.7. AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO

A avaliação da inflamação foi realizada através da avaliação dos níveis de Proteína C Reativa ultra sensível, fibrinogênio e citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ).

#### **4.7.1. Determinação de Proteína C Reativa ultra sensível (PCRus)**

Os níveis plasmáticos totais de proteína C reativa foram determinados pelo ensaio imunoturbidimétrico com intensificação da reação por partículas de látex revestidas com anticorpos monoclonais anti-PCR, seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes. O ensaio foi realizado pelo Laboratório Central da Prefeitura Municipal de Vitória (PMV).

Valor de referência:

- Inferior a 0,5 mg/dL

#### **4.7.2. Determinação de fibrinogênio**

A determinação do fibrinogênio foi realizada pelo método de Clauss, utilizando o conjunto diagnóstico Sta®Liquid Fib (STAGO), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. O ensaio foi realizado pelo Laboratório de Hematologia do Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes (HUCAM).

Valor de referência:

- 150 a 370 mg/dL

#### **4.7.3. Dosagem de citocinas**

##### *4.7.3.1. Determinação de interleucina 1 – beta (IL-1 $\beta$ )*

Foi quantificada a citocina IL-1 $\beta$  no plasma coletado em EDTA de cada grupo, utilizando o kit Human IL-1 $\beta$  ELISA (Boster Biological Technology®-Immunoleader, California, USA).

O kit se baseia no princípio do ensaio ELISA sanduíche, em que uma placa de 96 poços é pré revestida com o anticorpo monoclonal de rato específico para IL-1 $\beta$ . Para realização do ensaio foram adicionados 100  $\mu$ L de amostra dos pacientes (50  $\mu$ L de plasma + 50  $\mu$ L do tampão diluente da amostra). Sendo essa diluição necessária para que os valores se encontrassem dentro da curva padrão. Após a adição das amostras a placa foi incubada a 37°C por 90 min.

Após esse tempo, o conteúdo da placa foi descartado e foi adicionado 100 µL da solução de trabalho contendo o anticorpo de detecção policlonal de cabra específico para IL-1β. Foi realizada uma incubação a 37°C por 60 min e em seguida, foram feitas 3 lavagens com tampão PBS, a cada vez deixando o tampão de lavagem por 1 min nos poços.

Foram adicionados 100 µL da solução de trabalho ABC (Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase) e realizada uma incubação a 37°C por 30 min. Em seguida foram realizadas 5 lavagens com tampão PBS, a cada vez deixando o tampão de lavagem por 1-2 min nos poços, descartando assim os conjugados que não se ligaram.

O substrato cromogênico TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) foi adicionado aos poços (90 µL), incubando a 37°C no escuro por 15-20 min, em seguida foram adicionados 100 µL da solução de parada TMB em cada poço. A cor imediatamente muda para amarelo. A leitura é realizada utilizando o comprimento de onda da 450 nm.

O substrato TMB é utilizado para visualizar a reação enzimática HRP (Horseradish peroxidase). O TMB atua como um doador de hidrogênio para a redução do peróxido de hidrogênio em água por enzimas peroxidase tal como HRP. TMB é catalisado por HRP produzindo um produto de cor azul que muda para amarelo após a adição da solução de parada ácida. A densidade do amarelo é proporcional à quantidade de IL-1β humano da amostra capturados na placa.

Para realização do ensaio foi adicionado 100 µL de tampão de diluição para formação do branco e foi feita uma curva padrão. O resultado final foi expresso em concentração de pg/ml de IL-1β.

#### *4.7.3.2. Determinação do fator de necrose tumoral (TNF-α)*

Foi quantificado o TNF-α no plasma coletado em EDTA de cada grupo, utilizando o kit Human TNF-α ELISA (Boster Biological Technology®-

Immunoleader, California, USA). A metodologia é a mesma utilizada para a detecção de IL-1 $\beta$ , com poucas alterações.

O kit se baseia no princípio do ensaio ELISA sanduíche, em que uma placa de 96 poços é pré revestida com o anticorpo monoclonal de rato específico para TNF- $\alpha$ . Para realização do ensaio foram adicionados 100  $\mu$ L de amostra dos pacientes (50  $\mu$ L de plasma + 50  $\mu$ L do tampão diluente da amostra). Diluição necessária para valores que se encontrassem dentro da curva padrão, foi estimando que havia uma baixa concentração de proteínas. Após a adição das amostras a placa foi incubada a 37°C por 90 min.

Após esse tempo, o conteúdo da placa foi descartado e foram adicionados 100  $\mu$ L da solução de trabalho contendo o anticorpo de detecção policlonal de cabra específico para TNF- $\alpha$ . Foi realizada uma incubação a 37°C por 60 min e em seguida, foram feitas 3 lavagens com tampão PBS, a cada vez deixando o tampão de lavagem por 1 min nos poços.

Foram adicionados 100  $\mu$ L da solução de trabalho ABC (Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase) e realizada uma incubação a 37°C por 30 min. Em seguida foram realizadas 5 lavagens com tampão PBS, a cada vez deixando o tampão de lavagem por 1-2 min nos poços, descartando assim os conjugados que não se ligaram.

O substrato cromogênico TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) foi adicionado aos poços (90  $\mu$ L), incubando a 37°C no escuro por 25-30 min, em seguida são adicionados 100  $\mu$ L da solução de parada TMB em cada poço. A cor imediatamente muda para amarelo. A leitura é realizada utilizando o comprimento de onda da 450 nm.

O substrato TMB é utilizado para visualizar a reação enzimática HRP (Horseradish peroxidase). O TMB atua como um dador de hidrogênio para a redução do peróxido de hidrogênio em água por enzimas peroxidase tal como HRP. TMB é catalisado por HRP produzindo um produto de cor azul que muda para amarelo após a adição da solução de parada ácida. A densidade do



amarelo é proporcional à quantidade de TNF- $\alpha$  humano da amostra capturados na placa.

Para realização do ensaio foram adicionados 100  $\mu$ L de tampão de diluição para formação do branco e foi feita uma curva padrão. O resultado final foi expresso em concentração de pg/ml de TNF- $\alpha$ .

#### **4.8 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO -308 G/A NO GENE DO TNF- $\alpha$**

A avaliação dos parâmetros genéticos foi realizada a partir da detecção do polimorfismo -308 G/A na região promotora do gene do TNF- $\alpha$ .

##### **4.8.1. Extração de DNA genômico**

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de sangue total colhido com anticoagulante EDTA. A extração de DNA foi realizada pelo método *salting out* adaptado de Munro e Maniatis (1989). O método requer uso de soluções para lise de hemácias e leucócitos. A solução de lise de hemácias é composta por sacarose, solução de MgCl<sub>2</sub>, solução de Tris-base e TRITON X-100. Por sua vez, a solução de lise de leucócitos é preparada a partir de NaCl e NaEDTA 0,024 M.

Uma alíquota de 500  $\mu$ L da amostra de sangue total de cada paciente foi transferida para um tubo *ependorf* de 1,5 mL estéril e incubada com 500  $\mu$ L da solução de lise de hemácias por dez minutos, à temperatura ambiente. Durante este período, as amostradas foram invertidas de 5 a 6 vezes. Após a lise das hemácias, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm, durante 2 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspendido. Este procedimento foi feito duas vezes para todas as amostras. A partir desta fase, o sedimento de leucócitos foi novamente ressuspendido e à ele foram adicionados: 350  $\mu$ L da solução de lise nuclear, 35  $\mu$ l de SDS 10% e 7  $\mu$ l de Perclorato de Sódio 5 M. As amostras foram homogeneizadas vigorosamente em agitador de tubos (vórtex). Em seguida, foi adicionado à mistura 150  $\mu$ L de NaCl 4M e as amostras foram novamente agitadas em vórtex durante 30 segundos e, em seguida, centrifugadas a 14.000 rpm durante 3 minutos, a 4°C. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um

novo tubo contendo 500 µL de isopropanol. As amostras foram misturadas por inversão cerca de 20 vezes para que ocorresse a precipitação do DNA, e posteriormente centrifugadas a 14.000 rpm, 4°C, durante 3 minutos. Após o descarte do isopropanol, foram adicionados 500 µL de etanol 70%, refrigerado, para lavar o tubo que foram novamente invertidos por 20 vezes. As amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm por 3 minutos à 4°C e o sobrenadante final foi descartado. O pellet de DNA extraído foi mantido overnight a 37°C para secar. Para hidratar o DNA, foram adicionados às amostras 30 µL de solução de hidratação (Tris 10 mM/ EDTA 0,1 mM) que foram então aquecidas por 15 minutos a 65°C em banho-maria. O DNA extraído foi armazenado em freezer a -20°C até a pesquisa do polimorfismo.

O DNA de cada amostra foi quantificado usando-se um espectrofotômetro (NanoDrop® ND-2000 UV-vis) para confirmação da quantidade de DNA e sua pureza no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM).

#### **4.8.2. Detecção do polimorfismo -308 G/A do gene do TNF- $\alpha$**

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi padronizada para detecção do polimorfismo 308 G/A do gene do TNF $\alpha$ , de acordo com condições previamente descritas, utilizando-se os oligonucleotídeos da literatura (TUGLULAR et al., 2003; MARSH et al., 2003; DEGHAIDE et al., 2009). As sequências dos iniciadores e as condições de amplificação são mostradas abaixo (Quadro 1). Os iniciadores HGBA.A e HGBA.S foram utilizados como controle interno de cada reação.

**Quadro 1: Iniciadores utilizados na PCR para detecção do polimorfismo (-308 G/A) do gene do TNF- $\alpha$ .**

| INICIADOR                       | SEQÜÊNCIA (5'- 3')   | AMPLICON | ALVO            |
|---------------------------------|----------------------|----------|-----------------|
| TNFAA308.2 (1)<br>TNF Genérico  | CAGCGGAAACTTCCTTGGT  | 259 pb   | TNF<br>- 308 GA |
| TNFAS308G (2)<br>TNF Específico | ATAGGTTTTGAGGGGCATGG |          |                 |
| TNFAS308A (2)<br>TNF Específico | ATAGGTTTTGAGGGGCATGA |          |                 |
| HGBA.S (3)                      | CGGTATTTGGAGGTCAGCAC | 456 pb   | Controle        |
| HGBA.A (3)                      | CCCACCACCAAGACCTACTT |          | Controle        |

1- TUGLULAR et al., 2003; 2- MARSH et al., 2003, 3- DEGHAIDE et al., 2009

Para a PCR, foi utilizado o termociclador modelo S1000 ThermalCycler BIORAD (Foster City, CA EUA), e os reagentes foram oligonucleotídeos (Invitrogen<sup>®</sup>), desoxirribonucleotídeos (Promega<sup>®</sup>), tampão (15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 500 mM de KCl, 100 mM de Tris HCl pH 8,4 e 1% de TritonX-100) e Taq polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>). As misturas foram preparadas para um volume final de 10  $\mu$ L.

As condições de amplificação, como o número de ciclos, concentração de reagentes e temperatura de anelamento foram padronizados com o objetivo de se obter um bom sinal de amplificação com o mínimo de inespecificidade (Quadros 2 e 3) (DEGHAIDE et al., 2009). Em todos os conjuntos de reações de amplificação foi utilizado um tubo sem DNA (branco), que funciona como controle dos reagentes.

**Quadro 2: Concentrações de reagentes utilizados na PCR para detecção do polimorfismo (- 308 G/A) na região promotora do gene do TNF-  $\alpha$ .**

| Reagente          | Concentração | Quantidade(uL) |
|-------------------|--------------|----------------|
| Água              |              | 6,36           |
| Tampão            | 10 X         | 1,0            |
| MgCl <sub>2</sub> | 50 mM        | 0,3            |
| DNTP              | 20 mM        | 1,4            |
| HGBA S            | 10 uM        | 0,30           |
| HGBA A            | 10 uM        | 0,30           |
| 308A ou 308G      | 10 uM        | 0,30           |
| TNF-A 308.2       | 10 uM        | 0,30           |
| Taq Polimerase    | 5 U/ul       | 0,20           |
| DNA               | 150 ng       | 1,0            |
| Volume final      |              | 9,0            |

MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio, dNTP 2'deoxinucleosídeo 5' trifosfato

**Quadro 3: Programa de PCR, com perfil dos ciclos para detecção do polimorfismo (-308 G/A) na região promotora do gene do TNF- $\alpha$ , utilizado no termociclador.**

| Estágio              | Temperatura | Tempo    | Ciclos |
|----------------------|-------------|----------|--------|
| Desnaturação inicial | 94°C        | 5'       | 1X     |
| 1. Desnaturação      | 94°C        | 45"      |        |
| 2. Pareamento        | 64°C        | 45"      | 32X    |
| 3. Extensão          | 72°C        | 1'       |        |
|                      | 72°C        | 5'       | 1X     |
|                      | 4°C         | $\infty$ |        |

Os produtos de amplificação foram submetidos à separação por eletroforese utilizando-se gel de poliacrilamida a 8%, a 230 V por 1 hora (DEGHAIDE et al., 2009).

Após ser retirado da placa de corrida, o gel foi colocado em 50 mL de solução de fixação composta de etanol e ácido acético e foi mantido sob agitação, por 15 minutos. Em seguida foi corado com uma solução de nitrato de prata a 0,2%, na qual foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por dez minutos. Depois desse tempo, a solução corante foi descartada e o gel foi lavado com água. Após o descarte da água adicionou-se 50 mL de solução de revelação composta por NaOH e formaldeído. O gel foi colocado novamente sob agitação por dez minutos e então a solução de revelação foi descartada e substituída pela fixadora utilizada inicialmente.

#### **4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para a análise estatística foram utilizados o programa GraphPad Prism 5.0 e o Software SPSS 22.0. O estudo contou com variáveis quantitativas e qualitativas (categóricas). Foram considerados indicativos de diferença estatística valores de  $p < 0,05$ , isto é, intervalo de confiança de 95% para todos os testes estatísticos realizados. Antes da comparação entre os grupos e para verificar quais variáveis quantitativas possuíam distribuição normal foi realizado teste de Shapiro Wilk.

A apresentação dos dados foi feita na forma de média  $\pm$  desvio padrão e/ou mediana e intervalo interquartil (75% - 25%), quando havia dados que não seguiam a normalidade e com muitos outliers, sendo usada a mediana por ser um valor central dos dados, pouco afetada pela presença de valores discrepantes, como a média.

Para verificar a homogeneidade e frequência entre variáveis qualitativas, foi realizada análise de frequência das variáveis qualitativas através dos testes qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou exato de Fisher, quando alguma variável possuía um número de indivíduos menor do que 5.

Quando as variáveis quantitativas dos grupos comparados apresentaram distribuição normal, o teste realizado foi ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Bonferroni e quando as variáveis quantitativas dos grupos não seguiram a normalidade, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de teste *post hoc* de Dunn.

Para a comparação das diferenças de frequência genotípica e alélica dos polimorfismos entre os grupos controle e pacientes com DM2, foi utilizado o teste de Fisher. O risco do desenvolvimento de DM2 associado aos diferentes genótipos encontrados no polimorfismo -308G/A investigado no gene do TNF, foi calculado através da determinação da razão Odds Ratio (OR), através do programa GraphPad InStat. E para determinação dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  em relação ao genótipo foi usado o teste de Mann Whitney por se tratar de variáveis que não seguiam a normalidade.

Com auxílio do laboratório de estatística da UFES (LESTAT) os participantes deste estudo foram classificados em novos grupos de acordo com o teste de adesão. Para tais grupos, foi realizada a análise de variância, bem como o *post hoc* de Tukey para as variáveis quantitativas paramétricas e, para as não paramétricas, o teste de Kruskal-wallis com o *post hoc* de Dunn.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. PERFIL CLÍNICO E SOCIODEMOGRÁFICO

Para a composição do grupo de estudo, este trabalho contou com a participação de pacientes cadastrados em unidades básicas de saúde da Região de Saúde de Maruípe no município de Vitória, ES.

As informações coletadas através do questionário aplicado e do prontuário eletrônico dos participantes permitiram as caracterizações sociodemográfica, clínica e antropométrica dos participantes. Estas características bem como a análise estatística entre os grupos estão representadas nas tabelas 1 e 2.

Em relação ao sexo, os grupos na sua maioria são constituídos por mulheres, porém, o teste qui quadrado mostrou que não há diferença entre os grupos no que diz respeito à variável sexo ( $p= 0,1340$ ). Além disso, a idade média dos participantes dos grupos foi  $54,83 \pm 1,43$  para o grupo DM2 sem insulino terapia,  $59,73 \pm 1,30$  para o grupo DM2 com insulino terapia, e  $56,70 \pm 1,62$  para o grupo controle, não havendo diferenças estatísticas entre os grupos, como evidencia o teste de Kruskal-Wallis ( $p= 0,0570$ ).

Em relação às variáveis sociodemográficas, não houve diferença entre as variáveis profissão e estado civil, sendo que a maioria dos pacientes relatou trabalhar e serem casados, para a variável escolaridade houve diferença ( $p < 0,0001$ ), demonstrando que os grupos nos grupos DM2 a maioria dos pacientes possuía ensino fundamental completo, enquanto no grupo controle, a maioria apresentava ensino médio completo (tabela 1).

Dentre as variáveis clínicas, no consumo de bebida alcoólica houve diferença significativa entre os grupos ( $p= 0,043$ ), demonstrando que ambos os grupos com DM2 ingerem bebida alcoólica socialmente numa frequência maior (14 pacientes (35%) e 11 pacientes (27,5%), sem e com insulino terapia, respectivamente) que o grupo controle (5 pacientes (12,5%)). Em relação a variável tabagismo, a maior parte dos pacientes não são fumantes. Somente 3 (7,5%) pacientes do grupo DM2 sem insulino terapia, 5 (12,5%) pacientes do

grupo DM2 com insulino terapia são fumantes, enquanto nenhum paciente do grupo controle é fumante. O teste qui quadrado não mostrou diferença estatística em relação à variável qualitativa tabagismo ( $p = 0,079$ ) entre os participantes dos três grupos.

A caracterização dos grupos DM2 em relação ao tempo de duração da doença não apresentou diferença estatística entre os grupos ( $p= 0,367$ ) quando aplicado o Teste de Fisher, sendo que 20 pacientes (50%) do grupo DM2 sem insulino terapia e 25 pacientes (62,5%) do grupo DM2 com insulino terapia possuíam a doença há menos de 5 anos. Em relação à duração da insulino terapia, o estudo mostrou que 23 pacientes fazem uso de insulina há mais de 5 anos (57,5%) e 17 fazem uso há menos de 5 anos (42,5%), no grupo DM2 em insulino terapia.

Os pacientes foram classificados como hipertensos ou não mediante diagnóstico médico explicitado em prontuário, havendo diferença estatística quando realizado o teste qui quadrado ( $p= 0,0001$ ), mostrando que no total 75 pacientes (62,5%) eram hipertensos, sendo 67,5% do grupo DM2 sem insulino terapia e 85% do grupo com insulino terapia, em comparação com 35% do grupo controle.

De acordo com a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO, 2010), IMC entre 18,5 e 24,9 ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) representa um peso normal,  $\text{IMC} \geq 25$  ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) representa sobrepeso, e um  $\text{IMC} \geq 30$  ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) representa obesidade, com risco de ocorrência de comorbidades. O teste ANOVA de uma via mostrou que a média dos valores do índice de massa corporal dos participantes foi diferente ( $p= 0,0068$ ) entre os grupos DM2 com e sem insulino terapia, sendo observada uma média de  $32,10 \pm 1,271$  e  $28,03 \pm 0,6060$ , respectivamente e entre os grupos DM2 com insulino terapia e controle (média  $27,98 \pm 1,049$ ), sendo assim observado maior IMC nos pacientes DM2 com insulino terapia. No entanto, não houve diferença estatística quando os pacientes foram estratificados em eutróficos, com sobrepeso ou obesidade, e realizado o teste qui quadrado, conforme tabela 2.



**Tabela 1 – Características sociodemográficas dos participantes dos grupos controle e DM2 com e sem insulino terapia.**

| Variável                      | Categoria       | Grupo DM2 sem insulino terapia | Grupo DM2 com insulino terapia | Grupo controle | Valor p     |
|-------------------------------|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------|-------------|
| <b>Sexo</b><br>(n, %)         | Feminino        | 28 (70)                        | 25 (62,5)                      | 33 (82,5)      | 0,1340(a)   |
|                               | Masculino       | 12 (30)                        | 15 (37,5)                      | 7 (17,5)       |             |
| <b>Idade</b><br>(M ± DP)      | -               | 54,83 ± 1,43                   | 59,73 ± 1,30                   | 56,70 ± 1,62   | 0,0570(b)   |
| <b>Profissão</b><br>(n, %)    | Não trabalha    | 1 (2,5)                        | 7 (17,5)                       | 5 (12,5)       | 0,2145(a)   |
|                               | Trabalha        | 31 (77,5)                      | 23 (57,5)                      | 27 (67,5)      |             |
|                               | Aposentado      | 8 (20)                         | 10 (25)                        | 8 (20)         |             |
| <b>Estado civil</b><br>(n, %) | Solteiro        | 12 (30)                        | 10 (25)                        | 7 (17,5)       | 0,5201(a)   |
|                               | Casado          | 20 (50)                        | 19 (47,5)                      | 23 (57,5)      |             |
|                               | Divorciado      | 3 (7,5)                        | 4 (10)                         | 7 (17,5)       |             |
|                               | Outro           | 5 (12,5)                       | 7 (17,5)                       | 3 (7,5)        |             |
| <b>Escolaridade</b><br>(n, %) | Analfabeto      | 3 (7,5)                        | 7 (17,5)                       | 6 (15)         | <0,0001*(a) |
|                               | Ens.fundamental | 30 (75)                        | 30 (75)                        | 12 (30)        |             |
|                               | Ensino médio    | 7 (17,5)                       | 3 (7,5)                        | 18 (45)        |             |
|                               | Superior        | 0                              | 0                              | 4 (10)         |             |

\* Indica diferença estatística para  $p < 0,05$  (5%)

(a) Teste  $\chi^2$ ; (b) Kruskal-Wallis

**Tabela 2 – Características clínicas dos participantes dos grupos controle e DM2 com e sem insulinoterapia.**

| Variável  | Categoria    | Grupo DM2 sem insulinoterapia | Grupo DM2 com insulinoterapia | Grupo controle | Valor p                |
|---|--------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|------------------------|
| <b>Consumo bebidas alcóolicas</b><br><br>(n, %)     | Diariamente  | 0                             | 0                             | 0              | 0,043* (a)             |
|   | Semanalmente | 0                             | 2 (5,0)                       | 0              |                        |
|   | Socialmente  | 14 (35,0)                     | 11 (27,5)                     | 5 (12,5)       |                        |
|   | Nunca        | 26 (65,0)                     | 27 (67,5)                     | 35 (87,5)      |                        |
| <b>Tabagismo</b><br><br>(n, %)                      | Fumante      | 3 (7,5)                       | 5 (12,5)                      | 0              | 0,079 (a)              |
|   | Não fumante  | 37 (92,5)                     | 35 (87,5)                     | 40 (100)       |                        |
| <b>Tempo de diagnóstico DM2</b><br><br>(n, %)       | Menos 5 anos | 20 (50,0)                     | 25 (62,5)                     | -              | 0,367 (c)              |
|   | Mais 5 anos  | 20 (50,0)                     | 15 (37,5)                     | -              |                        |
| <b>Tempo de insulinoterapia</b><br><br>(n, %)       | Menos 5 anos | -                             | 23 (57,5)                     | -              | -                      |
|   | Mais 5 anos  | -                             | 17 (42,5)                     | -              |                        |
| <b>Hipertensão Arterial Sistêmica</b><br><br>(n, %) | Presente     | 27 (67,5)                     | 34 (85)                       | 14 (35)        | <0,0001*(a)            |
|   | Ausente      | 13 (32,5)                     | 6 (15)                        | 26 (65)        |                        |
| <b>IMC (M ± DP)</b>                                 | -            | 32,10 ± 1,27                  | 28,03 ± 0,60                  | 27,98 ± 1,04   | 0,0068*(b)<br>(I, III) |
| <b>IMC categorizado</b><br><br>(n, %)               | Eutrófico    | 6 (15,0)                      | 10 (25,0)                     | 17 (42,5)      | 0,063 (a)              |
|   | Sobrepeso    | 19 (47,5)                     | 19 (47,5)                     | 11 (27,5)      |                        |
|   | Obeso        | 15 (37,5)                     | 11 (27,5)                     | 12 (30,0)      |                        |

\* Indica diferença estatística para  $p < 0,05$  (5%)

(a) Teste  $\chi^2$ ; (b) ANOVA de 1 via; (c) Teste exato de Fisher

(I): diferença entre os grupos DM2 sem insulinoterapia e com insulinoterapia, (II): diferença entre os grupos DM2 sem insulinoterapia e controle, (III): diferença entre os grupos DM2 com insulinoterapia e controle.

Com relação aos medicamentos, foram listados os que tinham maior frequência de uso entre os pacientes, que são medicamentos para o tratamento de diabetes, hipertensão e dislipidemia, representados pelas classes: diurético tiazídico (hidroclorotiazida), betabloqueador (atenolol), inibidor da ECA (enalapril), antagonista da angiotensina II (losartan), inibidor de canal cálcio (anlodipino), diurético de alça (furosemida), estatina (sinvastatina) e fibrato (fenofibrato). Em relação ao grupo DM2 sem insulinização, a maioria utilizava metformina (biguanida) (97,5%) e/ou glicazida e glibenclamida (sulfonilureias) (6 e 3, 15 e 7,5%, respectivamente). No grupo DM2 em insulinização todos os 40 pacientes (100%) usavam insulina e 24 (60%) metformina (tabela 3).

**Tabela 3 – Tipo e frequência de medicamentos em uso pelos participantes dos grupos controle e DM2 com e sem insulinoterapia.**

| <b>Medicamento</b>       | <b>Grupo DM2 sem insulinoterapia</b> | <b>Grupo DM2 com Insulinoterapia</b> | <b>Grupo controle</b> |
|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| Enalapril (n, %)         | 14 (35)                              | 15 (37,5)                            | 10 (25)               |
| Losartan (n, %)          | 15 (37,5)                            | 11 (27,5)                            | 5 (12,5)              |
| Atenolol (n, %)          | 8 (20)                               | 9 (22,5)                             | 5 (12,5)              |
| Anlodipino (n, %)        | 6 (15)                               | 6 (15)                               | 1 (2,5)               |
| Hidroclorotiazida (n, %) | 21 (52,5)                            | 19 (47,5)                            | 13 (32,5)             |
| Furosemida (n, %)        | 0                                    | 2 (5)                                | 4 (10)                |
| Sinvastatina (n, %)      | 12 (30)                              | 7 (17,5)                             | 2 (5)                 |
| Fenofibrato (n, %)       | 4 (10)                               | 2 (5,0)                              | 1 (2,5)               |
| Glicazida (n, %)         | 6 (15)                               | 0                                    | -                     |
| Glibenclamida (n, %)     | 3 (7,5)                              | 1 (2,5)                              | -                     |
| Metformina (n, %)        | 39 (97,5)                            | 24 (60)                              | -                     |
| Insulina (n, %)          | -                                    | 40 (100)                             | -                     |

Na avaliação da adesão ao tratamento observa-se que o grupo DM2 sem insulina apresentou-se igualmente dividido entre aderente e não aderentes (20 pacientes, 50%), enquanto o grupo DM2 em insulino terapia apresentou um maior número de pacientes aderentes (23, que corresponde a 57,5%), e 17 não aderentes (42,5%). O grupo controle contou somente com 22 pacientes nesse teste porque o restante do grupo não fazia uso de nenhum medicamento de uso contínuo, sendo 12 aderentes (54,5%) e 10 não aderentes (45,5%) (Gráfico 1). O teste qui quadrado para avaliação da adesão ao tratamento medicamentoso não foi significativo ( $p= 0,796$ ), indicando que não há associação entre os grupos DM2 (com e sem insulino terapia) e controle, com a presença ou ausência de adesão, avaliadas a partir do teste de Morisky-Green.

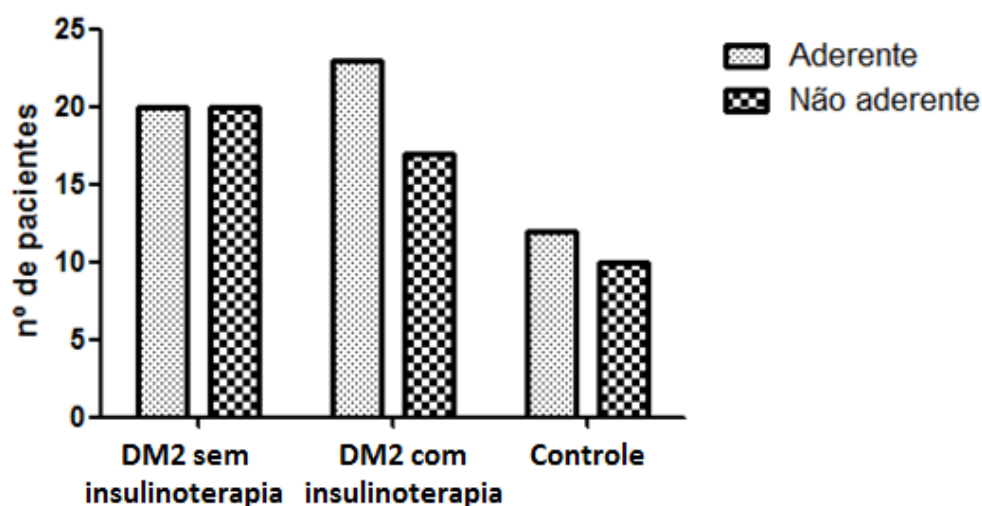


Gráfico 1 – Gráfico de barras representando a adesão ao tratamento medicamentoso dos pacientes dos grupos controle e DM2 com e sem insulino terapia, classificados segundo a metodologia de Morisky Green.

## 5.2. PERFIL BIOQUÍMICO

Os parâmetros bioquímicos foram representados por variáveis quantitativas que ajudaram a compor os perfis glicêmico (glicemia de jejum e HbA1C) e lipídico (CT, HDLc, LDLc, VLDLc e triglicerídeos).

Os resultados do perfil glicêmico mostram que os maiores níveis de glicemia de jejum foram encontrados no grupo DM2 com insulinoterapia, com uma mediana de 172,5 (225 – 118,3), assim como a HbA1c obteve os maiores níveis 8,65 (10,95 – 6,87) no grupo DM2 com insulinoterapia (tabela 4). A análise estatística revelou que houve diferença significativa para as variáveis HbA1c ( $p < 0,0001$ ) e glicemia de jejum ( $p < 0,0001$ ), sendo que na glicemia de jejum houve diferença entre os grupos DM2 sem insulinoterapia e controle e DM2 com insulinoterapia e controle. Já na HbA1c houve diferença estatística entre os três grupos estudados (DM2 com insulinoterapia e sem insulinoterapia; DM2 com insulinoterapia e controle; DM2 sem insulinoterapia e controle).

Os pacientes com DM2 foram categorizados, com relação à frequência de parâmetros considerados normais ou alterados, segundo os valores de referência, e foi realizado o teste de qui quadrado. Essa análise mostrou que 37,5% do grupo DM2 sem insulinoterapia e 62,5% do grupo DM2 com insulinoterapia possuíam níveis alterados de glicemia de jejum ( $p = 0,0235$ ) Da mesma forma, foi encontrado que 27,5% do grupo DM2 sem insulinoterapia e 75% do grupo DM2 com insulinoterapia possuíam níveis alterados de HbA1c ( $p < 0,0001$ ).

Em relação ao perfil lipídico, na análise estatística somente a variável HDLc foi estatisticamente diferente entre os grupos ( $p < 0,0001$ ), obtendo os maiores níveis 50 (60,0 – 41,2) no grupo controle e níveis semelhantes nos grupos DM2 sem e com insulinoterapia, 43,5 (49,0-36,0) e 44,0 (49,0-36,2), respectivamente. Houve diferença entre os grupos DM2 sem e com insulinoterapia em relação ao grupo controle, enquanto que as variáveis colesterol total, LDLc, VLDLc e triglicérideo não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) (tabela 4).

**Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos dos participantes dos grupos controle e DM2 com e sem insulinoterapia expressos como mediana, intervalo interquartil e valor p.**

| Variável      | Grupo DM2 sem insulinoterapia | Grupo DM2 com insulinoterapia | Grupo controle        | Valor p                      |
|---------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------------|
|               | Mediana (Q3 – Q1)             | Mediana (Q3 – Q1)             | Mediana (Q3 – Q1)     |                              |
| GJ (mg/dL)    | 123,7 (157,4 – 110,2)         | 172,5 (225 – 118,3)           | 93,6 (101,1 – 88,2)   | <0,0001*(b)<br>(II, III)     |
| HbA1c (%)     | 6,3 (7,3 – 5,8)               | 8,65 (10,9 – 6,8)             | 5,5 (6,0 – 5,3)       | <0,0001* (b)<br>(I, II, III) |
| CT (mg/dL)    | 193,5 (219,3 – 157,0)         | 197,5 (236,5 – 163,5)         | 207,5 (235,0 – 182,5) | 0,118 (a)                    |
| LDLc (mg/dL)  | 118,0 (144,0 – 92,0)          | 122,5 (154,8 – 92,25)         | 122,0 (147,3 – 105,5) | 0,537 (a)                    |
| HDLc (mg/dL)  | 43,5 (49,0 – 36,0)            | 44,0 (49,0 – 36,2)            | 50,0 (60,0 – 41,2)    | <0,0001* (a)<br>(II,III)     |
| VLDLc (mg/dL) | 27,0 (36,0 – 22,0)            | 24,0 (32,0 – 19,0)            | 24,5 (34,2 – 16,7)    | 0,400 (b)                    |
| TGD (mg/dL)   | 137,0 (183,8 – 116,3)         | 139,0 (224,0 – 98,0)          | 125,5 (178,8 – 85,5)  | 0,376 (b)                    |

\* Indica diferença estatística para  $p < 0,05$  (5%)

GJ: glicemia de jejum, HbA1C: hemoglobina glicada, CT: colesterol total, LDLc: colesterol LDL, HDLc: colesterol HDL, VLDLc: colesterol VLDL, TGD: triglicérideo; (a) Anova de uma via; (b) Teste de Kruskal-Wallis; Q3-Q1: Intervalo interquartil.

(I): diferença entre os grupos DM2 sem insulinoterapia e com insulinoterapia, (II): diferença entre os grupos DM2 sem insulinoterapia e controle, (III): diferença entre os grupos DM2 com insulinoterapia e controle.

### 5.3. PERFIL DE MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO

Para a avaliação dos marcadores de estresse oxidativo, foram realizadas as determinações plasmáticas de óxido nítrico, superóxido dismutase e peroxidação lipídica. Os valores referentes à média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil de cada variável bem como análise estatística entre os grupos e valor p estão representados na tabela 5. E os dados também estão

representados em gráfico boxplot para as variáveis, indicando a diferenças estatísticas encontradas e o valor  $p$  (Gráfico 2).

Os maiores níveis de óxido nítrico foram encontrados no grupo controle, com valores de mediana 7,11 (8,94-4,62), seguido de valores medianos de 6,99 (9,40-4,96) no grupo DM2 sem insulino terapia e os menores níveis no grupo DM2 com insulino terapia (4,64; 8,42-1,76) neste parâmetro. Segundo o teste Kruskal Wallis, foi observada diferença estatística nos níveis médios de óxido nítrico entre os grupos ( $p= 0,015$ ), sendo que houve diferença entre o grupo DM2 sem insulino terapia e com insulino terapia e diferença entre o grupo DM2 com insulino terapia e controle.

Os níveis menores de SOD encontrados foram de 1,97 (3,48-1,00) no grupo DM2 com insulino terapia, enquanto os grupos DM2 sem insulino terapia e controle apresentaram resultados próximos (3,62; 4,12-2,07 e 2,96; 5,31-1,82, respectivamente) e quando analisados estatisticamente se mostram diferentes, segundo o teste Kruskal Wallis, tendo o valor de  $p= 0,013$  e diferença entre os grupos DM2 sem insulino terapia e DM2 com insulino terapia.

Na peroxidação lipídica, representada pela dosagem do malondialdeído formado no plasma, observou-se os maiores valores de 3,15 (4,21-2,46) no grupo DM2 com insulino terapia, seguido de valores de 3,03 (4,12-2,07) no grupo DM2 sem insulino terapia e menores valores no grupo controle (0; 0-0). A avaliação da peroxidação lipídica foi estatisticamente diferente ( $p< 0,0001$ ) entre os grupos DM2 sem insulino terapia em relação ao controle e entre o grupo DM2 com insulino terapia em relação ao controle.

**Tabela 5 - Níveis plasmáticos dos marcadores dos níveis de óxido nítrico, superóxido dismutase e peroxidação lipídica nos grupos controle e DM2 com e sem insulino terapia expressos como médias, desvios padrão, mediana, intervalo interquartil e valor p.**

| Marcador   | Grupo DM2 sem insulino terapia | Grupo DM2 com insulino terapia | Grupo Controle | Valor p                 |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------|-------------------------|
|            | Mediana                        | Mediana                        | Mediana        |                         |
|            | (Q3 – Q1)                      | (Q3 – Q1)                      | (Q3 – Q1)      |                         |
| NO         | 6,99                           | 4,64                           | 7,11           | 0,015 <sup>*(a)</sup>   |
| ( $\mu$ M) | (9,40 – 4,96)                  | (8,42 – 1,76)                  | (8,94 – 4,62)  | (I, III)                |
| SOD        | 3,62                           | 1,97                           | 2,96           | 0,013 <sup>*(a)</sup>   |
| (U/mL)     | (4,12 – 2,12)                  | (3,48 – 1,00)                  | (5,31 – 1,82)  | (I)                     |
| MDA        | 3,03                           | 3,15                           | 0              | <0,0001 <sup>*(a)</sup> |
| ( $\mu$ M) | (4,12 – 2,07)                  | (4,21 – 2,46)                  | (0 – 0)        | (II, III)               |

NO: óxido nítrico, SOD: superóxido dismutase, MDA: malondialdeído

\* Indica diferença estatística para  $p < 0,05$ , (a) Teste Kruskal Wallis

(I): diferença entre os grupos DM2 sem insulino terapia e com insulino terapia, (II): diferença entre os grupos DM2 sem insulino terapia e controle, (III): diferença entre os grupos DM2 com insulino terapia e controle.



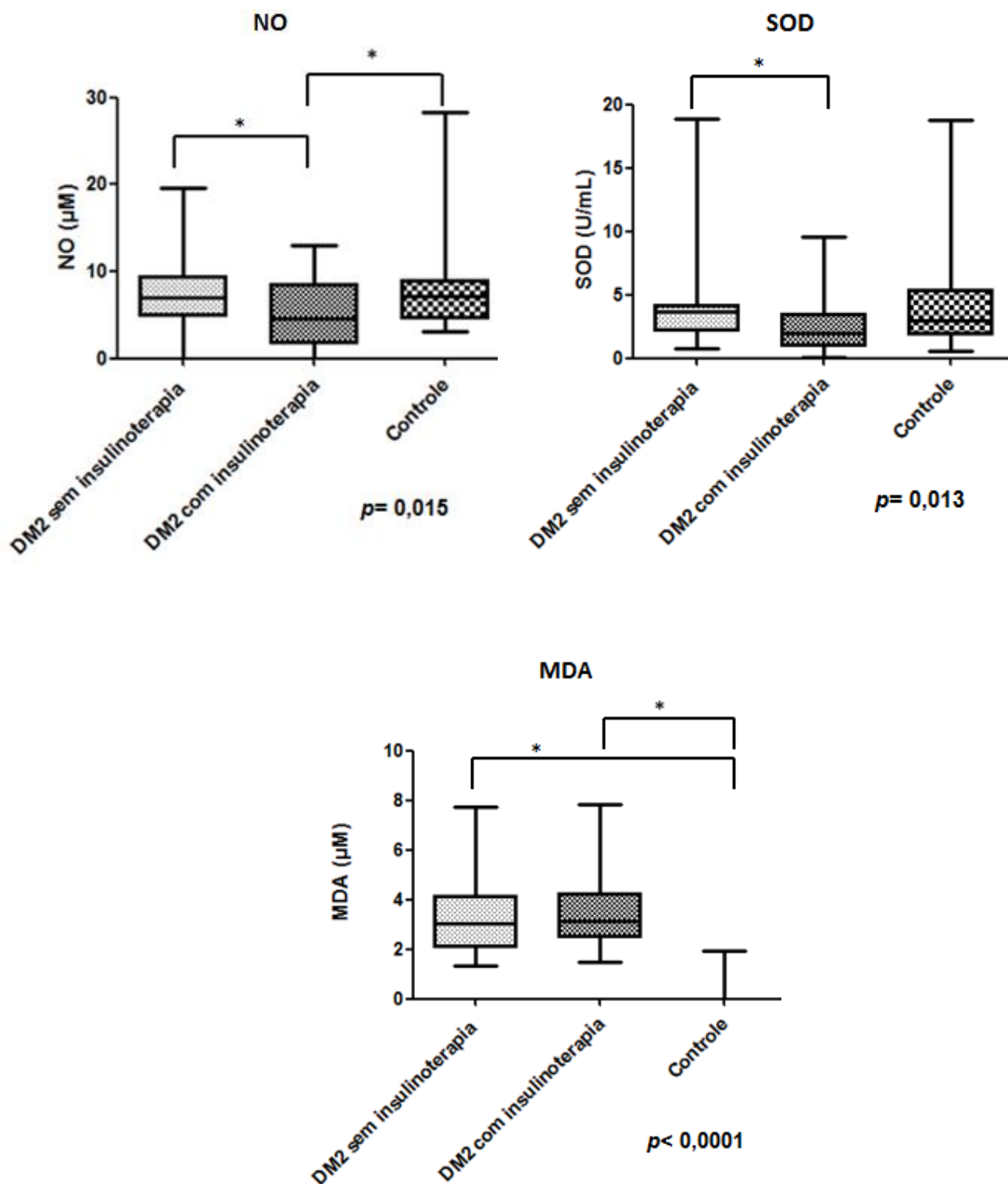


Gráfico 2 – Gráficos Box-plots correspondentes aos níveis plasmáticos de NO (µM), SOD (U/mL) e MDA (µM), dos participantes dos grupos DM2 sem insulinoterapia, DM2 com insulinoterapia e controle, com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10°, 25°, 50°, 75° e 90° percentis. \* Valor de p significativo ( $p < 0,05$ ). NO: óxido nítrico, SOD: superóxido dismutase, MDA: malondialdeído.

#### 5.4. PERFIL DE MARCADORES DA INFLAMAÇÃO

Na avaliação dos marcadores de inflamação, foram realizadas as determinações plasmáticas de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , PCRus e fibrinogênio. Os valores referentes à média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil das variáveis bem como análise estatística entre os grupos e valor  $p$  estão representados na tabela 6. E os dados também estão representados em gráfico boxplot para as variáveis, indicando a diferenças estatísticas encontradas e o valor  $p$  (Gráfico 3).

No ensaio da citocina IL1  $\beta$  que foi realizado não foi possível obter a quantificação, visto que a maioria dos indivíduos apresentaram valores de absorbância menores que o branco, impossibilitando a análise dos resultados entre os grupos participantes do estudo. Provavelmente a amostra estava muito diluída, ficando abaixo do limite de detecção do ensaio, ou ainda, a concentração plasmática de IL1  $\beta$  dos pacientes possuía valores muito baixos.

Na avaliação de TNF $\alpha$  os níveis mais elevados foram encontrados nos grupos dos pacientes com DM2, com valores de 94,13 (151,60-79,13) e 82,88 (101,60-56,63) nos grupos DM2 com e sem insulinoterapia, respectivamente, já no grupo controle foi encontrado os menores valores medianos de 19,13 (37,25-9,75). Segundo o teste de Kruskal Wallis, foi observada diferença estatística nos níveis médios de TNF $\alpha$  entre os grupos ( $p < 0,0001$ ), houve diferença entre o grupo DM2 sem insulinoterapia e controle e entre o grupo DM2 com insulinoterapia e controle.

Da mesma forma, na dosagem de PCRus foi observado níveis maiores de PCRus nos grupos dos pacientes com DM2 sem e com insulinoterapia, com valores medianos 0,49 (1,00-0,15) e 0,31 (0,64-0,13), respectivamente e menores valores no grupo controle (0,27; 0,38-0,06). Níveis estatisticamente significantes foram encontrados nos grupos em relação à PCRus ( $p = 0,0094$ ), havendo diferença entre o grupo DM2 sem insulinoterapia e controle, segundo o teste de Kruskal Wallis. Vale ressaltar que os valores de PCRus considerados normais são valores inferiores a 0,5 mg/dL.

A análise utilizando o teste qui quadrado, quando os parâmetros foram categorizados em normal e alterado, não apresentou diferença ( $p= 0,0679$ ). Os valores de PCRus se apresentaram alterados em 50% dos pacientes DM2 sem uso de insulina e em 30% dos pacientes DM2 em insulino terapia.

Ainda de acordo com os resultados da tabela 6, houve diferença estatística nas concentrações de fibrinogênio entre os grupos ( $p= 0,0001$ ), sendo que os valores medianos para o fibrinogênio foram maiores para o grupo do DM2 com insulino terapia (333; 386,00-293,50) do que para o grupo DM2 sem insulino terapia (290; 325,30-239,80) e controle (276; 334,50-224,00). Segundo o teste Anova de 1 via houve diferença entre o grupo DM2 com insulino terapia em relação ao sem insulino terapia, e entre o grupo DM2 com insulino terapia em relação ao controle. Vale ressaltar que os valores de fibrinogênio obtidos para os dois grupos estão dentro dos valores do padrão de referência descritos na literatura que vai de 150 a 370 mg/dL.

Os valores de fibrinogênio se apresentaram alterados em 10% dos pacientes DM2 sem uso de insulina e em 32,5% dos pacientes DM2 em insulino terapia, sendo essas frequências diferentes ( $p= 0,0139$ ).

**Tabela 6 - Níveis plasmáticos dos marcadores de inflamação TNF- $\alpha$ , PCRus e fibrinogênio nos grupos controle e DM2 com e sem insulinoterapia expressos como médias, desvios padrão, mediana, intervalo interquartil e valor p.**

| Marcador                | Grupo DM2 sem insulinoterapia | Grupo DM2 com insulinoterapia | Grupo Controle           | Valor p                  |
|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                         | Mediana                       | Mediana                       | Mediana                  |                          |
|                         | (Q3 -Q1)                      | (Q3 -Q1)                      | (Q3 -Q1)                 |                          |
| TNF $\alpha$<br>(pg/mL) | 82,88<br>(101,60- 56,63)      | 94,13<br>(151,60 - 79,13)     | 19,13<br>(37,25 - 9,75)  | <0,0001*<br>(a) (II,III) |
| PCRus<br>(mg/dL)        | 0,49<br>(1,00 - 0,15)         | 0,31<br>(0,64 - 0,13)         | 0,27<br>(0,38 - 0,06)    | 0,0094*<br>(a) (II)      |
| Fib.<br>(mg/dL)         | 290<br>(325,30 - 239,80)      | 333<br>(386,00 - 293,50)      | 276<br>(334,50 - 224,00) | 0,0001*<br>(b) (I,III)   |

TNF-A  $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa, PCRus: proteína C reativa ultra sensível, Fib: fibrinogênio.

\* Indica diferença estatística para  $p < 0,05$ , (a) Teste Kruskal Wallis, (b) Anova 1 via

(I): diferença entre os grupos DM2 sem insulinoterapia e com insulinoterapia, (II): diferença entre os grupos DM2 sem insulinoterapia e controle, (III): diferença entre os grupos DM2 com insulinoterapia e controle.

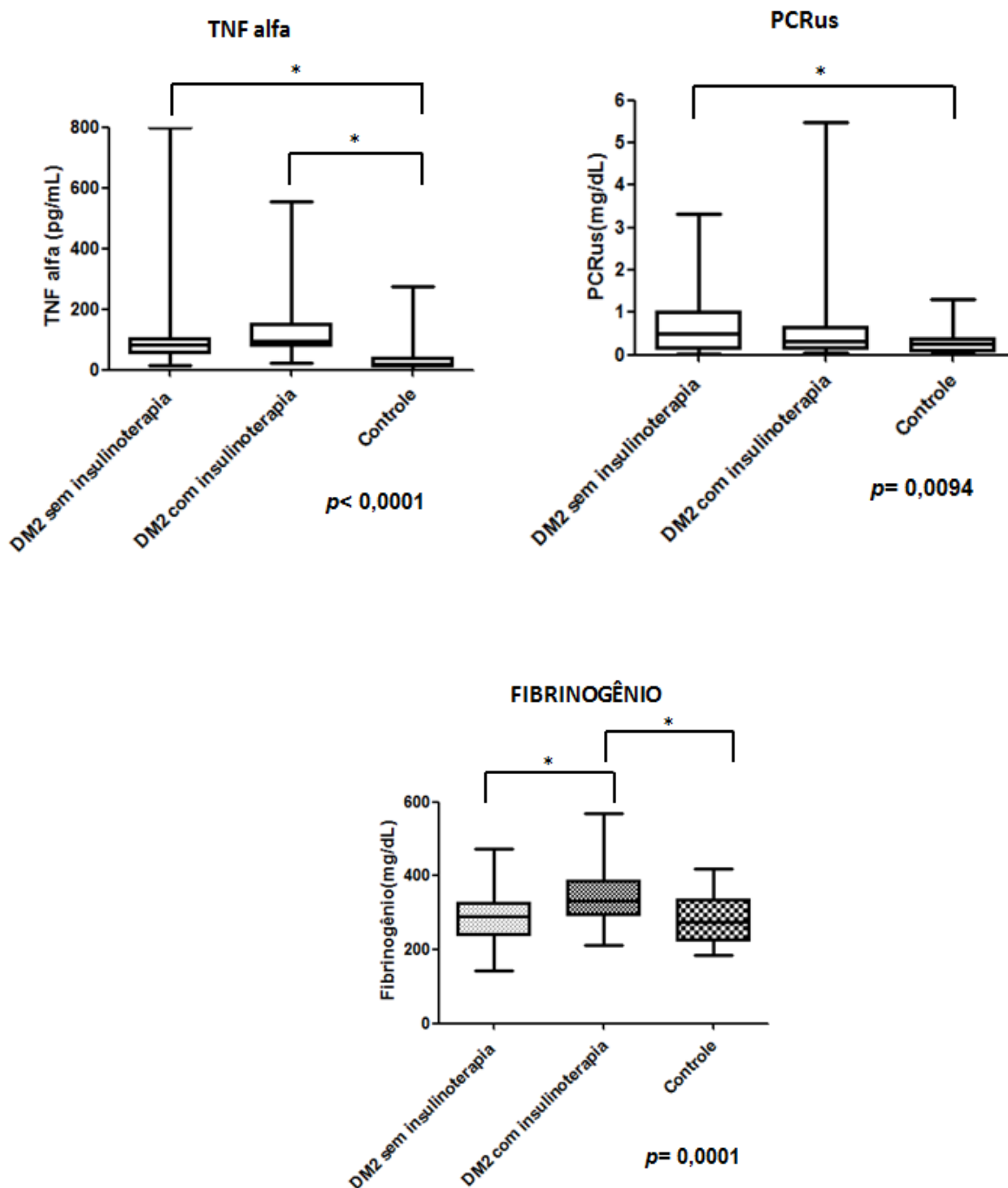


Gráfico 3 - Gráficos Box-plots correspondentes aos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  (pg/mL), PCRus (mg/dL) e fibrinogênio (mg/dL), dos participantes dos grupos DM2 sem insulinoterapia, DM2 com insulinoterapia e controle, com indicações, de baixo para cima, dos valores do 10°, 25°, 50°, 75° e 90° percentis. \* Valor de p significativo ( $p < 0,05$ ). TNF-A  $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa, PCRus: proteína C reativa ultra sensível.

## 5.5. PERFIL GENÉTICO

Todos os pacientes foram submetidos à pesquisa do polimorfismo -308 G/A na região promotora do gene do TNF- $\alpha$ , porém em alguns DNAs não foi possível realizar a genotipagem. No total foi possível obter resultado de 112 pacientes, sendo 35 do grupo DM2 com insulinoterapia, 39 do grupo DM2 com insulinoterapia e 38 pacientes do grupo controle. Para realizar a análise, no entanto, foram identificados dois grupos: DM2, onde haviam os pacientes que usavam ou não insulina, totalizando 74 pacientes e grupo controle, com 38 pacientes.

A figura 6 ilustra o resultado da investigação da presença do polimorfismo -308G/A no gene do TNF- $\alpha$  em gel de poliacrilamida corado pela prata. O padrão de peso molecular corresponde à última canaleta, a canaleta 1 demonstra o genótipo heterozigoto GA e as canaletas de 2 a 5 indicam indivíduos que apresentaram o genótipo homozigoto GG e o B representa o branco indicando que não houve contaminação dos reagentes. Neste estudo não foi encontrado nenhum carreador do genótipo homozigoto AA. Foi utilizado um paciente comprovadamente GG em todas as análises com o objetivo de minimizar o erro.

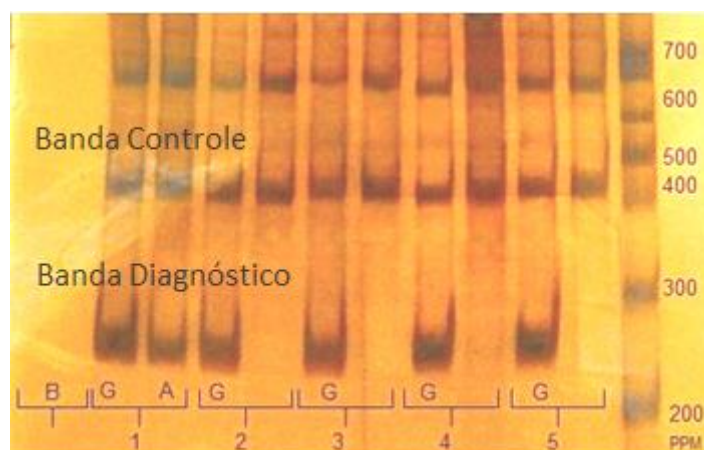


Figura 6- Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção do polimorfismo (-308 G/A) na região promotora do gene do TNF- $\alpha$ , através da técnica de PCR alelo específica. *Legenda:* PPM: padrão de peso molecular 100 pb, Genótipo GG: canaletas (2; 3; 4; 5) Genótipo GA: canaletas (1), genótipo AA ausente; B: branco.

A tabela 7 contém a distribuição da frequência genotípica e alélica para o grupo de pacientes com DM2, e grupo controle quanto ao polimorfismo -308 G/A do gene do TNF- $\alpha$ . No entanto, devido a alguns problemas com a técnica, não foi possível genotipar todos os participantes do estudo.

O grupo dos pacientes com DM2 foi formado por 74 pacientes incluindo os usuários e não usuários de insulinoterapia, dentre os quais 40 homozigotos GG e 34 pacientes heterozigotos GA, apresentando frequências genotípicas de 60,5 e 39,5 respectivamente. As frequências alélicas nesse grupo foram de 80,2 para G e 19,8 para A.

O grupo controle, por sua vez, foi composto por 38 pacientes, sendo 23 homozigotos GG e 15 indivíduos heterozigotos GA, apresentando frequências genotípicas de 54 e 46, respectivamente. As frequências alélicas nesse grupo foram de 77 para G e 23 para A.

O teste exato de Fisher não identificou diferença estatística em relação aos genótipos de ambos os grupos ( $p= 0,5515$ ), ou da distribuição dos alelos ( $p= 0,6132$ ).

**Tabela 7: Frequências genotípica e alélica do polimorfismo -308G/A do gene do TNF- $\alpha$ .**

| Frequências genotípica e alélica do TNF- $\alpha$ |    |                  |                |                        |        |                |
|---|----|------------------|----------------|------------------------|--------|----------------|
|   |    | Controle         | DM2            | Valor p <sup>(a)</sup> | OR     | CI             |
|   |    | n (frequência %) | n (frequência) |                        |        |                |
| Polimorfismo<br>-308 G/A                          | GG | 23 (60,5)        | 40 (54,0)      | 0.5515                 | 0.7673 | 0.3464 - 1.700 |
|   | GA | 15 (39,5)        | 34 (46,0)      | 0.5515                 | 1.303  | 0.5884 - 2.887 |
|   | AA | 0 (0)            | 0 (0)          | --                     | --     | --             |
| Alelo   | G  | 61 (80,2)        | 114 (77,0)     | 0.6132                 | 0.8245 | 0.4166 - 1.632 |
|   | A  | 15 (19,8)        | 34 (23,0)      | 0.6132                 | 1.213  | 0.6128 - 2.400 |

\* Indica diferença estatística para  $p < 0,05$ , OD: Odds Ratio, CI: Intervalo de confiança (a) Teste Exato de Fisher

Os níveis plasmáticos de TNF $\alpha$  dos indivíduos nos grupos controle e DM2 foram estratificados por genótipo e analisados (tabela 8). Quando se compara

os grupos verifica-se que existe diferença significativa em relação ao TNF- $\alpha$  tanto para o grupo formado pelos homozigotos GG ( $p < 0,0001$ ) controle ( $46,99 \pm 69,80$ ) em relação ao DM2 ( $116,4 \pm 107,4$ ), quanto para o grupo dos heterozigotos GA ( $p < 0,0001$ ) controle ( $22,85 \pm 21,37$ ) em relação ao DM2 ( $118,7 \pm 133,3$ ). Demonstrando que em ambos os casos, o nível do marcador TNF- $\alpha$  encontrado no plasma sanguíneo foi maior para o grupo DM2 quando comparado ao grupo controle.

De acordo ainda com a tabela 8 não houve diferença estatística entre a produção de TNF-A para ambos os genótipos quando avaliado o grupo controle ( $p = 0,6109$ ) e grupo DM2 ( $p = 1,000$ ).

**Tabela 8 - Níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  dos indivíduos nos grupos controle e DM2 estratificados por genótipo e valores p.**

| Níveis plasmáticos de TNF $\alpha$ (pg/mL) |                           |                           |                         |
|--|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Genótipo                                   | Controle                  | DM2                       | Valor p                 |
|  | média $\pm$ desvio padrão | média $\pm$ desvio padrão |                         |
| GG   | 46,99 $\pm$ 69,80         | 116,4 $\pm$ 107,4         | <0,0001 <sup>(a)*</sup> |
| GA   | 22,85 $\pm$ 21,37         | 118,7 $\pm$ 133,3         | <0,0001 <sup>(a)*</sup> |
| <b>Valor p</b>                             | 0,6109 <sup>(a)</sup>     | 1,000 <sup>(a)</sup>      |                         |

\* Indica diferença estatística para  $p < 0,05$  (a) Teste Mann Whitney.

## 5.6. ANÁLISE POR GRUPOS SEGUNDO ADESÃO

Com objetivo de verificar se o comportamento dos dados era diferente para pacientes aderentes ou não, foram considerados novos grupos de pacientes, classificados da seguinte forma:

- Grupo 1: 23 pacientes com DM2 que utilizam insulina e são aderentes;
- Grupo 2: 17 pacientes com DM2 que utilizam insulina e não são aderentes;



- Grupo 3: 20 pacientes com DM2 que não utilizam insulina e são aderentes;
- Grupo 4: 20 pacientes com DM2 que não utilizam insulina e não são aderentes.

A tabela 9 apresenta as medidas descritivas das variáveis quantitativas segundo os quatro grupos.

**Tabela 9: Medidas descritivas dos novos grupos, segundo a adesão.**

| Variável               | Grupo                     |         |               |                               |         |               |                           |         |               |                               |         |               |
|------------------------|---------------------------|---------|---------------|-------------------------------|---------|---------------|---------------------------|---------|---------------|-------------------------------|---------|---------------|
|                        | DM2 sem insulina aderente |         |               | DM2 sem insulina não aderente |         |               | DM2 com insulina aderente |         |               | DM2 com insulina não aderente |         |               |
|                        | N                         | Média   | Desvio-padrão | N                             | Média   | Desvio-padrão | N                         | Média   | Desvio-padrão | N                             | Média   | Desvio-padrão |
| <b>GJ</b>              | 20                        | 123,665 | 28,048        | 20                            | 150,735 | 47,618        | 23                        | 152,935 | 59,829        | 17                            | 239,859 | 123,550       |
| <b>HBA1C</b>           | 20                        | 6,215   | 0,796         | 20                            | 7,175   | 1,406         | 23                        | 8,235   | 1,513         | 17                            | 10,841  | 3,015         |
| <b>CT</b>              | 20                        | 185,400 | 44,281        | 20                            | 197,350 | 35,575        | 23                        | 206,174 | 55,072        | 17                            | 202,118 | 49,380        |
| <b>HDL</b>             | 20                        | 41,300  | 8,578         | 20                            | 42,600  | 8,375         | 23                        | 44,913  | 8,135         | 17                            | 42,353  | 9,473         |
| <b>LDL</b>             | 20                        | 115,671 | 40,072        | 20                            | 123,150 | 29,865        | 23                        | 123,666 | 41,099        | 17                            | 122,489 | 30,414        |
| <b>VLDL</b>            | 20                        | 27,528  | 9,344         | 20                            | 31,600  | 14,905        | 23                        | 27,927  | 12,972        | 17                            | 29,666  | 14,345        |
| <b>TGD</b>             | 20                        | 160,800 | 92,263        | 20                            | 160,650 | 74,506        | 23                        | 174,826 | 131,530       | 17                            | 183,412 | 117,139       |
| <b>PCRus</b>           | 20                        | 0,575   | 0,579         | 20                            | 0,833   | 0,829         | 23                        | 0,470   | 0,482         | 17                            | 0,668   | 1,264         |
| <b>NO</b>              | 20                        | 8,522   | 4,002         | 20                            | 6,319   | 2,906         | 23                        | 5,363   | 3,751         | 17                            | 4,802   | 3,153         |
| <b>SOD (atividade)</b> | 20                        | 43,035  | 10,364        | 20                            | 39,480  | 8,097         | 23                        | 32,600  | 13,141        | 17                            | 33,740  | 13,848        |
| <b>MDA</b>             | 20                        | 3,271   | 1,741         | 20                            | 3,337   | 1,777         | 23                        | 3,251   | 0,981         | 17                            | 3,674   | 1,760         |
| <b>TNF</b>             | 20                        | 116,625 | 165,271       | 20                            | 78,125  | 30,332        | 23                        | 144,886 | 128,815       | 17                            | 117,654 | 75,963        |
| <b>Fibrinogênio</b>    | 20                        | 282,500 | 84,929        | 20                            | 292,250 | 57,023        | 23                        | 341,130 | 83,239        | 17                            | 348,412 | 65,347        |

A tabela 10 apresenta os resultados da análise de variância e o post hoc de Tukey para as variáveis quantitativas paramétricas, e teste Kruskal-Wallis e o post hoc de Dunn-Bonferroni para as variáveis quantitativas não paramétricas, segundo os novos grupos.

As variáveis CT, HDL, LDL, VLDL, TGD, PCRus, SOD, MDA e TNF-A não apresentaram diferença entre as médias dos grupos. Para a variável NO há

diferença entre as médias dos grupos DM2 com insulina aderente e DM2 sem insulina aderente e para o fibrinogênio existe diferença entre os grupos DM2 com insulina não aderente e DM2 sem insulina aderente. Para as outras combinações dos grupos não há diferença. No caso da variável GJ, a diferença encontrada vem da comparação dos grupos DM2 com insulina não aderente e DM2 sem insulina aderente. Já para a variável HBA1C, a diferença encontrada vem da comparação dos grupos DM2 com insulina aderente e DM2 sem insulina aderente, dos grupos DM2 com insulina não aderente e DM2 sem insulina aderente e dos grupos DM2 com insulina não aderente e DM2 sem insulina não aderente.

**Tabela 10: Análise estatística dos novos grupos, segundo adesão.**

| Variável     | Valor-p      | Grupo  | Teste post hoc (valor-p) | Valores           |
|--------------|--------------|--|--------------------------|-------------------|
| NO           | 0,008* (a)   | DM2 com insulina aderente x DM2 com insulina não aderente            | 0,959                    | 5,363 x 8,522     |
|              |              | <u>DM2 com insulina aderente x DM2 sem insulina aderente</u>         | 0,022*                   |                   |
|              |              | DM2 com insulina aderente x DM2 sem insulina não aderente            | 0,809                    | 4,802 x 8,522     |
|              |              | <u>DM2 com insulina não aderente x DM2 sem insulina aderente</u>     | 0,010*                   |                   |
|              |              | DM2 com insulina não aderente x DM2 sem insulina não aderente        | 0,558                    |                   |
|              |              | DM2 sem insulina aderente x DM2 sem insulina não aderente            | 0,202                    |                   |
| Fibrinogênio | 0,011* (a)   | DM2 com insulina aderente x DM2 com insulina não aderente            | 0,990                    | 348,412 x 282,500 |
|              |              | DM2 com insulina aderente x DM2 sem insulina aderente                | 0,056                    |                   |
|              |              | DM2 com insulina aderente x DM2 sem insulina não aderente            | 0,146                    |                   |
|              |              | <u>DM2 com insulina não aderente x DM2 sem insulina aderente</u>     | 0,043*                   |                   |
|              |              | DM2 com insulina não aderente x DM2 sem insulina não aderente        | 0,109                    |                   |
|              |              | DM2 sem insulina aderente x DM2 sem insulina não aderente            | 0,976                    |                   |
| GJ           | 0,002* (b)   | DM2 com insulina aderente x DM2 com insulina não aderente            | 0,153                    | 239,859 x 123,665 |
|              |              | DM2 com insulina aderente x DM2 sem insulina aderente                | 0,401                    |                   |
|              |              | DM2 com insulina aderente x DM2 sem insulina não aderente            | 1,000                    |                   |
|              |              | <u>DM2 com insulina não aderente x DM2 sem insulina aderente</u>     | 0,001*                   |                   |
|              |              | DM2 com insulina não aderente x DM2 sem insulina não aderente        | 0,156                    |                   |
|              |              | DM2 sem insulina aderente x DM2 sem insulina não aderente            | 0,526                    |                   |
| HBA1C        | < 0,001* (b) | DM2 com insulina aderente x DM2 com insulina não aderente            | 0,380                    | 8,235, x 6,215    |
|              |              | <u>DM2 com insulina aderente x DM2 sem insulina aderente</u>         | <0,001*                  |                   |
|              |              | DM2 com insulina aderente x DM2 sem insulina não aderente            | 0,326                    | 10,841 x 6,215    |
|              |              | <u>DM2 com insulina não aderente x DM2 sem insulina aderente</u>     | <0,001*                  |                   |
|              |              | <u>DM2 com insulina não aderente x DM2 sem insulina não aderente</u> | 0,002*                   |                   |
|              |              | DM2 sem insulina aderente x DM2 sem insulina não aderente            | 0,268                    | 10,841 x 7,175    |

\* Indica diferença estatística para  $p < 0,05$  (a) Anova 1 via e post hoc de Tukey, (b) Kruskal-Wallis e post hoc de Dunn.

## 6.DISCUSSÃO

Neste estudo foram observadas características clínicas, antropométricas, bioquímicas, de estresse oxidativo e inflamatórias em pacientes com DM2 em uso ou não de insulinoterapia, em comparação com o grupo controle sem diagnóstico de DM2, sendo 40 pacientes em cada grupo, totalizando 120.

Considerando tempo de diagnóstico da DM2 observou-se que 20 pacientes do grupo DM2 sem insulinoterapia possuíam diagnóstico a mais de 5 anos, e 20 pacientes possuíam diagnóstico a menos de 5 anos, enquanto no grupo DM2 com insulinoterapia 15 pacientes possuíam diagnóstico a mais de 5 anos, e 25 pacientes a menos de 5 anos. Destes 25, 23 relataram o uso de insulina a menos de 5 anos também, levando a conclusão que esses pacientes evoluíram rapidamente para insulinização, podendo ter apresentado o diagnóstico em estágios já avançados da doença.

Gomes e colaboradores (2006) mostraram que os pacientes com DM2 possuem maiores níveis de IMC em relação ao controle, apresentando sobrepeso ou obesidade, que exercem uma influência considerável na associação com a doença cardiovascular. No estudo atual o grupo DM2 com insulinoterapia apresentou IMC igual a 28,03 enquanto o grupo DM2 sem insulinoterapia apresentou IMC de 32,10.

De acordo com as diretrizes da SBD (2016) a maior parte dos pacientes com DM2 apresenta sobrepeso (IMC: 25 a 29,9 kg/m<sup>2</sup>) ou obesidade (IMC ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>), sendo estes fatores contribuintes para a diminuição da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos ao longo do tempo.

O excesso de tecido adiposo tem sido associado a níveis aumentados de citocinas inflamatórias tais como IL-6 e TNF- $\alpha$  e o estudo de El-Kader e Al-Dahr (2016) demonstrou que 12 semanas de exercícios aeróbicos e dieta levou a uma modulação das citocinas inflamatórias e marcadores do estresse oxidativo através da redução dos níveis de IL-6, TNF- $\alpha$ , PCRus e MDA, e aumento das enzimas antioxidantes em pacientes obesos com DM2.

Além disso, a obesidade e aumento da adiposidade visceral são fatores importantes na patogênese da coexistência de DM e hipertensão (LASTRA et al., 2014). Foi observado no estudo que do total de 120 pacientes, 75 (62,5%) eram hipertensos, sendo 67,5% dos pacientes do grupo DM2 sem insulino terapia, 85% dos pacientes do grupo DM2 com insulino terapia e 35% dos pacientes do grupo controle diagnosticados com hipertensão. De acordo com os medicamentos usados pelos pacientes, depois dos prescritos para diabetes foi relatado a maior porcentagem entre os medicamentos anti-hipertensivos (Enalapril, Losartan, Atenolol e Hidroclorotiazida). A hipertensão contribui para aumentar o risco de doença cardiovascular, que é uma das principais causas de mortalidade nos pacientes diabéticos, além de aumentar o risco para o desenvolvimento de DM2, no caso dos pacientes controles (SOWERS et al., 2001).

A diabetes é uma doença complexa, que exige constante atenção à dieta, exercício, monitoramento da glicose, e medicação (insulina ou agentes hipoglicemiantes orais), a fim de obter um controle metabólico adequado e evitar complicações em longo prazo. Vários fatores influenciam na adesão ao tratamento como qualidade de vida, efeitos secundários dos medicamentos, problemas do sistema de saúde e falta de conhecimento sobre a doença (WHO, 2003; MORISKY et al., 2008).

Através do questionário de Morisky-Green adaptado para o português, que é uma medida indireta feita com informações fornecidas pelo próprio paciente (BLOCH et al., 2008), foi realizada a avaliação da adesão ao tratamento dos grupos estudados. Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa entre os grupos, 50% do grupo DM2 sem insulino terapia e 42,5% do grupo DM2 com insulino terapia foram classificados como não aderentes, sendo observado no momento da aplicação do questionário que muitos pacientes não faziam uso da terapia de forma adequada, pois muitos relataram se esquecer de fazer uso das medicações, ressaltando a falta de informação dos pacientes sobre a doença.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2003), quanto maior a complexidade do tratamento, menor a probabilidade do paciente o seguir, sendo a maior adesão aos agentes hipoglicemiantes orais associada à menor frequência de administração, ou seja, pacientes que tomam doses menos frequentes (uma vez por dia por exemplo). Como muitos pacientes relataram uso de medicamentos para outras condições como hipertensão e dislipidemia, isso pode ter influência na adesão. Além disso, a duração da doença possui uma relação negativa com a adesão, sendo que quanto maior o tempo que um indivíduo tem diabetes, menor é a probabilidade de ser aderente ao tratamento.

Por isso, torna-se importante ações de educação em saúde para pacientes com diabetes, estimulando o conhecimento sobre a doença e a importância do autocuidado, que como consequência terá a prevenção de complicações, melhora da qualidade de vida e aumento da longevidade. Para garantir resultados é fundamental que haja um trabalho em equipe, atuando de maneira ativa no tratamento da diabetes (SBD, 2016). O farmacêutico tem um papel muito importante na equipe, pois pode atuar especificamente na adesão ao tratamento, fazendo com que o paciente entenda a importância do uso correto da medicação.

Além disso, é importante ressaltar que a população deste estudo é de baixa escolaridade e reside em áreas do município de Vitória com condições precárias de saneamento básico, bem-estar e lazer, o que também provavelmente influenciou na baixa adesão a terapia medicamentosa.

Em relação à caracterização bioquímica o estudo demonstrou que os pacientes com DM2 de ambos os grupos tinham níveis elevados de glicemia em jejum, HbA1c e níveis reduzidos de HDLc em relação aos pacientes do grupo controle. Os testes de glicemia de jejum (nível glicêmico instantâneo) e HbA1c (reflete os níveis de glicose no sangue ao longo de várias semanas) revelam se está havendo um controle adequado da glicemia. É importante realizar tanto o teste da glicemia de jejum quanto de HbA1c nos pacientes diabéticos, pois apesar da vantagem da HbA1c refletir níveis pregressos de glicemia, suas

concentrações podem ser afetadas por fatores hematológicos e nutricionais como anemia e deficiência de ferro (ATTARD et al., 2015).

Na glicemia de jejum foi observada diferença entre os grupos DM2 em relação ao controle. Para um paciente sem diabetes o recomendado pela SBD (2016) é um nível de glicemia de jejum de até 99 mg/dL, entretanto, para um paciente com DM2 recomenda-se que os níveis de glicemia de jejum sejam de até 130 mg/dL. Neste estudo, o grupo controle e o grupo DM2 sem insulino terapia apresentaram resultados na faixa de referência, e o grupo DM2 com insulino terapia obteve níveis acima do recomendado. Entretanto, a categorização dos participantes do estudo, de acordo com os valores recomendados, mostrou que 37,5% dos pacientes com DM2 sem insulino terapia e 62,5% dos pacientes DM2 com insulino terapia apresentaram níveis alterados da glicemia de jejum.

Em relação a HbA1c, houve diferença neste estudo entre todos os grupos. Para a HbA1c recomenda-se que os pacientes com DM2 devem apresentar níveis inferiores a 7% (SBD, 2016). O grupo DM2 sem insulino terapia obteve uma mediana de 6,3%, apresentando assim um bom controle glicêmico, enquanto o grupo DM2 com insulino terapia obteve níveis de HbA1c acima do recomendado (8,65%), indicando um mau controle. O grupo controle apresentou níveis de HbA1c de 5,5%, inferior ao limite de referência (<5,7%). Após categorizar os pacientes de acordo com os valores recomendados para HbA1c, observou-se que 27,5% do grupo DM2 sem insulino terapia e 75% do grupo DM2 com insulino terapia, apresentaram HbA1c superior ao recomendado (7%).

Portanto, neste estudo, para o grupo DM2 com insulino terapia os resultados referentes ao controle glicêmico (glicemia de jejum e HbA1c) indicaram um mal controle, uma vez que todos os pacientes do grupo faziam uso de insulina e ainda 24 pacientes (60%) também faziam uso de metformina, assim, o resultado esperado seria uma glicemia controlada. No entanto, esse mau controle glicêmico por ser explicado pelo alto índice de não adesão à terapia medicamentosa. No entanto, para o grupo DM2 sem insulino terapia, apesar de

apresentar muitos pacientes não aderentes também, esses pacientes ainda não chegaram a um quadro de declínio completo das células  $\beta$ , conseguindo manter um melhor controle glicêmico, em comparação aos pacientes com falência completa das células  $\beta$  e uma maior evolução na RI.

Estudos relatam que níveis elevados de HbA1c é um fator de risco para doença cardiovascular e implica no aumento do risco de mortalidade em pacientes com doença arterial coronária. Além disso, a HbA1c está associada a um risco de desenvolver DM2 em pacientes não-diabéticos (SELVIN et al., 2010; KARAKOYUN et al., 2016). Dados mostram que o controle da HbA1c não é atingido por cerca de 73% dos pacientes com diabetes (MENDES et al., 2010). O estudo observacional UKPDS (STRATTON et al., 2000) mostrou que a cada 1% de redução na HbA1c, ocorre uma diminuição de 37% no risco de complicações microvasculares e 21% no risco morte relacionada com a diabetes.

Neste estudo também foi observada diferença estatística na dosagem de HDL, mostrando que estava abaixo do nível desejável em todos os grupos, apresentado diferença entre os grupos DM2 (sem e com insulino terapia) em relação ao controle. De acordo com Bartnik e Cosentino (2009), a RI promove mobilização de ácidos graxos livres do tecido adiposo que reduz o HDL e aumenta o LDL. Ressalta-se que de nesse estudo não houve diferença significativa entre os grupos na dosagem de LDL. O HDL é considerado protetor devido à suas ações anti-inflamatórias e antitrombóticas, utilizado na predição de eventos cardiovasculares (SIQUEIRA et al., 2007).

Na DM2 a hiperglicemia, hiperinsulinemia e deficiência de insulina levam a geração de espécies reativas, aumentando o estresse oxidativo em vários tecidos. Na ausência de uma resposta compensatória apropriada a partir da rede antioxidante endógena, ocorre ativação de vias de sinalização intracelulares sensíveis ao estresse, tendo a produção de produtos de genes das enzimas que produzem EROs que provocam danos celulares e levam as complicações da diabetes (EVANS et al., 2002).

As ERO e ERN são de curta duração e são difíceis de medir, por isso a maioria dos meios para avaliação da sua geração são indiretos. A função fisiológica das ERO e ERN é possível, desde que a homeostase seja mantida, porém na fisiopatologia ocorre perturbação desse sistema, podendo-se medir quantitativamente esse desequilíbrio (BASHAN et al., 2009).

Em uma célula normal, existe um equilíbrio pró-oxidante-antioxidante adequado. No entanto, no estresse oxidativo este equilíbrio pode ser deslocado para os pró-oxidantes, quando a produção de ERO é aumentada significativamente ou quando os níveis de antioxidantes são diminuídos. No organismo, o principal antioxidante preventivo é a SOD, que atua sobre o ânion superóxido, estando envolvida na defesa intracelular (SOMOGYI et al., 2007).

Na diabetes, a atividade e a expressão da SOD se encontram diminuídas (ADACHI et al., 2004), corroborando com o nosso estudo onde foi encontrado uma diminuição na quantidade da enzima no grupo DM2 com insulinoterapia em relação ao DM2 sem insulinoterapia, embora os grupos não tenham apresentado diferença em relação ao controle.

O estudo de Sindhu (2004) mostrou que através de um tratamento de 4 semanas com estreptozotocina em ratos (agente quimioterápico usado no tratamento de tumores do pâncreas, atua inibindo a síntese de DNA, bloqueando de forma irreversível a produção de insulina, induzindo a DM em animais), houve diminuição da expressão das enzimas antioxidantes, incluindo a SOD. Além disso, o mesmo estudo mostra que a terapia com insulina reverteu esse quadro normalizando a expressão dessas enzimas. Portanto, era esperado, neste trabalho, que o grupo DM2 com usuários de insulinoterapia apresentasse níveis de SOD semelhantes aos do controle. No entanto, vale ressaltar que a baixa adesão ao uso de insulina pode ter interferido neste resultado, não possibilitando reverter o desequilíbrio antioxidante. O grupo DM2 sem insulinoterapia apresentou níveis mais elevados que os usuários de insulina. Dal e colaboradores (2015) relatam resultados discrepantes em modelo animal, uma vez que a hiperglicemia pode aumentar, inibir, ou manter o



nível de expressão de enzimas antioxidantes podendo ser compensatória em resposta ao estresse oxidativo.

Na DM2, a lesão peroxidativa também pode estar envolvida no desenvolvimento de complicações diabéticas. O aumento na peroxidação de lipídios é uma indicação de declínio nos mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (TIWARI et al., 2013).

No estudo foi encontrado níveis maiores de MDA em ambos os grupos de pacientes com DM2 em relação ao controle. Outros estudos também reportaram níveis elevados de MDA em relação ao controle, sendo inclusive maiores entre pacientes com DM2 que sofreram infarto do miocárdio, e nos pacientes com controle glicêmico ruim em relação aos pacientes com um bom controle glicêmico (MAHREEN et al., 2010; NOBERASCO et al., 1991). Bandeira e colaboradores (2012) relataram maior peroxidação lipídica em pacientes diabéticos, tendo uma relação estreita com altos níveis de glicemia de jejum e HbA1c. Porém, quando a diabetes está associada à dislipidemia, mesmo em pacientes bem controlados, ocorre um aumento da peroxidação lipídica. A dislipidemia juntamente com o aumento da peroxidação lipídica estão correlacionados à níveis mais elevados de inflamação sistêmica (BASTOS et al., 2016).

No estresse oxidativo a produção de espécies reativas excede a capacidade dos sistemas de defesa antioxidantes disponíveis, afetando a biodisponibilidade do NO, que tem como ações controlar o tônus vascular, inibir a função de plaquetas, impedir a adesão de leucócitos e reduzir a proliferação da íntima, possuindo assim um mecanismo anti-aterosclerótico (PITOCCO et al., 2010).

Neste estudo, níveis de NO diminuídos foram encontrados nos pacientes do grupo DM2 com insulinoterapia. Houve diferença entre o grupo DM2 sem insulinoterapia em relação ao DM2 com insulinoterapia, e entre o grupo DM2 com insulinoterapia em relação ao controle. A hiperglicemia, diabetes e obesidade conduzem a uma diminuição da produção da atividade NO (AVOGARO et al., 2006). A redução na síntese do NO contribui para

consequências clínicas como hipertrofia vascular, aumento da adesão plaquetária no endotélio, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e aterosclerose (OUVIÑA et al., 2001).

O estresse oxidativo leva a um desequilíbrio na homeostase vascular devido ao aumento da vasoconstrição e vasorelaxamento prejudicado que promove o desacoplamento de eNOS além da redução de sua biodisponibilidade, promovendo a disfunção endotelial no diabetes (SENA; PEREIRA; SEIÇA, 2013). De acordo com Avogaro e colaboradores (2003), pacientes com diabetes tipo 2 não complicados têm uma via alterada de conversão de arginina a NO basal. A fração de arginina convertida a NO é menor em pacientes diabéticos do que em indivíduos normais. Sendo assim, células endoteliais na diabetes não conseguem produzir uma quantidade suficiente de NO e falham em relaxar em resposta a vasorelaxantes dependentes do endotélio (por exemplo, acetilcolina e bradicinina) (PITOCCO et al., 2010).

Diante dos estudos citados acima (AVOGARO et al., 2003; PITOCCO et al., 2010; SENA; PEREIRA; SEIÇA, 2013), esperava-se que ambos os grupos com DM2 apresentassem níveis diminuídos de NO, no entanto, os estudos citados não possuem informações a respeito do uso de insulino terapia, dificultando comparações. Em situações normais, a insulina estimula a produção de NO nas células endoteliais ativando a NO sintase, porém na RI a via em que ocorre a ativação é prejudicada e a produção de NO é diminuída, levando a disfunção endotelial (SENA; PEREIRA; SEIÇA, 2013). Devido a ausência de produção de insulina, e a não adesão ao tratamento, o grupo DM2 com insulino terapia pode ter apresentado os menores níveis de NO em comparação com os outros grupos.

Nos pacientes com DM2 foram observados níveis menores de SOD (pacientes com insulino terapia), maior peroxidação lipídica (pacientes com e sem insulino terapia) e menores níveis de NO (pacientes com insulino terapia) indicando um aumento do estresse oxidativo, em comparação com os indivíduos sem diagnóstico de DM2.

A disfunção endotelial, hipercoagulabilidade, estresse oxidativo e inflamação estão relacionadas com o desenvolvimento de complicações vasculares em diabetes (DOMINGUETI et al., 2016). O estresse oxidativo leva a geração de mediadores inflamatórios incluindo moléculas de adesão e interleucinas, que também vão induzir o estresse oxidativo, formando um ciclo (TANGVARASITTICHAJ, 2015). A inflamação subclínica é uma característica da DM2 em que é observada níveis elevados de proteínas de fase aguda, TNF- $\alpha$  e citocinas (SAAD et al., 2015), e inclusive os indivíduos que evoluem para DM2 exibem um baixo grau de inflamação antes do aparecimento da doença (TANGVARASITTICHAJ et al., 2016).

Níveis de PCRus foram analisados nos participantes deste estudo, sendo observados os maiores níveis para indivíduos do grupo DM2 sem insulinoterapia, havendo apenas diferença entre o grupo DM2 sem insulinoterapia em relação ao grupo controle.

Estudos mostram que pacientes com DM2 apresentam maior nível de PCRus (DEVARAJ et al., 2004; TANGVARASITTICHAJ et al., 2016). No presente estudo, o achado de maiores níveis de PCRus nos pacientes com DM2 sem insulinoterapia pode estar associado ao fato desse grupo possuir maiores índices de IMC ( $32,10 \text{ kg/m}^2$ ). Os níveis de PCRus são diretamente proporcionais ao índice de massa corporal (IMC), decaindo com a perda de peso, além de estar diretamente associados com os níveis de triglicédeos, colesterol total, pressão sanguínea e inversamente relacionados ao HDL, que se encontram diminuídos no grupo DM2 sem insulinoterapia (FESTA et al., 2002; LEITE et al., 2009).

Em outro estudo, pacientes com diabetes considerados bem controlados, porém com dislipidemia, também apresentaram níveis mais altos de PCRus, que foi associado a medidas significativamente maiores de circunferência abdominal (BASTOS et al., 2016). Estima-se que o tecido adiposo é responsável por 25% da produção de IL-6, que atua como estímulo para a produção hepática de PCRus (SIQUEIRA et al., 2007).

Além de ser um marcador de risco cardiovascular, a PCR promove aterogênese, induzindo a produção de citocinas inflamatórias em monócitos e promovendo a quimiotaxia de monócitos e a expressão do fator tecidual. Em células endoteliais, a PCR aumenta a expressão de moléculas de adesão celular, quimiocinas e endotelina-1, diminui a expressão de eNOS, e aumenta a adesão celular de monócitos-endoteliais (DEVARAJ et al., 2004; VERMA et al., 2004). Ainda, a PCR se liga a LDL e VLDL, induzindo assim a sua agregação (FESTA et al., 2002).

No entanto, deve-se ressaltar que o desenvolvimento de doença cardiovascular em populações com concentrações aumentadas de PCRus demonstram que este marcador está mais associado quando seus valores estão acima de 3 mg/dL. Valores abaixo de 1mg/dL, como é o caso da mediana dos três grupos analisados neste estudo possuem baixo risco de DCV (PFUTZNER, FORST, 2006). Porém, ao analisar os valores de PCRus individualmente, 50% dos pacientes DM2 sem uso de insulina e em 30% dos pacientes DM2 em insulinoterapia possuíam valores considerados alterados, e somente um paciente de cada grupo possuía valor associado a risco cardiovascular.

Em relação ao fibrinogênio foram observados os maiores níveis no grupo DM2 com insulinoterapia, seguido do grupo DM2 sem insulinoterapia e menores níveis no grupo controle. Foram encontradas diferenças entre o grupo DM2 com insulinoterapia em relação ao sem insulinoterapia, bem como entre o grupo com insulinoterapia em relação ao controle. No entanto, o valor plasmático médio do fibrinogênio encontrou-se dentro da normalidade em todos os grupos. De acordo com a análise individual, somente 10% dos pacientes DM2 sem uso de insulina apresentaram valores alterados enquanto 32,5% dos pacientes DM2 em insulinoterapia apresentaram valores acima do recomendado.

O tratamento com insulina não altera os níveis de fibrinogênio, entretanto, a terapia com metformina pode resultar em redução dos níveis de fibrinogênio nos pacientes com DM2 (GRANT, 2007). Assim, como 97,5% dos pacientes do grupo DM2 sem insulinoterapia utilizam metformina, em comparação com 60%

do grupo DM2 com insulinoterapia, isso pode ter contribuído para redução do nível médio de fibrinogênio no grupo DM2 sem insulinoterapia.

Observa-se maior concentração de fibrinogênio em pacientes com DM2, aumentando a suscetibilidade à trombose. O fibrinogênio pode promover a aterosclerose e trombose devido à hiperfibrinogenemia que aumenta a viscosidade do plasma, induz a agregação de glóbulos vermelhos, provoca a agregação de plaquetas, forma fibrina e produtos de degradação do fibrinogênio, estimula a proliferação e migração de células lisas. Todos estes fatores resultam em aumento de risco de infarto do miocárdio em pacientes com diabetes (BEMBDE, 2012; LEPEDDA et al., 2016).

Dentre as citocinas inflamatórias correlacionadas com a DM2, destaca-se a IL-1  $\beta$ , e TNF- $\alpha$ , que influenciam de forma crucial para o desenvolvimento da resistência à insulina (BENETTI et al., 2013). A dosagem da IL-1  $\beta$  foi realizada, porém, não foi possível quantificá-los, pois os níveis foram indetectáveis.

A ativação do inflamassoma NLRP3 facilita o recrutamento e ativação de procaspase-1, levando a clivagem desta em caspase-1, que não desempenha um papel importante na apoptose, mas cliva a proforma da IL-1 $\beta$ . Na patogênese da DM2 a IL-1 $\beta$  induz várias citocinas e quimiocinas, incluindo IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP1) que conduzem à atração de macrófagos e outras células imunes, que em última instância leva a disfunção da célula  $\beta$  (BENETTI et al., 2013; DONATH, 2014). Portanto, níveis plasmáticos elevados de IL-1  $\beta$  são preditivos da DM2, e uma possibilidade é que seus níveis se encontrem elevados no início da DM2, mas que se reduzam com a progressão da doença, justificando a baixa detecção no presente estudo.

Alguns medicamentos que são utilizados para tratar a DM2 têm efeitos antiinflamatórios além dos seus efeitos metabólicos definidos. Por exemplo, a glibenclamida é um potente inibidor da ativação de IL-1 $\beta$  nas ilhotas pancreáticas. A metformina inibe a liberação induzida por IL-1 $\beta$  de citocinas pró-inflamatórias através da inibição de NF- $\kappa$ B nos macrófagos e nas células.

Sendo assim, essas propriedades anti-inflamatórias também podem ter contribuído para baixa concentração plasmática de IL-1 $\beta$  observada nos pacientes (DONATH, 2014).

Os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  foram significativamente maiores para os grupos DM2 com insulino-terapia e sem insulino-terapia, ambos em comparação ao grupo controle. Segundo a literatura, pacientes com DM2 apresentam maior nível de TNF $\alpha$  (CIESLAK et al., 2015; DOMINGUETI et al., 2016). Sugere-se que o aumento de TNF- $\alpha$  seja uma característica da DM2 de forma independente do tratamento, ocorrendo tanto em pacientes que utilizam ou não insulina.

O mecanismo de ação de TNF- $\alpha$  na apoptose das células  $\beta$  não é inteiramente reconhecido, mas é realizado por uma ação sinérgica de TNF- $\alpha$  e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) por ativação de canais de cálcio, o que leva a uma disfunção das mitocôndrias e ativação de caspases (CIESLAK et al., 2015). Além disso, TNF- $\alpha$  também provoca efeitos negativos diretos sobre as vias de sinalização da insulina através da fosforilação de resíduos de serina do substrato do receptor de insulina (IRS-1), que inibe a autofosforilação do receptor de insulina, e têm ações pró-ateroscleróticas, como a promoção de recrutamento de leucócitos ao endotélio através da indução de moléculas de adesão e a síntese de quimioatraentes aumentando a permeabilidade capilar (PICKUP et al., 2004; ANDREELLI et al., 2006).

Um estudo mostrou que a expressão de SOD extracelular, encontrada em grande quantidade na parede arterial, é diminuída por TNF- $\alpha$ , indicando que alterações na SOD podem ocorrer em doenças vasculares, alterando a susceptibilidade da parede vascular a efeitos adversos do ânion superóxido (STRALIN e MARKLUND, 2000). Portanto, neste estudo os níveis altos de TNF- $\alpha$  podem ter influenciado também na diminuição dos níveis de SOD. Observa-se que o grupo com maior mediana de TNF- $\alpha$ , grupo DM2 com insulino-terapia, foi o que apresentou também a menor mediana de SOD.

Resumindo, neste estudo, nos pacientes com DM2 foram encontrados níveis maiores de PCRus (grupo DM2 sem insulino-terapia), fibrinogênio e TNF- $\alpha$

(grupo DM2 com e sem insulino-terapia), indicando a presença de maior estado inflamatório quando comparados aos indivíduos controles, indicando influência da doença nestes resultados.

Todos os pacientes foram submetidos à pesquisa do polimorfismo de substituição -308G/A no gene do TNF- $\alpha$ . Porém, não foram encontradas diferenças na distribuição genotípica e alélica entre o grupo DM2 em relação ao controle. Corroborando com o achado nesta análise, Sefri e colaboradores (2014) em sua meta-análise com 21 estudos caso-controle publicados até 2013, não encontraram associações significativas entre o polimorfismo 308G/A de TNF- $\alpha$  e o risco de desenvolver DM2.

Apesar de inúmeros estudos sobre o papel do TNF- $\alpha$  na patogênese do DM2, os achados deste estudo não puderam confirmar esta hipótese. Em outros estudos com números maiores de pacientes foram encontradas associações significativas entre o polimorfismo TNF- $\alpha$  -308G/A e o risco de DM2 (LUNA; SILVA; SANCHES, 2016), no entanto, o tamanho da amostra analisada neste trabalho (112 pacientes) foi pequeno quando comparado a estudos genéticos de populações, configurando uma limitação do estudo.

Embora estudos tenham sido realizados para avaliar a influência dos polimorfismos da região do TNF- $\alpha$  sobre sua expressão, a literatura tem apresentado muitos resultados contraditórios quando se correlaciona o efeito do polimorfismo sobre a DM2, que pode ocorrer devido a evidências documentadas em vários grupos étnicos.

Também não houve diferença quando analisados os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  dos indivíduos nos grupos controle e DM2 estratificados por genótipo dentro do mesmo grupo. Somente houve diferença quando comparados os níveis de TNF- $\alpha$  em relação aos diferentes grupos, demonstrando que o grupo DM2 possui níveis maiores de TNF $\alpha$  para os genótipos GG e GA. No entanto, como a DM2 se trata de uma doença influenciada por vários genes, os genes envolvidos no desenvolvimento do fenótipo exercem apenas um efeito parcial, não sendo o efeito de um único gene suficiente para causar DM2 (GUZMÁN-FLORES et al., 2011). No presente estudo sugere-se que a presença da DM2

influenciou de forma mais significativa os níveis de TNF- $\alpha$  do que o polimorfismo TNF-  $\alpha$  -308G/A.

Em relação às análises realizadas quando os pacientes foram classificados a partir da adesão, houve diferença somente nas variáveis NO, fibrinogênio, glicemia de jejum e HbA1c, possivelmente devido ao número de pacientes ser pequeno por grupo. Em relação ao NO, foi demonstrado que independente do paciente ser classificado como aderente ou não aderente, os níveis de NO são menores do que no grupo DM2 sem insulina aderente. O mesmo aconteceu com o fibrinogênio, onde foi observado que houve maiores níveis entre grupo DM2 com insulina aderente, em relação aos grupos DM2 sem insulina aderente.

Na glicemia de jejum o grupo DM2 com insulina aderente exibiu maiores níveis da variável quando comparados com o grupo DM2 sem insulina aderente. Já para a HbA1c, o grupo DM2 com insulina aderente obteve níveis maiores do que o grupo DM2 sem insulina aderente. Observaram-se níveis ainda maiores quando comparados os grupos DM2 com insulina não aderente e DM2 sem insulina aderente. Além disso, em relação aos grupos DM2 com insulina não aderente e DM2 sem insulina não aderente, os pacientes usuários de insulina apresentaram níveis maiores de HbA1c.

A partir dessa análise observa-se que os pacientes que usavam insulina e pacientes que não eram aderentes possuíam valores aumentados de NO, fibrinogênio, glicemia de jejum e HbA1c, indicando que alguns pacientes foram classificados erroneamente como aderentes devido a limitações do questionário de Morisky Green. Por isso, além de realizar intervenções que foquem na educação em diabetes e que se concentrem em pacientes individuais, devem ainda ser usadas outras abordagens para promover a melhoria da auto-gestão da diabetes, incluindo intervenções que visam os prestadores de saúde e intervenções a nível da comunidade ou sistemas, com objetivos de aumentar a adesão dos pacientes a terapia medicamentosa, garantindo um melhor controle da DM2 e menor risco de complicações futuras (WHO, 2003).



Contrariamente aos efeitos da glicose, que exacerba a inflamação, estudos indicam que a insulina possui efeitos antiinflamatórios, não só através da prevenção de hiperglicemia, mas também modulando moléculas inflamatórias. A terapia (intensiva) de insulina demonstrou diminuição nos níveis de estresse oxidativo, citocinas pró-inflamatórias sistêmicas e proteínas de fase aguda (MONNIER et al., 2010; HASEGAWA et al., 2011; DANDONA et al., 2007), e também possui ações vasodilatadoras, efeitos anti-trombóticos e, portanto, pode-se sugerir que a insulina tem propriedades anti-ateroscleróticas (KAPLAN et al., 2012).

A partir dos dados obtidos no estudo não foram observados os efeitos antiinflamatórios e antioxidantes relacionados à insulina, como relatado por Dandona (2007) e Monnier (2010), respectivamente. Entretanto, vale ressaltar que neste estudo, 42,5% dos pacientes do grupo DM2 em insulino terapia foram classificados como não aderentes à terapia medicamentosa.

Diante dos resultados apresentados e dados da literatura, pode-se sugerir que os pacientes com DM2, principalmente os pacientes em insulino terapia, possuem um estado inflamatório exacerbado além de um aumento no estresse oxidativo, estando mais favoráveis ao desenvolvimento de complicações diabéticas, embora haja uma limitação no número de amostras por grupo. Os mecanismos complexos que envolvem o estresse oxidativo, a inflamação e a hiperglicemia destacam a importância de estudos que investiguem a contribuição e interação desses fatores nos pacientes com DM2 com e sem insulino terapia, na intenção de contribuir para um melhor manejo da doença, tratamentos adequados e prevenção de maiores complicações.

## 7. CONCLUSÃO

Em conclusão, os pacientes com DM2, usuários e não de insulino-terapia, possuem aumento do estresse oxidativo e da inflamação, que podem, conseqüentemente, contribuir nas diversas complicações da doença. Sugere-se que a baixa adesão ao tratamento, especialmente no grupo de usuários de insulino-terapia, não permitiu evidenciar os possíveis benefícios desta terapia. Portanto, a falta de adesão ao tratamento medicamentoso prejudica o controle glicêmico, levando ao aumento do estresse oxidativo e da inflamação, que podem, conseqüentemente, contribuir nas diversas complicações da DM2.

## 8. REFERÊNCIAS

ADACHI, T. et al. Relationship of plasma extracellular-superoxide dismutase level with insulin resistance in type 2 diabetic patients. **The Journal of endocrinology**, v. 181, n. 3, p. 413–7, 2004.

ADLER, A. I. et al. Association between glycated haemoglobin and the risk of lower extremity amputation in patients with diabetes mellitus—review and meta-analysis. **Diabetologia**. v. 53, p.840–849, 2010.

ALHABIB, S.; ALDRAIMLY, M.; ALFARHAN, A. An evolving role of clinical pharmacists in managing diabetes: Evidence from the literature. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2014.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of care 2016. Diabetes Care, Volume 39, Supplement 1, 2016. Disponível em: <[http://www.http://care.diabetesjournals.org/content/39/Supplement\\_1](http://www.http://care.diabetesjournals.org/content/39/Supplement_1)>. Acesso em: 5 mai. 2016.

ANDREELLI, F.; JACQUIER, D.; TROY, S. Molecular aspects of insulin therapy in critically ill patients. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 9, n. 2, p. 124–30, 2006.

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. Diretrizes para Tratamento Farmacológico da Obesidade e do Sobrepeso. ABESO/SBEM, n. 76, 2010. Disponível em: <[www.abeso.org.br/pdf/diretrizes2010.pdf](http://www.abeso.org.br/pdf/diretrizes2010.pdf)>. Acesso em: 8 ago. 2016.

ATAIE-KACHOIE, P. et al. Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). **Journal of clinical pathology**, v. 6, p. 1–6, 2014.

ATTARD, S. M. et al. Implications of iron deficiency/anemia on the classification of diabetes using HbA1c. **Nutrition & diabetes**, v. 5, n. 6, p. e166, 2015.

AVOGARO, A. et al. L-Arginine-Nitric Oxide Kinetics in Normal and Type 2 Diabetic Subjects. **Diabetes**, v. 52, n. 3, p. 795–802, 2003.

AVOGARO, A. et al. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. **Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases**, v.16, p.39-45, 2006.

AZAD, N. et al. Association of PAI-1 and fibrinogen with diabetic retinopathy in the Veterans Affairs Diabetes Trial (VADT). **Diabetes care**, v. 37, n. 2, p. 501–6, 2014.

BAHIA, L. R.; ARAUJO, D. V.; SCHAAN, D. V. et al. The costs of type 2 diabetes mellitus outpatient care in Brazilian public health system. **Value in health**, v.14, p.137-140, 2011.

BANDEIRA, S. D. M. et al. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: Increase in lipid peroxidation and SOD activity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, 2012.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BARTNIK, M.; COSENTINO, F. Dysglycaemia, cardiovascular outcome and treatment. Is the jury still out? **European Heart Journal**, v. 30, n. 11, p. 1301–1304, 2009.

BASHAN, N.; KOVSAN, J.; KACHKO, I. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. **Physiological Reviews**, v. 89, p. 27–71, 2009.

BASTOS, A. S. et al. Diabetes and increased lipid peroxidation are associated with systemic inflammation even in well-controlled patients. **J Diabetes Complications**, v.30, n.8, p-1593-1599, 2016.

BEDARD, K.; KRAUSE, K.-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007.

BEMBDE, A. S. A study of plasma fibrinogen level in type-2 diabetes mellitus and its relation to glycemic control. **Indian journal of hematology & blood transfusion**, v. 28, n. 2, p. 105–8, jun. 2012.

BENETTI, E. et al. The NLRP3 Inflammasome as a Novel Player of the Intercellular Crosstalk in Metabolic Disorders. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p.1-9, 2013.

BERTOLDI, A. D.; KANAVOS, P.; FRANÇA, G. V. A, et al. Epidemiology, management, complications and costs associated with type 2 diabetes in Brazil: a comprehensive literature review. **Globalization and health**, v. 9, p. 62, 2013.

BLOCH, K. V.; MELO, A. S.; NOGUEIRA, A. R. Prevalence of anti-hypertensive treatment adherence in patients with resistant hypertension and validation of three indirect methods for assessing treatment adherence. **Cad. Saúde Pública**, v.24, p. 2979-2984, 2008.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813-820, 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications – a unifying mechanism. **Diabetes Journals**. v. 56, p. 1615-25, 2005.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. [30] Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v. 52, n. C, p. 302–310, 1978.

CAHILL, P. A.; REDMOND, E. M. Vascular endothelium e Gatekeeper of vessel health. ***Atherosclerosis***, v. 248, p. 97–109, 2016.

CERIELLO, A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. ***Diabetes Care***, v. 26, n. 5, p. 1589–1596, 2003.

CIESLAK, M.; WOJTCZAK, A.; CIESLAK, M. Role of pro-inflammatory cytokines of pancreatic islets and prospects of elaboration of new methods for the diabetes treatment. ***Acta Biochimica Polonica***, v.62, p.15-21, 2015.

CINTI, F.; BOUCHI, R.; KIM-MULLER, J. Y. et al. Evidence of  $\beta$ -cell dedifferentiation in human type 2 diabetes. ***Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism***, v. 101, n. 4, p. 1044–1054, 2016.

CORDA, S. et al. Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide. ***American journal of respiratory cell and molecular biology***, v. 24, n. 6, p. 762–768, 2001.

CORNELL, S. Continual evolution of type 2 diabetes: an update on pathophysiology and emerging treatment options. ***Therapeutics and Clinical Risk Management***, v. 11, p. 621-632, 2015.

DAL, S. et al. Oxidative stress status and liver tissue defenses in diabetic rats during intensive subcutaneous insulin therapy. ***Experimental Biology and Medicine***, n. 2, p. 1–9, 2015.

DANDONA, P. et al. Proinflammatory Effects of Glucose and Anti-Inflammatory Effect of Insulin: Relevance to Cardiovascular Disease. ***American Journal of Cardiology***, v. 99, n. 4 SUPPL., p. 15–26, 2007.

DCCT The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. ***The new England journal of medicine***, v. 329, n.14, p.977-986, 1993.

DEGHAIDE, N. H. S. et al. Tumor necrosis factor region polymorphisms are associated with AIDS and with cytomegalovirus retinitis. ***AIDS (London, England)***, v. 23, n. 13, p. 1641–1647, 2009.

DEFRONZO, R. A. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. ***Diabetes***, v. 58, n. 4, p. 773–795, 2009.

DEVARAJ, S.; KUMARESAN, P. R.; JIALAL, I. Effect of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells. ***Journal of Molecular and Cellular Cardiology***, v. 36, n. 3, p. 405–410, 2004.

DOMINGUETI, C. P. et al. Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 30, n. 4, p. 738-745, 2016.

DONATH, M. Y. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. **Nature Publishing Group**, v. 13, p.465-476, 2014.

DUTTA, D. et al. Tumor necrosis factor alpha -238G/A (rs 361525) gene polymorphism predicts progression to type-2 diabetes in an Eastern Indian population with prediabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 99, n. 3, p. e37–e41, 2013.

EL-KADER, S. M. A.; AL-DAHR, M. H. S. Impact of weight loss on oxidative stress and inflammatory cytokines in obese type 2 diabetic patients. **African Health Sciences**, v. 16, n. 3, p. 8–10, 2016.

ESSER, N. et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 105, n. 2, p. 141–150, 2014.

EVANS, J. L. et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 5, p. 599–622, 2002.

FERNÁNDEZ-REAL J. M. et al. The TNF- $\alpha$  Gene Nco I Polymorphism Influences the Relationship Among Insulin Resistance, Percent Body Fat, and Increased Serum Leptin Levels. **Diabetes**, v.46, p. 1468-1472, 1997.

FESTA, A. et al. Elevated Levels of Acute-Phase Proteins and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Predict the Development of Type 2 Diabetes The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1131-1137, 2002.

FONSECA, V. A. The Effects of Insulin on the Endothelium. **Endocrinol Metab Clin North Am.**36 Suppl 2:20-6., 2007.

FONTAINE-BISSON, B. et al. Tumor necrosis factor alpha -238G>A genotype alters postprandial plasma levels of free fatty acids in obese individuals with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 56, n. 5, p. 649–55, 2007.

FRANCÉS, D. E.; INGARAMO, P. I. RONCO, M. T.; CARNOVALE, C. E. Diabetes, an inflammatory process: Oxidative Stress and TNF- $\alpha$  involved in hepatic complication. **J. Biomedical Science and Engineering**. v. 6, p. 645-653, 2013.

FRANCO JÚNIOR, A. J. A. et al. Qualidade de vida e controle glicêmico do paciente portador de Diabetes Mellitus tipo 2. **Revista Psicologia e Saúde**, v. 5, n. 2 p. 102–108, 2013.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ Res**. v. 107, p. 1058-70, 2010.

GOMES, M. D. B. et al. Prevalência de sobrepeso e obesidade em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 no Brasil: estudo multicêntrico nacional. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 1, p. 136–144, 2006.

GRANT, P. J. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. **Journal of Internal Medicine**, v. 262, n. 2, p. 157–172, 2007.

GROSSMANNM, V. et al. Profile of the immune and inflammatory response in individuals with prediabetes and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 38, n. 7, p. 1356–1364, 2015.

GUZMÁN-FLORES, J. M. et al. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter -308G/A and -238G/A polymorphisms in Mexican patients with type 2 diabetes mellitus. **Disease markers**, v. 30, n. 1, p. 19–24, 2011.

HASEGAWA, A. et al. Anti-inflammatory effects of perioperative intensive insulin therapy during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. **Surgery Today**, v. 41, n. 10, p. 1385–1390, 2011.

HEDAYATI, M. et al. Association between TNF-alpha promoter G-308A and G-238A polymorphisms and obesity. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 2, p. 825–829, 2012.

INTERNACIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas. 7 edition revision, 2015. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas>>. Acesso em: 5 mai 2016.

JANSEN, H. J. et al. Start of insulin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus promotes the influx of macrophages into subcutaneous adipose tissue. **Diabetologia**, v. 56, p. 2573-2581, 2013.

KAMATA, K. et al. Islet amyloid with macrophage migration correlates with augmented b -cell deficits in type 2 diabetic patients. **Amyloid**, v. 6129, n. 3, p. 191–201, 2014.

KANETO, H.; MATSUOKA, T.; KIMURA, T et al. Appropriate therapy for type 2 diabetes mellitus in view of pancreatic  $\beta$ -cell glucose toxicity: “the earlier, the better”. **Journal of Diabetes**, v. 8, n. 2, p. 183–189, 2016.

KAPLAN, M.; AVIRAM, M.; HAYEK, T. Oxidative stress and macrophage foam cell formation during diabetes mellitus-induced atherogenesis: Role of insulin therapy. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 136, n. 2, p. 175–185, 2012.

KARAKOYUN, S. et al. Increased glycated hemoglobin level is associated with SYNTAX score II in patients with type 2 diabetes mellitus. **Angiology**, v. 67, n. 4, p. 384–390, 2016.

KARALLIEDDE, J.; GNUDI, L. Diabetes mellitus, a complex and heterogeneous disease, and the role of insulin resistance as a determinant of diabetic kidney disease. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the

European Dialysis and Transplant Association - **European Renal Association**, v. 31, n. 2, p. 206–13, 2016.

KATARIA, V. et al. Reactive Oxygen Species and Molecular Targets : Review on Diabetic Nephropathy. **International Journal of Advanced Research** v. 3, n. 4, p. 749–764, 2015.

KOCH, W. et al. Fibrinogen genes and myocardial infarction: A haplotype analysis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, p. 758-763, 2008.

LASTRA, G. et al. Type 2 diabetes mellitus and hypertension: An update. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 43, n. 1, p. 103–122, 2014.

LEITE, D., ROCHA, E. D. M., BRANDÃO-NETO, J. Obesidade : uma doença inflamatória. **Revista Ciência & Saúde**, v. 2, n. 2, p. 85-95, 2009.

LEPEDDA, A. J. et al. Identification of differentially expressed plasma proteins in atherosclerotic patients with type 2 diabetes. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 30, n. 5, p. 880–886, jul. 2016.

LIMA, L. M. et al. High-sensitivity C-reactive protein in subjects with type 2 diabetes mellitus and/or high blood pressure. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 51, n. 6, p. 956–60, ago. 2007.

LOPES, J.P.; OLIVEIRA, S.M.; FORTUNATO, J.S. Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células  $\beta$ -pancreáticas – Relação com as complicações do Diabetes Mellitus Tipo 2. **Acta Medica Portuguesa**, v. 21, p. 293-302, 2008.

LUNA, G. I.; SILVA, I. C. R.; SANCHEZ, M. N. Association between -308G / A TNFA Polymorphism and Susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus : A Systematic Review. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, p. 1-6, 2016.

LUNDBERG, J. O.; GLADWIN, M. T.; WEITZBERG, E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 14, n. 9, p. 623–41, 2015.

MAHREEN, R. et al. Significantly increased levels of serum malonaldehyde in type 2 diabetics with myocardial infarction. **International journal of diabetes in developing countries**, v. 30, n. 1, p. 49–51, 2010.

MARCHETTI, P. Islet inflammation in type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 59, n. 4, p. 668–672, 2016.

MARSH, H. P. et al. Polymorphisms in tumour necrosis factor (TNF) are associated with risk of bladder cancer and grade of tumour at presentation. **Br J Cancer**, v. 89, n. 6, p. 1096–1101, 2003.

MARZBAN, L. New insights into the mechanisms of islet inflammation in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 64, n. 4, p. 1094–1096, 2015.



- MCLELLAN, K. C. P.; MOTTA, D. G.; LERARIO, A.C.; CAMPINO, A. C. C. Custo do atendimento ambulatorial e gasto hospitalar do Diabetes Mellitus tipo 2. **Saúde em Revista**, São Paulo, v. 8, n. 20, p. 37-45, 2006.
- MENDES, A. B. V et al. Prevalence and correlates of inadequate glycaemic control: Results from a nationwide survey in 6,671 adults with diabetes in Brazil. **Acta Diabetologica**, v. 47, n. 2, p. 137–145, 2010.
- MONNIER, L. et al. Regulation of oxidative stress by glycaemic control: Evidence for an independent inhibitory effect of insulin therapy. **Diabetologia**, v. 53, n. 3, p. 562–571, 2010.
- MORISKY, D. E. et al. Predictive validity of a medication adherence measure in an outpatient setting. **Journal of Clinical Hypertension**, 2008.
- MOTAWI, T. M. K. et al. Effect of glycemic control on soluble RAGE and oxidative stress in type 2 diabetic patients. **BMC Endocrine Disorders** , v. 13, p.32-40 , 2013.
- MUNIANDY, S. et al. The oxidative stress of hyperglycemia and the inflammatory process in endothelial cells. **The Journal of Medical Investigation**, v.56, p.6-10, 2009.
- NIEDOWICZ, D. M.; DALEKE, D. L. The role of oxidative stress in diabetic complications. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 43, p. 289–330, 2005.
- NOBERASCO, G. et al. Malondialdehyde (MDA) level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 45, n. 4-5, p. 193–196, 1991.
- OUVIÑA, S.M. et al. Endothelial dysfunction, nitric oxide and platelet activation in hypertensive and diabetic type II patients. **Thromb Res**, v. 102, p. 107-14, 2001.
- PANENI F., BECKMAN J.A., CREAGER M.A., COSENTINO F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. **European Heart Journal**, 34: 2436–2446. 2013.
- PFUTZNER, A. et al. High-Sensitivity C-Reactive Protein Predicts Cardiovascular Risk in Diabetic and Nondiabetic Patients: Effects of Insulin-Sensitizing Treatment with Pioglitazone. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 4, n. 3, p. 706–716, 2010.
- PICKUP, J. Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. **Diabetes care**, v. 27, n. 3, p. 813–823, 2004.
- PITOCCO, D. et al. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. **Review of Diabetic Studies**, v. 7, n. 1, p. 15–25, 2010.
- PITOCCO, D. et al. Oxidative stress in diabetes: Implications for vascular and other complications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n.

11, p. 21525–21550, 2013.

PONTIERI, F. M.; BACHION, M. M. Crenças de pacientes diabéticos acerca da terapia nutricional e sua influência na adesão ao tratamento Beliefs of diabetic patients about nutritional therapy and its influence on their compliance with treatment. **Ciencia E Saude Coletiva**, v. 1, p. 151–160, 2010.

PORTERO, K. C. C.; MOTTA, D. G.; CAMPINO, A. A. C. Abordagem econômica e fluxograma do atendimento a pessoas com Diabetes Mellitus tipo 2 na rede pública de saúde de um município paulista. **Saúde em Revista**, São Paulo, v. 5, n. 11, p. 35-42, 2003.

RODRIGUES, K. F. et al. Association of a Large Panel of Cytokine Gene Polymorphisms with Complications and Comorbidities in Type 2 Diabetes Patients. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

SAAD, M. I. Abdelkhalek, T. M.; SALEH, M. M. et al. Insights into the molecular mechanisms of diabetes-induced endothelial dysfunction: focus on oxidative stress and endothelial progenitor cells. **Endocrine**, v. 50, n. 3, p. 537–567, 2015.

SEFRI, H.; et al. TNF A -308G > A polymorphism in Moroccan patients with type 2 diabetes mellitus : a case – control study and meta-analysis. **Mol Biol Rep**, DOI 10.1007/s11033-014-3454-5, 2014.

SENA, C. M.; PEREIRA, A. M.; SEIÇA, R. Biochimica et Biophysica Acta Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 12, p. 2216–2231, 2013.

SELVIN, E. et al. Glycated hemoglobin, diabetes, and cardiovascular risk in nondiabetic adults. **The New England journal of medicine**, v. 362, p. 800–811, 2010.

SESTI, L. F. C. et al. The -308G>a polymorphism of the TNF gene is associated with proliferative diabetic retinopathy in Caucasian Brazilians with type 2 diabetes. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 56, n. 2, p. 1184–1190, 2015.

SINDHU, R. K. et al. Dysregulation of Hepatic Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase in Diabetes: Response to Insulin and Antioxidant Therapies. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 26, n. 1, p. 43–53, 2004.

SIQUEIRA, A. F. A.; ALMEIDA-PITITTO, B. DE; FERREIRA, S. R. G. Doença cardiovascular no diabetes mellitus: análise dos fatores de risco clássicos e não-clássicos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 2, p. 257–267, 2007.

SOARES, A. L. et al. Alterações no sistema hemostático de pacientes com diabetes melito tipo 2. **Ver Bras Hematol Hemoter**. 32(6):482-488, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2015/2016. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br>>. Acesso em: 5 mai. 2016.

SOMOGYI, A. et al. Antioxidant measurements. **Physiological measurement**, v. 28, n. 4, p. R41–R55, 2007.

SOUZA, C.R.; ZANETTI, M.L. Administração de insulina: uma abordagem fundamental na educação em diabetes. **Rev. Esc. Enf. USP**, v.34, n.3, p. 264-70, 2000.

SOWERS, J. R.; EPSTEIN, M.; FROHLICH, E. D. Review Article Diabetes , Hypertension , and Cardiovascular Disease An Update. **Baseline**, v. 37, n. 4, p. 1053–1059, 2001.

STRÅLIN, P.; MARKLUND, S. L. Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v. 151, p. 433–441, 2000.

STRATTON, I. M. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. **Bmj**, v. 321, n. 7258, p. 405–412, 2000.

TABAK, A. G.; JOKELA, M.; AKBARALY, T. N. et al. Trajectories of glycemia, insulin sensitivity and insulin secretion preceding the diagnosis of type 2 diabetes: the Whitehall II study. **Lancet**, v. 373, n. 9682, p. 2215–2221, 2009.

TANGVARASITTICHAJ, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 3, p. 456–80, 2015.

TANGVARASITTICHAJ, S.; PONGTHAISONG, S.; TANGVARASITTICHAJ, O. Tumor Necrosis Factor-A, Interleukin-6, C-Reactive Protein Levels and Insulin Resistance Associated with Type 2 Diabetes in Abdominal Obesity Women. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 31, n. 1, p. 68–74, 2016.

TAYLOR, S. I.; ACCILI, D.; IMAI, Y. Insulin resistance or insulin deficiency: Which is the primary cause of NIDDM? **Diabetes**, v. 43, n. 6, p. 735–740, 1994.

TIWARI, B. K. et al. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. **Journal of biomarkers**, v. 2013, p. 378790, 2013.

TODA, N.; IMAMURA, T.; OKAMURA, T. Alteration of nitric oxide-mediated blood flow regulation in diabetes mellitus. **Pharmacology & therapeutics**, v. 127, n. 3, p. 189–209, 2010.

TUGLULAR, S.; BERTHOUX, P.; BERTHOUX, F. Polymorphisms of the tumour necrosis factor alpha gene at position - 308 and TNFd microsatellite in primary IgA nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. 4, p. 724–731, 2003.

ULLAH, F. et al. Original article knowledge of diabetic complications in patients with diabetes mellitus. **Journal of Ayub Medical College Abbottabad**, v. 27, n. 2, p. 360-363, 2015.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. Tight Blood Pressure Control and Risk of Macrovascular and Microvascular Complications in Type 2 Diabetes: UKPDS 38. **BMJ: British Medical Journal**, v. 317, n. 7160, p. 703-713, 1998.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

VERMA, S. et al. C-Reactive Protein Attenuates Endothelial Progenitor Cell Survival, Differentiation, and Function: Further Evidence of a Mechanistic Link between C-Reactive Protein and Cardiovascular Disease. **Circulation**, v. 109, n. 17, p. 2058–2067, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Adherence to long-term therapies, evidence for action, 2003. Disponível em: <[http://www.who.int/chp/knowledge/publications/adherence\\_report/en/](http://www.who.int/chp/knowledge/publications/adherence_report/en/)> Acesso em: 03 jan. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes. Fact sheet, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition, diagnosis and classification of Diabetes mellitus and its complications, 1999. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/who\\_ncd\\_ncs\\_99.2.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/who_ncd_ncs_99.2.pdf)>. Acesso em: 4 mai. 2015.

YAGIHASHI, S.; INABA, W.; MIZUKAMI, H. Dynamic pathology of islet endocrine cells in type 2 diabetes:  $\beta$ -Cell growth, death, regeneration and their clinical implications. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 7, n. 2, p. 155–165, 2016.

YAMAGISHI, S. et al. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1820, n. 5, p. 663–71, 2012.

ZACCARDI, F. WEBB, D. R.; YATES, T. et al. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. **Postgraduate Medical Journal**, v. 92, n. 1084, p. 63–69, 2016.