

**Caracterizações bioquímica e hemostática de  
pacientes com diabetes mellitus tipo 2 em  
insulinização**

**Nadmy Arrivabene Zavaris Gonçalves**

**Dissertação de Mestrado em Bioquímica e Farmacologia**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**Vitória, Julho de 2014**

# **Caracterizações bioquímica e hemostática de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 em insulinização**

**Nadmy Arrivabene Zavaris Gonçalves**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

---

Profa. Dra. Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem – Orientadora, UFES

---

Profa. Dra. Isabele Beserra Santos Gomes, UFES

---

Prof. Dr. Breno Valentim Vassalo, UFES

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**Vitória, Julho de 2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

G635p      Gonçalves, Nadmy Arrivabene Zavaris, 1983-  
Prevalência e fatores associados à infecção pelo M.  
tuberculosis entre agentes comunitários de saúde / Nadmy  
Arrivabene Zavaris Gonçalves. – 2014.  
116 f. : il.

Orientador: Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem.

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

1. Diabetes Mellitus tipo 2. 2. Insulina. 3. Hemostasia.  
4. Inflamação. I. Guimarães do Bem, Daniela Amorim Melgaço.  
II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

*À minha orientadora por ter confiado em mim e por ter conduzido todo o processo  
com doçura, dedicação e carinho.*

*Ao meu marido, meu eterno incentivador, meu companheiro, meu grande amor.*

*Aos meus pais e meu irmão pelo amor incondicional e por terem sempre sido minha  
base e meu suporte.*

*À Megg, pela companhia em todas as horas de estudo, sobretudo nas noites e  
madrugadas.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir viver e realizar mais esta conquista.

À toda minha família e a todos os meus verdadeiros amigos, que sempre estiverem comigo, torcendo por mim e entendendo minha ausência nestes dois anos tão atribulados.

À professora do departamento de farmácia e querida amiga Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves, pelo imprescindível auxílio na elaboração do projeto e por ser um verdadeiro anjo no meu caminho, sempre com palavras confiantes e incentivadoras.

À todos os pacientes e voluntários que aceitaram participar deste estudo, permitindo a sua realização.

À Prefeitura Municipal de Vitória, pela aceitação do projeto, pela confiança e estrutura concedidas.

À todos funcionários e colegas da Unidade Básica de Saúde de Consolação, que tornaram-se uma grande família para mim, em especial aos meus queridos técnicos em farmácia, Geceara e Adilson, por serem fiéis e sempre dispostos a ajudar todas as vezes em que precisei, às queridas Sandra, Analice e agentes comunitárias de saúde, pela ajuda na identificação dos pacientes, aos diretores antigos e atual pela confiança, ao Welington, pelo *start* e à Sirlene e Daniela, pela amizade e pela ajuda primordial na coleta de sangue.

Ao laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes, pela parceria no projeto e permissão para utilização do laboratório;

À minha super e eterna amiga Renata Tonani de Matos Petri que, para além de todas as horas de amizade sempre à mim dedicadas, ainda muito contribuiu como bioquímica, auxiliando-me na dosagem de parâmetros.

Aos meus queridos colegas de turma, que se tornaram amigos e fizeram tudo ter sido mais divertido, de maneira especial, à Lorena pelo treinamento nas práticas experimentais e à Lorraine, minha fiel companheira de laboratório.

A todos os alunos e estagiários que estiveram envolvidos na etapa inicial de seleção dos pacientes, com destaque para a Tamara e Gabriela que me ajudaram a organizar grande parte do processo.

Às estagiárias Suellen e Lílian, pela contribuição e zelo com nosso laboratório;

À professora Carolina Sales, do programa de pós graduação em saúde coletiva da UFES, pela ajuda na elaboração inicial do projeto;

À todos os professores da pós graduação, pelos ensinamentos e em especial às professoras Rita G. W. Pires e Cristina Martins, por gentilmente cederem seu laboratório para que eu realizasse parte de meus experimentos.

À querida professora Elenice Moreira Lemos, que embora seja de outro programa de pós graduação da UFES, sempre mostrou-se disponível e nunca mediu esforços para me ajudar, sempre permitindo que eu usufruísse da estrutura de seu laboratório e do núcleo de doenças infecciosas.

À doutoranda da professora Elenice, Juliana, pela gentileza em me ajudar e assessorar em parte dos experimentos.

À competente e querida professora Eliane Zandonade e seu aluno Wharley Borges, do laboratório de estatística da UFES, pelo belo exemplo de profissionalismo e pela clareza e autonomia com que me assessorou na análise estatística.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	20
2.1 DIABETES MELLITUS.....	21
2.1.1 CLASSIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO .....	22
2.1.2 TRATAMENTO.....	25
2.1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO DM2 E COMPLICAÇÕES.....	28
2.1.4 HIPERGLICEMIA E ENDOTÉLIO VASCULAR.....	29
2.1.4.1 Ativação da proteína quinase C (PKC) .....	31
2.1.4.2 Aumento da produção de produtos de avançada glicação (AGEs) .....	32
2.1.4.3 Ativação da via dos polióis.....	33
2.1.4.4 Ativação da via das hexosaminas.....	34
2.2 HEMOSTASIA, HIPERCOAGULABILIDADE E HIPOFIBRINÓLISE .....	35
2.3 DIABETES MELLITUS E INFLAMAÇÃO .....	38
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO GERAL.....	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4. METODOLOGIA.....	44
4.1 CASUÍSTICA .....	45
4.1.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	45
4.1.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	46
4.1.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	46
4.2 MÉTODOS.....	47
4.2.1 AMOSTRA BIOLÓGICA.....	47
4.2.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS E ANTROPOMÉTRICOS ...	48
4.2.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	48



4.2.3.1 Perfil Glicêmico.....	48
4.2.3.1.1 Determinação de hemoglobina glicada .....	48
4.2.3.1.2 Determinação de glicose.....	48
4.4.3.2 Perfil Lipídico .....	49
4.2.3.2.1 Determinação de Triglicerídio .....	49
4.2.3.2.2 Determinação de Colesterol total .....	49
4.2.3.2.3 Determinação de Colesterol LDL .....	50
4.2.3.2.4 Determinação de Colesterol HDL.....	50
4.2.3.2.5 Determinação de Colesterol VLDL.....	50
4.2.3.3 Marcadores Renais.....	51
4.2.3.3.1 Determinação de Uréia .....	51
4.2.3.3.2 Determinação de Creatinina.....	51
4.2.3.4 Marcador de inflamação .....	51
4.2.3.4.1 Determinação de Proteína C Reativa ultra sensível (PCRus) .....	51
4.2.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS GENÉTICOS .....	52
4.2.4.1 Extração do DNA genômico.....	52
4.2.4.2 Detecção do polimorfismo - 675 4G/5G.....	52
4.2.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS.....	55
4.2.5.1 Determinação dos níveis plasmáticos de PAI1 .....	55
4.2.5.2 Determinação dos níveis plasmáticos de d-dímero (D-di) .....	55
4.2.5.3 Determinação dos níveis plasmáticos de fibrinogênio .....	55
4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	56
5 RESULTADOS .....	58
5.1 CARACTERIZAÇÕES CLÍNICA E ANTROPOMÉTRICA .....	59
5.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA .....	63
5.3 CARACTERIZAÇÃO HEMOSTÁTICA DOS PARTICIPANTES.....	65
5.4 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS PARTICIPANTES .....	70
5.5 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DAS COVARIÁVEIS NA PREDIÇÃO DE DM2 EVOLUÍDA PARA INSULINIZAÇÃO.....	73

6 DISCUSSÃO.....	75
7 CONCLUSÕES.....	87
8 REFERÊNCIAS .....	89
APÊNDICE 1 .....	111
APÊNDICE 2 .....	113
ANEXO 1 .....	115

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Oligonucleotídeos sintéticos utilizados na PCR para detecção do polimorfismo (-675 4G/5G) na região promotora do gene do PAI-1 .....	53
Quadro 2 -	Concentrações de reagentes utilizados nas PCR's para detecção do polimorfismo (-675 4G/5G) na região promotora do gene do PAI-1 .....	53
Quadro 3-	Programa de PCR para detecção do polimorfismo (-675 4G/5G) na região promotora do gene do PAI-1 utilizado no termociclador .....	54
Quadro 4 -	Perfil de bandas (PCR alelo específica PAI-1 4G5G) .....	54
Tabela 1 -	Características sociodemográficas, clínicas e antropométricas dos participantes dos grupos controle e DM2 em insulinização .....	61
Tabela 2 -	Tipo e frequência de medicamentos em uso pelos participantes dos grupos controle e DM2 em insulinização .....	62
Tabela 3 -	Parâmetros bioquímicos dos participantes dos grupos controle e DM2 em insulinização expressos como mediana, intervalo interquartil e valor p .....	63
Tabela 4 -	Parâmetros bioquímicos dos participantes dos grupos controle e DM2 em insulinização, categorizados por seus valores de referência, e valor p .....	65
Tabela 5 -	Níveis plasmáticos de fibrinogênio, D-Di e PAI-1 nos grupos controle e DM2 em insulinização, expressos como médias, desvio padrão, mediana, intervalo interquartil e valor p .....	66
Tabela 6 -	Parâmetros hemostáticos dos participantes dos grupos controle e DM2 em insulinização, categorizados por seus valores de referência, e valor p	66
Tabela 7 -	Coeficiente de correlação (r) de Spearman e valor p para os marcadores Fibrinogênio, D-Di e PAI-1 nos participantes dos grupos controle e DM2 em insulinização .....	67

Tabela 8 -	Parâmetros genéticos dos participantes dos grupos controle e DM2 em insulínização .....	71
Tabela 9 -	Níveis plasmáticos de PAI-1 dos participantes dos grupos controle e DM2 em insulínização, estratificados por genótipo .....	72
Tabela 10	<i>Odd Ratio</i> bruto e ajustado das variáveis que apresentaram significância estatística no estudo de caso-controle entre indivíduos dos grupos controle e DM2 em insulínização .....	74

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Gráficos de dispersão correspondentes às correlações do grupo controle estatisticamente significantes para  $p < 0,05$ : fibrinogênio e glicemia, fibrinogênio e PCRus, PAI-1 e glicemia, PAI-1 e IMC ..... 68
- Figura 2 - Gráficos de dispersão correspondentes às correlações do grupo DM2 em insulinização estatisticamente significantes para  $p < 0,05$ : fibrinogênio e D-Di, Fibrinogênio e PCRus, D-Di e glicemia (negativa), PAI-1 e triglicérideo, PAI-1 e IMC ..... 69
- Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção do polimorfismo (-675 4G/5G) na região promotora do gene do PAI-1, através da técnica de PCR alelo específico ..... 70
- Figura 4 - Frequências genotípica e alélica do polimorfismo (-675 4G/5G) na região promotora do gene do PAI-1 ..... 71
- Figura 5 - Gráficos Blox-plot correspondentes aos níveis plasmáticos de PAI-1 (ng/mL) dos participantes do grupo controle estratificado por genótipo e diferença estatística para  $p < 0,05$  ..... 72

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Associação Americana de Diabetes
ADP	Adenosina difostato
AGE	Produtos de avançada glicação
ANOVA	Análise de variância
AT	Antitrombina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doença cardiovascular
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
D-Di	D-dímero
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDCF	Fator de contração derivado do endotélio
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
dNTP	desoxirribonucleosídeos trifosfatos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme linked immune assay</i>
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
ESF	Estratégia Saúde da Família
FT	Fator tecidual
GJ	Glicemia de jejum
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDLc	Lipoproteína de alta densidade
IMC	Índice da Massa Corporal
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NFK $\beta$	Fator nuclear kappa $\beta$
NO	Óxido nítrico
NPH	Neutral Protamine Hagedorn
PCR <sub>us</sub>	Proteína C reativa ultra sensível
LDLc	Lipoproteína de baixa densidade
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
Pb	Pares de base
PC	Proteína C
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PKC	Proteína quinase C
PDF	Produtos de degradação da fibrina
PS	Proteína S
PT	Protrombina
q.s.p	Quantidade suficiente para
PMV	Prefeitura Municipal de Vitória

RAGE	Receptor de produtos de avançada glicação
RI	Resistência à insulina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
TE	Tromboembolismo
TGC	Triglicérides
TVP	Trombose venosa profunda
t-PA	Ativador tecidual do plasminogênio
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
TXA2	Tromboxano A2
UBS	Unidade Básica de Saúde
UFES	Universidade Federal do Espírito santo
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
VCAM1	Molécula de adesão celular-vascular 1
VLDLc	Lipoproteína de densidade muito baixa
WHO	World Health Organization
$\chi^2$	Teste de qui-quadrado

## RESUMO

O estudo objetivou caracterizar hemostática e bioquimicamente pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) que evoluíram para insulinização. Compuseram o grupo em análise, 40 pacientes atendidos pela Unidade Básica de Saúde de Consolação, Vitória/ES, com idade entre 25 e 80 anos, diagnóstico de DM2 em utilização de insulina. Para o controle, foram selecionados 40 pacientes na mesma faixa etária, sem diagnóstico laboratorial e/ou clínico de DM. Foram dosados marcadores de inflamação, hipercoagulabilidade e fibrinólise: fibrinogênio, dímero-D (D-Di) e inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1). O polimorfismo (-675 4G/5G) na região promotora do gene do PAI-1 foi correlacionado com seus níveis plasmáticos. Foram medidos os parâmetros bioquímicos: glicemia de jejum (GJ), hemoglobina glicada (HbA1C), colesterol total (CT), colesterol HDL (HDLc), colesterol LDL (LDLc), triglicérido (TGC), proteína C reativa ultra sensível (PCRus), ureia e creatinina plasmáticas. Houve ainda a verificação do IMC, obesidade, tabagismo, hipotireoidismo, hipertensão, dislipidemia e resistência à insulina. A análise estatística mostrou diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em relação aos valores médios de HDLc, VLDLc, TGC, ureia, PCRus e fibrinogênio. Houve diferença entre os grupos para VLDLc, TGC, creatinina e fibrinogênio alterados. No controle foram observadas as correlações: fibrinogênio e glicemia, fibrinogênio e PCRus, PAI-1 e glicemia, PAI-1 e IMC. No grupo DM2 em insulinização houve correlação para fibrinogênio e D-di, fibrinogênio e PCRus, D-Di e glicemia (negativa), PAI-1 e triglicérido, PAI-1 e IMC. Níveis de PAI-1 foram estatisticamente maiores no grupo controle em indivíduos com genótipo 5G5G, seguido de 4G5G e 4G4G. A Regressão Logística Binária confirmou que as variáveis hipertensão e fibrinogênio foram significantes ao p-valor (0.009) e (0.049) e *ODDS Ratio* ajustado (4,184; 1,426-12,276) e (3,293; 1,006-10,775) respectivamente, mostrando que hipertensos têm um risco 4,18 vezes maior de terem DM2 insulinizada e que indivíduos com hiperfibrinogenemia possuem um risco 3,29 vezes maior. Com o estudo espera-se contribuir para melhor entendimento das complexas alterações que acompanham o paciente diabético tipo 2 usuário de insulina numa expectativa de buscar adequado tratamento e prevenção para as complicações macrovasculares do diabetes.

**Palavras chave:** Diabetes mellitus tipo 2, insulinização, hemostasia, inflamação.



## ABSTRACT

The study aims to characterize biochemically and hemostatic mellitos patients with diabetes mellitus type 2 (DM2) who developed insulin regimen. Composed group under analysis, 40 patients attended the Basic Health Unit of Consolation, Vitória / ES, aged 25 to 80 years, diagnosed with DM2 and that were already evolved to insulinization. As controls, 40 patients were selected in the same age group without laboratory and / or clinical diagnosis of DM. Markers of inflammation, hypercoagulability and fibrinolysis were measured: Fibrinogen, D-dimer (D-Di) and plasminogen activator type 1 inhibitor (PAI-1). The polymorphism (-675 4G/5G) in the promoter region of the PAI-1 gene was correlated with their serum levels. Biochemical parameters were measured: plasma glucose (PG), glycated hemoglobin (A1C), total cholesterol (TC), HDL cholesterol (HDL-C), LDL (LDLc) cholesterol, triglycerides (TGC), ultrasensitive C reactive protein (hsCRP), urea and serum creatinine. There was still checking BMI, obesity, smoking, hypothyroidism, hypertension, dyslipidemia and insulin resistance. Statistical analysis showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between groups with regard to mean values of HDL-C, VLDL-C, TGC, urea, hsCRP and fibrinogen. There was significant difference between groups for VLDLc, TGC, creatinine and fibrinogen. Controls present correlations between: fibrinogen and glucose, hsCRP and fibrinogen, PAI-1 and glucose, PAI-1 and BMI. In insulinization DM2 group correlation was observed correlation between: fibrinogen and D-di, hsCRP and fibrinogen, D-Di and glucose (negative), PAI-1 and triglycerides, PAI-1 and BMI. PAI-1 levels were higher in the control group in subjects with genotype 5G5G, 4G5G and 4G4G followed. Binary Logistic Regression confirmed that the variables hypertension and fibrinogen were significant at p-value (0.009) and (0.049) and adjusted odds ratio (4.184, 1.426 to 12.276) and (3.293, 1.006 to 10.775), respectively, showing that hypertensive patients have a risk 4.18 times more likely to have insulinization type 2 diabetes and that individuals with hyperfibrinogenemia have a 3.29 times greater risk. With this study we hope to contribute to better understanding of the complex changes that accompany the user insulinization type 2 diabetic patients in expectation of seeking appropriate treatment and prevention for the macrovascular complications of diabetes.

**Keywords:** DM2, insulinization, hemostasis, inflammation.

# ***1 INTRODUÇÃO***

O diabetes mellitus (DM) é uma doença multifatorial associada ao aumento de risco cardiovascular quando comparado a indivíduos que não possuem a doença. Dentre os tipos de DM, o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) corresponde a cerca de 90% dos casos de diabetes no mundo sendo que a epidemia de diabetes está particularmente relacionada a este subtipo, que se manifesta pela resistência e/ou secreção reduzida de insulina. (WHO, 2013)

O DM representa um considerável encargo econômico tanto para o indivíduo quanto para a sociedade, especialmente quando mal controlado. A maior parte dos custos diretos de seu tratamento está relacionada às suas complicações que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevida dos indivíduos. (PORTERO *et al.*, 2003; MCLELLAN *et al.*, 2006; IDF, 2013).

Os resultados de grandes estudos como *The Diabetes Control and Complications Trial Research Group* (DCCT) e *UK Prospective Diabetes Study* (UKPDS) demonstraram relação direta entre hiperglicemia cronicamente mantida e as complicações micro e macrovasculares (DCCT, 1993; UKPDS, 1998). Assim, indivíduos com diabetes representam cerca de 30% dos pacientes que se internam em unidades coronarianas intensivas (SILVA *et al.*, 2006). Cerca de 80% dos indivíduos diabéticos morrem em decorrência de eventos trombóticos e 75% dessas mortes resultam de eventos cardiovasculares (WHO, 2013).

Isso ocorre uma vez que as alterações no endotélio provocadas pela hiperglicemia promovem ativação do processo inflamatório, que, juntamente com hipertensão e dislipidemia, proporcionam a formação de placas ateroscleróticas. Estudos mostraram que a insulina possui efeitos seletivos na síntese de proteínas hepáticas em pessoas normais, e que a resistência aos seus efeitos levaria à síntese aumentada de proteínas de fase aguda, como o fibrinogênio e a proteína C reativa, caracterizando o processo inflamatório (GRANT *et al.*, 2007).

Assim, embora os parâmetros da síndrome metabólica como hiperglicemia, dislipidemia e hipertensão possam causar lesão vascular, a disfunção endotelial pode ser intrínseca ao DM2 e esse quadro pode conduzir a um estado ativado caracterizado, em parte, pela adesão e agregação plaquetária e aumento da coagulabilidade (OUVINA *et al.*, 2001).

A hiperglicemia também interfere no sistema fibrinolítico, uma vez que estimula a produção do inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1). Assim, estudos têm mostrado que pacientes com DM2 possuem níveis aumentados de marcadores de ativação da cascata da coagulação (D-di) e fibrinólise (PAI-1), evidenciando estados pró-trombóticos (VAUGHAN *et al.*, 2005; NWOSE *et al.*, 2007; WAKABAYASHI *et al.*, 2009). Assim, uma avaliação dos níveis desses marcadores hemostáticos pode ser fundamental na avaliação do risco trombótico de pacientes com DM2. (DAWSON *et al.*, 1993; ZORIO *et al.*, 2008).

Os níveis de PAI-1 também são modulados geneticamente, uma vez que a concentração plasmática de PAI-1 está correlacionada com o polimorfismo -675 4G/5G na região promotora do gene do PAI-1. Indivíduos que apresentam o genótipo 4G/4G estão associados a uma maior produção de PAI-1, situação que pode corroborar para estados pró-trombóticos, devido uma maior inibição da fibrinólise (DAWSON *et al.*, 1993; ZORIO *et al.*, 2008).

Muitas pesquisas mostram a associação positiva entre diabetes e marcadores hemostáticos e as evidências apontam para desfechos que sugerem que o indivíduo com DM2 apresente um estado de hipercoagulabilidade e hipofibrinólise (YAMADA *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2010). No entanto, as correlações entre as complicações vasculares no diabetes, hiperglicemia cronicamente mantida e o grau de anormalidade da hemostasia ainda não foram completamente elucidados.

Neste contexto e dado o caráter multifatorial do DM2, os estudos necessitam de detalhamento no que diz respeito ao grau de comprometimento do organismo, às comorbidades e às medidas terapêuticas adotadas, uma vez que estes parâmetros refletem diretamente na progressão da doença e nos resultados dos marcadores laboratoriais avaliados nesses indivíduos.

Em consonância ao grande impacto sobre as complicações de DM2 determinadas pelos estados de inflamação, hipercoagulabilidade e hipofibrinólise é importante e justificável investigar tais alterações em um grupo de pacientes diabéticos tipo 2 que evoluíram para insulino terapia a fim de mapear a situação da população afetada. Vale, contudo, ressaltar que estudos dessa natureza ainda não foram conduzidos na população de estudo.

## ***2 REFERENCIAL TEÓRICO***

## 2.1 DIABETES MELLITUS

O diabetes Mellitus (DM), segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou incapacidade da insulina de exercer adequadamente suas ações, caracterizada pela hiperglicemia crônica e alterações no metabolismo dos carboidratos, dos lipídeos e das proteínas (WHO, 2013).

O diabetes mellitus (DM) representa, atualmente, um dos problemas mais significativos de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como também naqueles em desenvolvimento. Em 1985, o número de indivíduos diabéticos na população mundial era de aproximadamente 30 milhões e em 1995, o número chegou a 135 milhões. Em última nota, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em outubro de 2013, mostrou que 347 milhões de indivíduos possuem diabetes mellitus no mundo, estando, 25,1 milhões na América Central e do Sul e 12,4 milhões no Brasil. Estima-se que em 2004 3,4 milhões de pessoas morreram em consequência do diabetes, sendo as complicações cardiovasculares responsáveis por cerca de 50% da mortalidade (WHO, 2013; SBD, 2014).

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) estamos vivendo uma epidemia de diabetes. No Brasil, na década de 80, a prevalência de diabetes era estimada em 7,6%, sendo que hoje, as taxas apontam para 12,1 a 13,5%. Este aumento pode ser explicado pelo crescente envelhecimento populacional, urbanização e principalmente pelo aumento do sedentarismo e obesidade (SBD, 2009; SBD, 2014).

Por ser o diabetes mellitus uma doença de natureza crônica, as complicações advindas da doença são geralmente graves e requerem meios onerosos para seu controle, gerando altos gastos tanto para o paciente como para o sistema público de saúde. Acredita-se que o custo desta doença para o Brasil seja de aproximadamente 3,9 bilhões de dólares por ano (SBD, 2014).

No diabetes mellitus a hiperglicemia crônica culmina com o desenvolvimento de patologia microvascular nos glomérulos renais, retina, e nervos periféricos. Assim, devido a patologia microvascular, o diabetes mellitus é a principal causa de doença renal crônica, cegueira, doença e neuropatias debilitantes (BROWNLEE, 2001; 2005).

Além da patologia microvascular, o diabetes mellitus associa-se também à doença aterosclerótica macrovascular, afetando artérias que irrigam cérebro, coração e extremidades inferiores. Neste contexto, pacientes com diabetes também possuem maior risco de acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio e amputação de membros inferiores (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005).

### **2.1.1 CLASSIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO**

O diabetes mellitus é representado por vários distúrbios metabólicos heterogêneos que possuem em comum a hiperglicemia, que pode advir de perturbações na ação e/ou secreção da insulina (SBD, 2014).

Atualmente, a classificação do DM é baseada na etiologia da doença. A Organização Mundial da Saúde (OMS), Associação Americana de Diabetes (ADA) e a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) classificam o diabetes mellitus em:

- DM1: ocorre destruição autimune ou idiopáticas das células betapancreáticas, culminando na deficiência de insulina. Corresponde de 5 a 10% dos casos;
- DM2: é caracterizado por anormalidades na ação e secreção da insulina. Geralmente ambos ocorrem, no entanto pode ocorrer predomínio de um dos dois. A maior parte apresenta obesidade. Corresponde de 90 a 95% dos casos;
- Outros tipos específicos de DM: são as formas menos comuns da doença e cujas causas podem ser observadas, como doenças pancreáticas e endócrinas, síndromes genéticas e infecções;
- DM gestacional: é a alteração da glicemia que inicia-se ou é diagnosticada durante a gestação. Também relaciona-se à resistência a insulina e perda de célula beta. Acontece em 1 a 14% das gestações;
- Pré diabetes: Caracterizado como um estado intermediário entre homeostase normal da glicose e o DM. Os pacientes nesta categoria possuem risco aumentado de diabetes.

Segundo a Associação Americana de Diabetes (ADA), Organização Mundial da Saúde (OMS) e Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), os critérios para

diagnóstico do DM2 atualmente aceitos são os abaixo descritos. Caso haja positividade em qualquer um dos parâmetros, pode ser confirmado o diagnóstico de diabetes (ADA, 2013; SBD, 2014).

- Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescidos de glicemia casual (a qualquer hora do dia) acima de 200 mg/dL;
- Glicemia de jejum (ausência de ingestão calórica por no mínimo 8hs) igual ou superior a 126 mg/dL;
- Glicemia de duas horas pós sobrecarga de 75 g de glicose acima de 200 mg/dL;
- Hemoglobina glicada maior ou igual a 6,5%.

A evolução até o DM2 ocorre em um período de tempo variável, iniciando-se em estágios intermediários de glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída, decorrentes de uma combinação de resistência à ação da insulina e disfunção de células beta (REPORTS, 1997; SBD, 2014; ADA, 2013).

Assim, a glicemia de jejum alterada e a tolerância diminuída à glicose são condições clínicas que não caracterizam o DM2, mas que podem ser consideradas como risco aumentado para diabetes, representando um estado intermediário entre a normalidade e o DM2. Segundo a Associação Americana de Diabetes (ADA) e Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), os critérios para definição do estado de pré-diabetes são:

- Glicemia de jejum (ausência de ingestão calórica por no mínimo 8hs)  $\geq 100$  e  $\leq 125$  mg/dL;
- Glicemia de duas horas pós sobrecarga de 75 g de glicose  $\geq 140$  e  $\leq 199$  mg/dL;
- Hemoglobina glicada  $\geq 5,7$  e  $\leq 6,4$  mg/dL

A utilização de hemoglobina glicada (HbA1C) como critério de diagnóstico para o diabetes mellitus foi inicialmente proposta em 2009 / 2010 pela Sociedade Brasileira de Diabetes e pela Associação Americana de Diabetes e tem sido mantida conforme última publicação de ambas em 2014 (SBD, 2014; ADA, 2013). No entanto, hemoglobinopatias, anemias hemolítica e ferropriva são situações que



podem comprometer a aplicação deste parâmetro como critério de diagnóstico. Além disso, recentemente tem sido relatado que a etnia pode ser outro fator de discordância entre os resultados de HbA1C, onde evidências sugerem que os afrodescendentes e asiáticos possuem maiores níveis de HbA1c que caucasianos para valores iguais de glicemia (ZIEMER, *et al.*, 2010; JOHN, *et al.*, 2012; ADA, 2014; SBD, 2014).

É importante ressaltar que os critérios de diagnóstico de DM por glicemia plasmática possuem nível A de evidência, no entanto, embora a hemoglobina glicada ainda seja considerada critério de diagnóstico, é pertinente a realização de estudos mais conclusivos, conforme reconhece a própria SBD (SBD, 2014).

A resistência à insulina (RI) é um estado caracterizado pela resposta subnormal do organismo à insulina e está presente em mais de 80% dos pacientes com DM2. Ela acarreta o aumento da síntese de triglicerídeos, aumento do LDL-colesterol e redução do HDL-colesterol. Nos rins, a ação moduladora da insulina na excreção de uratos, potássio e sódio é modificada, com maior efeito poupador de sódio, favorecendo a manutenção ou agravamento da hipertensão arterial sistêmica. Dessa forma, a resistência à ação da insulina está associada a uma série de anormalidades metabólicas como hipertensão, dislipidemia, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, disfunção endotelial, hipercoagulação, hipofibrinólise e inflamação (FESTA *et al.*, 2000; TEMELKOVA-KURKTSCHIEV *et al.*, 2003; SBD, 2014).

Assim, a resistência à insulina é uma condição fisiopatológica de importante investigação clínica sendo considerada um fator de risco independente para doença cardiovascular. Segundo a SBD, pode-se definir que um paciente tem resistência a insulina, na prática clínica, quando se enquadra nos critérios de um dos modelos propostos por Stern e colaboradores (2005) , após estudos de grande porte que avaliou 2.321 pacientes (STERN *et al.*, 2005; SBD, 2014).

Neste estudo, adotaremos o modelo 3 proposto por Stern et al, que possui 81,3% de sensibilidade, 76,3% de especificidade e define os seguintes critérios para resistência à insulina como sendo:

- IMC > 28,7 Km/m<sup>2</sup>, ou
- IMC > 27,5 Km/m<sup>2</sup> + história familiar de DM, ou

- História familiar de DM negativa, mas triglicérideo > 2,44 mmol/L (216 mg/dL) (STERN *et al.*, 2005; SBD, 2009; SBD, 2014).

Importante ressaltar que modificações no estilo de vida podem definir o desenvolvimento ou não do DM2 e tornam-se decisivas na sua prevenção. Assim, hábitos de vida mais saudáveis como dieta balanceada e rica em fibras, controle do peso e realização de atividade física são capazes de reduzir em 58% o risco de um indivíduo com tolerância a glicose reduzida e resistência à insulina tornar-se diabético (SBD, 2014).

### 2.1.2 TRATAMENTO

O tratamento do DM2 visa à manutenção do controle metabólico e compreende terapias não medicamentosa e medicamentosa (BRASIL, 2001; SBD, 2014). Os recursos medicamentosos são empregados, geralmente, em um segundo momento da terapêutica, diante da incapacidade de controlar os níveis glicêmicos pela prática da dieta e de exercícios físicos (MALERBI & FRANCO, 1997; FOSTER *et al.*, 1998; ALAD *et al.*, 2000; ADA, 2013). O tratamento não medicamentoso consiste em adotar hábitos saudáveis de vida, sobretudo em relação à alimentação adequada e à prática de atividades físicas regulares (MODESTO *et al.*, 2003), contribuindo para redução do índice de massa corporal, melhora da sensibilidade à insulina, diminuição de glicemia e triglicérides e aumento do HDLc, importantes para retardar a doença cardiovascular e outras complicações do DM2 (SBH, 2005).

A Associação Americana de Diabetes e a Sociedade Brasileira de Diabetes estabelecem metas para caracterizar o bom controle glicêmico de pacientes com DM2 e para isto definem os níveis desejáveis e os níveis toleráveis para os parâmetros laboratoriais do controle glicêmico (SBD, 2014; ADA; 2013).

Em relação à glicemia de jejum, a meta é <100 mg/dL, com tolerância até 130 mg/dL. Para glicemia pós prandial, a meta é < 140 mg/dL, com tolerância até 160 mg/dL. Para a hemoglobina glicada a meta varia conforme a idade, condições clínicas, risco de hipoglicemia e gestação, sendo <7,0% para adultos, <8,% para crianças de 6 a 12 anos, <8,5% para crianças de 0 a 6 anos e idosos, <7,5% para

adolescentes de 13 a 19 e  $<6,0$  nos casos de diabetes gestacional (ADA, 2013; SBD, 2009; SBD, 2014).

O momento em que o paciente é diagnosticado com DM2, não necessariamente coincide com o início da doença. Muitas vezes o paciente tem a doença em evolução durante anos antes de seu diagnóstico. Neste sentido, a terapia mais adequada para o paciente com DM2 é bastante individualizada e está intimamente relacionada com a capacidade secretória de seu pâncreas no momento do diagnóstico e durante o curso da doença (SBD, 2014).

Conforme mencionado, o tratamento do DM2 visa o controle glicêmico na expectativa de postergar as complicações inerentes à doença. No entanto, embora haja recomendações e protocolos estabelecidos pela ADA e SBD, é importante salientar que a melhor estratégia de tratamento do DM2 bem como a decisão de início da insulinoterapia também deve ser pautada na experiência do clínico ou do especialista que acompanha o paciente e conhece suas particularidades clínicas, financeiras e intelectuais (SBD, 2014, ADA, 2013).

Didaticamente, o DM2 pode ser dividido em fases de acordo com a função das células beta-pancreáticas. Na fase 1, período inicial do DM2, onde há discreta hiperglicemia, obesidade e insulinoresistência, a indicação terapêutica mais acertada é aquela que utiliza medicamentos que atuam melhorando a resistência à insulina e os níveis glicêmicos por ação periférica, ou seja, não aumentam a secreção de insulina nem o ganho de peso. A metformina, para estes casos, é a droga de escolha (SBD, 2009; SBD, 2014).

A redução da secreção de insulina caracteriza a fase 2 da doença, e nesta é primordial a utilização de um secretagogo, como as sulfoniluréias, geralmente em associação com sensibilizadores de insulina. Nesta fase, embora ainda pouco praticada, a insulinização precoce (insulina basal) pode ser uma opção, visando preservação das células beta pancreáticas (SBD, 2009; SBD, 2014).

A fase 3 é marcada pela progressiva perda de secreção de insulina, como consequência da maior falência de células beta e já com a presença de comorbidades. Neste momento é necessário associar aos agentes orais a insulinização oportuna (injeção de insulina de depósito) (SBD, 2009; SBD, 2014).

Com o decorrer do DM2, a fase 4 é marcada pelo predomínio claro da insulinopenia ou insulinização plena. Agora é importante que o paciente receba quantidades de insulina que satisfaçam todas as suas necessidades diárias, geralmente 1 ou 2 aplicações de insulina de depósito, acompanhada de insulina de ação rápida, antes das refeições. Importante ressaltar que a associação com o sensibilizador de insulina (metformina) pode ser mantida (BARRET *et al* 1998; COUTINHO *et al.*, 1999; SBD, 2009; SBD, 2014).

A medicação mais efetiva no que diz respeito à redução da hemoglobina glicada em pacientes com DM2 é a insulina. No entanto e de modo geral, a utilização da insulina é muito aquém do que deveria e isso acontece pelo desconhecimento. Assim há o receio de prescrição pelos médicos e de utilização pelos pacientes e seus familiares, que encaram a utilização da insulina como uma punição, uma vez que a via de administração é mais invasiva e incômoda (SBD, 2009; 2014).

A conduta terapêutica é feita conforme a condição inicial do paciente e entre os agentes medicamentosos disponíveis para a terapia do diabetes incluem-se os antidiabéticos orais e a insulina. Há evidências de que o controle intensivo da glicemia nos pacientes com diabetes tipo 2, tanto por meio de antidiabéticos orais ou insulina, substancialmente diminui o risco de complicações microvasculares (UKPDS, 1998).

A insulino terapia no DM2 está indicada sempre que as metas laboratoriais não se mantêm adequadas com os agentes orais, no caso de hiperglicemia sintomática e de emagrecimento, como forma de reposição progressiva baseada na evolução de HbA1C. Assim, é importante destacar que a insulino terapia oportuna pode ser necessária a qualquer tempo durante a evolução natural do DM2 (SBD, 2014).

Existem insulinas de ação curta, intermediária e longa e os tipos de insulina e seus análogos disponíveis no Brasil são a insulina regular, aspart e lispro (curta ação), a insulina Protamina Neutra de Hagedorn (NPH) que é uma suspensão de insulina num complexo de zinco / protamina (ação intermediária) e a glargina (ação longa). Elas permitem diferentes esquemas de administração como forma de mimetizar a secreção fisiológica (FUCHS, *et al.* 2006).

A insulina é um hormônio relacionado ao metabolismo, mas também à função vascular e à hemostasia. Estudos têm demonstrado que a insulina estimula a produção de PAI-1, assim, um excesso deste hormônio é capaz de promover anormalidades em suas concentrações, aumentando o risco de eventos trombótico (COSTA *et al.*, 2006).

### **2.1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO DM2 E COMPLICAÇÕES**

O DM2 está associado ao aumento do risco de complicações microvasculares, sendo as mais prevalentes a nefropatia, retinopatia e neuropatia e de complicações macrovasculares, com destaque para doença arterial coronariana (DAC), o acidente vascular cerebral (AVC) e a doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) (BROWNLEE, 2001; NAZIMEK-SIEWNIAK *et al.*, 2002). O DM2 é uma doença multifatorial que associa hiperglicemia a um conjunto de fatores de risco cardiovasculares, incluindo hipertensão, obesidade visceral, dislipidemia, microalbuminúria e hipercoagulabilidade. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) acomete cerca de 70% dos indivíduos com DM2 e esses, geralmente, apresentam controle glicêmico ineficaz e dislipidemia (ZIMMET, 2001).

Cerca de 80% dos indivíduos diabéticos morrem em decorrência de eventos trombóticos e 75% a 80% dessas mortes resultam de eventos cardiovasculares (CARR, 2001). A presença de sobrepeso e obesidade exerce uma influência considerável na elevada morbidade e mortalidade da doença decorrente principalmente da associação com a doença cardiovascular (ERBERLY *et al.*, 2003). Um estudo na população brasileira revelou que 75% dos indivíduos com DM2 não estava na faixa de peso ideal, sendo que um terço tinha obesidade (GOMES *et al.*, 2006). Atualmente temos evidências suficientes de que o melhor controle da glicemia no início da doença (STRATTON *et al.*, 2000), da pressão arterial (UKPDS, 1998) e da dislipidemia (HEART, 2003) resulta em uma redução significativa nas complicações microvasculares e macrovasculares do paciente diabético.

As complicações macrovasculares do diabetes se devem principalmente à formação de placas ateroscleróticas. A insulina está envolvida no metabolismo de lipídeos, uma vez que ela regula a transcrição da lipase lipoproteica endotelial,

enzima que hidrolisa os triglicerídeos presentes nas VLDL e nos quilomicrons. Assim, alterações na concentração e na funcionalidade da insulina promovem alterações no metabolismo lipídico favorecendo as complicações macrovasculares no diabetes (DAVIS & GRANNER, 1996). Além da regulação exercida pela insulina, a disfunção endotelial também favorece a hipertrigliceridemia, uma vez que a enzima lipase lipoproteica endotelial, encontra-se reduzida também nessa situação. Dessa forma, há um favorecimento da formação de placas ateroscleróticas (KASHIWAZAKI *et al.*, 1998) e a manutenção dos níveis plasmáticos ideais dos lipídeos constitui um dos objetivos do tratamento dos indivíduos diabéticos para evitar a progressão das complicações macrovasculares secundárias ao diabetes (WHO, 2013).

A hiperglicemia causa anormalidades no fluxo sanguíneo e aumenta a permeabilidade vascular. A presença de hiperglicemia persistente durante a evolução da doença pode levar a alterações estruturais permanentes de tecidos e funções celulares e, por isso, é tão importante monitorar a glicemia dos pacientes, principalmente ao primeiro sinal de hiperglicemia (UKPDS, 1998; GROSS & MASTROTOTARO, 2000; BROWLEE, 2005; BECKMAN, *et al.*, 2013).

#### **2.1.4 HIPERGLICEMIA E ENDOTÉLIO VASCULAR**

A parede dos vasos sanguíneos é coberta internamente por uma fina camada celular chamada endotélio. As células endoteliais possuem um papel primordial na manutenção da fluidez sanguínea, tônus e permeabilidade vasculares. Este cumpre sua função de manutenção do tônus vascular pela liberação de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras (PANENI, *et al.* 2013). Além disso, são responsáveis por controlar funções vasculares, respostas à expressão gênica e sinalização de processos celulares, como crescimento, apoptose, migração e remodelamento da matriz extracelular (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005).

Uma das substâncias liberadas pelas células endoteliais é o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) / Óxido nítrico (NO) capaz de dilatar os vasos em resposta à liberação de acetilcolina. Igualmente, estas células sintetizam e liberam prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio

(EDHFs), que também são considerados EDRFs por reduzir o tônus vascular (vasodilatadores). Além dos EDRFs, que são benéficos à função vascular e garantem a fluidez sanguínea, o endotélio produz os fatores de constrição derivados do endotélio (EDCFs) (WONG *et al.*, 2010). Embora as substâncias químicas que representem os EDCFs ainda não estejam bem elucidadas, nos últimos anos, muitas pesquisas têm apontado a prostaglandina H<sub>2</sub>, o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), os leucotrienos, os anions de endotelina e o superóxido como exemplos sugeridos de EDCFs (VANHOUTTE *et al.*, 2009).

A produção equilibrada destes fatores é primordial para manter a homeostase vascular, no entanto, algumas doenças, como o diabetes, prejudicam a liberação e função dos EDRFs, reduzindo as dilatações endotélio dependentes e aumentam a liberação de EDCFs, contribuindo para vasoconstrição e complicações vasculares (VANHOUTTE *et al.*, 2009; THOMAS *et al.*, 2008). Este desequilíbrio leva à disfunção endotelial e esta contribui para o desenvolvimento da aterosclerose por gerar inflamação, rigidez arterial e alteração do tônus e fluxo arteriais. Assim, a disfunção endotelial tem sido apontada como a principal responsável pela lesão inicial da aterosclerose e um marcador precoce de doença cardiovascular (PANENI *et al.*, 2013; BECKMAN, *et al.*, 2013).

Evidências sugerem que a hiperglicemia causa excesso de produção de ROS gerando um quadro de estresse oxidativo capaz de induzir disfunção endotelial e inflamação, desempenhando um papel importante no desencadeamento de doença vascular no diabetes (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005; CREAGER, *et al.*, 2003; WILD *et al.*, 2004; PANENI, *et al.* 2013).

O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre enzimas oxidantes e antioxidantes, com conseqüente aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e é um determinante crítico da disfunção endotelial no DM2. (MEZZETTI, *et al.* 2000; HAJDARA, *et al.* 2006) A geração de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), induzida pela hiperglicemia, inativa NO ao formar peroxinitrito (ONOO<sub>2</sub>), um oxidante poderoso que penetra facilmente através das membranas de fosfolípidios e induz a nitrosilação de substratos. (CREAGER *et al.*, 2003). As proteínas nitrosiladas diminuem a atividade de enzimas endoteliais antioxidantes e da NO sintetase,

reduzindo a produção de NO e retroalimentando o estresse oxidativo (PANENI *et al.*, 2013).

Os superóxidos diminuem a quantidade e inibem a função de NO, prostaciclina e outros EDHF e mediam a resposta EDCF por ativar COXs aumentando a produção de prostaglandinas vasoconstritoras. Além disso, as ROS podem aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias e de aderência celular (YANG *et al.*, 2004), uma vez que, levam a um aumento de NF-kB e à transcrição de genes pró-inflamatórios que codificam selectinas, moléculas de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e de adesão intracelular-1 (ICAM-1). Isso facilita a adesão de monócitos ao endotélio vascular, diapedese no sub-endotélio e subsequente formação de células espumosas, o que caracteriza as placas ateroscleróticas (PANENI, *et al.* 2013; BECKMAN, *et al.*, 2013).

Para explicar a produção de ROS induzida pela hiperglicemia, complexos mecanismos bioquímicos têm sido propostos no sentido de associar as anormalidades estruturais e funcionais dos tecidos vasculares à hiperglicemia. (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005; SANTINI, 1997) São eles, a via dos polióis, o fluxo das hexosaminas, a formação de produtos de glicação avançada (AGEs) e a ativação da proteína quinase C (PKC). (GIACCO & BROWNLEE, 2010; NISHIKAWA *et al.*, 2000)

#### **2.1.4.1 Ativação da proteína quinase C (PKC)**

Estudos sugerem que PKC é a molécula que mais afeta a homeostase vascular em virtude da hiperglicemia. A PKC é uma quinase serinatreonina envolvida em eventos de transdução de sinais e que atua catalisando a transferência de um grupo fosfato do ATP a várias proteínas. Para ser ativada, a PKC também deve sofrer fosforilação e esta ocorre em resposta ao aumento do mensageiro lipídico diacilglicerol (DAG), seu principal ativador (IDRIS *et al.*, 2001; BROWLEE, 2001; BROWLEE, 2005)

Estados de hiperglicemia aumentam os níveis DAG, que ativa a PKC. Uma consequência importante desta ativação é a geração de mais ROS, sendo esta, uma das principais fontes de ROS através da hiperglicemia. Uma vez ativada, a PKC é responsável por diversas alterações estruturais e funcionais da vasculatura,



incluindo aumento da permeabilidade celular, angiogênese, crescimento celular, expansão da matriz extracelular, apoptose, inflamação e estados prótrombóticos (KOYA, *et al.*, 1997; GERALDES, *et al.* 2010).

A enzima NADPH oxidase do tipo fagocítica é a maior fonte de produção de ROS em muitas células não-fagocíticas, como fibroblastos, células musculares lisas e endoteliais (GREENE, *et al.*, 1999; BROWLEE, 2001; BROWLEE, 2005). Em pequenas quantidades, a produção de ROS pela oxidase, é primordial para a sinalização metabólica, no entanto, em grandes quantidades pode gerar dano oxidativo. A NADPH oxidase é formada por subunidades que podem ser fosforiladas por quinases, como a PKC, formando uma oxidase ativa cataliticamente. (KITADA *et al.*, 2003; EL-BENNA *et al.*, 2005) Assim, em células endoteliais vasculares, a ativação da PKC induzida pela hiperglicemia aumenta a produção de superóxido por meio de NADPH oxidase (INOGUCHI, *et al.* 2000; PANENI, *et al.* 2013; BECKMAN, *et al.* 2013).

A PKC pode afetar o endotélio não só pelo acúmulo intracelular de ROS, mas também por diminuir a atividade da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) (ALP, 2004; CONSENTINO, 1997). Além disso, a PKC também promove aumento da produção de endotelina-1 (ET-1), favorecendo a vasoconstrição e agregação plaquetária (GERALDES *et al.*, 2010). A produção de ROS dependente de PKC também participa do processo aterosclerótico, desencadeando inflamação vascular e propiciando estados prótrombóticos pelo aumento de PAI-1. (GIACCO, *et al.*, 2010).

A disfunção endotelial no diabetes não é apenas o resultado da não disponibilidade de NO, mas também do aumento da síntese de vasoconstritores e prostanóides (PANENI *et al.*, 2013; HINK *et al.*, 2001). O aumento dos níveis da ciclo-oxigenase - 2 (COX2) mediada pela PKC associa-se a um aumento de tromboxano A2 e uma redução da prostaciclina (PGI2) (PANENI, *et al.* 2013; BECKMAN, *et al.*, 2013).

#### **2.1.4.2 Aumento da produção de produtos de avançada glicação (AGEs)**

Os AGEs são proteínas ou lipídios que se tornam glicados após a exposição a açúcares oxidados e contribuem para o desenvolvimento de aterosclerose. Eles

podem ser gerados por auto-oxidação da glicose paraglioxal, decomposição de produtos de amadori em 3-deoxiglucosona ou fragmentação do gliceraldeído-3-fosfato em metilglioxal (WELLS-KNECHT *et al.*, 1995). As ROS mitocondriais também aumentam a síntese de AGEs (PANENI *et al.*, 2013; BECKMAN *et al.*, 2013).

A geração de AGEs leva à disfunção celular, provocando a ativação de seus receptores (RAGEs) em células endoteliais, mesangiais e macrófagos. (YAN *et al.*, 2010; BIERHAUS *et al.*, 2005) Acredita-se que os AGEs ao interagirem com seus receptores, estimulam a produção de ROS com consequente ativação de citocinas inflamatórias como as interleucinas 1 e 6, fator de crescimento I, fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), prostaglandinas e fator estimulador de colônias de granulócitos (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005).

Os AGEs se acumulam na maioria dos órgãos-alvo que podem ser acometidos no diabetes, como rim, retina e placas ateroscleróticas. (HAMMES *et al.*, 1999) A glicação irreversível do colágeno subendotelial e de outras proteínas estruturais do vaso forma produtos que acumulam no subendotélio em função do tempo e dos níveis glicêmicos e estão diretamente relacionados à aterosclerose e insuficiência renal ( MEIGS *et al.*, 2000; TAKEUCHI *et al.*, 2001; TAN *et al.*, 2002;).

Os AGEs promovem mudanças na estrutura e nas propriedades biofísicas da membrana basal causando alterações na permeabilidade e na capacidade vasodilatadora dos vasos (TOOKE *et al.*, 1995; PANENI *et al.* 2013; BECKMAN *et al.*, 2013). Além disso, a glicação de fatores de transcrição provoca maior expressão de genes pró-trombóticos (PAI-1) e pró-inflamatórios (TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1) pelas células endoteliais (DOI *et al.*, 1992; FULOP *et al.*, 2007; BUSE *et al.*, 2006).

A sinalização AGE- RAGE ativa ainda outras vias bioquímicas sensíveis a ROS, como o fluxo das hexosaminas e fluxo da via dos polióis (PANENI *et al.*, 2013; BECKMAN *et al.*, 2013).

#### **2.1.4.3 Ativação da via dos polióis**

A produção de ROS induzida pela glicose também ativa o fluxo da via dos polióis envolvida em alterações vasculares (NISHIKAWA *et al.*, 2000; BECKMAN *et*

*al.*, 2013; PANENI *et al.*, 2013). A aldose redutase é a primeira enzima da via dos polióis e utiliza o NADPH como cofator para reduzir aldeídos tóxicos a álcoois inativos e, em menor quantidade, a glicose a sorbitol (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005).

A hiperglicemia regula positivamente a via dos polióis, através da atividade elevada da aldose redutase e sorbitol desidrogenase, resultando numa diminuição da proporção NADPH/NAD<sup>+</sup> associada a um aumento da proporção NADHcitosolico/NAD<sup>+</sup>. Subsequentemente ocorre a supressão da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase, culminando no aumento de ROS (MEZZETTI *et al.*, 2000; HAIDARA *et al.*, 2006). Assim, a ativação da aldose redutase promove maior conversão de glicose a sorbitol, reduz o NAPH e a glutatona (antioxidantes intracelulares) e gera ainda mais estresse oxidativo (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005; PANENI *et al.*, 2013; BECKMAN *et al.*, 2013).

#### **2.1.4.4 Ativação da via das hexosaminas**

Em um ambiente hiperglicêmico, um aumento do fluxo de frutose 6 fosfato ativa uma cascata de eventos que resulta em diferentes padrões de glicosilação e que são responsáveis pela desregulação de enzimas envolvidas na homeostase vascular, como a redução da atividade e disfunção da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) (FULOP *et al.*, 2007; GIACCO *et al.*, 2010). A ativação da via hexosamina resulta em maior oxidação de eNOS, aumento da produção de citocinas inflamatórias e aumento da transcrição de PAI-1 (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005).

Diante do exposto, o estresse oxidativo é o mecanismo que, como consequência da hiperglicemia, parece ser capaz de unificar todas as vias descritas. Assim alteração central de todos estes processos parece ser a produção aumentada de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial induzida pela hiperglicemia (BROWLEE, 2001; BROWNLEE, 2005; PANENI *et al.*, 2013; BECKMAN *et al.*, 2013).

## 2.2 HEMOSTASIA, HIPERCOAGULABILIDADE E HIPOFIBRINÓLISE

Além do endotélio vascular, o processo hemostático depende da interação complexa e harmônica entre os componentes intravasculares que incluem as plaquetas, as proteínas plasmáticas da coagulação, da anticoagulação e da fibrinólise (JOBE, 1992; LOTSPEICH-STEININGER *et al.*, 1992).

A integridade endotelial é primordial para a manutenção da fluidez sanguínea uma vez que previne agregação plaquetária, apresenta propriedades anticoagulantes e estimula o sistema fibrinolítico. Assim, para que a coagulação seja iniciada, é preciso que aconteça a exposição de componentes que, em estados normais, estão localizados no interior dos vasos sanguíneos (VAM HINSBERG *et al.*, 2001).

As lesões vasculares e as alterações bioquímicas, como a liberação de endotoxinas e citocinas, podem precipitar a expressão do fator tecidual (FT) pelas células endoteliais e monócitos no espaço intravascular. Após a exposição do FT, a coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica seqüencial de pró-enzimas por proteases do plasma, resultando na formação de trombina, que converte por proteólise o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel. É, portanto, uma cadeia de reações composta pelos fatores da coagulação, íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e fosfolipídios presentes nas membranas e nos tecidos (FRANCO *et al.*, 2001; LORENZI *et al.*, 2003).

O processo de coagulação é regulado por sistemas anticoagulantes endógenos como a antitrombina (AT), a proteína C (PC) e a proteína S (PS) que permitem que a formação de fibrina seja limitada ao local da lesão endotelial (DAHLBACK *et al.*, 2005).

O sistema fibrinolítico tem por função a degradação da fibrina resultante do processo de coagulação. O mecanismo pelo qual isto ocorre consiste na conversão do plasminogênio, pela ação do ativador do plasminogênio (t-PA), em plasmina, uma potente enzima proteolítica que atua sobre a fibrina levando à formação de produtos de degradação que possuem diferentes pesos moleculares. O menor fragmento desta degradação é o dímero-D (D-Di), que possui uma meia vida plasmática de 8 horas, com taxa urinária de eliminação (LIJNERT *et al.*, 2003).

Quando os níveis plasmáticos de D-Dímero estão aumentados, há indicação tanto de maior formação de fibrina como de ação aumentada da plasmina, sendo considerado um marcador sanguíneo tanto de fibrinólise como de hipercoagulabilidade. Na prática clínica, valores plasmáticos superiores a 500 ng/dL podem estar relacionados principalmente a trombose venosa profunda (TVP) e/ou embolia pulmonar, infarto agudo de miocárdio (IAM) e/ou angina instável, coagulação intravascular disseminada (CIVD) aguda ou crônica e cirurgia recente. Existe, portanto, a associação entre os níveis de dímero-D e a presença de doenças trombóticas, mas clinicamente, sua maior relevância é para exclusão de tromboembolismo pulmonar em serviços de emergência (NWOSE *et al.*, 2007; WAKABAYASHI *et al.*, 2009; Mc BANE *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2010).

A fibrinólise pode ainda sofrer a ação de ativadores e de inibidores. Um inibidor é o inibidor do ativador do plasminogênio do tipo 1 (PAI-1) que promove a inibição dos ativadores do plasminogênio tipo tecidual (t-PA) e tipo uroquinase (u-PA) resultando em menor formação de plasmina (RIJKEN *et al.*, 2005).

O PAI-1 é uma proteína produzida por células endoteliais, tecido hepático e adiposo. Sua expressão é regulada por fatores de transcrição nucleares chamados PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) e que também estão envolvidos no metabolismo da glicose e dos lipídios (COSTA *et al.*, 2006). Sua síntese é estimulada pela interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF), fatores de crescimento e hormônios como estrógeno e insulina. (SOARES *et al.*, 2010) Assim, como insulina estimula a produção de PAI-1 (COSTA *et al.*, 2006), um excesso deste hormônio é capaz de promover anormalidades em suas concentrações, aumentando o risco de eventos trombóticos.

A literatura tem sugerido que pacientes com diabetes apresentam, geralmente, estados de hipercoagulabilidade e hipofibrinólise, com a presença de níveis elevados dos marcadores hemostáticos (YAMADA *et al.*, 2000; ASO *et al.*, 2000; MEIGS *et al.*, 2000; CARR *et al.*, 2001; MCBANE *et al.*, 2010).

A hiperglicemia e a hiperinsulinemia atuam sobre o sistema fibrinolítico estimulando a produção de PAI-1. Dessa forma, ambos os estados associam-se à hipofibrinólise de forma independente (DU, *et al.*, 2000). Tal condição favorece a

permanência do coágulo de fibrina e, conseqüentemente, o desenvolvimento de trombos (YUDKIN *et al.*, 1999; DU *et al.*, 2000).

Estudos têm evidenciado uma redução na capacidade fibrinolítica e níveis elevados de PAI-1 em pacientes com doença coronariana estabelecida e também em indivíduos saudáveis que desenvolveram doença coronariana durante o acompanhamento (THOGERSEN *et al.*, 1998; FALCO *et al.*, 2001). No entanto, outros estudos questionam o papel do PAI-1 neste cenário, uma vez que a associação desapareceu após ajuste para fatores confundidores como DM2, hipertensão arterial, IMC e triglicérides (FOLSOM *et al.*, 2001).

O inibidor do ativador do plasminogênio do tipo 1 (PAI-1) parece ser mais que um simples marcador de síndrome metabólica, podendo ser considerado um verdadeiro componente desta, e ser, inclusive, um atraente alvo para o desenvolvimento de drogas futuras (WESTRICK *et al.*, 2007; ZORIO *et al.*, 2008).

Os níveis de PAI-1 foram aumentados em pacientes com síndrome metabólica e com DM2 com síndrome metabólica. Há indícios de que os níveis de PAI-1 estão associados com parâmetros da síndrome metabólica como IMC, HDL-c e resistência à insulina, que são parâmetros considerados como risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (MEIGS *et al.*, 2006; AL-HAMODI *et al.*, 2011).

Assim, nível elevado de PAI- 1 parece ser um fator de risco independente para o desenvolvimento do DM2 em indivíduos saudáveis, ou seja, o aumento de PAI-1, provavelmente, precede o desenvolvimento de DM2 (GRANT *et al.*, 2007).

Outros distúrbios do sistema hemostático como aumento da formação de trombina e altos níveis de fibrinogênio foram encontrados em pacientes diabéticos com risco cardiovascular (JUHAN-VAGUE *et al.*, 1996; DEGUCHI *et al.*, 2000; VAN *et al.*, 2003). Além disso, o estado de hiperglicemia de pacientes com diabetes determina que a fibrina formada seja mais rígida, resultante do fibrinogênio glicado, o que também dificulta a degradação do coágulo (SOARES *et al.*, 2010; UNDAS *et al.*, 2014).

Sabe-se que D-Di e PAI-1 são marcadores hemostáticos aumentados em pacientes com DM2, no entanto, como a etiologia da complicação vascular no diabético é multifatorial, não se sabe se o estado de hipercoagulabilidade é causa ou

conseqüência da lesão vascular. Alguns estudos, inclusive, mostram que o nível sanguíneo elevado de PAI-1 também é um fator de risco independente para o desenvolvimento do DM2 em indivíduos saudáveis (GRANT *et al.*, 2007).

Os eventos trombóticos são causados por vários fatores hereditários e adquiridos, que agem isoladamente ou em conjunto, resultando em uma situação de desequilíbrio hemostático e induzindo uma condição pró-trombótica (GEMMATI *et al.*, 1998). Dentre os fatores genéticos têm sido descritos dois polimorfismos no gene do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), que pode estar relacionado com a patogênese da trombose venosa e da doença coronariana. A inserção ou deleção de um nucleotídeo na região promotora do gene do PAI-1 (-675 4G/5G) foi identificada a 675 pb antes do início da transcrição. Este polimorfismo produz dois alelos contendo quatro ou cinco sequências de guaninas (G). Estudos *in vitro* têm mostrado aumento da transcrição do gene associado à presença do alelo 4G, o que explica, provavelmente, o mecanismo pelo qual é observado o aumento dos níveis plasmáticos de PAI-1 em indivíduos portadores desse alelo. Recentemente, foi descrita a associação do polimorfismo 4G/5G com parâmetros da síndrome metabólica, indicando que este pode aumentar o risco de DM2 e doença cardiovascular (AL-HAMODI *et al.*, 2012). Portanto, a genotipagem deste polimorfismo pode ser relevante para avaliar o risco de trombose ou doença coronariana (NAUCK *et al.*, 1999). O genótipo 4G/4G tem sido associado à retinopatia diabética em pacientes com DM2 (FUNK *et al.*, 2005; EZZIDI *et al.*, 2009).

### **2.3 DIABETES MELLITUS E INFLAMAÇÃO**

A aterosclerose é uma doença inflamatória originada por multifatores e de evolução crônica que acontece devido à agressão ao endotélio vascular (SBD, 2013)

A disfunção endotelial faz com que lipoproteínas plasmáticas, como a LDLc, tornem-se mais permeáveis, atravessem o endotélio e cheguem à camada íntima, favorecendo seu acúmulo no espaço subendotelial. As partículas de LDLc sofrem oxidação e favorecem o surgimento de moléculas de adesão leucocitárias na superfície endotelial que são responsáveis por atrair monócitos e linfócitos para a íntima. No espaço subendotelial os monócitos se diferenciam e macrófagos que

fagocitam as LDLc oxidadas formando as células espumosas, principal componente da lesão aterosclerótica inicial. A progressão da placa ocorre mediante secreção pelos macrófagos, de citocinas inflamatórias e de enzimas proteolíticas degradadoras de colágeno e outros componentes teciduais. Mesmo que em menor quantidade, os linfócitos T no interior do ateroma também produzem citocinas inflamatórias e contribuem para evolução do processo inflamatório (HANSSON, 2005).

As células musculares lisas da camada arterial média são estimuladas por mediadores da inflamação a proliferarem e migrarem para a camada íntima, passando a produzir citocinas, fatores de crescimento e matriz extracelular. Assim, são componentes da placa aterosclerótica, elementos celulares, núcleo lipídico e necrótico e componentes da matriz extracelular. Quando estáveis, possuem maior quantidade de colágeno apresentados em espessas capas fibrosas, poucas células inflamatórias e pequenos núcleos lipídicos e necróticos. No entanto, as placas instáveis possuem acentuada atividade inflamatória e proteolítica, proeminentes núcleos lipídicos e necróticos e uma fina capa fibrótica (LIBBY *et al.*, 2005). São as instáveis que mais determinam as manifestações clínicas da aterosclerose, uma vez que a ruptura dessa capa libera material lipídico altamente trombogênico, culminando na formação sobrejacente de trombos (aterotrombose) (CUCHEL *et al.*, 2007).

As células hepáticas produzem proteínas inflamatórias, sendo as mais relevantes da prática clínica, a proteína C reativa (PCR) e o fibrinogênio, que têm sido consideradas marcadores de inflamação sistêmica.

A PCR é uma proteína sintetizada por hepatócitos, células endoteliais e adipócitos, e cuja regulação é feita por citocinas inflamatórias (WU *et al.*, 2006; ABDELLAOUI *et al.*, 2007). Além dos estados inflamatórios agudos, os níveis de PCR estão ligeiramente aumentados em estados inflamatórios crônicos, como a aterosclerose. Assim, a inflamação é extremamente relevante no desenvolvimento e na progressão da aterosclerose, uma vez que o aumento dos marcadores de inflamação ocorre anos antes do evento coronariano (HERNÁNDEZ *et al.*, 2006).

Estudos têm evidenciado que a PCR inibe a óxido nítrico sintetase endotelial e conseqüentemente a liberação de NO, induz a expressão de moléculas de adesão,



estimula produção de fator tecidual e a captação de colesterol pelos macrófagos, e promove ativação plaquetária e aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos (PRADHAM *et al.*, 2001; MOJIMINIYI *et al.*, 2002; DARVALL *et al.*, 2007; DANDONA *et al.*, 2007).

O fibrinogênio é uma glicoproteína de alto peso molecular composta por dois pares de três cadeias polipeptídicas não idênticas, que são ligadas por pontes de hidrogênio (SAITO *et al.*, 1996).

A trombose arterial pode ser definida como um acúmulo crônico de ateroma, seguido de ruptura da placa, agregação plaquetária e falência do sistema fibrinolítico em lisar o trombo (BAUER, 1998). O fibrinogênio é capaz de promover trombose arterial por meio da formação de fibrina, agregação plaquetária e aumento da viscosidade plasmática. Além disso, ele induz a proliferação de células do endotélio, corroborando para o desenvolvimento da aterosclerose (DARVALL *et al.*, 2007).

Assim, a inflamação que acompanha a aterosclerose pode colaborar para os níveis elevados de fibrinogênio e este pode contribuir para trombose arterial na medida em que aumenta a formação de fibrina, a viscosidade plasmática, a agregação plaquetária e proliferação muscular lisa (ERNST *et al.*, 1997).

O aumento dos níveis plasmáticos de fibrinogênio também é considerado um fator de risco independente para a doença cardiovascular (JUHAN-VAGUE, 1996; DEGUCHI, *et al.*, 2000; VAN & ROSENDAAL, 2003) e este se encontra aumentado nos pacientes com DM2. (DUNCAN *et al.*, 1999; YUDKIN *et al.*, 1999; MEIGS *et al.*, 2000).

Os indivíduos que apresentam síndrome metabólica, estado que geralmente antecede o DM2, possuem um quadro subclínico de inflamação crônica. A insulina é um hormônio que promove o aumento da síntese hepática de albumina e diminuição de fibrinogênio e PCR. Assim, indivíduos com a redução dos efeitos fisiológicos da insulina ou resistência à insulina, perdem esta função e podem ter os níveis desses marcadores inflamatórios aumentados. (DARVALL *et al.*, 2007; DANDONA *et al.*, 2007; FESTA *et al.*, 2000; SCHIMIDT *et al.*, 1999).

Um estudo prospectivo de fatores de risco para doença cardiovascular em adultos com idade igual ou superior a 65 anos avaliou 5.888 pessoas que tinham glicemia de jejum normal e o papel dos marcadores inflamatórios, PCR e

fibrinogênio, no desenvolvimento do DM2. Os pacientes que desenvolveram DM2 apresentaram níveis basais mais elevados de PCR do que aqueles que se mantiveram normoglicêmicos. Pacientes com níveis elevados de PCR tiveram 2,03 vezes mais chance de desenvolver diabetes durante o acompanhamento (BARZILARY *et al.*, 2001).

No *Insulin Resistance Atherosclerosis Study* (IRAS), foi observado um aumento linear dos níveis de PCR com o aumento do número de desordens metabólicas. Posteriormente, nesse mesmo estudo, foram analisados os níveis de PCR e fibrinogênio em pacientes que desenvolveram diabetes em cinco anos de acompanhamento. Os pacientes apresentavam valores basais significativamente mais elevados de fibrinogênio e PCR quando comparados aos que não desenvolveram diabetes (FESTA *et al.*, 2000).

Neste ínterim, evidências têm sugerido que a inflamação crônica pode preceder o desenvolvimento do DM2 e valores elevados dos marcadores inflamatórios como PCR e fibrinogênio podem identificar uma população de alto risco entre pessoas com tolerância normal à glicose, com o potencial de prevenir doença aterosclerótica e DM2 (BARZILARY *et al.*, 2001; FESTA *et al.*, 2002).

**3 OBJETIVOS**

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação de marcadores bioquímicos, hemostáticos e inflamatórios em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 em insulinização do território de Consolação, Vitória / ES.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização bioquímica de pacientes com diabetes tipo 2 em insulinização, através da avaliação de: hemoglobina glicada, glicemia de jejum, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicerídeos, proteína C reativa ultrasensível, ureia e creatinina;
- Determinar os níveis plasmáticos de inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), D-Dímero (D-Di) e fibrinogênio para caracterizações hemostática e inflamatória de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 em insulinização;
- Correlacionar os marcadores inflamatórios e hemostáticos (PAI-1, fibrinogênio e D-dímero) entre si e com parâmetros clínicos, bioquímicos e antropométricos em pacientes com DM2 em insulinização;
- Correlacionar a presença de polimorfismo (-675 4G/5G) na região promotora do gene do PAI-1 com seus níveis plasmáticos em pacientes com DM2 em insulinização;
- Estudarmos a razão de ocorrência das covariáveis e sua influência nos indivíduos afetados para predizer, independentemente, a ocorrência de DM2 em insulinização.

## ***4. METODOLOGIA***

Trata-se de um estudo de caso-controle, onde as observações e estudo de resultados foram referentes a indivíduos com diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), especificamente os que utilizam insulina, e indivíduos sem diabetes mellitus (controles). Ao todo foi tomada uma amostra de 80 pessoas, sendo dessas 40 portadoras de DM2 em insulinização e as outras 40, indivíduos sem DM.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) (anexo 1) e os indivíduos que participaram do estudo, após serem convidados e receberem explicações sobre o projeto, responderam ao questionário de pesquisa (Apêndice 1) e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice 2).

## **4.1 CASUÍSTICA**

### **4.1.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO**

A Atenção Básica (AB) é caracterizada por um conjunto de ações de promoção, prevenção, recuperação e reabilitação de saúde nos âmbitos individual e coletivo que são realizadas através do trabalho em equipe e dirigidas a populações de territórios delimitados. Como forma de implementar a AB, o Governo Federal propôs aos municípios a Estratégia de Saúde da Família (ESF), que é direcionada para a comunidade com foco nas famílias, para as quais promove suas principais ações (MS, 2006).

Os participantes deste estudo pertencem ao território de saúde composto pelos bairros Horto, Consolação, São Benedito e Gurigica (Floresta e Jaburu) do município de Vitória / ES. Este território conta com um total de 11.645 habitantes que são atendidos pela equipe de ESF da Unidade Básica de Saúde de Consolação (PMV/IBGE, 2011). A principal causa de mortalidade é devido às doenças cardiovasculares que contabilizam 32,6% das mortes no local, sendo maior que a média nacional de 31,9% (PMV, 2012).

É o território do município com o maior número de famílias cadastradas no programa bolsa família do governo nacional, sendo que sua população caracteriza-se pelo alto índice de analfabetismo, baixa escolaridade e baixa renda familiar, o que pode refletir negativamente no estilo de vida bem como dificultar a compreensão e

conscientização de seus processos nosológicos. O território possui ainda um alto índice de violência, sendo classificado como de alto risco socioeconômico. Além disso, apresenta-se como morros, becos e escadarias, fruto de sua ocupação desordenada, o que pode prejudicar o acesso dos usuários aos serviços oferecidos pela Unidade Básica de Saúde de Consolação bem como influenciar na qualidade de vida e acesso às necessidades básicas (PMV, 20012).

#### **4.1.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Foram incluídos 40 indivíduos adultos, de ambos os sexos, na faixa etária de 25 a 80 anos, cadastrados e atendidos pela Estratégia Saúde da Família (ESF) de uma Unidade Básica de Saúde (UBS) do município de Vitória, com diagnóstico clínico e laboratorial de diabetes mellitus tipo 2 há pelo menos um ano e que tivessem evoluído para insulinoterapia. Para o grupo controle, foram incluídos 40 indivíduos adultos com idade entre 25 e 80 anos sem histórico de diabetes mellitus.

Assim, os pacientes selecionados compuseram os seguintes grupos:

- Grupo controle: 40 indivíduos que não possuíam diabetes mellitus.
- Grupo com DM2: 40 indivíduos com diagnóstico clínico e laboratorial de DM2 e já evoluídos para insulinoterapia.

#### **4.1.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Foram excluídos de ambos os grupos, indivíduos que apresentavam qualquer uma das seguintes condições:

- Câncer;
- Doença infecciosa aguda ou processo infeccioso em desenvolvimento;
- Doença hepática crônica;
- Gravidez;
- Alcoolismo;
- Distúrbios da coagulação;

- Uso de antiagregante plaquetário e/ou anticoagulantes;
- Terapia de reposição hormonal;
- Início do uso de anticoncepcional contendo derivados de estrogênio nos três meses antecedentes ao estudo;
- Submissão à cirurgia nos três meses antecedentes ao estudo.

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 AMOSTRA BIOLÓGICA**

A coleta de sangue foi realizada entre março e novembro de 2013. Foi solicitado aos participantes que respeitassem um período de 12 horas de jejum antes da coleta que foi feita por punção venosa utilizando um sistema de tubos sob vácuo (Vacuette®).

Para as dosagens bioquímicas, glicemia de jejum (GJ), hemoglobina glicada (HbGA1c), ureia, creatinina, 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 do sistema Vacuette® com anticoagulante EDTA e 4,0 mL de sangue venoso em tubos do sistema Vacuette® 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 coletados 4mL de sangue venoso em tubos do sistema Vacuette® com anticoagulante EDTA. As amostras obtidas foram aliqüotadas, identificadas e armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA no laboratório de Bioquímica Clínica da UFES.

Para as dosagens dos marcadores hemostáticos, foram coletados 4,0 mL de sangue venoso em tubos com citrato de sódio 3,8%. As amostras obtidas em citrato foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 20 minutos, para obtenção das amostras de plasma pobre em plaquetas, e foram aliqüotadas, identificadas e armazenadas a - 80° C até o momento das dosagens de PAI-1, d-dímero e fibrinogênio na UFES.



## **4.2.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS E ANTROPOMÉTRICOS**

Os parâmetros sexo, idade, tabagismo, índice de massa corporal (IMC), tempo de diagnóstico, tempo de início da insulinoterapia, presença de história familiar de diabetes, resistência à insulina (RI), hipertensão arterial sistêmica (HAS), hipotireoidismo, 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.

## **4.2.3 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, além de evidenciar os marcadores renal e inflamatório dos participantes.

### **4.2.3.1 Perfil Glicêmico**

#### *4.2.3.1.1 Determinação de hemoglobina glicada (HbA1C)*

A determinação da hemoglobina glicada foi feita por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna de troca iônica, utilizando o sistema VARIANT II HbA1C (Bio-Rad), seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes. Valor de referência conforme citado em tópico anterior (SBD, 2014 e ADA, 2013).

#### *4.2.3.1.2 Determinação de glicose (glicemia de jejum)*

As concentrações de glicose foram determinadas por ensaio colorimétrico enzimático com hexoquinase, utilizando os sistemas automatizados Roche/Hitachi cobas, seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes. Valor de referência conforme citado em tópico anterior (SBD, 2014 e ADA, 2013).

#### *4.2.3.1.3 Determinação da resistência à insulina (RI)*

Neste estudo, adotaremos para determinação da resistência à insulina o modelo 3 proposto por Stern et al, que define os seguintes critérios:

- IMC > 28,7 Km/m<sup>2</sup>, ou
- IMC > 27,5 Km/m<sup>2</sup> + história familiar de DM, ou
- História familiar de DM negativa, mas triglicérideo > 2,44 mmol/L (216 mg/dL) (STERN *et al.*, 2005; SBD, 2009; SBD, 2014).

#### 4.4.3.2 Perfil Lipídico

##### 4.2.3.2.1 Determinação de Triglicerídio

As concentrações de triglicerídio foram determinadas por ensaio colorimétrico enzimático com lipase lipoproteica, utilizando os sistemas automatizados Roche/Hitachi cobas, seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes.

Valor de referência (SBC, 2013):

- Adultos acima de 20 anos:
- Ótimo: < 150 mg/dL
- Limítrofe: 150 a 200 mg/dL
- Elevado: 200 a 499mg/dL
- Muito elevado ≥ 500 mg/dL

##### 4.2.3.2.2 Determinação de Colesterol total

As concentrações de colesterol total foram determinadas por ensaio colorimétrico enzimático com colesterol oxidase, utilizando os sistemas automatizados Roche/Hitachi cobas, seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes.

Valor de referência (SBC, 2013):

- Adultos acima de 20 anos:
- Desejável: < 200 mg/dL
- Limítrofe: 200 a 239 mg/dL
- Elevado: ≥ 240 mg/dL

#### 4.2.3.2.3 Determinação de Colesterol LDL

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).

Equação de Friedewald:  $LDLc = CT - (HDLc + VLDLc)$

Valor de referência (SBC, 2013):

- Adultos acima de 20 anos:
- Ótimo: < 100 mg/dL
- Desejável: 100 a 129 mg/dL
- Limítrofe: 130 a 159 mg/dL
- Elevado: 160 a 189 mg/dL
- Muito elevado  $\geq$  190 mg/dL

#### 4.2.3.2.4 Determinação de Colesterol HDL

As dosagens de colesterol HDL foram feitas por teste colorimétrico enzimático na presença de íons de magnésio e sulfato de dextrano, utilizando os sistemas automatizados Roche/Hitachi cobas, seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes.

Valor de referência (SBC, 2013):

- Adultos acima de 20 anos:
- Baixo: < 40 mg/dL
- Elevado: > 60 mg/dL

#### 4.2.3.2.5 Determinação de Colesterol VLDL

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

$VLDLc = TG/5$  (para  $TG < 400$  mg/dL)

Valor de referência (SBC, 2013):

- Inferior a 30 mg/Dl

#### **4.2.3.3 Marcadores Renais**

##### *4.2.3.3.1 Determinação de Uréia*

As concentrações de ureia foram determinadas por ensaio colorimétrico enzimático com urease / glutamato desidrogenase, utilizando os sistemas Roche/Hitachi cobas

Valor de referência (SBC, 2013):

- ≤ 65 anos: < 50 mg/dL
- > 65 anos: < 71 mg/dL

##### *4.2.3.3.2 Determinação de Creatinina*

A creatinina plasmática foi determinada por ensaio colorimétrico cinético baseado no método de Jaffé com picrato alcalino, utilizando os sistemas automatizados Roche/Hitachi cobas, seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes.

Valor de referência (SBC, 2013):

- Homens: 0,7 a 1,2 mg/dL
- Mulheres: 0,5 a 0,9 mg/dL

#### **4.2.3.4 Marcador de inflamação**

##### *4.2.3.4.1 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, utilizando os sistemas automatizados Roche/Hitachi cobas, seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes.

Valor de referência (SBC, 2013):

- Adulto: < 0,5 mg/dL

#### **4.2.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS GENÉTICOS**

##### **4.2.4.1 Extração do DNA genômico**

O DNA genômico dos pacientes foi extraído com o kit “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. Uma alíquota de 300 µL da amostra de sangue total de cada paciente foi transferida para um tubo *ependorf* de 1,5 mL estéril e incubada com uma solução de lise de hemácias por dez minutos, à temperatura ambiente. Após, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm, durante um minuto em microcentrífuga. A etapa foi repetida. Houve o descarte do sobrenadante e ao sedimento foi adicionada solução de lise celular. Foi adicionada solução de precipitação de proteínas e a amostra foi agitada em vórtex durante trinta segundos. A amostra foi centrifugada a 14.000 rpm durante três minutos. Para um tubo contendo isopropanol, foi transferido o sobrenadante contendo DNA e a amostra foi invertida cerca de trinta vezes para precipitação do DNA. A amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por três minutos. O isopropanol foi descartado e, em seguida, adicionado etanol a 70%. Os tubos foram invertidos por cerca de trinta vezes, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras permaneceram secando por doze horas. Foi adicionado 30µL de solução de hidratação (Tris 10 mM/ EDTA 0,1 mM) e houve incubação em banho seco à 65°C por 1 hora.

O DNA de cada amostra foi quantificado usando-se um espectrofotômetro (NanoDrop® ND-2000 UV-vis). Após este procedimento, as amostras foram armazenadas em geladeira para posterior pesquisa do polimorfismo.

##### **4.2.4.2 Detecção do polimorfismo - 675 4G/5G**

O polimorfismo - 675 4G/5G na região promotora do gene do PAI-1 foi detectado utilizando a técnica de PCR alelo específica. Esta foi padronizada de acordo com condições previamente descritas, utilizando-se os oligonucleotídeos descritos na literatura (MANSFIELD et al., 1995) (Quadro 1).

**Quadro 1 - Oligonucleotídeos sintéticos utilizados na PCR para detecção do polimorfismo (- 675 4G/5G) na região promotora do gene do PAI-1**

Mutação	Óligo senso	Óligo antisenso
PAI-1 4G	5' GTC TGG ACA CGT GGG GA 3'	
PAI-1 5G	5' GTC TGG ACA CGT GGG GG 3'	
PAI-1 4G/5G	5' AAG CTT TTA CCA TGG TAA CCC CTG GT 3'	5' TGC AGC CAG CCA CGT GAT TGT CTA G 3'

Polimorfismo 4G/5G no gene do *PAI-1* (MANSFIELD, *et al.*, 1995).

Para a PCR, foi utilizado o termociclador modelo S1000 ThermalCycler da marca BIO-RAD, 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 (Promega<sup>®</sup>). As misturas foram preparadas para um volume final de 20 µL.

As condições de amplificação, como o número de ciclos, concentração de reagentes e temperatura de anelamento foram padronizados para cada segmento genômico a ser amplificado com o objetivo de se obter um bom sinal de amplificação com o mínimo de inespecificidade (Quadros 2 e 3). 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 nas PCR's para detecção do polimorfismo (- 675 4G/5G) na região promotora do gene do PAI-1**

Reagentes	Concentração	Concentrações de uso	
	Estoque	<i>PAI-1 4G</i>	<i>PAI-1 5G</i>
Tampão	5X (7,5mM MgCl <sub>2</sub> )	1X (1,5mM MgCl <sub>2</sub> )	1X (1,5mM MgCl <sub>2</sub> )
Dntp	2mM	0,2 Mm	0,2 mM
Óligo senso	100 µM	10 µM (4G)	10 µM (5G)
Óligo antisenso	100 µM	10,0 µM	10,0 µM
Taq polimerase	5 U/µL	1U	1U
DNA	53 ng/µL (média)	212 ng	212 ng
Água qsp	*	20µL	20µL

qsp: quantidade suficiente para

**Quadro 3 - Programa de PCR, para detecção do polimorfismo (- 675 4G/5G) na região promotora do gene do PAI-1, utilizado no termociclador**

Etapas	Gene a ser amplificado
	<i>PAI-1 (4G/5G)</i>
Desnaturação prévia	95° - 5 min
Desnaturação	95° - 1 min
Anelamento	58° - 1 min
Extensão	72° - 1 min
N ° de ciclos	25 ciclos
Extensão final	72° - 5 min

Após amplificação do segmento específico para os gene PAI-1 4G5G, foi realizada e eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata. Através da separação eletroforética foi possível verificar se o indivíduo analisado foi heterozigoto 4G5G, homozigoto 4G4G ou homozigoto 5G5G, conforme o perfil de bandas apresentado no Quadro 4 .

**Quadro 4 - Perfil de bandas (PCR alelo específica PAI-1 4G5G)**

Polimosfismo PAI-1 (4G5G)		
4G	5G	Genótipo
260pb	260pb	Controle
139 pb	—	4G4G
—	139 pb	5G5G
139 pb	139 pb	4G5G

## **4.2.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS**

### **4.2.5.1 Determinação dos níveis plasmáticos de PAI1**

A determinação dos níveis plasmáticos do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) foi feita pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay), utilizando-se IMUBIND<sup>®</sup> Plasma PAI-1 ELISA REF 822 (American Diagnostica<sup>®</sup> Inc. – Estados Unidos), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada a 490 nm.

Valor de referência (SBC, 2011):

- Normal: 0 a 47 ng/mL

### **4.2.5.2 Determinação dos níveis plasmáticos de d-dímero (D-di)**

A determinação dos níveis plasmáticos do d-dímero foi feita pelo ensaio imunoturbidimétrico com intensificação da reação por partícula (aglutinação em látex de segunda geração) para determinação quantitativa dos produtos de degradação da fibrina em plasma humano, utilizando os sistemas Roche/Hitachi cobas c, seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. Alta sensibilidade e intermediária especificidade.

Valor de referência (SBC, 2004):

- Normal: < 0,5 µg/mL

### **4.2.5.3 Determinação dos níveis plasmáticos de fibrinogênio**

A determinação do fibrinogênio foi realizada pelo método de Clauss, utilizando o conjunto diagnóstico Dade<sup>®</sup> Fibrinogen Determination Reagents (SIEMENS), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

Valor de referência (SBC, 2013):

- Normal: 180 a 350 mg/dL



#### 4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística inicial foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0. O estudo contou com variáveis quantitativas e qualitativas (categóricas). Antes da comparação entre os grupos e para verificar quais variáveis quantitativas possuíam distribuição normal foi realizado teste de Shapiro Wilk. Para comparação das variâncias foi realizado teste F.

Quando as variáveis quantitativas dos dois grupos comparados apresentaram distribuição normal e não houve diferença estatística entre as variâncias, o teste realizado foi t de Student. Quando as variáveis quantitativas dos dois grupos comparados apresentaram distribuição normal, mas houve diferença estatística entre as variâncias foi realizado teste T com correção de Welch e quando as variáveis quantitativas de ambos os grupos não seguiram a normalidade, foi realizado o teste não paramétrico de Mann Whitney.

A comparação entre os grupos estratificados por genótipo foi feita utilizando análise de variância de 1 fator para grupos independentes (ANOVA) seguida do teste de bonferroni post hoc, para as variáveis que apresentaram distribuição normal. Para as variáveis que apresentaram distribuição fora da normalidade, a comparação entre mais de dois grupos foi realizada com teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de múltipla comparação de Dunn post hoc.

Para verificar a homogeneidade entre dois grupos, foi realizada análise de frequência das variáveis qualitativas através dos testes qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou exato de Fisher. Considerando que o N total sempre foi  $\geq 37$ , o teste de Fisher foi usado quando algum valor da tabela de contingência foi  $< 5$  e o  $\chi^2$ , quando todos os valores foram  $> 5$ . Para a frequência entre mais de dois grupos foi realizado o teste  $\chi^2$  em todas as situações.

Para a investigação da correlação entre os parâmetros estudados foi feito teste de Pearson, para as variáveis com distribuição normal e teste de Spermán para as variáveis com distribuição fora da normalidade.

Para filtrar os agentes que mais explicassem o modelo e a contribuição dessas variáveis na implicação de ter DM2 ou não sob as condições pré-estabelecidas no desenvolvimento do estudo, os dados foram compilados no

*Software SPSS 20.0* e após agregação das variáveis significativas ao nível  $p$  (0.20 – 20%) pelo teste de associação  $\chi^2$ , foi realizado um modelo de Regressão Logística Bivariada com as variáveis mais significativas para a estimação das *Odds Ratio*. Destaca-se que o método de escolha das variáveis utilizado foi um *Backward Stepwise Conditional*, significativo ao  $p$  valor  $< 0.05$  (5%). Neste modelo, foi utilizado o cálculo dos *Odds Ratio* bruto e ajustado, mas foi considerado o *Odds Ratio* ajustado por ser uma medida mais precisa, uma vez que parte da estimação do parâmetro que mede cada variável no modelo e não apenas da razão de proporcionalidade feita no cálculo do *Odds Ratio* bruto. A partir da construção do intervalo de confiança (0,05 – 5%) para o *Odds Ratio* ajustado foi extraída a informação de quanto a covariável influencia na característica omitida que está sendo usada para comparação no modelo.

## ***5 RESULTADOS***

## 5.1 CARACTERIZAÇÕES CLÍNICA E ANTROPOMÉTRICA

Para a composição do grupo de estudo, este trabalho contou com a participação de pacientes cadastrados em uma unidade básica de saúde com estratégia saúde da família (ESF), pertencente ao município de Vitória / ES. Todos os 104 pacientes cadastrados nesta unidade, com diagnóstico de DM2 que evoluíram para insulinização, receberam um convite com dia e hora para explicação sobre a participação no projeto.

Dos 104 pacientes convidados, 66 compareceram e concordaram em participar do estudo, assinaram termo o TCLE e responderam ao questionário da pesquisa. Destes, foram selecionados 42 pacientes que respeitavam os critérios de inclusão e exclusão do estudo. Os 42 pacientes seguiram para a coleta de sangue, realizada no posto de coleta da unidade de saúde. Dois pacientes foram excluídos devido erro de coleta de amostra.

A seleção do grupo controle totalizou 40 pacientes que não possuíam diagnóstico de DM2 e que concordaram em participar do estudo mediante assinatura do TCLE, seguindo os mesmos procedimentos do grupo DM2.

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 e valores p estão representadas na tabela 1.

O teste  $X^2$  mostrou que houve homogeneidade entre os grupos no que diz respeito à variável sexo ( $p = 0,1520$ ). Além disso, a média de idade dos participantes de ambos os grupos assim como a idade por faixa etária também foram estatisticamente iguais, como evidenciam os testes de Mann Whitney ( $p = 0,9539$ ) e qui quadrado ( $p = 0,2770$ ), respectivamente (tabela 1).

O teste exato de Fisher não resultou em diferença estatística em relação à variável qualitativa tabagismo ( $p = 0,1084$ ) entre os participantes dos dois grupos. Da mesma maneira, o teste T de Student mostrou que a média dos valores do índice de massa corporal dos participantes não foi uma variável com diferença estatística entre os grupos deste estudo ( $p = 0,5712$ ), conforme tabela 1.

A variável IMC foi ainda categorizada em obeso e não obeso, de acordo com as recomendações da Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESCO, 2009), que admite como obeso o indivíduo com  $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ . O teste  $\chi^2$  de Pearson realizado para a análise de associação mostrou que, ao nível de significância igual a 0,05 (5%), a variável IMC categorizada (obesidade) não foi estatisticamente diferente entre os grupos, mesmo que o grupo DM2 em insulinação tenha ficado com a maior porcentagem de pacientes alterados destas categorias (tabela 1).

Em relação à resistência à insulina (RI), classificada segundo 3º modelo de Stern et al (STERN *et al*, 2005; SBD, 2011; 2014), o teste  $\chi^2$  não mostrou diferença estatística entre os grupos ( $p = 0,0736$ ), estando presente em 16 indivíduos (40%) do grupo controle e em 24 (60,0%) pacientes do grupo DM2 em insulinação (tabela 1).

A caracterização do grupo DM2 em insulinação mostrou que, em relação ao tempo de duração do DM2, 34 pacientes (85%) possuíam a doença há mais de 5 anos e que a duração da insulinação destes indivíduos estava em torno de 5,54 ( $\pm 5,846$ ) anos (Tabela 1).

Os pacientes de ambos os grupos foram classificados como hipertensos ou não mediante diagnóstico médico explicitado em prontuário e foram classificados como dislipidêmicos conforme os parâmetros estipulados pela V Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (SBC, 2013), o que seria a alteração de pelo menos um dos parâmetros LDLc, HDLc e/ou TGC no momento da coleta.

Neste contexto, o teste  $\chi^2$  evidenciou diferença estatística na frequência de hipertensão ( $p = 0,0001$ ) e de dislipidemia ( $p = 0,0124$ ) entre os grupos, sendo ambas mais frequentes no grupo DM2 insulizado. No entanto, o teste exato de Fisher mostrou não haver diferença estatística na frequência de hipotirteoidismo ( $p = 0,9999$ ) entre os participantes dos dois grupos (tabela 1).

**Tabela 1 – Características sociodemográficas, clínicas e antropométricas dos participantes dos grupos controle e DM2 em insulinização.**

Variável	Categoria	Grupo controle	Grupo DM2 em insulinização	Valor p
Sexo (n, %)	Feminino	30 (75,0%)	24 (60,0%)	0,152 <sup>(a)</sup>
	Masculino	10 (25,0%)	16 (40,0%)	
Idade (M ± DP)	-	57.05 ± 2.386	57.33 ± 1.819	0,9539 <sup>(b)</sup>
Idade por faixa etária (n, %)	20 A 29 anos	00 (0,0%)	01 (2,5%)	0,2770 <sup>(a)</sup>
	30 A 39 anos	08 (20,0%)	03 (7,5%)	
	40 A 49 anos	08 (20,0%)	05 (12,5%)	
	60 A 79 anos	07 (17,5%)	11 (27,5%)	
	80 ou mais	17 (42,5%)	20 (50,0%)	
Tabagismo (n, %)	Fumante	01 (2,5%)	06 (15,0%)	0,1084 <sup>(d)</sup>
	Não Fumante	39 (97,5%)	34 (85,0%)	
IMC (M ± DP)	-	27,75 ± 0,9683	28,43 ± 0,7354	0,5712 <sup>(c)</sup>
IMC categorizado (n, %)	Obeso	14 (37,8%)	10 (25,0%)	0,2240 <sup>(a)</sup>
	Não obeso	23 (62,2%)	30 (75,0%)	
Resistência à insulina (n, %)	Presente	16 (40%)	24 (60,0%)	0,0736 <sup>(a)</sup>
	Ausente	24 (60%)	16 (40,0%)	
DM2 há mais de 5 anos (n, %)	-	-	34 (85,0)	-
Duração Insulinização (M ± DP)	-	-	5,54 ± 5,846	-
Hipertensão Arterial Sistêmica (n, %)	Presente	15 (37,5%)	32 (80,0%)	0,0001 <sup>(a)</sup>
	Ausente	25 (%)	08 (20,0%)	
Dislipidemia (n, %)	Presente	11 (27,5%)	22 (55,0%)	0,0124 <sup>(a)</sup>
	Ausente	29 (72,5%)	18 (45,0%)	
Hipotireoidismo (n, %)	Presente	02 (5,0%)	01 (2,5%)	0,9999 <sup>(d)</sup>
	Ausente	38 (95,5%)	39 (97,5%)	

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

(a) Teste  $\chi^2$ ; (b) Teste de Mann Whitney; (c) Teste T de Student; (d) Teste exato de Fisher

Com relação aos medicamentos em uso, o teste  $\chi^2$  não mostrou diferença estatística na frequência do uso dos medicamentos representados pelas classes diurético tiazídico (hidroclorotiazida), betabloqueador (atenolol) e inibidor da ECA (enalapril). O teste exato de Fisher também evidenciou não haver diferença estatística na frequência do uso dos medicamentos representados pelas classes antagonista da angiotensina II (losartan), inibidor canal cálcio (anlodipino), diurético de alça (furosemida), estatina (sinvastatina) e fibrato (fenofibrato). Em relação ao grupo DM2 em insulinização, todos os 40 pacientes (100%) relataram o uso, possuíam prescrição médica e dispensação regular de insulina NPH, 05 (12,5%) de insulina regular e 22 (55%) de metformina (tabela 2).

**Tabela 2 – Tipo e frequência de medicamentos em uso pelos participantes dos grupos controle e DM2 em insulinização.**

Variável	Grupo Controle (N = 40)	Grupo com DM2 em insulinização (N = 40)	Valor p
Enalapril (n, %)	08 (20)	13 (32,5)	0,2044 <sup>(a)</sup>
Losartan (n, %)	03 (7,5)	10 (25,0)	0,0660 <sup>(b)</sup>
Atenolol (n, %)	07 (17,5)	08 (20,0)	0,7772 <sup>(a)</sup>
Anlodipino (n, %)	01 (2,5)	05 (12,5)	0,2007 <sup>(b)</sup>
Hidroclorotiazida (n, %)	12 (30,0)	18 (45,0)	0,1658 <sup>(a)</sup>
Furosemida (n, %)	4 (10,0)	01 (2,5)	0,3588 <sup>(b)</sup>
Sinvastatina (n, %)	01 (2,5)	06 (15,0)	0,1084 <sup>(b)</sup>
Fenofibrato (n, %)	00 (0,0)	02 (5,0)	0,4936 <sup>(b)</sup>
Levotiroxina (n, %)	02 (5,0)	01 (2,5)	0,9999 <sup>(b)</sup>
Metformina (n, %)	-	22 (55,0)	-
Insulina NPH (n, %)	-	40 (100,0)	-
Insulina Regular (n, %)	-	05 (12,5)	-

Diferença estatística para  $p < 0,05$  (5%); (a) Teste  $\chi^2$ ; (b) Teste exato de Fisher

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

Os parâmetros bioquímicos, dosados pelo laboratório central da PMV foram representados por variáveis quantitativas que ajudaram a compor os perfis glicêmico (glicemia e HbA1C) e lipídico (CT, HDLc, LDLc, VLDLc e Triglicerídeos) além de evidenciarem os marcadores renal (uréia e creatinina) e de inflamação (PCRus).

Os valores referentes à mediana e intervalo interquartil de cada variável bem como análise estatística entre os grupos e valor p estão representados na tabela 3.

**Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos dos participantes dos grupos controle e DM2 em insulinização expressos como mediana, intervalo interquartil e valor p.**

Variável	Grupo controle	Grupo DM2 em insulinização	Valor p <sup>(a)</sup>
	Mediana (Q3 – Q1)	Mediana (Q3 – Q1)	
GJ (mg/dL)	93,0 (87,1 – 98,6)	197,5 (120,5 – 246,8)	< 0.0001*
HbA1c (%)	5,4 (5,1 – 5,7)	9,6 (7,8 – 12,1)	< 0.0001*
CT (mg/dL)	200,0 (180,3 – 223,3)	195,5 (160,0 – 231,5)	0,6215
LDLc (mg/dL)	117,0 (108,3 – 139,3)	125,5 (84,7 – 148,0)	0,7388
HDLc (mg/dL)	50,0 (40,2 – 57,7)	44,0 (37,0 – 49,0)	0,0042*
VLDLc (mg/dL)	23,0 (16,7 – 28,0)	29,0 (19,0 – 36,2)	0,0224*
Triglicerídeo (mg/dL)	117,5 (85,5 – 148,0)	150,0 (98,7 – 205,3)	0,0339*
Creatinina (mg/dL)	0,7 (0,6 – 0,8)	0,8 (0,6 – 1,4)	0,1302
Uréia (mg/dL)	27,5 (15,8 – 81,9)	32,45 (18,9 – 182,9)	0,0355*
PCRus (mg/dL)	0,24 (0,07 – 0,35)	0,32 (0,18 – 0,61)	0,0212*

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

GJ: glicemia de jejum, HbA1C: hemoglobina glicada, CT: colesterol total, PCRus: proteína C reativa ultra sensível, (a) Teste de Mann Whitney; Q3-Q1: Intervalo interquartil.

Neste contexto, a análise revelou que houve diferença estatística entre os grupos no que diz respeito ao perfil glicêmico, representado pelas variáveis HbA1c ( $p < 0,0001$ ) e glicemia de jejum ( $p < 0,0001$ ) (tabela 3).



Em relação ao perfil lipídico, as variáveis HDLc ( $p = 0,0042$ ), VLDLc ( $p = 0,0224$ ) e triglicérido ( $p = 0,0339$ ) foram estatisticamente diferentes entre os grupos, enquanto que as variáveis colesterol total e LDLc não foram tiveram diferença ( $p > 0,05$ ) (tabela 3).

Dentre os marcadores que expressam a função renal dos pacientes, apenas a uréia mostrou diferença estatística entre os grupos ( $p = 0,0355$ ), uma vez que a variável creatinina resultou em  $p > 0,05$ . O marcador de inflamação PCRus foi estatisticamente diferente entre os grupos ( $p = 0,0212$ ) (tabela 3).

Além das variáveis glicemia de jejum e hemoglobina glicada, que são critérios para diagnóstico de diabetes mellitus, o teste  $\chi^2$  mostrou que os grupos também apresentaram diferença estatística em relação à frequência de parâmetros considerados normais ou alterados, segundo os valores de referência, para as variáveis VLDLc ( $p = 0,0210$ ), triglicérido ( $0,0210$ ) e creatinina ( $0,0220$ ). Estas variáveis apresentaram-se acima dos valores de referência considerados normais, respectivamente, em 20 (50,0%), 20 (50,0%) e 12 (30,8%) pacientes do grupo DM2 e em 10 (25%), 10 (25%) e 04 (10%) indivíduos do grupo controle (tabela 4).

Conforme já mencionado, quando os valores de glicemia de jejum estão entre 100 e 125 mg/dL e/ou de hemoglobina glicada estão entre 5,7 e 6,4 mg/dL, pode-se evidenciar que o indivíduo esteja em um estado de tolerância alterada à glicose (SBD, 2011). Em vista deste parâmetro, é importante ressaltar que, no momento analisado, 13 participantes do grupo controle (32,5%) enquadravam-se neste estado, muito embora que, para fins clínicos, haja necessidade de confirmação dos níveis plasmáticos mediante nova dosagem.

**Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos dos participantes dos grupos controle e DM2 em insulinização categorizados por seus valores de referência e valor p.**

Variável	Categoria	Controle		DM2 em insulinização		Valor p <sup>(a)</sup>
		N	%	N	%	
GJ	Alterado	0	0,0%	31	77,5%	< 0,0001*
	Normal	40	100,0%	9	22,5%	
HbA1c	Alterado	0	0,0%	36	90,0%	< 0,0001*
	Normal	40	100,0%	4	10,0%	
CT	Alterado	20	50,0%	19	47,5%	0,8230
	Normal	20	50,0%	21	52,5%	
HDLc	Alterado	9	22,5%	14	35,0%	0,2170
	Normal	31	77,5%	26	65,0%	
LDLc	Alterado	15	37,5%	16	40,0%	0,8180
	Normal	25	62,5%	24	60,0%	
VLDLc	Alterado	10	25,0%	20	50,0%	0,0210*
	Normal	30	75,0%	20	50,0%	
TGC	Alterado	10	25,0%	20	50,0%	0,0210*
	Normal	30	75,0%	20	50,0%	
Uréia	Alterado	2	5,0%	3	7,5%	0,6440
	Normal	38	95,0%	37	92,5%	
Creatinina	Alterado	4	10,0%	12	30,8%	0,0220*
	Normal	36	90,0%	27	69,2%	
PCRus	Alterado	7	17,5%	11	27,5%	0,2840
	Normal	33	82,5%	29	72,5%	

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

GJ: glicemia de jejum, HbA1c: hemoglobina glicada, CT: colesterol total, TGC: triglicerídeo, PCRus: proteína C reativa ultra sensível, (a) Teste  $\chi^2$

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO HEMOSTÁTICA DOS PARTICIPANTES

Para a avaliação dos marcadores hemostáticos, foram realizadas as determinações plasmáticas de fibrinogênio, D-Di e PAI-1. 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.

Segundo teste t de Student, foi observada diferença estatística nos níveis médios de fibrinogênio entre os grupos ( $p = 0,0153$ ), sendo que o nível médio de fibrinogênio foi maior no grupo DM2 em insulinização. Os níveis médio de D-Di e

PAI-1 não foram estatisticamente diferentes entre os grupos, segundo os testes de Mann Whitney ( $p = 0,2889$ ) e t de Student ( $p = 0,0826$ ), respectivamente.

**Tabela 5 - Níveis plasmáticos de fibrinogênio, D-Di e PAI-1 nos grupos controle e DM2 em insulinização expressos como médias, desvios padrão, mediana, intervalo interquartil e valor p.**

\* Indica diferença estatística para  $p < 0,05$ , (a) Teste t de Student, (b) Teste de Mann Whitney

Marcador	Grupo controle		Grupo DM2 em insulinização		Valor p
	Média $\pm$ DP	Mediana (Q3 – Q1)	Média $\pm$ DP	Mediana (Q3 – Q1)	
Fibrinogênio (mg/dL)	297,7 $\pm$ 8,9	292,0 (268,7 – 335,5)	332,8 $\pm$ 10,8	341,1 (288,9 – 381,5)	0,0153 <sup>(a)</sup>
D-Di ( $\mu$ g/mL)	0,566 $\pm$ 0,292	0,504 (0,383 – 0,701)	0,769 $\pm$ 0,114	0,533 (0,430 – 0,806)	0,2889 <sup>(b)</sup>
PAI-1 (ng/mL)	43,9 $\pm$ 3,7	38,8 (27,2 – 57,9)	35,7 $\pm$ 2,9	32,2 (18,8 – 49,3)	0,0826 <sup>(a)</sup>

D-Di: d-dímero, PAI-1: Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1

**Tabela 6 – Parâmetros hemostáticos dos participantes dos grupos controle e DM2 em insulinização, categorizados por seus valores de referência e valor p.**

Variável	Categoria	Controle		DM2 em insulinização		Valor p <sup>(a)</sup>
		N	%	N	%	
Fibrinogênio	Alterado	07	17,9%	18	45,0%	0,0100*
	Normal	32	82,1%	22	55,0%	
D-Di	Alterado	19	51,4%	25	64,1%	0,2600
	Normal	18	48,6%	14	35,9%	
PAI-1	Alterado	15	38,5%	11	27,5%	0,3000
	Normal	24	61,5%	29	72,5%	

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

D-Di: d-dímero; PAI-1: Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1

(a) Teste  $\chi^2$

O teste  $\chi^2$  mostrou que, somente em relação à variável fibrinogênio ( $p = 0,010$ ), houve diferença estatística em relação à frequência de parâmetros considerados normais ou alterados, segundo os valores de referência. O fibrinogênio apresentou-se acima dos valores de referência considerados normais em 7 (17,9%)

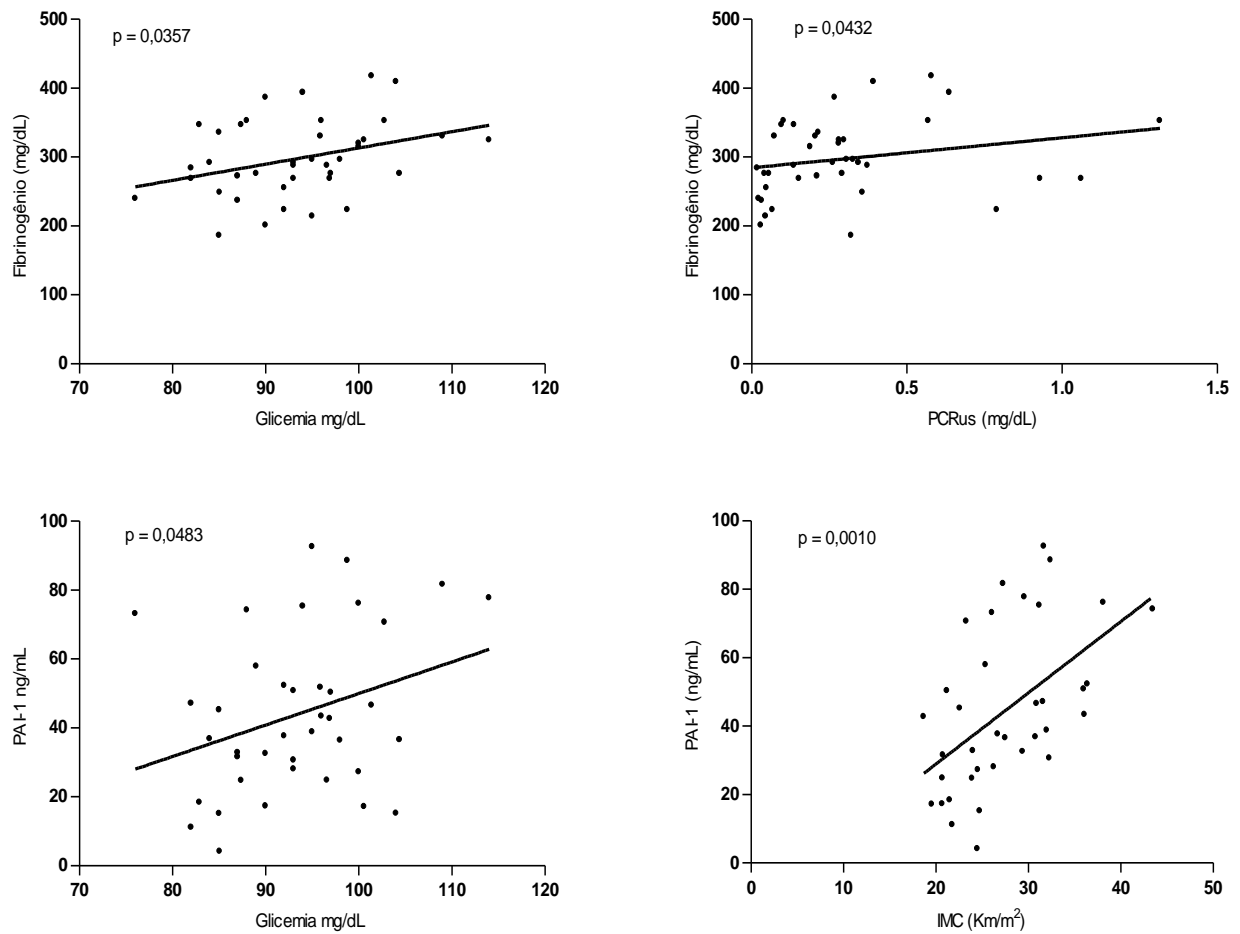
pacientes do grupo controle e em 18 (45,0%) pacientes do grupo DM2 (tabela 6). Embora sem diferença estatística, importante mencionar que a frequência de indivíduos com níveis de PAI-1 alterados foi superior no grupo controle em relação ao grupo DM2 (tabela 6).

As correlações estatisticamente significativas entre os marcadores avaliados encontram-se na tabela 7. Foi observada correlação positiva entre os níveis plasmáticos de fibrinogênio e glicemia, fibrinogênio e PCR, PAI-1 e glicemia e PAI-1 e IMC no grupo controle. Também houve correlação positiva entre os níveis de fibrinogênio e D-Di, fibrinogênio e PCR, PAI-1 e triglicérideo e PAI-1 e IMC no grupo DM2 em insulinização. Houve ainda correlação negativa entre os níveis de D-Di e glicemia no grupo DM2 em insulinização.

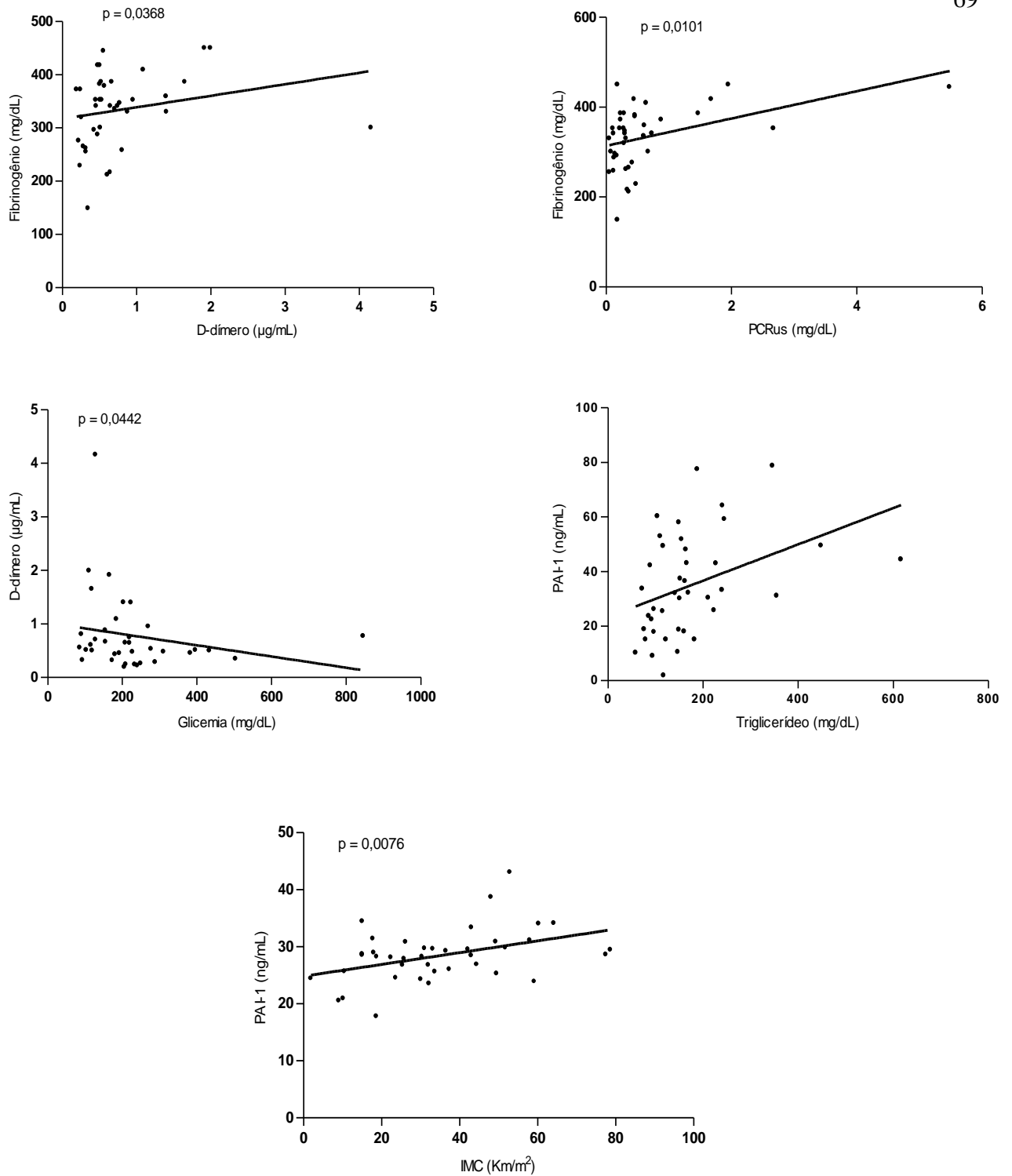
**Tabela 7 - Coeficiente de Correlação (r) de Spearman e valor p para os marcadores Fibrinogênio, D-Di e PAI-1 nos participantes dos grupos controle e DM2 em insulinização.**

Grupo	Marcadores	R	Valor p
Controle	Fibrinogênio e glicemia	0,33	0,0357 <sup>*(a)</sup>
	Fibrinogênio e PCR	0,32	0,0432 <sup>*(b)</sup>
	PAI-1 e glicemia	0,32	0,0483 <sup>*(a)</sup>
	PAI-1 e IMC	0,52	0,0010 <sup>*(a)</sup>
DM2 em insulinização	Fibrinogênio e D-Di	0,33	0,0368 <sup>*(b)</sup>
	Fibrinogênio e PCR	0,40	0,0101 <sup>*(b)</sup>
	D-Di e glicemia	- 0,33	0,0442 <sup>*(b)</sup>
	PAI-1 e triglicérideo	0,48	0,0019 <sup>*(b)</sup>
	PAI-1 e IMC	0,42	0,0076 <sup>*(a)</sup>

\* Indica diferença estatística para  $p < 0,05$  (5%); r: Coeficiente de Correlação; D-Di: D dímero  
(a) Teste de correlação de Pearson; (b) Teste de correlação de Spearman



**Figura 1 – Gráficos de dispersão correspondentes às correlações do grupo controle estatisticamente significantes para  $p < 0,05$ : fibrinogênio e glicemia, fibrinogênio e PCRus, PAI-1 e glicemia, PAI-1 e IMC**

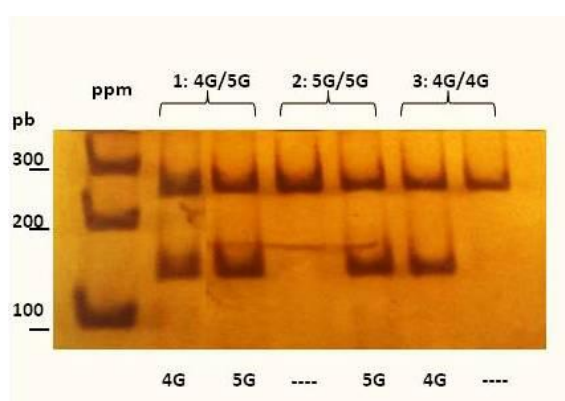


**Figura 2 – Gráficos de dispersão correspondentes às correlações do grupo DM2 em insulinação estatisticamente significantes para  $p < 0,05$ : fibrinogênio e D-Di, fibrinogênio e PCRus, D-Di e glicemia (negativa), PAI-1 e triglicérido, PAI-1 e IMC**

#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS PARTICIPANTES

A investigação da presença do polimorfismo para a deleção/inserção -675 4G/5G no gene do PAI-1 foi realizada em todos os participantes do estudo.

A figura 3 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata, para a detecção do polimorfismo 4G/5G no gene do *PAI-1*. O padrão de peso molecular corresponde à primeira canaleta. As canaletas 2 e 3 representam o genótipo heterozigoto 4G/5G, as canaletas 4 e 5 exibem o genótipo homozigoto para a deleção (5G/5G) e as canaletas 6 e 7 mostram o homozigoto para a inserção (4G/4G).



Legenda: Canaletas: 1) PPM, 2-3) genótipo 4G5G, 4-5) genótipo 5G/5G e 6-7) genótipo 4G4G.

**Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção do polimorfismo (-675 4G/5G) na região promotora do gene do *PAI-1*, através da técnica de PCR alelo específico.**

A figura 4 e a tabela 8 mostram as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo 4G/5G na região promotora do gene do *PAI-1*. O teste  $\chi^2$  mostrou diferença estatística ( $p = 0,0483$ ) na composição dos grupos caso e controle tanto em relação à frequência dos genótipos do polimorfismo 4G/5G como na frequência dos alelos ( $p = 0,0158$ ).

No grupo controle, 08 (20,0%) indivíduos foram homozigotos para a deleção (4G/4G), 18 (45,0%) heterozigotos (4G/5G) e 14 (35,0%) homozigotos 5G/5G. Além disso, as frequências dos alelos 4G e 5G foram, respectivamente, 0,42 e 0,58 no grupo controle (figura 4).

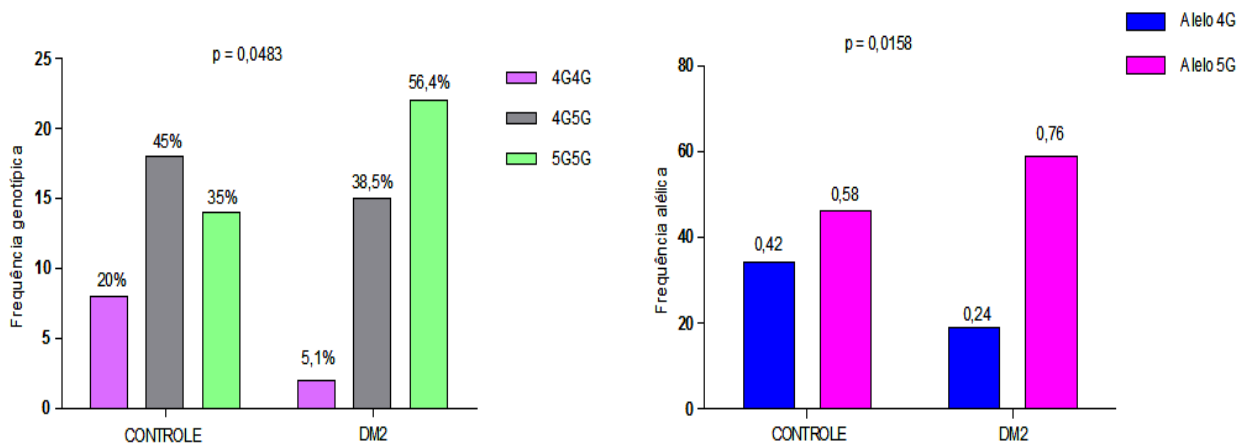
Entre os pacientes do grupo DM2 em insulinização, 02 (5,1%) foram homozigotos 4G/4G, 15 (38,5%) foram heterozigotos 4G/5G e 22 (56,4%)

homozigotos 5G/5G. A frequência dos alelos 4G e 5G foram, respectivamente, 0,24 e 0,76 no grupo DM2 em insulinização (figura 4).

**Tabela 8 – Parâmetros genéticos dos pacientes dos grupos controle e DM2 em insulinização.**

		Frequências genotípica e alélica		
		Controle n (%)	DM2 em insulinização n (%)	Valor p <sup>(a)</sup>
Polimorfismo	4G/4G	8 (20%)	2 (5,1%)	0,0483*
	4G/5G	18 (45%)	15 (38,5%)	
	5G/5G	14 (35%)	22 (56,4%)	
Alelo	4G	34 (0,42)	19 (0,24)	0,0158*
	5G	46 (0,58)	59 (0,76)	

\* Indica diferença estatística para  $p < 0,05$   
(a) Teste  $\chi^2$



**Figura 4 - Frequência genotípica e alélica do polimorfismo (-675 4G/5G) na região promotora do gene do PAI-1), nos grupos controle e DM2 em insulinização.**

O teste ANOVA seguida do teste de bonferroni para múltiplas comparações mostrou que houve diferença estatística ( $p = 0,0072$ ) no que diz respeito aos níveis



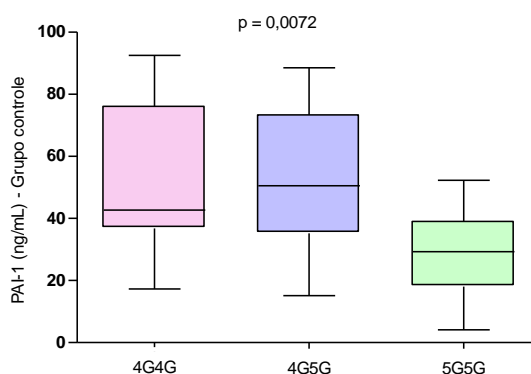
plasmáticos de PAI-1 entre os indivíduos do grupo controle estratificados por genótipo, havendo diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os indivíduos com genótipo 4G4G com 5G5G e entre os de genótipo 4G5G com 5G5G. (tabela 9 e figura 5). No grupo DM2, no entanto, não foi observada diferença estatística, segundo teste de Kruskal Wallis seguido de Dunn post hoc (tabela 9).

**Tabela 9 – Níveis plasmáticos de PAI-1 dos indivíduos nos grupos controle e DM2 em insulinização estratificados por genótipo e valores p**

Polimorfismo	Níveis de PAI-1 (ng/mL)		Valor p
	Controle	DM2	
	média ± desvio padrão	média ± desvio padrão	
4G/4G	54,2 ± 27,2	27,8 ± 7,6	0,0630 <sup>(a)</sup>
4G/5G	51,5 ± 22,5	37,7 ± 18,8	0,0677 <sup>(b)</sup>
5G/5G	29,1 ± 13,6	34,4 ± 19,6	0,3806 <sup>(b)</sup>
Valor p	0,0072* <sup>(c)</sup>	0,7725 <sup>(d)</sup>	

\* Indica diferença estatística para  $p < 0,05$

PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1; (a) Teste T com correção de Welch; (b) Teste T; (c) Anova e Bonferroni post hoc; (d) Kruskal Wallis e Dunn post hoc



**Figura 5 - Gráficos Box-plot correspondentes aos níveis plasmáticos de PAI-1 (ng/mL) dos participantes do grupo controle estratificados por genótipo e diferença estatística para  $p < 0,05$**

## 5.5 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DAS COVARIÁVEIS NA PREDIÇÃO DE DM2 EVOLUÍDA PARA INSULINIZAÇÃO

O resultado dos testes de associação (qui quadrado) das variáveis sexo, faixa etária, hipertensão, hipotireoidismo, tabagismo, genotipagem, obesidade, colesterol total, HDLc, LDLc, VLDLc, triglicérideo, ureia, creatinina, PCR, fibrinogênio, Dímero-D e PAI-1 foram analisados e aqueles cujo nível de significância foi  $< 20\%$  ( $p < 0,2$ ) foram selecionados para a realização do modelo de regressão logística. Neste contexto, foram significativas ao p valor igual a 0,2 (20%) as variáveis sexo ( $p = 0,1520$ ), hipertensão ( $p = 0,0001$ ), VLDL ( $p = 0,0210$ ), TGC ( $p = 0,0210$ ), creatinina ( $p = 0,0220$ ), genótipo ( $p = 0,0483$ ) e fibrinogênio ( $p = 0,0100$ ) (tabelas 1, 4, 6 e 8).

Quando estas foram lançadas no modelo de regressão logística para estudar a razão de ocorrência das covariáveis e sua influência nos indivíduos afetados, apenas duas foram significativas para efeito de comparação do grupo caso-controle. A tabela 10 mostra que estas variáveis foram hipertensão, significante ao p-valor (0.009) e *ODDS Ratio* ajustado 4,184 (I.C. 95%: 1,426-12,276), e fibrinogênio, significante ao p-valor (0,049) e *ODDS Ratio* ajustado 3,293 (I.C. 95%: 1,006-10,775).

No estudo, estes achados mostram que os indivíduos hipertensos possuem um risco 4,18 vezes maior de serem diabéticos que os indivíduos não hipertensos. Significa, ainda, que os indivíduos com níveis plasmáticos de fibrinogênio alterado têm risco 3,29 vezes maior de serem diabéticos, quando comparados aos indivíduos com níveis de fibrinogênio dentro da normalidade.

**Tabela 10 - Odds Ratio bruto e ajustado das variáveis que apresentaram significância estatística no estudo entre indivíduos dos grupos controle e DM2 em insulinização.**

Variáveis	ODDS RATIO BRUTO				ODDS RATIO AJUSTADO			
	p-valor	OR	95% IC para EXP(B)		p-valor	OR	95% IC para EXP(B)	
			LI	LS			LI	LS
Sexo feminino	0,155	0,500	0,192	1,300	0,097	0,388	0,127	1,189
Hipertensão	0,000	6,667	2,440	18,212	0,009	4,184	1,426	12,276
VLDL alterado	0,023	3,000	1,164	7,732				
Creatinina alterada	0,028	4,000	1,161	13,777				
Genótipo 4G4G	0,033	0,159	0,029	0,861				
Genótipo 4G5G	0,195	0,530	0,203	1,383				
Hiperfibrinogenemia	0,012	3,740	1,338	10,456	0,049	3,293	1,006	10,775

IC: intervalo de confiança; EXP(B): Exponencial de B, LI: limite inferior; LS: limite superior; OR: Odds Ratio

## **6 *DISCUSSÃO***

Antes de qualquer análise, é importante ressaltar que os pacientes que compuseram este estudo residem em um território do município de Vitória (ES) onde as condições de saneamento básico, lazer e bem estar social são precárias, além de contar com uma população com um alto nível de analfabetismo e baixa escolaridade.

Há anos, autores têm apontado a educação como uma peça central no tratamento de pacientes com diabetes através de estudos em comunidades com distintos aspectos socioeconômicos, mostrando que tais características podem interferir diretamente no autocuidado e na maneira como os pacientes encaram a doença e o tratamento proposto (OTERO, 2008, MONDADORI, 2008) Além disso, mais de 80% das mortes por diabetes ocorrem em países de renda baixa e média, segundo dados publicados pela OMS (OMS, 2011).

O reconhecimento desta situação fez com que surgissem os objetivos do presente estudo e a importância de avaliar marcadores bioquímicos e hemostáticos em pacientes com DM2 usuários de insulina no território de consolação. Neste contexto e para além das características etiológicas referentes ao curso e evolução da doença, os aspectos socioeconômicos dos pacientes e do território em questão podem contribuir para explicar o perfil bioquímico encontrado nos pacientes com DM2 deste estudo, que foi marcado pela alta descompensação glicêmica.

Sabe-se que a inflamação ocupa um papel central em todas as fases de arteriosclerose, desde a patogênese do ateroma até a síndrome coronariana aguda. Estudos têm demonstrado que a proteína C reativa (PCR), além de ser um marcador de risco de doenças cardiovasculares, tem sido recentemente definida como um possível fator capaz de promover a aterogênese, tendo inclusive, mostrado que a PCR pode induzir a produção de citocinas, de TNF $\alpha$ , de moléculas de adesão e diminuir a síntese de óxido nítrico sintetase, prejudicando a homeostase endotelial (VERMA *et al*, 2004; DEVARAJ *et al*, 2004; TESTA *et al*, 2008).

Estudos mostram que a insulina possui efeitos seletivos na síntese de proteínas hepáticas em pessoas normais e que tanto estados de hiperinsulinemia como de hiperglicemia levariam à produção aumentada de proteínas de fase aguda, como o fibrinogênio e a PCR. (PRADHAM *et al.*, 2001; MOJIMINIYI *et al* 2002).

Neste estudo, tanto os valores médio dos níveis plasmáticos de fibrinogênio ( $p = 0,0153$ ) como os de PCR ( $p = 0,0212$ ) no grupo DM2 em insulinização foram estatisticamente maior que o do grupo controle. Assim, devido a associação de níveis superiores de dois marcadores inflamatórios no grupo de estudo, há que se considerar que os indivíduos do grupo DM2 em insulinização evidenciam um maior estado inflamatório quando comparado ao controle.

Os níveis plasmáticos de fibrinogênio geralmente estão aumentados em pacientes diabéticos, como ressaltado por outros autores (DUNCAN *et al.*, 1999; YUDKIN *et al.*, 1999; MEIGS *et al.*, 2000). Além disso, estudos têm mostrado que a hiperfibrinogenemia está implicada como uma fonte de aterosclerose e suas complicações e que níveis elevados de fibrinogênio significam aumento do risco cardiovascular, sendo este considerado um fator de risco independente para DCV (EMST *et al.*, 1993; JUHAN-VAGUE, 1996; BEMBDE *et al.*, 1012).

Neste trabalho, a frequência de hiperfibrinogenemia no grupo DM2 em insulinização foi estatisticamente maior ( $p = 0,010$ ) que no controle, embora o valor plasmático médio do marcador neste grupo tenha se mantido dentro da normalidade. Assim, mesmo que os valores de fibrinogênio tenham se mostrado maiores no grupo DM2 em insulinização, seriam esperados valores ainda maiores dada a característica de descompensação glicêmica apresentada pelo grupo.

Sabe-se que 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 *et al.*, 2007). Assim, como 55% dos pacientes do grupo DM2 insulinizados possuem prescrição, dispensação e referem utilizar metformina, isso pode ter contribuído para redução do nível médio de fibrinogênio no grupo DM2 em insulinização.

O nível plasmático elevado de fibrinogênio é considerado um fator de risco trombótico uma vez que pode resultar em ativação da coagulação. Assim, além de marcador de inflamação, o fibrinogênio também é considerado um marcador de coagulação uma vez que a hiperfibrinogenemia aumenta a capacidade de coagulação e está associado com hiperviscosidade sanguínea e ativação plaquetária (AZAD *et al.*, 2014). Neste contexto, o grupo DM2 em insulinização

apresenta um estado pró-trombótico quando comparado com o controle devido a hipercoagulabilidade revelada pelos maiores níveis de fibrinogênio.

Alguns estudos têm evidenciado uma correlação positiva entre fibrinogênio e hipertensão arterial (BIASIUTTI, 2003; KOENING, 2003) Além disso, em indivíduos saudáveis, os níveis séricos de fibrinogênio têm sido correlacionados não só à glicemia de jejum, mas também a outros componentes da síndrome metabólica como níveis pressóricos e IMC. Assim, é provável que os pacientes com DM2 que possuam, concomitantemente, hipertensão ou obesidade, possam contar com mais fatores contribuidores para elevação dos níveis de fibrinogênio (VOLP *et al*, 2008).

O mesmo pode ter ocorrido em nosso estudo, em relação à hipertensão. É importante mencionar que embora haja indivíduos hipertensos e obesos em ambos os grupos, houve diferença estatística somente na frequência de hipertensão ( $p = 0,00011$ ), que foi maior no grupo DM2. Neste ínterim, é possível que não só a hiperglicemia, mas também a hipertensão possa estar influenciando níveis plasmáticos mais elevados de fibrinogênio encontrados no grupo DM2 em insulinização em relação ao controle.

A literatura refere que outra alteração na hemostasia promovida pela hiperglicemia refere-se ao fibrinogênio, uma vez que, quando glicado, faz com que o coágulo de fibrina formado a partir dele seja mais resistente à fibrinólise justamente por ser mais denso e rígido (CARR *et al*, 2001; GRANT *et al*, 2007) Além disso, um estudo que avaliou, através de microscopia eletrônica de varredura, o coágulo de fibrina em estados saudáveis e na presença de doenças como DM2, mostrou que indivíduos nesta condição contam com uma formação mais acelerada dos coágulos e que estes são constituídos por redes compactas, altamente ramificadas, com fibras finas e relativamente resistentes à lise (UNDAS, 2014).

Sabendo-se que o dímero-D é o último fragmento resultante da degradação de fibrina polimerizada e que o fibrinogênio é o precursor da fibrina, é possível explicar a positiva correlação estatisticamente encontrada, neste estudo, entre os níveis plasmáticos de fibrinogênio e de dímero-D no grupo DM2 em insulinização.

Evidências têm mostrado que pacientes com DM2 geralmente possuem níveis elevados de dímero-D. No entanto, alguns autores têm sugerido que os valores de dímero-D em pacientes com DM2 podem estar subestimados e isso pode ser

explicado pelo estado de hipofibrinólise, geralmente associado ao DM2, e pelo fato de a fibrina formada no diabético ser, provavelmente, mais rígida, o que dificultaria a sua degradação em dímero-D. (WAKABAYASHI, 2009; NWOSE, 2007).

Em nosso trabalho, embora a média dos níveis plasmáticos de dímero-D no grupo controle tenha sido menor que no grupo DM2, ela não foi estatisticamente diferente entre os grupos ( $p = 0,2889$ ). Como o grupo de pacientes com DM2 em insulinização deste estudo comporta indivíduos glicêmica e cronicamente descompensados, podemos sugerir que os valores de dímero-D possam estar menores que o esperado devido à possível formação de um coágulo de fibrina mais rígido, uma vez que a hiporegulação da fibrinólise não foi evidenciada, dado os níveis de PAI-1, que se mantiveram dentro da normalidade em 72% dos pacientes do grupo DM2, tendo inclusive, apresentado um valor médio inferior ao do grupo controle.

Além disso, outro fator que confabula para sugerir tal associação é que este estudo encontrou uma correlação negativa e estatisticamente significativa ( $p = 0,0442$ ) entre os valores de dímero-D e glicemia de jejum, o que não aconteceu no grupo controle. Assim, é possível sondar que cronicamente, quanto maior a glicemia, maior seria a alteração na formação fibrina, maior a dificuldade de degradá-la e, portanto, menores seriam os valores de D-Di.

Concentrações elevadas de dímero-D podem indicar tanto coagulação como fibrinólise aumentadas e na prática clínica podem estar relacionadas principalmente a trombose venosa profunda (TVP) e/ou embolia pulmonar, infarto agudo de miocárdio (IAM) e/ou angina instável, coagulação intravascular disseminada (CIVD) aguda ou crônica e cirurgia recente. Assim, existe a associação entre os níveis de dímero-D e a presença de doenças trombóticas, mas clinicamente, sua maior relevância é para exclusão de tromboembolismo pulmonar em serviços de emergência, que geralmente é descartado quando os valores plasmáticos de dímero-D são inferiores a 500 ng /dL. (NWOSE *et al.*, 2007; WAKABAYASHI *et al.*, 2009; Mc BANE *et al.*, 2010; SOARES *et.al.*, 2010)

Dada a possibilidade de os valores plasmáticos de dímero-D estarem subestimados em pacientes com DM2, o que poderia, inclusive, estar acontecendo neste estudo, pode-se inferir que, ao realizar a dosagem de d-dímero, seria



importante levar em consideração o fato de o paciente possuir ou não DM2 e principalmente se é um diabético descompensado. Neste contexto, há que se ressaltar que o d-dímero, quando dosado isoladamente, parece não ser um bom marcador para avaliar fibrinólise e coagulação em pacientes com DM2. Neste estudo, também não foi observada correlação entre os níveis de dímero-D e PAI-1, em ambos os grupos.

Os pacientes tomados como controle deste estudo, não possuíam diabetes mellitus, no entanto, algumas variáveis evidenciaram que parte destes indivíduos possuíam características referentes à síndrome metabólica como hipertensão arterial sistêmica (37,5%), dislipidemia (27,5%), resistência à insulina (40,0%) e obesidade (62,2%). Embora as taxas de HAS e dislipidemia tenham sido estatisticamente maiores no grupo com DM2, as taxas de obesidade e RI não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Isso pode ter contribuído para a os resultados do estudo, principalmente os que se referem ao PAI-1, que não apresentou diferença estatística entre a média de seus níveis plasmáticos nos grupos caso e controle.

A insulina é um hormônio que estimula a produção de PAI-1, assim, um excesso deste hormônio é capaz de promover anormalidades em suas concentrações, aumentando o risco de eventos trombóticos. Estudos têm demonstrado que os efeitos prejudiciais da glicose já ocorrem em níveis glicêmicos abaixo do limiar para o diagnóstico de diabetes, ou seja, alterações precoces na glicemia, associadas à resistência à insulina, hiposecreção de insulina e obesidade são responsáveis por modificações funcionais e estruturais na parede dos vasos sanguíneos e conseqüente risco cardiovascular. (BARTNIK *et al*, 2009; WEI *et al*, 1998). Neste contexto, não só a hiperglicemia, mas também a resistência à insulina parecem ser peças centrais no desenvolvimento da aterosclerose e suas complicações (PANENI *et al*, 2013; BECKMAN *et al*, 2013).

Neste sentido, alguns autores corroboram com o achado de nosso estudo quando dizem acreditar que alterações nos níveis de PAI-1 não são advindas do DM2, mas de um verdadeiro conjunto de componentes da síndrome metabólica e que níveis plasmáticos elevados de PAI-1 são considerados fator de risco para o desenvolvimento do DM2 em indivíduos saudáveis (GRANT, 2007). Assim, a causa

da complicação vascular nos pacientes com DM2 é multifatorial e ainda não é conhecido se o estado de hipofibrinólise é causa ou consequência da lesão vascular.

Estudos de intervenção mostraram que o uso de medicamentos sensibilizadores de insulina, como a metformina, promove redução dos níveis de PAI-1. (GRANT, 2007) Por este motivo, assim como a resistência à insulina e a obesidade podem ter sido fatores importantes para determinar o aumento da média dos valores plasmáticos de PAI-1 no grupo controle, o uso de metformina por 55% dos pacientes do grupo DM2 em insulinação pode ter contribuído para a redução da média dos níveis plasmáticos de PAI-1 neste grupo.

O PAI- 1 é um dos reguladores primários do sistema fibrinolítico, assim, o aumento dos níveis plasmáticos deste inibidor pode comprometer a degradação da fibrina e promover estados pró trombóticos. Devido o prejuízo da fibrinólise, o aumento dos níveis de PAI-1 configura situações clínicas de alto risco para ocorrência de eventos trombóticos em pacientes com obesidade e síndrome metabólica (ZORIO *et al*, 2008)

Neste estudo, o PAI-1, correlacionou-se estatisticamente com triglicérideo no grupo DM2 em insulinação ( $p = 0,0019$ ) e com IMC em ambos os grupos ( $p = 0,0010$  e  $p= 0,0076$ , respectivamente no controle e DM2). Essas correlações confirmam a hipótese que o tecido adiposo esteja relacionado com os níveis deste marcador, corroborando com a literatura que tem sugerido que altos níveis de ácidos graxos, evidenciados pela obesidade, geram uma lipotoxicidade no organismo quando presentes de forma crônica (LOPES *et al*, 2008). Assim, o tecido adiposo estimularia a produção de citocinas, inflamatórias como interleucina 1 (IL-1) e TNF $\alpha$  (FESTA *et al.*, 2000; TEMELKOVA-KURKTSCHIEV *et al*, 2003), que por sua vez, estimulariam a síntese de PAI-1 (SOARES *et a.*, 2010)

A literatura refere que, ao menos em parte, os níveis plasmáticos de PAI-1 são modulados geneticamente, uma vez que a concentração de PAI-1 já foi relacionada com o polimorfismo -675 4G/5G no gene promotor do PAI-1. A inserção de uma guanina na cadeia de DNA da região promotora (alelo 5G) interfere no processo de transcrição conferindo um local de ligação para um inibidor. Assim, estudos têm relatado uma associação entre a presença do alelo 4G e níveis plasmáticos mais elevados de PAI- 1 (ZORIO, 2008).

Embora o n deste estudo seja pouco representativo para determinar frequência alélica ou genotípica na população estudada, a quantificação tanto dos alelos ( $p= 0,0158$ ) como dos três tipos de genótipo ( $p= 0,0483$ ), foi estatisticamente diferente entre os grupos. O grupo DM2 em insulinização, além de ter apresentado uma menor frequência do alelo 4G, contou com 22 (56,4%) pacientes com o genótipo 5G5G e apenas com 2 (5,1%) pacientes com o genótipo 4G4G, que é aquele que determina maiores níveis plasmáticos de PAI-1, ou seja, este grupo não contou com a contribuição genética para elevar a média dos níveis plasmáticos do grupo.

No entanto, o grupo controle contou com uma maior frequência do alelo 4G, além disso possuiu 8 (20%) pacientes com o genótipo 4G4G e 18 (45%) pacientes com genótipo 4G5G, o que pode ter contribuído para níveis mais altos de PAI-1 neste grupo. Assim, os achados estão de acordo com a literatura e o fator genético, neste estudo, também pode estar contribuindo para os níveis de PAI-1 encontrados em ambos os grupos.

Ainda em relação ao componente genético, o grupo DM2 em insulinização, selecionado aleatoriamente contou com um número muito reduzido de portadores do genótipo 4G4G, inviabilizando a análise estatística e possivelmente influenciando na não significância encontrada ao realizar o teste de comparação. No entanto, a contribuição genética para os níveis de PAI-1 nos indivíduos do grupo controle foi encontrada uma vez que os portadores dos genótipos 5G5G apresentaram níveis plasmáticos estatisticamente menores que os portadores tanto do genótipo 4G/4G como do 4G/5G. Estes dados estão de acordo com a literatura que mostra que a presença do alelo 4G está associada a aumentos na transcrição do gene do PAI-1 e consequentemente em maiores níveis plasmáticos.

O complexo mecanismo que envolve a alteração de marcadores hemostáticos e inflamatórios por intermédio da hiperglicemia está intimamente associado à produção de espécies reativas de oxigênio dependente de PKC que participa do processo aterosclerótico, desencadeando inflamação vascular com o aumento de fibrinogênio e PCR e propiciando estados prótrombóticos pelo aumento de PAI-1. No entanto, o que mais tem intrigado os pesquisadores é que a tanto a maior formação

de AGEs como a ativação da PKC parecem não ser interrompidas imediatamente após a normalização da glicemia (GIACCO *et al*, 2010).

Evidências tanto laboratoriais como clínicas têm sugerido a expressão "memória metabólica" para explicar o dano endotelial persistente mesmo após a normalização dos níveis de glicemia em pacientes com DM2 que passaram por um período de descompensação glicêmica. O mecanismo que explica a memória metabólica ainda não é completamente compreendido, mas uma causa sugerida é que a hiperglicemia intracelular induza uma superprodução de ROS ao nível mitocondrial.

A superprodução de ROS é o primeiro e fundamental evento na ativação de todas as outras vias envolvidas na patogênese de complicações diabéticas, tais como fluxo via do poliol e das hexosaminas, o aumento da formação de AGE e a ativação da PKC. A ligação de AGEs em seus receptores RAGE resulta na geração de ROS intracelular, que pode influenciar a expressão genética de RAGE, promovendo sua maior expressão e, ao mesmo tempo, pode contribuir para uma maior produção de radicais livres ao nível mitocondrial. Assim, a produção de ânion superóxido mitocondrial seria uma condição que não dependeria dos níveis glicêmicos. E esta condição de auto-manutenção, que conduz a uma geração de estresse oxidativo persistente independente dos reais níveis de glicemia, poderia contribuir para o aparecimento da memória metabólica (CERIELLO *et al.*, 2009).

Importante lembrar que os pacientes componentes do grupo DM2 apresentam um quadro crônico de descompensação glicêmica, uma vez que são indivíduos que já evoluíram para a fase 4 da doença, marcada pela insulinização plena e tida como o último estágio evolutivo das células beta pancreáticas.

Neste íterim, o conceito de memória metabólica parece corroborar com os resultados de nosso estudo, uma vez que os níveis glicêmicos correlacionaram-se estatisticamente tanto com os níveis de PAI-1 ( $p = 0,0483$ ) como de fibrinogênio ( $p = 0,0357$ ) somente no grupo controle, ou seja, aqueles cujos níveis glicêmicos estão mantidos dentro da normalidade.

O mesmo não aconteceu com o grupo DM2, onde não houve correlação estatisticamente significativa entre os níveis glicêmicos e fibrinogênio, nem entre glicemia e PAI-1, sugerindo que a correlação dos níveis glicêmicos com o marcador

de inflamação e hipergoagulabilidade fibrinogênio e com o marcador de hipofibrinólise PAI-1, aconteça em pacientes que não foram submetidos a um estado de hiperglicemia crônica e que, portanto, não tiveram o gatilho acionado para o início do dano endotelial, possivelmente correlacionado à memória hiperglicêmica.

Estudos epidemiológicos têm avaliado o papel dos marcadores inflamatórios e hemostáticos na evolução do DM2 e têm mostrado, após anos de acompanhamento, que tanto os níveis de fibrinogênio como de PAI-1 estão mais elevados em pacientes que desenvolvem diabetes do que naquele que não desenvolvem a doença (FESTA *et al.*, 2001).

Em relação à predição de DM2 em insulinização, a regressão logística deste estudo mostrou que duas variáveis, ofereceram risco ao indivíduo de tornar-se diabético tipo 2 em insulinização. Fibrinogênio e hipertensão foram significantes aos p valores (0,049) e (0,009) e *ODDS Ratio* ajustados (3,293; 1,006 – 10,775) e (4,184; 1,426 – 12,276), respectivamente. Neste trabalho, isto significa que os indivíduos hipertensos possuem um risco 4,18 vezes maior de serem diabéticos tipo 2 em insulinização que os não hipertensos e que os indivíduos com hiperfibrinogenemia possuem um risco 3,29 vezes maior de serem diabéticos tipo 2 em insulinização quando comparados aos indivíduos com níveis de fibrinogênio dentro da normalidade.

Esse resultado corrobora com estudos que mostram que valores elevados de marcadores inflamatórios podem ajudar a identificar uma população com risco de desenvolver diabetes tipo 2 e também doença aterosclerótica (The Cardiovascular Health Study, 2001). Neste contexto, estudos têm associado o fibrinogênio ao risco de desenvolver DM2. Após sete anos de acompanhamento, um trabalho concluiu que os indivíduos que possuíam hiperfibrinogenemia apresentaram um risco de 1,2 vezes maior de desenvolver diabetes melito tipo 2 (DM2) (SHIMIDT, 1999). Em outro estudo o fibrinogênio foi associado a um risco de 1,14 vezes mais chance de desenvolvimento de retinopatia diabética (NGUYEN *et al.*, 2009).

Da mesma forma, a hipertensão predizendo o DM2 evoluído para insulino terapia também está de acordo com as evidências científicas que apontam que o adequado controle pressórico pode apresentar efeitos benéficos em termos da prevenção do DM2. O estudo UKPDS (1998) já evidenciou que há um maior risco de

desenvolvimento de DM2 em pacientes hipertensos e de igual maneira os pacientes diabéticos são mais frequentemente hipertensos. O mesmo estudo mostrou que após 8,4 anos do acompanhamento de 1.148 pacientes hipertensos com diabetes, foi observado que naqueles com menores níveis pressóricos houve uma redução de 44% no acidente vascular cerebral e de 32% nas mortes relacionadas ao diabetes (UKPDS, 1998).

Embora a correlação entre inflamação e DM2 possa ocorrer independentemente da obesidade, é fato que a etiopatogenia do DM2 conta com uma importante participação do tecido adiposo uma vez que este é capaz de secretar citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF-alfa (FRANCISCO *et al*, 2006).

Neste estudo, os grupos não se diferenciaram estatisticamente pela presença de obesidade, o que também refletiu nos indivíduos do grupo controle com resistência à insulina, que também não foi estatisticamente diferente do grupo DM2. Isso pode ter contribuído para o fato da variável PAI-1, preditora de casos de DM2 em alguns estudos, não ter se mostrado significativo no modelo de regressão logística deste trabalho.

Por outro lado, o fato de não ter havido diferença estatística entre os grupos no que diz respeito à obesidade e à resistência à insulina contribuiu para a confirmação de que o aumento de PAI-1, provavelmente, precede o desenvolvimento de DM2 e que estes componentes possam iniciar alterações vasculares mesmo com níveis glicêmicos abaixo do limiar para o diagnóstico de diabetes, o que lhes sugerem ser peças centrais no desenvolvimento da aterosclerose e suas complicações (GRANT, 2007; PANENI *et al.*, 2013).

Diante dos nossos resultados e em conjunto com dados da literatura, embora com limitação no número de amostras, é possível sugerir que os pacientes com DM2 em insulinização possuem um estado inflamatório exacerbado além de um risco trombótico aumentado, estando mais favoráveis para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No entanto, a rede complexa entre a coagulação, inflamação e hiperglicemia destaca a importância de estudos que investiguem a contribuição e interação desses fatores de risco para trombose e doença cardiovascular e suas mais diversas correlações, como em pacientes com DM2, na intenção de contribuir

para um melhor manejo da doença, tratamentos adequados e prevenção de maiores complicações principalmente àqueles que evoluíram para insulinização plena.

## ***7 CONCLUSÕES***



- Os pacientes diabéticos tipo 2 em insulinização possuem níveis maiores de fibrinogênio e PCRus, indicando a presença de maior estado inflamatório e hipercoagulabilidade com possível contribuição para risco de desenvolvimento de doença cardiovascular;
- O polimorfismo -675 4G/5G na região promotora do gene do gene do PAI-1 influencia os níveis desse marcador em indivíduos do grupo controle e possivelmente contribui para seus níveis elevados;
- As correlações positivamente existentes entre glicemia e os marcadores fibrinogênio e PAI-1 em indivíduos sem diabetes mellitus do tipo 2 não se mantêm em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 em insulinização, sugerindo que o aumento destes marcadores ocorra até um certo limite de evolução dos níveis glicêmicos;
- A análise de Regressão Logística Bivariada evidencia que os indivíduos com hipertensão arterial sistêmica possuem um risco 4,18 vezes maior de desenvolverem DM2 em insulinização que os não hipertensos e que as pessoas com hiperfibrinogenemia possuem 3,29 vezes mais chance de tornarem-se diabéticas do tipo 2 em insulinização que aquelas com níveis dentro da normalidade.

## ***8 REFERÊNCIAS***

ABDELLAOUI, A.; AL-KHAFFAF, H. C-reactive protein (CRP) as a marker in peripheral vascular disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* v. 20, p. 1-5, 2007.

ALAD (ASSOCIAÇÃO LATINO-AMERICANA DE DIABETES). Guias ALAD 2000. Para el Diagnostico y Manejo de la Diabetes Mellitus Tipo 2 Com Medicina Basada en Evidencia, 2000. <[http://alad.org/guias\\_alad.html](http://alad.org/guias_alad.html)>.

AL-HAMODI, Z.H.; SAIF-ALI, R.; ISMAIL, I.S.; AHMED, K.A.; MUNIANDY, S. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism is associated with metabolic syndrome parameters in Malaysian subjects. *J Clin Biochem Nutr*, v.50, p.184-9, 2012.

ALP, N. J.; CHANNON, K. M. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* p. 24, v. 413-20, 2004.

AL-HAMODI, Z.; ISMAIL, I. S.; SAIF-ALI, R.; AHMED, K. A.; MUNIANDY, S. Association of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue plasminogen activator with type 2 diabetes and metabolic syndrome in Malaysian subjects. *Cardiovascular Diabetology.* v.51, p. 10-23, 2011.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Clinical practice recommendations 2009. *Diabetes Care*, v. 23 (Sup.1), p. 32-41, 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* v. 36 (Sup.1), p. 11-66, 2013.

ASO, Y.; FUJIWARA, Y.; TAYAMA, K.; TAKEBAYASHI, K.; INUKAI, T.; TAKEMURA, Y. Relationship between soluble thrombomodulin in plasma and coagulation or fibrinolysis in type 2 diabetes. *Clinica Chimica Acta*, v. 301, p. 135-145, 2000.

AZAD, N.; *et al* the VADT Study Group. Association of PAI-1 and Fibrinogen With Diabetic Retinopathy in the Veterans Affairs Diabetes Trial (VADT). *Diabetes Care*. v.37, p. 502-6, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. Diretrizes Brasileiras de Obesidade. 3 ed. AC Farmacêutica. São Paulo, 2009.

BARRET-CONNER, E.; FERRARA, A. Isolated postchallenge hiperglicemia and the risk of fatal cardiovascular disease in older woman and men: the Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care*. v. 21, p. 1236-9, 1998.

BARTNIK, M.; COSENTINO, F. Dysglycaemia, cardiovascular outcome and treatment. Is the jury still out? *Eur Heart J*. v. 30, p. 1301-04, 2009.

BARZILARY, J. I.; ABRAHAM, L.; CUSHMAN, M.; KULLER, L. H.; RESNICK, H. E.; TRACY, R. P. The Relation of Markers of Inflammation to the Development of Glucose Disorders in the Elderly: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes*, v. 50, p.: 2384-89, 2001.

BAUER, K. Update thrombophilia. *Hematology*. v. 32, p. 231-235, 1999.

BECKMAN, J. A.; PANENI, F; CONSENTINO, F; CREAGER, M. A. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. *European Heart Journal*. v. 34, p. 2444-56, 2013.

BIERHAUS, A.; HUMPERT, P. M.; MORCOS, M,; WENDT, T.; CHAVAKIS, T.; ARNOLD, B.; STERN, D. M.; NAWROTH, P. P. Understanding rage, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med*. v. 83, p. 876-86, 2005.

BLOCH, K.V.; MELO, A.N.; NOGUEIRA, A.R. Prevalência da adesão ao tratamento anti-hipertensivo em hipertensos resistentes e validação de três métodos indiretos de avaliação da adesão. *Cad Saúde Pública*, v.24, p. 2979-84, 2008.

BUSE, M. G. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 290, p. 1-8, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas Públicas. Plano de reorganização da atenção à hipertensão e diabetes mellitus. Brasília, 2001.

BRASIL. Portaria nº 648 de 28 de março de 2006. Aprova a Política Nacional de Atenção Básica, estabelecendo a revisão das diretrizes e normas para a organização da Atenção Básica para o Programa de Saúde da Família (PSF) e o programa Agentes Comunitários de Saúde (PACS). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 29 de março de 2006.

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.

CANADIAN DIABETES ASSOCIATION. Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada. *Canadian Journal of Diabetes.* v. 37 (Sup.1) p 1-227, 2013.

CARR, M. E. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *Journal of Diabetes and its Complications*, v. 15, n. 1, p. 44-54, 2001.

CERIELLO, A.; MICHAEL, A. THORPE, I.; THORPE, J. The “Metabolic Memory”: Is More Than Just Tight Glucose Control Necessary to Prevent Diabetic Complications? *J Clin Endocrinol Metab.* v. 94, p. 410-15, 2009.

COSENTINO, F.; HISHIKAWA, K.; KATUSIC, Z. S.; LUSCHER, T. F. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation.* v. 24, p. 9625-28, 1997.

CONSENTINO, F.; ETO, M.; DE PAOLIS, P.; VAN DER LOO, B.; BACHSCHMID, M.; ULLRICH, V.; KOUROEDOV, A.; DELLI GATTI, C.; JOCH, H.; VOLPE, M.; LUSCHER, T. F. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation*. v. 107, p. 1017-23, 2003.

COSTA, J.V.; DUARTE, J.S. Tecido Adiposo e Adipocinas. *Acta Med Port*. v. 19, p.251-6, 2006.

COUTINHO, M; GERSTEIN, H.; WANG, Y.; YUSUF, S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events a metaregression analysis for published data from 2<sup>o</sup> studies of 95.783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care*. v. 22, p. 232-40, 1999.

CUCHEL, M.; BLOEDON, L. T.; SZAPARY, P. O.; KOLANSKY, D. M.; WOLFE, M. L.; SARKIS, A.; *et al*. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. v. 356, p. 148-56, 2007.

DAHLBACK, B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J Intern Med*. v. 257, p. 209-23, 2005.

DANDONA, P.; CHAUDHURI, A.; GHANIM, H.; MOHANTY, P. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effects of insulin: relevance to cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. v. 99, p. 15-26, 2007.

DAVIS, S.N.; GRANNER, D.K. Insulina, fármacos hipoglicemiantes orais e a farmacologia do pâncreas endócrino. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Ed.). *Goodman & Gilman - as bases farmacológicas da terapêutica*. 9a.ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996, cap. 60, p. 1103-1125.

DARVAL, K. A. L.; SAM, R. C.; SILVERMAN, S. H.; BRADBURY, A. W.; ADAM, D. J. Obesity and thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. v. 33, p. 223-33, 2007.

DAWSON, S. J.; WILIMAN, B.; HAMSTEN, A.; GREEN, F.; HUMPHRIES, S.; HENNEY, A.M. The two allele sequences of a common polymorphism in the promotor of the plasminogen activator inhibitor (PAI-I) gene respond differently to IL-1 in Hep G2 cells. *J. Biol. Chem*. v. 268, p. 1073-9, 1993.

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. *N Engl J Med*. v. 329, p. 977-86, 1993.

DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. v. 14, p. 173-194, 1991.

DEGUCHI, K.; DEGUCHI, A.; WADA, H.; MURASHIMA, S. Study of cardiovascular risk factors and hemostatic molecular markers in elderly persons. *Semin Thromb Hemost*. v. 26, p. 23-7, 2000.

DEVARAJ, S.; KUMARESAN, P. R.; JIALAL, I. Effect of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*. v. 36, p. 405-10, 2004.

DOI, T. *et al*. Receptor-specific increase in extracellular matrix productions in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci*. v. 89, p. 2873-77, 1992.

DU, X.L.; EDELSTEIN, D.; ROSSETTI, L.; FANTUS, I.G.; GOLDBERG, H.; ZIVADEH, F.; WU, J.; BROWNLEE, M. H. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces

plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci*, 2000.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; ELBIM, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. v. 53, p. 199-206, 2005.

ERBERLY, L.E.; COHEN, J.D.; PRINEAS, R.; YANG, L. Impact of incident diabetes and incident nonfatal cardiovascular disease on 18-year mortality: the multiple risk factor intervention trial research group. *Diabetes Care*, v. 26, p.848-54. 2003.

ERNEST, E.; KOEING, W. Fibrinogen and cardiovascular risk. *Vasc Med*. v. 2; p. 115-25, 1997.

ERSOY C.; KIYICI, S.; BUDAK, F.; ORAL, B.; GUCLU, M.; DURAN, C.; SELIMOGLU, H.; ERTURK, E.; TUNCEL, E; IMAMOGLU, S. The effect of metformin treatment on VEGF and PAI-1 levels in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes research and clinical practice*. v. 81, p. 56-60, 2008.

EZZIDI, I.; MTIRAOU, N.; CHAIEB, M.; KACEM, M.; MAHJOUR, T.; ALMAWI, W.Y. Diabetic retinopathy, PAI-1 4G/5G and -844G/A polymorphisms, and changes in circulating PAI-1 levels in Tunisian type 2 diabetes patients. *Diabetes Metab.*, v.35, p.214-9, 2009.

FALCO, C.; TORMO, G.; ESTELLES, A.; ESPANA, F.; TORMO, E.; GIALBERT, J.; VELASCO, J. A.; AZNAR, J. Fibrinolysis and lipoprotein(a) in women with coronary artery disease. Influence of hormone replacement therapy. *Haematologica*. v. 86, p. 92, 2001.

FESTA, A.; D'AGOSTINO, R.; HOWARD, G.; et al. Chronic Subclinical Inflammation as Part of the Insulin Resistance Syndrome: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*, v.102, p. 42-47, 2000.



FESTA, A.; D'AGOSTINO, R. Jr; TRACY, R. P.; HAFFNER, S. M. 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, p.1113-1137, 2002.

FESTA, A.; D'AGOSTINHO, R.; HOWARD, G.; MYKKANEN, L.; TRACY, R. P.; HAFFNER, S. M. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: The insulin resistance atherosclerosis study (IRAS). *Circulation*. v. 102, p. 42-7, 2000.

FOLSOM, A. R.; ALEKSIC, N.; PARK, E.; SALOMAA, V.; JUNEIA, H.; WU, K. K. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* v. 21, p. 611, 2001.

FOSTER, D. N. Diabetes mellitus. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine* (A. S. FAUCI, E. BRAUNWALD, K. J. ISSELBACHER, J. D. WILSON, J. B. MARTIN, D. L. KASPER, S. L. HAUSER), New York: McGraw-Hill, p. 2060-2081, 1998.

FRANCISCO, G.; HERNÁNDEZ, C.; SIMÓ, R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipidemia. *Clin Chim Acta*. v. 369, p. 1-16, 2006.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação do sangue e da fibrinólise. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu, 2001. cap 65, p. 739-747.

FULOP, N.; MARCHASE, R. B.; CHATHAM, J. C. Role of protein o-linked n-acetylglucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. v. 73, p. 288-97, 2007.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. *Farmacologia Clínica – Fundamentos da Terapêutica Racional*. Guanabara Koogan, 3ª ed. Rio de Janeiro, 2006.

FUNK, M.; ENDLER, G.; EXNER, M.; MARCULESCU, R.; ENDLER, L.; ABRAHAMIAN H. et al. PAI-1 4G/5G insertion/deletion promoter polymorphism and microvascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Wien Klin Wochenschr*, v.117, p.707-10, 2005.

GEMMATI, D.; SERINO, M. L.; MORATELLI, R.; MARI, G.; BALLERINI, G.; SCAPOLI, G. L. Coexistence of antithrombin deficiency, factor V Leiden and hyperhomocysteinemia in a thrombotic family. *Blood Coagul. Fibrinol., Oxford*, v. 9, p. 173-176, 1998.

GERALDES, P.; KING, G. L. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res.* v. 106, p. 1319-31, 2010.

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

GIORGI, D.M.A. Microalbuminúria na hipertensão arterial primária: significado e valor prognóstico. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*, v. 13, p. 85-91, 2003.

GREENE, D. A.; AREZZO, J. C.; BROWN, M. B. Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy. *Zenarestat Study Group. Neurology.* v. 53, p. 580-591, 1999.

GOMES, M. B.; GIANNELLA NETO, D.; FARIA M et al. Prevalence of type 2 diabetic patients within the targets of care guidelines in daily clinical practice: a multicenter study in Brazil. *Review of Diabetic Studies*, v. 3, p. 82-87, 2006.

GRANT, P.J. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med.*, v. 262, p.157-72, 2007.

GROSS, T. M.; MASTROTOTARO, J.J. Efficacy and Reliability of the Continuous Glucose Monitoring System. *Diabetes Technology & Therapeutics*, v. 2, p. S19-26, 2000.

Haidara, M. A.; Yassin, H. Z.; RATEB, M.; *et al.* Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *Curr Vasc Pharmacol.* v. 4, p. 215-27, 2006.

Hammes, H. P.; ALT, A.; NIWA, T.; CLAUSEN, J. T.; BRETZEL, R. G.; BROWNLEE, M.; *et al.* Differential accumulation of advanced glycation end products in the course of diabetic retinopathy. *Diabetologia.* v. 42, p. 728-36, 1999.

HANDELSMAN, Y.; MECHANICK, J. I.; BLONDE, L., *et al.* American Association of Clinical Endocrinologists. Medical Guidelines for Clinical Practice for Developing a Diabetes Mellitus Comprehensive Care Plan. *Endocr Pract* v.17, p. 1- 53, 2011.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* v. 352, p. 1685-95, 2005.

HEART Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, v.361, p.2005-2016, 2003.

HINK, U.; LI, H.; MOLLNAU, H.; OELZE, M.; MATHEIS, E.; HARTMANN, M.; SKATCHKOV, M.; THAISS, F.; STAHL, R. A.; WARNHOLTZ, A.; MEINERTZ, T.; GRIENDLING, K.; HARRISON, D. G.; FORSTERMANN, U.; MUNZEL, T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res.* v. 88, p. 14-22, 2001.

HIRANO, T.; OOKUBO, K.; KASHIWAZAKI, K.; TAJIMA, H.; YOSHINO, G.; ADACHI, M. Vascular endothelial markers, von willebrand factor and thrombomodulin index, are specifically elevated in type 2 diabetic patients with nephropathy: comparison of primary renal disease. *Clinica Chimica. Acta*, v. 299, p. 65-75, 2000.

IDRIS, I.; GRAY, S, *et al.* Protein kinase C activation: isozymespecific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia*. v. 44, p. 659-73, 2001.

INOBUCHI, T.; LI, P.; UMEDA, F.; YU, H. Y.; KAKIMOTO, M.; IMAMURA, M.; AOKI, T.; ETOH, T.; HASHIMOTO, T.; NARUSE, M.; SANO, H.; UTSUMI, H.; NAWATA, H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NADPH oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. v. 29, p. 1939-45, 2000.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes health economics: facts, figures and Forecasts. Brussels: IDF Task Force on Diabetes Health Economics, International Diabetes Federation, Ed. The Federation, 1999. 32p.

JOBE, M.I. Mecanisms of coagulation and fibrinolysis. In: LOTSPEICH-STEININGER, C.A.; STIENE-MARTIN, E.A.; KOEPKE, J.A. (Ed.). *Clinical hematology: principles procedures correlations*. London: J.B.Lippincott, v.13, p.579-598, 1992.

JOHN, W. G. UK Department of Health Advisory Committee on Diabetes. Use of HbA1c in the diagnosis of diabetes mellitus in the UK. *Diabet Med*. v. 29, p. 1350-7, 2012.

JUHAN-VAGUE, I.; ALESSI, M. C.; VAGUE, P. Thrombogenic and fibrinolytic factor and cardiovascular risk in non-insulin-dependent Diabetes mellitus. *Annals of Medicine*, v. 28, n. 4, p. 371-380, 1996.

KASHIWAZAKI, K.; HIRANO, T.; YOSHINO, G.; KUROKAWA, M.; TAJIMA, H.; ADACHI, M. Decreased release of lipoprotein lipase is associated with vascular endothelial damage in NIDDM patients with microalbuminuria. *Diabetes Care*, v. 21, p. 2016-20, 1998.

KEANE, W.F.; EKNOYAN, G. Proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, elimination (PARADE): a position paper of the National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis*, v. 33, p. 1004-10, 1999.

KITADA, M.; KOYA, D.; SUGIMOTO, T.; ISONO, M.; ARAKI, S.; kashiwagi, A., *et al.* Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase c-[beta] activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. *Diabetes*. v. 52, p. 2603-14, 2003.

KOENING, W.; ROTHENBACHER, D.; HOFFMEISTER, A.; *et al.* Plasma fibrin d-dimer levels and risk of stable coronary artery disease: results of a large case-control study. *Arterioscler Tromb Vasc Biol*. v. 21, p. 1701-05, 2001.

KOENING, W. Fibrinogen in cardiovascular disease: un update. *Thromb Haemost.* v. 89, p. 601-9, 2003.

KOYA, D. *et al.* Characterization of protein Kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli rats. *J Clin Invest*, v. 100, p. 100-126, 1997.

KRASS, I.; TAYLOR, S.J.; SMITH, C.; ARMOUR, C.L. Impact on medication use and adherence of Australian pharmacists' diabetes care services. *J. Am. Pharm. Assoc.* v.45, p.33-40, 2005.

LAIGHT, D. W.; CARRIER, M. J.; ANGGARD, E. E. Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res*. v. 47, p. 457-64, 2000.

LIBBY, P.; THEROUX, P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. v. 111, p. 3481-8, 2005.

LIJNEN, H. R. Role of fibrinolysis in obesity and thrombosis. *Tromb Res*. v. 123, p. 46-49, 2009.

LIJNERT, R.G.; COLLEN, D. Fibrinolytic system and its disorders. In: Lux SE, Stossel TP, Handin RI. Blood: principles and practice of Hematology. 2° ed. p. 1249-1274, 2003.

LOPES, J. P.; OLIVEIRA, S. M.; FORTUNATO, J. S.; *et al.* Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células  $\beta$  pancreática. Acta Med. v. 21, p. 293-302, 2008.

LORENZI, T.F.; D'AMICO, E.; DANIEL, M.M; SILVEIRA, P.A.A.; BUCCHERI, V. Manual de hematologia. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. 641 p.

LOTSPEICH-STEININGER, C. A.; STIENE-MARTIN, E. A.; KOEPKE, J. A. Clinical hematology. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1992. 545p.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. Diabetes Mellitus: Guia Básico para Diagnóstico e Tratamento/Elaboração. 2a Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1997.

MANSFIELD, M. W.; STICKLAND, M. H.; GRANT, P. J. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promotor polymorphism and coronary artery disease in non-insulin-dependent diabetes. Thromb. Haemost., Stuttgart, v.74, p. 1032-1034, 1995.

MARTINEZ, T.L.R. Conduas clínicas nas dislipidemias. Belo Horizonte: Heath, 1997, 291.

MAZZONE, T.; CHAIT, A.; PLUTZKY, J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. Lancet. v. 371, p. 1800-09, 2008.

MCBANE, R.D. 2nd; HARDISON, R.M.; SOBEL, B.E.; BARI 2D Study Group. Comparison of plasminogen activator inhibitor-1, tissue type plasminogen activator antigen, fibrinogen, and D-dimer levels in various age decades in patients with type 2

diabetes mellitus and stable coronary artery disease (from the BARI 2D trial). *Am J Cardiol.*, v. 105, p.17-24. 2010.

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, p. 37-45, 2006.

MEIGS, J. B.; MITTLEMAN, M. A.; NATHAN, D. M.; TOFLER, G. H.; SINGER, D. E.; MURPHY-SHEEHY, P. M.; LIPINSKA, I.; D'AGOSTINO, R. B.; WILSON, P. W. F. Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: the Framingham Offspring study. *Jama*, v. 283, p. 221-228, 2000.

MEIGS, J.B.; O'DONNELL, C.J.; TOFLER, G.H.; et al. Hemostatic markers of endothelial dysfunction and risk of incident type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes*, v. 55, p. 530-7, 2006.

MEZZETTI, A.; CIPOLLONE, F.; CUCCURULLO, F. Oxidative stress and cardiovascular complications in diabetes: isoprostanes as new markers on an old paradigm. *Cardiovasc Res.* v. 47, p. 475-88, 2000.

MODESTO FILHO, J. Aumento da prevalência do DM2 no jovem. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 47, suppl: S419, 2003.

MOJIMINIYI, O. A.; ABDELLA, N.; MOUSSA, M. A.; et al. Association of C-reactive Protein with Coronary Heart Disease Risk Factors in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Diab. Res. Clinic. Prac.*, v.58, p. 37-44, 2002.

MONDADORI, P. *et al.* Organização de um serviço de assistência ao paciente com diabetes melito tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v. 52, p.234-9, 2008.

NAZIMEK-SIEWNIAK, B.; MOCZULSKI, D.; GRZESZCZAK, W. Risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes results of

longitudinal study design. *Journal of Diabetes and its Complications.*, v. 16, n. 4, p. 271-6, 2002.

NGUYEN, T. T.; AIBRAHIM, E.; ISLAM, F. M.; KLEIN, R.; KLEINI, B. E.; COTCH, M. F.; SHEA, S.; WONG, T. Y. Inflammatory, hemostatic, and other novel biomarkers for diabetic retinopathy: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Diabetes Care.* v. 32, p. 1704-9, 2009.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; DU, X. L.; YAMAGISHI, S.; MATSUMURA, T.; KANEDA, Y.; YOREK, M. A.; BEEBE, D.; OATES, P. J.; HAMMES, H. P.; GIARDINO, I.; BROWNLEE, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* v. 404, p. 787-97, 2000.

NWOSE, E. U.; RICHARDS, R. S.; JELINEK, H. F.; KERR, P. G. D-dimer identifies stages in the progression of diabetes mellitus from family history of diabetes to cardiovascular complications. *Pathology.* v. 39, p. 252-7, 2007.

NWOSE, E. U.; RICHARDS, R. S.; JELINEK, H. F.; KERR, P. G. D-dimer identifies stages in the progression of diabetes mellitus from family history of diabetes to cardiovascular complications. *Pathology.* v. 39, p. 252-7, 2007.

OTERO, L. M. *et al.* Conhecimento do paciente diabético acerca de sua doença, antes e depois da implementação de um programa de educação em diabetes. *Rev Latino-am Enfermagem.* v. 16, p. 123-30, 2008.

OTTANI, F.; GALVANI, M. Prognostic role of hemostatic markers in acute coronary syndromes patients. *Clin Chim Acta.* v. 311, p. 33-39, 2001.

OUVIÑA, S.M.; LA GRECA, R.D.; ZANARO, N.L.; PALMER, L.; SASSETTI, B. 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.; CONSENTINO, F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *European Heart Journal*. v. 34, p. 2436-46, 2013.

PMV (PREFEITURA MUNICIPAL DE VITÓRIA). Índice de qualidade urbana (IQU) aplicado para bairros do município de Vitória – 2005 a 2012. Coordenadoria de Planejamento. Vitória, 2012.

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.

PRADHAM, A. D.; MANSON, J. E.; RIFAI, N.; et al. C-reactive Proteins, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes MELLITUS. *JAMA*, v. 286, p. 327-334, 2001.

REPORTS of Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, v. 20, p. 1183-97, 1997.

RIJKEN, D.C. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Bailliers Clin Haematol*, v. 8, p. 291-312, 1995.

SAITO, H. Normal Hemostatic Mechanisms. In: Ratnoff OD & Forebs CD. *Disorders of Hemostasis*. W.B. Saunders Company. v. 3, p. 23-52, 1996.

SANTINI, S. A.; MARRA, G.; GIARDINA, B.; COTRONEO, P.; MORDENTE, A.; MARTORANA, G. E.; et al. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes*. v. 46, p. 1853-8, 1997.

SCHIMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; SHARRET, A. R.; LINDENBERG, G.; SAVAGE, P. J.; AFFENBACHER, S.; *et al.* Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (ARIC study): a cohort study. *Lancet*. v. 353, p. 1649-52, 1999.

SILVA T. R.; FELDMAN, C.; LIMA, M. H. L.; NOBRE, M. R. C.; DOMINGUES, R. A. L. Controle do Diabetes Mellitus e Hipertensão Arterial em Grupos de Intervenção Educacional e Terapêutica em Seguimento Ambulatorial de uma Unidade Básica de Saúde. *Saúde e Sociedade*, v. 15, p. 180-189, 2006.

SOARES, A.L.; ROSÁRIO, P.W.; BORGES, M.A.; SOUSA, M.O.; FERNANDES, A.P.; CARVALHO, M.G. PAI-1 and D-dimer in type 2 diabetic women with asymptomatic macrovascular disease assessed by carotid Doppler. *Clin Appl Thromb Hemost.*, v. 16, p. 204-8, 2010.

SOARES, A.L.; SOUZA, M.O.; FERNANDES, A.P.S.M.; CARVALHO, M.G. Alterações do sistema hemostático nos pacientes com diabetes melito tipo 2. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v. 32, p. 482-8, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz de Embolia Pulmonar. *Arq Bras Cardiol*. v. 83 (Supl.1), p. 1-9, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. PAI-1 4G/5G Polymorphism and Plasma Levels Association in Patients with Coronary Artery Disease. *Arq Bras Cardiol*. v. 97 (Supl.6), p. 462-67, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*. v. 101 (Supl.1), p. 1-22, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diagnóstico e classificação do diabete melito e tratamento do diabete melito tipo 2. Recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab*. v. 44, p. 8-35, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013/14.. Disponível em <<http://www.diabetes.org.br>>. Acesso em mai 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Algoritmo para o tratamento do diabetes tipo 2. Arq Bras Endocrinol Metab. Posicionamento Oficial SBD nº 3, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Conduta terapêutica no diabetes tipo 2: Algoritmo SBD, 2014. Posicionamento Oficial SBD. Disponível em <<http://www.diabetes.org.br>>. Acesso em mai 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. I Diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. v. 84, p. 1-28, 2005.

STEHOUWER, C.D.A.; GALL, M.; TWISK, J.W.R.; KNUDSEN, E.; EMEIS, J.J.; PARVING, H. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 Diabetes: prospective, interrelated, and independently associated with risk of death. Diabetes, v. 51, p. 1157-65, 2002.

STERN, S. E.; WILLIAMS, K.; FERRANNINI, E.; DEFRONZO, R.A.; BOGARDUS, C.; STERN, M. P. Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements. Diabetes. v. 54, p. 333-9, 2005.

STRATTON, I.M.; ADLER, A.I.; NEIL, H. et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. BMJ, v. 321 , p.405-419 , 2000.

TAKEUCHI, M.; YANASE, Y.; MATSUURA, N. et al. Immunological detection of a novel advanced glycation end-product. Mol Med, v. 7, p. 783-91, 2001.

TAN, K.C.; CHOW, W.S.; AI, V.H.; METZ, C.; BUCALA, R.; LAM, KS. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, v. 25, p.1055-9, 2002.

TEMELKOVA-KURKTSCHIEV, T.; SIEGERT, G.; BERGMANN, S.; et al. Subclinical Inflammation is Strongly Related to Insulin Resistance but not to Impaired Insulin Secretion in a High Risk Population for Diabetes. *Metabolism*, v.51, p. 743-749, 2003.

TESTA, R.; BONFIGLI, A. R.; BONFIGLI, A.; SIROLLA, C.; SIROLLA, B.; *et al.* C-reactive protein is directly related to plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) levels in diabetic subjects with the 4G allele at position L675 of the PAI-1 gene. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. v. 18, p. 220-26, 2008.

THOGERSEN, A. M.; JANSSON, J. H.; BOMAN, K.; NILSSON, T. K.; WEINEHALL, L.; HUHTASAARI, F.; HALLMANS, G. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation*. v. 98, p. 2241-50, 1998.

THOMAS, S. R.; WITTING, P. K.; DRUMMOND, G. R. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. v. 10, p. 1713-65, 2008.

TOOKE, J.E. Microvascular function in human diabetes. A physiological perspective. *Diabetes*, v. 44, p. 721-6, 1995.

UKPDS (UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP). Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet*, v. 352, p. 837-53, 1998.

UNDAS, A. Fibrin clot properties and their modulation in thrombotic disorders. *Thrombosis and Haemostasis*. v. 112 p. 137-65, 2014.

VAN, H.; ROSENDAAL, F. R. High levels of fibrinogen are associated with the risk of deep venous thrombosis mainly in the elderly. *J Thromb Haemost*. v. 1, p. 2677-8, 2003.

VANHOUTTE, P. M. COX-1 and vascular disease. *Clin Pharmacol Ther*. v. 86, p. 212-15, 2009.

VANHOUTTE, P. M.; SHIMOKAWA, H.; TANG, E. H.; *et al*. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol*. v. 196, p. 193-222, 2009.

VERMA, S.; KULISZEWSKI, M. A.; LI, S. H.; SZMITKO, P. E.; ZUCCO, L.; WANG, C. H.; *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, p. 2058-67, 2004

VAN HISBERG, V. W. The endothelium: vascular control of haemostasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. v. 95, p. 198-201, 2001.

VAUGHAN, D. E. PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost*. v. 3, p. 1879-83, 2005.

WAKABAYASHI, J.; MASUDA, H. Association of D-dimer with microalbuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *Thrombolysis*, v. 27, p. 29-35, 2009.

WEI, M.; GASKILL, S. P.; HAFFNER, S. M.; STERN, M. P. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*. v. 21, p. 1167-72, 1998.

WELLS-KNECHT, K. J. *et al.* Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry*. v. 34, p. 3702-09, 1995.

WESTRICK, R. J.; EITZMAN, D. T. Plasminogen activator inhibitor-1 in vascular thrombosis. *Curr Drug Targets*, v. 8, p. 966, 2007.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. v. 27, p. 1047-53, 2004.

WING, T. W.; WONG, S. L.; XIAO, Y. T.; YU, H. Endothelial Dysfunction: The Common Consequence in Diabetes and Hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. v. 55, p. 345-52, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes mellitus. Fact sheets, n. 312, 2011. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>>. Acesso em: 4 mai. 2013.

WU, J. T.; WU, L. L. Linking inflammation and atherogenesis: Soluble markers identified for the detection of risk factors and for early risk assessment. *Clin Chim Acta*. v. 366, p. 74-80, 2006.

YAMADA, T.; SATO, A.; NISHIMORI, T. *et al.* Importance of hypercoagulability over hyperglycemia for vascular complication in type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*., v. 49, p. 23-31, 2000.

YAN, S. F.; RAMASAMY, R.; SCHIMIDT, A. M. The rage axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circ Res*. v. 196, p. 842-53, 2010.

YANG, D.; GLUAIS, P.; ZHANG, J. N.; *et al.* Nitric oxide and inactivation of the endothelium-dependent contracting factor released by acetylcholine in spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* v. 43, p. 815-20, 2004.

YUDKIN, J.S. Abnormalities of coagulation and fibrinolysis in insulin resistance. Evidence for a common antecedent? *Diabetes Care*, v. 22, p. 25-30, 1999.

ZALBA, G.; SAN, J. G.; MORENO, M. U.; FORTUNO, M. A.; FORTUNO, A.; BEAUMONT, F. J.; *et al.* Oxidative stress in arterial hypertension: role of NADPH oxidase. *Hypertension.* v. 38, p. 1395-9, 2001.

ZIEMER, D. C.; KOLM, P.; WEINTRAUB, W. S.; *et al.* Glucose-Independent, BlackWhite differences in hemoglobin A1c levels. *Ann Intern Med.* v. 152, p. 770-7, 2010.

ZIMMET, P.; ALBERT, K. G. M. M.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.*, v. 414, p. 782-787, 2001.

ZORIO, E.; GILABERT-ESTELLÉS, J.; ESPAÑA, F.; RAMÓN, L. A.; COSÍN, R.; ESTELLÉS, A. Fibrinolysis: The Key to New Pathogenetic Mechanisms. *Current Medicinal Chemistry.* v. 15, p. 923-29, 2008.

## APÊNDICE 1

QUESTIONÁRIO PARA APLICAÇÃO		
Ficha de Acompanhamento - Usuários de Insulina – USF Consolação		
Nome:		Data: ___/___/___
DN: ___/___/___	M/F:	Tel:
Endereço:		
1. Profissão:	2. N° dependentes:	3. Renda:Familiar:
4. Sexo : ( ) M ( ) F	5. Estado Civil: ( ) Solteiro ( ) Casado ( ) Divorciado ( ) Outro	6. Escolaridade: ( ) Analfabeto ( ) Fundamental ( ) Médio ( ) Superior
7. Ingere bebida alcoólica?: ( ) Diariamente ( ) Todos os finais de semana ( ) Socialmente, em eventos ( ) Nunca	8. Fumante?: ( ) Sim ( ) Não	
9. Há quanto tempo possui diagnóstico de DM2? ( ) Menos 5 anos ( ) Mais 5 anos		
10. Há quanto tempo utiliza insulina? _____		
11. Utiliza algum serviço que não pertence ao SUS (particular) para o tratamento do DM2? ( ) Sim ( ) Não		
12. Já foi diagnosticado com algum tumor maligno? ( ) Sim ( ) Não Se sim, há qtos anos? _____		
13. Possui doença renal crônica? ( ) Sim ( ) Não Se sim, há qtos anos? _____		
14. No momento, está com alguma doença infecciosa aguda? ( ) Sim ( ) Não Se sim, qual? _____		
15. Faz uso de AAS? ( ) Sim ( ) Não Se sim, qual foi o último dia que tomou? _____		
16. Faz uso de Varfarina (Marevan)? ( ) Sim ( ) Não Se sim, qual foi o último dia que tomou? _____		
17. Faz uso de Ginkgo biloba? ( ) Sim ( ) Não Se sim, qual foi o último dia que tomou? _____		
18. Faz reposição hormonal (para mulheres no climatério)? ( ) Sim ( ) Não Se sim, qual? _____		
19. Faz uso de anticoncepcional? ( ) Sim ( ) Não Se sim, qual ? _____		
20. Já fez alguma cirurgia? ( ) Sim ( ) Não Se sim, há qto tempo? ( ) Menos de 3 meses ( ) Maide 3 meses		
21. Familiares com Diabetes: ( ) Sim ( ) Não Se sim, quem: _____		



22. Tem ou já teve depressão? ( ) Sim ( ) Não Se sim, quando?

\_\_\_\_\_

2.3 Outras doenças crônicas: ( ) Sim ( ) Não Quais:

\_\_\_\_\_

24. Possui Glicosímetro? ( ) Sim ( ) Não Se sim, foi fornecido pela PMV?

\_\_\_\_\_

#### PARÂMETROS A VERIFICAR

P.A.	
I.M.C.	
Exames Laboratoriais	

#### ENTREVISTA

Medicamentos em uso e posologia	<p>1) Você às vezes tem problemas em se lembrar de tomar a sua medicação?</p> <p>2) Você às vezes se descuida de tomar seu medicamento?</p> <p>3) Quando está se sentindo melhor, você às vezes para de tomar seu medicamento?</p> <p>4) Às vezes, se você se sentir pior ao tomar a medicação, você para de tomá-la?</p>
---------------------------------	---

**APÊNDICE 2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO  
SANTO  
Centro de Ciências da Saúde**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O Sr. (a) está sendo convidado (a) à participar do estudo: **“Avaliação do impacto do acompanhamento multiprofissional na adesão ao tratamento, controle metabólico e melhoria da qualidade de vida de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 insulino-dependentes.”** O projeto de pesquisa será realizado pelo Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo em colaboração com a Unidade de Saúde da Família de Consolação, em Vitória (ES). O presente estudo visa avaliar o impacto da ação da equipe multiprofissional (médico, farmacêutico, enfermeiro e educador físico) na educação, adesão ao tratamento, melhoria da qualidade de vida, controle metabólico e hemostasia, de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) insulino-dependentes do território de Consolação.

Se você concordar em participar neste estudo, você irá responder a um questionário, bem como irá realizar exames laboratoriais periódicos para acompanhamento da doença em questão. Os dados coletados serão utilizados somente para os objetivos propostos pelo estudo. Este acompanhamento será realizado durante um ano.

A participação é voluntária e este consentimento poderá ser retirado a qualquer tempo, se você quiser participar desse estudo, solicitamos que autorize a coleta de 4,5 mL de seu sangue para realizarmos exames laboratoriais. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição que forneceu os seus dados, como também na que trabalha.

O sr(a) não terá nenhum custo ou quaisquer compensações financeiras. O benefício relacionado à sua participação será de aumentar o conhecimento científico no controle da diabetes.

A coleta de amostras de sangue venoso inclui um pequeno risco de acidente de punção, representado, principalmente por extravasamento sanguíneo subcutâneo sem gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional com experiência e capacidade técnica.

Suas respostas serão tratadas de forma anônima e confidencial, isto é, em nenhum momento será divulgado o seu nome em qualquer fase do estudo. Os dados coletados serão utilizados apenas nesta pesquisa e os resultados divulgados em eventos e/ou revistas científicas.

Qualquer outra informação que desejar poderá ser obtida com as professoras responsáveis ou através do Comitê de Ética em Pesquisa da UFES / CEP, pelo telefone 3335-7211, ou e-mail. cep.ufes@hotmail.com.

Prof<sup>a</sup>. Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem

Telefone: 3335-7556 e-mail: dani.far.ufes@gmail.com

Prof<sup>a</sup>. Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves

Telefone: 3335-7307 e-mail: ritacassiarg@yahoo.com.br

Prof<sup>a</sup>. Carolina Maia Martins Sales

Telefone: 3335-7283 e-mail: carolnurse@hotmail.com

Nome: \_\_\_\_\_

Documento de identificação: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## ANEXO 1

CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES




---

**PROJETO DE PESQUISA**

**Título:** Avaliação do impacto do acompanhamento multiprofissional na adesão ao tratamento, controle metabólico, hemostasia e melhoria da qualidade de vida de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 insulino-dependentes

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 05619812.3.0000.5060

**Pesquisador:** Daniela Amorim Melgaço Guimarães do Bem

**Instituição:** Centro de Ciências da Saúde ((CCS-UFES))

---

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**Número do Parecer:** 85600  
**Data da Relatoria:** 29/08/2012

**Apresentação do Projeto:**

- Trata-se de um estudo de intervenção e prospectivo;
- Os sujeitos da pesquisa serão pacientes diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), que utilizam insulina como tratamento para controle da glicemia, de ambos os sexos, vinculados às equipes de saúde da família da USF Consolação;
- Os pacientes dispostos a participar do estudo, serão randomizados aleatoriamente em dois grupos proporcionais: grupo controle (n = 65 pacientes) e grupo de intervenção (n = 65 pacientes);
- Os pacientes inscritos no grupo controle receberão o atendimento habitual oferecido na unidade de Saúde da Família;
- Os pacientes randomizados para o grupo de intervenção, além das atividades habituais oferecidas, também receberão acompanhamento multiprofissional domiciliar. A intervenção se dará de forma individual, por meio da aplicação de um questionário, seguido de orientações específicas abordando as deficiências identificadas em cada paciente, além de atividades educativas em grupo que poderão ser realizadas de acordo com as necessidades observadas.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar o impacto da ação da equipe multiprofissional (médico, farmacêutico, enfermeiro e educador físico) na educação, adesão ao tratamento, melhoria da qualidade de vida, controle metabólico e hemostasia, de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) insulino-dependentes do território de Consolação.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** a coleta de amostras de sangue venoso inclui um pequeno risco de acidente de punção, representado, principalmente por extravasamento sanguíneo subcutâneo sem gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional com experiência e capacidade técnica. Além disso, as coletas serão realizadas em local com infra-estrutura adequada para este procedimento.  
**Benefícios:** indiretos, aumentar o conhecimento científico no controle da diabetes.

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**CEP:** 29.040-091

**UF:** ES

**Município:** VITORIA

**Telefone:** (27)3335-7211

**E-mail:** cep.ufes@hotmail.com ; cep@ccs.ufes.br

CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES



**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa muito bem delineada. As pendências foram resolvidas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE está de acordo com o que preconiza a Resolução 196.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto Aprovado

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Os membros aprovaram o parecer do relator.

VITORIA, 30 de Agosto de 2012

---

Assinado por:  
Adauto Emmerich Oliveira

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

CEP: 29.040-091

E-mail: cep.ufes@hotmail.com ; cep@ccs.ufes.br