EMERSON RENATO MARTINS

**Análise de componentes do metabolismo lipídico na
resposta inflamatória induzida por ligadura e punção
cecal em ratos diabéticos**

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

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Processos
Imunes e Infecciosos
Orientador: Prof. Dr. Fabiano
Pinheiro da Silva

**São Paulo
2017**

Emerson Renato Martins

**Análise de componentes do metabolismo lipídico na
resposta inflamatória induzida por ligadura e punção
cecal em ratos diabéticos**

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

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Processos
Imunes e Infecciosos
Orientador: Prof. Dr. Fabiano
Pinheiro da Silva

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Martins, Emerson Renato

Análise de componentes do metabolismo lipídico na resposta inflamatória
induzida por ligadura e punção cecal em ratos diabéticos / Emerson Renato
Martins -- São Paulo, 2017.

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

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e
Infecciosos.

Orientador: Fabiano Pinheiro da Silva.

Descritores: 1.sepse 2.diabetes mellitus 3.bioquímica 4.lipídeos
5.inflamação 6.biomarcadores 7.ratos Wistar

USP/FM/DBD-296/17

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho em especial a minha esposa, **Márcia Regina Devecchi Martins**, aos meus filhos, **Ingrid Devecchi Martins** e **Leonardo Devecchi Martins** e **familiares** presentes em minha vida, que me apoiaram e proporcionaram esta oportunidade e por compreenderem os motivos da minha ausência. Dedico também aos estimados **Professores** que acreditaram no meu potencial e participaram intensivamente desta conquista.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a **Deus**, que é a inteligência suprema que nos permite estar aqui neste espaço e tempo, vivendo, convivendo e aprendendo.

Ao professor e orientador Prof. Dr. **Fabiano Pinheiro da Silva**, a quem ofereço todo meu respeito e gratidão.

Ao Professor Emérito Dr. **Marcel Cerqueira Cesar Machado**, pelas sugestões que de forma significativa contribuiu para o meu amadurecimento profissional.

Aos meus pais, **José Martins** (*in memoriam*), **Wilsa Aparecida Vieira Martins** e **irmãos** tão amados pelo apoio incondicional.

Aos meus **amigos** e **companheiros** (as) do Laboratório de Investigações Médicas e do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, digna de minha total admiração pessoal e profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Ciências e tecnológicas pelo auxílio a bolsa de estudo.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	
2.1	Sepse	4
2.1.1	Fisiopatologia da sepse	7
2.2	Diabetes	14
2.2.1	Contexto histórico sobre <i>Diabetes mellitus</i>	14
2.2.2	Diabetes tipo 1	18
2.2.3	Fisiopatologia da Diabetes	20
2.2.4	Insulinoterapia	23
2.2.5	Diabetes na sepse	25
2.2.6	Lípidios	28
3	OBJETIVOS	35
4	MÉTODOS	
4.1	Animais	36
4.2	Indução da Diabetes (DM1): Alloxan	36
4.3	Modelo de punção e ligadura cecal (CLP)	37
4.4	Extração de RNA	37
4.4.1	Leucócitos	37
4.4.2	Purificação do RNA Total nos leucócitos (<i>Quick-Start/QIAGEN</i>).....	38
4.4.3	Tecidos (miócitos, adipócitos e hepatócitos)	39
4.5	Preparação para o PCR	40
4.6	Reação em Cadeia da polimerase em tempo real (<i>RT-PCR</i>)	40

4.7	Ensaio Imuno-enzimático (ELISA)	42
4.8	Estatística	44
5	RESULTADOS	
5.1	Modelo de diabetes induzido pelo Alloxan	45
5.2	Curva de mortalidade	45
5.3	Reação em cadeia da polimerase	46
5.3.1	Fatty acid-binding protein 4	47
5.3.2	Fatty acid-binding protein 7	48
5.3.3	Acetil-CoA acetiltransferase (Acat2)	49
5.3.4	Glicoquinase (Gk)	51
5.4	Ensaio imunoenzimático (ELISA)	53
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÃO	64
8	ANEXO	66
9	REFERÊNCIAS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ACCP	American College of Chest Physicians
Acat	Acetyl-CoA Acetyltransferase
a.C.	Antes de Cristo
aPC	Activated Protein C
APC	Antigen-Presenting Cell
AGEs	<i>Advanced Glycation</i> End-Products
Akt2	Serine/Threonine-Protein Kinase 2
AA	Araquidonic Acid
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
bpm	Batimento por minuto
CD	Cluster of Differentiation
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
CXCR2	C-X-C Chemokine Receptor Type 2
CLP	Cecal Ligation Puncture
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DM	Diabetes Mellitus
DCCT	The Diabetes Control and Complications
DAG	Diacylglycerol
d.C.	Depois de Cristo
DHA	Acido docosaheptaenoico
DEPEC	Diethylpyrocarbonate
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ERK1	Extracellular Signal-Regulated <i>Kinase</i> 1
Fabp	Fatty Acid-Binding Protein
Fas/FasI	Type-II Transmembrane Protein
Gk	Glucokinase
GAD-65	Glutamic Acid Decarboxylase 65
GLUT	Glucose Transporter
GRK2	G Protein-Coupled Receptor Kinase 2
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HMGB1	High Mobility Group Protein Box 1
HLA	Human Leukocyte Antigen
HDL	High Density Lipoprotein
I-CA	Islet Cell Antibody
IAA	<i>Anti</i> -Insulin Auto-Antibody
IFN- γ	Interferon Gamma
IRAK-4	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4
IL	Interleukin
Ig	Immunoglobulin
Ikk β	Inhibitor of Kappa Beta
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
Ikk α	Inhibitor of Kappa Beta

ipm	Incursões por minuto
IA-2	Anti-tyrosine Phosphatase
JNK	Jun N-terminal kinase
kDA	<i>Kilodaltons</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LAL	Lipase lisossomic Acid
MODY	Maturity-Onset Diabetes of The Young
mmHg	Milímetro de Mercúrio
MyD88	Myeloid Differentiation Primary response gene 88
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
MARK	Microtubule Affinity Regulating <i>Kinase</i>
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MIP-3 α	Macrophage Inflammatory Protein-3 Alpha
MHC1	Major Histocompatibility Complex 1
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen
Nk	Natural Killer Cells
NETs	<i>Neutrophil</i> Extracellular Traps
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NO	Nitric Oxide
PRRs	Pattern Recognition Receptors
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKC	Protein Kinase C
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acid</i>
pH	<i>Potential of Hydrogen</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PNH	Neutral Protamine Hagedorn
pAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor Type 1
PMN	Polymorphonuclear
PAMPS	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PI3k	Phosphatidylinositol 3-Kinase
ROS	Reactive <i>Oxygen</i> Species
rpm	<i>Rotation per Minute</i>
RNA	Ribonucleic Acid
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SNC	Sistema Nervoso Central
SIRT-1	Sirtuin-1
SDMO	Syndrome of Multiple Organ Dysfunction
SOCS-1	Suppressor Of Cytokine Signaling 1
SOATs	Esterol O-Aciltransferases
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
t-PA	Tissue Plasminogen Activator
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha

TLR	Toll-Like Receptors
TP	Tempo de Protrombina
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
TREM-1	Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1
Th	T Helper Cells
TRIF	TIR-Domain-Containing Adapter-Inducing Interferon- β
TIRAP	Toll-Interleukin 1 Receptor, Domain Containing Adaptor Protein
TRAF-6	TNF receptor associated factor 6
UTIs	Unidades de Terapia Intensiva
VEGF	<i>Vascular Endothelial</i> Growth Factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
vs.	Versus

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
Σήψις	Sepse
>	Maior
<	Menor
°C	Grau Celsius
mm ³	Milimetro Cúbico
k	Kappa
β	Beta
α	Alfa
γ	Gamma
ε	Epsilon
δ	Delta
+	Positivo
-	Negativo
V	Cinco
VIII	Oito
II	Dois
XVIII	Dezoito
mg	Miligramma
dL	decilitro
U	Unidade
kg	Quilograma
kDa	KiloDalton
N ⁰	Número
g	grama
®	Marca registrada
cm	Centimetro
μL	Microlitro
nm	Nanômetro
Δ	Delta
≤	Igual ou Menor
=	Igual
pg	Picograma

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 .Diversos estágios da sepse estabelecidos no consenso de 1991.....	6
Tabela 2 Conceito de PIRO	7
Tabela 3 Variação de temperatura nas reações de PCR	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Receptores de superfície celular e inúmeras moléculas intracelulares responsáveis pelas ativações de genes para transcrição de citocinas (SIRS).....	9
Figura 2	Resumo básico da resposta imunoinflamatória da Sepse.....	11
Figura 3	Mecanismo unificador da lesão celular produzido pela hiperglicemia nas vias dos polióis, hexosaminas, AGEs e PKC (A – aumento da síntese da membrana basal, oclusão capilar e glomeruloesclerose, B – aumento da disfunção endotelial, C – aumento da permeabilidade e angiogênese).....	21
Figura 4	Estrutura tridimensional por cristalografia de Raio X da Fabp4..	31
Figura 5	Estrutura tridimensional por cristalografia de Raio X da Fabp7...	32
Figura 6	Estrutura tridimensional por cristalografia de Raio X da Glicoquinase (Gk).....	33
Figura 7	Estrutura tridimensional por cristalografia de Raio X da Acat2....	34
Figura 8	94 genes expressos em <i>PCR-array</i> para o perfil lipídico (QiAGEN).....	41

LISTAS DE GRÁFICOS

Gráfico 1	O gráfico mostra os grupos diabetes e diabetes/sepsis com a dosagem do nível de glicose no sangue (mg/dL) antes e pós indução por Allosan (42mg/Kg).....	45
Gráfico 2	A curva de mortalidade foi determinada a cada 12 horas por 48 horas e a comparação entre os grupos CLP e DM+CLP demonstra o cálculo % de sobrevivência entre os animais ($p=0,04$)..	46
Gráfico 3	Níveis de <i>RNAm</i> do gene <i>Fabp4</i> expressos em diferentes tecidos dos respectivos grupos acima. Observa-se que as figuras (Adipócitos) e (Miócitos) apresentam diferença expressiva do <i>Fabp4</i> entre CLP vs DM+CLP.....	48
Gráfico 4	As colunas demonstram as variações do <i>RNAm</i> do <i>Fabp</i> expresso nos grupos sobre as diferentes células (leucócitos hepatócitos).....	49
Gráfico 5	Aumento expressivo em miócitos de <i>Acat2</i> (CLP vs DM/CLP). Em leucócitos houve uma pequena variação na expressão entre os grupos. Os grupos CLP vs DM/CLP de hepatócitos tiveram resultados similares. Em adipócitos houve um aumento de <i>Acat2</i> no grupo CLP em comparação com DM+CLP.....	50
Gráfico 6	Expressão da enzima Glicoquinase em diferentes estágios da doença, comparando os grupos CLP vs DM+CLP.....	52
Gráfico 7	Os dados demonstram os níveis em ng/mL de <i>Fabp4</i> aumentado no plasma dos grupos DM+CLP em relação ao grupo CLP, porém sem diferença estatística entre as colunas (CLP vs DM+CLP). Os níveis em pg/mL de <i>Fabp7</i> no plasma dos grupos CLP vs DM+CLP, demonstram diferença estatisticamente significativa com aumento na frequência de <i>Fabp7</i> no grupo DM+CLP.....	53
Gráfico 8	Cálculo da curva padrão de ambas as lipoproteínas demonstraram valores de $r^2 0,999$ de confiabilidade (<i>SoftMax Pro</i> , <i>VERSAmax</i>).....	54

Resumo

Martins ER. *Análise de componentes do metabolismo lipídico na resposta inflamatória induzida por ligadura e punção cecal em ratos diabéticos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: A sepse permanece entre as principais causas de morte nos países desenvolvidos e subdesenvolvidos com uma incidência que aumenta a cada ano. O aumento no número de pacientes diabéticos internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) também tem chamado a atenção pela complexidade das comorbidades e demais complicações metabólicas encontradas nesta população, contribuindo assim para a desregulação de vias imunológicas e falência de múltiplos órgãos. Diversos estudos sobre distúrbios lipídicos em pacientes diabéticos criticamente enfermos tem sido discutido amplamente na última década com o intuito de identificar características que possam fornecer uma visão mais abrangente das alterações metabólicas e da fisiopatologia desta doença. **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo foi buscar através da análise do perfil lipídico, novos marcadores biológicos e compreender as variáveis da resposta imunoinflamatória encontrada em modelo experimental de sepse, comparando ratos sépticos com e sem diabetes mellitus. **MÉTODOS:** Utilizamos o modelo de ratos (Wistar) de 8 semanas, divididos em 4 grupos: controle, diabetes (DM), sepse (CLP) e sepse/diabetes (DM+CLP). Através do modelo de punção e ligadura cecal (CLP), induzimos sepse. Através do modelo de Alloxana, induzimos diabetes. Coletamos o plasma para teste de

Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e células para extração de Ácido Ribonucleico (RNA) que, em seguida, foi submetido a análise através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **RESULTADOS:** A nossa curva de mortalidade demonstrou diferenças significativas entre os grupos analisados ($p=0,04$). Descobrimos que os grupos CLP vs DM+CLP obtiveram alterações significativas para as expressões de *RNA*m das lipoproteínas, Fabp4 em adipócitos ($p=0,0095$) e miócitos ($p=0,0152$), Acat2 em miócitos ($p=0,0303$), Gk em leucócitos ($p=0,0260$) e por ELISA a isoforma Fabp7 ($p=0,0152$) demonstrou concentrações aumentadas no plasma dos animais diabéticos induzidos a sepse (DM+CLP). **CONCLUSÃO:** Concluimos que as alterações observadas nas expressões das lipoproteínas revelam um papel importante na patogênese da sepse em animais diabéticos. Acreditamos que através de estudos futuros poderemos complementar a efetividade desse mecanismo complexo e utilizá-lo de forma terapêutica.

Descritores: 1.sepse 2.diabetes mellitus 3.bioquímica 4.lipídeos 5.inflamação 6.biomarcadores 7.ratos Wistar

Abstract

Martins ER. *Analysis of lipid metabolism components in the inflammatory response induced by cecal ligation and puncture in diabetic rats* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

INTRODUCTION: Sepsis remains among the leading causes of death in developed and underdeveloped countries with an incidence that increases every year. The increased incidence of sepsis in diabetic patients admitted to intensive care units (ICUs) has also drawn attention due to the complexity of the disease and other metabolic complications, leading to immune deregulation, multiple organ failure and high mortality rates. Lipid metabolism in critically ill diabetic patients has been widely investigated in the last decades, since it is an important characteristic in the pathophysiology of this complex disease. **OBJECTIVE:** The aim of this study was to investigate the lipid profile of diabetic rats, submitted to cecal ligation and puncture. **METHODS:** Wistar rats 8-week were divided in the following groups: control, diabetes (DM), sepsis (CLP) and sepsis/diabetes (DM+CLP). Plasma was collected for the Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay test (ELISA) and the cells were used for Ribonucleic Acid extraction (RNA) that was then analyzed through the Polymerase Chain Reaction (PCR-array). **RESULTS:** Our mortality curve showed significant differences among the study groups ($p=0.04$). We found that the CLP vs DM+CLP groups showed significant differences in the mRNA expression of the lipoproteins Fabp4 in adipocytes ($p=0.0095$) and myocytes ($p=0.0152$), Acat2 in myocytes ($p=0.0303$) and Gk

in leukocytes ($p=0.0260$). The protein values of Fabp7 ($p=0.0152$) exhibited increased plasma concentrations in diabetic animals submitted to sepsis (DM+CLP). **CONCLUSION:** We conclude that our results of the lipoprotein expression values of several molecules reveal key findings in the pathogenesis of sepsis in diabetic animals and can be used as biomarkers of sepsis in this specific population.

Descriptors: 1.sepsis 2.diabetes mellitus 3.biochemistry 4.lipids
5.inflammation 6.biomarkers 7.rats Wistar

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

A sepse é uma síndrome complexa definida por resposta inflamatória sistêmica (SIRS), caracterizada por manifestações múltiplas que podem determinar a disfunção ou falência de um ou mais órgãos ou sistemas, apresentando uma alta mortalidade. Cerca de 70% dos pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva (UTIs) desenvolvem SIRS, podendo também ocorrer em associação a eventos não-infecciosos, como traumatismos múltiplos, cirurgias, pancreatite e queimaduras.¹

Estima-se que aproximadamente 19 milhões de pessoas são acometidas pela doença em todo mundo, com o crescimento de 1% ao ano. No Brasil, cerca de 25% dos pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva (UTIs) atendem aos critérios e diagnóstico de sepse grave ou choque séptico, com taxas progressivamente maiores de mortalidade devido a sepse (34,7%), sepse grave (47,3%) e choque séptico (52,2%). A incidência de mortalidade na população brasileira é de aproximadamente 400.000 pessoas por ano, gerando um custo de 3.2 bilhões de dólares (1/1000 habitantes) para os setores públicos e privados. A procura pelo diagnóstico rápido e tratamento eficaz da sepse parece cada dia mais premente. A sua incidência aumenta e os pacientes se apresentam aos serviços de emergência cada vez mais idosos com doenças crônicas e ao mesmo tempo com patógenos mais resistentes.^{2, 3, 4, 5}

O termo diabetes é geralmente utilizado para pacientes com transtorno metabólico complexo de etiologia heterogênea, caracterizada pela

hiperglicemia e distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, resultantes de defeitos da secreção e/ou da ação da insulina. A secreção insuficiente de insulina pode ocorrer em associação com a destruição ou a perda de função das células beta das ilhotas pancreáticas.^{6, 7, 8}

No mundo, a diabetes está associado a uma maior mortalidade e ao alto risco de complicações micro e macro-vasculares, sendo que a sua incidência varia de acordo com a geografia e etnia, atingindo mais a população caucasiana. No Brasil, as estimativas variam em torno de 7 pacientes para cada 100.000 habitantes. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, a doença (tipo 1) acomete aproximadamente 5-8% da população infantil e adolescente com forte caráter genético e início na fase pré-escolar com aumento de 3% ao ano.^{9, 10}

Estudos recentes em pacientes sépticos com diabetes demonstram uma maior susceptibilidade para infecções secundárias, quando comparados aos pacientes não diabéticos.^{11, 12} O estado hiperglicêmico destes pacientes está parcialmente associado a deficiências fisiológicas nas funções dos leucócitos, incluindo quimiotaxia, fagocitose e a reduzida atividade microbicida.^{13, 14}

Com base em análises da glicotoxicidade celular nesses pacientes, vários estudos ao longo do tempo sugeriram um impacto fisiológico deletério para pacientes com hiperglicemia. Entretanto, os estudos epidemiológicos não foram capazes de revelar associação entre hiperglicemia e mortalidade nas unidades de terapia intensiva (UTIs). Na última década, vários ensaios

randomizados foram publicados sobre o controle glicêmico em pacientes críticos, corroborando o conceito de que a hiperglicemia talvez seja uma alteração adaptativa ao estresse e que deveria ser tolerada na doença crítica (*Estudo de Leuven*).^{15, 16} Talvez estes resultados possam ser justificados pela compreensão incompleta de como a insulina modula a resposta imunológica na sepse, gerando incertezas de especialistas sobre o papel dos valores glicêmicos em doentes críticos.^{17, 18}

O fato é que as evidências sobre a patogênese e os mecanismos bioquímicos e moleculares desse grupo de pacientes ainda permanecem incertos. Partindo deste contexto, priorizamos em nosso estudo avaliar as propriedades tipicamente heterogêneas do perfil lipídico em diferentes estágios da doença em modelo experimental. Em geral, sabe-se que os lipídeos exibem uma imensa diversidade combinatória e estrutural e desempenham um papel biológico essencial na síntese, sinalização, organização e deslocamento celular, porém em inúmeras doenças metabólicas esses lipídeos sofrem interações físico-químicas, levando a disfunção e desregulação metabólica.^{19, 20} A nossa expectativa com isso, é obter uma visão mais ampla do status bioquímico dos pacientes hiperglicêmicos com sepse em relação às manifestações clínicas que são altamente variáveis, bem como alavancar a inclusão de novos biomarcadores de potencial importância na prática clínica.

2. Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sepses

A sepsis é uma das mais antigas síndromes conhecidas na medicina. A palavra sepsis é de origem grega (*σήψις*) e significa decomposição ou putrefação e já era mencionada há 2700 anos atrás em poemas de Homero. Hipócrates (a.C. 460-377) acreditava que a sepsis era um processo pelo qual a carne apodrece, devido falta de oxigênio. Galeno (129-199 d.C.), mais tarde, considerava a sepsis um evento necessário para cicatrização de feridas. Com a confirmação da teoria dos germes por Semmelweis (1818-1865), Pasteur (1822-1895) e outros, a sepsis foi redefinida como uma infecção sistêmica, muitas vezes descrita como “envenenamento do sangue” e presume-se ser o resultado da invasão de organismos patogênicos no indivíduo, que em seguida, espalham-se através da corrente sanguínea para outros órgãos. Na época, a teoria dos germes e o advento dos antibióticos não explicaram totalmente a patogênese da sepsis, muitos pacientes com sepsis morriam apesar da bem-sucedida erradicação do agente patogênico. Ao passar do tempo, certos pesquisadores sugeriram que a patogenicidade da doença talvez fosse ocasionada pela resposta inflamatória e não pelo germe.^{21, 22, 23}

Os termos, infecção e sepsis, são geralmente utilizados de forma independente, entretanto, tal hábito acaba simplificando uma relação complexa. A infecção está relacionada à presença do agente agressor em uma localização normalmente estéril, enquanto a sepsis, está relacionado à

manifestação sistêmica do hospedeiro, isto é, a reação inflamatória é desencadeada frente à uma infecção grave.²⁴

A falta de homogeneização conceitual sobre a doença era muito utilizada e por alguns pesquisadores a denominavam síndrome séptica ou septicemia, o que confundia os leitores, quando realizavam análise dos dados epidemiológicos. Diferentes taxas de incidência e de mortalidades eram relatadas em estudos clínicos, no entanto, o mesmo paciente pode ao longo de sua internação, evoluir para diferentes estágios da mesma doença e isso necessita ser classificado através de uma nomenclatura clara e completa. Parte destas disparidades podem ser atribuídas as diferenças e definições utilizadas, levando à necessidade de se criar um consenso sobre a nomenclatura da doença.^{25, 26}

Sabendo disto, a comunidade científica em 1991, *American College of Chest Physicians* (ACCP) e a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM), estabeleceram um conjunto de definições para os diversos estágios da sepse, incluindo sepse grave, choque séptico e disfunções de múltiplos órgãos. Entre as definições, também foi proposto o termo “Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica” (SIRS) para qualquer reação inflamatória secundária a agressões infecciosas ou não. A SIRS pode ser desencadeada por uma grande variedade de condições não infecciosas, tais como trauma, queimaduras, choque hemorrágico ou choque hipovolêmico, pancreatite, e entre outros tipos de doenças.^{27, 28}

Os critérios para sepse foram revisados em 2001 pela Conferência de Consenso para incluir critérios de diagnóstico laboratorial e reconheceram

que não havia um parâmetro único e sim um conjunto de parâmetros clínicos ou laboratoriais que são adequadamente sensíveis ou específicos para diagnosticar a sepse. As manifestações clínicas da sepse e seus estágios são altamente variáveis e incluem febre ou hipotermia, taquicardia, taquipneia, hipotensão, leucocitose ou leucopenia, e alterações em uma série de mediadores inflamatórios, levando a disfunção orgânica e alterações da coagulação (Tabela 1).^{28, 29}

Tabela 1 – Diversos estágios da sepse estabelecidos no consenso de 1991

TERMO	CRITÉRIO
SIRS	É manifestada por duas ou mais das seguintes condições; 1) temperatura > 38°C ou < 36°C; 2) frequência cardíaca > 90 bpm; 3) frequência respiratória > 20 ipm ou pCO ₂ < 32 mmHg; 4) contagem de glóbulos brancos > 12.000/mm ³ ou < 4.000/mm ³ ou bastonetes > 10%.
SEPSE	Resposta inflamatória à infecção, manifestada por duas ou mais das seguintes condições: 1) temperatura > 38°C ou < 36°C; 2) frequência cardíaca > 90 bpm; 3) frequência respiratória > 20 jpm ou pCO ₂ < 32 mmHg; 4) contagem de glóbulos brancos > 12.000/mm ³ ou < 4.000/mm ³ ou bastonetes > 10%.
SEPSE GRAVE	Sepse associada a disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão. Hipotensão e anormalidades da perfusão podem incluir, mas não são limitadas por acidose láctica, oligúria ou uma alteração aguda no estado mental.
HRS	Pressão arterial sistólica < 90 mmHg ou uma redução > 40 mmHg da linha de base, na ausência de outras causas de hipotensão.
CHOQUE SÉPTICO	Sepse relacionada com hipotensão, apesar da adequada reposição volêmica com a presença de anormalidades da perfusão que podem estar associadas à acidose metabólica, oligúria ou alteração aguda do estado mental. Pacientes que recebem agentes inotrópicos ou vasopressores podem não estar hipotensos no momento em que as anormalidades da perfusão são medidas.
SDMO	Presença da alteração na função orgânica em um paciente agudamente enfermo, de modo que a homeostasia não possa ser mantida sem suporte avançado de vida.

Fonte: Adaptado de MAYR, FB et al., 2015

Com uma prevalência anual de mortalidade entre 30 e 50 mortes por 100.000 habitantes, esta condição indica que a doença está entre as 10 principais causas de morte em unidades de terapia intensiva, com um número de casos que ultrapassa 750.000 por ano nos Estados Unidos

(USA) e afeta aproximadamente 19 milhões de pessoas em todo mundo.^{30, 31}

Estima-se que 60% de todos os eventos de sepse e 80% das mortes ocorram em indivíduos com mais de 65 anos. A incidência aumenta exponencialmente com a idade avançada, sendo um dos fatores de risco para a mortalidade entre adultos hospitalizados com sepse (Tabela 2).^{5, 28, 29}

Tabela 2 – Conceito de PIRO

	Clinica	Outros Testes
P (Predisposição)	Idade, Abuso de Álcool, Terapia de Imunossupressivo ou esteroides	Monitoramento Imunológico, Fatores Genéticos
I (Infecção)	Sítio específico (pneumonia, peritonite)	Raio-X, Tomografia Computadorizada, Bacteriologia
R (Resposta)	Mal-estar, temperatura, frequência cardíaca e respiratória	Contagem de leucócitos, Procalcitonina, Tempo de Ativação Parcial de Tromboplastina
O (Disfunção dos Órgãos)	Pressão arterial, Micção, Escala de coma de Glasgow	PaO ₂ /FiO ₂ , Creatinina, Bilirrubina e Plaquetas

Fonte: Adaptado de MAYR, FB. et al., 2015

Os vários estágios da doença na maioria das vezes estão relacionados com as características dos microrganismos, resistência a antibióticos, tal como, a elevada carga de infecção entre outros fatores de virulência. A utilização frequente de antibióticos de amplo espectro em pacientes doentes que permanecem na UTI por períodos mais longos, tem sido um grave problema em diferentes países, gerando a necessidade da implementação de estratégias no controle e prevenção da resistência bacteriana na sepse.^{29, 32}

2.1.1 Fisiopatologia da sepse

A infecção disseminada é provocada por agentes patogênicos que liberam grandes quantidades de endotoxinas. As endotoxinas são

conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e foram identificados há mais de 100 anos atrás, mas foi em 1951 que Borden e Hall, sugeriram que esses componentes bacterianos poderiam ter um papel fundamental no desenvolvimento da sepse e são frequentemente encontrados no sangue de pacientes graves.^{23, 33}

O reconhecimento destas estruturas, lipopolissacarídeos nas bactérias gram-negativas e ácido teicóico ou peptideoglicanos nas bactérias gram-positivas, são feitos através de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs), proteínas quinases e fosfatases, que são expressos em barreiras epiteliais, bem como em células dendríticas e macrófagos. Os receptores de reconhecimento de patógenos denominado de receptores Toll-Like, TREM-1, CD14 e CD18, controlam a propagação de sinal no citoplasma, culminando na transcrição de uma variedade de mediadores inflamatórios.^{25, 34}

Historicamente, foram identificados em humanos 9 homólogos TLRs (*Drosophila Toll*), sendo que os receptores mais importantes são os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6, que são expressos na superfície das células para o reconhecimento de produtos bacterianos, incluindo lipoproteínas bacterianas, ácidos teicóicos (TLR-2 como um heterodímero juntamente com TLR-1 ou TLR-6), lipopolissacarídeos (TLR-4) e flagelina (TLR-5). Os receptores TLRs 3, 7, 8 e 9 são localizados em compartimentos intracelulares e estão associados ao reconhecimento ou detecção de ácidos nucleicos virais, incluindo DNA de cadeia dupla (TLR-3), RNA viral de cadeia simples (TLR-7), ou a citosina não metilada-fosfato-guanina DNA de bactéria

e vírus (TLR-9).^{35, 36}

A estimulação dos TLRs e CD14, resultam na ativação do domínio intracelular ao IRAK-4 (IL-1 receptor-associated kinase), processo facilitado pela proteína de diferenciação mieloide (MyD88). A interação de MyD88 com a enzima IRAK leva a ativação das quinases I κ K α e I κ K β (inibidor de NF- κ B) ligada ao fator de transcrição nuclear NF- κ B (fator nuclear κ B), responsável pela ativação de genes para transcrição de inúmeras citocinas partícipes da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), conforme demonstra Figura 1.^{37, 38}

Figura 1 – Receptores de superfície celular e inúmeras moléculas intracelulares responsáveis pelas ativações de genes para transcrição de citocinas (SIRS)

Fonte: Adaptado de CAVAILLON & CONQUY (2006).

As citocinas são produzidas de forma regulada para modulação da resposta imune. Uma vez expressas, as citocinas TNF- α e IL-1 β levam a uma consequente ativação da resposta imune inata, caracterizada pela produção adicional de outras citocinas efetoras ou imunorreguladoras que aumentam a expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais. A ativação dos monócitos e macrófagos e a intensa ação dos mediadores iniciais acarretam a síntese de IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , MIF e HMGB1 (High mobility group protein box 1), com vários efeitos sinérgicos e antagônicos como uma “tempestade de citocinas”, que ao mesmo tempo, tentam restaurar o equilíbrio na resposta inflamatória. No entanto, marcadores inflamatórios importantes, tais como TNF- α , IL-1 β , ou IL-10, não mostram qualquer padrão consistente na sua expressão gênica e são altamente variáveis em humanos.^{25, 39}

Com todo esse processo complexo e dinâmico, a resposta imune inata atua inicialmente no sentido de contenção dos patógenos. As células fagocitárias (macrófagos, monócitos e granulócitos polimorfonucleares), ativa radicais livres de oxigênio, proteases, hidrolases e a via alternativa do sistema complemento, que são essenciais para a morte das bactérias.^{23, 33}

O neutrófilo é a maior população de células em um indivíduo e possuem um papel fundamental na defesa contra infecções bacterianas, no entanto, a ativação destas células provocam o aumento da permeabilidade vascular, ocasionando edema tecidual. Além disso, as células endoteliais ativadas liberam óxido nítrico, um potente vasodilatador. As células polimorfonucleares a fim de degradarem os patógenos internalizados,

produzem espécies reativas de oxigênio e grande concentração de enzimas proteolíticas que muitas vezes comprometem a microcirculação com hiperatividade endotelial, deposição de fibrina, oclusão vascular e o desenvolvimento de exsudato nos tecidos dificultando ainda mais uma oxigenação adequada (Figura 2).^{40, 41}

Figura 2 – Resumo básico da resposta imunoinflamatória da Sepse

Fonte: Acervo Próprio (2017)

O endotélio vascular contém várias camadas e em condições normais está envolvido em várias funções fisiológicas incluindo a hemostase, integridade vascular, fornecimento de nutrientes e oxigênio para os órgãos.⁴² A extrema ativação do sistema inflamatório na sepse grave é acompanhada por uma estimulação de igual potencial para o sistema de coagulação. Durante a sepse, um conjunto de substâncias no plasma também resultam em danos das células endoteliais, como ativação da trombomodulina, ácido araquidônico, leucotrienos, citocinas, cininas, sistema complemento, fator de

ativação de plaquetas. Fisiologicamente a proteína C (PC) regula os fatores de coagulação do sangue e é o principal mecanismo de feedback negativo. Esta proteína C (PC) é convertida em proteína C ativada (aPC) pela ligação da trombina com o receptor da trombomodulina, que proteoliticamente cliva os fatores de coagulação Va e VIII, inibindo a síntese do fator ativador de plasminogênio 1, que em parte reduz a apoptose, adesão de leucócitos, e a produção de citocinas. Os pacientes com sepse demonstram a diminuição de trombomodulina e a ativação recorrente do TNF- α que pode estar associado com o aumento do fator ativador de plasminogenio 1 (t-PA) e assim prejudicando os fatores anticoagulantes com aparente comprometimento da fibrinólise na sepse e do ponto de vista, resultando na propagação e/ou difusão de trombos na circulação.^{28, 32, 35, 43, 44}

A resposta imune adaptativa quando ativada na sepse é responsável pela amplificação da imunidade inata. Resumidamente, as células apresentadoras de antígenos (APC) desempenham um papel central e predominante na resposta padrão dos linfócitos B e T. Os linfócitos B são responsáveis por produzirem imunoglobulinas que são extremamente importantes para o reconhecimento de antígenos pelas células fagocitárias. As células T diferenciam-se em subtipos especializados de células efectoras, Tipo 1 (Th1) e Tipo 2 (Th2), e promovem diferentes aspectos da resposta imune. As células T helper tipo 1 (Th1), secretam citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, TNF- α e IL-1 β , e ao contrário, as células T helper tipo 2 (Th2) secretam interleucinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10), promovendo com isso um feedback positivo.^{39, 45, 46, 47, 48}

Outro fator importante é a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos e células dendríticas e com isto, estas células estimulam a tolerância imune ao induzir a liberação de citocinas anti-inflamatórias, incluindo a IL-10 e TGF- β , o qual suprime a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Esta potente ligação entre a liberação de IL-10 pela apoptose das células e a imunossupressão na sepse é preditiva de um desfecho fatal em pacientes críticos. Além disso, existem duas principais vias envolvidas na indução de apoptose, uma conhecida como via extrínseca que é mediada pela caspase 8 e a outra conhecida como via intrínseca mediada pela caspase 9. De qualquer forma ambas as vias podem ativar a caspase 3 que é uma importante protease da morte celular programada. Exemplificando, as caspases humanas estão divididas em duas partes funcionalmente de subfamílias distintas, aquelas envolvidas na apoptose (caspase 2, caspase 3, caspase 6, caspase 7, caspase 8, caspase 9, caspase 10) e as relacionadas com a caspase 1, cujo papel principal envolve o processamento de citocinas e regulação inflamatória (caspase 1, caspase 4, caspase 5 e caspase 12). Após a montagem de uma estrutura intracelular induzida pela caspase 1 e caspase 5, o inflamassoma é ativado e é fundamental para a clivagem e ativação de várias citocinas pró-inflamatórias que são os principais mediadores da disfunção orgânica que ocorre durante a endotoxemia. Neste entendimento, a apoptose induzida por septicemia é importante porque pode fornecer uma visão sobre os fatores potenciais que são responsáveis por iniciar a morte celular programada e permitir o desenvolvimento de um alvo terapêutico.⁴⁹

Infelizmente, não há dúvida que o comprometimento da imunidade inata e adaptativa possa contribuir para os resultados adversos na sepse e seus estágios. Enquanto o monitoramento de metas terapêuticas, como a infusão de vasopressores, reposição volêmica, administração de antibióticos, e outros suportes permanecem controversas e empíricas, a susceptibilidade a infecções hospitalares, resistência polimicrobiana, sabidamente tem ocorrido e requerem uma melhor compreensão em seus múltiplos pontos, permitindo com isso, a otimização da mortalidade e a possibilidade de uma chance de uma sobrevida para os pacientes sépticos.^{22, 35, 50, 51}

2.2 Diabetes

2.2.1 Contexto histórico sobre *Diabetes mellitus*

Historicamente a descrição mais antiga da diabetes foi encontrada em um manuscrito egípcio, por volta de 1500 a.C., o “Papiro de Ebers”, onde faziam referência a diurese frequente e abundante, sede incontrolável e emagrecimento acentuado, como suas principais manifestações clínicas.⁵²

Em 276 a.C., na Grécia pela primeira vez Demétrius de Apameia utilizou o termo “diabetes” que significa “sifão”, mas só em 230 a.C., o grego Appolonius de Memphis forneceu uma descrição mais pormenorizada dos sintomas. A primeira descrição clínica completa da diabetes foi feita por um médico grego. Aretaeus da Capadócia no século II d.C., que observou uma excessiva quantidade de urina que passava através dos rins.⁵³

Sushruta e Charaka, médicos indianos, em 400 a 500 d.C., identificaram a doença e classificaram-na como madhumeha ou urina-mel, quando observaram que a urina atraía formigas. Identificaram ainda duas condições distintas, diabetes tipo 1 e tipo 2, sendo que o tipo 1 foi definido como estando associado à juventude (aos mais jovens, crianças e adolescentes) e o tipo 2 que foi definido como associado ao excesso de peso.⁵⁴

Na Pérsia medieval (980-1037 d.C.) Avicenna forneceu um relato detalhado sobre a *Diabetes mellitus* no The Canon of Medicine, descrevendo um apetite anormal e o colapso das funções sexuais, fazendo referência ao sabor doce da urina colhida dos doentes. Tal como Aretaeus antes dele, Avicenna também reconheceu a diabetes primária e secundária, descreveu a gangrena que resulta de feridas mal curadas em indivíduos diabéticos e chegou a formular um tratamento para tratar a diabetes, utilizando para isso uma mistura de Tremoço, Trigonella (feno grego) e sementes de Curcuma zedoaria, que leva a uma redução considerável na excreção de açúcar, sendo um conceito ainda utilizado. Johann Peter Frank (1745-1821), foi quem identificou diferenças entre *Diabetes mellitus* e *Diabetes insipidus*.⁵⁵

Em 1776, Matthew Dobson confirmou que o sabor doce provém de um tipo de açúcar que se encontra em excesso na urina e sangue.⁵⁶ O termo “mellitus” ou “de mel” foi acrescentado pelo britânico John Rolle no fim do século XVIII, para o diferenciar de uma segunda condição conhecida como *Diabetes insipidus*, a qual também está associada uma micção frequente.⁵⁴

Em 1869, Paul Langerhans, estudante de medicina, observou que o pâncreas continha 2 grupos de células, as células acinares, que secretam enzimas digestivas e as agrupadas em ilhas ou ilhotas. A descoberta do papel que o pâncreas desempenhava na diabetes é geralmente atribuída a Joseph von Mering e Oskar Minkowski, que em 1889 descobriram que cães cujo pâncreas tinha sido removido, desenvolviam todos os sintomas e sinais de diabetes e morriam num curto espaço de tempo.⁵⁷

Em 1910, Sir Edward Albert Sharpey-Schafer sugeriu que as pessoas com diabetes tinham deficiência num único produto químico, que normalmente era produzido pelo pâncreas. Designou essa substância de insulina, do latim insula, que significa ilha, e de forma a fazer referência às ilhotas de Langerhans existentes no pâncreas e produtores de insulina.⁵⁸

Entre 1916 e 1920, o fisiologista Nicolas Paulesco fez vários experimentos e descobriu que as injeções de extratos pancreáticos reduziam a glicose e as cetonas urinárias em cães diabéticos. Em 1921, Frederick G. Banting pressupôs que o tecido das ilhotas secretava insulina, mas que o hormônio era destruído por digestão proteolítica, antes ou no decorrer da extração. Juntamente com Charles H. Best, procurou superar o problema ao amarrar os ductos pancreáticos, assim o tecido acinar sofreu degeneração, deixando as ilhotas intactas, então o tecido remanescente foi extraído com etanol e ácido. Com isso Banting e Best obtiveram um extrato pancreático eficaz na redução da concentração sanguínea de glicose em cães diabéticos.⁵⁷

A insulina foi purificada e cristalizada por John Jacob Abel e a

sequência de aminoácidos foi estabelecida por Sanger em 1960 e a elucidação da estrutura tridimensional por Hodgkin e seus colaboradores em 1972. As células beta das ilhotas pancreáticas sintetizam insulina a partir de um precursor de 110 aminoácidos de cadeia simples, denominado pré-pró-insulina. Este é rapidamente clivado para formar a pró-insulina. Nesse ponto, a molécula se dobra e formam-se as pontes de dissulfeto. Na conversão da pró-insulina humana em insulina no complexo de golgi, são removidos 4 aminoácidos básicos e o conector remanescente ou peptídeo C por proteólise. Este hormônio desencadeia um notável conjunto de respostas biológicas, onde, exerce efeitos anabólicos e catabólicos sobre os tecidos, adiposo, fígado e músculos.⁵⁷

A distinção do que hoje entendemos como diabetes do tipo 1 e diabetes do tipo 2, foi estabelecida por Sir Harold Percival (Harry), tendo sido publicada em janeiro de 1936.⁵⁸ Apesar do grande avanço na compreensão do determinismo genético de algumas formas monogênicas de diabetes, como o MODY, a elucidação da predisposição genética das formas mais comuns de DM2 de início mais tardio permanece ainda distante. A constatação de que o DM2 é geneticamente heterogêneo implica que deva haver inúmeros defeitos primários que contribuem a susceptibilidade para a doença.⁵⁹

Atualmente, a classificação do *Diabetes mellitus* contempla quatro grandes grupos bem conhecidos: (a) diabetes tipo 1 (DM1), (b) tipo 2 (DM2), (c) diabetes gestacional, (d) outros tipos específicos de diabetes. No entanto, com base em observações clínicas, genéticas e estudos

moleculares realizada em populações miscigenadas, como as da América Latina, cabe lembrar que esta classificação nem sempre é adequada, onde “fenótipos nem sempre refletem genótipos”.⁶⁰

2.2.2 Diabetes tipo 1

O diabetes tipo 1 é uma doença crônica e progressiva com a destruição seletiva das células beta pancreáticas secretoras de insulina, ocorrendo a incapacidade na manutenção da homeostase da glicose, usualmente por um processo autoimune (forma autoimune: tipo 1A) ou menos comumente de causa desconhecida (forma idiopática: tipo 1B). A natureza poligênica da diabetes (mais de 40 loci foram associados com a susceptibilidade à doença ou resistência) e combinado com associações ambientais e compreende um grupo heterogêneo de doenças que apresentam abruptamente alterações estruturais em diversos sistemas orgânicos, incluindo micro angiopatia (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macro angiopatia (doença coronariana, insuficiência arterial periférica, entre outras). O pico de incidência global da diabetes do tipo 1 é de 3% ao ano, e ocorre de forma presente em 5% a 10% dos casos de diabetes, entre aos 10/14 anos de idade. Estatisticamente há uma diminuição progressiva da doença em indivíduos acima de 15 anos, de tal maneira que casos de diabetes do tipo 1 após 35 anos são pouco frequentes.^{6, 61, 62, 63, 64, 65}

A deficiência de insulina leva ao aumento da gliconeogênese e lipólise, elevando o nível de ácidos graxos livres e corpos cetônicos, resultando em cetoacidose. A cetoacidose é uma emergência

endocrinológica e ocorre principalmente em pacientes com DM (tipo 1), sendo em diversas vezes, a primeira manifestação da doença decorrente da deficiência absoluta ou relativa de insulina. Os principais fatores precipitantes são as infecções, má aderência ao tratamento (omissão da aplicação de insulina, abuso alimentar) ou uso de medicamentos hiperglicemiantes e outras intercorrências graves, tal como o acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio ou trauma. Indivíduos com excesso de glicose no sangue e falta de controle glicêmico são particularmente vulneráveis a essas complicações. Os principais sintomas são; polidipsia, poliúria, enurese, hálito cetônico, fadiga, visão turva, náuseas e dor abdominal, além de vômitos, desidratação, hiperventilação e alterações do estado mental. Todo esse quadro pode agravar, levando a complicações como choque, distúrbio hidroeletrólítico, insuficiência renal, pneumonia de aspiração, síndrome da angústia respiratória e edema cerebral em crianças.^{7, 66}

O diagnóstico bioquímico é realizado através do teste glicêmico, hemoglobina glicada, entre outros. Uma ampla variedade de marcadores metabólicos tem sido estudada, como por exemplo, os anticorpos anticélulas das ilhotas (I-CAs), antiinsulina (IAAs), antiácido glutâmico descarboxilase (GAD-65) e antitirosina fosfatases (IA-2 e IA-2B). Geralmente, pelo menos um desses marcadores estão presentes em 85-90% dos indivíduos com hiperglicemia de jejum. A importância de um diagnóstico precoce e o controle glicêmico destes pacientes demonstram a longo prazo, uma menor incidência das complicações diabéticas. Estudos prospectivos desenvolvidos

em grande escala pelos grupos, “The Diabetes Control and Complications” (DCCT) e “UK Prospective Diabetes Study”, comprovaram esta relação sobre pacientes submetidos ao tratamento intensivo por um período médio de 6,5 anos, onde obtiveram a diminuição das complicações micro e macrovasculares. O conceito de memória metabólica, define que estas complicações estão ligadas ao estresse oxidativo e produtos de glicação avançada, e comprovam essa teoria quanto aos efeitos da inflamação crônica dos pacientes não tratados intensivamente e demonstram o impacto substancial representada na expectativa de vidas destes pacientes.^{63, 67}

2.2.3 Fisiopatologia da Diabetes

A glicose presente no compartimento extracelular é transportada para o compartimento intracelular por difusão facilitada, mediante a ação dos transportadores de glicose, especialmente GLUTs 1 e 4. Uma vez dentro da célula a glicose é metabolizada por glicólise. O GLUT 1 é super expresso em condições de altas concentrações extracelulares de glicose e hipóxia, e o aumento de fluxo glicolítico resulta em aumento da síntese da diacilglicerol (DAG). Vários mecanismos bioquímicos têm sido propostos para explicar anormalidades estruturais e funcionais associadas com a exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia, no entanto, alterações redox causadas pelo aumento do fluxo na via do sorbitol, como o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), hiperglicemia-induzida, podem ser responsáveis por todas as outras alterações bioquímicas. O aumento do fluxo pela via dos polióis induzido pelo aumento

de ROS determina maior conversão a frutose, resultando em aumento da relação $\text{NADH}^+ : \text{NAD}^+$, o que aumentaria a síntese de novo de diacilglicerol com ativação da PKC. Por fim, a formação de produtos avançados de glicosilação não enzimática (AGEs), induzida pela hiperglicemia crônica, além de causar dano tecidual direto, também pode aumentar a formação de ROS (Figura 3).⁶⁸

Figura 3 – Mecanismo unificador da lesão celular produzido pela hiperglicemia nas vias dos polióis, hexosaminas, AGEs e PKC (A – aumento da síntese da membrana basal, oclusão capilar e glomeruloesclerose, B – aumento da disfunção endotelial, C – aumento da permeabilidade e angiogênese)

Fonte: Adaptado de Michael A. Brownlee (2005).

Em termos imunológicos de potenciais mecanismos patogênicos têm sido sugeridos que os eventos iniciais putativos da doença podem ocorrer durante a organogênese e são associados fortemente com o lócus HLA

localizado no cromossomo 6p21 e seriam auto reativos para a especificidade dos linfócitos T ou por viroses (Coxsackie B, Rubéola e Caxumba) que podem infectar diretamente e lisar as células beta. A infecção viral também pode contribuir indiretamente através do aumento de expressão de MHC de classe 1 em linfócitos B e na produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente de interferons do tipo 1, IL-8 e a quimiocina CCL5. A ativação das células do sistema imune com maior significância e o influxo nos nódulos linfáticos do pâncreas são mediadas pelas células linfocitárias do tipo T CD4+, células T CD8+, Linfócitos B (CD20+), Natural Killer (NK), seguido por Macrófagos (CD68+), e células plasmáticas (CD138+).^{64, 65}

Durante a progressão da diabetes as células NK interagem com outras células imunes para a secreção de enzimas lisossômicas e espécies reativas de oxigênio, bem como, citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α e IL-17, os quais promovem a expansão das células Th17, linfócitos B, células T CD4+ e T CD8+, levando a infiltração destas células nas ilhotas pancreáticas. Porém alguns estudos mencionam que as células T CD8+ citotóxicas são as principais células efetoras na destruição das células beta. Dois mecanismos celulares de destruição das células beta pancreáticas foram descritos, o mecanismo associado ao reconhecimento e o mecanismo associado à ativação. No primeiro mecanismo, a célula T CD8+ é ativada diretamente pelo reconhecimento de antígenos das células beta apresentadas por moléculas de MHC de classe 1 presentes nas próprias células beta pancreáticas. A ativação das células T CD8+ consequentemente provoca a morte das células beta por contato célula-célula através das vias

de sinalização por Fas/FasL ou perforina/granzima. De acordo com o segundo mecanismo, as células T CD4+ ou T CD8+ reconhecem antígenos das células beta indiretamente, apresentados por APCs (células dendríticas ou macrófagos) e eleva a morte destas células através da ativação das células citotóxicas, refletindo diretamente nas injúrias teciduais.^{64, 69}

Estratégias para compreender a resposta imune inata e adaptativa e o papel das células beta na patogênese do diabetes do tipo 1 e suas complicações vem sendo estudadas exaustivamente e o entendimento mais detalhado da doença culminará com estratégias terapêuticas cada vez mais efetivas.^{63, 65}

2.2.4 Insulinoterapia

A insulinoterapia intensificada é imprescindível no tratamento do DM1 e deve ser instituído assim que o diagnóstico for realizado com o objetivo de alcançar um estado de euglicemia, principalmente quando os níveis de glicose estiverem acima de 300mg/dL (plasma), acompanhado de perda de peso, cetonúria e cetonemia. O clássico estudo prospectivo Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) demonstrou que o tratamento intensivo do DM1, com três ou mais doses diárias de insulina de ações diferentes, é eficaz em reduzir a frequência de complicações crônicas do DM, pois levou à diminuição de 76% dos casos de retinopatia, 60% de neuropatia e 39% de nefropatia nos pacientes tratados intensivamente em relação aos tratados convencionalmente.^{70, 71}

O tratamento intensivo pode ser realizado com a aplicação de

múltiplas doses de insulina com diferentes tipos de ação, com seringa, caneta ou sistema de infusão contínua de insulina. O tratamento com múltiplas doses de insulina tornou-se bastante prático após o surgimento das canetas, hoje apresentadas em vários modelos, até mesmo com possibilidade de usar doses 0,5 (meia) unidade de insulina e com comprimentos diferentes de agulhas (4, 5, 6, 8 e 12 mm).⁷² A dose diária total de insulina preconizada em indivíduos com DM1 com diagnóstico recente ou logo após diagnóstico de cetoacidose diabética varia de 0,5 a 1 U/kg por dia. Entretanto, alguns casos requerem doses maiores de insulina para a recuperação e equilíbrio metabólico. Essa dose diária depende da idade, peso corporal, estágio puberal, intensidade de atividades físicas e de outras intercorrências.⁷³

Os análogos de insulina de ação ultrarrápida são indicados aos pacientes que apresentam tendência a terem hipoglicemia nos períodos pós-prandiais tardios e noturnos. Atualmente estão disponíveis três análogos de insulina de ação ultrarrápida: Lispro, Asparte e Glulisina. A insulina Lispro apresenta uma inversão nas posições dos aminoácidos Lisina (B29) e Prolina (B28) da cadeia beta da insulina, o que lhe confere absorção mais rápida para a circulação. Na insulina Asparte, substitui-se um aminoácido Prolina por ácido Aspártico carregado negativamente na posição 28 da cadeia beta, produzindo repulsão elétrica entre as moléculas de insulina e reduzindo sua tendência à auto associação; em frascos ou cartuchos, encontra-se na forma de hexâmeros, mas com rápida dissociação em dímeros e monômeros no tecido subcutâneo, garantindo rápida absorção. A

insulina Glulisina é outro análogo de insulina de ação ultrarrápida obtido pela troca de asparaginase por Lisina na posição 3 da cadeia beta e de Lisina por ácido Glutâmico na posição 29 da mesma cadeia. Os estudos com o análogo de insulina Glulisina demonstraram resultados semelhantes na redução dos eventos hipoglicêmicos e na eficácia quando comparado à Lispro e à Asparte. Sugere-se que a insulina NPH (Neutral Protamine Hagedorn) seja aplicada antes do café da manhã, do almoço, do jantar e de dormir. O fato desses análogos apresentarem um perfil mais estável, menor variabilidade glicêmica, não necessitarem de homogeneização, torna-os uma administração mais flexível.⁷⁴

2.2.5 Diabetes na sepse

Em 1904, Lassar sugeriu que o nível elevado de glicose em pacientes sépticos poderia levar a infecção, servindo-o como fonte de nutrientes para bactérias. Hadmann em 1911 mostrou que a hiperglicemia não aumentava o crescimento bacteriano e propôs um defeito na função imunológica.¹² Outro estudo postulou que a inativação dos componentes imunológicos estava associada as ligações cruzadas dos produtos finais da glicação avançada, permitindo a esses pacientes uma maior vulnerabilidade a infecção. Com o objetivo de demonstrarem essa variabilidade imunológica, uma série de estudos foram propostos por outros pesquisadores no decorrer do tempo e importantes alterações foram associadas as funções da imunidade inata e adaptativa com consequente redução das células PMN, incluindo a redução da aderência endotelial, quimiotaxia, fagocitose e morte bacteriana.^{75, 76, 77}

As evidências sugerem que a hiperglicemia está relacionada positivamente com o aumento de espécies reativas de oxigênio, causando danos teciduais e reduzindo a perfusão tecidual. Testes preliminares indicam falhas na ativação do NF- κ B, que é um importante modulador da transcrição e mediador inflamatório relacionado com a disfunção de vários sistemas. Esta falha pode ser justificada pela reduzida fosforilação da proteína inibidora I κ B- α e a subunidade p65, que é responsável pela transcrição do gene e dos níveis circulantes e potencial de ação da MIF (Fator inibitório de Macrófago). A sinalização através de TLRs requerem a molécula adaptadora MyD88 para serem acoplado ao receptor. Os macrófagos alveolares de animais diabéticos expressam mais RNAm para SOCS-1 que é um inibidor de MyD88. Essa expressão (SOCS-1) é um fator importante, porque diminui a transdução de sinal mediada pelos TLRs, ativação de NF- κ B e a transcrição de genes inflamatórias.^{21, 75, 78}

As complexas interações celulares que ocorrem durante a sepse nesses pacientes requerem uma resposta eficiente, porém as disfunções no metabolismo de diabéticos são evidentes na resposta inata. Pacientes com diabetes internados com infecções bacterianas demonstram uma dessensibilização para o receptor da quimiocina CXCR2 e isto pode estar associado a prejuízos na migração de neutrófilos para o foco da infecção podendo levar o paciente séptico a morte. Alguns estudos justificam que existem prejuízos na ativação de genes ligados a regulação da Proteína Quinase B (PKB), isso poderia ser o principal problema no mecanismo que modula a expressão da CXCR2 acoplado ao receptor da Proteína Quinase-

2-G (GRK2) em células polimornucleares.^{13, 15, 18, 79}

Os pacientes diabéticos com sepse demonstram desregulação entre citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias produzida pelo aumento dos níveis de glicose transitória, assim como, menores concentrações circulantes de anticorpos IgG e IgM, sendo proposto nestes casos a correção com a normoglicemia.^{17, 18} Estudos *in vivo*, indicam que ratos diabéticos induzidos por aloxana possuíam menores níveis de *RNAm* para IL-1 β e TNF- α nos pulmões e em linfonodos mesentéricos, quando comparados com animais controles, 6 horas após a instilação de LPS. Após o tratamento desses animais com insulina, a expressão desses genes de citocinas foram restauradas aos níveis dos animais não-diabéticos, além disso, foram demonstrados que a hiperglicemia reduz fortemente a atividade fibrinolítica induzida pela inflamação devido a uma exagerada indução de pAI-1 (plasminogen activator inhibitor type 1).^{80, 81}

A compreensão celular e molecular incompleta de como a insulina regula a imunidade na sepse tem em parte promovido incertezas sobre a viabilidade de um controle da glicose em doentes críticos. O fato é que o risco de um diabético evoluir para sepse é maior quando se compara com um paciente não diabético. A questão é saber se a hiperglicemia durante a evolução das infecções agudas, estão associadas aos piores desfechos clínicos desses pacientes em unidades de terapia intensiva.^{17, 82, 83} Por fim, o mecanismo da imunodeficiência e a suscetibilidade para o desenvolvimento de sepse nos pacientes com diabetes ainda necessitam de maiores elucidações.^{12, 84}

2.2.6 Lipídeos

Os lipídeos nos humanos exibem uma imensa diversidade combinatória e estrutural e desempenham um papel biológico essencial na sinalização, organização e deslocamento celular. O estresse oxidativo associado com altas doses de ácidos graxos livre no plasma, parece ser o principal problema no metabolismo, causando necrose, edema celular, e com a perda da integridade da membrana, segundo alguns estudos. A acumulação excessiva e a concentração de metabólitos lipídicos intracelulares, como por exemplo, o diacilglicerol e espécies de ceramidas acabam também tendo seu papel na patogênese, o qual suprimem a atividade da insulina intracelular e compromete a fosforilação da PI3k e Akt2. Todo esse mecanismo de ação resulta em prejuízo na síntese do glicogênio, o que contribui para causas fisiopatológicas subjacentes no metabolismo dos lipídeos. Assim, as propriedades tipicamente heterogêneas dos lipídeos e suas isoformas determinam o grau da disfunção no metabolismo dos diabéticos, e são representadas por interações físico-químicas, pela regulação de vários genes e síntese proteica, sendo cruciais na patogênese de inúmeras doenças.^{19, 20, 85, 86}

Neste contexto, acredita-se que algumas lipoproteínas de forma ubíqua, seja um potencial marcador para diversas doenças por causa da sua diversidade na homeostase metabólica. Deste modo, destacamos em nosso estudo preliminar (*PCR-array*), a atividade sistêmica de várias lipoproteínas nos grupos controle, diabetes, sepse e diabetes com sepse. Após o cálculo

comparativo, *Mann Whitney* não paramétrico entre os grupos sepse e diabetes com sepse, foram excluídos do estudo 96.24% das lipoproteínas. Analisamos então, o perfil lipídico correspondente (3.76%) das lipoproteínas selecionadas, Fabp4, Fabp7, Gk e Acat2 com os grupos sepse e diabetes com sepse, demonstrando os efeitos específicos que possam estar ligado positivamente com o estresse endócrino metabólico e demais condições clínicas levantadas em pacientes críticos. A seguir, destacamos um breve histórico fisiometabólico das características de cada uma das lipoproteínas selecionadas:

- a) Fabps: As Fabps representam 1-5% das proteínas citosólicas e são moléculas chaperonas intra e extracelular com um peso molecular de 12-15 kDA que se ligam a ácidos graxos de cadeia longa saturado ou insaturado, eicosanoides e outros lipídeos de alta afinidade. Foi descoberto em 1972, nas espécies *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*, camundongos e humanos, demonstrando uma forte conservação evolutiva. Existem pelo menos 9 isoformas de Fabps identificados até o momento (L-FABP/FABP1, I-FABP/FABP2, H-FABP/FABP3, FABP4/aP2, E-FABP/FABP5, IL-FABP/FABP6, B-FABP/FABP7, M-FABP/FABP8, T-FABP/FABP9) com inúmeras atividades nas células, tais como, transporte e armazenamento de lipídeos, síntese de membrana, enzimas, etc. Diversos estudos foram postulados sobre o complexo papel das Fabps promovendo uma infinidade de questões correlacionada ao metabolismo bioquímico dos lipídeos

em pacientes críticos.^{87, 88, 89}

- b) Fabp4: A Fabp4 (aP2) tem um peso molecular de 15kDa, o gene está localizado no cromossomo 8q21 e representa cerca de 6% de todas as Fabps (Figura 4). A sua atividade esta relacionada ao transporte de ácidos graxos em associação com a lipólise e paralelamente é regulada pela fração de receptores ativados por proliferação de peroxissomas gama (PPAR γ) e pela via não clássica, adenilil ciclase/proteína quinase A e sinalização de guanilil ciclase/proteína quinase G, sendo altamente expressa em adipócitos e macrófagos. O nível exarcebado deste peptídeo tem sido correlacionada com múltiplas patologias e vários estudos tem direcionado esta adipocina como possível marcador biológico para doenças, como a síndrome metabólica, diabetes, aterosclerose, hipertensão e cardiopatia. Recentemente foram observados também o oposto, sendo que a deficiência de FABP4 no indivíduo leva a supressão de macrófagos e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-12 e IL-6), consistindo indiretamente na deficiência da resposta imune adaptativa.^{87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96}

Figura 4 - Estrutura tridimensional por cristalografia de Raio X da Fabp4

Fonte: RCSB Protein Data Bank (2017)

c) Fabp7: A Fabp7 (B-Fabp) é um outro membro das Fabps altamente expressa em cérebro embrionário e o gene está localizada no cromossomo 6q22-q23 (Figura 5). Na fase neonal e adulto a Fabp7 diminui drasticamente no cérebro e sua principal função é a captação e transporte de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), como por exemplo, o ácido docosahexaenóico (DHA) responsável pelo neurodesenvolvimento. A expressão desordenada desta chaperona em células gliais (gliais radiais e astrócitos) tem sido amplamente estudada na diferenciação e crescimento celular, principalmente durante o desenvolvimento de tumores malignos de alto grau e também utilizada como biomarcador. Os gliomas representam 70% dos tumores primários

malignos do sistema nervoso central, e são conhecidos como glioblastoma multiforme (astrocitoma de grau 4) e astrocitoma anaplásico (astrocitoma de grau 3), em geral associados ao mal prognóstico. Para outros efeitos patológicos, pouco se sabe sobre a expressão da Fabp7, considerando seu papel sistêmico pouco incerto.^{94, 97, 98, 99, 100}

Figura 5 - Estrutura tridimensional por cristalografia de Raio X da Fabp7

Fonte: RCSB Protein Data Bank (2017)

- d) GCK: A glicoquinase (Figura 6) é uma isoenzima hexoquinase relacionado com outras três hexoquinase homologas da via clássica do metabolismo da glicose, que funcionalmente catalisa a fosforilação da glicose à glicose-6-fosfato para a síntese do glicogênio e da glicólise. É conhecida pela capacidade de atuar

como sensor dos níveis de glicose dentro das células, na formação do triacilglicerol e está presente nas células hepáticas, pâncreas, intestino e cérebro. A mutação do gene ligado a glicoquinase está associada em geral a diabetes do tipo 2 e ao subtipo autossômico de diabetes conhecida como MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*).^{101, 102, 103, 104}

Figura 6 - Estrutura tridimensional por cristalografia de Raio X da Glicoquinase (Gk)

Fonte: RCSB Protein Data Bank (2017)

- e) Acat2: A enzima alostérica Acetil-CoA acetiltransferase também conhecida como esterol O-aciltransferases (SOATs) é subdividida em isoformas, Acat1 e Acat2. O gene do Acat2 é expresso no cromossomo 12 e tem um peso molecular de 46 kDa (Figura 7). É uma proteína integral localizada na região do retículo

endoplasmático e sua principal função é a conversão do colesterol livre intracelular em esteres de colesterol, auxiliando no transporte de quilomícron e como reguladores biológicos (hormônios esteroides). O Acat1 é expresso de forma ubíqua em todos os tecidos, enquanto que o Acat2 é expresso em maior proporção nos hepatócitos e intestino delgado. A inibição de Acat2 diminui a formação de VLDL, LDL, e isso tem sido considerada como uma forma terapêutica para a redução de lipídeos e prevenção da aterosclerose.^{105, 106, 107, 108, 109}

Figura 7 - Estrutura tridimensional por cristalografia de Raio X da Acat2
Fonte: The European Bioinformatics (2017)

3. Objetivos

3 OBJETIVOS

- 1) O nosso objetivo foi extrair dos ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), células leucocitárias, plasmas e tecidos dos respectivos grupos; controle, sepse (CLP), diabetes e diabetes induzidos a sepse (DM/CLP).
- 2) Analisar a expressão do *RNAm* de 96 lipoproteínas em células do tecido adiposo, músculos, fígado e leucócitos, através da reação em cadeia de polimerase (*RT-PCR*).
- 3) Avaliar a concentração da lipoproteína Fabp4 e Fabp7 no plasma através do ensaio imuno-enzimático (*ELISA*).
- 4) Avaliar a curva de mortalidade em 48 horas dos grupos, diabetes e diabetes com sepse.
- 5) Desse modo, pretendemos proporcionar uma visão mais ampla do status bioquímico que estão relacionadas as alterações imunoinflamatórias em diferentes estágios da doença em questão, permitindo assim, alavancar a inclusão de novos biomarcadores de potencial importância na prática clínica para pacientes diabéticos com sepse.

4. Métodos

4 MÉTODOS

4.1 Animais

Seguindo os princípios éticos de experimentação e uso animal, o estudo foi submetido em conformidade à aprovação pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP), conforme protocolo de pesquisa nº 140/14 (Anexo). Os animais (*Rattus norvegicus*) utilizados tinham aproximadamente 8 semanas, com peso entre 200g à 250g. Os grupos foram divididos em animais Controles (N=6), Diabéticos (N=6), Sepses induzido por CLP (N=6), Diabéticos com Sepses (N=6) e Curva de Mortalidade (N=20).

4.2 Indução da Diabetes (DM1): Alloxan

Para indução química da diabetes, os animais foram mantidos em jejum sólido por 12 horas. Após este período foram realizadas a pesagem e dosagem da glicemia de cada animal na pré-indução. A solução de aloxana monoidratada (*Sigma-Aldrich Inc, St Louis, MO, USA*) foi preparada minutos antes da aplicação por meio da diluição equivalente do fármaco em solução salina 0,9%. Os animais foram anestesiados por isoflurano (*Cristália®*) e receberam dose única de 42mg/Kg de aloxana via intraperitoneal. Uma hora e meia depois, a alimentação foi reintroduzida aos animais. Dez dias após a indução, os animais foram submetidos a uma nova avaliação, peso e nível de glicemia. O nível de glicose foi monitorado por meio do glicosímetro

comercial OneTouch Ultra (*Johnson & Johnson®*) e aqueles animais que obtiveram a glicemia superior à 200mg/dL foram considerados diabéticos.

4.3 Modelo de punção e ligadura cecal (CLP)

Os animais foram anestesiados por via intraperitoniana com 80mg/Kg de cloridrato de ketamina (*Ketalar®, Parker-Davis*), associado com 10mg/Kg de cloridrato de xilazina (*Rompun®, Bayer*). A incisão feita foi de aproximadamente 2 cm em linha mediana, o suficiente para se exteriorizar o ceco. A ligadura cecal foi feita com fio de náilon 4.0 sem causar a obstrução do intestino. Para cada animal foram realizadas duas punções distalmente à ligadura com uma agulha 22 gauge, e o local foi comprimido no intuito de se testar a patência das punções. Os abdômens dos ratos foram suturados em planos e mantidos no biotério em temperatura ambiente com água e comida *Ad libitum*. A coleta das amostras sanguíneas, tecido adiposo, fígado e músculos foram feitas após 8 horas do procedimento cirúrgico e armazenados em biobanco à 80°C negativo.

4.4 Extração de RNA

4.4.1 Leucócitos

Os tubos falcon (15mL) com o sangue, sem o plasma, foram completados com 8mL de solução hipertônica (lise pH7,4). Os tubos foram homogeneizados com uma pipeta Pasteur descartável e permaneceram por 10 minutos no gelo e foram centrifugados por 5 minutos (12000 rpm) à 4°C.

O sobrenadante foi desprezado e o pellet das amostras foram homogeneizados com 1mL da solução hipertônica. Em seguida, foram transferidos separadamente para tubos eppendorfs de 1mL e permaneceram por 10 minutos no gelo e foram centrifugados novamente por 5 minutos (12000 rpm) à 4°C. O sobrenadante foi desprezado, os pellets foram homogeneizados com a solução de hipertônica e centrifugados de novo por 5 minutos (12000 rpm). Feito isto, retirou-se o sobrenadante dos eppendorfs e adicionou-se 1mL de PBS (phosphate buffered saline) nos pellets preservados, e depois, foram armazenados no biobanco à 80°C negativo.

4.4.2 Purificação do RNA Total nos leucócitos (*Quick-Start/QIAGEN*)

Para a purificação do RNA total das amostras de leucócitos foram adicionados 50µL de DEPC (etanol 70% gelado, preparado com 30% de água), 20µL de acetato de sódio (3 Mol.) e 150µL de isopropanol gelado. Permaneceram por 30 minutos no freezer à 20°C negativo, e foram centrifugadas por 10 minutos (12000 rpm) à 4°C. O sobrenadante dos microtubos foram desprezados e vertidos em papel toalha por 10 minutos (secar). Todas as amostras foram ressuspendidas com 15µL de DEPC. Adicionados 600µL de tampão RLT (quite) em cada amostra e homogeneizados com uma seringa até a diluição do pellet. Adicionou-se mais 600µL de etanol 70% e com uma pipeta foram homogeneizados. Do conteúdo total, foram transferidos 600µL do RNA de cada amostra para a coluna *RNeasy Mini Spin* e centrifugados a 10.000 rpm por 30 segundos à 25°C. O volume sob a coluna *RNeasy Mini Spin* foram desprezados e o

restante das amostras dos eppendorfs (600µL) foram transferidos para as colunas e novamente, centrifugados e desprezados. Foi adicionado dentro da coluna 700µL do tampão RW1 (quite) e por 30 segundo foram centrifugados (10.000 rpm) à 25°C e posterior o volume abaixo das colunas foram desprezados. Adicionou-se nas colunas 500µL do tampão RPE (quite) e centrifugou-se (10.000 rpm) por 2 minutos à 25°C. Desprezou-se o volume sob as colunas *RNeasy Mini Spin*, e as colunas foram acondicionadas dentro de eppendorfs contendo 50µL de água sem RNase (*RNase Free*). As amostras foram centrifugadas por 1 minuto (10.000 rpm) à 25°C e dos eppendorfs foram retiradas 50µL do volume de RNA total, que foram recolocadas novamente na coluna e centrifugadas (10.000 rpm). Após estes procedimentos as amostras foram acondicionadas no biobanco 80°C negativo.

4.4.3 Tecidos (miócitos, adipócitos e hepatócitos)

Os tubos contendo os órgãos foram macerados e separados por grupos em microtubos 2mL. Adicionou-se em cada microtubo com tecido, 1mL de trizol. Em seguida, utilizou-se o vortex por 15 segundos e incubou-se por 5 minutos à 25°C. Adicionou-se nos tubos, 200µL de clorofórmio e novamente utilizou-se o vortex para misturar o volume e permaneceram incubados à 25°C por 3 minutos. Centrifugou-se as amostras por 15 minutos (12.000 rpm) à 4°C. Transferiu-se o sobrenadante (fase incolor) dos tubos para os eppendorfs com 500µL de isopropanol gelado, em seguida, incubando-se por 10 minutos à 25°C. Verteu-se por várias vezes e posterior

centrifugou-se por 10 minutos (12.000 rpm) a 4⁰C. O sobrenadante dos tubos foram desprezados e adicionado 1mL de DEPC (etanol 70% gelado, preparado com 30% de água). Os tubos foram homogeneizados e centrifugados por 10 minutos (12000 rpm) à 4⁰C e novamente o sobrenadante dos tubos foram desprezados. Os tubos eppendorfs permaneceram por 5 minutos vertidos em papel toalha. As amostras foram ressuspensas com 50µL de DEPC e armazenados no biobanco à 80⁰C negativo.

4.5 Preparação para o PCR

Os tubos contendo as amostras foram descongeladas e adicionados 4µL de DNase (Qiagen) por 10 minutos à 25⁰C (temperatura ambiente). Adicionou-se 1µL de EDTA (25nm) e incubou-se por 10 minutos à 69⁰C. Após este procedimento as amostras permaneceram no gelo e foram quantificados em ng/mL (Concentração/Razão) pelo aparelho espectrofotômetro Nanovue.

4.6 Reação em Cadeia da polimerase em tempo real (*RT-PCR*)

Os RNAs totais dos leucócitos foram distribuídos isoladamente em placas de *RT-PCR* juntamente com o MIX do quite comercial RNeasy previamente preparada (7,5µL do Syber Green, 0,3µL do Super Scrip, 0,3µL do Primer 1 (reverse) e Primer 2 (forward) específico, 0,15µL do ROX e 1,45µL de H₂O para cada amostra). Para cada poço da placa foram adicionadas 5µL de cada amostra e 10µL do MIX (*RT² RNA QC PCR-array*

and Primer Assays) preparada para quantificação da expressão dos genes lipídicos, conforme especificações do fabricante (QiAGEN). As reações semiquantitativas das placas foram feitas através do termociclador da marca Step One Plus RT-PCR AB (Applied Biosystems) à uma temperatura de 56°C, e posteriormente validados em um banco de dados do fabricante (PARN 0072C-24). O cálculo sobre a relação dos grupos foi através do método comparativo de Ct e $\Delta\Delta Ct$.

Após análise dos cálculos de estatística dos 94 genes (Figura 8) expresso em leucócitos por *PCR-array*, isolamos os genes de interesse (Acat2, Fabp4, Fabp7 e Gk) para uma nova amplificação de *PCR* convencional nos demais tecidos.

Acaa1, Acaa2, Acad10, Acad11, Acad9, Acadl, Acadm, Acads, Acadsb, Acadvl, Acat1, **Acat2**, Acot12, Acot2, Acot3, Acot7, Acot8, Acot9, Acox1, Acox2, Acox3, Acsbg1, Acsbg2, Acs11, Acs13, Acs14, Acs15, Acs16, Acsm2a, Acsm3, Acsm4, Acsm5, Aldh2, Bdh1, Bdh2, Cpt1a, Cpt1b, Cpt1c, Cpt2, Crat, Crot, Decr1, Decr2, Echs1, Eci2, Ehhadh, Fabp1, Fabp2, Fabp3, **Fabp4**, Fabp5, Fabp6, **Fabp7**, Gcdh, **Gk**, Gk2, Gpd1, Gpd2, Hadha, Hmgcl, Hmgcs1, Hmgcs2, Lipe, Lpl, Mcee, Mut, Oxct2a, Pecr, Ppa1, Prkaa1, Prkaa2, Prkab1, Prkab2, Prkaca, Prkacb, Prkag1, Prkag2, Prkag3, Slc27a1, Slc27a2, Slc27a3, Slc27a4, Slc27a5, Slc27a6, Actb, B2m, Hprt1, Ldha, Rplp1, RGDC, RTC, RTC, RTC, PPC, PPC, PPC.

Figura 8 – 94 genes expressos em *PCR-array* para o perfil lipídico (QiAGEN)

No segundo teste de PCR, utilizamos os mesmos parâmetros metodológicos supracitado na primeira análise, porém com os genes de interesse para cada placa. As concentrações especificadas pelo fabricante (QiAGEN) foram de 5µL do *RNA total* de cada amostra (tecido adiposo, fígado e músculo) e 10µL do MIX específico. As temperaturas variaram no termociclador entre 56°C à 57°C de acordo com o tecido ou gene, conforme

descrito em Tabela 3.

Tabela 3 – Variação de temperatura nas reações de PCR

	Adipócitos	Hepatócitos	Miócitos
Fabp4	57 ⁰ C	57 ⁰ C	57 ⁰ C
Fabp7	56 ⁰ C	56 ⁰ C	56 ⁰ C
Gk	56 ⁰ C	56 ⁰ C	56 ⁰ C
Acat2	57 ⁰ C	57 ⁰ C	57 ⁰ C
Housekeeping		Rplp1	57 ⁰ C

4.7 Ensaio Imuno-enzimático (ELISA)

Fabp4: Foram utilizados os genes recombinante de Fabp4 (Nº MBS2516252) do fabricante *ELISAKit/MyBioSource*. Na microplaca de ELISA foram adicionados 100µL do diluente padrão e 100µL do plasma de cada amostra. A curva padrão do Fabp4 foi reconstituída em concentrações (Standard); 50ng/mL, 25ng/mL, 12,5ng/mL, 6,25ng/mL, 3,125ng/mL, 1,563ng/mL, 0,781ng/mL, 0 ng/mL. A placa foi selada e permaneceu por 90 minutos incubada à 37⁰C e após este período foi removido todo o volume da placa (sem lavar). Imediatamente foi adicionado 100µL da solução “biotinylated detection Ab” em cada poço e novamente permaneceu incubada à 37⁰C por 1 hora.

O volume total inserido na placa foi aspirado e lavado com uma pipeta multicanal por três vezes (350µL de tampão de lavagem). Sem o volume, a placa foi vertida sobre um papel absorvente. Em seguida, foi adicionado em cada poço da placa 100µL da solução HRP conjugada, selando-se com adesivo e incubando-se por mais 30 minutos à 37⁰C.

Repetiu-se o procedimento da lavagem por mais 5 vezes e adicionou-se 90µL do reagente de substrato em cada poço da placa. Neste momento,

a placa foi selada com adesivo e incubada por 20 minutos à 37°C, sob a proteção da luz. A solução de parada (Stop solution) foi adicionada em seguida em cada poço da placa e mensurada por densidade óptica em filtro de 450nm pelo aparelho VERSAmax (microplaque reader) e programa SoftMax Pro.

Fabp7: Foram utilizados os genes recombinante de Fabp7 (Nº MBS912329), do fabricante *ELISAKit/MyBioSource*. Na microplaca de ELISA foram adicionados 100µL do diluente padrão e 100µL do plasma de cada amostra. A curva padrão do Fabp7 foi reconstituída em concentrações (Standard) de 1800pg/mL, 900pg/mL, 450pg/mL, 225pg/mL, 112,5pg/mL, 56,2pg/mL, 28,1pg/mL, 0pg/mL. A placa foi selada com adesivo e permaneceu por 2 horas incubada à 37°C e após este período foi removido todo o volume da placa (sem lavar). Imediatamente foi adicionado 100µL da solução “biotin-antibody” (1 vez) em cada poço e novamente permaneceu incubada à 37°C por 1 hora.

O volume total inserido na placa foi aspirado e lavado com uma pipeta multicanal por duas vezes (200µL de tampão de lavagem), respeitando o intervalo de 2 minutos para cada lavagem. Sem o volume, a placa foi vertida sobre um papel absorvente. Em seguida, foi adicionado em cada poço da placa 100µL do reagente HRP-avidin (1 vez), selando-se com adesivo e incubando-se por mais 1 hora à 37°C.

Repetiu-se o procedimento da lavagem por mais 6 vezes e adicionou-se 90µL do substrato TMB em cada poço da placa. Neste momento, a placa foi selada com adesivo e incubada por 20 minutos à 37°C, sob a proteção da

luz. A solução de parada (Stop solution) foi adicionada em seguida em cada poço da placa e mensurada por densidade óptica em filtro de 450nm pelo aparelho VERSAmax (microplaque reader) e lida pelo programa SoftMax Pro.

4.8 Estatística

A análise estatística de todos os grupos CLP (Sepse) vs DM/CLP (Sepse com Diabetes), foram feitas com o auxílio do programa *GraphPad Prism* versão 7.3, por intermédio do “*Mann Whitney Test*”, não paramétrico. Calculado o respectivo intervalo de confiança (IC95%); e um valor de *P* bi caudado ($p \leq 0,05$) considerando estatisticamente significativo.

5. Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Modelo de diabetes induzido pelo Alloxan

Comparando os níveis de glicose no sangue total (mg/dL) dos modelos experimentais antes e pós-indução química por Alloxan (10 dias), demonstramos o aumento estatisticamente significativo da glicose nos grupos; diabetes ($p=0,0022$) e diabetes/sepsse ($p=0,0045$), de acordo com a Gráfico 1. Os dados foram analisados através do *Wilcoxon test*, GraphPad Prism 7.3.

Gráfico 1 - O gráfico mostra os grupos diabetes e diabetes/sepsse com a dosagem do nível de glicose no sangue (mg/dL) antes e pós indução por Alloxan (42mg/Kg)

5.2 Curva de Mortalidade

A Curva de Mortalidade foi construída apartir dos grupos, sepsse (N=10) e diabetes com sepsse (N=10). Os grupos permaneceram no biotério

em temperatura ambiente, com água e alimentação por um período de 48 horas.

Os animais hiperglicêmicos induzidos a sepse (DM+CLP) demonstraram maior suscetibilidade a infecção generalizada e teve uma sobrevida menor em percentagem quando comparado com o grupo sepse (CLP). Os dados foram submetidos a análise de estatística por intermédio do *Teste Mantel-Cox, GraphPad Prism 7.3*, de acordo com a Gráfico 2.

Gráfico 2 - A curva de mortalidade foi determinada a cada 12 horas por 48 horas e a comparação entre os grupos CLP e DM+CLP demonstra o cálculo % de sobrevida entre os animais ($p=0,04$)

5.3 Reação em Cadeia da Polimerase

Com a seleção dos genes de interesse (Fabp4, Fabp7, Acat2 e Gk), propusemos demonstrar através do PCR convencional a expressão de *RNAm* destas lipoproteínas nos Tecidos e Leucócitos do nosso modelo

experimental; Controle, Diabéticos (DM), Sepses (CLP) e Sepses com Diabetes (DM/CLP). Assim, comparamos o cálculo da estatística ($p \leq 0,05$) dos grupos com o teste não paramétrico, *Mann Whitney test*, (*GraphPad Prism* 7.3), sobre as variáveis das colunas CLP (N=6) versus DM/CLP (N=6), a fim de compreender melhor os aspectos imunopatogênicos envolvidos nas doenças.

5.3.1 Fatty Acid-Binding Protein 4

Nossos resultados para esta lipoproteína, foi observado a relativa frequência expressa do gene entre as duas colunas CLP vs DM/CLP, onde verificamos que os níveis do *RNA* para o Fabp4 em leucócitos ($p=0,1939$) e hepatócitos ($p=0,4762$), não demonstram diferença estatística significativa após análise. Em Adipócitos ($p=0,0095$) e Miócitos os níveis expressos de Fabp4 ($p=0,0152$) apresentaram valores com diferença estatisticamente significativa (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Níveis de *RNA* do gene *Fabp4* expressos em diferentes tecidos dos respectivos grupos acima. Observa-se que as figuras (Adipócitos) e (Miócitos) apresentam diferença expressiva do *Fabp4* entre CLP vs DM+CLP

5.3.2 Fatty Acid-Binding Protein 7

A expressão do *Fabp7* nos Leucócitos ($p=0,0734$) e Hepatócitos ($p=0,7922$) entre os grupos CLP vs DM/CLP, não demonstraram valores significativos após análises estatística, *Mann Whitney test* (Gráfico 4). As amostras dos tecidos adiposos e músculos não expressaram *RNA* de *Fabp7*. O teste foi submetido em temperaturas diferentes no termociclador e

investigado por eletroforese, onde confirmamos a ausência de Fabp7 nos dois tecidos.

Gráfico 4 - As colunas demonstram as variações do *RNA* do Fabp7 expresso nos grupos sobre as diferentes células (leucócitos e hepatócitos)

5.3.3 Acetil-CoA acetiltransferase (*Acat2*)

Investigamos a expressão do RNA total de *Acat2* nos Miócitos, Adipócitos, Hepatócitos e Leucócitos. Verificamos após análises que em miócitos houve um aumento significativo da enzima no grupo CLP quando comparado com o grupo DM+CLP ($p=0,0303$) com diferença estatística. Nos demais tecidos, hepatócitos ($p=0,7922$), adipócitos ($p=0,2468$) e leucócitos ($p=0,4848$) não foram observados valores para diferença estatística (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Aumento expressivo em miócitos de Acat2 (CLP vs DM/CLP). Em leucócitos houve uma pequena variação na expressão entre os grupos. Os grupos CLP vs DM/CLP de hepatócitos tiveram resultados similares. Em adipócitos houve um aumento de Acat2 no grupo CLP em comparação com DM+CLP

5.3.4 Glicoquinase (Gk)

Confirmamos também um aumento na expressão do RNAm da enzima Gk em leucócitos, onde demonstra diferença significativa entre os grupos CLP vs DM+CLP ($p=0,0260$). Em hepatócitos ($p>0,9999$) e adipócitos ($p=0,6991$), os grupos CLP e DM+CLP tiveram valores similares na expressão e não houve diferença estatística. Em miócitos houve aumento na expressão de Gk no grupo CLP quando comparado com o grupo DM+CLP, porém não demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,2403$), de acordo com o Gráfico 6.

Gráfico 6 - Expressão da enzima Glicoquinase em diferentes estágios da doença, comparando os grupos CLP vs DM+CLP.

5.4 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

A frequência de Fabp7 observada no plasma das amostras dos grupos CLP vs DM+CLP foi estatisticamente significativa ($p=0,0152$). O Fabp4 demonstrou uma concentração maior no plasma do grupo DM+CLP quando comparado com o grupo CLP, porém essa frequência não demonstrou diferença estatística significativa entre CLP vs DM+CLP ($p=0,1320$), conforme o Gráfico 7. Os dados obtidos no ensaios foram comparados através do teste não paramétrico, *Mann Whitney test* (GraphPad Prism 7.3) e a curva padrão pelo programa *SoftMax Pro*, *VERSAmax* (Gráfico 8).

Gráfico 7 - Os dados demostram os níveis em ng/mL de Fabp4 aumentado no plasma dos grupos DM+CLP em relação ao grupo CLP, porém sem diferença estatística entre as colunas (CLP vs DM+CLP). Os níveis em pg/mL de Fabp7 no plasma dos grupos CLP vs DM+CLP, demonstram diferença estatisticamente significativa com aumento na frequência de Fabp7 no grupo DM+CLP

Gráfico 8 - Cálculo da curva padrão de ambas as lipoproteínas demonstraram valores de $r^{0,999}$ de confiabilidade (SoftMax Pro, VERSAmax)

6. Discussão

6 DISCUSSÃO

Entender e desvendar todos fatores bioquímicos e moleculares que levam a perda da homeostase metabólica como a respectiva hipoperfusão sistêmica, liberação de catecolaminas, citocinas, hipercatabolismo, lipólise e proteólise dos pacientes diabéticos com sepse, continua sendo um grande desafio para a medicina.^{110, 113} Epidemiologicamente a diabetes nos últimos anos tem crescido em proporções alarmantes e historicamente tem sido caracterizado pela sua origem multifatorial, tratamento inadequado e suas complicações fisiopatológicas promovida em grande parte pelo estresse oxidativo (Ages) que refletem no desenvolvimento de comorbidades crônicas e infecções. Em geral, justifica-se que o estado crítico observado na evolução clínica destes pacientes são correlatas com o estresse endocrinometabólico, seguido pela hiperglicemia transitória ou ao mesmo tempo com a dissonância imunológica, o que dificulta o tratamento específico para ambos os grupos. Além disso, outros estudos também têm promovido incertezas sobre a taxa de mortalidade nas unidades de terapia intensiva entre doentes hiperglicêmicos com sepse em comparação a outros indivíduos com sepse. Mayr e Yende (2016), demonstraram parâmetros clínicos similares (IL-6, IL-8, IL-10, E-selectina, ICAM-1, Dímero-D, TP e TTPA) entre ambos grupos de pacientes após o quarto dias da admissão em UTI.^{111, 112, 114, 115, 116}

Apesar das evidências conceituais relacionarem esta analogia clínica

sobre a perspectiva de vida desse conjunto de pacientes hiperglicêmico ou não em UTIs, a nossa avaliação primária em modelo experimental, demonstrou que os ratos (Wistar) induzidos a super produção de espécies reativas de oxigênio pelo método químico (Aloxana monoidratada/diabetogênica) foram mais susceptíveis as infecções generalizadas após o procedimento cirúrgico de punção e ligadura cecal e tiveram uma sobrevida menor quando comparados com os animais induzidos apenas a sepse por CLP, conforme a “curva de mortalidade”. Estes dados estão de acordo com outro estudo mencionado por Filgueiras *et al* (2012), onde é verificado no teste a diferença significativa na mortalidade entre animais experimentais “hiperglicêmico com sepse” versus “animais com sepse” (CLP). Justificando este fato, há tempos tem sido postulado sobre o mecanismo inibitório das funções imunológicas (inata e adaptativa) com consequente redução das células polimorfo nucleares (PMN), incluindo a redução da aderência endotelial, quimiotaxia (CXCR2), fagocitose e morte bacteriana (NETs), o que leva estes indivíduos a maior vulnerabilidade a doenças.^{02, 12, 13}

Considerando toda a diversidade funcional e molecular envolvida no sistema imune e vias do metabolismo destes pacientes, propusemos como desafio, estudar o material biológico colhido dos animais experimentais a fim de descrever a importância do papel lipídico na patogênese da diabetes e sepse. Dentro deste contexto, sabe-se que os lipídeos e suas isoformas representam uma gama de eventos químicos intra e extracelular, até então, pouco compreendidos em diversas doenças do metabolismo e tem-se

tornado objeto de pesquisa em todo mundo.²⁰ Assim utilizamos como ferramenta para estudo do material, o *PCR-array* e *ELISA*, onde buscamos um diferencial considerável nas expressões das lipoproteínas envolvidas no processo inflamatório dos animais induzidos a sepse (CLP) e diabetes com sepse (DM+CLP). De modo geral, encontramos nos adipócitos, miócitos, hepatócitos, plasma e leucócitos, a expressão dos *RNAm* das *Fabp4*, *Fabp7*, *Acat2* e *Gk*, com significativa diferença entre os grupos já mencionados.

Os nossos dados revelaram o aumento expressivo de *RNAm* para o perfil de *Fabp4* nos tecidos adiposos e musculares do grupo sepse (CLP) em relação ao grupo sepse com hiperglicemia (DM+CLP). Especula-se que a *Fabp4* e seus efeitos bioativos tenha um importante papel no transporte de ácidos graxos e sirva como uma fonte potente de energia para as células do sistema imune e hiperatividade inflamatória na sepse.¹⁵ Huang et al. (2013), decreve o aumento da concentração elevada de *Fabp4* em doença crítica considerando como marcador bioquímico de hipoperfusão e lesões em tecidos adiposos na inflamação aguda. Além disso, esta adipocina demonstra sinergia com a procalcitonina e $\text{TNF-}\alpha$ circulantes, e acrescenta esta ligação com a piora clínica dos pacientes com sepse.⁹² Outros estudos também mencionam o aumento de *Fabp4* nos adipócitos de pacientes críticos.¹⁴ Niu, et al. (2016), menciona em uma análise que pacientes diabéticos recentemente diagnosticado também apresentavam níveis mais alto de *Fabp4* no soro e associaram positivamente o fato com a produção de citocinas inflamatórias, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL17.^{117, 118} Em nosso estudo não analisamos a correlação de citocinas inflamatórias com a expressão da

Fabp4 e curiosamente não observamos demais estudos que justifique tal supressão da adipocina em questão nos pacientes diabéticos com sepse em comparação com outros grupos. Porém investigamos a concentração de Fabp4 no plasma para uma possível alteração relacionada a patogenicidade da diabetes na sepse e não constatamos um escore significativo para o grupo, embora o grupo (DM+CLP) mostrasse uma maior expressão da Fabp4.

Em miócitos a adipocina Fabp4 está suprimida no grupo de animais diabéticos com sepse em comparação com os demais grupos. Esta descoberta demonstra uma hiporreatividade metabólica da proteína carreadora e parece estar em desacordo com outros estudos que descrevem o aumento da lipoproteína comparando com as condições clínicas do paciente com sepse grave. Distúrbios patológicos como o aumento de ácido láctico, danos teciduais, aumento de espécies reativas de oxigênio, acrescido com a intensidade de citocinas são condizentes com a atividade da Fabp4 acima do normal e este efeito expressivo sendo intensificado na doença crítica, segundo outras pesquisas.^{16, 17, 18, 19, 20}

A isoforma Fabp7 demonstra um mecanismo restrito para células progenitora neural e gliais e quase sempre o aumento exarcebado desta lipoproteína está associada a tumores no cérebro, câncer de mama, melanoma, esclerose múltipla, no entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da Fabp7 em outros órgãos. Em nossa análise houve a expressão parcial da Fabp7 em leucócitos e hepatócitos sem diferença estatística nos grupos de estudos, por outro lado, descobrimos uma diferença considerável no plasma.

O nosso grupo de animais diabéticos com sepse demonstrou um aumento na concentração de Fabp7 no plasma em relação ao grupo com sepse. Em referência aos dados obtidos com a análise do plasma, buscamos características imitantes na literatura, porém não foram encontrados tais efeitos na resposta imunometabólico. Independente, a exposição da Fabp7 no processo patogênico de algumas doenças sugere, lesões, proliferação e invasão celular de vários estágios tumorais e recentemente descobriu-se que esta proteína ligante, pode ser regulada pela proteína quinase “C” (PKC), via MAPK, ERK 1 e ERK 2, mecanismo este, também envolvido processo inflamatório da sepse.^{22, 119, 120, 121} KIPP et al. (2011) correlacionou a expressão da Fabp7 com o infiltrado inflamatório envolvido na regulação de astrócitos em diferentes sub-regiões do cérebro. Neste caso, os astrócitos quando estimulado pela Fabp7, diferem inversamente a sua capacidade de expressão para determinadas citocinas. Por exemplo, o *RNAm* para GM-CSF, IL-13 e RANTES estavam presentes em níveis significativamente maiores no córtex quando comparado com o mesencéfalo, enquanto o IL-2, M-CSF, P-Selectin e MIP-3a foram inversamente reduzidas no cortex. Os autores explicam que a atividade dos Astrócitos depende da presença ativamente da Fabp7 em conjunto com a participação ligantes dos ácidos graxos de cadeia longa altamente insaturado (PUFA), ácido docosahexaenóico (Omega 3; DHA, 22: 6) e o ácido araquidônico (Omega 6; AA, 20: 4). Estes resultados demonstram que o aumento da expressão da Fabp7 no sistema nervoso central (SNC) implicam em ativação da resposta inflamatória, afetando fortemente o curso da doença.^{21, 100} Nossos dados são

preliminares, porém a concentração da Fabp7 no plasma possa também estar associada a disfunção sistêmica aguda do metabolismo de pacientes críticos, possibilitando assim, uma demanda maior na captação e transporte de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa envolvida na síntese celular e na imunorresponsividade.

A glicotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo no metabolismo ocasiona importantes danos fisiológicos como já mencionado anteriormente na revisão.¹⁰² O aumento de apoptose das células beta pancreáticas e a resposta inflamatória no desenvolvimento da diabetes em pacientes críticos, têm-se tornado alvo atraente em diferentes estudos. Nestas condições, analisamos a glicoquinase (Gk) nos leucócitos, onde apontamos um aumento expressivo nos animais experimentais induzidos a sepse (CLP), com significativa diferença, quando comparado com os animais diabéticos induzido a sepse (DM+CLP). Avaliamos a expressão da glicoquinase em outros tecidos considerando o complexo papel desta hexoquinase que objetivasse uma melhor compreensão funcional. Os hepatócitos, adipócitos e miócitos expressaram a glicoquinase, no entanto, essa intensidade é variável, não demonstrou parâmetros significativos entre os modelos envolvidos no estudo.

A glicoquinase participa ativamente da via glicolítica clássica para a síntese do glicogênio e provavelmente os nossos resultados possam estar relacionados com o mecanismo adaptativo para garantir a oferta de glicose como substrato bioenergético exclusivo para o cérebro e outros órgãos de forma compensatória no paciente crítico. Além disso, Oh et al. (2017),

relaciona a interação direta e indiretamente da glicoquinase com outras proteínas endogenicamente e isso tem levado a expressão e ativação de vários genes ligado modulação de vias inflamatórias específicas sugerindo um efeito anti-apoptótico. Os pesquisadores em questão demonstraram em um estudo com modelos experimentais, que a glicoquinase além de atuar como um sensor de glicose dentro da célula, também regula a expressão da proteína SIRT-1 (NAD-dependente da sirtuína 1 desacetilase). A SIRT-1 tem sido especificado como uma enzima desacetilase de histonas com propriedade bioquímica relevante no processo inflamatório. O interessante na ocasião é que esses efeitos foram benéficos com a supressão parcial da atividade do NF- κ B e da expressão da proteína Bcl-2, o que viabilizou a redução de citocinas inflamatórias e apoptoses das células beta pancreáticas.¹²²

Opostamente ao aumento da glicoquinase sistêmica, a diminuição ou deficiência tem sido parte integrante envolvida no déficit da captação de glicose pelas células e consequentemente esses pacientes apresentam, hiperglicemia, desestabilização de proteínas e instabilidade no metabolismo dos lipídeos.¹⁰³ O mais comum distúrbio identificado por essas manifestações é conhecida como a diabetes do subtipo MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*). Este tipo de diabetes baseia-se em critérios específicos, como por exemplo, histórico familiar, idade e etnia. Em geral estes pacientes apresentam uma hiperglicemia discreta e normalmente são diagnosticados por técnica molecular.^{101, 104, 123, 124} A nossa observação é que a hiperglicemia esta presente em ambas as condições, tanto na

diminuição, como também expressão exacerbada da enzima glicoquinase, e talvez isso, possa ser interpretada involuntariamente com outras condições clínicas e funcionais que abragem desde o ciclo de Randle à ativação das catecolaminas de forma compensatória devido a intensidade da doença.

Em fase ao nosso estudo por *PCR-array*, observamos que a expressão de *RNAm* da Acetil-CoA acetiltransferase 2 (*Acat2/SOAT2*) em miócitos foram suprimidas em nosso modelo experimental de diabetes induzido a sepse (DM+CLP), quando relacionado com o modelo sepse (CLP). A expressão diminuída de *Acat2* também foi vista em outro estudo, e esta consequência tem gerado distúrbios metabólicos em certas classes de lipoproteínas de densidade baixa. Estas características podem indicar perda de função progressiva da lipase de ácido lisossômico (LAL), alterações na captação dos lipídeos exógenos pelos quilomicrons, que coincidem com o aumento de ester de colesterol no fígado, cujo o grau em alguns casos é conhecido como doença de wolman (WD).^{125, 126}

Não foram feitos exames bioquímicos complementares em nosso estudo, porém a diminuição da *Acat2* em miócitos tenha uma relevância significativa no perfil lipídico, com o aumento do catabolismo energético nos músculos. Esse catabolismo dependente da atividade metabólica contínua do ciclo de Klebs, e isto, é determinante para a oxidação de ácidos graxos (fonte primária dos tecidos musculares), para a atividade elevada de Malonil CoA (inibidor de *Acat*) e de radicais livres que reagem principalmente com as biomoléculas orgânicas, elevando as concentrações séricas de corpos cetônicos e ácido láctico nos animais diabéticos enfermos. Anatomicamente

estes animais apresentavam evidências claras de inanição, hepato e esplenomegalia com perda de massa corporea muscular, indiretamente impactada pelas complicações orgânicas comumente descrita na diabetes de pacientes críticos.¹²⁷

Proporcionalmente Sodhi et al. (2014) demonstra de forma positiva a expressão da Acat2 em miócitos. De acordo com o estudo, além de estar associada ao crescimento e desenvolvimento dos músculos esqueléticos, esta enzima também atua na síntese de proteínas de adesão e vias de sinalização envolvida na resposta inflamatória.¹²⁸ Pedrelli et al. (2014) menciona a funcionabilidade da Acat2 na redistribuição de partículas lipoproteicas e a expressão da proteína Abca1 que é essencial para o transporte reverso do colesterol e para a biogênese do HDL no Fígado.¹²⁹ Além das múltiplas doenças metabólicas, diabetes, aterosclerose, hipercolesterolemia esta isoenzima alostérica vem sendo proporcionalmente estudada como um possível marcador biológico para câncer renal, hepatocarcinoma, entre outros.^{130, 131}

7. Conclusões

7 CONCLUSÕES

1. A nossa curva de mortalidade apresenta fatores sugestivos para as complicações diabéticas nos animais induzidos a sepse que estão associados a perspectiva de vida, isto mostra, uma forte relação com a patogênese da doença e que foram mais susceptíveis as infecções generalizadas.
2. Que a expressão de Fabp4 em adipócitos e miócitos tiveram um importante papel como marcador inflamatório, uma vez que esta adipocina demonstra sinergia com determinadas citocinas na doença aguda.
3. No plasma a concentração da isoforma Fabp7 foi maior no grupo diabetes induzidos a sepse, isto quando comparado com o grupo sepse, talvez esses dados sugerisse uma demanda maior no transporte de ácidos graxos para o metabolismo energético integrada a síntese celular, e outros complexos do sistema na disfunção orgânica.
4. O aumento expressivo da glicoquinase em leucócitos dos animais induzidos a sepse demonstra que a síntese do glicogênio no metabolismo possa estar envolvida com o mecanismo adaptativo da resposta inflamatória e provavelmente de forma compensatória a

captação da glicose seja utilizado como substrato energético para as células leucocitárias devido a intensidade inerente ao quadro grave da doença.

5. A supressão da Acat2 em miócitos de ratos diabéticos induzido a sepse supõe um aumento da secreção de epinefrina na circulação para a degradação dos triglicérides como situação emergencial, priorizando a homeostase energética no organismo e provavelmente também tenha ocorrido com a baixa ingestão calórica, alterações na biossíntese de ácidos graxos através da reação de Beta-oxidação ou seus precursores (Acetil-CoA, Malonil-CoA, Biotina, etc.).
6. Considerando as questões preliminares supracitadas, conclui-se que a expressão destas lipoproteínas na fisiopatologia da doença possui um papel importante e revelam características que possam contribuir no desenvolvimento de um método efetivo para uma intervenção terapêutica em pacientes diabéticos com sepse em um futuro próximo.

8. Anexo

8 ANEXO

Anexo 1 - Comissão de ética no uso de animais (140/14)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09/10/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **140/14** intitulado: **“Estudo do Perfil Imunológico em Modelo Animal Diabético com Sepsis”** que utilizará **90** animais da espécie **rato**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Fabiano Pinheiro da Silva

Pesquisador (a) Executante: Emerson Renato Martins

CEUA-FMUSP, 09 de Outubro de 2014

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

9. Referências

9 REFERÊNCIAS *

1. Silva FP, Velasco IT. *Sepse*. São Paulo: Manole, 2007. 512 p.
2. Annane D, et al. Current epidemiology of septic shock: The CUB-Réa Network. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 165-172.
3. Koenig A, et al. Estimativa do impacto econômico da implantação de um protocolo hospitalar para detecção e tratamento precoce de sepse grave em hospitais públicos e privados do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2010; 22 (3): 213-219.
4. Silva E. Sepsis, a problem with the size of Brasil. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2006; 18 (1): 05-06.
5. Silva FP, et al. Septic shock in older people: a prospective cohort study. *Immunity & Ageing*. 2013; 21 (10): 01-05.
6. Seino Y, et al. Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *The Japan Society: Journal of Diabetes Investigation*. 2010; 1: 212-228.
7. Brasil, Ministério da Saúde. *Diabetes mellitus*. 36. ed. Brasília: Ms, 2013. 160 p. (CDU 616.379-008.64).
8. Sunahara KKS, Sannomiya P, MARTINS JO. Briefs on insulin and innate immune response. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2011; 28 (1): 1-8.
9. FEDERATION, International Diabetes. *IDF Diabetes ATLAS*. 2013. Disponível em: www.idf.org. Acesso em: 05 jun. 2015.
10. SAÚDE, Cria. Estatísticas diabetes 1. 2015. Disponível em: <http://www.criasaude.com.br/N9887/doencas/estatisticas-diabetes-1.html>>. Acesso em: 29 jan. 2015.
11. Brasil, Ministério da Saúde. *Diabetes mellitus*. Brasília: Ms, 2006. 56p. (A).
12. Koh GCKW. et al. The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2011; 31

(1): 379-388.

13. Carlos D, et al. Histamine H2 receptor signaling in the pathogenesis of sepsis: studies in a murine diabetes model. *The Journal of Immunology*. 2013; 191 (1): 1373-1382.

14. Stengenga ME, et al. Diabetes does not alter mortality or hemostatic and inflammatory responses in patients with severe sepsis. *Critical Care Medicine*. 2010; 38 (2): 539-545.

15. Branco RG, et al. Glycemic control and insulin therapy in sepsis and critical illness. *Jornal de Pediatria*. 2007; 83 (5): 128-136.

16. Pitrowsky M, et al. Glucose control in critically ill patients in 2009: no alarms and no surprises. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2009; 3 (21): 310-314.

17. Kenzel S, et al. Insulin modulates the inflammatory granulocyte response to streptococci via phosphatidylinositol-3-kinase. *The Journal of Immunology*. 2012; 189 (1): 4582-4591.

18. Schuetz P, Castro P, Shapiro NI. Diabetes and Sepsis: preclinical findings and clinical relevance. *Diabetes Care*. 2011; 3 (34): 771-778.

19. Yébenes J, et al. Epidemiology of sepsis in Catalonia: analysis of incidence and outcomes in a european setting. *Annals of Intensive Care*. 2017; 7 (19): 1-10.

20. Khalil M, et al. Lipidomics era: Accomplishments and challenges. *Mass Spectrometry Wiley Periodicals*. 2010; 29 (1): 877-929.

21. Angus DC, Poll TD. Severe sepsis and septic shock. *The New England Journal of Medicine*. 2013; 369 (9): 840-851.

22. Delano MJ, et al. Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *The Journal of Immunology*. 2010; 186 (1): 195-202.

23. Vicent JL, Abraham E. The last 100 years of sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005; 173: 256-263.

24. Matos GFJ, Victorino JA. Diagnosis criteria for sepsis, severe sepsis and sepsis shock. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2005; 16 (2): 102-104.

25. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potente immunoregulators and potential therapeutic targets-na updated view. *Mediators of Inflammation*. 2013; 2013 (1): 1-16.
26. Silva EPC, Michels Junior V. Epidemiology. *Revista Brasileira Terapia Intensiva*. 2004; 16 (2): 97-101.
27. Barbosa AP, et al. Criteria for inflammatory response diagnosis and monitoring. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2004; 16 (2): 105-108.
28. Sttar ME, et al. Increased coagulation and suppressed generation of activated protein C in aged mice during intra-abdominal sepsis. *American Journal of Physiology*. 2014; 308 (1): 83-91.
29. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2015; 5: 4-11.
30. Bataar O, et al. Nationwide survey on resource availability for implementing current sepsis guidelines in Mongolia. *World Health Organization*. 2010; 88 (1): 1-9.
31. Lever A, Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology and diagnosis. *British Medical Journal*. 2007; 335 (1): 879-883.
32. Russell JA. Management of sepsis. *The New England Journal of Medicine*. 2006; 355 (1): 1699-1713.
33. Pereira Júnior GA, et al. Pathogenetic mechanisms of sepsis and their therapeutics implications. *Medicina Intensiva*. 1998; 31 (1): 349-362.
34. Namas R, et al. Sepsis: something old, something new and a systems view. *Journal of Critical Care*. 2013; 3 (1): 1-19.
35. Bernard A, Bernard GR. The immune response: targets for the treatment of severe sepsis. *International Journal of inflammation*. 2012; 1 (1): 1-9.
36. Salomão R, et al. TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock*. 2008; 30 (1): 73-76.
37. Batista RS, et al. Atualidades proteômicas na sepse. *Associação Médica Brasileira*. 2011; 58 (3): 376-382.
38. Redondo ACC, et al. TLR-2 and TLR-4 expression in monocytes of newborns with late-onset sepsis. *Jornal de Pediatria*. 2013; 90 (5): 472-478.

39. Henkin CS, et al. Sepsis: currents aspects. *Scientia Medica*. 2009; 19 (3): 135-145.
40. Brown AK, et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *The Lancet*. 2006; 368 (1): 157-169.
41. Soriano FG, et al. Potential role of poly (adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of myocardial contractile dysfunction associated with human septic shock. *Critical Care Medicine*. 2006; 34 (4): 1073-1079.
42. Aird CW. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003; 101 (10): 3765-3777.
43. Johansen ME, et al. Profound endotelial damage predicts impending organ failure and death in sepsis. *Thrombosis & Hemostasis*. 2005; 41 (1): 16-25.
44. Nguyen HB, et al. Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Annals of Emergency Medicine*. 2006; 48 (1): 28-54.
45. Fraternal A, et al. Molecules altering the intracellular thiol content modulate NF-Kb and STAT-1/IRF-1 signalling pathways and IL-12 p40 and IL-27 p28 production in murine macrophages. *Plos One*. 2013; 8 (3): 1-12.
46. Sakaguchi S, et al. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2010; 10 (7): 490-500.
47. Sakaguchi S, et al. Immunologic self tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology*. 1995; 155 (3): 1151-1164.
48. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nature Reviews Immunology**. 2004; 4 (11): 841-855.
49. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nature*. 2006; 6 (1): 813-822.
50. Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host microorganism interactions (*). *Annual Review of Immunology*. 2009; 27: 551-589.
51. Vignali D. How many mechanisms of regulatory T cells need? *European*

Journal of Immunology. 2008; 38 (4): 908-911.

52. Pires AC, Chacra AR. A evolução da insulinoterapia no diabetes melito tipo 1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2007; 52 (2): 268-278.

53. Mimbacas A, Javiel G. Diabetes type 1 and 2: what is behind a classification? *Intech Open*. 2011; 1: 287-304.

54. Poretsky L. *Principles of Diabetes mellitus*. 2. ed. New York: Springer, 2009. 845 p. (978-0-387-09840)

55. Nabipour I. Clinical endocrinology in the islamic civilization in Iran. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2003; 1: 43-45.

56. Dobson M. Nature of the urine in diabetes. *Medical Observations and Inquiries*. 1776; 5 (1): 298-310.

57. Gilman AG, et al. As bases farmacológicas da terapêutica. 10. Ed. Rio de Janeiro: Mcgrawhill, 2005. 1553 p. (85-86804-28-2)

58. Himsworth HP, Lond MRCP. Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. *The Lancet*. 1936; 277 (1) 127-130.

59. Reis AF, Velho G. Bases genéticas do diabetes mellitus tipo 2. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia*. 2002; 46 (4): 426-432.

60. Mimbacas A, et al. Genotype and phenotype correlations in diabetic patients in Uruguay. *Genetics and Molecular Research*. 2009; 8 (4): 1352-1358.

61. Ferreira LT, et al. Diabetes mellitus: hyperglycemia and its chronic complications. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*. 2011; 36 (3): 182-188.

62. Gross JL, et al. Diabetes mellitus: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica*. 2002; 46 (1): 16-26.

63. Sesterheim P, Saitovitch D, Staub HL. Type 1 diabetes mellitus: multifactors that confer susceptibility to the autoimmune pathogenesis. *Scientia Medica*. 2007; 17 (4): 212-217.

64. Tabarrozzi AEB, et al. Cell-based interventions to halt autoimmunity in type 1 diabetes mellitus. *Clinical and Experimental Immunology*. 2012; 171 (1): 135-146.
65. Wallberg M, Cooke A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Cell Press: Trends in Immunology*. 2013; 34 (12): 583-591.
66. Chattopadhyay D, et al. Diabetes and hypertension: A Cause and Effect Synergy? *Phytotherapy in the Management of Diabetes and Hypertension*. 2012; 60-96.
67. Testa R, et al. The “Metabolic Memory” theory and the early treatment of hyperglycemia in prevention of diabetic complications. *Nutrients*. 2017; 9 (437): 1-9.
68. Shaan BD. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabolica*. 2003; 47 (6): 654-662.
69. Farias KCRM. Avaliação da reconstituição imunológica em pacientes com diabetes mellitus do tipo 1 e esclerose múltipla após transplante autólogo de células tronco hematopoéticas. Tese (Doutorado). São Paulo: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 2006.
70. Grossi SAA, Cianciarullo TI, Della Manna T. Glycemic profiles in insulin adjustments in patients with type 1 diabetes mellitus. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*. 2003; 37 (1): 62-71.
71. Hissa MN, et al. Tratamento do diabetes mellitus tipo 1 com bomba de infusão subcutânea contínua de insulina lispro. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica*. 2001; 45 (5): 487-493.
72. Almeida HGG, et al. Perfil de pacientes diabéticos tipo 1: Insulinoterapia e automonitorização. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2002; 48 (2): 151-155.
73. Maia FFR, Araújo LR. Insulin pen injector for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Jornal de Pediatria*. 2002; 78 (3): 189-192.
74. Oliveira JEP, et al. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. Rio de Janeiro: Gen, 2014. 361 p. (CDU: 616.379-008.64).
75. Singla A, et al. Effect of type II diabetes mellitus on outcomes in patients with acute respiratory distress syndrome. *Journal of Critical Care*. 2014; 69

(1): 66-69.

76. Schuetz P, Castro P, Shapiro NI. Diabetes and Sepsis: preclinical findings and clinical relevance. *Diabetes Care*. 2011; 34 (1): 771-778.

77. Telo GH, et al. Prevalence of diabetes in Brazil over time: a systematic review with meta-analysis. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2016; 8 (65): 1-13.

78. Filgueiras Júnior LR, et al. Sepsis-induced acute lung injury (ALI) is milder in diabetic rats and correlates with impaired NF-Kb ACTIVATION. *Plos One*. 2012; 9 (7): 1-9.

79. Bakar MHA, et al. Metabolomics – the complementary field in systems biology: a review on obesity and type 2 diabetes. *The Royal Society of Chemistry*. 2015; 11 (1): 1742-1774.

80. Martins JO, et al. Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through nuclear factor-Kb activation in LPS-induced acute lung injury in rats. *Shock*. 2009; 31 (4): 404-409.

81. Stengenda ME, et al. Hyperglycemia enhances coagulation and reduces neutrophil degranulation, whereas hyperinsulinemia inhibits fibrinolysis during human endotoxemia. *Blood*. 2008; 112 (1): 82-89.

82. Krinsley JS, et al. Diabetic status and the relation of the three domains of glycemic control to mortality in critically ill patients: an international multicenter cohort study. *Critical Care*. 2013; 17 (1): 1-17.

83. Kim Y, et al. Impact of glycemic variability and hypoglycemia on adverse hospital outcomes in non-critically ill patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2014; 103 (1): 437-443.

84. Teles JM, et al. *Sepse: controle glicêmico*. São Paulo: Ambans, 2011. 10 p.

85. Oliver MF, Opie LH. Effects of glucose and fatty acids on myocardial ischaemia and arrhythmias. *Lancet*. 1994; 343(8890): 155-158.

86. Derek ME, Hyun-Jun P, Hui-Young L. The role of lipids in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes and associated co-morbidities. *BMB Reports*. 2016; 49 (3): 139-148.

87. Smathers RL, Petersen DP. The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions. *Human Genomics*. 2011; 3 (170):

1479-7364.

88. Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008; 7 (6): 1-30.

89. Hotamisligil GS, Bernlohr DA. Metabolic functions of FABPs - mechanisms and therapeutic implications. *Nature Reviews Endocrinology*. 2015; 11 (10): 592-605.

90. Hongliang X, Hertzel AV, Steen KA, Bernlohr DA. Loss of fatty acid binding protein 4/aP2 reduces macrophage inflammation through activation of SIRT3. *Molecular Endocrinology*. 2016; 30: 325–334.

91. Undurti ND. Serum adipocyte fatty acid-binding protein in the critically ill. *Critical Care*. 2013; 17 (121): 1-4.

92. Huang CL, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels in patients with critical illness are associated with insulin resistance and predict mortality. *Critical Care*. 2013; 17 (R22): 1-7.

93. Furuhashi M, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Fatty acid-binding protein 4 (FABP4): Pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases. *Clinical Medicine Insights: Cardiology*. 2014; 8 (s3): 23–33.

94. Furuhashi M, et al. Reduction of serum FABP4 level by sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Lipid Research*. 2015; 56: 2372-2380.

95. Djousse L, et al. Plasma fatty acid-binding protein 4, non-esterified fatty acids, and incident diabetes in older adults. *Diabetes Care*. 2012; 35 (8): 1701-1707.

96. Hardaway A, Podgorski I. IL-1 β , RAGE and FABP4: targeting the dynamic trio in metabolic inflammation and related pathologies. *Future Medicinal Chemistry*. 2013; 5 (10): 1089-1108.

97. Schnell A, et al. The nuclear receptor REV-ERBa regulates Fabp7 and modulates adult hippocampal neurogenesis. *PLOS ONE*. 2014; 9 (6): 1-14.

98. Maximin E, et al. Fatty acid binding protein 7 and N-3 poly unsaturated fatty acid supply in early rat brain development. *Developmental Neurobiology*. 2015; 39: 287-297.

99. Elsherbiny ME, Emara M, Godbout R. Interaction of brain fatty acid-binding protein with the polyunsaturated fatty acid environment as a potential determinant of poor prognosis in malignant glioma. *Progress Lipid Research*. 2013; 52 (4): 562-570.
100. Kipp M, et al. Brain lipid binding protein (FABP7) as modulator of astrocyte function. *Physiological Research*. 2011; 60 (Suppl. 1): 49-60.
101. Lu G, et al. Overexpression of a glucokinase point mutant in the treatment of diabetes mellitus. *Gene Therapy*. 2016; 23: 323–329.
102. Morishita K, et al. Asymptomatic congenital hyperinsulinism due to a glucokinase-activating mutation, treated as adrenal insufficiency for twelve years. *Case Reports in Endocrinology*. 2016; 2017: 1-6.
103. Rahib L, et al. Glycerol kinase deficiency alters expression of genes involved in lipid metabolism, carbohydrate metabolism, and insulin signaling. *European Journal of Human Genetics*. 2007; 15: 646–657.
104. Markwardt ML, Seckinger KM, Rizzo MA. Regulation of glucokinase by intracellular calcium levels in pancreatic B cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2016; 291 (6): 3000-3009.
105. Rogers MA, et al. Acyl-CoA: cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): enzymes with multiple sterols as substrates and as activators. *J Steroid Biochemistry Molecular Biology*. 2015; 151: 102–107.
106. Parini P, et al. ACAT2 and human hepatic cholesterol metabolism: identification of important gender-related differences in normolipidemic, nonobese Chinese patients. *Atherosclerosis*. 2009; 207 (1): 266–271.
107. Nguyen TM, et al. Cholesterol esterification by ACAT2 is essential for efficient intestinal cholesterol absorption: evidence from thoracic lymph duct cannulation. *Journal of Lipid Research*. 2012; 53: 95-104.
108. Lee RG, et al. Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates. *Journal of Lipid Research*. 2000; 41: 1991-2001
109. Sakashita N, et al. Acyl-Coenzyme A: Cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) is induced in monocyte-derived macrophages: in vivo and in vitro studies. *Laboratory Investigation*. 2003; 83 (11): 1569-1581.
110. Walley KR. Biomarkers in sepsis. *Current Infectious Disease Reports*: Springer. 2013; 15: 413-420.

111. Claus RA, et al. Approaching clinical reality: markers for monitoring systemic inflammation and sepsis. *Current Molecular Medicine*. 2010; 10 (2): 227-235.
112. Okazaki Y, Matsukawa A. Pathophysiology of sepsis and recent patents on the diagnosis, treatment and prophylaxis for sepsis. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*. 2009; 3 (1): 26-32.
113. Delgado AF. Resposta inflamatória e alterações nutricionais: biomarcadores. *International Journal of Nutrology*. 2017; 10 (1): 330-334.
114. Mayr FB, Yende S. Understanding the complex host response in sepsis: is diabetes the key? *Critical Care*. 2016; 20 (321): 1-2.
115. van Vught, LA, et al. Association of diabetes and diabetes treatment with the host response in critically ill sepsis patients. *Critical Care*. 2016; 20 (252): 22-15.
116. Schuetz P, et al. Diabetes Is Not Associated With Increased Mortality in Emergency Department Patients With Sepsis. *Annals Emergency Medicine*. 2011; 58 (5): 438–444.
117. Lee SH, et al. Prognostic Implications of Serum Lipid Metabolism over Time during Sepsis. *BioMed Research International*. 2015; 1: 1-8.
118. Niu G, Li J, Wang H, Ren Y, Bai J. Associations of A-FABP with Anthropometric and Metabolic Indices and Inflammatory Cytokines in Obese Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *BioMed Research International*. 2016; 1: 1-6.
119. Slipicevic A, et al. The fatty acid binding protein 7 (FABP7) is involved in proliferation and invasion of melanoma cells. *BMC Cancer*. 2008; 8 (276): 1-13.
120. Goto Y, et al. A New Melanoma Antigen Fatty Acid–Binding Protein 7, Involved in Proliferation and Invasion, Is a Potential Target for Immunotherapy and Molecular Target Therapy. *Cancer Research*. 2006; 66 (8): 4443-4449.
121. Takaoka N, Takayama T, Ozono S. Functional analysis of fatty acid binding protein 7 and its effect on fatty acid of renal cell carcinoma cell lines. *BMC Cancer*. 2017; 17 (192): 2-8.
122. Oh YS, Seo S, Park K, Jun HS. Compound 19e, a novel glucokinase activador, protects against cytokine-inducet Beta-cell apoptosis in INS-1

cells. *Frontiers in Pharmacology*. 2017; 8 (169): 1-10.

123. Pearson ER, et al. β -Cell Genes and Diabetes: Quantitative and Qualitative Differences in the Pathophysiology of Hepatic Nuclear Factor-1 α and Glucokinase Mutations. *Diabetes*. 2001; 50 (Suplement 1): 100-107.

124. Cho EH, et al. Identification of Maturity-Onset Diabetes of the Young Caused by Glucokinase Mutations Detected Using WholeExome Sequencing. *Endocrinology and Metabolism*. 2017; 1: 1-6.

125. Ohshiro T, et al. New Pyripyropene A Derivatives, Highly SOAT2-Selective Inhibitors, Improve Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Atherogenic Mouse Models. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2015; 355: 297-307.

126. Lopez AM, Posey KS, Turley SD. Deletion of sterol O-acyltransferase 2 (SOAT2) function in mice deficient in lysosomal acid lipase (LAL) dramatically reduces esterified cholesterol sequestration in the small intestine and liver. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 2014; 454 (1): 162–166.

127. Curi R, et al. Ciclo de Krebs Como Fator Limitante na Utilização de Ácidos Graxos Durante o Exercício Aeróbico. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica*. 2003; 47 (2):135-143.

128. Sodhi SS, et al. An Approach to Identify SNPs in the Gene Encoding Acetyl-CoA Acetyltransferase-2 (ACAT 2) and Their Proposed Role in Metabolic Processes in Pig. *Plos One*. 2014; 9 (7): 1-10.

129. Pedrelli M, et al. Hepatic ACAT2 Knock Down Increases ABCA1 and Modifies HDL Metabolism in Mice. *Plos One*. 2014; 9 (4): 1-13.

130. Zhao Z, et al. Prognostic significance of two lipid metabolism enzymes, HADHA and ACAT2, in clear cell renal cell carcinoma. *Tumour Biology*. 2016; 37(6): 8121-8130.

131. Pramfalk C, et al. Control of ACAT2 liver expression by HNF1. *Journal of Lipid Research*. 2005; 46(9): 1868-1876

132. RCSB Protein Data Bank. Three-dimensional Structure by X-Ray Crystallography FABP4 (Human). [Cited 2017 June 22] Available from: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3Q6L>

133. RCSB Protein Data Bank. Three-dimensional Structure by X-Ray Crystallography FABP4 (Human). [Cited 2017 June 22] Available from: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1FDQ>

134. RCSB Protein Data Bank. Three-dimensional Structure by X-Ray Crystallography Glucokinase (Human). [Cited 2017 June 22] Available from: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=5V4W>

135. The European Bioinformatics. Three-dimensional Structure by X-Ray Crystallography Acat2 (Human). [Cited 2017 June 22] Available from: http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/search/index?gene_name:ACAT2

* De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.