CARINE TELES SANGALETI MIYAHARA

**Efeitos da galantamina sobre biomarcadores inflamatórios e
adipocinas em pacientes com síndrome metabólica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Programa de: Cardiologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda Marciano
Consolim Colombo

SÃO PAULO

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Miyahara, Carine Teles Sangaleti

Efeitos da galantamina sobre biomarcadores inflamatórios e adipocinas em
pacientes com síndrome metabólica / Carine Teles Sangaleti Miyahara. -- São
Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.

Orientador: Fernanda Marciano Consolim Colombo.

Descritores: 1.Síndrome X metabólica 2.Obesidade abdominal 3.Inflamação
4.Sistema nervoso autônomo 5.Galantamina

USP/FM/DBD-412/16

A Deus por colocar em meu caminho as pessoas maravilhosas que me ajudaram nessa conquista e, ao meu marido Yoshi por todo amor e companheirismo.

À Profª Dra. Fernanda Marciano Consolim - Colombo por ser exemplo de mulher e me ensinar todos os dias o que é ser professora, orientadora, profissional competente e ser atenciosa com todos aqueles que precisam de apoio. Texto algum conseguirá expressar toda admiração e afeto que tenho por você.

Ao **Prof Dr. Luiz Ap. Bortolotto** pela oportunidade de ingressar ao Programa de Cardiologia e por todo apoio e co-orientação durante esse período.

A **todo grupo da Unidade de Hipertensão** Dr. Heno Ferreira Lopes, Dr. Luciano, Dr. Jaime, Dra. Valéria, Dr. Henrique, Márcia, Janice, Adriana e Dra. Grázia, Dr. Dante pelo carinho, descontração, apoio e ensinamentos. Não há unidade melhor para desenvolver um projeto de pesquisa que a unidade de Hipertensão, pois nela todos trabalham com seriedade, dedicação, apoio mútuo e muita diversão.

A **Profª Dra. Lisete Michelini** por todo apoio. Obrigada por fazer parte de minha vida e cuidar de minha formação.

Aos **amigos do Departamento de Enfermagem da Universidade Estadual do Centro-Oeste** em especial as minhas amigas Maria Regiane, Alexandra e Maria Lúcia por todo apoio.

A **Profª Dra. Maria Claudia Irigoyen** pelo apoio irrestrito ao desenvolvimento desse projeto de pesquisa.

Aos prezados **amigos do laboratório de Hipertensão Experimental**: Janaína, Kátia, Sílvia, Michele, Fernando, Edson, Maicon, Oscar, Isabel por todo apoio e amizade.

Aos meus **companheiros de estudo, que se tornaram grandes amigos, e parceiros** nesse projeto Fernando O. Costa, Tércio Lemos de Moraes, João Vicente, Ariane Viana e Morgana.

A **minha estimada família** pelo apoio, torcida e reconhecimento da minha conquista. À minha mãe por todas as orações e a minha irmã pelo companheirismo e **meus irmãos de coração** Luciano e Maíra por todo apoio e amizade.

À **Profª Dra Kátia De Angelis** e aos **alunos de pós-graduação do Laboratório de Fisiologia Translacional** da Universidade Nove de Julho pela colaboração e suporte nas análises de resultados;

A todos **os funcionários do setor de matrícula e tomografia** do Instituto do Coração (Incor) da FMUSP pela colaboração e gentileza.

Ao **Renato e Miriam** do setor e Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial por todo apoio, disposição e amizade.

A todos os **participantes** do meu estudo pela confiança e disposição.

As minhas **amigas** e companheiras de percurso na pós-graduação: Mariana Charântola, Irene Mari e Mariana Cabral, obrigada pela amizade, companhia e apoio incondicional.

E finalmente, agradeço ao final aquela que me apoio muito no início, à **Elaine da Comissão Científica**, pela iniciativa e suporte incondicional que garantiram minha entrada no programa. Sua atitude marcou positivamente todo meu processo de formação. Jamais esquecerei sua disposição em me ajudar.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
	LISTA DE FIGURAS	
	LISTA DE TABELAS	
	RESUMO	
	ABSTRACT	
1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Síndrome Metabólica: definição e o papel da obesidade visceral.....	03
1.2	Fisiopatologia da inflamação na SM: o papel do tecido adiposo.....	11
1.3	Regulação neural da inflamação: a “Via Antiinflamatória Colinérgica”	20
1.4	Estimulação da Via Antiinflamatória Colinérgica pela Galantamina na SM.....	26
2	JUSTIFICATIVA.....	29
2.1	Hipóteses.....	30
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo geral.....	32
3.2	Objetivos específicos.....	32
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	33
4.1	Delineamento do Estudo.....	34
4.2	Casuística.....	36
4.3	Cálculo amostral.....	36
4.4	Critérios de Inclusão.....	37
4.5	Critérios de Exclusão.....	38
4.6	Procedimentos.....	39
4.6.1	Avaliação de inclusão e seguimento.....	39
4.6.2	Testes Cognitivos.....	40
4.6.3	Exames laboratoriais.....	40
4.6.4	Registro de variáveis hemodinâmicas e da modulação simpato-	

	vagal.....	46
4.6.5	Análise da variabilidade da FC e da PA.....	49
4.6.6	Exames de imagem.....	50
4.6.7	Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial – MAPA.....	51
4.7	Sequência do estudo.....	51
4.8	Análises estatísticas.....	56
4.9	Financiamento.....	57
5	RESULTADOS.....	58
5.1	Seleção dos participantes e caracterização da amostra.....	59
5.2	Correlações entre as variáveis antes do tratamento.....	63
5.3	Efeitos do Tratamento com Galantamina ou Placebo nos parâmetros clínicos e metabólicos.....	68
5.4	Efeitos do tratamento com Galantamina ou Placebo em parâmetros da modulação autonômica cardiovascular.....	71
5.5	Efeitos do tratamento com Galantamina e Placebo nos marcadores inflamatórios.....	74
5.6	Efeitos da Galantamina em parâmetros clínicos e metabólicos.....	79
5.7	Efeitos do tratamento com Galantamina em marcadores do Estresse Oxidativo.....	82
5.8	Efeitos do tratamento com Galantamina na quantidade de gordura visceral e subcutânea abdominal e epicárdica.....	84
5.9	Resultados do diário de uso da medicação.....	84
6	DISCUSSÃO.....	86
7	CONCLUSÕES.....	105
7.1	Considerações Finais.....	106
8	ANEXOS.....	107
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AHA	American Heart Association
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância em Saúde
Ach	Acetilcolina
CA	Circunferência abdominal
CAT	Enzima catalase
CD40	Receptor CD40
DCV	Doença Cardiovascular
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GH	Hormônio de crescimento
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HF	Componente de alta frequência
IDF	International Diabetes Federation
IL	Interleucina
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IMC	Índice de massa corporal
ICV	Intracerebrovascular
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IRS	Substrato do receptor de insulina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LF	Componente de baixa frequência
MCP	Proteína quimiotática de monócitos

M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MAPA	Monitorização ambulatorial da pressão arterial
NCEP ATPIII	National Cholesterol Education Program`s Adult Treatment Panel III
NHLBI	National Heart, Lung and Blood Institute
NF-kB	Fator nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão Arterial
PI3K	Receptor de insulina com atividade quinase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PAI	Ativador de plasminogênio
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	Proteína C Reativa
RMSSD	Raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos RR consecutivos
RI	Resistência à Insulina
SM	Síndrome Metabólica
SR-A	Receptor scavenger classe 1 A
SDNN	Desvio padrão de intervalos RR normais
SDPA	Desvios padrão dos picos sistólicos
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
sCD40L	Ligante solúvel CD40
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistem Nervoso Simpático
SOD	Enzima superóxido dismutase

SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
Tbars	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
Th1	Linfócitos T helper do tipo 1
Th2	Linfócitos T helper do tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TG	Triglicerídeos
VCAM	Molécula de adesão de células vasculares
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
Wnt/ β -catenina	Via de sinalização intracelular Wnt Beta-catenina
$\alpha 7$ nAChR	Receptor nicotínico tipo alfa 7

Tabela 1	Critérios para diagnóstico da SM segundo o ATP III.....	05
Tabela 2	Critérios para diagnóstico da SM segundo o ATP III revisado..	09
Tabela 3A	Características descritivas das variáveis demográficas, de gordura corporal, clínicas e metabólicas antes do tratamento com Galantamina ou Placebo.....	62
Tabela 3B	Características descritivas dos biomarcadores inflamatórios e medidas de estresse oxidativo antes do tratamento com Galantamina ou Placebo.....	63
Tabela 4A	Alterações nos valores basais de parâmetros antropométricos, clínicos e metabólicos entre os grupos Galantamina e Placebo após o tratamento.....	69
Tabela 4B	Alterações nos valores basais em marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo entre os grupos Galantamina e Placebo após o tratamento.....	70
Tabela 5	Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo.....	73
Tabela 6	Parâmetros clínicos nos grupos Galantamina e Placebo antes e após o tratamento.....	78
Tabela 7	Níveis de gordura epicárdica, visceral e subcutânea abdominal antes e após tratamento em ambos os grupos.....	82
Tabela 8	Associações entre efeitos relatados durante o tratamento por grupo.....	83

Figura 1	Fisiopatogênese da síndrome metabólica e doença cardiovascular aterosclerótica. Adipocinas da adiposidade central e sistema imunológico desempenham papel central no desenvolvimento da síndrome (Adaptado de Reilly e Rader, 2003, p.1549; Circulation).....	10
Figura 2	Tecido Adiposo inputs e outputs. (Adaptado de Ribeiro-Filho <i>et al</i> 2006, Arq Bras Endocrinol Metab).....	12
Figura 3	Reflexo Antiinflamatório Colinérgico.(Apaptado de Tracey KJ, The JCI, 2007).....	24
Figura 4	Monitor Finometer® que registra curvas de PA batimento-a-batimento, de forma não invasiva.....	47
Figura 5	Manguito de pressão circundando a falange média do segundo dedo da mão esquerda, registrando curvas de PA derivadas da pulsação da artéria digital, com o princípio básico da técnica de fotopletismografia digital.....	48
Figura 6	Correlações lineares significantes na população em estudo antes do tratamento (T ₀). A e B: Correlação positiva entre valor de CA com níveis de gordura visceral e de Tbars respectivamente. C: Correlação positiva entre níveis de gordura visceral e PAS; D: Correlação negativa entre níveis de gordura visceral e de SOD.....	64
Figura 7	Correlações lineares significantes na população em estudo antes do tratamento (T ₀). A e B: Correlação positiva entre valor de CA co níveis de gordura visceral e de Tbars respectivamente. C: Correlação positiva entre níveis de gordura visceral e PAS; D: Correlação negativa entre níveis de gordura visceral e de SOD.....	66
Figura 8	Correlações lineares significantes na população em estudo	

	antes do tratamento (T_0). A, B, C e D: Correlações positivas entre índices do balanço simpato-vagal (LF/HF) e aos valores de PAS, PAD, Triglicerídeos (trig) e variabilidade da PA (SDPA) respectivamente.....	68
Figura 9	Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência nos grupos placebo e Galantamina antes (T_0) e após (T_1) o tratamento. A) componente de alta frequência normalizado (HFnu); B) componente de baixa frequência normalizado (LFnu); C) balanço simpato-vagal (LF/HF).....	71
Figura 10	Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência nos grupos Placebo e Galantamina antes (T_0) e após (T_1) o tratamento. A) Valores absolutos do componente de alta frequência (HFabs); B) valores absolutos do componente de baixa frequência (LFabs); C e D) porcentagem dos componentes de alta (%HF) e baixa frequência (%LF).....	72
Figura 11	Níveis plasmáticos de TNF α antes (T_0) e após (T_1) o tratamento nos grupos Galantamina e Placebo.....	74
Figura 12	Níveis plasmáticos de IL6 antes (T_0) e após (T_1) o tratamento nos grupos Galantamina e Placebo.....	74
Figura 13	Níveis plasmáticos de sCD40L nos grupos Galantamina e Placebo antes (T_0) e após (T_1) o tratamento. ^L Variável analisada em escala logarítmica.....	75
Figura 14	Níveis plasmáticos de IL1 β nos grupos Galantamina e Placebo antes (T_0) e após (T_1) o tratamento.....	76
Figura 15	Níveis plasmáticos de Leptina nos grupos Galantamina e Placebo antes (T_0) e após (T_1) o tratamento.....	77
Figura 16	Valores plasmáticos de adiponectina nos grupos Galantamina	

	e Placebo antes (T ₀) e após (T ₁) o tratamento.....	77
Figura 17	Níveis plasmáticos de Insulina nos grupos Galantamina e Placebo, antes (T ₀) e após (T ₁) o tratamento. ^L Análises realizadas em escala logarítmica.....	79
Figura 18	Valores do Índice HOMA nos grupos Galantamina e Placebo, antes (T ₀) e após (T ₁) o tratamento.....	79
Figura 19	Valores de indicadores do Estresse Oxidativo. A) Valores plasmáticos da lipoperoxidação (Tbars); Níveis globulares de SOD (B) e CAT (C) antes (T ₀) e após (T ₁) o tratamento. análises realizadas em escala logarítmica.....	81

Miyahara CTS. *Efeitos da Galantamina sobre biomarcadores inflamatórios e adipocinas em pacientes com Síndrome Metabólica* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: O componente inflamatório se constitui em potente foco de estudo e intervenção no manejo das anormalidades da Síndrome Metabólica. Estudos recentes demonstram que a Galantamina, um anticolinesterásico que potencializa a via antiinflamatória colinérgica, reduz a adiposidade visceral e suprime a liberação excessiva de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias em modelos experimentais com animais obesos. Este estudo propôs a investigação dos efeitos do tratamento com Galantamina nos componentes da modulação autonômica cardiovascular, nos níveis de marcadores inflamatórios, em parâmetros hemodinâmicos e bioquímicos, nos níveis da gordura visceral abdominal e epicárdica, bem como em marcadores do estresse oxidativo, em portadores de SM. **MÉTODOS:** Estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego, placebo-droga (paralelo) realizado com 60 pacientes de ambos os sexos e idade entre 18-50 anos, que preenchiam os critérios para SM. Todos os pacientes foram amplamente avaliados para se excluirmos condições que pudessem interferir no estado inflamatório, e gravidez. Os pacientes foram randomizados na razão 1:1 para receberem placebo ou Galantamina, com dose inicial de 8 mg por 04 semanas, que foi aumentada para 16 mg por 8 semanas (total 12 semanas). Análise de variância para medidas repetidas foi usada para comparar diferenças entre os grupos, antes e após o tratamento. **RESULTADOS:** O grupo que recebeu Galantamina apresentou melhora da modulação simpato-vagal ao leito cardiovascular, menores níveis dos marcadores pró-inflamatórios (TNF α , IL-6, sCD40L), de leptina e de lipoperoxidação lipídica, e maiores níveis de adiponectina e das enzimas anti-oxidantes superóxido desmutase e catalase. Apresentou ainda melhora do metabolismo de glicose, caracterizada pela redução dos níveis de insulina e do índice HOMA. Esses efeitos foram independentes da perda de peso e da redução de gordura visceral. **CONCLUSÃO:** Nossos resultados indicam uma eficácia, anteriormente não reconhecida, da Galantamina na regulação dos níveis marcadores inflamatórios e estresse oxidativo e em aliviar a resistência à insulina em pacientes com a Síndrome Metabólica. Esses resultados demonstram ainda que a estimulação colinérgica pode aprimorar o manejo e tratamento da MetS

Descritores: síndrome X metabólica; obesidade abdominal; Inflamação; sistema nervoso autônomo; galantamina.

Miyahara CTS. *Galantamine effects on inflammatory biomarkers and adipokines in patients with Metabolic Syndrome* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016

.

BACKGROUND: Inflammatory profile constitutes a powerful focus of study and intervention on the management of abnormalities related to metabolic syndrome (MetS). Recent studies demonstrated that Galantamine, an anticholinesterase that enhances the cholinergic anti-inflammatory pathway, reduces visceral fat and suppresses the excessive release of adipokines and proinflammatory cytokines in obese experimental models. This study sought to investigate the effects of treatment with Galantamine on cardiovascular autonomic modulation components, inflammatory markers levels, hemodynamic and biochemical parameters, abdominal visceral and epicardial fat levels, as well as markers of oxidative stress, in patients with MetS. **METHODS:** A prospective, randomized, double-blind, placebo-drug (parallel) study was performed with 60 patients of both sexes and aged between 18-50 years, who met the criteria for MetS. All patients were widely evaluated to exclude conditions that might interfere in the inflammatory condition, and pregnancy. The patients were randomized in a 1: 1 ratio to receive placebo or Galantamine, with an initial dose of 8 mg for four weeks, which was increased to 16 mg for 8 weeks (total 12 weeks). Variance analysis for repeated measures was used to compare the differences between groups, before and after the treatment. **RESULTS:** The group that received Galantamine showed improvement of cardiovascular sympathetic-vagal balance, lower levels of pro-inflammatory markers (TNF α , IL-6, sCD40L), leptin and lipid peroxidation. Besides, the level of adiponectin, anti-oxidants superoxide dismutase enzymes and catalase were increased in the Galantamine group. Therefore, it was also observed improvement of the glucose metabolism, characterized by reduction of the insulin levels and HOMA index comparing Galantamine with Placebo. These effects were independent of the weight loss and of the visceral fat reduction. **CONCLUSIONS:** Our results indicate efficiency, not previously recognized, of the Galantamine on the regulation of inflammatory markers levels and oxidative stress, as well as in reducing insulin resistance in patients with MetS. These results further demonstrate that the cholinergic stimulation can improve the management and treatment of the MetS.

Descriptors: metabolic Syndrome X; obesity, abdominal; inflammation; autonomic nervous system; galantamine.

.

As doenças cardiovasculares (DCV) ainda se destacam como principal causa de morbimortalidade em todo mundo (AHA, 2011). Reconhece-se que a base fisiopatológica destas doenças está relacionada à complexa interação de alterações em um conjunto de mecanismos de regulação de funções metabólicas e hemodinâmicas, que acabam culminando com a lesão vascular.

Neste contexto, a Síndrome Metabólica (SM) vem ganhando destaque, pois retrata a interação de anormalidades metabólicas e hemodinâmicas que elevam o risco de DCV, especialmente em indivíduos que apresentam obesidade (Ando, Fujita 2009, Eckel, Grundy, Zimmet 2005, Filho *et al* 2006, Reilly, Rader 2003). O risco de morbimortalidade por DCV dos indivíduos com SM chega a ser o dobro que a dos indivíduos sem a síndrome (Alexander *et al*, 2003), uma vez que a associação de riscos cardiovasculares, típicos desta anormalidade, excede o risco da presença de seus componentes de forma isolada (Ando, Fujita 2009, Issoma 2001, Lakka 2002, Girman 2004, Malik, 2004).

O diagnóstico de SM pode se caracterizar numa potente ferramenta, na prática clínica, para triagem e acompanhamento dos indivíduos com alto risco de desenvolvimento de DCV. Além disso, o reconhecimento da SM é relevante em promover informação adicional a respeito do risco de desenvolvimento do diabetes (Alexander *et al* 2003; Reilly, Rader 2003).

O conceito de SM vem sendo amplamente discutido na literatura, e por retratar um conjunto de complexas interações, sua definição vem sofrendo alterações ao longo do tempo.

A fisiopatologia da SM ainda não é totalmente conhecida, mas fatores genéticos e ambientais (vida moderna com sedentarismo, consumo calórico

excessivo, estresse), que estão diretamente relacionados ao acúmulo de gordura visceral, inflamação e aumento da atividade simpática, provavelmente estão no cerne desta condição patológica.

Atualmente se reconhece que um estado inflamatório, de caráter crônico e subclínico, caracteriza diversas “condições” crônicas relacionadas à morbimortalidade por DCV, como é o caso da SM. E, recentemente, surgiu o conceito de que o sistema nervoso autônomo (SNA) modula o sistema imune e os estados inflamatórios por meio de uma rede de sinalização complexa, cujos elementos envolvem marcadores inflamatórios e células imunes. Tal conceito vem sendo estudado e ampliado. Esse foi o propósito desse estudo, que é o primeiro a avaliar, em pacientes com SM, os efeitos da modulação autonômica com Galantamina sobre componentes da resposta inflamatória.

1.1 Síndrome Metabólica: definição e o papel da obesidade visceral

Uma análise histórica sobre a SM demonstra que sua definição frequentemente girou em torno da identificação de seus componentes, ou seja, dos fenótipos antropométrico (índice de massa corporal e circunferência abdominal), bioquímico (níveis de glicemia, LDL/HDL e triglicerídeos) e hemodinâmico (pressão arterial) usados para o seu diagnóstico. Atualmente se pode afirmar que, estudos sobre os mecanismos etiopatogênicos envolvidos nessa síndrome vêm sendo foco das pesquisas. A elucidação sobre tais mecanismos vem preenchendo as lacunas que dificultavam seu entendimento, para “*além da somatória de suas partes*” (Waine, 2005; Reilly, Rader, 2003).

A relação entre DCV e a presença simultânea alterações metabólicas foi descrita pela primeira vez na década de 20 (Eckel 2005), e a presença simultânea de obesidade, dislipidemia, diabetes e hipertensão no final da década de 60 (Alexander et al, 2003; Reaven 88 e 94 Lemieus 2000, Kaplan 89, Defronzo 91). Mas foi final da década de 70 que termo “Síndrome Metabólica” foi, pela primeira vez, utilizado para descrever a presença simultânea destes quatro componentes (Alexander et al 2003). Em 1991, Ferrannini e *co/s* afirmaram que a causa da presença simultânea destes componentes era o estado de resistência à insulina (RI) e, por isso concluíram que o nome mais apropriado desta anormalidade metabólica era “Síndrome da Resistência à Insulina” (Ferrannini *et al*, 1991).

Reaven, em 1988 e 1992, também reconheceu a RI como causa do conjunto de anormalidades metabólicas, que não incluía a obesidade, da síndrome que denominou como “Síndrome X”. Entretanto, em estudos posteriores este pesquisador destaca a íntima relação entre obesidade e o estado de RI (Reaven, 1994, 2005).

Kaplan (1989), um ano após Reaven cunhar o termo a “Síndrome X”, acrescentou a obesidade abdominal aos fatores que descreviam essa síndrome e, a renomeou de “Síndrome do Quarteto Mortal” (hipertensão, resistência à insulina, elevados índices plasmáticos de triglicerídeos e a obesidade abdominal). Este autor subtraiu os baixos níveis de HDL colesterol dos fatores descritos por Reaven.

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

Em 1999, com o propósito de introduzir a investigação da SM na prática clínica, a organização Mundial de Saúde (OMS) definiu os critérios de seu diagnóstico. Novamente houve destaque para a investigação da RI, apontada na definição da OMS como o principal fator de risco para SM. Tanto a obesidade visceral, quanto à corporal, medida pelo índice de massa corporal (IMC), também foram propostas como componentes diagnósticos.

Em 2001, o National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP: ATP III) lançou a definição de SM que é a mais aceita e utilizada na prática clínica até os dias atuais. Segundo esta, o indivíduo é diagnosticado com portador de SM se tiver três ou mais dos seguintes fatores (Tabela 1):

Tabela 1- Critérios para diagnóstico da SM segundo o ATP III

- Obesidade central: circunferência da cintura > 102 cm (homens) > 88 cm (mulheres)
 - HDL colesterol< 40 mg/dl (homens) <50 mg/dl (mulheres)
 - Glicose sanguínea: ≥ 110 mg/dl
 - Pressão Arterial: $\geq 130 \times 85$ mmHg
 - Triglicerídeos: ≥ 150 mg/dl
-

Adaptado de: Eckel, Grundy, Zimmet. The metabolic syndrome. **The Lancet** 2005.

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

Cabe destacar que, como pesquisador reconhecido da temática das alterações metabólicas vinculadas à doença cardiovascular aterosclerótica, Reaven destacou em artigo de 2004 que, apesar das anormalidades associadas à SM serem similares as encontradas em estados de RI, não era possível negar que muitos indivíduos sem essa anormalidade apresentavam o padrão metabólico da SM. E ainda, nem todo indivíduo com RI desenvolvia as anormalidades vinculadas à síndrome. Todavia, podia-se afirmar que esse padrão metabólico anormal era preponderantemente mais comum nos indivíduos com obesidade abdominal (Reaven, 2004).

Diversos estudos apontam que a epidemia mundial de obesidade vem tornando a SM no maior e mais prevalente fator de risco para doença cardiovascular. A taxa de prevalência atual é de 20 a 25 % na população geral com comportamento de elevação, devido a essa epidemia (Ando, Fujika 2009, Wisse 2004, Dustan *et al* 2002). Por isso, aponta-se que a obesidade representa hoje o componente diagnóstico mais relevante da síndrome (Eckel 2005).

O estudo em profundidade da relação entre obesidade e suas comorbidades demonstra que não é o peso em si, ou a gordura total, que têm impacto no desenvolvimento de SM, mas sim o acúmulo de tecido adiposo em determinados segmentos corporais, em especial nas vísceras abdominais; aquela denominada de gordura visceral, abdominal ou central (Wisse, 2004). Pesquisas vinculadas ao Framingham Heart Study demonstraram que o volume de gordura visceral, avaliado por meio de tomografia computadorizada, estava associado com múltiplos fatores de risco metabólicos que levam a DCV (Fox *et al* 2007 Rosito *et al* 2008, Speliotes *et al* 2010). Vários outros estudos

confirmaram essa observação (Iacobellis *et al* 2008, Wheeler *et al* 2005, Iacobellis 2003).

Já está bem estabelecida a existência de uma grande heterogeneidade do ponto de vista metabólico entre os depósitos de tecido adiposo subcutâneo e visceral. O tecido adiposo visceral tem maior atividade endócrina e parácrina, relacionada à secreção de fatores pró-inflamatórios (citocinas e adipocinas), que contribuem substancialmente para o desenvolvimento de lesão vascular e de outras alterações metabólicas. Além disso, o tecido adiposo visceral abdominal é mais responsivo à ação de catecolaminas e de outros hormônios, bem como a estímulos do sistema nervoso central, que o tecido subcutâneo (Kershaw e Flier, 2004; Després, Lemieux, 2006; Ribeiro-Filho *et al* 2006).

Quando se analisa os componentes clássicos descritos na SM pode-se compreender que a liberação elevada de ácidos graxos livres na circulação, decorrente da lipólise dos estoques de triglicerídeos do tecido adiposo é um dos fatores que explicam a resistência dos tecidos à insulina (Eckel 1989; Bergman *et al*, 2006). Esse excesso de ácidos graxos livres na circulação acarreta alterações hepáticas e musculares no metabolismo da glicose (Samuel *et al*, 2004), elevação da liberação de insulina pelo pâncreas (hiperinsulinemia) (Boden, Shulman, 2002), e aumento do tônus simpático em diversos segmentos, gerando efeitos hemodinâmicos sistêmicos e a ampliação da lipólise (Ferrannini *et al*, 1987), perfazendo assim, um ciclo patológico.

O quadro de RI é preditor da diabetes do tipo 2 (Eckel 2007), e as alterações hemodinâmicas dela decorrentes podem culminar no estado de hipertensão (Kuroda *et al*, 1999; Egan 2003). Hall *et al* (1998) sugeriram ainda que a gordura visceral aumentada pode desempenhar um papel mecânico

compressivo sobre os rins e isto levaria a liberação dos componentes do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), com consequente elevação da pressão arterial na SM. O aumento de ácidos graxos livres e a resistência dos tecidos à insulina podem também explicar o aumento da síntese de triglicerídeos pelo fígado e seus níveis circulantes aumentados na SM. Tanto o aumento da gênese de triglicerídeos como o de seus níveis circulantes ocasionam redução nos níveis de lipoproteína de alta densidade, (HDL colesterol) seja por redução de sua síntese, como por aumento de seu clearance na circulação (Ji *et al*, 2006).

Pelo exposto, o Internacional Diabetes Federation - IDF (2006) recomenda que a obesidade abdominal, verificada pela medida da circunferência da cintura (em valores ajustados segundo a etnia), seja o critério fixo para o diagnóstico da SM, com mais dois critérios dentre: triglicerídeos ≥ 150 mg/dl; HDL colesterol < 40 para homens e < 50 mg/dl para mulheres, pressão arterial sistólica ≥ 130 e diastólica ≥ 90 mmHg e glicose de jejum elevada. Vale destacar que o consenso do IDF considera intolerância à glicose valores de glicemia de jejum maior ou igual a 100 mg/dL (IDF 2006).

Em 2005, em uma revisão dos critérios de SM, a American Heart Association e o National Heart, Lung, and Blood Institute (AHA/NHLBI) mantiveram o critério do NCEP ATPIII (Tabela 2). A justificativa foi o fato desse critério não enfatizar uma única etiologia, ou seja, não enfoca nem resistência à insulina, nem gordura abdominal, para a SM. Além disso, manteve-se a justificativa de ser um critério de maior simplicidade de aplicação. Todavia, foi alterado o ponto de corte da glicemia de jejum de 110 para 100 mg/dl, em

decorrência de ajustes promovidos pela American Diabetes Association (ADA) no diagnóstico de DM (Grundy *et al*, 2005).

Tabela 2- Critérios para diagnóstico da SM segundo o ATP III revisado

Presença de 3 ou mais dos seguintes fatores

Tiglicerídeos	≥ 150 mg/dl
HDL-Colesterol	
Homem	< 40 mg/dl
Mulher	< 50 mg/dl
Pressão Arterial	≥ 130x85 mmHg
Obesidade Central	
Homem	CA ≥ 102 cm
Mulher	CA ≥ 88 cm
Glicose de jejum	≥ 100mg/dl

Adaptado de Grundy et al, 2005
CA: Circunferência abdominal

Mais recentemente, além da gordura visceral abdominal, a que se localiza ao redor do coração (gordura epicárdica) tem sido alvo de grande interesse. Devido a sua proximidade aos vasos e seu efeito parácrino, sua participação na inflamação vascular dos vasos coronarianos e do próprio miocárdio vem sendo investigada. Estudos demonstraram que a gordura epicárdica, avaliada por meio da tomografia, se caracterizava como parâmetro acurado de risco para SM, igual ou melhor que outros parâmetros antropométricos, incluindo a gordura intra-abdominal (Wang, Li, Chen 2010). Além disso, a gordura epicárdica, a depender da sua espessura e localização, é preditora de calcificação vascular cardíaca e, conseqüentemente, de doença coronariana (Rosito *et al* 2008, Sarin *et al*, 2008 e Wang, 2009 e 2010).

Pesquisas atuais vêm demonstrando que a relação entre gordura visceral e SM vai muito além de explicar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos com a etiologia de seu padrão anormal metabólico clássico. O tecido adiposo é densamente innervado, infiltrado por células do sistema imune, e vem sendo considerado cada vez mais um órgão potente na produção de substâncias com ação local, proximal e sistêmica, responsivo a estímulos hormonais, ambientais e do SNC e, que apresenta uma programação genética que determina seu padrão de funcionamento patológico (Figura 1).

Figura 1- Fisiopatogênese da síndrome metabólica e doença cardiovascular aterosclerótica. Adipocinas da adiposidade central e sistema imunológico desempenham papel central no desenvolvimento da síndrome (Adaptado de Reilly e Rader, 2003, p.1549; *Circulation*)

1.2 Fisiopatologia da inflamação na SM: o papel do tecido adiposo

Muito se discute na literatura se a SM representa somente um aglomerado (*cluster*) de fatores de risco ou se há uma relação causal entre os seus componentes. O não consenso sobre esse ponto decorre da observação de que, alterações em cada um dos componentes, de forma individual, podem acarretar distúrbios nos outros sistemas de regulação e assim, desenvolver todo o conjunto que se denomina SM.

Atualmente se propõe que mecanismos mediados por citocinas pró-inflamatórias, produzidas principalmente pelos adipócitos da gordura visceral e por células do sistema imune inato, ativam o sistema nervoso simpático, o SRAA e que desencadeiam o estresse oxidativo em diversos tecidos, possam explicar a etiologia do risco cardiovascular da SM.

A atividade do tecido adiposo pode ser influenciada por diversos hormônios e pela ação direta do sistema nervoso autônomo, considerando que esse tecido é inervado pelo sistema nervoso simpático (Lopes e Egan, 2006) e parassimpático (Kreier *et al*, 2002; Uno, 2006) (Figura 2).

Figura 2- Tecido Adiposo inputs e outputs. (Adaptado de Ribeiro-Filho *et al* 2006, **Arq Bras Endocrinol Metab**).

Um estado inflamatório de baixo grau (subclínico), mas de caráter crônico, vem se caracterizando como componente mais robusto na fisiopatogênese da SM (Festa *et al*, 2000). Dentre as citocinas mais estudadas no contexto da síndrome estão o fator de necrose tumoral (TNF- α) e as interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6). Além destas citocinas, destacam-se como marcadores inflamatórios liberados pelo tecido adiposo: a proteína C reativa (PCR), a leptina, a resistina, o angiotensinogênio, o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI) -1, entre outros que vem sendo amplamente investigados.

Cabe destacar que dentre as citocinas, o TNF- α e a IL-6 são as mais estudadas e diretamente apontadas como desencadeadoras das respostas pró-inflamatórias (Eckel, Grundy, Zimmet, 2005).

O TNF- α já também tem papel comprovado no desenvolvimento da resistência dos tecidos à insulina, diabetes *mellitus* do tipo 2 e aumento do tônus simpático (Das, 2010). Em obesos, há uma forte correlação entre os níveis de TNF- α e o metabolismo de glicose, pois essa citocina prejudica a sinalização intracelular da insulina, ao reduzir a fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e a atividade do receptor de insulina com atividade quinase (PI3K). Isso resulta na redução da síntese e translocação do GLUT-4, que é um dos principais transportadores de glicose, resultando na diminuição da captação de glicose pelas células, mediada pela insulina (Volp *et al*, 2008). A redução de sensibilidade da insulina causa glicogênese hepática e reduz o clearance de glicose no músculo esquelético e adipócitos. Desta forma, há conseqüente aumento dos níveis de glicose circulantes e hiperinsulinemia.

Outro mecanismo que pode explicar a RI induzida pelo TNF- α , é o aumento nos níveis de ácidos graxos livres circulantes decorrentes de lipólise ocasionada por ação desta citocina (Wisse, 2004; Després, Lemieux, 2006).

É relevante destacar que o TNF- α é produzido tanto por adipócitos, quanto por macrófagos infiltrados no tecido adiposo e, que apesar das concentrações do TNF serem maiores ao nível tecidual (Kershaw, Flier, 2004), seus níveis sistêmicos são capazes de representar um estado inflamatório. Outro fato importante é que, o TNF- α é mais secretado pelo tecido adiposo visceral, comparado ao tecido subcutâneo (Tsigos *et al*, 1999).

Além dos efeitos diretos sobre o metabolismo de glicose e ácidos graxos, sugere-se que o TNF- α apresenta ações relacionadas à expressão genética, como a supressão da expressão de genes envolvidos na captação de

glicose, no metabolismo e oxidação de ácidos graxos e ainda aumenta a expressão de genes envolvidos na síntese do colesterol e ácidos graxos (Ruan, *et al*, 2002). O TNF também está envolvido com a produção e liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6.

A IL-6 também é uma citocina com ação pró-inflamatória associada com obesidade, estados de RI e hiperinsulinemia na SM. Pode ser considerada como citocina endócrina, pois seu foco de ação se localiza distante do local de liberação, desta forma, seus efeitos se correlacionam com suas concentrações plasmáticas (Wisse, 2004).

Semelhante ao TNF- α , a IL-6 é secretada tanto por adipócitos como por macrófagos do tecido adiposo e, seus níveis circulantes aumentam conforme o nível de adiposidade corporal. Estímulos hormonais (insulina e glicocorticóides), neural (inervação simpática) e parácrinos (TNF- α e IL1- β) têm sido relacionados com o aumento na produção e secreção da IL-6 (Wisse, 2004). A expressão e secreção desta citocina é 2 a 3 vezes maior nos depósitos de gordura visceral do que nos subcutâneos (Fain *et al*, 2004). Estudos demonstram que os níveis de IL-6 estão aumentados em hipertensos e em indivíduos com RI (Das 2010, Bautista *et al*, 2005; Fernandez-Real *et al*, 2001).

Em indivíduos magros a liberação de IL-6 desempenha importantes ações benéficas na regulação do balanço energético. Entretanto, há produção e secreção desregulada na obesidade e em outros estados em que há aumento do tônus simpático.

Dentre as ações da IL-6 que se relacionam à SM destacam-se: 1. A estimulação da produção da PCR, que é uma citocina amplamente relacionada

à injúria vascular; 2. Regulação no metabolismo de carboidratos e lipídeos ao, reduzir a expressão do substrato do receptor de insulina -1 (IRS-1) e do GLUT 4 nos tecidos hepático e muscular, bem como por aumentar a lipólise, por inibição da lipase protéica e aumento consequente da liberação de ácidos graxos livres na circulação (Volp *et al*, 2008).

Outra interleucina relacionada à SM é IL-1 β , que também apresenta um perfil pró-inflamatório e está envolvida no processo de aterogênese. Essa interleucina também mantém íntima relação com os níveis de TNf- α e a IL-6 e, num complexo de ações conjuntas, tais citocinas são capazes de manter o estado inflamatório e levar a resistência periférica dos tecidos à insulina.

Assim como o TNF- α , a IL-1 β induz uma via de sinalização importante no desencadeamento da resposta inflamatória, por meio da ativação do fator de transcrição fator nuclear kappa B (NF- κ B), que está relacionado por sua vez à expressão das proteínas envolvidas com o estado inflamatório, como moléculas de adesão endotelial (Bastos, Rogero, Arêas, 2009).

A IL-1 β também estimula a produção de IL-6 por células musculares lisas e aumenta a expressão de macrófagos, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF), que se associam ao processo inflamatório e de aterogênese (Francisco, Hernández, Simó, 2006).

Cabe destacar nesse ponto que, o eixo inflamatório da SM está relacionado a diversas ações que aumentam as chances de doença cardiovascular, como aumento da expressão das moléculas de adesão intercelular (ICAM), molécula de adesão de células vasculares (VCAM), proteína quimiotática de monócitos (MCP), fator estimulador de colônias de

macrófagos (M-CSF) e as proteínas CD40 e sCD40L. Além disso, como os níveis de TNF- α , IL-6, PCR, IL-1 β , ICAM, VCAM, MCP também são elevados em estados de hiperglicemia e obesidade visceral, e as proteínas CD40 e sCD40L em indivíduos com obesidade visceral, sugere-se que além de explicarem agravos metabólicos e hemodinâmicos da SM, tais componentes inflamatórios podem estar envolvidos no desenvolvimento da mesma.

Ainda em relação às alterações metabólicas e o estado inflamatório na SM, alguns estudos vêm demonstrando que os níveis de interleucina 10 (IL-10), reconhecida como citocina com ações antiinflamatórias por inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias e outros fatores de lesão endotelial, podem estar reduzidos na síndrome (Esposito *et al*, 2003; Choi *et al*, 2007)

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

Estudos sugerem que a leptina, por exemplo, aumenta a produção de citocinas inflamatórias como a PCR, IL-6 e outros marcadores produzidos por monócitos e macrófagos (Wisse 2004, Prasad, Quyyumi 2004).

Apesar de ser classificada como peptídeo hormonal envolvido com a regulação do metabolismo energético, a leptina vem sendo amplamente estudada como adipocina pró-inflamatória que, na SM pode ajudar explicar o estado de RI, aumento do estímulo simpático e manutenção do estado inflamatório.

De forma paradoxal, os níveis de leptina estão elevados na obesidade, provavelmente devido à resistência aos efeitos hipotalâmicos dessa adipocina

em obesos. Dessa forma, os níveis plasmáticos de leptina se mantêm elevados e propiciam a potencialização de suas ações em outras células alvo.

Diversos estudos já demonstraram a relação entre níveis de leptina circulantes e SM. Kajikawa *et al* (2011) mostraram que os níveis de leptina se correlacionavam positivamente com valores aumentados de circunferência abdominal (CA), índice de massa corporal (IMC) e a RI medida pelo índice HOMA. Como num ciclo vicioso, os níveis de leptina se elevam por ação da insulina, TNF- α e glicocorticóides (Kajikawa *et al*, 2011).

Os efeitos da leptina são mediados especialmente por receptores que apresentam grande homogeneidade aos de citocinas e, embora seus receptores no hipotálamo não sejam adequadamente ativados na obesidade, receptores funcionais são encontrados fora dessa área do sistema nervoso central (SNC).

Algumas células do sistema imune são alvo da ação da leptina. Estudos experimentais demonstram que essa adipocina ativa células do sistema imune inato e do adaptativo, em especial linfócitos T helper do tipo 1 (Th1), de caráter inflamatório e, diminui a população de linfócitos T helper do tipo 2 (Th2) que estão envolvidos na regulação da resposta inflamatória (Wisse, 2004; Lord, 2002). Embora sejam reconhecidos efeitos benéficos da leptina durante infecções agudas, a imunomodulação crônica da resposta inflamatória, tanto em animais como em humanos, tem efeitos prejudiciais. (Hasty *et al*, 2001).

Além disso, a leptina parece ser capaz de aumentar a produção de citocinas pelos macrófagos e, para além de suas ações no sistema imune que se relacionam a manutenção do estado inflamatório patológico, seu efeito

regulador da pressão arterial, por ativação do sistema nervoso simpático e depressão da resposta vasodilatadora atribuída ao óxido nítrico (NO), já foi demonstrado (Beltowsky, 2006).

Assim temos que, o funcionamento inadequado dos receptores de leptina do hipotálamo compromete a regulação da ingestão alimentar, sem comprometer a lipólise, o que acarreta aumento da liberação de ácidos graxos livres na circulação sanguínea e a produção de citocinas inflamatórias que propiciam o estado de RI (Chu *et al*, 2001; Zeman *et al*, 2009). A hiperinsulinemia, decorrente tanto dos níveis elevados de leptina como do estado de RI, aumenta o tônus simpático e pode aumentar os níveis pressóricos (Bravo *et al*, 2006), além de potencializar a lipólise e liberação dos ácidos graxos e síntese de triglicerídeos pelo fígado.

Os níveis de leptina se correlacionam ainda com a produção de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez determinam a produção, proliferação e migração de monócitos circulantes (Wisse, 2004). Assim, o componente inflamatório da SM está também intimamente relacionado ao desbalanço do estresse oxidativo, somando assim mais um fator que propicia a DCV (Hopps *et al*, 2010, Ando, Fujita 2009, Skalicky *et al*, 2008; Furukawa *et al*, 2004).

Os adipócitos também produzem e liberam a adipocina denominada adiponectina, cujos efeitos sobre o metabolismo da glicose e citocinas pró-inflamatórias são contrários aos da leptina. Estudos demonstram que a adiponectina tem efeitos antiinflamatórios protetores benéficos para manutenção da sensibilidade dos tecidos à insulina e contra lesão vascular. No

entanto, apesar de ser produzida pelos adipócitos, sua liberação está reduzida na obesidade visceral (Matsuzawa *et al*, 2004).

Alterações nos genes que codificam a adiponectina predispõe a SM, RI, diabetes do tipo 2 e outras doenças cardiovasculares (Volp *et al*, 2008). Por suas propriedades antiinflamatórias, essa adipocina vem sendo destacada como marcador da SM, pois seus níveis diminuídos se correlacionam com a elevação das citocinas IL-6, TNF- α e PCR e RI (Choi *et al*, 2007).

De fato, estudo de Maeda *et al* (2001) demonstrou que o TNF- α é um importante inibidor da adiponectina e que níveis dessa adipocina estão reduzidos no diabetes do tipo 2. Lindsay *et al* (2002) demonstraram, em modelo animal, que os níveis de adiponectina se correlacionaram fortemente com a sensibilidade à insulina pois, quanto maiores os níveis de adiponectina, menor a RI.

Além disso, a adiponectina vem demonstrando efeitos inibitórios em fenômenos vinculados à lesão aterosclerótica como: 1. Inibição da expressão de moléculas de adesão como ICAM, VCAM e E- seletina; 2. Inibição do fator nuclear NF-kB induzido pelo TNF- α ; 3. Inibição da expressão do receptor scavenger classe 1 (SR-A) de macrófagos, que resulta na diminuição da captação do LDL – colesterol oxidado e na formação de célula espumosa; 4. Inibição da proliferação de células musculares lisas (Matsuzawa *et al* 2004)

Com base no exposto, evidencia-se íntima relação entre obesidade, em especial a visceral, biomarcadores da inflamação, sintetizados e liberados pelos adipócitos e por células imunes do tecido adiposo, e SM. Assim, métodos voltados ao manejo desse estado inflamatório podem ser relevantes no tratamento e manejo da SM.

1.3 Regulação neural da inflamação: a “Via Antiinflamatória Colinérgica”

O conhecimento da influência do sistema nervoso sobre o sistema imunológico é reconhecida de longa data. Hans Seyle, em 1936, foi um dos primeiros cientistas a descrever os efeitos de estímulos estressores mentais e fisiológicos sobre componentes do sistema imunológico. Em seus estudos, os animais expostos a fatores nocivos apresentaram, à necropsia, hipertrofia das glândulas adrenais, úlceras gástricas e atrofia de órgãos linfóides (Reiche, Nunes, Marimoto, 2004).

Para além dos efeitos moduladores de hormônios do eixo neuroendócrino clássico, o estudo da interação entre os sistemas, imune (SI) e nervoso central (SNC), vem se expandindo e se constituindo em campo de interesse de inúmeras áreas de pesquisa relacionadas à neurociência, imunologia, fisiologia e outros.

Sabe-se atualmente que diversos estímulos provenientes do SN, central e periférico, podem modular a ação de células do sistema imunológico, bem como a liberação de substâncias envolvidas na resposta imune

Numa visão embasada no conceito de homeostasia fisiológica, parece claro que SNC e SI interajam na preparação do organismo para enfrentar mecanismos estressores, entendidos aqui como fatores patológicos. Todavia, essa relação pode ocorrer de forma equilibrada e se constituir num mecanismo relevante na proteção da homeostase, ou, de outra forma, essa interação pode ajudar a perpetuar quadros patológicos.

Os efeitos da estimulação simpática sobre a resposta imune e inflamação já são bem estudadas. Já é sabido que a adrenalina (secretada pela medula adrenal) e a noradrenalina (secretada pelos axônios de terminais simpáticos e pela medula adrenal) modulam a liberação de citocinas, e assim a resposta inflamatória por meio de receptores α e β adrenérgicos nas células imunes (Hasko e Szabo, 1998). Além disso, há acumulada evidência que os tecidos linfóides são amplamente inervados por terminais simpáticos (Pongratz, Straub 2014; Felten et al, 1987). Dessa forma, a estimulação simpática descompensada mantém ou aumenta o estado inflamatório.

Recentemente descobriu-se que a estimulação parassimpática vagal também pode modular a resposta inflamatória e, suprimir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, controlar ou mesmo inibir a inflamação (Tracey, 2002).

Estudos sobre essa nova função da via parassimpática, que é mediada pelo nervo vago, é denominada de “Via Antiinflamatória Colinérgica” (Pavlov *et al*, 2003). O conceito sobre essa via, denominada também em alguns estudos como “reflexo antiinflamatório colinérgico”, teve início nos anos 2000, com o grupo de Tracey e *cols* que investigavam os efeitos supressivos de uma droga, denominada CNI-1493, sobre a inflamação induzida pela aplicação de um agente irritante na pata de ratos. Nesse estudo a administração intracerebrovascular (ICV) da CNI-1493 suprimiu a resposta inflamatória de forma mais eficiente que a sua administração sistêmica da droga (Borovikova *et al*, 2000a). Os mesmos pesquisadores comprovaram que tais efeitos dependiam da ação do nervo vago, pois com a vagotomia os efeitos antiinflamatórios não ocorriam.

Num modelo de endotoxemia letal, também em ratos, a estimulação elétrica da via eferente vagal mimetizou os efeitos da injeção ICV da CNI-1493. Como efeitos antiinflamatórios ocorreram: a diminuição dos níveis séricos e hepáticos de TNF- α , além da atenuação do desenvolvimento de hipotensão severa e o choque sistêmico em animais expostos a endotoxina, com aumento da sobrevivência dos mesmos (Borovikova *et al* 2000b). Em outros estudos do mesmo grupo, a ativação desta via neural, pela estimulação elétrica do nervo vago, também resultou em redução significativa nos níveis sistêmicos de TNF- α e atenuou o desenvolvimento do estado de choque de ratos submetidos à lesão cardíaca de isquemia-reperfusão, que é outro modelo de inflamação sistêmica (Bernik *et al*, 2003; Pavlov, Tracey 2005). Tais resultados comprovaram que os efeitos da estimulação vagal eferente apresentavam ação imunomodulatória de caráter sistêmico.

Nota-se que os estudos citados sobre a Via Antiinflamatória Colinérgica comumente acessam o componente inflamatório pelos níveis da citocina TNF- α , por ser considerado um mediador necessário e suficiente de resposta inflamatória (Nathan, 2002; Tracey, 2002).

Outros estudos que seguiram o paradigma da Via Antiinflamatória Colinérgica elucidaram outros componentes da mesma. Borovikova *et al* (2000a) demonstraram que os efeitos antiinflamatórios da estimulação vagal podiam ser bloqueados pela atropina. Wang *et al* (2003) demonstraram que os efeitos periféricos da estimulação eferente vagal dependiam de receptores nicotínicos do tipo $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR). Pavlov *et al* (2006) mostraram que antagonistas muscarínicos não eram capazes de suprimir com a mesma

eficácia os efeitos antiinflamatórios e, que apenas o bloqueio central dos receptores muscarínicos surtia efeito parcial sobre a via.

Em conjunto, esses dados demonstraram que: 1. Que a acetilcolina era o principal neurotransmissor envolvido, por isso o nome “Via Antiinflamatória Colinérgica”; 2. Os efeitos da estimulação vagal se davam preferencialmente pela via colinérgica mediada por receptores nicotínicos do tipo $\alpha 7$ n AChR e; 3. receptores muscarínicos mediavam ações centrais desta via antiinflamatória.

Assim, após as primeiras descrições da via Antiinflamatória Colinérgica Tracey (2002) propôs um complexo sistema que funcionava como um mecanismo reflexo em resposta a estímulos periféricos inflamatórios. Este sistema compreendia o estímulo inflamatório, especialmente o TNF- α , capaz de acionar a via aferente vagal, centros reguladores vagais localizados no SNC que por sua vez que acionavam a via eferente vagal e áreas supra bulbares que inibiam a resposta inflamatória, atuando em células do sistema imune, em especial, nos macrófagos. (Figura 3)

Figura 3- Reflexo Antiinflamatório Colinérgico.(Apaptado de Tracey KJ, **The JCI**, 2007)

Nesse modelo, a estimulação parassimpática (vagal), por meio da ação da acetilcolina, demonstrou-se capaz de inibir a liberação de TNF, IL-1, IL-6 e IL-8 de macrófagos ativados com LPS (mimetizando um estado inflamatório), sem afetar a produção de citocinas antiinflamatórias, como a IL-10 (Borovikova, 2000b; Tracey, 2002). Além disso, os sinais aferentes vagais podem ser retransmitidos às áreas do SNC, como a formação reticular da medula, lócus cerúleo e hipotálamo culminando em especial na liberação do ACTH e inibição do funcionamento de células imunes.

Cabe destacar que outro modelo explicativo das ações antiinflamatórias vagais foi proposto Rosas-Ballina *et al* (2011) e neste, postula-se uma conexão não neural entre a via eferente vagal e o baço, órgão apontado como essencial na mediação sistêmica das respostas

antiinflamatórias vagais. Segundo esse modelo, a estimulação vagal eferente trafega pelo nervo esplênico, cujas terminações nervosas liberam no baço o neurotransmissor noradrenalina (terminações simpáticas); a noradrenalina estimula receptores na parede dos linfócitos T, que por sua vez, são capazes de sintetizar e liberar acetilcolina; esse neurotransmissor estimula os macrófagos localizados nas adjacências, por meio da interação com os receptores $\alpha 7nACh$. Como esses macrófagos são produtores de citocinas inflamatórias, a estimulação vagal se constitui numa via de redução da resposta inflamatória, fato que pode ser exemplificado em diversos estudos (Huston, Tracey 2011; Rosas-Ballina, Tracey 2009; Rosas-Ballina *et al*, 2008).

Mais recentemente, uma revisão de 2011 propôs outro modelo, incorporando a participação de outras estruturas neurais e imunes nesse complexo reflexo (Rosas-Ballina *et al*, 2011).

Assim, apesar de ainda não se conhecer todos os elementos celulares e detalhes das vias neurais do reflexo antiinflamatório colinérgico, esse sistema já vem se configurando como alvo terapêutico, visando condições clínicas que tem como base um estado de inflamação exacerbada e/ou crônica, como: artrite reumatóide (Goldstein *et al*, 2007), insuficiência cardíaca (Behling *et al*, 2003), doenças auto-imunes (Nizri *et al*, 2006), diabetes (Ali *et al* 2015; Schmartz *et al*, 2009), doença de Alzheimer, obesidade e na SM (Satapathy *et al*, 2011).

1.4 Estimulação da Via Antiinflamatória Colinérgica pela Galantamina na SM

Estudos que avaliaram a modulação autonômica demonstram que há redução da atividade vagal no contexto da obesidade e na SM (Richter *et al*, 1996; Rissanen, Franssila-Kallunki, Rissanen, 2001; Koskinen *et al*, 2009). Além disso, já foi demonstrado que a atividade da enzima acetilcolinesterase, que modula os efeitos da acetilcolina na fenda sináptica e em suas células alvo após estimulação vagal, está aumentada em estados de RI (Schmatz *et al*, 2009).

Estudos indicam ainda que a via eferente do nervo vago atua como via de comunicação entre o hipotálamo e a gordura visceral (Das, 2010) e sua estimulação inibe a liberação de citocinas inflamatórias desta gordura. Além disso, o nervo vago atua como via neuronal de comunicação entre fígado e o tecido adiposo e o SNC. Em modelo animal, a ressecção do segmento aferente hepático do vago impediu a redução dos níveis de adiposidade periférica, indicando que esse nervo media diversas ações relacionadas ao balanço energético da gordura periférica, inclusive as decorrentes da estimulação simpática (Uno *et al* 2006).

Além da estimulação elétrica do nervo vago, o exercício físico e medicamentos podem ser utilizados para potencializar a ação vagal. No contexto da SM, a estimulação colinérgica por meio da inibição da ação da enzima acetilcolinesterase já vem sendo empregada em modelos animais (Das, 2007; Pavlov *et al*, 2009). Dentre as drogas que desempenham tal função, destaca-se nesse estudo a Galantamina.

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

A administração de Galantamina mostrou-se capaz de reduzir significativamente os níveis de séricos de TNF- α em modelos de obesidade em ratos e camundongos. O papel estimulador dessa droga na Via Antiinflamatória Colinérgica foi demonstrado pela ausência de seu efeito nos níveis séricos de TNF- α em ratos que não apresentavam a $\alpha 7nAChR$, a subunidade do receptor nicotínico de acetilcolina responsável por mediar os sinais antiinflamatórios dessa via (Pavlov, Tracey 2005; Pavlov, 2007; Van Maanen, Vervoordeldonk, Tak 2009). Vale destacar que o tratamento com Galantamina, além de suprimir os níveis de TNF- α circulantes, também promoveu a redução do peso corporal, da adiposidade abdominal e da resistência à insulina (Satapathy *et al*, 2011).

No estudo de Mennatallah *et al* (2014), o tratamento de ratos diabéticos com Galantamina resultou em redução de peso corporal, dos valores de glicemia de jejum, da resistência à insulina medida pelo índice HOMA, reduziu ainda os níveis de TNF- α circulantes, melhorou o padrão lipídico, e reduziu o estresse oxidativo de diversos tecidos. Os autores atribuíram parcialmente tais

afeitos ao aumento dos mecanismos de sinalização intracelular da insulina promovidos pela Galantamina.

Assim, a Galantamina apresenta potencial para agir sobre diversos fatores determinantes da SM.

Considerando vários aspectos relacionados à SM (como sua relevância como agrupamento de fatores de risco cardiovascular, o aumento da sua prevalência, decorrente da epidemia mundial de obesidade, e o reconhecimento do processo inflamatório crônico como um mecanismo fisiopatológico comum no desenvolvimento dos distúrbios característicos dessa condição) e o papel do sistema nervoso parassimpático como importante modulador da atividade inflamatória, tornam-se necessários estudos que ampliem o entendimento sobre a interação destes elementos. E, em especial, de estudos que avaliem intervenções sobre a potencial base fisiopatológica da SM, visando agir positivamente na progressão das doenças cardiovasculares a ela relacionadas. A Galantamina, droga aprovada pela ANVISA e de uso clínico rotineiro para pacientes idosos e com diversas morbidades, por sua ação anticolinesterásica, poderia amenizar o estado inflamatório e interferir de modo benéfico nos distúrbios metabólicos associados à Síndrome Metabólica.

2.1 Hipóteses

As hipóteses do presente estudo foram: o uso de Galantamina em pacientes com SM pode aumentar a modulação vagal, e assim atuar em componentes da Via Antiinflamatória Colinérgica levando, conseqüentemente, à redução de marcadores inflamatórios. Além disso, essa droga poderia reduzir marcadores do estresse oxidativo sistêmico, e conseqüentemente, melhorar o perfil lipídico e a resistência à insulina destes pacientes.

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da Galantamina sobre biomarcadores inflamatórios e demais componentes da Síndrome Metabólica

3.2 Objetivos específicos

Analisar os efeitos do tratamento com Galantamina nos parâmetros:

- Autonômicos - relacionados a variabilidade da FC e da PAS nos domínios do tempo e da frequência;
- Inflamatórios – dosagem de adipocinas e citocinas no sangue periférico
- Clínicos - dados antropométricos, e quantificação de gordura visceral (abdominal e epicárdica)
- Metabólicos – dosagem de glicose e glicose, cálculo do HOMA, e dosagem de lípidos no sangue periférico
- Estresse oxidativo – quantificação do balanço redox no sangue periférico

4.1 Delineamento do Estudo

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

uso). As informações relevantes do diário foram transcritas para o prontuário do participante.

4.2 Casuística

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

4.3 Cálculo amostral

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

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

4.4 Critérios de Inclusão

Os indivíduos deviam preencher os critérios listados abaixo:

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

4.5 Critérios de Exclusão

Não foram incluídos no estudo indivíduos que estavam ou apresentavam:

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

8. Abuso de álcool ou outras substâncias nos 12 meses prévias à entrada no estudo;
9. História de depressão maior ou pacientes com ideação suicida;
10. História pessoal de desordem alimentar.

4.6 Procedimentos

4.6.1 Avaliação de inclusão e seguimento

A anamnese e exame físico dos participantes do estudo foram realizados em todo decorrer do estudo e serviram como fonte de informações referentes ao estado de saúde dos participantes. Tal avaliação incluiu: o registro de dados demográficos, inquérito sobre medicamentos utilizados, resultados de exames prévios e os resultados dos exames realizados no decorrer do protocolo, avaliação antropométrica e a investigação de sintomas adversos.

Avaliação antropométrica: Circunferência abdominal (cm) – medida na metade da altura entre a crista ilíaca e a borda inferior da costela, utilizando uma fita métrica inextensível. Estatura (m) – medida pelo estadiômetro de marca Sanny. Massa corporal total (kg) – usando balança Filizola. Índice de massa corporal (IMC) – peso (kg)/estatura²(m). Para determinação da classificação do IMC foi adotada a classificação da OMS (2006).

Também foi realizado, antes e após o término do tratamento, um exame neurológico minucioso por um especialista (neurologista) que incluiu:

avaliação neuropsicológica qualitativa (presença ou não de apatia, indiferença, diminuição no fluxo verbal, diminuição ou ausência de fala espontânea, estereotípias, atividade motora sem propósito e inapropriidades sociais como intrusões entre outros) e testes neuropsicológicos.

Quanto aos “critérios de segurança” dos pacientes, usamos a padronização apresentada no Anexo 1 e ao final do protocolo os participantes mantiveram seguimento ambulatorial indicado no Ambulatório de Síndrome Metabólica da Universidade Nove de Julho ou no Incor/USP.

4.6.2 Testes Cognitivos

Foram aplicados testes neuropsicológicos padronizados: capacidade de memorização de palavras (anexo 2), flexibilidade mental (anexo 3); capacidade de concentração (anexo 4), Mini exame do estado mental (anexo 5) e prova do relógio (anexo 6).

4.6.3 Exames laboratoriais

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

Exames laboratoriais básicos (bioquímicos e hormonais): perfil lipídico (colesterol total e frações), triglicerídeos, TSH, T₄ livre, TGO, TGP, beta HCG (para as mulheres), glicose, hemoglobina glicada, insulina, creatinina, hemograma completo, sódio, potássio. Para coleta de amostras de sangue para realizar tais medidas, os participantes foram instruídos a realizar jejum de 12 horas. Os exames foram realizados pela Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP Medicina Diagnóstica).

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

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

A análise dos marcadores inflamatórios foi realizada com kits Multiplex pela empresa Gênese. Esses kits utilizam tecnologia Luminex xMAP (Multiple Analyte Profiling, x = variável a ser medida) que envolve um processo de quantificação de microesferas de látex com dois fluoróforos específicos. Utilizando proporções precisas desses dois fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas que são identificadas em código de cores

pelo instrumento Luminex. Os kits Multiplex foram desenvolvidos com essas microesferas e se fundamentam no processo de “imunoensaio”. Anticorpos de captura específicos para cada analito (substância a ser detectada na amostra) estão imobilizados nas superfícies das microesferas por meio de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito se liga aos anticorpos de captura, a detecção final é feita através de um outro marcador fluorescente (Streptavidina-Ficoeritrina) ligado ao anticorpo de detecção. O equipamento Luminex 200 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (código de cor para o ensaio), e o segundo feixe de laser quantifica o sinal de reporte de cada microesfera. Cabe destacar que esse método de dosagem de biomarcadores é indicado quando se almeja a análise de um perfil de fatores em interação, num quadro determinado. O método proporciona assim o reconhecimento de um panorama mais amplo que a ação individual de um elemento isolado.

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

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

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

- Centrifugação da amostra em 3000rpm por 20 minutos a 4 °C, seguido de separação do plasma e subsequente congelamento em nitrogênio.
- Preparo dos glóbulos vermelhos: após retirada do plasma, 1 ml dos glóbulos foi aspirado e colocado em tubo seco; a seguir foi adicionado 1mL soro fisiológico, o conteúdo foi homogeneizado e colocado novamente na centrifuga por 10 minutos a 3000 rpm. Este procedimento deve ser repetido por 3 vezes, sempre se descartando o sobrenadante e adicionando soro fisiológico em igual quantidade de glóbulos, até que se obtivesse o completo preparo dos glóbulos vermelhos. Para cada 100ul dos glóbulos vermelhos lavados foram acrescentados 1000ul da solução de enzimas (0,240 gramas de Mg SO₄, 0,029 ml (29ul) de ácido acético glacial, diluídos em 500 ml de H₂O destilada); alíquotas foram acondicionadas em eppenderfs e armazenados em freezer a -70 °C até o momento das medidas de estresse oxidativo.

Atividade de enzimas anti-oxidantes

Catalase (CAT) - A taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade da CAT. Desta forma, o consumo de H₂O₂ pode ser utilizado como uma medida de atividade da enzima CAT. O ensaio

consistiu em medir a diminuição da absorbância a 240nm, comprimento de onda onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo. Para a realização das medidas foi usada uma solução tampão constituída de fosfatos a 50 mmol/L em pH 7,4. Foram adicionados 9 µL deste tampão e 10 µL de amostra de tecido na cubeta do espectrofotômetro, sendo esta mistura descontada contra um branco de tampão fosfato. A seguir foram adicionados 35 µL de peróxido de hidrogênio (0,3 mol/L) e foi monitorada a diminuição da absorbância no espectrofotômetro (Boveris, Chance, 1973).

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

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

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

Medida de peroxidação proteica - dosagem de carbonilas - O ensaio para detecção das carbonilas é uma das técnicas utilizadas para a determinação de proteínas modificadas oxidativamente. A técnica se baseia na reação das proteínas oxidadas do plasma sanguíneo com 2,4 dinitrofenil hidrazina (DNPH) em meio ácido, seguido de sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos e incubação final com guanidina. Desta forma, a absorbância das carbonilas foi medida em um espectrofotômetro a 360nm, num meio de reação contendo os seguintes reagentes: guanidina (6M) em ácido clorídrico (HCl) (2,5M) pH= 2,5; 2,4 DNPH em HCl (2,5M); ácido tricloroacético (TCA) 20%; TCA 10%; etanol - acetato de etila 1:1(V/V). Paralelamente foi realizada a curva

padrão de proteína, com albumina, com a absorbância lida em 280nm no espectrofotômetro (Reznick, Packer, 1994).

Nitritos e Nitratos - Os níveis de nitritos e nitratos no plasma foram medidos pela reação das amostras com o reagente de Griess em microplacas (96 poços) em aparelho leitor de ELISA. Alíquotas de 50 µL de homogeneizado de tecido foram incubadas com cofatores enzimáticos e nitrato redutase (3U/ml) por uma 30 minutos para conversão de nitrato em nitrito em temperatura ambiente. O total de nitrito tecidual foi então analisado pela reação das amostras com 50 µL de reagente de Griess. O total de nitrito tecidual foi estimado a partir de uma curva padrão de absorbância em 592 nm (Granger et al., 1999).

4.6.4 Registro de variáveis hemodinâmicas e da modulação simpato-vagal

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

Para realizar a medida dos parâmetros hemodinâmicos e dos componentes do controle autonômico do sistema cardiovascular (balanço

simpato-vagal), utilizou-se inicialmente, o registro das curvas de pressão arterial, batimento a batimento, pelo método não invasivo com o sistema FINOMETER® (Finometer, Finapres Medical Systems BV, Arnhem, Netherlands) (Figura 4).

Figura 4- Monitor Finometer® que registra curvas de PA batimento-a-batimento, de forma não invasiva.

O equipamento utiliza como princípio básico a técnica de fotopletismografia digital, colocando-se um manguito de pressão circundando a falange distal de um dedo da mão esquerda (Figura 5) (Wesseling *et al*, 1983). Tendo como base as curvas de pressão arterial e os dados do paciente (idade, sexo, peso e altura), um programa de análise de sinais (software BeatScope) gera dados hemodinâmicos como PA sistólica e diastólica, frequência cardíaca, débito cardíaco e resistência vascular periférica.

Figura 5- Manguito de pressão circundando a falange média do segundo dedo da mão esquerda, registrando curvas de PA derivadas da pulsação da artéria digital, com o princípio básico da técnica de fotopletismografia digital.

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

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

4.6.5 Análise da variabilidade da FC e da PA

A modulação autonômica cardíaca foi inferida por meio da análise da variabilidade da FC (VFC) e variabilidade da PA (VPA) nos domínios do tempo e da frequência, seguindo-se protocolos específicos para cada domínio (Moraes *et al.*, 2000).

Variabilidade no domínio do tempo: A série temporal do intervalo de pulso foi analisada no domínio do tempo por meio da análise da variância do intervalo dos batimentos normais (VARNN). Além da variância, foram obtidos o SDNN (desvio padrão de intervalos RR normais), e o RMSSD (raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos RR consecutivos).

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

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

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

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

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

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

Para a variabilidade da PA considerou-se os valores do componente de baixa frequência absoluta (LFPAS abs).

4.6.6 Exames de imagem

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

4.6.7 Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial – MAPA

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

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

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

4.7 Sequência do estudo

Durante o período deste estudo, os indivíduos foram avaliados em 6 momentos, de acordo com a sequência apresentada abaixo:

1ª Avaliação / Avaliação inicial - screening

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

Inicialmente foram avaliados clinicamente de acordo com o descrito previamente, e orientados a comparecerem no dia seguinte em jejum (8-10h) para serem submetidos à coleta de sangue para realização de testes laboratoriais de rotina.

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

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

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

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

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

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

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

3ª Avaliação – Semana 1

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

4ª Avaliação- Semana 4

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

5ª Avaliação- Semana 8

Após 8 semanas da randomização (permitido 48 h de desvio) os indivíduos foram avaliados pela 5ª vez, para verificar especialmente efeitos adversos da

droga, para registro de dados antropométricos (peso e circunferência abdominal) e de registro das curvas de PA batimento a batimento. Aqueles que não apresentaram efeitos adversos que justificassem a interrupção do estudo (descritos no anexo 1) foram orientados a continuar a tomar a medicação, na mesma dosagem que o mês anterior (total de 16 mg de Galantamina ou placebo). Foram dispensadas mais 4 cartelas, com 2 cápsulas de medicamento para serem tomadas 1 x dia. Os pacientes foram então orientados para retornar em 4 semanas em jejum para a avaliação final e para trazerem as cartelas da medicação dispensada.

6ª Avaliação – Semana 12

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

Nessa visita todos os pacientes realizaram novamente:

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

4.8 Análises estatísticas

Todas as variáveis foram analisadas descritivamente por meio de medidas resumo (média e erro padrão). A comparação de médias no início do estudo entre os grupos (Galantamina e Placebo) foram realizados por meio do *teste t* de Student para amostras independentes.

Na análise das correlações entre duas variáveis, foi usado o estudo da curva de regressão que melhor representasse o fenômeno estudado, sendo representado o valor desta associação pelo R , e a significância pelo valor de p .

Para a avaliação do comportamento das médias das variáveis em dois instantes de avaliação (T0 vs T1) por grupo de tratamento (Galantamina vs Placebo) utilizou-se a análise de variâncias (ANOVA) com medidas repetidas tendo como fator fixo o grupo. A ANOVA apresenta como um dos pressupostos a normalidade nos dados o qual foi verificada utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, aplicou-se a transformação logarítmica.

A associação entre os atributos qualitativos (obtidos dos diários individuais sobre o uso da medicação) e grupo foi verificada empregando-se o teste de Qui-Quadrado.

Para os testes estatísticos considerou-se um nível de significância de 5%. As análises foram realizadas com o uso dos softwares estatísticos SPSS 20.0 e STATA 12.

4.9 Financiamento

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

Os resultados deste estudo serão apresentados segundo a sequência dos objetivos propostos.

5.1 Seleção dos participantes e caracterização da amostra

No período de março a junho de 2014 foi realizada a busca ativa de potenciais participantes nos Ambulatórios de Risco Cardiovascular e Síndrome Metabólica da Universidade Nove de Julho. Nesse período 189 indivíduos foram avaliados e 60 foram selecionados para o estudo, conforme esquema abaixo.

Entre os 60 participantes a média das idades foi de 41,8 anos $\pm$ 8,6 anos (mediana de 44 anos), sendo observada uma idade mínima de 20 anos e máxima de 58 anos. Quanto ao sexo, 30 eram do sexo masculino e 30 feminino, e no processo de randomização, cada grupo (Galantamina e Placebo) teve a distribuição igualitária 15/15 por sexo.

O conjunto de todos os componentes que preenchem os critérios de SM de acordo com os critérios do APT III esteve presente somente em 25% dos pacientes. Os demais pacientes apresentaram 3 ou 4 componente da SM, em combinações variadas.

De forma individual, a “circunferência abdominal (CA) aumentada” foi o único componente que esteve presente nos 60 participantes (prevalência de 100%). O segundo fator mais prevalente foi “triglicerídeos elevados”, presente em 49 participantes (81.7%), seguido de “PA elevada” em 46 (76.7%), “HDL baixo” em 38 (63.4%) e “glicemia elevada” em 37 (61.7%) dos participantes.

Nenhum participante apresentou efeito adverso ao uso da medicação, e nenhuma alteração neurológica foi observada desde o início até o final do estudo.

Estão apresentadas na tabela 3A as características descritivas das variáveis idade, de gordura corporal, clínicas e metabólicas e, na tabela 3B as características descritivas das medidas inflamatórias e do estresse oxidativo, analisadas antes do tratamento, entre os grupos Galantamina e Placebo.

Tabela 3A - Características descritivas das variáveis demográficas, de gordura corporal, clínicas e metabólicas antes do tratamento com Galantamina ou Placebo

	Galantamina	Placebo	p
Idade (anos)	40,8 ± 1,6	42,7 ± 1,4	0,398
IMC (Kg/m²)	34,7 ± 0,6	33,7 ± 0,6	0,344
CA (cm)	108,3 ± 1,3	107,9 ± 1,4	0,874
PAS (mmHg)	126,4 ± 2,2	124,9 ± 2,0	0,624
PAD (mmHg)	81,2 ± 1,4	79,5 ± 1,4	0,507
FC (bpm)	72,1 ± 1,6	70,5 ± 1,7	0,452
LF (nu)	55,0 ± 2,7	48,3 ± 3,1	0,118
HF (nu)	45,0 ± 2,8	51,1 ± 3,1	0,149
LF/HF	1,8 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,163
Glicose (mg/dl)	102,1 ± 1,9	100,1 ± 2,0	0,746
Triglicerídeos (mg/dl)	178,2 ± 15,2	169,8 ± 13,1	0,820
Colesterol Total (mg/dl)	198,0 ± 7,0	199,2 ± 8,1	0,829
LDL-c (mg/dl)	124,6 ± 6,8	125,8 ± 7,1	0,820
HDL-c (mg/dl)	42,1 ± 1,3	42,3 ± 1,5	0,903
Insulina (pg/ml)	17,5 ± 1,5	19,1 ± 3,5	0,805 ^L
HOMA	4,3 ± 0,3	3,8 ± 0,3	0,627

IMC= índice de massa corporal; CA = circunferência abdominal; PAS= pressão arterial sistólica
PAD = pressão arterial diastólica; FC = Frequência cardíaca; LF = componente de baixa frequência; HF = componente de alta frequência.

^LVariáveis na escala logarítmica.

* p<0.05 no teste t

Os dados da tabela 3A demonstram que, referentes à idade, dados antropométricos e medidas do metabolismo de glicose e lipídeos ambos os grupos foram semelhantes, indicando que o processo de randomização foi efetivo.

Com relação aos marcadores de inflamação e de estresse oxidativo (Tabela 3B), todos, exceto a IL-1b e a sCD40L, foram semelhantes entre os grupos. Esses dois marcadores foram significativamente maiores no grupo Galantamina comparado ao grupo placebo.

Tabela 3B - Características descritivas dos biomarcadores inflamatórios e medidas de estresse oxidativo antes do tratamento com Galantamina ou Placebo

	Galantamina	Placebo	p
TNFα (pg/ml)	12,9 $\pm$ 0,9	12,9 $\pm$ 0,8	0,995
IL-6 (pg/ml)	9,79 $\pm$ 0,3	10,12 $\pm$ 2,5	0,553
IL-1b (pg/ml)	10,3 $\pm$ 1,4	3,7 $\pm$ 0,4	0,038*
IL-10 (pg/ml)	7,4 $\pm$ 2,6	3,8 $\pm$ 0,3	0,147 ^L
sCD40L (pg/ml)	5102,9 $\pm$ 803,2	2323,6 $\pm$ 557,8	0,003 ^{L*}
Leptina (ng/ml)	33,3 $\pm$ 0,0	32,5 $\pm$ 0,0	0,893
Adiponectina (μg/ml)	8,8 $\pm$ 0,0	8,9 $\pm$ 0,0	0,974
Proteínas (mg/ml)	40,9 $\pm$ 1,2	39,9 $\pm$ 1,2	0,694
Tbars (pmol/mg)	7,7 $\pm$ 1,2	9,5 $\pm$ 1,4	0,553 ^L
Nitritos (nit/mgprot)	0,3 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,280
Carbonilas (nmol/mg)	0,9 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,3	0,383
QL (cps/mg)	36000,4 $\pm$ 3073,6	36331,3 $\pm$ 3303,4	0,460
SOD (USod/mgprot)	3,3 $\pm$ 0,0	3,2 $\pm$ 0,0	0,392
CAT (nmol/mg)	2,6 $\pm$ 0,5	2,6 $\pm$ 0,7	0,555

Tbars = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (peroxidação lipídica); QL = SOD= superóxido desmutase, CAT = catalase.

^LVariáveis na escala logarítmica.

* p<0.05 no teste *t*

5.2 Correlações entre as variáveis antes do tratamento

Visando incrementar o perfil descritivo da população estudada e ampliar a compreensão sobre a interação entre fatores no fenômeno fisiopatológico da SM, foram feitas análises de correlação entre as variáveis de estudo antes do tratamento (T₀). As associações significantes estão apresentadas nas figuras a seguir: as correlações entre os níveis de gordura abdominal, avaliados por medida da CA ou tomografia, com fatores relacionados ao estresse oxidativo e pressão arterial estão apresentadas na figura 6; as correlações entre parâmetros da modulação autonômica com o

biomarcador TNF α e os níveis de catalase estão apresentados na figura 7, e a correlação entre marcadores do balanço simpato-vagal com os níveis de pressão arterial e de triglicerídeos estão apresentados na figura 8.

Figura 6- Correlações lineares significantes na população em estudo antes do tratamento (T_0). A e B: Correlação positiva entre valor de CA com níveis de gordura visceral e de Tbars respectivamente. C: Correlação positiva entre níveis de gordura visceral e PAS; D: Correlação negativa entre níveis de gordura visceral e de SOD

Constata-se na figura 6 (Painel A) que houve correlação entre os níveis de gordura abdominal visceral, avaliados por métodos distintos: medida da CA e a tomografia computadorizada ($R= 0,339$ $p=0,01$). Esse dado demonstra que a medida da CA é um bom parâmetro de medida dos níveis de gordura visceral. Também houve correlação positiva entre os valores de CA com os níveis do marcador de peroxidação lipídica (Painel B, $R= 0,269$, $p = 0,03$), o que denota que o EO é potencializado conforme aumentam os níveis de gordura abdominal.

Na figura 7 observa-se que os valores de gordura visceral, medidos pela tomografia, se correlacionaram de forma positiva com valores de PAS medidos pela MAPA, demonstrando que quanto maior os níveis de gordura visceral abdominal, maiores os valores de PAS (Painel C: $R= 0,430$, $p = 0,01$). Além disso, houve correlação negativa entre a gordura visceral com os níveis da enzima antioxidante SOD (Painel D: $R= - 0.361$, $p = 0,02$).

Figura 7- Correlações lineares significantes na população em estudo antes do tratamento (T_0). A e B: Correlação positiva entre valor de CA co níveis de gordura visceral e de Tbars respectivamente. C: Correlação positiva entre níveis de gordura visceral e PAS; D: Correlação negativa entre níveis de gordura visceral e de SOD.

Ainda na figura 7 observa-se correlação significativa entre os parâmetros da modulação autonômica e biomarcadores de inflamação e de estresse oxidativo. Na figura 7 A e B observa-se, respectivamente, que os níveis e TNF α diminuem conforme aumentam os valores do HFnu (modulação parassimpática) da variabilidade ($R = -0,258$, $p = 0,04$), e o inverso ocorre em

relação aos níveis da CAT ($R = 0,281$, $p = 0,03$). As correlações com o LFnu (modulação simpática) da variabilidade mostram comportamento inverso ao observado para o HFnu. Tais correlações demonstram que maior modulação simpática está presente em perfis mais pró-inflamatórios e, que a parassimpática está positivamente associada a um perfil antiinflamatório.

As correlações encontradas entre modulação autonômica (relação LF/HF) (Figura 8) demonstraram correlação positiva do predomínio simpático da PAS (Painel A: $R = 0,323$, $p = 0,01$) e PAD (Painel B: $R = 0,356$, $p = 0,00$) obtidos pela MAPA, com os níveis de triglicerídeos (Painel C: $R = 0,255$, $p = 0,05$) e com a modulação simpática na variabilidade da PA (Painel D: $R = 0,355$, $p = 0,00$).

Figura 8- Correlações lineares significantes na população em estudo antes do tratamento (T_0). A, B, C e D: Correlações positivas entre índices do balanço simpato-vagal (LF/HF) e aos valores de PAS, PAD, Triglicerídeos (trig) e variabilidade da PA (SDPA) respectivamente.

5.3 Efeitos do Tratamento com Galantamina ou Placebo nos parâmetros clínicos e metabólicos

Nas tabela 4A e 4B estão apresentados os deltas dos valores médios dos parâmetros clínicos e metabólicos, comparando-se os momentos basal

(T0) e após 12 semanas de tratamento (T1), nos grupos que receberam Galantamina ou Placebo.

Tabela 4A- Alterações nos valores basais de parâmetros antropométricos, clínicos e metabólicos entre os grupos Galantamina e Placebo após o tratamento

	Galantamina	Placebo	<i>p</i>
Antropométricas			
Peso (kg)	-0,61 ± 0,4	- 0,68 ± 0,4	0,919
IMC (kg/m ²)	-0,24 ± 0,0	-0,20 ± 0,0	0,902
CA (cm)	-2,23 ± 0,0	-1,37 ± 0,0	0,245
VFC			
HF(nu)	9,37 ± 0,4	- 4,55 ± 0,4	<0,000
LF(nu)	- 9,37 ± 0,4	5,10 ± 0,5	<0,000
LF/HF	-0,65 ± 0,0	0,21 ± 0,0	<0,002
Metabólicas			
HDL (mg/dl)	0,51 ± 0,0	-0,37 ± 0,0	0,567
LDL (mg/dl)	- 11,4 ± 0,9	-9,72 ± 0,8	0,805
Colesterol Total (mg/dl)	-13,56 ± 0,8	- 11,56 ± 0,6	0,794
Triglicerídeos (mg/dl)	-19,15 ± 2,0	- 10,96 ± 1,9	0,593
Glicose	-6,63 ± 0,4	- 1,07 ± 0,4	0,077
Insulina ^L	-5,8 ± 1,6	4,8 ± 6,0	<0,013 ^L
HOMA	-1,5 ± 0,4	2,3 ± 1,0	<0,003
Hemodinâmica			
PAS (mmHg)	1,0 ± 0,4	-1,47 ± 0,4	0,463
PAD(mmHg)	-2,97 ± 0,3	-4,67 ± 0,3	0,551
PASMAPA (mmHg)	-2,63 ± 0,3	-3,83 ± 0,2	0,613
PADMAPA (mmHg)	-3,23 ± 0,2	-2,17 ± 0,2	0,551
FC (bpm)	0,78 ± 1,3	- 0,95 ± 1,6	0,876

^L variáveis analisadas em escala logarítmica
Valores de significância $p < 0,05$

Na tabela 4B estão apresentados os deltas dos valores médios dos parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo, comparando-se os momentos basal (T0) e após 12 semanas de tratamento (T1), nos grupos que receberam Galantamina ou Placebo.

Tabela 4B- Alterações nos valores basais em marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo entre os grupos Galantamina e Placebo após o tratamento

	Galantamina	Placebo	<i>p</i>
Citocinas/Adipocinas			
TNF α (pg/ml)	-2,24 $\pm$ 0,1	0,26 $\pm$ 0,1	<0,037
IL6 ^L (pg/ml)	- 3,56 $\pm$ 0,6	- 0,99 $\pm$ 2,2	<0,032
IL1 β (pg/ml)	- 4,4 $\pm$ 0,7	1,9 $\pm$ 0,7	0,112
IL10 (pg/ml)	0,90 $\pm$ 0,8	- 1,10 $\pm$ 0,8	0,342
sCD40L ^L (pg/ml)	- 3346,9 $\pm$ 917,5	2580,2 $\pm$ 799,4	<0,001 ^L
Adiponectina (μ g/ml)	0,89 $\pm$ 0,0	-1,81 $\pm$ 0,0	<0,000
Leptina (ng/ml)	-7,65 $\pm$ 0,4	4,37 $\pm$ 0,2	<0,000
Estresse Oxidativo			
Proteínas (mg/ml)	-4,75 $\pm$ 3,0	-1,18 $\pm$ 4,1	0,443
Tbars ^L (pmol/mg)	-1,25 $\pm$ 1,3	1,39 $\pm$ 2,1	<0,006
Nitritos (nit/mgprot)	- 0,07 $\pm$ 0,0	0,06 $\pm$ 0,0	0,093
Carbonilas (nmol/mg)	- 0,11 $\pm$ 0,0	0,01 $\pm$ 0,0	0,333
QL ^L (cps/mg)	- 56 $\pm$ 312,3	3687 $\pm$ 381,7	0,863
SOD (USod/mgprot)	1,96 $\pm$ 0,0	- 0,28 $\pm$ 0,0	<0,002
CAT (nmol/mg)	1,13 $\pm$ 0,0	0,32 $\pm$ 0,0	<0,009

^L variáveis analisadas em escala logarítmica
Valores de significância $p < 0,05$

5.4 Efeitos do tratamento com Galantamina ou Placebo em parâmetros da modulação autonômica cardiovascular.

Os parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) no domínio da frequência, que se referem à modulação autonômica para o coração (Figura 09) demonstraram que o tratamento com Galantamina aumentou o valor absoluto do componente normalizado de alta frequência (HF, Painel A), relacionado ao tônus vagal, reduziu o valor absoluto do componente normalizado de baixa frequência (LF, Painel B) relacionado ao tônus simpático; desta forma, ocorreu significativa melhora do balanço simpato-vagal, que é expresso pela relação entre LF/HF (Painel C), que se caracteriza pela redução da modulação simpática e aumento da modulação parassimpática.

Figura 9- Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência nos grupos placebo e Galantamina antes (T₀) e após (T₁) o tratamento. A) componente de alta frequência normalizado (HFnu); B) componente de baixa frequência normalizado (LFnu); C) balanço simpato-vagal (LF/HF).

Quanto aos valores percentuais de HF e LF observou-se o mesmo comportamento descrito para os valores normalizados (Figura 10 C e D), e nos valores absolutos houve redução no componente de baixa frequência, apenas no grupo que recebeu Galantamina (Figura 10 A e B).

Figura 10 - Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência nos grupos Placebo e Galantamina antes (T₀) e após (T₁) o tratamento. A) Valores absolutos do componente de alta frequência (HFabs); B) valores absolutos do componente de baixa frequência (LFabs); C e D) porcentagem dos componentes de alta (%HF) e baixa frequência (%LF).

Quanto aos parâmetros da VFC no domínio do tempo, não houve diferenças entre os grupos ou tempos (Tabela 5), apesar do aumento no valor numérico no índice RMSSD, que apresenta correlação estabelecida na literatura com os índices de HF no domínio da frequência.

Tabela 5- Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo.

	Galantamina			Placebo		
	T ₀	T ₁	<i>p</i>	T ₀	T ₁	<i>p</i>
SDNN	38,3 ± 3,4	32,9 ± 2,0	0,122	39,0 ± 3,6	39,8 ± 2,5	0,122
RMSSD	29,0 ± 2,8	30,8 ± 2,4	0,752	36,1 ± 4,6	35,8 ± 5,2	0,752

SDNN: desvio padrão dos intervalos R-R normais; RMSSD: raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos RR consecutivos

De forma semelhante, não foram observadas alterações nos parâmetros da variabilidade da pressão arterial, nem no domínio do tempo, nem da frequência. Tanto o valor médio da variabilidade total da PA, quanto o valor do componente de baixa frequência, que indica a modulação simpática para os vasos, foram reduzidos no grupo Galantamina após o tratamento (SDPA = 5,17 ± 0,3 *versus* 4,83 ± 0,2 mmHg; LF% = 8,53 ± 1,0 *versus* 6,34 ± 0,7), mas não houve diferenças estatisticamente significantes com o grupo que recebeu placebo.

5.5 Efeitos do tratamento com Galantamina e Placebo nos marcadores inflamatórios

Importantes marcadores pró-inflamatórios apresentaram redução significativa com o tratamento com Galantamina, quando comparados ao grupo placebo. Foi o caso do TNFα (10,6 ± 0,7 vs 13,1 ± 0,7 pg/ml, Figura 11), da IL6 (6,23 ± 0,4 vs 9,13 ± 0,4, Figura 12), do sCD40L (1756,1 ± 456,4^L vs 4903,8 ± 806,0^L pg/ml, Figura 13) e da Leptina (25,6 ± 0,0 vs 36,9 ± 0,0 ng/ml, Figura 15).

Figura 11- Níveis plasmáticos de TNFα antes (T₀) e após (T₁) o tratamento nos grupos Galantamina e Placebo.

Figura 12- Níveis plasmáticos de IL6 antes (T₀) e após (T₁) o tratamento nos grupos Galantamina e Placebo.

No caso do marcador sCD40L o tratamento com Galantamina não apenas reduziu seus níveis em relação ao grupo placebo após término do tratamento, como reverteu o quadro inflamatório mais acentuado desse grupo, uma vez que seus valores estavam significativamente aumentados em relação

ao placebo antes do tratamento. E em relação ao grupo placebo, houve aumento significativo desse marcador após o término do tratamento (Figura 13).

Figura 13- Níveis plasmáticos de sCD40L nos grupos Galantamina e Placebo antes (T₀) e após (T₁) o tratamento. ^L Variável analisada em escala logarítmica.

De forma semelhante ao sCD40L, os níveis da IL-1 β encontravam-se inicialmente mais elevados no grupo que recebeu Galantamina, e o tratamento com essa droga reduziu os níveis dessa citocina pró-inflamatória ($10,3 \pm 1,5$ vs $5,9 \pm 1,4$ pg/ml), trazendo os valores próximos ao do grupo placebo. (Figura 14).

Figura 14- Níveis plasmáticos de IL1 β nos grupos Galantamina e Placebo antes (T₀) e após (T₁) o tratamento.

Os valores séricos de IL-10, que apresenta efeitos antiinflamatórios, não sofreram alterações significativas em resposta ao uso de Galantamina ou Placebo.

Quanto às adipocinas, os níveis plasmáticos de leptina reduziram significativamente nos pacientes que receberam Galantamina quando comparados os momentos T₀ e T₁ ($33,3 \pm 0,05$ vs $36,9 \pm 0,07$ ng/ml, $p < 0,04$, Figura 15). De forma oposta, os níveis de leptina aumentaram significativamente no segundo momento de avaliação no grupo Placebo ($32,5 \pm 0,05$ vs $36,9 \pm 0,05$ ng/ml, $p < 0,031$) (Tabela 3). Os valores pós-tratamento foram diferentes entre os grupos.

Figura 15- Níveis plasmáticos de Leptina nos grupos Galantamina e Placebo antes (T₀) e após (T₁) o tratamento.

Comportamento inverso ao observado para os níveis de leptina ocorreu com os níveis de adiponectina nos dois grupos. Dessa forma, houve aumento nos níveis de adiponectina entre os participantes que receberam Galantamina, em relação ao tempo (pré= $8,8 \pm 0,05$ vs pós= $9,7 \pm 0,07$ $\mu\text{g/ml}$; $p < 0,002$), e quanto comparado ao grupo Placebo (Galantamina $9,7 \pm 0,07$ vs Placebo $7,0 \pm 0,03$ $\mu\text{g/ml}$; $p < 0,001$). No grupo placebo houve o oposto (Figura 16).

Figura 16- Valores plasmáticos de adiponectina nos grupos Galantamina e Placebo antes (T₀) e após (T₁) o tratamento.

5.6 Efeitos da Galantamina em parâmetros clínicos e metabólicos

Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação ao IMC, às medidas de consultório da PAS e PAD e aos valores de frequência cardíaca. No entanto, houve diferenças significativas, em relação ao tempo de tratamento (efeito tempo), nas variáveis CA e nos valores de PAS obtidos pela MAPA. Assim, em ambos os grupos, os valores de CA e PAS foram reduzidos quando comparados T₀ e T₁ (Tabela 6). Todavia esses valores não foram diferentes entre os grupos. Em relação à PAD, medida pela MAPA, apenas entre os participantes que receberam Galantamina houve redução após o tratamento. Novamente, a análise estatística da interação grupo e tempo, não mostrou diferenças significativas entre os grupos

Tabela 6- Parâmetros clínicos nos grupos Galantamina e Placebo antes e após o tratamento.

	Galantamina			Placebo		
	T ₀	T ₁	<i>p</i>	T ₀	T ₁	<i>p</i>
CA (cm)	108,3 ± 1,3	106,0 ± 1,4	<0,001	107,9 ± 1,6	106,6 ± 1,6	<0,001
MAPAS (mmHg)	126,3 ± 2,3	123,7 ± 2,1	<0,008	125,0 ± 1,7	121,9 ± 2,3	0,008
MAPAD (mmHg)	81,6 ± 2,0	78,4 ± 1,6	0,012	79,5 ± 1,6	77,3 ± 1,9	0,090

MAPAS = medida ambulatorial da pressão arterial sistólica

MAPAD = medida ambulatorial da pressão arterial diastólica

Quanto aos parâmetros metabólicos relacionados à SM destacam-se os relacionados à glicemia e resistência à insulina. O tratamento com Galantamina resultou em redução nos níveis de insulina circulantes ($23,9 \pm 2,0$ vs $11,7 \pm 1,6$ pg/ml, Figura 17) e melhorou à resistência a insulina, aferida pelo

índice HOMA (Figura 18), tanto em relação ao tempo, como na comparação entre grupos. Além disso, os níveis de glicose caíram no grupo Galantamina quando comparados os níveis pré e pós tratamento ($102,1 \pm 1,9$ vs $95,5 \pm 1,7$ pg/ml; $p=0,016$)

Figura 17- Níveis plasmáticos de Insulina nos grupos Galantamina e Placebo, antes (T₀) e após (T₁) o tratamento.
^L Análises realizadas em escala logarítmica

Figura 18- Valores do Índice HOMA nos grupos Galantamina e Placebo, antes (T₀) e após (T₁) o tratamento.

Não foram detectadas alterações significativas entre os grupos nos níveis plasmáticos de HDL e triglicerídeos. No entanto, os níveis de colesterol total e LDL-c caíram nos dois grupos, quando se comparam apenas os valores pré e pós-tratamento.

Dessa forma, tivemos para os níveis de colesterol total no grupo Galantamina T_0 versus T_1 : $198,0 \pm 7,0$ vs $186,0 \pm 7,4$ mg/dl. No grupo Placebo: $199,2 \pm 8,2$ vs $188,3 \pm 6,4$ mg/dl. Mas, não houve diferença entre os grupos.

5.7 Efeitos do tratamento com Galantamina em marcadores do Estresse Oxidativo

O grupo que tomou Galantamina apresentou elevação nos valores das enzimas antioxidantes (Figura 19) SOD ($T_0 = 3,3 \pm 0,2$ vs $T_1 = 4,2 \pm 0,3$ USod/mgprot) e, CAT ($T_0 = 2,6 \pm 0,1$ vs $T_1 = 3,7 \pm 0,1$ mmol/mg) e redução significativa nos níveis de lipoperoxidação, marcador de lesão de membranas plasmáticas decorrente das espécies reativas de oxigênio, medidos por meio da dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ($T_0 = 7,7 \pm 1,1$ versus $T_1 = 5,7 \pm 0,6$ pmol/mg, Figura 19). Não ocorreram alterações significativas desses compostos no grupo Placebo.

Figura 19- Valores de indicadores do Estresse Oxidativo. A) Valores plasmáticos da lipoperoxidação (Tbars); Níveis globulares de SOD (B) e CAT (C) antes (T₀) e após (T₁) o tratamento.
^L análises realizadas em escala logarítmica

Não foram detectadas alterações significativas nas dosagens de carbonilas e nos valores de quiluminescência, bem como nos valores de nitritos e nitratos, em ambos os grupos estudados.

5.8 Efeitos do tratamento com Galantamina na quantidade de gordura visceral e subcutânea abdominal e epicárdica

Em concordância com a redução nos valores da medida da CA, houve redução nos valores de gordura visceral abdominal e subcutânea em ambos os grupos. No entanto, diferente da queda significativa que houve com os valores da medida da CA, a queda nos valores da gordura subcutânea e visceral, medidos por tomografia, não foi estatisticamente significativa.

Tabela 7- Níveis de gordura epicárdica, visceral e subcutânea abdominal antes e após tratamento em ambos os grupos

Gordura (cm ²)	Galantamina			Placebo		
	T ₀	T ₁	<i>p</i>	T ₀	T ₁	<i>p</i>
Epicárdica	192,0±11,6	179,0±8,0	0,206	168,0±8,4	170,0±7,7	0,255
Visceral	168,3±10,4	163,4±11,1	0,132	163,0±11,3	160,1±11,5	0,480
Abdominal						
Subcutânea	350,4±20,8	345,0±22,6	0,081	379,2±22,3	369,1±22,4	0,396
Abdominal						

5.9 Resultados do diário de uso da medicação

Com base nas descrições realizadas pelos participantes no diário de uso da medicação e nas declarações feitas pelos mesmos durante a anamnese, em toda visita de avaliação desse estudo, foram tabulados todos os “efeitos” relatados durante o protocolo. Tais “efeitos” não foram classificados como

adversos por não se configurarem em indesejáveis, desagradáveis e que comprometessem a rotina dos participantes.

As frequências e razão de chances desses efeitos são apresentadas na tabela 8.

Tabela 8- Associações entre efeitos relatados durante o tratamento por grupo

	Grupos				Total		Razão de Chances do atributo	p
	Galantamina		Placebo					
	N	%	N	%	N	%		
Melhora da qualidade o sono	30	100,0%	30	100,0%	60	100,0%	6,0 (1,5 - 24,3)	0,007
Não	18	60,0%	27	90,0%	45	75,0%		
Sim	12	40,0%	3	10,0%	15	25,0%		
Melhora do funcionamento intestinal	30	100,0%	30	100,0%	60	100,0%	29,0 (3,5 - 241,1)	<0,001
Não	15	50,0%	29	96,7%	44	73,3%		
Sim	15	50,0%	1	3,3%	16	26,7%		
Fome reduzida	29	100,0%	30	100,0%	59	100,0%	8,4 (2,1 - 34)	0,001
Não	15	51,7%	27	90,0%	42	71,2%		
Sim	14	48,3%	3	10,0%	17	28,8%		
Ansiedade reduzida	30	100,0%	30	100,0%	60	100,0%	5,7 (1,7 - 18,9)	0,003
Não	14	46,7%	25	83,3%	39	65,0%		
Sim	16	53,3%	5	16,7%	21	35,0%		

p – nível descritivo do teste de Qui-Quadrado.

Pode-se observar na Tabela 8, que o grupo que recebeu Galantamina referiu melhora na qualidade do sono ($p=0,007$), funcionamento do intestino ($p<0,001$), redução da fome ($p=0,001$) e da ansiedade ($p=0,003$). Dessa forma, pode-se notar que, comparado ao grupo Placebo, o grupo que recebeu Galantamina apresentou maior porcentagem de sono melhor (40,0% contra 10,0%), de funcionamento de intestino (50,0% contra 3,3%), de menos fome (48,3% contra 10,0%) e de menor ansiedade (53,3% contra 16,7%).

Esse é o primeiro estudo clínico que usou um inibidor reversível da acetilcolinesterase, a Galantamina, em indivíduos com Síndrome Metabólica. O padrão seguro de uso desse medicamento, observado em diversos estudos com portadores de distúrbios cognitivos e demenciais, bem como os potenciais efeitos antiinflamatórios e metabólicos inferidos em estudos experimentais, estimularam sua escolha para o tratamento dessa condição clínica, que se caracteriza pela presença de inflamação de caráter crônico e subclínico.

Como principais resultados destacamos que o tratamento com dose submáxima de Galantamina, por um período de 12 semanas, foi eficiente em aumentar a modulação vagal e ocasionou redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α e IL-6, bem como alterou de forma positiva a relação dos níveis leptina/adiponectina, e o estado redox. As mudanças desses parâmetros foram acompanhadas de redução dos níveis plasmáticos de insulina e do índice HOMA, o que demonstra melhora no metabolismo da glicose. A melhora foi tal que, se considerados os índices médios de RI, o tratamento com Galantamina corrigiu totalmente o estado de resistência evidenciado antes do tratamento.

A Galantamina é um inibidor competitivo dos sítios de ligação da enzima acetilcolinesterase e em menor grau da butirilcolinesterase, de administração por via oral, que atua no SNC por atravessar a barreira hematoencefálica (Loy, Schneider, 2006). É um medicamento amplamente utilizado no tratamento da doença de Alzheimer, devido sua capacidade de amplificação da ação colinérgica no SNC. Além da ação central, por penetrar a barreira hematoencefálica, essa medicação apresenta ampla distribuição sistêmica minutos após sua ingestão, podendo, dessa forma ter uma ação

sistêmica. Estudos farmacológicos destacam que, a ação competitiva inibitória da Galantamina se torna relevante em locais onde a biodisponibilidade de Ach é menor, como é o caso de áreas do SNC relacionadas à memória e cognição em doenças demenciais (Loy, Schneider, 2006).

Recentemente, demonstrou-se que algumas condições clínicas caracterizadas por distúrbios metabólicos cursam com maior atividade da acetilcolinesterase, e conseqüentemente menor atividade da acetilcolina (Ach). Como exemplo, ratos tornados diabéticos com estreptozocina apresentam aumento da ação da acetilcolinesterase nas ilhotas de Langerhans pancreáticas (Godfrey, Matschinsky, 1975); e em humanos no córtex cerebral e no plasma sanguíneo (Sanchez-Chavez, Salceda 2001, 2000). Outros estudos clínicos e modelos experimentais demonstraram ainda que a ação das colinesterases está aumentada em estados de RI (Abbott et al, 1993), diabetes (Schmatz et al, 2009; Sreedhar et al, 2006; Hanshin et al, 2001), na coronariopatia (Dave, Katyare 2002; Alcantara et al 2002) e na SM (Alcantara et al 2005; Randell et al 2005; Valle et al 2006; Das 2007).

Além de ser o principal neurotransmissor envolvido nas respostas vagais, a Ach apresenta *per se* um potencial antiinflamatório capaz de inibir a liberação de TNF α , tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Borovikova et al, 2000) e, aumenta a produção da enzima óxido-nitrito sintase endotelial (eNO) (Czura, Friedman, Tracey, 2003; Blaise, Stewart, Guerard 1993; Andriantsitohaina, Surprenant, 1992).

Além de inibir a ação das colinesterases, a Galantamina aumenta os efeitos da Ach nos receptores nicotínicos, funcionando como “modulador

alostérico”. E esse é outro mecanismo de ação que confere à droga a capacidade de potencializar a transmissão colinérgica.

Sabe-se que os efeitos da Ach, relacionados aos aspectos anteriormente citados, dependem da interação com o receptor do tipo $\alpha 7nAch$. Esse receptor é encontrado tanto no SNC, onde está envolvido com funções cognitivas (Polanka, 2012), quanto em células do sistema imunológico como macrófagos e linfócitos T. Os principais terminais parassimpáticos vagais inervam diversos órgãos do sistema hematopoiético (Polanka, 2012) como, linfonodos, baço, timo e fígado. A estimulação vagal leva à liberação de do neurotransmissor Ach que rapidamente interage com receptores $\alpha 7nAch$ (superfície de macrófagos e linfócitos T) culminando na redução da produção de citocinas inflamatórias (Borivikova 200, Tracey 2009, Tracey 2005). Mas cabe destacar que os elementos que compõem esse complexo circuito de integração do SN autônomo e SI ainda estão sendo definidos.

Em uma recente revisão de Olofsson *et al* (2012) os autores destacam, a partir do estudo detalhado das projeções eferentes do nervo vago, inúmeros circuitos com ação neuro-imunomodulatória que podem compor a Via Antiinflamatória. Dentre esses circuitos destaca-se a inervação vagal ao timo (e as células imune), glândula adrenal, tecido adiposo abdominal e placas de Peyer do intestino delgado. Em todos esses circuitos a estimulação vagal eferente culmina em redução da resposta inflamatória.

Estudos recentes demonstram ainda que o nervo vago inerva o tecido adiposo (Kreier et al, 2002). Já se evidenciou que o tecido adiposo visceral apresenta infiltração de macrófagos pró-inflamatórios, e que de fato é um órgão produtor de citocinas com atividade pró-inflamatória. Apesar deste tecido não ser

descrito como alvo da via antiinflamatória colinérgica, podemos fazer a hipótese de que o tecido adiposo disfuncional pode ser modulado pelo aumento da atividade vagal.

No presente estudo, não podemos discriminar o local de maior efeito da Galantamina, se central ou sistêmico. Entretanto, a droga foi eficiente em aumentar a modulação vagal e interferir de forma positiva em marcadores inflamatórios e citocinas que regulam o metabolismo da glicose, que são produzidos no tecido adiposo ou cuja liberação depende de estímulos originados nesse tecido.

O excesso de ácidos graxos livres circulantes, derivados do tecido adiposo, e a liberação crônica de citocinas e adipocinas com ação pró-inflamatória, interferem diretamente no metabolismo de glicose e lipídico em diversos tipos celulares, e aumentam de forma reflexa a atividade simpática sistêmica. Ocorre, como consequência, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio alterando o estado redox dos tecidos (incluindo, pâncreas, músculos, vasos sanguíneos, rins, dentre outros), o que leva à produção e liberação mantidas dos biomarcadores inflamatórios. Todas essas alterações podem explicar os quadros patológicos relacionados à morbi-mortalidade cardiovascular dos portadores de SM.

Galantamina e citocinas

Comparando-se nossos resultados com dados da literatura, podemos afirmar que os participantes desse estudo, incluídos a partir do diagnóstico de SM segundo os critérios do ATP-III, apresentavam realmente um perfil pró-

inflamatório no momento basal, em relação os valores de citocinas descritos para adultos saudáveis.

Quando comparados os valores basais obtidos dos participantes desse estudo com os resultados do estudo de Kim *et al* (2011) - no qual foi empregado o mesmo método de dosagem de citocinas, em indivíduos adultos saudáveis - observamos que os valores de TNF α , IL6, IL1 β e sCD40L estavam todos elevados, respectivamente, SM desse estudo vs normais : TNF α = 12,9 $\pm$ 5,1 vs 3,2 $\pm$ 4,0 pg/ml; IL6= 9,7 $\pm$ 2,1 vs 2,9 $\pm$ 6,4 pg/ml; IL1 β = 10,3 $\pm$ 8,3 vs 3,7 $\pm$ 2,5 no grupo Placebo vs 2.0 $\pm$ 9.9 pg/ml; sCD40L= 5102,9 $\pm$ 4474 no grupo Galantamina e 2323,6 $\pm$ 3107 no grupo Placebo vs 2205,8 $\pm$ 4699,2 pg/ml).

Outros estudos apontam que o valor normal de TNF α em adultos com menos de 65 anos, determinado pelo método ELISA, deva ser inferior a 10mg/dl (Hilderman *et al* 2015; Arican *et al* 2005). Nossos dados corroboram com inúmeras evidências da relação entre estados de RI, diabetes mellitus do tipo 2 e elevados níveis de TNF α em indivíduos com obesidade visceral (Swaroop, Rajarajeswari, Naidu 2012; Goyal *et al*, 2012; Mishima *et al* 2001). De forma significativa, há relação entre aumento de TNF α e pior prognóstico para o desenvolvido de DCV. Em importante estudo publicado por Ridker *et al* (2000), foram acompanhados 272 pacientes durante 9 meses após infarto do miocárdio. No período, os valores plasmáticos de TNF α se mantiveram elevados no grupo IAM quando comparados ao grupo controle (2,84 vs 2,57 pg/ml), e o risco de infarto recorrente foi maior nos indivíduos que apresentavam valores dessa citocina acima de 4,17 pg/ml.

Os níveis de TNF α apresentam íntima relação com a produção e liberação de IL6, IL1 β e outras citocinas inflamatórias. Isso ocorre tanto nas

células endoteliais e adipócitos, quanto em células do sistema imune, tendo como consequência a ampliação da cascata inflamatória por ação autácrina, parácrina e endócrina, potencializando os prejuízos decorrentes desse processo vicioso: alteração no metabolismo de glicose, lipídico, ativação simpática e alterações hemodinâmicas (Volp et al, 2008).

Há ainda relação entre os níveis de TNF e o marcador solúvel sCD40L. CD40L é um membro da família TNF, ambas são co-expressadas pelos macrófagos, linfócitos T, plaquetas, células endoteliais e células musculares lisas. A CD40L existe na forma solúvel (sCD40L) e também como uma proteína transmembrana. Níveis circulantes de sCD40L refletem a ativação do sistema CD40/CD40L. Este sistema tem sido implicado na fisiopatologia da aterosclerose, desde o processo de aterogênese precoce até o processo tardio das complicações trombóticas (Francisco, Hernández, Simó, 2006). Entre suas funções, o sistema CD40/CD40L exerce diversos efeitos pró-inflamatórios e pró-trombóticos, como: a) estimulação da produção de radicais livres (ROS) nas células endoteliais, os quais antagonizam a produção de óxido nítrico (ON); b) indução da expressão de moléculas de adesão (CAMs) nas células musculares lisas e endoteliais; c) estimulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias; d) aumento da expressão de metaloproteinases, tornando a placa aterosclerótica mais frágil; e) indução da expressão do fator tissular no endotélio e células musculares lisas, promovendo o aumento do potencial trombogênico da placa; e f) participação na ativação plaquetária. Nesse sentido, tem sido demonstrado que a CD40 é expressa da superfície de plaquetas, e sua ligação resulta ativação plaquetária, a qual promove a formação do trombo (Volp 2008).

Alguns estudos demonstram que os níveis de sCD40L estão aumentados na SM (Natal *et al*, 2008, Angelico *et al*, 2006) e apresenta associação positiva com os valores de TNF α , e negativa com os níveis de adiponectina (Restituto *et al*, 2010). Durante a inflamação TNF α e CD40L mantém mútua influência: CD40L leva à produção de TNF em vários tipos celulares (Burger *et al*, 2004), enquanto o TNF aumenta a expressão de CD40 e ativa suas vias de sinalização intracelular (Goth *et al*, 2004; Lu *et al* 2003). A redução dos níveis desse marcador inflamatório obtida com o uso de Galantamina representa potencialmente um avanço na prevenção de lesões vasculares relacionadas à DCVs.

Os níveis de IL6 entre os participantes do presente estudo estavam mais elevados que os encontrados em pacientes em hemodiálise no estudo de Hilderman *et al* (2015) (9,7 vs 7,9 mg/dl), superiores aos valores encontrados em idosos saudáveis acima de 65 anos (2,5 pg/dl) (Kim *et al*, 2011) e, também superiores aos 1,46 mg/dl encontrados em homens adultos aparentemente saudáveis (Ridker *et al*, 2000).

Além de estar diretamente envolvida com o desenvolvimento da hiperinsulinemia, RI e SM, a IL6 é a principal citocina relacionada ao aumento da produção e liberação da proteína C reativa (PCR). A PCR é uma proteína que comumente se eleva na fase aguda de processos inflamatórios, (Abdellaoui, Al-Khaffaf, 2007), mas também é uma proteína que apresenta discretas elevações na sua concentração em processos inflamatórios crônicos (“doenças subclínicas”) vasculares. Por ser facilmente dosada no soro humano e por manter associação com o desenvolvimento de manifestações clínicas da doença aterosclerótica, a PCR é o biomarcador mais investigado, até o momento, no

âmbito da DCV. Níveis aumentados da PCR podem elevar o risco cardiovascular em portadores de SM, por induzir a disfunção endotelial a ativar células imunes de adesão (Devaraj *et al*, 2010).

Porém, o papel deste fator como elemento da via reflexa anti-inflamatória e como marcador de resposta anti-inflamatória é pouco reconhecido e utilizado.

Os níveis da PCR não foram avaliados nesse estudo, o que poderia ser considerada uma limitação do trabalho. Todavia, optou-se aqui por manter a linha investigatória dos mesmos tipos de citocinas investigadas nos estudos experimentais, que reconhecidamente participam da Via Antiinflamatória Colinérgica. O papel da PCR na complexa rede envolvida nos processos de neuro-imunomodulação deverá ser investigada em futuros estudos.

A centralidade da análise dos níveis de TNF α e IL6 decorre do fato de serem apontadas como capazes de iniciar e manter a resposta inflamatória em distúrbios metabólicos e ainda, junto com a IL1 β , são sinais capazes de acionar o braço aferente do reflexo Antiinflamatório. Como há evidências que demonstram que a atividade vagal está prejudicada em estados de RI, obesidade e SM, o tratamento com Galantamina mostrou-se capaz de potencializar a ação colinérgica, e consequentemente, modular a resposta inflamatória e reduzir os níveis desses importantes biomarcadores.

Deve-se destacar que em relação aos níveis de IL1 β , diversos estudos destacam que em indivíduos saudáveis tal citocina não é sequer detectada (Kleiner *et al*, 2013) e nossos resultados demonstraram seus valores elevados entre os participantes. Esse resultado pode evidenciar o perfil patológico e vicioso de produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, que marcam a

SM e que, o tratamento com Galantamina pode amenizar tal perfil com impactos positivos no padrão metabólico.

Estudos clínicos em portadores da doença de Alzheimer (DA) que usavam inibidores da acetilcolinesterase apresentam resultados controversos com relação ao efeito antiinflamatório desses fármacos, e a presença de redução de marcadores inflamatórios vem sendo atribuída especialmente aos efeitos anti-oxidantes periféricos (Tabet, 2006). No entanto, vem aumentando as evidências dos efeitos moduladores sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias desses fármacos. Como exemplo, em estudo clínico realizado com 21 pacientes portadores de DA, com idade medida de 74.5 anos, o uso do inibidor de acetilcolinesterase Donepezil (droga considerada de terceira geração no tratamento da DA, como a Galantamina) resultou na redução dos níveis das citocinas TNF α , IL6 e IL1 β , após 30 dias de tratamento. Além disso, o uso de Donepezil resultou na redução da expressão do RNAm, em cultura de células, dessas citocinas (Reale *et al*, 2004).

Galantamina e metabolismo da glicose

No presente estudo, a estimulação colinérgica, por meio da administração de Galantamina, repercutiu em melhoras importantes em indicadores do metabolismo de glicose e na correção do estado de RI. Em recente estudo publicado por Ali *et al* (2015), os autores destacam que a sinalização colinérgica no SNC está implicada com a regulação da produção de glicose hepática via inervação vagal, e que a Ach facilita a liberação e sinalização intracelular da insulina, melhorando assim o metabolismo de glicose.

No referido estudo, administrando Galantamina em doses progressivas em ratos diabéticos durante 12 semanas, os autores observaram: redução nos níveis e da atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro, fígado e músculo esquelético; redução da ingestão de comida pelos ratos e, consequente perda de peso, correção dos parâmetros relacionados a homeostase de glicose (redução dos níveis plasmáticos de glicose, redução da RI medida pelo índice HOMA); aumento dos mecanismos de sinalização intracelular da insulina e consequente ativação e translocação do GLUT 4 até a membrana celular; e aumento da sinalização da via Wnt/ β -catenina (Ali *et al*, 2015).

No presente estudo confirmamos que as observações de melhora na RI descritas em animais são também evidentes em humanos, e acrescentamos a demonstração de redução nos níveis de TNF α , IL-6, e leptina e aumento nos níveis de adiponectina.

Como já exposto, citocinas pró-inflamatórias e leptina podem levar a RI, por ação direta nas células, e de forma indireta, por estimularem a lipólise do tecido adiposo com aumento da liberação de ácidos graxos livres na circulação. A leptina ainda leva ao aumento do tônus simpático (ativação reflexa) que pode ampliar a lipólise e a inflamação (Patel *et al*, 2008).

A adiponectina por sua vez, tem efeitos antiinflamatórios e se associa negativamente aos níveis de obesidade visceral e RI. Adiponectina demonstra capacidade de inibir a adesão de monócitos ao endotélio vascular, a transformação de macrófagos em *foam cells* e a expressão de moléculas de adesão, suprimindo, inclusive, a expressão de TNF α induzida por essas células (Fantuzzi, 2005; Goldstein, Scalia, 2004).

Nossos dados corroboram ainda com os resultados do estudo experimental de Satapathy *et al* (2011) realizado com camundongos obesos. Os animais foram tratados com 4mg/kg/dia durante quatro semanas, e apresentaram, ao final do tratamento redução dos níveis de IL-6 e leptina, além de aumento nos níveis de adiponectina, efeitos atribuídos a modulação vagal da inflamação. Apresentaram ainda, redução da RI (medida pelo índice HOMA) atribuída à melhora nos níveis de citocinas e adipocinas. Além desses efeitos, os camundongos apresentaram redução do consumo alimentar, do peso e dos níveis de gordura abdominal.

Galantamina, peso e gordura visceral

Diversos estudos vêm demonstrando que a estimulação vagal no SNC leva a redução do consumo alimentar, e ao aumento da expressão de fatores neurotróficos relacionados ao aumento do gasto energético (Blaszkiewicz, Townsend, 2016). Já a estimulação vagal eferente (periférica) pode agir em diferentes vias para aumentar o gasto energético (Blaszkiewicz, Townsend, 2016; Das 2007; Valle *et al* 2006; Alcantara *et al* 2005; Randell *et al* 2005; Kreier *et al*, 2002).

Observações clínicas de perda de peso associados com a estimulação por longo prazo do nervo vago, como um tratamento para a epilepsia (Abubakr, Wambacq, 2008; Burneo *et al*, 2002) e depressão grave (Pardo *et al*, 2007) destacam o vago como foco de intervenção nos distúrbios relacionados metabolismo do tecido adiposo.

No estudo de Satapathy *et al* (2011), os autores atribuíram parcialmente a perda do peso dos animais que receberam Galantamina à redução do ingesta alimentar, decorrente da ativação de vias colinérgicas centrais. Os autores ainda destacaram evidências obtidas em modelos animais que mostraram o papel chave de receptores nicotínicos para Ach do tipo $\alpha 7$ centrais modulando os mecanismos de regulação do apetite, dependentes da melatonina (Jo, Wiedl, Role, 2005). Como a Galantamina também apresenta ação modulatória alostérica positiva sobre receptores nicotínicos (Albuquerque *et al*, 2001) esse é um possível mecanismo central que explicou a redução do apetite e perda de peso nos animais.

Em nosso estudo, esse racional pode ajudar a explicar a redução da fome relatada pelos participantes que receberam Galantamina. Entretanto, não observamos redução do peso corpóreo de forma significativa, apesar de ter sido observado diminuição nos níveis de gordura visceral, aferidos tanto pela medida da circunferência abdominal como pela quantificação de gordura pela tomografia de abdômen. Isso evidencia outro resultado importante, que o efeito antiinflamatório da Galantamina pode ser capaz de gerar melhoras metabólicas antes da perda do peso. Esse fator pode trazer repercussões clínicas positivas, conferindo redução do risco cardiovascular de forma muito precoce, antes mesmo da diminuição dos níveis de gordura abdominal e visceral. Por outro lado, infere-se que o processo inflamatório pode ser um fator “mantenedor” do excesso de peso.

Em estudo que avaliou especificamente a perda de peso em portadores de DA, que usaram Galantamina por um longo período em dose de 16 e 24 mg, não foram observadas associações significantes entre perda de

peso e o uso da medicação (Droogsma *et al*, 2013). A perda de peso, característica desse distúrbio demencial, foi atribuída a diversos outros fatores como presença de doenças associadas, a aceitação alimentar no envelhecimento, ter ou não cuidador domiciliar entre outros (Droogsma *et al*, 2013).

Nenhum estudo clínico realizado em portadores de DA quantificou variações nos níveis de gordura visceral. Tais estudos têm foco nas melhoras da função cognitiva e realização das atividades de a vida diária.

Galantamina e marcadores de modulação autonômica

No presente estudo a avaliação da variabilidade da frequência (VFC) foi usada como método de medida indireta da modulação vagal e de efeito da droga (Galantamina).

A VFC é uma medida amplamente utilizada para avaliar o balanço autonômico (modulação simpato-vagal) para o coração, mais especificamente, no nó-sinoatrial. Existem métodos bem estabelecidos e padronizados da VFC nos domínios do tempo e da frequência. Após a aquisição das séries temporais dos intervalos de pulso (IP), denominados de tacogramas, usa-se a análise espectral para detectar a densidade de potência espectral total e a distribuição das potências em faixas, em função das diferentes frequências que compõem o sinal. Já foram estabelecidas faixas de frequências de baixa frequência, onde há predomínio do componente simpático (componente LF), e outra faixa de alta frequência onde há o predomínio parassimpático (componente HF). Essas potências podem ser expressas em valores absolutos ou em unidades

normalizadas, e essas medidas representam a contribuição relativa de cada componente do SNA no total da variabilidade de um registro de sinal biológico.

A administração de antagonistas de Ach ou vagotomia reduzem o componente de alta frequência (HF), e a estimulação elétrica do vago aumenta a potência dessa faixa espectral, demonstrando dessa forma, que esse componente reflete a ação vagal ao coração. O componente de baixa frequência apresenta maior relação com a atividade simpática, e a relação entre os componentes de baixa e alta frequência (LF/HF) tem sido proposta e aceita como o índice do balanço simpato-vagal da variabilidade cardíaca (Task Force of the European Society of Cardiology, 1996).

A administração de Galantamina para portadores de SM do presente estudo se mostrou efetiva para aumentar a modulação vagal, efeito já demonstrado em modelo experimental, como também para reduzir o componente simpático, melhorando o balanço simpato-vagal ao coração. As medidas da VFC têm sido fortemente associadas à morbimortalidade por diversas doenças cardiovasculares, bem como com as situações clínicas que cursam com inflamação subclínica, como a SM (Herder *et al* 2016, Papaioannou, Pneumatikos, Maglaveras 2013; Huston, Tracey 2011). Na verdade, a hiperatividade simpática e a menor modulação vagal são os perfis autonômicos que caracterizam situações de maior risco cardiovascular que, podem ser detectadas facilmente pela análise da VFC (Gerritsen *et al*, 2001). Além disso, as mudanças nesses parâmetros podem indicar melhora frente às diversas estratégias de tratamento.

A quantificação da modulação vagal para o coração pode sugerir ao mesmo tempo um estado de ativação vagal para o organismo (atividade vagal

sistêmica). Essa consideração foi abordada pelo próprio proponente da Via Antiinflamatória Colinérgica em recente publicação (Huston, Tracey, 2011). Nesse artigo, os autores afirmam que é possível considerar que a redução da modulação vagal cardíaca pode ser um indicativo da perda da influência inibitória tônica do vago sobre respostas inflamatórias (atividade de células imunes e liberação de citocinas), ou seja, uma disfunção que não ocorreria se esse circuito neural, envolvido com imunomodulação, estivesse funcionando.

Por apresentar considerável associação com a inflamação, a VFC se configura realmente numa importante ferramenta de investigação da modulação vagal.

Por meio das análises de correlação, demonstramos na população de portadores de SM, que, quanto maior a modulação simpática maior é o estado inflamatório e o estresse oxidativo. De forma oposta, maior atividade vagal se correlaciona com menores valores de biomarcadores de estresse oxidativo.

Li *et al* (2004) ao avaliarem a VFC de ratos com insuficiência cardíaca demonstraram que a atividade simpática é diretamente proporcional aos marcadores inflamatórios, e inversamente proporcional a atividade vagal. O estudo CARDIA verificou que uma relação positiva entre níveis séricos de mediadores pró-inflamatórios e atividade simpática está presente em humanos jovens (Sloan *et al*, 2007). Corroborando com estes dados, Marsland *et al* (2007) demonstraram em humanos que a melhora da VFC tem relação inversa com as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , contudo não apresentou relação direta com a citocina anti-inflamatória IL-10.

Assim, a melhora no padrão de modulação vagal cardíaca e a redução de citocinas pró-inflamatórias verificada no presente estudo podem sugerir que

ocorreu melhora de Via Antiinflamatória Colinérgica. De forma interessante, não houve alterações significativas nos parâmetros cardiovasculares, pois nem FC, nem PA foram alteradas.

Ausência de alterações nos parâmetros de FC e PA também foi encontrada em estudo que avaliou os efeitos da Galantamina na função cardíaca de idosos com DA (Isik *et al*, 2010). Já no estudo de Kroger *et al* (2012) sugere-se que o uso de inibidores da acetilcolinesterase, dentre eles a Galantamina, entre indivíduos com mais de 50 anos, possa causar eventos adversos cardíacos como síncope e bloqueio atrioventricular. Os autores, no entanto, não diferenciam doses, uma vez que as maiores doses desses medicamentos estão associadas a maiores chances de efeitos colaterais. O estudo também não caracteriza os participantes segundo doenças associadas e outros fatores de risco. No presente estudo usamos uma dose de Galantamina menor que a indicada na prática clínica para portadores de Alzheimer. É possível que o incremento de dose tenha efeito maior no sistema cardiovascular.

Ademais, os benefícios da modulação vagal cardiovascular se expressam na melhora de processos celulares que explicam diversas alterações patológicas, como a inflamação. Entretanto, sugerimos, que mesmo sub-doses de Galantamina se associam a melhora nos parâmetros de VFC para coração, o que pode representar melhora na modulação vagal também em outros órgãos e territórios.

Assim, a melhora no padrão inflamatório e metabólico, mediado por meio da ação colinérgica vagal, pode ser dose e tempo dependentes.

Galantamina e redução do Risco Cardiovascular

Considerando o potencial da ação antiinflamatória sobre a mortalidade cardiovascular, Lin *et al* (2016) avaliaram a associação entre o uso de inibidores da acetilcolinesterase e o risco de acidente vascular encefálico em pacientes com demência. Foram avaliados 10.634 pacientes dos quais 5.182 fizeram uso de inibidores da acetilcolinesterase e 5.182 não fizeram uso. Foi realizado controle rigoroso de fatores de confusão; mas o peso não estava entre as variáveis analisadas. O desfecho primário foi ocorrência de acidente vascular encefálico isquêmico (AVE-I) durante o período de avaliação, e o secundário foi mortalidade por todas as causas. A incidência de ACE-I foi significativamente menor nos usuários dos inibidores da acetilcolinesterase, e o risco de ACE-I consequentemente também foi menor. Os resultados foram atribuídos ao potencial antiinflamatório (redução das citocinas inflamatórias) e antioxidante desses medicamentos. Não houve diferenças na mortalidade por causas gerais. Os autores explicam que, possivelmente isso ocorreu porque não foram excluídos pacientes com alto risco geral de mortalidade (Lin *et al*, 2016).

A associação entre inibidores da acetilcolinesterase incluindo, Donepezil, Rivastigmina e Galantamina, com mortalidade por síndrome coronariana aguda (SCA) foi avaliada em 9075 portadores de DA, seguidos durante um período de 10 anos, e demonstrou que o uso desses medicamentos reduziu significativamente a incidência de SCA e outras causas de mortalidade cardiovascular. A conclusão do estudo foi que o tratamento com inibidores da acetilcolinesterase podem reduzir os riscos de SCA nos portadores de demência devido, sugerindo como mecanismos, melhora na função endotelial, por ação

antioxidante direta e por redução dos níveis de citocinas inflamatórias liberadas por macrófagos e outras células do sistema imunológico (Wun *et al*, 2015).

Em estudo similar realizado na Suécia com 7073 portadores de DA, com idade média de 79 anos, o uso de inibidores da acetilcolinesterase foi associado à redução de 38% no risco de infarto do miocárdio (IM), 36% de morte por todas as causas e, com redução de 26% na mortalidade por DCV. Ainda, o risco de IM e morte foi menor entre os usuários que faziam uso das maiores doses de medicação: donepezil 10 mg, rivastigmine .6 mg, galantamine 24 mg (Nordstrom *et al*, 2013).

Pode-se dizer que há ainda controvérsias a respeito da dose ideal dos inibidores da acetilcolinesterase, pois apesar do estudo de Nordstrom *et al* (2013) e de Wun *et al* (2015) demonstrarem que as maiores doses foram as associadas a menores riscos de incidência de SCA e IM, respectivamente, outros estudos demonstram que efeitos adversos negativos gastrintestinais como náuseas, vômitos e intolerância gástrica, que levam a suspensão do uso desses medicamentos, estão associados as maiores doses (Birks, 2006; McGleenon, Dynan, Passmore, 1999).

Certamente a inflamação na doença de Alzheimer apresenta características distintas em relação às inflamações de caráter crônico e subclínico como o da SM, no entanto há diversas similaridades referentes às comorbidades cardiovasculares relacionadas ao estado inflamatório. Além disso, a linha de discussão desses estudos também foca o papel da Via Antiinflamatória Colinérgica, evidenciando assim que a estimulação dessa via é promissor no manejo das condições patológicas marcadas pela inflamação crônica.

7.1 Considerações Finais

Os resultados desse estudo demonstram que o uso de Galantamina em portadores de SM apresenta-se como potencial estratégia adjuvante para seu tratamento. Pode-se afirmar que a Galantamina apresenta perfil seguro de uso, vistos os efeitos positivos relatados pelos participantes e pela ausência de efeitos adversos.

Os resultados demonstram que nossas hipóteses foram comprovadas parcialmente. Podemos ainda considerar que houve estimulação colinérgica vagal, verificada pelo aumento do componente da alta frequência e queda no componente de baixa frequência da VFC.

A estimulação colinérgica foi capaz de modular o perfil inflamatório com melhora consequente no padrão metabólico, especialmente da glicose. Ainda, tais efeitos foram independentes da perda de peso ou redução nos níveis de gordura visceral.

Além disso, a estimulação colinérgica pode ocasionar melhoras em parâmetros que nem sempre são considerados no tratamento dos portadores da SM, como o estado de bem estar, ansiedade, fome, entre outros, que podem contribuir com o sucesso no manejo dessa patologia.

Anexo 1

Critérios de Segurança dos participantes

Os procedimentos de estudo somente tiveram início depois da obtenção do consentimento verbal e escrito dos pacientes participantes.

As seguintes informações serão fornecidas para os indivíduos convidados a participar:

- ✓ A finalidade do estudo
- ✓ As características que qualificam a elegibilidade dos indivíduos para participação no estudo
- ✓ Uma descrição direta de qualquer ou todos os benefícios para os indivíduo
- ✓ Nome do investigador(es) e local da pesquisa
- ✓ Nome e número telefônico para contato e informações.

Os pacientes foram informados quanto aos potenciais riscos do uso do medicamento Galantamina.

a) Risco associado ao uso de galantamina: todos os estudos com humanos envolvendo fármacos carregam risco potencial para o paciente; no entanto, a vantagem de usar galantamina é que a mesma tem aprovação da FDA e os dados sobre sua segurança em humanos estão disponíveis, pois a galantamina é amplamente usada no tratamento da Doença de Alzheimer. No entanto, não foi usada em pacientes com SM. Como consequência, o uso da galantamina é de caráter experimental neste estudo. As reações adversas à droga são geralmente de natureza mínima, como listadas no sítio do fabricante, incluindo: náusea, vômitos, anorexia, diarreia e perda de peso.

Além disso, informações de segurança são citadas pelo fabricante (Janssen pharmaceutical: <http://axert360.com/omn360razadyne/about-razadyne-e-rasadyne-er-dosing.html>; acessado em junho de 2012)

b) Interações com outras medicações:

Anestesia: inibidores da colinesterase, como a galantamina, podem potencializar os efeitos de bloqueio neuromuscular por agentes do tipo succinilcolina ou similares durante anestesia.

Eventos cardiovasculares: em função de sua ação farmacológica, os inibidores da colinesterase possuem efeitos vagotônicos sobre os nodos sinoatrial e atrioventricular, levando a bradicardia e bloqueio atrioventricular. Tais ações podem ser particularmente importantes em pacientes com desordem de condução supraventricular ou em pacientes em uso concomitante de drogas que diminuem significativamente a frequência cardíaca. Em ensaios clínicos, a galantamina HBr esteve associada a relatos mais freqüentes de bradicardia e síncope do que com placebo.

Gastrointestinais: inibidores da colinesterase podem aumentar a secreção de ácido gástrico. Os pacientes devem ser monitorados de perto quanto a sintomas de sangramento gastrointestinal, em especial os pacientes com risco aumentado de úlcera péptica, e.g., pacientes com história doença ulcerosa ou paciente em uso concomitante de drogas antiinflamatórias não-esteróides.

Geniturinário: inibidores da colinesterase podem causar obstrução do esvaziamento vesical.

Neurológicos: inibidores da colinesterase podem ter potencial como causa de convulsões generalizadas. Em ensaios clínicos, não houve nenhum aumento na incidência de convulsões com o uso de galantamina HBr, quando comparada ao placebo.

Pulmonares: inibidores da colinesterase devem ser prescritos com cuidado para pacientes com história de asma ou doença pulmonar obstrutiva crônica.

Morte em indivíduos com déficit cognitivo leve (MCI): em estudos controlados com indivíduos idosos com MCI, 13 indivíduos em uso de RAZADYNE m.r. (n=1026) e 1 indivíduo com placebo (n=1022) morreram de causas diversas. Cerca de metade das mortes em indivíduos com RAZADYNE m.r. pareceram resultar de várias causas vasculares (infarto do miocárdio, AVC e morte súbita). RAZADYNE e RAZADYNE ER não estão indicadas para o tratamento de déficit cognitivo leve (MCI).

Pacientes com distúrbio hepático ou renal: em pacientes com função hepática ou renal moderadamente comprometidas, a titulação da droga deve ser calculada com precaução. O uso de RAZADYNE ou RAZADYNE ER (REMINYL ER) em pacientes com alterações hepáticas ou renais severas ($Cl_{cr} < 9 \text{ mL/min}$) não é recomendado.

Para outros efeitos colaterais incomuns e raros, deve-se contactar o fabricante pelo web site (<http://www.drugs.com/pro/razadyne.html>) ou a referência médica para prescrições (www.pdr.net).

Riscos psicológicos: uma vez que o estudo envolve placebo, alguns dos indivíduos serão privados do potencial benefício da droga. O efeito psicológico ao final do estudo será abordado. No entanto, não há nenhuma outra recomendação pela FDA e terapia farmacológica suficientemente comprovada para o tratamento da SM como um todo. Uma vez que ambos os grupos não serão privados de tal benefício, antecipamos que os efeitos psicológicos não serão significativos.

Todos os participantes no estudo foram monitorados pelo investigador principal e investigadores envolvidos no trabalho. Os pacientes foram acompanhados conforme as etapas descritas anteriormente. A cada Visita (contato) foram avaliados eventos adversos, uso concomitante de medicações e aderência à medicação em estudo. Eventos adversos menores, tais como náuseas, vômitos, diarreia, etc., foram registrados e devidamente tratados sintomaticamente. Nenhum participante a apresentou efeito adverso desagradável.

Anexo2

Capacidade de Memorização

Pede-se que o participante memorize algumas palavras e repita-as, mais tarde, as que se lembra. As palavras não devem guardar nenhuma relação umas com as outras.

Exemplo: memorizar as palavras olho, abacaxi e carro, certificando-se de que o paciente memorizou as palavras. Proceder com algum exame ou ação (o que decorre algum tempo) e pedir para que repita as palavras memorizadas. 1 ponto para cada palavra lembrada corretamente. Pontuação de 0 a 3.

Flexibilidade Mental

E

Anexo 4

Capacidade de concentração

Manter a capacidade de concentração em determinado aspecto.

Nomes de cores com palavras diferentes das cores designadas:

AZUL AMARELO VERMELHO VERDE

VERDE AZUL AMARELO VERMELHO

VERDE VERMELHO AZUL AMARELO

VERMELHO VERDE AMARELO AZUL

AMARELO VERMELHO VERDE AZUL

VERMELHO AZUL AMARELO VERDE

(Teste STROOP, versão Victoria, adaptado para o português).

Anexo 5 – MMS (MINI-MENTAL STATUS EXAMINATION)

(Folstein et al., 1975) Mini-Exame do Estado Mental

Nome _____ Idade _____ Escolaridade _____

<u>ORIENTAÇÃO TEMPORAL</u>	errado	certo
Dia do mês		
Mês		
Ano		
Dia da semana		
Hora		
<u>ORIENTAÇÃO ESPACIAL</u>		
local específico		
local genérico		
bairro ou rua próxima		
Cidade		
Estado		
<u>MEMÓRIA IMEDIATA</u>		
Vaso		
Carro		
Tijolo		
<u>ATENÇÃO E CÁLCULO</u>		
Número de respostas corretas		
<u>MEMÓRIA DE EVOCÇÃO</u>		
Vaso		
Carro		
Tijolo		
<u>LINGUAGEM</u>		
Nomeação – relógio		
Caneta		
Repetir “Nem aqui, nem ali, nem lá”.		
Comando “Pegue o papel com a mão direita		
Dobre ao meio		
E coloque no chão		
Ler e executar “Feche os olhos”		
Escrever uma frase		
Copiar o desenho		
Data:	escore total:	

Escreva uma frase:

Copiar o desenho

Anexo 6

Teste do Relógio

Comando: Pedir ao paciente para fazer um relógio, fazendo um círculo e colocando os números na posição correta, sem olhar no relógio dele, assim que terminar peça para colocar os ponteiros marcando 10 minutos para as 2 horas.

Tempo: Não tem tempo determinado

Avalia: Percepção visual, praxia de construção, disfunção do hemisfério direito com negligência a esquerda, relógio muito pequeno indica falta de planejamento e número em lugares inadequados indicam déficit executivo.

ESPAÇO PARA O DESENHO

TABELA CORREÇÃO ANEXADA NO VERSO DA FOLHA

PONTUAÇÃO OBTIDA: _____

PONTOS CRITÉRIOS DE CORREÇÃO

SUNDERLAND: J AM GERIATR SOC 1989, 37: 725-729

De 1 a 5 pontos – Desenhos do relógio, ponteiros e números inexistentes ou incorretos.

1. Não houve iniciativa de desenho. Desenho não interpretável.
2. Desenho indica que a solicitação de desenho foi de certa forma compreendida, vaga representação.
3. Distorção na numeração. Faltam números ou estes estão fora do relógio. Não existe conexão entre números e relógio. Ausência de ponteiros.
4. Aglomeração dos números em uma região, Interpretação errada da solicitação de desenho dos ponteiros (desenho de “face digital”, indicar as horas colocando círculos nos números etc).
5. Numeração “ao contrário” hora errada.

De 6 a 10 pontos – Desenhos do relógio, ponteiros e números corretos, com pouca distorção até tarefa plenamente correta

6. Posição dos ponteiros desconectada do relógio.
7. Ponteiros alterados porém compreensíveis, hora errada mas números corretos.
8. Pequenos erros na posição dos ponteiros.
9. Pequenos erros no tamanho e posição dos ponteiros.
10. Tarefa realizada plenamente correta.

Anexo 7

Descrição da técnica de aquisição de imagens por Tomografia Computadorizada

Gordura visceral abdominal:

As imagens utilizadas para a medida da gordura visceral foram adquiridas através tomografia computadorizada mutidetector (TCMD) sem contraste.

Imagens axiais foram realizadas durante pausa inspiratória, no espaço intervertebral entre a quarta e quinta vértebras lombares (L4-L5), visualmente determinada com base nesta primeira imagem. Os parâmetros de aquisição utilizados são: voltagem do tubo de 120 kV e corrente do tubo de 200 mA com colimação dos detectores de 64 por 0,5 mm e reconstrução com cortes tomográficos de 10 mm de espessura, seguindo modelos previamente descritos e aceitos na literatura. A localização dessas imagens coincide com a topografia da cicatriz umbilical e é muito próxima da localização onde é realizada a medida da circunferência abdominal.

A quantificação da adiposidade nas imagens adquiridas foi feita através da medida da área de gordura (cm²) contida em diferentes compartimentos abdominais. As imagens obtidas nas topografias descritas foram interpretadas através de software de edição de imagens (Aquarius System, TeraRecon, Inc, Foster City, Califórnia)

Uma vez que a cavidade abdominal é preenchida por diversas estruturas e órgãos, e muitas vezes a gordura não pode ser separada visualmente dessas, foi necessária edição das imagens para isolamento da gordura. A atenuação da gordura, padronizada por estudos anteriores, está entre -190 e -30 unidades Hounsfield. Sendo assim, o perímetro do compartimento abdominal em estudo foi manualmente delimitado e o software mensurou exclusivamente a área das estruturas incluídas nessa faixa de atenuação atribuída à gordura.

As medidas de adiposidade realizadas na topografia de L4-L5 foram as áreas de gordura do compartimento intra-abdominal e subcutânea. Para a medida da gordura do compartimento intra-abdominal (GVA) foi delimitado o perímetro da face interna da musculatura abdominal, excluindo a coluna vertebral.

A medida da gordura no compartimento subcutâneo foi definida da seguinte maneira: Inicialmente foi medida a área de gordura do compartimento intra-abdominal somado à musculatura abdominal e a coluna vertebral, definindo o limite desse compartimento como a face externa da musculatura abdominal, excluindo da medida apenas o tecido subcutâneo e a pele. O segundo passo foi a medida da área total de gordura na topografia L4-L5. A gordura abdominal subcutânea foi definida pela subtração das áreas de gordura total pela área das demais estruturas encontradas nessa topografia.

Gordura epicárdica/pericárdica:

O cálculo das gorduras epicárdica/pericárdica foi feito utilizando a aquisição para o escore de cálcio, sem nenhuma radiação adicional, utilizando parâmetros de seleção e cálculos semelhantes aos da gordura visceral abdominal. A gordura epicárdica é aquela encontrada entre o miocárdio e o pericárdio visceral. A gordura pericárdica é aquela encontrada externamente ao folheto parietal do pericárdio.

A quantificação da adiposidade nas imagens adquiridas foi feita através da medida da área de gordura (cm²) contida em diferentes compartimentos da gordura pericárdica (epicárdica/pericárdica). As imagens obtidas nas topografias descritas foram interpretadas através de software de edição de imagens (Aquarius System, TeraRecon, Inc, Foster City, Califórnia)

Uma vez que a cavidade torácica é preenchida por diversas estruturas, foi necessária edição das imagens para isolamento da gordura. A atenuação da

gordura foi padronizada entre -190 e -30 unidades Hounsfield. Sendo assim, o perímetro do compartimento torácico em estudo foi manualmente delimitado e o software mensurava exclusivamente a área das estruturas incluídas nessa faixa de atenuação atribuída à gordura, encontrando um valor total de gordura epicárdica e pericárdica somadas. Posteriormente, foi feita a seleção manual da gordura epicárdica e então através de cálculo de subtração com a gordura epicárdica/pericárdica total, se encontrava o valor da gordura pericárdica.

8 REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Olukoga OA, Gordon C and Arrol S. Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridemia in insulin sensitivity in diabetes. **Clin Sci** 1993; 85:77-81.

Abubakr A, Wambacq I. Long-term outcome of vagus nerve stimulation therapy in patients with refractory epilepsy. **J Clin Neurosci** 2008;15(2):127–9.

Abdellaoui A, Al-Khaffaf H. C-reactive protein (CRP) as a marker in peripheral vascular disease. **Eur J Vasc Endovasc Surg** 2007; 20:1-5.

Albuquerque EX, Santos MD, Alkondon M, Pereira EF, Maelicke A. Modulation of nicotinic receptor activity in the central nervous system: a novel approach to the treatment of Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord**. 2001;15 Suppl 1:S19-25.

Alcantara VM, Chautard-Freire-Maia, E.A., Scartezini, M., Cerci, M.S., Braun-Prado, K., Picheth, G. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. **Scand J Clin Lab Invest** 2002; 62:399–404.

Alessi A, Brandão AA, Pierin A, Feitosa AM, Machado CA, Forjaz CL *et al*. IV Diretriz para uso da Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial - II Diretriz para uso da Monitorização Residencial da Pressão Arterial IV MAPA / II MRPA. **Arq Bras Cardiol** 2005; 85 (suppl.2): 1-18.

Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. NCEP- Defined Metabolic Syndrome, Diabetes, and Prevalence of Coronary Heart Disease Among NHANESIII Participants Age 50 Years and Older. **Diabetes** 2003; 52:1210–1214.

Ali MA, El-Abhar HS, Kamel MA, Attia AS. Antidiabetic Effect of Galantamine: Novel Effect for a Known Centrally Acting Drug. **PLoS One** 2015; 11;10(8):e0134648.

Ando K, Fujita T. Metabolic syndrome and oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine** 2009; 47:213-218.

Andriantsitohaina R, Surprenant A: Acetylcholine released from guinea-pig submucosal neurones dilates arterioles by releasing nitric oxide from endothelium. **J Physiol** 1992; 453: 493–502.

Angelico F, Alessandri C, Ferro D, Pignatelli P, Del Bem M, Fiorello S, Cangemi R, Loffredo L, Violi F. Enhanced soluble CD40L in patients with the metabolic syndrome: relationship with in vivo thrombin generation. **Diabetologia** 2006, 49:1169.

Arıcan O, Aral M, Sasmaz S, Cıragil P. Serum levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. **Mediators Inflamm** 2005; 2005(5):273-9.

Bastos DHM, Rogero MM, Arêas JAG. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2009; 53(5): 646-56

Bautista LE, Vera LM, Arenas IA, Gamarra G. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF- α) and essential hypertension. **J Hum Hypertens** 2005; 19: 149–154.

Behling A, Moraes RS, Rohde LE, Ferlin EL, Nóbrega AC, Ribeiro JP. Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces ventricular arrhythmia and enhances heart rate variability in heart failure. **Am Heart J** 2003;146(3):494-500.

Beltowsky J. Role of leptin in blood pressure regulation and arterial hypertension. **J Hypertens** 2006; 24(5):789-801.

Berg AH, Scherer PE. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. **Circ Res** 2005; 96:939-949.

Bergman RN, Kim SP, Catalano KJ, Hsu IR, Chiu JD, Kabir M, et al. Why visceral fat is bad: mechanisms of the metabolic syndrome. **Obesity** (Silver Spring). 2006;14 Suppl 1:16S-19S.

Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Ulloa L, Yang H et al. Pharmacological Stimulation of the Cholinergic Antiinflammatory Pathway. **J. Exp. Med** 2002; 195(6):781-788.

Blaise GA, Stewart DJ, Guérard MJ. Acetylcholine stimulates release of endothelium-derived relaxing factor in coronary arteries of human organ donors. **Can J Cardiol** 1993; 9(9):813-20.

Blaszkiwicz M, Townsend KL. Adipose Tissue and Energy Expenditure: Central and Peripheral Neural Activation Pathways. **Curr Obes Rep** 2016;5(2):241-50.

Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Cochrane Database Syst Rev** 2006; 25;(1):CD005593.

Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. **Eur J Clin Invest** 2002; 32 Suppl 3:14-23.

Borovikova LV, Ivanova S, Nardi D, Zhang M, Yang H, Ombrellino M, Tracey KJ. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. **Auton Neurosci** 2000a; 85(1-3):141-7.

Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature** 2000b; 405(6785):458-462.

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J** 1973;134:707–716.

Bravo PE, Morse S, Borne DM, Aguilar EA, Efrain R. Leptin and Hypertension in Obesity. **Vasc Health Risk Manag** 2006; 2(2): 163–169.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology** 1978; 52:302-10.

Burger D, Molnarfi N, Gruaz L, Dayer JM.. Differential induction of IL-1 and TNF by CD40 ligand or cellular contact with stimulated T cells depends on the maturation stage of human monocytes. **J. Immunol** 2004; 173: 1292–1297.

Burneo JG, Faught E, Knowlton R, Morawetz R, Kuzniecky R. Weight loss associated with vagus nerve stimulation. **Neurology** 2002;59(3):463–4.

Choi KM, Ryu OH, Lee KW, Kim HY, Seo JA, Kim SG, Kim NH, et al. Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. **Diabetes Res Clin Pract** 2007; 75(2):235-40.

Chu NF, Spiegelman D, Hotamisligil GS, Rifai N, Stampfer M, Rimm EB. Plasma insulin, leptin, and soluble TNF receptors levels in relation to obesity-related atherogenic and thrombogenic cardiovascular disease risk factors among men. **Atherosclerosis** 2001;157(2):495-503.

Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ: Neural inhibition of inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. **J Endotoxin Res** 2003; 9:409–13.

Das UN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Med Sci Monit** 2007;13(12):RA214-21.

Das UN. Vagus nerve stimulation as a strategy to prevent and manage metabolic syndrome. **Med Hypotheses** 2011;76(3):429-433.

Dave KR, Katyare SS: Effect of alloxan-induced diabetes on serum and cardiac butyrylcholinesterases in the rat. **J Endocrinol**, 2002; 175: 241–50.

DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care** 1991, 14:173–194.

Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**. 2006, 14;444(7121):881-7.

Devaraj S, Singh U, Jialal I. Human C-reactive protein and the metabolic syndrome. **Curr Opin Lipidol** 2009;20(3):182-9.

Droogsma E, van Asselt DZ, van Steijn JH, Schuur T, Huinink EJ. Effect of long-term treatment with galantamine on weight of patients with Alzheimer's dementia. **J Nutr Health Aging** 2013;17(5):461-5.

Dunstan DW, Zimmet PZ, Welborn TA, Courten MP, Cameron AJ, Sicree RA, et al. The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance. **Diabetes Care**. 2002; 25: 829-34.

Eckel RH. Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. **N Engl J Med** 1989; 320:1060–68.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. **The Lancet** 2005; 365(9468):1415–1428.

Eckel RH. Mechanisms of the components of the metabolic syndrome that predispose to diabetes and atherosclerotic CVD. **Proc Nutr Soc** 2007; 66(1):82-95.

Egan BM. Insulin resistance and the sympathetic nervous system. **Curr Hypertens Rep** 2003; 5: 247–54.

Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, Giugliano G, Marfella R, Nicoletti G, Giugliano D. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88(3):1055-8.

Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA** 2001; 285: 2486–97.

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology** 2004; 145(5):2273-82.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **J Allergy Clin Immunol** 2005; 115(5):911-9.

Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, Carlson SL, Ackerman KD, Madden KS, et al: Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. **Immunol Rev** 1987, 100:225–260.

Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Circulating Interleukin 6 Levels, Blood Pressure, and Insulin Sensitivity in Apparently Healthy Men and Women. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86: 1154–1159.

Ferrannini E, Haffner SM, Mitchell BD, Stern MP. Hyperinsulinaemia: the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. **Diabetologia** 1991; 34(6):416-22.

Ferrannini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone G. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). **J Clin Invest**. 1997;100(5):1166-73.

Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). **Circulation** 2000; 102(1):42-7.

Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. **Circulation** 2007; 116(1):39-48.

Francisco G, Hernández C, Simó R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipemia. **Clin Chim Acta** 2006; 369(1):1-16.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y *et al*. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest** 2004; 114(12): 1752-61.

Gerritsen J, Dekker JM, TenVoorde BJ, Kostense PJ, Heine RJ, Bouter LM, et al. Impaired autonomic function is associated with increased mortality, especially in subjects with diabetes, hypertension, or a history of cardiovascular disease: the Hoorn Study. **Diabetes Care** 2001;24(10):1793-8.

Girman CJ, Rhodes T, Mercuri M, Pyörälä K, Kjekshus J, Pedersen TR, et al; 4S Group and the AFCAPS/TexCAPS Research Group. The metabolic syndrome and risk of major coronary events in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) and the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS). **Am J Cardiol** 2004;93(2):136-41.

Godfrey DA, Matschinsky FM: Enzymes of the cholinergic system in islets of Langerhans. **J Histochem Cytochem** 1975; 23: 645–51.

Goldstein RS, Bruchfeld A, Yang L, Qureshi AR, Gallowitsch-Puerta M, Patel NB *et al.* Cholinergic anti-inflammatory pathway activity and High Mobility Group Box-1 (HMGB1) serum levels in patients with rheumatoid arthritis. **Mol Med** 2007;13(3-4):210-5.

Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89(6):2563-8.

Gomes F, Telo DF, Souza HP, Nicolau JC, Halpern A, Serrano Jr CV. Obesidade e Doença Arterial Coronariana: Papel da Inflamação Vascular. **Arq Bras Cardiol** 2010; 94(2): 273-279.

Goehler LE, Gaykema RP, Hansen MK, Anderson K, Maier SF, Watkins LR. Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. **Auton Neurosci.** 2000 Dec 20;85(1-3):49-59.

Gorter PM, van Lindert ASR, Vos AM, Meijs MFL, van der Graaf Y, Doevendans AP, *et al.* Quantification of epicardial and peri-coronary fat using cardiac computed tomography; reproducibility and relation with obesity and metabolic syndrome in patients suspected of coronary artery disease. **Atherosclerosis** 2008; 197(2): 896–903.

Gotoh H, Kawaguchi Y, Harigai M, Hara M, Saito S, Yamaguchi T, Shimada K, Kawamoto M, Tomatsu T, Kamatani N. Increased CD40 expression on articular chondrocytes from patients with rheumatoid arthritis: contribution to production of cytokines and matrix metalloproteinases. **J Rheumatol** 2004;31(8):1506-12.

Goyal R, Faizy AF, Siddiqui SS, Singhai M. Evaluation of TNF- α and IL-6 Levels in Obese and Non-obese Diabetics: Pre- and Postinsulin Effects. **N Am J Med Sci** 2012 Apr;4(4):180-4.

Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. **Meth Enzymol** 1999;301:58-61.

Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. **Circulation** 2005; 112 (17): 2735-52

Hall JE, Brands MW, Henegar JR, Shek EW. Abnormal kidney function as a cause and a consequence of obesity hypertension. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 1998; 25: 58 –64.

Haskó G, Szabó C. Regulation of cytokine and chemokine production by transmitters and co-transmitters of the autonomic nervous system. **Biochemical Pharmacology** 1998; 56(9): 1079–1087.

Hashim Y, Shepherd D, Wiltshire S, Holman RR, Levy JC, et al. Butyrylcholinesterase K variant on chromosome 3 q is associated with Type II diabetes in white Caucasian subjects. **Diabetologia** 2001; 44: 2227–30

Hasty AH, Shimano H, Osuga J, Namatame I, Takahashi A, Yahagi N et al. Severe hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and atherosclerosis in mice lacking both leptin and the low density lipoprotein receptor. **J Biol Chem** 2001; 276(40):37402-8.

Herder C, Schamarek I, Nowotny B, Carstensen-Kirberg M, Straßburger K, Nowotny P, Kannenberg JM, Strom A, Püttgen S, Müssig K, Szendroedi J, Roden M, Ziegler D; German Diabetes Study Group. Inflammatory markers are associated with cardiac autonomic dysfunction in recent-onset type 2 diabetes. **Heart**. 2016 Aug 1. pii: heartjnl-2015-309181.

Hilderman M, Qureshi AR, Al-Abed Y, Abtahi F, Lindecrantz K, Anderstam B, Bruchfeld A. Cholinergic anti-inflammatory pathway activity in dialysis patients: a role for neuroimmunomodulation? **Clin Kidney J** 2015; 8(5):599-605

Hopps E, Noto D, Caimi G, Aversa MR. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. **Nutr Metab Cardiovasc Dis** 2010; 20(1):72-77.

Huston JM, Tracey K. The pulse of inflammation: heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy. **J Intern Med** 2011; 269(1):45-53.

Iacobellis G, Ribaudo MC, Assael F, Vecci E, Tiberti C, Zappaterreno A *et al.* Echocardiographic epicardial adipose tissue is related to anthropometric and clinical parameters of metabolic syndrome: a new indicator of cardiovascular risk. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88(11):5163-8.

Iacobellis G, Willens HJ, Barbaro G, Sharma AM. Threshold Values of High-risk Echocardiographic Epicardial Fat Thickness. **Obesity** 2008; 16: 887–892

International Diabetes Federation: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. **IDF** 2006.

Isik AT, Bozoglu E, Naharci MI, Kilic S. Evaluation of the effects of galantamine on cardiac function in elderly patients with Alzheimer's disease. **Am J Geriatr Pharmacother** 2010; 8(5):454-9.

Isoma BO, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissen M, *et al.* Cardiovascular Morbidity and Mortality Associated With the Metabolic Syndrome. **Diabetes Care** 2001; 24:683–689.

Ji J, Watts GF, Johnson AG, Chan DC, Ooi EMM, Rye KA *et al.* High-Density Lipoprotein (HDL) Transport in the Metabolic Syndrome: Application of a New Model for HDL Particle Kinetics. **J Clin Endocrinol Metab** 2006; 91: 973–979.

Jo YH, Wiedl D, Role LW. Cholinergic modulation of appetite-related synapses in mouse lateral hypothalamic slice. **J Neurosci** 2005; 25(48):11133-44.

Kahn R. Metabolic syndrome--what is the clinical usefulness? **Lancet** 2008; 7; 371(9628):1892-3.

Kajikawa Y, Ikeda M, Takemoto S, Tomoda J, Ohmaru N, Kusachi S. Association of circulating levels of leptin and adiponectin with metabolic syndrome and coronary heart disease in patients with various coronary risk factors. **Int Heart J** 2011; 52(1):17-22

Kaplan N. The deadly quartet: Upper body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia and hypertension. **Arch Int Med**. 1989;7:1514–20

Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab**. 2004;89(6):2548-56.

Kleiner G, Marcuzzi A, Zanin V, Monasta L, Zauli G. Cytokine Levels in the Serum of Healthy Subjects. **Mediators of Inflammation** 2013; (2013), Article ID 434010.

Kim HO, Kim HS, Youn JC, Shin EC, Park S. Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays. **J Transl Med** 2011; 9:113.

Koskinen T, Kähönen M, Jula A, Mattsson N, Laitinen T, Keltikangas-Järvinen L *et al*. Metabolic syndrome and short-term heart rate variability in young adults. The cardiovascular risk in young Finns study. **Diabet Med** 2009; 26(4):354-61

Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, Van Eden CG, Havekes LM, Kalsbeek A *et al*. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat--functional implications. **J Clin Invest** 2002; 110(9):1243-50.

Kröger E, Berkers M, Carmichael PH, Souverein P, van Marum R, Egberts T. Use of rivastigmine or galantamine and risk of adverse cardiac events: a database study from the Netherlands. **Am J Geriatr Pharmacother** 2012;10(6):373-80.

Kuroda S, Uzu T, Fujii T, Nishimura M, Nakamura S, Inenaga T, Kimura G. Role of insulin resistance in the genesis of sodium sensitivity in essential hypertension. **J Hum Hypertens** 1999; 13: 257–62.

Lacobellis G, Assael F, Ribaudo MC, Zappaterreno A, Alessi G, Di Mario U, Leonetti F. Epicardial fat from echocardiography: a new method for visceral adipose tissue prediction. **Obes Res**.2003 ;11(2):304-10.

Lacobellis G, Willens HJ, Barbaro G, Sharma AM. Threshold values of high-risk echocardiographic epicardial fat thickness. **Obesity (Silver Spring)** 2008;16(4):887-92

Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. **JAMA** 2002; 288(21):2709-16.

Leib C, Katus HA, Kaya Z. Cholinergic control of inflammation in cardiovascular diseases. **Trends in Cardiovascular Medicine** 2013; 23(2):46–51.

Lemieux I, Pascot A, Couillard C, et al. Hypertriglyceridemic waist: a marker of the atherogenicmetabolic triad (hyperinsulinemia; hyperapolipoprotein B; small, dense LDL) in men? **Circulation** 2000; 102:179-84.

Li M, Zheng C, Sato T, Kamada T, Sugimachi M, Sunagawa K. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. **Circulation** 2004;109:120-24

Lim S, Meigs JB. Ectopic fat and cardiometabolic and vascular risk. **Int J Cardiol** 2013; S0167-5273(13)01660-4.

Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. **Lancet** 2002; 360(9326):57-8.

Lin YT, Wu PH, Chen CS, Yang YH, Yang YH. Association between acetylcholinesterase inhibitors and risk of stroke in patients with dementia. **Sci Rep (Nature)** 2016; 6:29266.

Lopes HF, Egan BM. Autonomic dysregulation and the metabolic syndrome: pathologic partners in an emerging global pandemic. **Arq Bras Cardiol** 2006;87(4):538-47.

Lord G. Role of leptin in immunology. **Nutr Rev** 2002; 60(10 Pt 2):S35-8.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem** 1951; 193: 265–75.

Loy C, Schneider L. Galantamine for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Cochrane Database Syst Rev** 2006; 25(1):CD001747.

Lu LF, Cook WJ, Lin LL, Noelle RJ. CD40 signaling through a newly identified tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) binding site. **J Biol Chem** 2003; 278(46):45414-8

Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. **Diabetes** 2001; 50(9):2094-9.

Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR, et al. Impact of the Metabolic Syndrome on Mortality From Coronary Heart Disease,

Cardiovascular Disease, and All Causes in United States Adults. **Circulation** 2004; 110:1245-1250.

Marsland AL, Gianaros PJ, Prather AA, Jennings JR, Neumann SA, Manuck SB. Stimulated production of proinflammatory cytokines covaries inversely with heart rate variability. **Psychosom Med** 2007;69(8):709-16.

Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2004; 24(1):29-33.

Maurovich-Horvat P, Massaro J, Fox CS, Moselewski F, O'Donnell CJ, Hoffmann U. Comparison of anthropometric, area and volume-based assessment of abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue volumes using multi-detector computed tomography. **International Journal of Obesity** 2007; 31: 500–506.

Mazurek T, Zhang LF, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, et al. Human Epicardial Adipose Tissue Is a Source of Inflammatory Mediators. **Circulation** 2003; 108:2460-2466.

McGleenon BM1, Dynan KB, Passmore AP. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. **Br J Clin Pharmacol** 1999; 48(4):471-80.

Mishima Y, Kuyama A, Tada A, Takahashi K, Ishioka T, Kibata M. Relationship between serum tumor necrosis factor-alpha and insulin resistance in obese men with Type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract** 2001;52(2):119-23.

Nakamura T, Tokunaga K, Shimomura I, Nishida M, Yoshida S, Kotani K, et al. Contribution of visceral fat accumulation to the development of coronary artery disease in non-obese men. **Atherosclerosis**. 1994;107(2):239-46.

Natal C, Restituto P, Iñigo C, Colina I, Díez J, Varo N. The proinflammatory mediator CD40 ligand is increased in the metabolic syndrome and modulated by adiponectin. **J Clin Endocrinol Metab** 2008; 93(6):2319-27.

Nathan C. Points of control in inflammation. **Nature** 2002; 420(6917):846-52.

Nizri E, Hamra-Amitay Y, Sicsic C, Lavon I, Brenner T. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors. **Neuropharmacology** 2006; 50(5):540-7.

Nordström, P., Religa, D., Wimo, A., Winblad, B. & Eriksdotter, M. The use of cholinesterase inhibitors and the risk of myocardial infarction and death: a nationwide cohort study in subjects with Alzheimer's disease. **Eur. Heart J** 2013; 34: 2585 - 91.

Oda E. The metabolic syndrome as a concept of adipose tissue disease. **Hypertens Res** 2008, 31(7):1283-91.

Papaioannou V, Pneumatikos I, Maglaveras N. Association of heart rate variability and inflammatory response in patients with cardiovascular diseases: current strengths and limitations. **Front Physiol** 2013; 10 (4):174.

Pardo JV, Sheikh SA, Kuskowski MA, Surerus-Johnson C, Hagen MC, Lee JT, et al. Weight loss during chronic, cervical vagus nerve stimulation in depressed patients with obesity: an observation. **Int J Obes (Lond)** 2007;31(11):1756–9.

Patel SB, Reams GP, Spear RM, Freeman RH, Villarreal D. Leptin: linking obesity, the metabolic syndrome, and cardiovascular disease. **Curr Hypertens Rep** 2008;10(2):131-7.

Pavlov AV, Parrish WR, Rosas-Ballina M, Ochani M, Puerta M, Ochani K et al. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the

cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior and Immunity** 2009; 23(1):41–45.

Pavlov VA, Ochani M, Yang LH, Gallowitsch-Puerta M, Ochani K, Lin X, et al. Selective $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. **Crit Care Med** 2007;35(4):1139-44.

Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. **Mol Med**. 2003; 9(5-8):125-34.

Pavlov VA, Tracey KJ. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Biochem Soc Trans**. 2006, 34(Pt 6):1037-40.

Pavlov VA, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior and Immunity** 2005; 19(6):493–499.

Pavlov VA, Tracey KJ. The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism. **Nat Rev Endocrinol**. 2012 Dec;8(12):743-54

Penalva DQF. Síndrome metabólica: diagnóstico e tratamento. **Rev Med** 2008; 87(4):245-50.

Pohanka M. $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Is a Target in Pharmacology and Toxicology. **Int J Mol Sci** 2012; 13(2): 2219–2238.

Pongratz G, Straub RH. The sympathetic nervous response in inflammation. **Arthritis Res Ther**. 2014; 16: 504.

Prasad A, Quyyumi AA. Renin-Angiotensin System and Angiotensin Receptor Blockers in the Metabolic Syndrome. **Circulation** 2004; 110:1507-1512.

Randell EW, Mathews MS, Zhang H, Seraj JS, Sun G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. **Clin Biochem** 2005; 38(9):799-805.

Reale M, Iarlori C, Gambi F, Feliciani C, Salone A, Toma L *et al.* Treatment with an acetylcholinesterase inhibitor in Alzheimer patients modulates the expression and production of the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. **J Neuroimmunol** 2004; 148 (1-2):162-71.

Reaven G. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes** 1988; 37:1595-607.

Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. **Annu Rev Med.** 1993;44:121-31.

Reaven GM. Insulin Resistance, Cardiovascular Disease, and the Metabolic Syndrome. How well do the emperor's clothes fit? **Diabetes Care** 2004; 27(4):1011-12.

Reaven GM. The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. **Endocrinol Metab Clin North Am** 2004; 33(2):283-303.

Reaven GM. The insulin resistance syndrome: Definition and Dietary Approaches to Treatment. **Annu Rev Nutr** 2005; 25:391-406.

Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. **Lancet Oncol** 2004; 5(10):617-25.

Reilly MP, Rader DJ. The Metabolic Syndrome. More than the sum of its parts? **Circulation** 2003. 108:1546-51.

Restituto P, Colina I, Varo JJ, Varo N. Adiponectin diminishes platelet aggregation and sCD40L release. Potential role in the metabolic syndrome. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2010;298(5):E1072-7.

Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol** 1994;233:357-63.

Rissanen P, Franssila-Kallunki A, Rissanen A. Cardiac parasympathetic activity is increased by weight loss in healthy obese women. **Obes Res** 2001; 9(10):637-43.

Ribeiro Filho FF, Mariosa LS, Ferreira SRG, Zanella MT. Gordura Visceral e Síndrome Metabólica: Mais Que Uma Simples Associação. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2006;50(2):230-238.

Richter WO, Geiss HC, Aleksic S, Schwandt P. Cardiac autonomic nerve function and insulin sensitivity in obese subjects. **Int J Obes Relat Metab Disord** 1996; 20(10):966-9.

Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. **Circulation** 2000 May 9;101(18):2149-53.

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. **Circulation** 2012;125(1):e2-e220

Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C *et al.* Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. **Science** 2011; 334(6052):98-101.

Rosas-Ballina M, Tracey K. The Neurology of the Immune System: Neural Reflexes Regulate Immunity. **Neuron** 2009; 64(1): 28–32.

Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, Ochani K, Harris YT, Huston JM *et al.* Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. **Proc Natl Acad Sci USA** 2008; 105(31): 11008–11013.

Rosito AG, Massaro JM, Hoffmann U, Ruberg FL, Mahabadi AA, Vasan RV *et al.* Pericardial Fat, Visceral Abdominal Fat, Cardiovascular Disease Risk Factors, and Vascular Calcification in a Community-Based Sample. The Framingham Heart Study. **Circulation** 2008; 117:605-613.

Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- α : implications for insulin resistance. **Diabetes** 2002; 51(11):3176-88.

Sacks HS, Fain JN. Human epicardial adipose tissue: A review. **American Heart Journal** 2007; 153(6):907–917.

Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, *et al.* Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. **J Biol Chem**. 2004; 30;279(31):32345-53

Sanchez-Chavez G, Salceda R: Effect of streptozotocin-induced diabetes on activities of cholinesterases in the rat retina. **IUBMB Life** 2000; 49: 283–87.

Sanchez-Chavez G, Salceda R: Acetyl- and butyrylcholinesterase molecular forms in normal and streptozotocin-diabetic rat retinal pigment epithelium. **Neurochem Int** 2001; 39: 209–15.

Sarin S, Wenger C, Marwaha A, Qureshi A, Go BDM, Woomert CA, *et al.* Clinical Significance of Epicardial Fat Measured Using Cardiac Multislice

Computed Tomography. **The American Journal of Cardiology** 2008; 102(15): 767–771.

Sarin S, Wenger C, Marwaha A, Qureshi A, Go BD, Woomert CA, Clark K, Nassef LA, Shirani J. Clinical significance of epicardial fat measured using cardiac multislice computed tomography. **Am J Cardiol**. 2008;102(6):767-71.

Satapathy SK, Ochani M, Dancho M, Hudson LK, Rosas-Ballina M, Valdes-Ferrer SI, et al. Galantamine alleviates inflammation and other obesity-associated complications in high-fat diet-fed mice. **Mol Med**. 2011; 17(7-8):599-606.

Scott LJ, Goa KL. Galantamine: a review of its use in Alzheimer's disease. **Drugs**. 2000 Nov;60(5):1095-122.

Sloan RP, McCreath H, Tracey KJ, Sidney S, Liu K, Seeman T. RR interval variability is inversely related to inflammatory markers: the CARDIA study. **Mol Med** 2007; 13(3-4):178-84.

Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R, Stefanello N, Gutierrez J, Corrêa M, et al. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **Eur J Pharmacol** 2009; 610(1-3):42-8.

Silveira MR, Frollini AB, Verlengia R, Cavaglieri CR. Correlação entre obesidade, adipocinase sistema imunológico. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum** 2009, 11(4): 466-472.

Skalicky J, Muzakova V, Kandar R, Meloun M, Rousar T, Palicka V. Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. **Clin Chem Lab Med** 2008; 46(4):499-505.

Speliotes EK, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, Meigs JB, Sahani DV, et al. Fatty liver is associated with dyslipidemia and dysglycemia independent of visceral fat: the Framingham Heart Study. **Hepatology** 2010; 51(6): 1979-87.

Sreedhar G, Thota, H., Allam, A.R., Suresh babu, C., Siva Prasad, A., Divakar, Ch. Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus: the cholinesterase connection?. **Lipids Health Dis** 2006; 5:28.

Swaroop JJ, Rajarajeswari D, Naidu JN. Association of TNF- α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **Indian J Med Res** 2012; 135(1): 127–130.

Tabet N. Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: anti-inflammatories in acetylcholine clothing! **Age Ageing** 2006; 35(4):336-8.

Tracey KJ. Fat meets the cholinergic antiinflammatory pathway. **J Exp Med** 2005; 202(8): 1017–1021.

Tracey KJ. Reflex control of immunity. **Nat Rev Immunol** 2009; 9(6):418-28.

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. **Circulation** 1996; 93:1043–1065.

Tracey KJ. The inflammatory reflex. **Nature** 2002; 420(6917):853-9.

Tsigos C, Kyrou I, Chala E, Tsapogas P, Stavridis JC, Raptis SA, Katsilambros N. Circulating tumor necrosis factor alpha concentrations are higher in abdominal versus peripheral obesity. **Metabolism** 1999; 48(10):1332-5

Uno K, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J *et al.* Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. **Science** 2006; 312(5780):1656-9.

Valle A, O'Connor DT, Taylor P, Zhu G, Montgomery GW, Slagboom PE, Martin NG, Whitfield JB. Butyrylcholinesterase: association with the metabolic syndrome and identification of 2 gene loci affecting activity. **Clin Chem.** 2006; 52(6):1014-20.

Van Maanen MA, Vervordeldonk MJ, Tak PP. The cholinergic anti-inflammatory pathway: towards innovative treatment of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol** 2009; 5(4): 229-32.

Volp ACP, Alfenas RCG, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC, Bressan J. Capacidade dos Biomarcadores Inflamatórios em Predizer a Síndrome Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2008; 52(3): 537-549

Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, da Silva MER, Santos RF. Depot-Specific Hormonal Characteristics of Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue and their Relation to the Metabolic Syndrome. **Horm Metab Res** 2002; 34(11/12): 616-621.

Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, *et al.* Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature** 2003;421(6921):384-8.

Wang TD, Lee WJ, Shih FY, Huang CH, Chen WJ, Lee YT *et al.* Association of epicardial adipose tissue with coronary atherosclerosis is region-specific and independent of conventional risk factors and intra-abdominal adiposity. **Atherosclerosis** 2010; 213: 279–287.

Wang TD, Lee WJ, Shih FY, Huang CH, Chang YY, Chen WJ *et al.* Relations of Epicardial Adipose Tissue Measured by Multidetector Computed Tomography to Components of the Metabolic Syndrome Are Region-Specific and Independent of Anthropometric Indexes and Intra abdominal Visceral Fat. **J Clin Endocrinol Metab** 2009; 94(2):662– 669.

Wang TD, Lee WJ, Chen MF. Epicardial Adipose Tissue Measured by Multidetector Computed Tomography: Practical Tips and Clinical Implications. **Acta Cardiol Sin** 2010; 26:5568.

Wesseling KH, Wit B, Weber JAP, Smith NT. A simple device for the continuous measurement of cardiac output. **Adv Cardiovasc Phys** 1983; 5:16-52.

Wheeler GL, Shi R, Beck SR, Langefeld CD, Lenchik L, Wagenknecht LE *et al.* Pericardial and visceral adipose tissues measured volumetrically with computed tomography are highly associated in type 2 diabetic families. **Invest Radiol**. 2005; 40(2):97-101.

Wilcock GK, Lilienfeld S, Gaens E. Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. Galantamine International-1 Study Group. **BMJ** 2000; 321(7274):1445-9.

Wisse BE. The Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. **J Am Soc Nephrol** 2004; 15: 2792– 2800.

Wu PH, Lin YT, Hsu PC, Yang YH, Lin TH, Huang CT. Impact of acetylcholinesterase inhibitors on the occurrence of acute coronary syndrome in patients with dementia. **Sci Rep (Nature)** 2015;5:15451

Yamakawa K, Matsumoto N, Imamura Y, Muroya T, Yamada T, Nakagawa J, et al. Electrical Vagus Nerve Stimulation Attenuates Systemic Inflammation and Improves Survival in a Rat Heatstroke Model. **Plos One** 2013; 8(2): e56728.

Zeman M, Jirak R, Jachymova M, Vecka M, Tvrzicka E, Zak A. Leptin, adiponectin, leptin to adiponectin ratio and insulin resistance in depressive women. **Neuro Endocrinol Lett** 2009;30(3):387-95.