

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E  
TOXICOLÓGICAS**

**LÍVIA PEDROSA MOURA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LEUCÓCITOS MARCADOS COM  
<sup>99m</sup>Tc-ECD NA IDENTIFICAÇÃO DE PROCESSO INFLAMATÓRIO NA  
PELE ÍNTEGRA DE MEMBROS POSTERIORES ISQUÊMICOS EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 2**

**BELO HORIZONTE  
2017**

**LÍVIA PEDROSA MOURA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LEUCÓCITOS MARCADOS COM  
<sup>99m</sup>Tc-ECD NA IDENTIFICAÇÃO DE PROCESSO INFLAMATÓRIO NA  
PELE ÍNTEGRA DE MEMBROS POSTERIORES ISQUÊMICOS EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de mestra.

Orientadora: Dra. Simone Odília Antunes  
Fernandes

Coorientadora: Dra. Lucíola da Silva Barcelos

Coorientador: Dr. Valbert Nascimento Cardoso

BELO HORIZONTE  
2017

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS, que todos os dias de minha vida me iluminou para que eu pudesse conquistar todos os meus sonhos.

À minha família por todo amor, apoio e cuidado. Todas as minhas conquistas são para vocês. Pai, obrigada por ser essa pessoa brilhante, de coração gigante, que me inspira a ser cada dia uma pessoa melhor. Mãe, minha grande força, obrigada por todos os ensinamentos e por estar comigo em todos os momentos. Clara, obrigada por ser minha melhor amiga, melhor companhia e melhor IC, eu não teria conseguido sem você! João, obrigada pelo apoio e torcida de sempre e por ser o melhor irmão que eu poderia ter.

Ao Arthur, por estar ao meu lado todos esses anos, me incentivando e amparando nos momentos difíceis. Obrigada por ser meu apoio e por me fazer ser sempre minha melhor versão. Que alegria poder comemorar mais uma vitória ao seu lado. Agradeço também à sua família que me faz sentir tão querida e especial.

À Professora Simone por ter me acolhido no Lab. De Radioisótopos, pela amizade e por ter me permitido tanto aprendizado. Sou muito grata a você por todas as minhas realizações e conquistas.

Ao Professor Valbert pelas contribuições durante todo o meu percurso no laboratório e por ter feito meus olhos brilharem pela Medicina Nuclear nas suas aulas.

À Professora Lucíola pela orientação e por permitir que eu pudesse realizar esse trabalho em seu laboratório. Muito obrigada por todos os ensinamentos.

Ao Sued pela ajuda incessante durante esses anos, e pela amizade construída durante os experimentos. Cada momento difícil foi superado com a sua ajuda.

A todos os colegas do Lab. de Radioisótopos que estiveram comigo nessa caminhada e ajudaram nos meus experimentos. Em especial ao Leonardo que sempre me inspirou a ser melhor, obrigada por ser um exemplo.

A todos do Lab. de Angiogênese que me ajudaram e me fizeram sentir à vontade! Jousie, Puebla, Mari e Isa muito obrigada!

Ao Professor Adriano e Fernanda que colaboraram com meu projeto e me ajudaram a tornar esse trabalho mais significativo. Obrigada por serem tão atenciosos e me receberem tão bem.

À Professora Raquel que sempre foi um exemplo de pessoa e profissional na minha vida. Obrigada pelo carinho e atenção dedicados a mim. Agradeço por estar do meu lado em todas as minhas conquistas e por fazer parte delas, por me incentivar a fazer sempre mais e ser sempre melhor.

Aos amigos da Nuclear MedCenter que me ajudaram a fazer essa caminhada um pouco mais leve. Ana, Shirley, Stefania a amizade de vocês foi fundamental nesse percurso.

Os dois últimos anos foram intensos, produtivos e acima de tudo, desafiadores. Obrigada a cada um que se fez presente e de alguma maneira contribuiu para o meu crescimento e para que eu conseguisse conquistar mais essa vitória. Gratidão a todos vocês!

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACK** - da expressão inglesa *Ammonium-Chloride-Potassium* (Amônio Cloreto de Potássio)

**AGEs** - da expressão inglesa *Advanced Glycation End-products* (Produtos de Glicação Avançada)

**CEBIO** - Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

**CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG

**CI** - Claudicação Intermitente

**DAC** - Doença Arterial Coronariana

**DAP** - Doença Arterial Periférica

**DCCT** - da expressão inglesa *Diabetes Control and Complication Trial* (Controle do Diabetes e Triagem das suas Complicações)

**D** - Diabético

**DM** - Diabetes mellitus

**DM1** - Diabetes mellitus tipo 1

**DM2** - Diabetes mellitus tipo 2

**DMSO** - Dimetil sulfóxido

**EASD** - da expressão inglesa *European Association for the Study of Diabetes* (Associação Européia para o estudo do Diabetes)

**ECD** - Etilenodicitestinato de dietila

**EDTA** - da expressão inglesa *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilendiamino tetra acético)

**EPM** - Erro padrão da média

**FDA** - *Food and Drug Administration*

**GJ** - Glicemia de jejum

**H&E** - Hematoxilina e Eosina

**IA** - Isquemia Aguda

**Hb1a** - Hemoglobina glicada 1a

**ICC/C** - Isquemia Crônica (Crítica)

**HIF-1 $\alpha$**  - Fator Induzido pela Hipóxia 1 alfa

**IDF** - da expressão inglesa *International Diabetes Federation* (Federação Internacional do Diabetes)

**HMPAO** - hexametilpropilenoamino oxima

**<sup>111</sup>In** - Índio-111

**keV** - Kilo-elétron-volt

**LPDI** - da expressão inglesa *Laser Doppler Perfusion Imaging* (Imagem de Perfusão por Laser Doppler)

**M** - Molar (Mol/Litro)

**mg/kg** - miligramas por quilo

**$\mu$ Ci** - micro Curie

**$\mu$ L** - Microlitros

**MBq** - Megabequerel

**MN** - Medicina Nuclear

**<sup>99</sup>Mo** - Molibdênio-99

**MPO** – Mieloperoxidase

**Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>** - Pertecnetato de Sódio

**NaCl** - Cloreto de Sódio

**NAG** - N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase

**ND** – Não diabético

**nm** - Nanômetro

**NGSP** - da expressão inglesa *National Glycohemoglobin Standardization Program* (Programa Nacional de Padronização da Glicohemoglobina)

**OAF** - Oclusão da Artéria Femoral

**PBS** - *Phosphate buffer saline* (tampão fosfato salina)

**PET** – Tomografia por emissão de pósitron

**p/v** - peso sobre volume

**RM** – Ressonância magnética

**rpm** - Rotações por minuto

**ROI** - Região de Interesse

**ROS** - espécies reativas de oxigênio

**STZ** - Estreptozotocina

**T<sub>1/2</sub>** - Tempo de meia-vida

**<sup>99m</sup>Tc** - Tecnécio-99 metaestável

**TC** – Tomografia computadorizada

**TNF $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral Alfa

**TSI** – Teste de sensibilidade a insulina

**TTOG** - teste de tolerância oral à glicose

**<sup>235</sup>U** - Urânio-235

**UFMG** - Universidade Federal de Minas Gerais

**VEGF** - Fator de Crescimento de Endotélio Vascular

**%DI/g** - Porcentagem de dose injetada por grama

## RESUMO

O diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença crônica considerada epidemia mundial e associada a inúmeras complicações. Uma das complicações vasculares, denominada Doença Arterial Periférica (DAP), ocorre pelo estreitamento do lúmen das artérias dos membros inferiores e consequente prejuízo do suprimento sanguíneo. A isquemia estimula resposta vascular e inflamatória tanto no músculo quanto na pele do membro, podendo ocasionar úlceras, que podem evoluir para amputação do membro afetado. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial uso de leucócitos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD na identificação do processo inflamatório na pele de membros posteriores isquêmicos em modelo de DM tipo 2 induzido por dieta hiperlipídica. Camundongos C57BL/6 (n=45) com 8 semanas de idade foram divididos em dois grupos: diabéticos (D) (n=25) e não diabéticos (ND) (n=20). O grupo D recebeu dieta hiperlipídica contendo 60% de gordura, enquanto o grupo ND recebeu dieta padrão. Após 12 semanas de dieta, foram realizados testes de sensibilidade à insulina e de tolerância à glicose e, posteriormente, a isquemia do membro posterior foi induzida pela oclusão unilateral permanente da artéria femoral (OAF) e confirmada por imagem de perfusão por Laser Doppler. A isquemia se manteve durante todo o período experimental, com discreto aumento na perfusão no dia 3 ( $p < 0,05$ ). A OAF estimulou a expressão de HIF1 na pele de membros posteriores isquêmicos e essa expressão foi menor nos animais diabéticos em relação aos não diabéticos ( $p < 0,01$ ). Os animais do grupo D apresentaram resistência à insulina e intolerância à glicose, bem como obesidade (observado por ganho de peso exacerbado e maior adiposidade quando comparado ao grupo controle ND). Nos animais diabéticos, observou-se maior conteúdo de leucócitos totais no sangue periférico ( $p < 0,001$  vs. ND antes da OAF), o qual, entretanto, manteve-se inalterado após a OAF. Os animais não diabéticos, ao contrário, apresentaram aumento significativo no número de leucócitos circulantes 1 dia após a OAF ( $p < 0,001$  vs. ND antes da OAF), o qual se manteve até o 3º dia. Inicialmente, avaliou-se a atividade inflamatória na pele íntegra de membros posteriores 1 e 3 dias após indução de isquemia. Na pele dos membros isquemiados dos animais diabéticos, observou-se maiores níveis da citocina pró-inflamatória  $\text{TNF}\alpha$  (avaliada por ELISA) 1 dia após a OAF ( $p < 0,05$  vs. ND). O conteúdo cutâneo de neutrófilos e macrófagos foi avaliado de forma indireta através da quantificação da atividade das enzimas MPO e NAG, respectivamente. Os animais não diabéticos apresentaram aumento significativo no infiltrado cutâneo de neutrófilos apenas no 3º dia após a OAF ( $p < 0,05$  vs. ND 1º dia). Os animais diabéticos, entretanto, apresentaram menor infiltrado neutrofílico tanto no 1º ( $p < 0,05$  vs. ND) quanto no 3º ( $p < 0,001$  vs. ND) dia após a OAF. Ao contrário, o conteúdo de macrófagos na pele manteve-se inalterado em ambos os grupos durante todo o período experimental. Para a avaliação do potencial diagnóstico de leucócitos radiomarcados, leucócitos totais foram isolados do sangue periférico, marcados com  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD e injetados na veia da cauda dos animais 1 ou 3 dias após a OAF. No dia 1, observou-se menor captação de radioatividade no membro isquêmico tanto dos animais diabéticos ( $p < 0,05$ ) quanto dos não diabéticos ( $p < 0,01$ ), enquanto que, no dia 3, observou-se aumento da captação nos membros isquêmicos de ambos os grupos ( $p < 0,01$ ). De forma interessante e corroborando os dados de infiltrado inflamatório de neutrófilos, a captação de radioatividade foi menor na pele dos animais diabéticos tanto no 1º ( $p < 0,05$  vs. ND), quanto no 3º ( $p < 0,01$  vs. ND) dia após a OAF. Dessa maneira, os nossos dados sugerem a capacidade de leucócitos radiomarcados em identificar o processo inflamatório na pele de membros posteriores isquêmicos de camundongos obesos com diabetes do tipo 2.

**Palavras-chave:** inflamação; diabetes *mellitus*; doença arterial periférica; isquemia; leucócitos; leucócitos radiomarcados;  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD.



## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease considered worldwide epidemic and associated with numerous complications. One of the vascular complications, Peripheral Arterial Disease (PAD), is the narrowing of the lumen of lower arteries and consequent loss of blood supply. Ischemia stimulates vascular and inflammatory response both in the limb muscle and skin, which can lead to ulcers and possibly progress to amputation of the affected limb. The objective of this study was to evaluate the potential of  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD-labeled leukocytes in the identification of inflammatory processes in the skin of ischemic hindlimbs in a type 2 DM model induced by a hyperlipid diet. C57BL/6 mice (n = 45) 8 weeks old were divided into two groups: diabetic (D) (n = 25) and non-diabetic (ND) (n = 25). Group D received a hyperlipid diet containing 60% of fat, while the ND group received standard diet. After 12 weeks of diet, insulin sensitivity and glucose tolerance tests were performed, and the posterior limb ischemia was induced by permanent unilateral occlusion of the femoral artery (OAF) and confirmed by laser Doppler perfusion imaging. Ischemia was maintained throughout the experimental period, with a slight increase in perfusion on day 3 (p <0.05). The OAF stimulated the expression of HIF1 in the skin of ischemic hindlimbs and this expression was reduced in diabetic animals compared to non-diabetic (p <0.01). The animals of group D presented insulin resistance and glucose intolerance, as well as obesity (observed by exacerbated weight gain and greater adiposity when compared to the ND control group). In diabetic animals, higher total leukocyte was observed in peripheral blood (p 0.001 vs. ND before OAF). There was no number of circulating leukocytes 1 day after OAF (p <0.001 vs. ND before OAF), which was maintained until the 3rd day. Initially, we evaluated an inflammatory activity in the intact skin of hind limbs 1 and 3 days after ischemia induction. In the skin of the ischemic limbs of diabetic animals, higher levels of the proinflammatory cytokine TNF $\alpha$  (assessed by ELISA) were observed 1 day after an OAF (p <0.05 vs. ND). The content of cutaneous neutrophils and macrophages was evaluated indirectly by measurement of enzyme activity MPO and NAG, respectively. Non-diabetic animals showed significant non-infiltrated cutaneous neutrophils only on day 3 after OAF (p <0.05 vs. ND 1 day). The diabetic animals, however, presented less neutrophilic infiltrate both on 1st (p <0.05 vs. ND) and on 3rd (p <0.001 vs. ND) day after an OAF. In contrast, the content of macrophages in the skin remained unchanged in all groups throughout the experimental period. For an evaluation of the diagnostic potential of radiolabeled leukocytes, total leukocytes were isolated from the peripheral blood, labeled with  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD and injected into the tail vein of the animals 1 or 3 days after an OAF. On day 1, there was lower uptake of radioactivity without ischemic limbs of both diabetic (p <0.05) and non-diabetic animals (p <0.01), whereas on day 3, in the ischemic limbs of both groups (p <0.01). Interestingly and corroborating the data of neutrophil inflammatory infiltrate, the uptake of radioactivity was lower in the skin of the diabetic animals, both at 1st (p <0.05 vs. ND), and 3rd (p <0.01 vs. ND) days after an OAF. Thus, our data suggest the ability of radiolabeled leukocytes to identify the inflammatory processes in the skin of ischemic hindlimbs of obese mice with type 2 diabetes.

**Keywords:** Inflammation; Diabetes mellitus; Peripheral arterial disease; Ischemia; Leukocytes; Radiolabeled leukocytes;  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Componentes da resposta inflamatória.....	13
<b>Figura 2-</b> Migração dos leucócitos para o foco inflamatório.....	15
<b>Figura 3-</b> Classificação do Diabetes <i>Mellitus</i> .....	18
<b>Figura 4-</b> Evolução da síndrome metabólica e diabetes.....	23
<b>Figura 5-</b> Fisiopatologia da DAP em diabéticos.....	27
<b>Figura 6-</b> Via da úlcera diabética.....	30
<b>Figura 7-</b> Modelo animal.....	45
<b>Figura 8-</b> Protocolo de tolerância à glicose.....	47
<b>Figura 9-</b> Protocolo de resistência à insulina.....	48
<b>Figura 10-</b> Cirurgia de Oclusão da Artéria Femoral. Modelo animal de isquemia de membros posteriores.....	49
<b>Figura 11-</b> Equipamento de imagem de perfusão por laser Doppler.....	50
<b>Figura 12-</b> Contador de radiação gama – Wizard (Turku/Finlândia).....	57
<b>Figura 13-</b> Perfil corporal.....	60
<b>Figura 14-</b> DH60 promove resistência à insulina e tolerância à glicose.....	61
<b>Figura 15-</b> Alterações bioquímicas provocadas pela DH60.....	62
<b>Figura 16-</b> Avaliação do Fluxo Sanguíneo de membro posterior por meio da imagem de perfusão por laser Doppler.....	63
<b>Figura 17-</b> Avaliação leucocitária dos animais antes e após a OAF.....	64
<b>Figura 18-</b> Contagem diferencial de leucócitos relativa.....	66
<b>Figura 19-</b> Expressão de mRNA do HIF1 na pele isquêmica dos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND).....	68
<b>Figura 20-</b> Avaliação do Infiltrado de neutrófilos na pele do membro posterior isquêmico de camundongos.....	70
<b>Figura 21-</b> Avaliação do Infiltrado de neutrófilos na pele do membro posterior isquêmico e na pele do membro contralateral de camundongos.....	71
<b>Figura 22-</b> Avaliação do Infiltrado de macrófagos na pele do membro posterior isquêmico de camundongos.....	72
<b>Figura 23-</b> Concentração da citocina pró-inflamatória TNF $\alpha$ na pele.....	74
<b>Figura 24-</b> Percentual da dose injetada por grama de tecido (%DI/g) dos leucócitos radiomarcados nos grupos não diabético e diabético, 2 horas após a injeção.....	75
<b>Figura 25-</b> Percentual da dose injetada por grama de tecido (%DI/g) dos leucócitos radiomarcados comparando os grupos não diabético e diabético, 2 horas após a injeção.....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Critérios diagnósticos do diabetes.....	22
<b>Tabela 2:</b> Mecanismo de acumulação dos radiofármacos no tecido inflamado.....	35
<b>Tabela 3:</b> Modelos animais de indução de diabetes.....	39
<b>Tabela 4:</b> Preparo das dietas padrão e DH60.....	46
<b>Tabela 5:</b> Preparo do mix de RT-PCR.....	52
<b>Tabela 6:</b> Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para o PCR em tempo real.....	53

## SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
1.1 Inflamação.....	13
1.2 Diabetes <i>Mellitus</i> .....	16
1.2.1 Classificação .....	17
1.2.2 Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2.....	19
1.2.3 Diagnóstico.....	21
1.2.4 Complicações.....	22
1.3 Doença Arterial Periférica .....	23
1.3.1 Complicações no diabético.....	26
1.4 Ferida diabética.....	29
1.5 Medicina Nuclear / Radiofarmácia... ..	32
1.5.1 Tecnécio-99m.....	33
1.5.2 O papel da medicina nuclear no diagnóstico de processos inflamatórios.....	34
1.5.3 Radiofármacos convencionais utilizados para o diagnóstico de processos inflamatórios.....	35
1.6 Modelos animais de diabetes.....	37
2 JUSTIFICATIVA.....	41
3 OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivo geral.....	43
3.2 Objetivos específicos.....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Animais.....	45
4.2 Modelo de indução de diabetes por dieta hiperlipídica.....	45
4.3 Preparo das dietas.....	46
4.4 Testes de tolerância intraperitoneal à glicose (TTG).....	47
4.5 Testes de sensibilidade insulínica (TSI).....	47
4.6 Peso corporal e peso de tecido adiposo.....	48
4.7 Ingestão alimentar.....	48
4.8 Análise bioquímica.....	48
4.9 Modelo experimental de isquemia.....	49
4.10 Avaliação da recuperação hemodinâmica pós-isquêmica.....	50
4.11 Quantificação do número total e diferencial de leucócitos no sangue.....	50
4.12 Análise da expressão de HIF1 na pele íntegra de membros posteriores por PCR tempo real.....	51
4.12.1 Extração de RNA.....	51
4.12.2 Quantificação de RNA.....	52
4.12.3 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	52
4.12.4 Avaliação da expressão gênica.....	53
4.13 Avaliação da atividade de n-acetil-β-d-glicosaminidase (NAG) – presença de macrófagos.....	53

4.14 Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO) – presença de neutrófilos.....	54
4.15 Dosagem da citocina TNF $\alpha$ .....	54
4.16 Marcação dos leucócitos com <sup>99m</sup> Tc-ECD	
4.16.1 Isolamento dos leucócitos do sangue total.....	55
4.16.2 Análise da viabilidade celular.....	55
4.16.3 Marcação do etilenodicitostina dietil éster (ECD) com <sup>99m</sup> Tc.....	56
4.16.4 Marcação de leucócitos.....	56
4.17 Estudo ex vivo da pele do membro posterior.....	57
4.18 Análise estatística.....	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1 Validação do modelo de Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2.....	59
5.2 Avaliação da isquemia tecidual de membros posteriores.....	62
5.3 Perfil leucocitário dos animais.....	64
5.4 Análise da expressão de HIF1 na pele íntegra de membros posteriores por PCR tempo real.....	67
5.5 Análise do perfil inflamatório da pele íntegra por meio de dosagens de biomarcadores enzimáticos e citocina pró-inflamatória.....	68
5.6 Análise dos leucócitos radiomarcados para identificação do processo inflamatório na pele.....	74
6 CONCLUSÃO.....	77
7 PERSPECTIVA.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação apresenta-se como uma resposta de defesa do organismo que se inicia após a ocorrência de danos celulares causados por microrganismos, agentes físicos, químicos, necrose tecidual ou ainda reações imunológicas. O objetivo da resposta inflamatória é a eliminação da causa da lesão no organismo e consiste em dois componentes principais: uma reação vascular caracterizada por aumento do calibre vascular e conseqüente aumento de fluxo sanguíneo e modificações da permeabilidade vascular, o que permite o extravasamento de exsudato; e uma reação celular em que as células envolvidas nessa resposta estão localizadas nos tecidos ou acessam o local a partir da circulação (ABBAS *et al.*, 2008). Estão envolvidos nessas reações tecidos e células, incluindo o fluido e as proteínas do plasma, células circulantes, vasos sanguíneos e componentes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo. Dentre as células circulantes podem ser citados os neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas. Já as células do tecido conjuntivo são os mastócitos, fibroblastos e macrófagos. Os constituintes da matriz extracelular compreendem as proteínas fibrosas (colágeno e elastina), glicoproteínas de adesão e proteoglicanos (Figura 1) (MITCHELL e COTRAN, 2003).

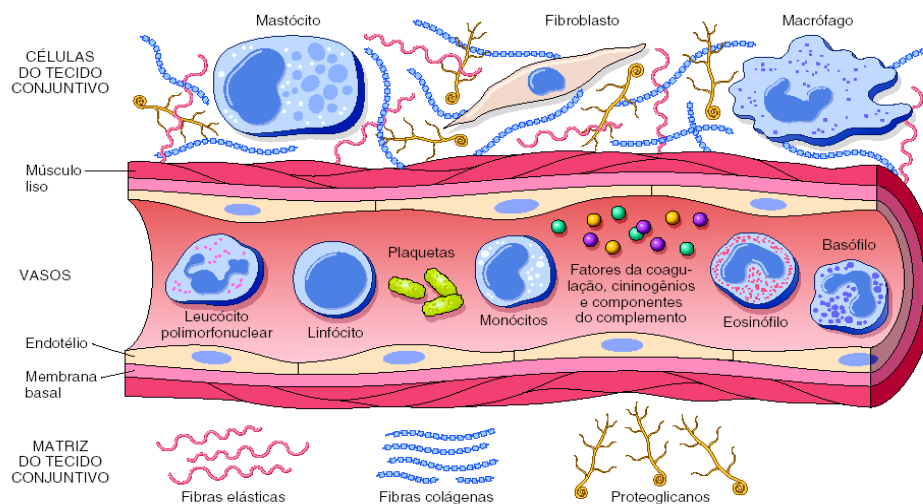


Figura 1- Componentes da resposta inflamatória

Fonte: MITCHELL e COTRAN, 2003

O processo inflamatório se inicia pelo reconhecimento da lesão ou infecção pelos macrófagos residentes nos tecidos e pelos mastócitos, que produzem uma grande variedade de mediadores inflamatórios incluindo quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, eicosanoides e produtos da cascata proteolítica. Esses mediadores químicos são produzidos em resposta a diversos estímulos e desencadeiam a resposta inflamatória através da secreção de mediadores pró-inflamatórios como por exemplo a histamina, e de citocinas, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (MEDZHITOV, 2008). A função dos mediadores químicos é iniciar a resposta inflamatória provocando o aumento do aporte sanguíneo para o local da inflamação (vasodilatação) e o aumento da permeabilidade da parede vascular, que permitirá a passagem do plasma e de moléculas maiores através do endotélio. Assim sendo, é possível o acesso de mediadores solúveis no local da inflamação, o que permite que o exsudato inflamatório de leucócitos (principalmente neutrófilos), que normalmente está restrito aos vasos sanguíneos, possa chegar aos tecidos extravasculares (CALDER, 2014; MEDZHITOV, 2008). Desta maneira, os leucócitos migram ativamente da circulação para o local da inflamação, aderindo-se ao endotélio vascular através de moléculas de adesão ("rolling" e adesão). Em seguida, ocorre a etapa de transmigração na qual os leucócitos passam através do endotélio e da membrana basal devido à sinalização de quimioatratores. Por fim, ocorre a migração para o foco inflamatório por meio da quimiotaxia (Figura 2) (ABBAS *et al.*, 2008; MITROULIS *et al.*, 2015; RANG *et al.*, 2007).

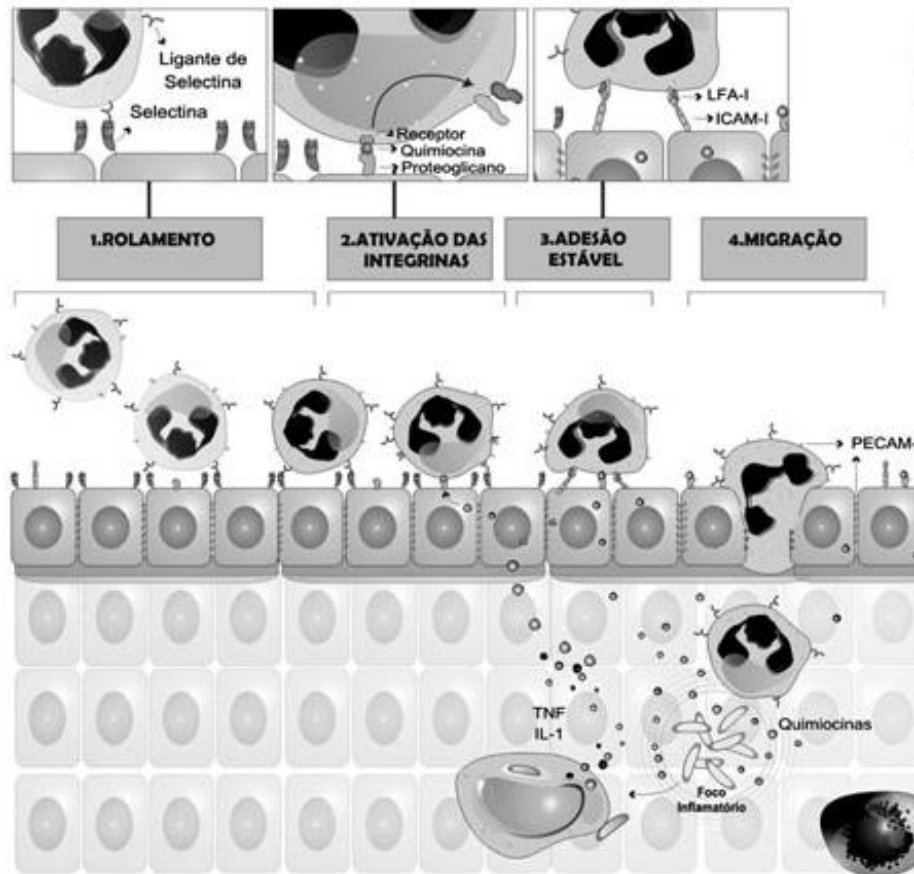


Figura 2- Migração dos leucócitos para o foco inflamatório

Fonte: JUNIOR *et al.*, 2005

O processo inflamatório pode ser dividido em agudo ou crônico. A inflamação aguda é a resposta inicial à lesão celular e tecidual, caracterizada por aumento do fluxo sanguíneo no local da inflamação; da permeabilidade vascular na área afetada; da transmutação de proteínas do plasma e do influxo de leucócitos, sendo de duração relativamente curta (MITCHELL e COTRAN, 2003). As alterações vasculares e o recrutamento celular causam três dos cinco sinais clássicos da inflamação aguda, sendo eles calor, rubor e tumor. Se a reação for intensa, pode haver envolvimento regional dos linfonodos e resposta sistêmica na forma de neutrofilia e febre, o que também caracteriza a fase aguda da inflamação. Os dois sinais restantes, dor e diminuição da função, ocorrem em consequência da liberação dos mediadores inflamatórios e dos danos provocados pelos leucócitos. Na inflamação aguda o infiltrado celular é formado predominantemente por células polimorfonucleares (MITCHELL e COTRAN, 2003; RENNEN *et al.*, 2001).



Entretanto, em alguns casos, a inflamação não evolui para resolução e se torna crônica (DUMITRIU *et al.*, 2009). A inflamação crônica acontece dentro de semanas ou meses e é caracterizada por inflamação ativa com destruição tecidual e tentativa de reparação dos danos (cicatrização). Eventualmente, pode ser consequência da continuação de um processo inflamatório agudo, mas, muitas vezes, acontece de maneira insidiosa, como uma reação pouco intensa e, frequentemente, assintomática. Observa-se infiltrado mononuclear (macrófagos, linfócitos e células plasmáticas); destruição do tecido provocada principalmente pelas células inflamatórias e mecanismos de reparação, envolvendo a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e fibrose (MITCHELL e COTRAN, 2003).

Esse processo inflamatório crônico tem sido considerado fundamental no desenvolvimento de doenças inflamatórias como a obesidade, câncer e aterosclerose (BROOKS-WORRELL e PALMER, 2012). Quando não há uma restituição dos vasos, as alterações que ocorrem na oxigenação dos tecidos podem impedir a reparação normal, resultando em atrofia e necrose (NATHAN e DING, 2010).

As causas e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na inflamação crônica, que ocorre em uma grande variedade de doenças como as cardiovasculares e o diabetes *mellitus* (DM), ainda não são bem compreendidas (MEDZHITOV, 2008). Contudo, sabe-se que os eventos de isquemia e reperfusão desencadeiam uma resposta inflamatória que pode levar desde lesões celulares, até a falência de órgãos, sendo os leucócitos fundamentais nesse processo (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010).

## **1.2 DIABETES MELLITUS**

O Diabetes *Mellitus* (DM) é definido como uma doença caracterizada pela elevação nos níveis de glicose sanguínea (hiperglicemia) em decorrência de defeitos na secreção ou na ação do hormônio insulina, produzido no pâncreas (ASSOCIATION, 2015). Tanto o DM quanto as alterações na tolerância à glicose são frequentes na população adulta e estão associadas a um aumento das mortalidades por doença cardiovascular e complicações microvasculares. O DM é uma doença que pode ser controlada, mas exige mudanças nos hábitos de

vida, devendo os portadores adotarem uma série de comportamentos específicos de autocuidado, cuidados médicos, bem como ações de vigilância e assistência à saúde para que os níveis de glicose sejam mantidos o mais próximo possível da normalidade (ASSOCIATION, 2013).

Nas Américas, o número de indivíduos com diabetes foi projetado para 64 milhões em 2025. Nos países desenvolvidos, o aumento ocorrerá principalmente nas faixas etárias mais avançadas, decorrente do aumento da expectativa de vida e do crescimento populacional. Já nos países em desenvolvimento, o aumento será observado em todas as faixas etárias, principalmente no grupo de 45-64 anos, onde sua prevalência deverá triplicar, e nas faixas de 20-44 e acima de 65 anos, onde é esperado duplicação no número de indivíduos acometidos pelo DM. E ainda, há uma projeção alarmante de crescimento de 170% na prevalência do DM, com um aumento de 84 para 228 milhões de indivíduos afetados, (FERREIRA *et al.*, 2005; GUARIGUATA *et al.*, 2014). A mortalidade causada por essa enfermidade em indivíduos com idade superior a 40 anos só é superada pelas doenças cardiovasculares (VIGO *et al.*, 2006).

### **1.2.1 CLASSIFICAÇÃO:**

O DM é classificado em tipo 1, tipo 2, tipos específicos devido a outras causas e o diabetes gestacional, conforme demonstrado na Figura 3.

DIABETES TIPO 1
Destruição das células beta, usualmente levando à deficiência completa de insulina
A. Autoimune
B. Idiopático
DIABETES TIPO 2
Graus variados de diminuição de secreção e resistência a insulina
OUTROS TIPOS ESPECÍFICOS
Defeitos genéticos da função da célula $\beta$
Defeitos genéticos da ação da insulina
Doenças do pâncreas exócrino
Endocrinopatias
Indução por drogas ou produtos químicos
Infecções
Formas incomuns de diabetes imuno-mediado
DIABETES GESTACIONAL

Figura 3- Classificação do Diabetes *Mellitus*

Fonte: GROSS *et al.*, 2002 adaptado

No diabetes tipo 1 (DM1) ocorre destruição das células beta do pâncreas, usualmente por processo autoimune (tipo 1A), ou menos comumente, por causa desconhecida (tipo 1B). Geralmente, o DM1 é diagnosticado na infância ou adolescência e acaba usualmente culminando na deficiência absoluta de insulina, sendo necessário, portanto, a administração diária de insulina exógena (ASSOCIATION, 2015).

O diabetes tipo 2 (DM2) está associado a população em envelhecimento e resulta em um defeito progressivo na secreção de insulina, ou da incapacidade de utilizar adequadamente a insulina produzida, fenômeno conhecido como resistência à insulina (ASSOCIATION, 2015).

Os outros tipos de diabetes podem ter diversas causas como defeitos genéticos na função das células  $\beta$ , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças no pâncreas (como a fibrose) ou em consequência do uso de alguma droga indutora de danos ao pâncreas. Atribuir um tipo de diabetes a um indivíduo muitas vezes depende das circunstâncias presentes no momento do diagnóstico, sendo que alguns indivíduos não necessariamente se encaixam claramente em

uma única categoria. Por exemplo, alguns pacientes não podem ser claramente classificados como tendo DM1 ou DM2. A apresentação clínica e a progressão da doença podem variar consideravelmente em ambos os tipos de diabetes. O diagnóstico do tipo 1 versus tipo 2 é comumente feito utilizando critérios como idade de início, gravidade de sintomas hiperglicêmicos, presença de cetose, grau de obesidade e a necessidade de reposição de insulina (ASSOCIATION, 2013; ASSOCIATION, 2015; GROSS *et al.*, 2002; EHSES *et al.*, 2009).

Há ainda o diabetes gestacional, que é definido como a tolerância diminuída aos carboidratos, de graus variados de intensidade, diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre da gravidez, que não é claramente diabetes evidente, podendo ou não persistir após o parto (ASSOCIATION, 2013; ASSOCIATION, 2015).

### **1.2.2 DIABETES MELLITUS TIPO 2:**

O DM2 tornou-se uma das doenças crônicas mais prevalentes no mundo sendo frequentemente acompanhada por várias síndromes metabólicas, como nefropatia, neuropatia, retinopatia e doença arterial coronariana (BONISCHNETZLER e DONATH, 2013; HEIDEMANN *et al.*, 2013; POOVATHUMKAL *et al.*, 2017). O DM2 foi identificado como um dos maiores desafios para saúde humana no século XXI. Estima-se que mais de 350 milhões de pessoas em todo o mundo sofram desta doença (MARTIN e MCGEE 2014). O DM2 é caracterizado por hiperglicemia, disfunção de células  $\beta$  e dislipidemia resultante de desregulações metabólicas mediadas pela insulina, como diminuição da utilização de glicose, defeitos na secreção de insulina e uma resistência periférica à insulina no músculo esquelético, no tecido adiposo e no fígado (CHAWLA *et al.*, 2011; DONATH e SHOELSON, 2011; OUCHI *et al.*, 2011; POOVATHUMKAL *et al.*, 2017; SHOELSON *et al.*, 2006). A hiperglicemia crônica pode prejudicar muitos sistemas de órgãos e representa um considerável desafio à saúde e um fardo econômico, tanto para o indivíduo como para a sociedade (CHEN, 2012; DANAEI, 2011). Além das limitações funcionais na vida diária, o DM2 pode levar a uma redução significativa na expectativa de vida (SESHASAI *et al.*, 2011; SCHUNK *et al.*, 2012).

O DM2 é uma patologia de evolução lenta e assintomática por muitos anos. Na fase sintomática, os sintomas clássicos são a perda de peso, polidipsia, poliúria, polifagia e fraqueza. Os indivíduos diabéticos podem apresentar apenas resistência à insulina, bem como uma deficiência relativa de insulina, mas principalmente, um defeito secretório de insulina acompanhado de resistência à insulina. No último caso, a secreção de insulina pode estar defeituosa e desta forma, insuficiente para promover redução nos níveis de glicose, e uma vez que as células também apresentam resistência à insulina. Essa resistência à insulina pode melhorar com a redução de peso e ou tratamento farmacológico da hiperglicemia, mas raramente consegue se restabelecer e retomar os níveis normais (ASSOCIATION, 2015).

A observação de que a maioria dos indivíduos diagnosticados com DM2 eram obesos; despertou o interesse de pesquisadores, que recentemente identificaram evidências que apoiam o envolvimento do sistema imunológico no desenvolvimento da obesidade concomitante ao de DM2 (ASSOCIATION, 2015; BÖNI-SCHNETZLER *et al.*, 2008; EHSES *et al.*, 2009; DONATH *et al.*, 2008; DONATH *et al.*, 2009).

Historicamente, o DM2 era considerado uma doença metabólica do indivíduo envelhecido, contudo, atualmente a prevalência do DM2 está aumentando de forma exponencial em faixas etárias mais jovens, adquirindo características epidêmicas em vários países, particularmente os em desenvolvimento. Hoje em dia observa-se que mais de 80% dos casos de diabetes são do tipo DM2. O aumento da incidência desse tipo é largamente atribuído às mudanças no estilo de vida, o que inclui a dieta hipercalórica e o sedentarismo, bem como a obesidade e o envelhecimento da população (AHMED e GOLDSTEIN, 2006; ISMAIL-BEIGI, 2012).

O risco de desenvolver DM2 aumenta com a idade, obesidade e sedentarismo e é mais prevalente em mulheres, indivíduos hipertensos ou dislipidêmicos e em determinados subgrupos raciais/étnicos (afro-americano, americano, hispânico/latino e asiático-americano). O DM2 é frequentemente associado a uma forte predisposição genética, no entanto, a genética do DM2 ainda não é completamente compreendida (ASSOCIATION, 2015).

O excesso de peso e a obesidade são os principais fatores de risco modificáveis para o DM2. A obesidade, em particular a excessiva adiposidade

visceral, está associada à resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia e hipertensão, que em conjunto são denominadas "síndrome metabólica". Estes distúrbios metabólicos aumentam o risco de desenvolvimento de DM2 e de doenças cardiovasculares, que juntas, contribuem para altas taxas de mortalidade e morbidade (ALBERTI *et al.*, 2009). A obesidade em si causa algum grau de resistência à insulina uma vez que o tecido adiposo produz uma série de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF $\alpha$ , interleucinas e inibidor 1 do ativador do plasminogênio, que são associados com a resistência à insulina (WILCOX, 2005). A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu que a prevalência da obesidade está aumentando rapidamente para proporções epidêmicas em todo o mundo a uma taxa alarmante (SMITHY e HERONNATURE, 2005). Os diabéticos que não são considerados obesos pelos critérios tradicionais, comumente apresentam um aumento da porcentagem de gordura corporal, predominantemente na região abdominal (ASSOCIATION, 2004; SARTORELLI e FRANCO, 2003).

Um dos grandes problemas com o DM2, é o diagnóstico, que normalmente ocorre tardiamente, quando os danos na microcirculação e outros sistemas já estão estabelecidos. Isso ocorre porque o DM2 normalmente é uma doença assintomática de lenta progressão.

### **1.2.3 DIAGNÓSTICO:**

Anteriormente, o diagnóstico do diabetes se baseava nos níveis de glicemia em jejum (GJ) e no Teste de Tolerância Oral a Glicose (TTOG), no qual a glicose é medida no sangue duas horas após administração oral de 75 g de dextrosol. Em 2009, o *International Expert Committee*, que inclui representantes do *American Diabetes Association*, do *International Diabetes Federation* (IDF), e do *European Association for the Study of Diabetes* (EASD) passaram a recomendar o uso da hemoglobina glicada (A1C) no diagnóstico do diabetes, pois reflete um estado metabólico do indivíduo (ASSOCIATION, 2015).

Os parâmetros a serem analisados para o diagnóstico estão descritos na Tabela 1:

## DIAGNÓSTICO DIABETES

A1c  $\geq 6,5\%$ . O teste deve ser realizado em um laboratório especializado usando método certificado pelo NGSP e padronizado para o ensaio clínico DCCT.

GJ  $\geq 126\text{mg/dL}$ . O jejum é definido como a ausência de ingestão calórica de pelo menos 8h.

TTOG  $\geq 200\text{mg/dL}$ . O teste deve ser realizado como descrito pela OMS, usando uma carga de glicose contendo o equivalente a 75 g de glicose anidra dissolvida em água e quantificação da glicose 2 horas depois

Paciente com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica, a glicose plasmática aleatória  $\geq 200\text{mg/dL}$ .

Tabela 1- Critérios diagnósticos do diabetes  
Fonte: ASSOCIATION, 2015

### 1.2.4 COMPLICAÇÕES:

O DM2 raramente é diagnosticado nas etapas iniciais da doença uma vez que a hiperglicemia se desenvolve gradualmente, e em fases precoces, muitas vezes não é grave o suficiente para que o paciente possa notar qualquer um dos sintomas clássicos de diabetes. Com isso tais pacientes possuem um maior risco de desenvolver complicações microvasculares e macrovasculares (ASSOCIATION, 2004; SARTORELLI e FRANCO, 2003).

Várias são as complicações decorrentes do DM e a inflamação desempenha um importante papel ao longo da patogênese das complicações microvasculares (AARON, 2004). A lipotoxicidade e a glicotoxicidade, bem como a formação de produtos finais de glicação avançada e fenômenos epigenéticos ocorrem mais tarde na evolução da síndrome metabólica e diabetes (Figura 4).

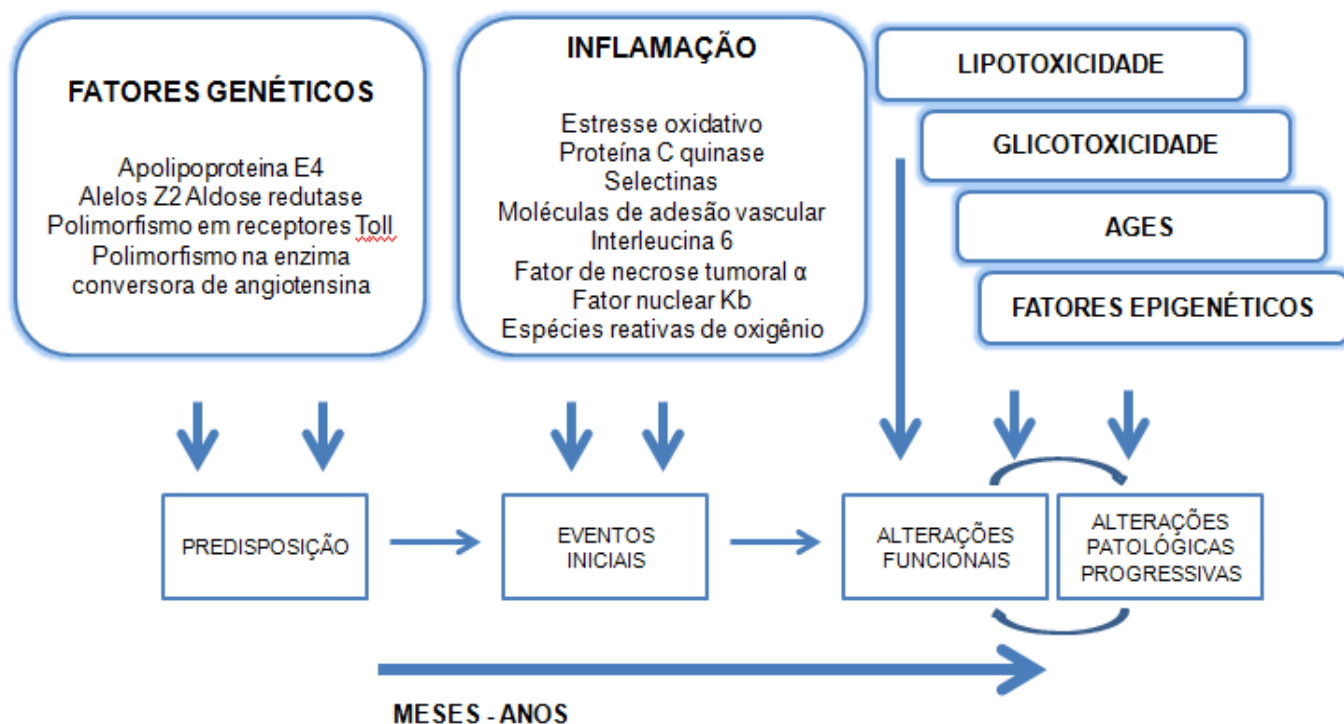


Figura 4- Evolução da síndrome metabólica e diabetes

Fonte: VINIK e MEHRABYAN, 2004 Adaptado

Dentre as complicações microangiopáticas destacam-se as que causam cegueira (retinopatia diabética), doença renal (nefropatia diabética) e dano neuronal (neuropatia sensitiva distal). Existem também as complicações macroangiopáticas, nas quais ocorre o comprometimento aterosclerótico das artérias dos membros inferiores e das artérias cerebrais (SCHEFFEL *et al.*, 2004). A doença cardiovascular é a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com DM2, e o risco relativo para essas doenças é de duas a quatro vezes maior nos pacientes diabéticos que na população geral (MOHAMMEDI *et al.*, 2016; TRICHES *et al.*, 2009) sendo o DM um fator de risco maior para Doença Arterial Periférica (DAP) (THIRUVOIPATI, 2015).

### 1.3 DOENÇA ARTERIAL PERIFÉRICA

A DAP é uma manifestação clínica comum e grave, especialmente frequente em pacientes com DM2, que ocorre pelo estreitamento do calibre das artérias dos membros inferiores, com obstrução progressiva do fluxo sanguíneo arterial, que resulta em estenose ou oclusão de vasos sanguíneos não



coronarianos, e prejuízo crônico do suprimento sanguíneo (MASCARENHAS *et al.*, 2014; PENUELAS *et al.*, 2007). Muitas vezes, essa obstrução se deve à formação de uma placa aterosclerótica nas artérias dos membros inferiores, e pode ainda ser devida a formação de trombo local ou embolização nos membros afetados (CASSAR e BACHOO, 2006; SAAB *et al.*, 2009). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da DAP são idade, sexo, tabagismo, hipertensão arterial, dislipidemia e DM, sendo sua principal causa a aterosclerose (MASCARENHAS *et al.*, 2014; NG *et al.*, 2014; VALDIVIELSO *et al.*, 2014); podendo estar mais elevada, cerca de 20-30% entre a população que apresenta fatores de risco tais como DM, hipertensão e/ou dislipidemia (GHOSH e ARONOW, 2004; MURABITO *et al.*, 2002).

Muitos estudos já demonstraram que a hiperglicemia crônica leva a doenças vasculares, com alterações do metabolismo e das funções endoteliais (MADONNA e DE CATERINA, 2011; ROBERTS e PORTER, 2013; ALTABAS, 2015). A disfunção do endotélio decorrente da hiperglicemia ocorre principalmente por uma diminuição na produção de óxido nítrico (NO) e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esse desequilíbrio é conhecido como estresse oxidativo e tem um papel determinante na progressão das complicações vasculares associadas ao DM (KOLLURU *et al.*, 2012).

A DAP é uma condição de saúde incapacitante que afeta 20% das pessoas com mais de 75 anos, sendo predominantemente uma doença da população idosa. À medida que a população do mundo ocidental envelhece, a taxa de incidência também aumenta; uma revisão estimou uma carga global de 202 milhões de casos de DAP diagnosticados desde 2010, número que aumentou substancialmente em relação a última década (FOWKES *et al.*, 2013).

A prevalência de DAP varia em diferentes populações no mundo, e nos Estados Unidos, cerca de 4,2% dos adultos com mais de 40 anos são assintomáticos, taxa esta que pode chegar a 7,0% naqueles com síndrome metabólica (SUMNER *et al.*, 2012). A prevalência exata de DAP nas pessoas com DM tem sido difícil de determinar devido alguns fatores, incluindo a ausência de sintomas e em alguns casos, a percepção diminuída da dor devido à neuropatia e o rastreamento inadequado. Apesar desses complicadores, estudos epidemiológicos têm correlacionado DM com um aumento da prevalência de DAP (FAGLIA, 2011).

À medida que a doença progride as quantidades de oxigênio e nutrientes para os tecidos são insuficientes, a isquemia progressiva presente na DAP pode levar a complicações como dor crônica nas pernas, ulcerações na pele, claudicação intermitente, gangrena e, eventualmente, amputação, e em casos mais graves, morte (PEACH *et al.*, 2012; STACY *et al.*, 2015). Apesar da gravidade desta doença, uma proporção significativa de indivíduos com DAP permanecem não diagnosticados na prática clínica porque em grande parte das vezes esses pacientes são assintomáticos (CHAUDRU *et al.*, 2016; PANICO *et al.*, 2015).

Uma das manifestações mais comuns e mais antigas da DAP é a claudicação intermitente; descrita como dor em um grupo muscular de extremidade inferior que é provocada pelo esforço e aliviada dentro de alguns minutos de repouso. Ao longo do tempo, a dor pode ser provocada por esforço menor e tornar-se mais frequente, mesmo em repouso. Há evidências de que dois terços das pessoas com úlceras de perna arterial venosa mista experimentam dor moderada a grave diariamente. Como tal, as pessoas com DAP são mais propensas a experimentar uma perda de autonomia, deficiência, incapacidade para o trabalho, sofrimento emocional e má qualidade de vida em comparação com indivíduos sem DAP (MASCARENHAS *et al.*, 2014).

Tem-se ainda a isquemia aguda e a isquemia crônica (crítica) de membro inferior, causadas pela redução do fluxo sanguíneo para os membros inferiores com prejuízo para a perfusão dos tecidos. Esses quadros são caracterizados pela dor em repouso, desenvolvimento de úlceras isquêmicas ou gangrena isquêmica, e envolve ainda alterações micro e macrovasculares, incluindo a perda da densidade capilar e disfunções endoteliais que pode levar a perda de membros ou até mesmo a morte, se não tratada a tempo. A dor isquêmica é complexa e é causada por uma infinidade de mecanismos, incluindo a falta de oxigênio, acúmulo de resíduos metabólicos, lesões de reperfusão, inflamação, lesão nervosa, vasoespasmos, trauma e ansiedade.

Para agravar a situação, a DAP isquêmica ainda é sub-reconhecida, sub-diagnosticada e, portanto, sub-tratada (MASCARENHAS *et al.*, 2014; SUMPIO 2012; VEMULAPALLI e PATEL, 2015). Atualmente, o diagnóstico é feito a partir da avaliação clínica e de exames como o índice tornozelo-braquial, e técnicas tradicionais de imagem, como Doppler ultrassonografia, ressonância magnética

(RM) e angiografia de contraste (ANDERSEN, 2010; CLAIR *et al.*, 2012; STACY *et al.*, 2015;).

### **1.3.1 COMPLICAÇÕES NO DIABÉTICO**

Com base no *UK Prospective Diabetes Study*, a duração e o grau de hiperglicemia estão associados a um risco aumentado de DAP. O aumento da predisposição à DAP no DM é multifatorial e complexo. Os pacientes com DAP e DM possuem uma função pior das extremidades inferiores do que aqueles somente com DAP. Além disso, os pacientes diabéticos com DAP são propensos a isquemia súbita de trombose arterial e úlcera isquêmica das extremidades inferiores (ASSOCIATION, 2003; CRIQUI e ABBOYANS, 2015).

A fisiopatologia da DAP na população diabética é semelhante ao da população não-diabética (MARSO e HIATT, 2006). No entanto, em pacientes diabéticos, a superprodução de produtos de glicação (AGEs), aumento do estresse oxidativo, fatores inflamatórios aumentados e dislipidemia podem piorar direta ou indiretamente a DAP (Figura 5). Isto é, essas anormalidades no DM complicam a fisiopatologia e os mecanismos da DAP (JUDE *et al.*, 2010; GERRY *et al.*, 2016; ASSOCIATION, 2003).

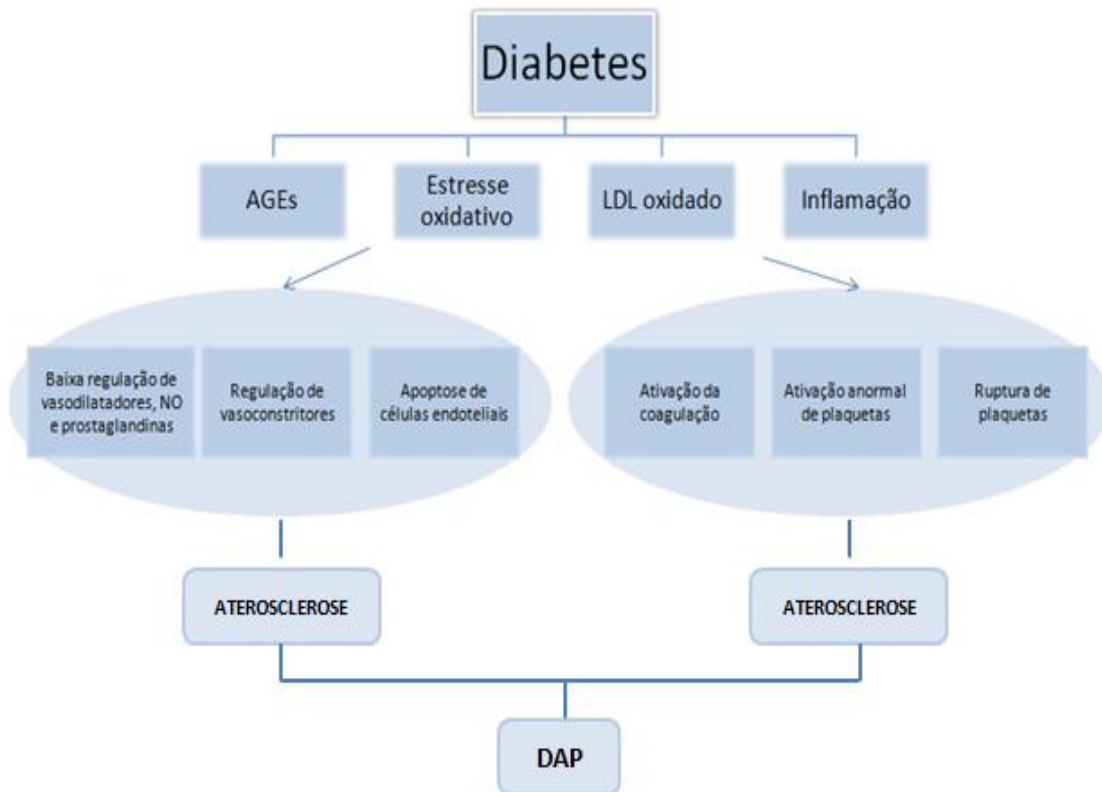


Figura 5- Fisiopatologia da DAP em diabéticos  
 FONTE: GERRY *et al.*, 2016 Adaptado

A isquemia, mesmo na ausência de lesão, desencadeia respostas moleculares e celulares que irão determinar o remodelamento do tecido isquêmico. A isquemia provoca hipóxia, ativando a produção do fator induzido pela hipóxia (HIF). Além disso, resposta inflamatória também é desencadeada, com o recrutamento de vários tipos de células inflamatórias para o local da isquemia, onde estas desempenham papel ativo no remodelamento vascular e tecidual (SILVESTRE *et al.*, 2013). No caso de pacientes diabéticos, ocorre prejuízo nesses processos em decorrência de uma menor capacidade em lidar com a hipóxia. Há menor produção de HIF e de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e conseqüentemente, menor capacidade de formar novos vasos para suprir a demanda de oxigênio e responder a lesão com células inflamatórias (HOWANGYIN e SILVESTRE, 2014).

Em comparação com a população em geral, os diabéticos são afetados pela aterosclerose em uma idade mais jovem, sendo que esse processo tende a progredir em um ritmo muito mais rápido, resultando em maiores taxas de

amputação (SUMPIO, 2012). O risco de claudicação intermitente é cerca de duas vezes maior em pacientes com diabetes quando comparado com indivíduos não-diabéticos. Além disso, os riscos de DAP aumentam com a gravidade e a duração do diabetes, bem com o uso de insulina (KALLIO *et al.*, 2003; JONES, 2015; SELVIN *et al.*, 2004). Em relação ao risco de amputação, pacientes diabéticos apresentam chances cerca de cinco vezes maiores do que em indivíduos sem diabetes (JONES, 2015; JUDE *et al.*, 2001), o que pode ser explicado pela neuropatia sensorial associada ao diabetes, microangiopatia e infecção, bem como um padrão específico de DAP que afeta as artérias mais distais com menos possibilidades de revascularização.

A associação da epidemia mundial de diabetes com o aumento dos níveis de obesidade pode provocar um aumento na proporção de casos de DAP (GUARIGUATA *et al.*, 2014).

As doenças vasculares são responsáveis por mais de 70% do total de óbitos em pacientes com DM2 (TANII *et al.*, 2006), sendo que a isquemia periférica resultante de uma DAP é vista como um componente causal em cerca de 60% dos casos de ulcerações (RATHUR e BOULTON, 2007; NDIP, 2012). Essa isquemia pode levar à necrose do tecido muscular e fibrose; podendo, ainda, desencadear uma resposta vascular (vasodilatação e angiogênese) e inflamatória (LI *et al.*, 2015). Esses eventos propiciam o aparecimento de lesões cutâneas no diabético que são conhecidas como feridas diabéticas.

Como resposta compensatória à isquemia, o corpo humano regula positivamente a expressão de fatores de crescimento angiogênicos, tais como o VEGF, o fator de crescimento de fibroblastos, e os receptores correspondentes, que coletivamente estimulam o desenvolvimento de vasos colaterais. Nos casos em que esses mecanismos compensatórios biológicos falham (o que normalmente ocorre), intervenções terapêuticas como exercícios, cirurgia de revascularização, fatores de crescimento exógeno, terapias de células-tronco e sistemas de liberação de fármacos podem ser usadas para ajudar na reconstituição da circulação sanguínea das extremidades (CLAIR *et al.*, 2012; HINCHLIFFE *et al.*, 2012). A revascularização cirúrgica ainda é o melhor tratamento para DAP, no entanto, outras estratégias podem ser consideradas quando, por qualquer motivo, um procedimento cirúrgico não é possível (OURIEL, 2001).

## 1.4 FERIDA DIABÉTICA

As feridas diabéticas, conhecidas popularmente como “pé diabético”, ocorrem em consequência a DAP, associada a neuropatia. São resultado de vários processos fisiopatológicos, caracterizados por diversas alterações e complicações, que podem ocorrer nos pés e nos membros inferiores dos diabéticos (CAIAFA *et al.*, 2011). Ocorrem como consequência de neuropatia, de doença vascular periférica e de deformidades. As lesões geralmente decorrem de traumas e frequentemente se complicam com gangrena e infecção, ocasionadas por falhas no processo de cicatrização. Quando não há instituição de um tratamento adequado e precoce, as lesões podem culminar em amputação (MENKE *et al.*, 2014, VIGO *et al.*, 2006). Representam uma das mais incapacitantes complicações crônicas advindas do mau controle da doença, com impacto social e econômico tanto para as famílias, quanto para o sistema de saúde e a sociedade, em países desenvolvidos e emergentes. Ainda hoje, as úlceras de pé e amputações continuam sendo complicações comuns e sérias do diabetes, e associam-se a uma mortalidade significativa (DUARTE e GONÇALVES; 2011). Relatos na literatura indicam que cerca de 50% dos pacientes submetidos a amputações não traumáticas dos membros inferiores são diabéticos e estes ainda têm uma elevada mortalidade seguinte à amputação, que pode variar de 39% a 80% em cinco anos (GUO e DIPIETRO, 2010; MOULIK, *et al.*, 2003).

Pessoas diabéticas com úlcera e/ou amputação prévia possuem importantes fatores de risco para recidivas. Anualmente, de 2% a 3% das pessoas com diabetes podem desenvolver úlceras nos membros inferiores, podendo esse percentual aumentar para 15% ao transcorrer da vida. As úlceras superficiais correspondem a 85% dos casos graves de hospitalização (VIGO *et al.*, 2006). Além disso, a hiperglicemia prejudica a eficiência da resposta inflamatória por meio de alterações nas funções de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (LADEIRA *et al.*, 2011). Os fatores de risco mais estudados para desenvolvimento de úlceras, incluem neuropatia com diminuição da sensibilidade e deformidades, calosidades, educação terapêutica deficiente, descontrole metabólico, obesidade, idade, sexo, tempo de evolução do diabetes,

dificuldade de acesso ao sistema de saúde, uso de calçados inadequados, tabagismo entre outros fatores (Figura 6).

Um dos principais mecanismos do ferimento se refere à baixa pressão prolongada sobre a proeminência óssea que juntamente com o uso de calçados impróprios causa feridas sobre os pés. O trauma vindo dos sapatos, a perda da sensação protetora devido à neuropatia, associada à deformação nos pés, a mobilidade limitada, contribuem para a ulceração nos pés de pessoas com diabetes (FRYKBERG *et al.*, 2006).

As complicações dessas lesões podem causar formigamento, dor que pode aparecer em forma de ardência ou de picadas, fraqueza e perda de sensibilidade no pé, dificultando a percepção de calor, frio e mesmo de algum machucado.

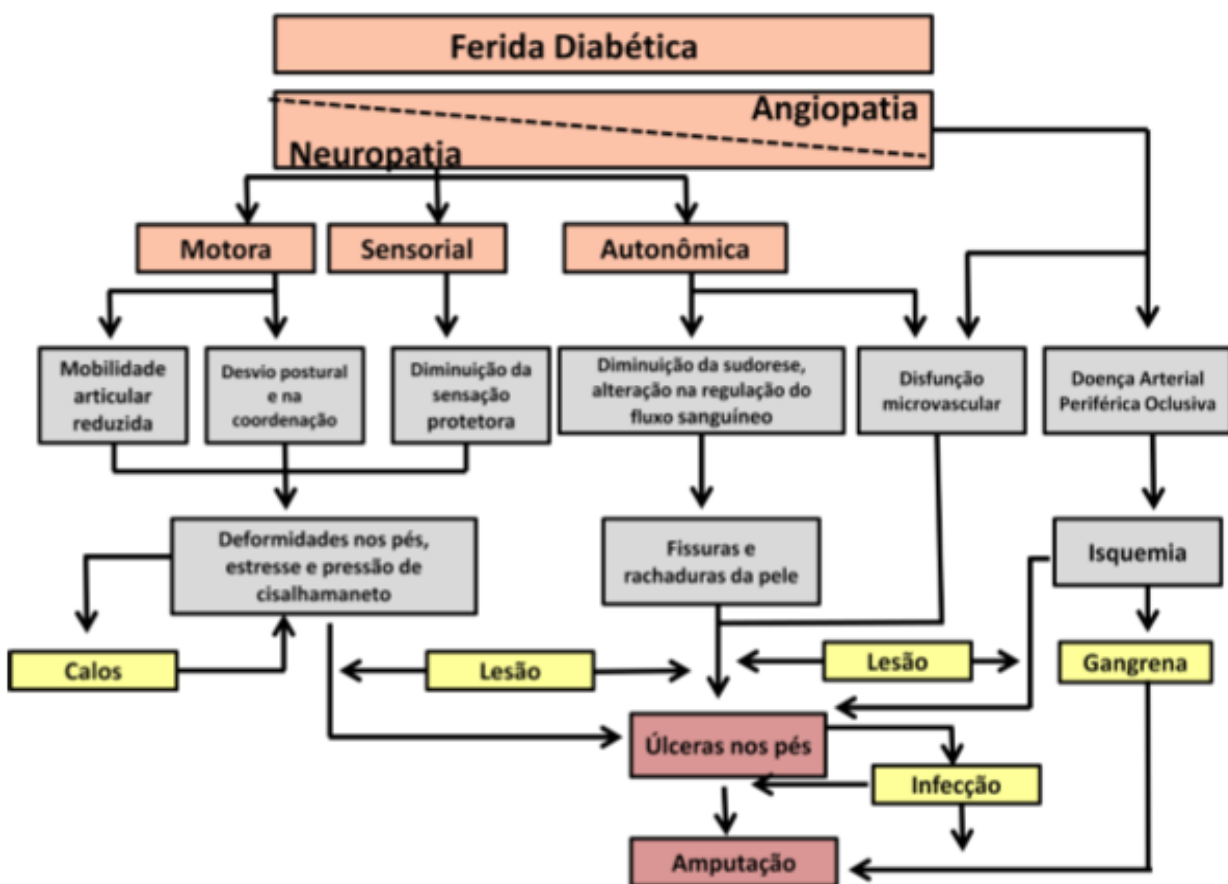


Figura 6- Via da úlcera diabética

Fonte: LEPÄNTALO *et al.*, 2011

Destaca-se nesse contexto a necessidade de os profissionais de saúde avaliarem os pés das pessoas com diabetes de forma minuciosa e com frequência regular, bem como desenvolverem atividades educativas, visando melhorar o autocuidado, e principalmente a manutenção de um bom controle glicêmico (BOIKE *et al.*, 2002). A avaliação dos pés constitui-se em passo fundamental na identificação desses fatores de risco que podem ser modificados, o que, conseqüentemente, reduzirá o risco de ulceração e amputação de membros inferiores nas pessoas com diabetes (TAVARES *et al.*, 2009).

As ulcerações representam barreiras distintas para as terapias conservadoras devido à dificuldade em tratar adequadamente as feridas até cicatrizar, ou mantê-las curadas ao longo do tempo; incapacidade de proporcionar higiene diária suficiente dos pés em pacientes debilitados; e por fim o comprometido do fluxo vascular distal. Com isso, conseqüentemente, muitos destes pacientes progridem para uma amputação, e um dado importante, é que a mortalidade após uma grande amputação é muito alta (VAN DAMME *et al.*, 2001; FAGLIA *et al.*, 2009). O prejuízo da perfusão arterial pode ser uma causa isolada de amputação e predisponente à gangrena (FRYKBERG *et al.*, 2006). A infecção também tem um importante papel neste contexto. Pacientes diabéticos descompensados, ou seja, aqueles sem um controle adequado da glicemia têm um aumento da predisposição às infecções de pele causadas principalmente por *Candida albicans*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Esse aumento da predisposição está associado a múltiplos fatores como deficiência na microcirculação, doença vascular periférica, neuropatia periférica e diminuição da resposta imune observada nos pacientes diabéticos (AHMED e GOLDSTEIN, 2006).

Testes clínicos laboratoriais tais como glicose em jejum, hemoglobina glicada, hemograma com ou sem a contagem diferencial de leucócitos são utilizados no acompanhamento do diabetes e podem ser úteis no cuidado com essas lesões cutâneas (FRYKBERG *et al.*, 2006).

O diagnóstico da neuropatia dessas feridas pode ser realizado através de vários testes sensitivos. Existem ainda os diagnósticos que são realizados pelo exame de imagem. A radiografia fornece informações anatômicas e de detecção de infecções de partes moles quando há produção de gás. A tomografia



computadorizada (TC) é indicada no caso de suspeita da patologia no osso ou na articulação não evidenciados na radiografia. A RM é preferível a TC quando se investiga osteomielite para avaliar a patologia nos tecidos moles e nos ossos. A tomografia pela emissão de pósitrons (PET) distingue osteomielite de artropatia neuropática, porém essa técnica ainda não é amplamente disponível (CAIAFA *et al.*, 2010; FRYKBERG *et al.*, 2006).

Pode ser avaliada a perfusão dos membros inferiores, utilizando-se o Doppler que identifica o grau de isquemia através da medida das pressões absolutas na extremidade inferior e também através da medida relativa comparada com o membro superior: índice tornozelo/braço. Em relação a esse método ainda há dúvidas se ele pode prever o prognóstico de hemorragias e de eventos isquêmicos. A arteriografia por punção direta é muito utilizada como ferramenta diagnóstico-terapêutica ao evidenciar o território a ser revascularizado, com detalhes de qualidade, da anatomia da doença arteriosclerótica. O exame deve estender-se até a visualização das artérias do pé e seus ramos, pois nos diabéticos é frequente o padrão de oclusão das artérias da perna, poupando as artérias dos pés (CAIAFA *et al.*, 2010; FRYKBERG *et al.*, 2006; GABRIEL *et al.*, 2010).

## **1.5 MEDICINA NUCLEAR / RADIOFARMÁCIA**

A Medicina Nuclear (MN) é uma especialidade médica que utiliza métodos cintilográficos para o diagnóstico de diversas doenças, sendo aplicada em todas as modalidades clínicas, inclusive nos diagnósticos de inflamação e infecção. A Radiofarmácia é o ramo da ciência que estuda os aspectos da química, farmacologia, bioquímica e fisiologia de compostos radioativos denominados radiofármacos que são utilizados em Medicina Nuclear, para fins de diagnóstico e tratamento de diversas doenças (THRALL e ZIESSMAN, 2003).

A cintilografia é um método de diagnóstico por imagem não invasivo de alta sensibilidade, que utiliza baixas doses de radiação, é indolor, tem custo e disponibilidade razoáveis, e permite avaliação funcional ou metabólica de órgãos ou estruturas a partir da utilização de radiofármacos (SIMON *et al.*, 2012).

Os radiofármacos são preparações farmacêuticas, sem ação farmacológica, que contém na sua composição um radionuclídeo (emissor de

radiação) capaz de permitir a detecção, e uma molécula que atua como carreador e determina localização e biodistribuição. Os radiofármacos são utilizados na dose de “traços” e por isso também são conhecidos como radiotraçadores, sendo utilizados para avaliar a fisiologia, bioquímica ou patologia no corpo humano (ARAÚJO *et al.*, 2008; HARVEY *et al.*, 2014).

As características físico-químicas do radiofármaco determinam a sua farmacocinética, isto é, a sua fixação no órgão alvo, metabolização e eliminação do organismo, enquanto que as características físicas do radionuclídeo determinam a aplicação do composto em diagnóstico ou terapia. Os mecanismos que promovem a ligação do radiofármaco ao sítio alvo podem ser diversos, envolvendo desde uma simples perfusão sanguínea do composto pelos órgãos de interesse, até a ligação a receptores celulares específicos ou participação em uma via metabólica ou processo bioquímico. Esta particularidade distingue a MN de outras técnicas como a RM ou TC que se limitam, na maioria das vezes, a obter imagens da estrutura anatômica, sem uma correlação funcional (SILVA *et al.*, 2011).

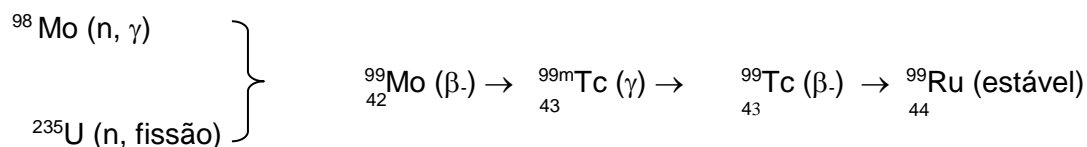
A escolha de um radionuclídeo para o desenvolvimento de um radiofármaco para aplicação em diagnóstico ou terapia em Medicina Nuclear depende principalmente das suas características físicas. Considerando todas as características desejáveis, o tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) é o radionuclídeo mais usado em medicina nuclear. As suas propriedades físicas ideais são, o tempo de meia-vida física de 6 horas, emissão de fótons de 140 keV (88%) que permite uma boa penetração tecidual e qualidade nas imagens, além disso, a boa disponibilidade através do gerador Molibdênio-99/Tecnécio-99m (KRISTEN *et al.*, 2012; TSOPELAS, 2015).

### **1.5.1 TECNÉCIO-99m**

O isótopo radioativo,  $^{99m}\text{Tc}$  foi descoberto por Perrier e Segrè (1937), num ciclotron, na Universidade da Califórnia, em Berkeley.

O isótopo metaestável  $^{99m}\text{Tc}$  é originado da desintegração de um elemento radioativo o molibdênio-99 ( $^{99}\text{Mo}$ ), isótopo este proveniente da fissão nuclear do urânio e do bombardeamento do  $^{98}\text{Mo}$  (estável) por nêutrons em um reator

nuclear (KRISTEN *et al.*, 2012; THRALL e ZIESSMAN, 2003) esquematicamente escreve-se:



### 1.5.2 O PAPEL DA MEDICINA NUCLEAR NO DIAGNÓSTICO DE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS

O estudo de processos inflamatórios em MN é de grande relevância para a clínica médica. O diagnóstico de doenças inflamatórias geralmente requer exames laboratoriais e procedimentos de imagem. A abordagem para diagnosticar uma doença inflamatória específica depende do tipo de suspeita de doença e da apresentação clínica. Portanto, o contexto em que os procedimentos de imagem são usados varia consideravelmente. As técnicas de imagem para a detecção de inflamação incluem ultrasonografia, TC, RM, técnicas endoscópicas, PET, cintilografia planar e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT). Para melhor compreender o papel dessas modalidades em relação às técnicas de MN, é importante estar ciente de suas respectivas vantagens e desvantagens (GOTTHARDT *et al.*, 2010).

O processo inflamatório é caracterizado por aumento no fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e influxo de células do plasma para o tecido. O radiofármaco usado na imagem de processos inflamatórios acumula-se no local da lesão devido às mudanças fisiológicas que ocorrem no local da inflamação. Portanto, a imagem cintilográfica não depende de alterações morfológicas e sim de alterações físico-químicas no tecido acometido. Este fato confere ao método cintilográfico a capacidade de detectar processos inflamatórios na sua fase inicial. Além disso, a cintilografia permite rastrear o corpo inteiro e determinar a extensão do processo inflamatório (BOERMAN *et al.*, 2001).

Vários radiofármacos têm sido desenvolvidos na última década, cada um com suas vantagens e limitações (Tabela 3). No diagnóstico de inflamações, o acúmulo e a retenção do radiofármaco no sítio da inflamação podem ocorrer por mecanismos específicos ou não específicos. Os processos específicos compreendem interações entre o radiofármaco e o alvo, como peptídeos quimiotáticos ou ligações anticorpo-antígeno. Os radiofármacos não específicos acumulam-se no local da inflamação devido ao aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e ao processo de transudação (CORSTENS e MEER, 1999; GOTTHARDT *et al.*, 2010; RENNEN *et al.*, 2001).

RADIOFÁRMACO	MECANISMO
$^{18}\text{F}$ -FDG	Macrófagos (células metabolicamente ativas), leucócitos
$^{99\text{m}}\text{Tc}/^{111}\text{In}$ -leucócitos autólogos	Migração ativa para os sítios da inflamação
$^{67}\text{Ga}$ -Citrato	Aumento da perfusão, extravasamento devido aumento da permeabilidade, ligação a lactoferrina
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Nanocoloides	Absorção pelos macrófagos
$^{99}\text{Tc}/^{111}\text{In}$ - proteínas (IgG)	Extravasamento (aumento de perfusão e permeabilidade dos vasos)

Tabela 2- Mecanismo de acumulação dos radiofármacos no tecido inflamado

Fonte: GOTTHARDT *et al.*, 2010 modificado

### 1.5.3 RADIOFÁRMACOS CONVENCIONAIS UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS

#### Leucócitos radiomarcados

Em 1976, McAfee e Thakur descreveram seus estudos com um quelato lipofílico, a oxima, que forma um complexo lipofílico com o  $^{111}\text{In}$  capaz de atravessar livremente a membrana celular. No interior da célula, o complexo  $^{111}\text{In}$ -oxima dissocia-se e o  $^{111}\text{In}$  liga-se de forma irreversível a componentes citoplasmáticos, não sendo liberado com o tempo.

Em 1986, Peters e colaboradores descreveram a marcação de leucócitos com o complexo lipofílico  $^{99m}\text{Tc}$ -Hexametilpropilenoamina oxima (HMPAO). Devido ao seu caráter lipofílico e a ausência de carga, o complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO penetra na membrana celular permanecendo no interior da célula por um determinado tempo (ENGRONYAT *et al.*, 2005). A meia vida no sangue é de 4 horas e o composto normalmente acumula-se de maneira fisiológica no cérebro, fígado, baço, medula óssea, rins e trato gastrointestinal (SIGNORE *et al.*, 2002).

O complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO é um marcador indiscriminado, ou seja, é capaz de marcar qualquer tipo de célula. Portanto, é imprescindível utilizar técnicas de separação celular para que se obtenha uma alta porcentagem de granulócitos para serem marcados. Para a realização da cintilografia podem ser utilizados os leucócitos, ou apenas os granulócitos. Com o procedimento de marcação habitual alguns poucos granulócitos são danificados, eles são eliminados rapidamente da circulação depois da sua reinjeção (ENGRONYAT *et al.*, 2005).

As principais aplicações atuais são as doenças inflamatórias do intestino, tais como retocolite ulcerativa, osteomielite, febre de origem indeterminada, e diagnóstico infeccioso do pé diabético (FILIPPI *et al.*, 2009). Entretanto, não existe relato na literatura com relação ao emprego deste procedimento na avaliação das alterações que ocorrem na pele devido a DAP associada ao DM.

O Etilenodicitestinato de dietila (ECD) apresenta características similares ao HMPAO como caráter lipofílico, estabilidade e pequeno tamanho. Ambos são metabolizados dentro da célula cerebral e apresentam boa extração e boa taxa de retenção. Se comparados, o ECD apresenta duas vantagens em relação ao HMPAO: maior estabilidade *in vitro* e uma depuração dos tecidos extra cerebrais mais rápida. O ECD tem sido amplamente utilizado para imagens do fluxo cerebral (ASENBAUM *et al.*, 1998). O ECD é outro radiofármaco que também pode ser utilizado para a marcação de leucócitos (COUTINHO, 2015).

O uso dos leucócitos radiomarcados para identificar o processo antes da abertura da ferida diabética é interessante pois as características do processo inflamatório permitem que eles se acumulem no local da lesão devido às mudanças fisiológicas que ocorrem.

## 1.6 MODELOS ANIMAIS DE DIABETES:

Além da predisposição genética associada, o risco de desenvolvimento do diabetes também está relacionado a fatores ambientais. O que faz com que a patogênese da doença ainda não tenha sido completamente elucidada (SRINIVASAN *et al.*, 2005).

Os modelos animais de diabetes são amplamente utilizados a fim de se obter esclarecimentos sobre os principais mecanismos moleculares, bem como a função de cada um dos mediadores envolvidos na fisiopatologia, assim como possibilidades de tratamentos das complicações e ainda desenvolvimento de novos fármacos (CESARETTI *et al.*, 2006; KIRSTEN *et al.*, 2010).

Apesar de existirem diversos modelos animais de DM (Tabela 3), tanto espontâneos quanto induzidos, eles não são capazes de simular de maneira fiel a patogênese observada em humanos. Assim sendo, o melhor modelo deve ser escolhido a partir da definição do que se deseja observar no experimento (CORREIA-SANTOS *et al.*, 2012; KIRSTEN *et al.*, 2010).

Os modelos animais classificados como espontâneos ou geneticamente derivados podem ser obtidos a partir de mutações genéticas que são repassadas de geração a geração, tais como os camundongos db/db e os camundongos ob/ob (SRINIVASAN *et al.*, 2005). Esses animais desenvolvem diabetes espontaneamente e tem a causa predominantemente genética, diferente do observado nos humanos com DM2, onde outros fatores de risco externos como obesidade, qualidade de vida e envelhecimento estão diretamente relacionados ao surgimento da doença (MARQUES-LOPES *et al.*, 2004, NOLAN *et al.*, 2011).

Os modelos que utilizam animais transgênicos ou knockouts proporcionam excelente oportunidade para investigação da função de produtos genéticos específicos, avaliação da influência da depleção de determinados genes, bem como da ativação de vias metabólicas específicas. Portanto, esses modelos são úteis para pesquisar sobre a influência dos genes na patogênese do DM2 e na busca de novos alvos moleculares para o tratamento da doença. (BIRNBAUM, 2001; LIVINGSTON, 1999; NANDI *et al.*, 2004).

Os modelos de indução química de diabetes podem ser realizados de duas maneiras. A primeira utiliza altas doses de estreptozotocina (STZ), que é uma glicosamina-nitrosureia com propriedades diabetogênicas, capaz de causar

hiperglicemia principalmente pela sua ação citotóxica direta sobre as células beta pancreáticas. Esta é a principal droga utilizada na indução do diabetes tipo 1 (QUONDAMATTEO, 2014; SRINIVASAN *et al.*, 2005). Uma segunda forma, é utilizar o aloxano, uma pirimidina com estrutura semelhante ao ácido úrico e à glicose, que age destruindo seletivamente as ilhotas pancreáticas beta levando à deficiência de insulina, hiperglicemia e cetose (QUONDAMATTEO, 2014; RERUP, 1970; SRINIVASAN *et al.*, 2005).

Os mecanismos de ação desses modelos não são bem compreendidos, porém sabe-se que não podem ser usados como modelo de DM2, pois a hiperglicemia induzida não é decorrente de um quadro de resistência insulínica (MALAISSE, 1982; PORTHA *et al.*, 1989; SRINIVASAN *et al.*, 2005). Modelos de diabetes induzidos quimicamente são comuns na elucidação da possível influência dos fatores ambientais nos processos destrutivos pancreáticos endócrinos e, conseqüentemente, no desenvolvimento de diabetes (SRINIVASAN *et al.*, 2005).

Os modelos animais de diabetes induzido pela dieta são possíveis devido a manutenção de condições ambientais adequadas e controladas para os animais. São utilizados elevados teores de carboidratos e gorduras para o desenvolvimento de obesidade e, conseqüentemente, levam ao DM2. Desta forma, esses modelos manifestam a maioria dos traços característicos dos pacientes com predisposição para desenvolver DM2 quando se tornam obesos (SRINIVASAN *et al.*, 2005), sendo útil devido à sua semelhança com as respostas metabólicas na obesidade humana (TSCHÖP e HEIMAN, 2001). Assim sendo, o modelo caracteriza-se, por obesidade, hiperinsulinemia, resistência à insulina e intolerância à glicose, além de resistência periférica a leptina, sendo capaz ainda de manifestar essas características associadas aos pacientes com predisposição genética (CESARETTI *et al.*, 2006; SRINIVASAN *et al.*, 2005; WINZELL e AHREN, 2004).

CLASSIFICAÇÃO	MODELOS DM2 OBESOS	MODELOS DM2 NÃO OBESOS
Espontâneos ou geneticamente derivados	Camundongos ob/ob Camundongos db/db Camundongos KK Camundongos NZO Camundongos NONcNZO10 Camundongos TSOD Camundongos M16	Camundongo ALS/Lt Camundongo mutante (Akita)
Induzido por dietas	Camundongos C57BL/6 Camundongos Spiny Rato Sand	
Quimicamente induzidos	Camundongos tratado com GTG	Baixas doses de aloxano ou STZ em camundongos e ratos
Animais transgênicos ( <i>knock-out</i> )	Camundongos <i>Knock-out</i> no receptor $\beta$ 3 Camundongos <i>Knock-out</i> UCP1	Camundongo transgênico ou <i>Knock-out</i> envolvendo genes da insulina ou receptor de insulina (IRS-1, IRS-2, GLUT-4)

Tabela 3- Modelos animais de indução de diabetes

Fonte: SRINIVASAN *et al.*, 2005 - MODIFICADO

O DM2 é um distúrbio metabólico complexo no qual fatores genéticos e ambientais interagem e contribuem para o estabelecimento da doença. Devido à variedade de impacto desses fatores, o DM2 pode manifestar-se em várias condições clínicas e fisiopatológicas.

Modelos animais de DM2 só podem representar alguns dos fenótipos que são prevalentes em humanos. Como a obesidade é um dos principais fatores ambientais predisponente ao DM2, embora não seja uma condição determinante, a capacidade de um animal para desenvolver em primeiro lugar a obesidade, para finalmente desenvolver diabetes, é um dos critérios mais importantes utilizados para selecionar um modelo (CHATZIGEORGIU *et al.*, 2009).

A utilização de modelos animais diabéticos relacionados com estudos de isquemia utilizando a oclusão da artéria femoral são raros (COUTINHO, 2015;



LIMA, 2015). A avaliação da pele íntegra após essa indução foi feita apenas para DM1 (COUTINHO, 2015).

## 2 JUSTIFICATIVA

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica caracterizada pelo aumento dos níveis de glicemia (hiperglicemia) e associada a inúmeras complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e membros inferiores. O DM é consequência de defeitos na secreção e/ou na ação da insulina envolvendo processos patogênicos específicos, por exemplo, destruição das células beta do pâncreas, resistência à ação da insulina, distúrbios da secreção da insulina, entre outros. Desde 1980 o número de pessoas vivendo com diabetes quadruplicou e alcançou os 422 milhões de pessoas em 2014, especialmente em países em desenvolvimento de acordo com dados da OMS. Além disso, é previsto aumento de 114% na incidência de diabetes até 2030, o que faz com que a doença seja considerada uma epidemia mundial, que acomete crianças, jovens, adultos e idosos e, conseqüentemente, um sério problema de saúde pública. O DM é uma doença multifatorial e a previsão de progressão alarmante para os próximos anos pode ser explicada principalmente devido ao estilo de vida moderno pouco saudável, com o aumento do sedentarismo e da obesidade, além do envelhecimento da população. O DM2 tornou-se uma das doenças crônicas mais comuns do mundo, presente em 90% a 95% dos casos, essa alta prevalência associada ao fato de que o desenvolvimento do DM impacta negativamente a vida do indivíduo, além de provocar reflexos na sociedade e na economia dos países, demonstram a importância do estudo dessa doença.

Avaliando as possíveis complicações do DM, as lesões cutâneas, caracterizadas pelo aparecimento de feridas de difícil cicatrização e passíveis de infecção, são de extrema relevância devido sua alta incidência e por serem a principal causa de internação dentre os pacientes diabéticos. Os riscos associados à diabetes são muito maiores, com risco de amputação maior em torno de cinco vezes em pacientes diabéticos do que em indivíduos sem diabetes. O impacto socioeconômico é grande, incluindo gastos com tratamentos, internações prolongadas e recorrentes, incapacitações físicas, além dos prejuízos econômicos, como a perda de emprego e produtividade. Para o paciente prejudica diretamente a vida pessoal, afetando a autoimagem,

autoestima, papel na família e sociedade e, em consequência da limitação física, pode haver um isolamento social.

O diagnóstico desta complicação do DM é realizado por meio de inúmeros testes, dependendo de sua origem neuropática, isquêmica ou neuro-isquêmica. Esse diagnóstico é demorado e muitas vezes tardio, pois requer o aparecimento de sintomas nos pés como as úlceras, seguidas ou não de infecção, ou as deformidades anatômicas, sendo que nos casos mais graves, naqueles associados à isquemia, muitas vezes, o quadro pode evoluir rapidamente para a gangrena, amputação do membro e morte.

Não há relatos na literatura da avaliação da pele íntegra do membro posterior após isquemia em modelos animais de diabetes tipo 2 induzido por dieta hiperlipídica. Diante desse contexto, torna-se interessante que novos estudos sejam realizados para o melhor entendimento das alterações provocadas devido ao evento isquêmico. Com isso, o presente trabalho tem como proposta investigar alterações que ocorrem na pele íntegra de membros posteriores de animais DM2, após oclusão da artéria femoral. Espera-se com os resultados desse trabalho identificar, precocemente, o processo inflamatório antes da abertura da ferida diabética isquêmica.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o potencial do uso de leucócitos radiomarcados com  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD como método para identificação do processo inflamatório na pele de membros posteriores isquêmicos em modelo pré-clínico de diabetes do tipo 2 induzido por dieta hiperlipídica.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar os efeitos da ingestão de dieta hiperlipídica a 60% sobre:
  - O estado nutricional (peso corporal e consumo alimentar), o índice de adiposidade e parâmetros bioquímicos/metabólicos (níveis sanguíneos de glicose, colesterol e triglicérides);
  - A sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose;
  - A contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico.
  
- Avaliar o fluxo sanguíneo de membros posteriores após a oclusão permanente da artéria femoral (OAF) de animais alimentados com dieta padrão controle (grupo não diabético – ND) ou dieta hiperlipídica a 60% (grupo diabético – D);
  
- Avaliar a expressão de HIF1a na pele íntegra de membros posteriores após a OAF de animais não diabéticos e com diabetes do tipo 2 induzida por dieta hiperlipídica a 60%;
  
- Analisar a ocorrência de alterações inflamatórias na pele íntegra de membros posteriores após a OAF em animais não diabéticos e com diabetes do tipo 2 induzida por dieta hiperlipídica a 60%, especificamente sobre:
  - Os níveis da citocina pró-inflamatória TNF $\alpha$ ;
  - O conteúdo de neutrófilos e de macrófagos por meio de dosagens de biomarcadores enzimáticos.

- Avaliar a captação dos  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD-leucócitos na pele do membro posterior isquêmico nos animais não diabéticos e com diabetes do tipo 2 induzida por dieta hiperlipídica a 60%.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com idade de 8 semanas, obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG. Os animais foram mantidos sob condições controladas de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h) e temperatura (24°C), e com livre acesso às rações específicas de cada grupo e água. Esse projeto foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG), Protocolo nº 358/2016.

### 4.2 MODELO DE INDUÇÃO DE DIABETES POR DIETA HIPERLIPÍDICA

Foram utilizados 45 animais (n=45) com 8 semanas de idade. Destes animais, 25 foram submetidos a dieta hiperlipídica (60% de gordura) para desenvolver o DM2, de acordo com o protocolo utilizado por Souza *et al.* (2013) por 12 semanas consecutivas. Ao completar a 12ª semana de dieta, foi realizado o teste de tolerância a glicose (TTG) e teste de sensibilidade a insulina (TSI), utilizando glicosímetro e fitas reagentes. Os animais com resultados positivos foram selecionados para os experimentos. Os animais do grupo controle, não diabéticos, receberam a dieta padrão AIN95M.

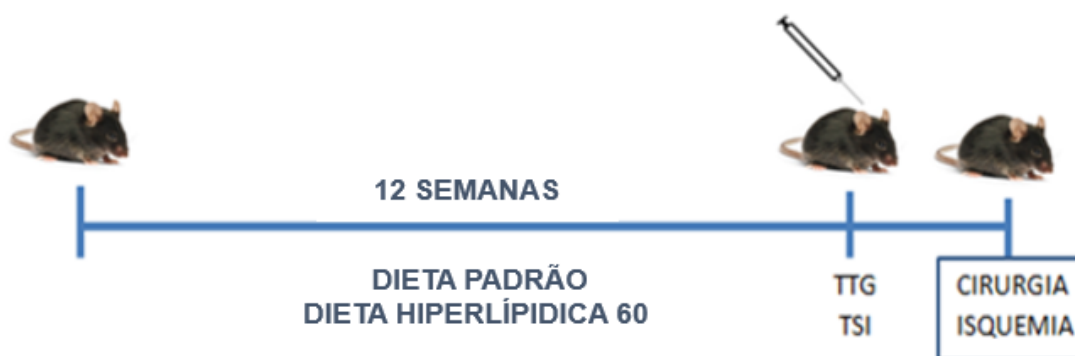


Figura 7- Modelo animal

Após os testes confirmatórios da indução do diabetes, dos 45 animais, 25 animais diabéticos e os 20 não diabéticos foram submetidos à isquemia dos membros posteriores.

### 4.3 PREPARO DAS DIETAS

As dietas dos animais foram preparadas de acordo com LIMA, 2015. O grupo controle recebeu uma dieta padrão (Purina – Labina®), utilizado para manutenção dos animais (7,8% lipídeo, 50,3% carboidrato e 41,9% de proteína). Os animais diabéticos receberam uma dieta obesogênica. Para cada quilo preparado de ração, foram utilizados 0,014 g de hidroxitolueno butilado, 2,5 g de bitartarato de colina, 3 g de cistina, 10 de mix vitamínico AIN93M, 35 g de minerais AIN93M, 50 g de celulose, 62 g de amido, 200 g de caseína, 20 g de óleo de soja, 310 g de groselha, 355 g de banha de porco. Todos os ingredientes foram misturados em uma vasilha, em seguida foram peneirados para garantir uma mistura homogênea. Após peneirar, a ração foi colocada em pequenos potes dentro da gaiola, devido sua consistência pastosa.

<b>INGREDIENTES</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>HIPERLIPÍDICA 60 (g)</b>
	<b>(g)</b>	
<b>Amido de milho</b>	465,7	62
<b>Caseína</b>	140	200
<b>Amido dextrinizado</b>	155	0
<b>Sacarose</b>	100	0
<b>Óleo de soja</b>	40	20
<b>Fibra</b>	50	0
<b>Mix de minerais</b>	35	35
<b>Mix de vitaminas</b>	10	10
<b>L-Cistina</b>	1,8	3
<b>Bitartarato de colina</b>	2,5	2,5
<b>Tetrabuil-hidroquinona</b>	0,008	0,014
<b>Groselha</b>	0	310
<b>Banha de porco</b>	0	355

Tabela 4- Preparo das dietas padrão e DH60  
(LIMA, 2015)

#### 4.4 TESTES DE TOLERÂNCIA INTRAPERITONEAL À GLICOSE (TTG)

Após 12 semanas de tratamento com a dieta indutora de resistência à insulina os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose e resistência à insulina (Figura 8).

Após o período de jejum de 12 horas foi injetado via intraperitoneal uma solução de 25% de glicose preparada em salina 0,9% estéril na dose de 2 g de glicose/kg de peso corporal do animal. Após pequeno corte na ponta da cauda do animal, o sangue foi coletado e utilizado para quantificação de glicose nos intervalos de 0 (antes da administração de glicose), 15, 30, 60 e 90 minutos utilizando fitas reagentes e glicosímetro (LIMA, 2015).

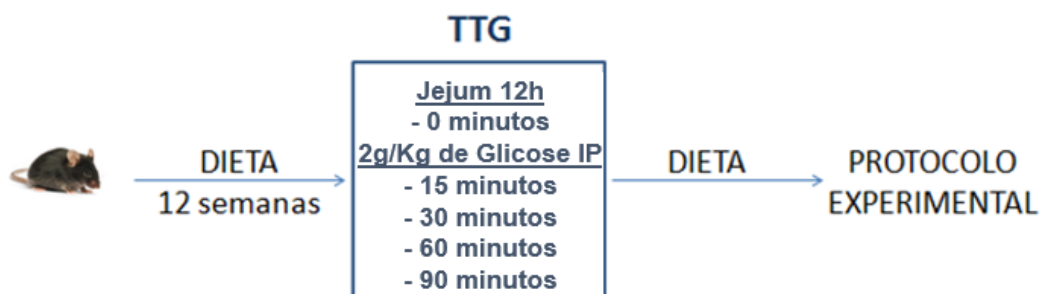


Figura 8- Protocolo de tolerância à glicose

Os animais que se tornaram resistentes foram selecionados e utilizados no experimento. Os animais que receberam a dieta controle também passaram pelos testes.

#### 4.5 TESTES DE SENSIBILIDADE INSULÍNICA (TSI)

O teste de sensibilidade insulínica (TSI) foi realizado dois dias após a realização do TTG com os animais alimentados. Foi administrado 0,75 U de insulina/kg de peso corporal para cada animal, via intraperitoneal. O sangue foi coletado para quantificação de glicose após pequeno corte na ponta da cauda do animal nos intervalos de 0 (antes da administração de insulina), 30, 60, 90 e 120 minutos decorridos a partir da aplicação (Figura 9) (LIMA, 2015).



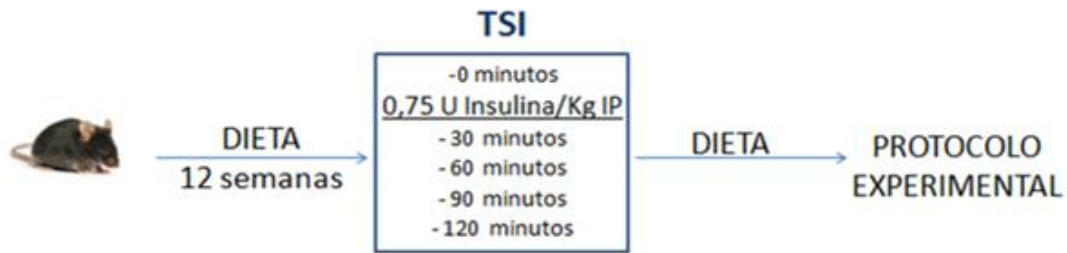


Figura 9- Protocolo de resistência à insulina

#### 4.6 PESO CORPORAL E PESO DE TECIDO ADIPOSEO

Para determinação do ganho de peso, os animais foram pesados sempre no mesmo horário, vezes por semana duas. A massa adiposa foi avaliada através da coleta e pesagem do tecido adiposo epididimal, mesentérico e o retroperitoneal após eutanásia dos animais. O peso do tecido adiposo foi corrigido pelo peso corporal (LIMA, 2015).

#### 4.7 INGESTÃO ALIMENTAR

A ração foi pesada em balança semi-analítica duas vezes por semana. A pesagem era feita antes e depois de acrescentar mais ração e então pela diferença entre a quantidade de ração administrada e o que sobrou, calculava-se a quantidade de ração ingerida por cada gaiola na semana. Foi necessária a correção da quantidade de comida ingerida por caixa: onde a quantidade ingerida de comida na semana foi dividida pelo número de animais da caixa, dividido pela quantidade de dias na semana (LIMA, 2015).

#### 4.8 ANÁLISE BIOQUÍMICA

No dia da eutanásia, os animais foram submetidos a 8 horas de jejum e o sangue foi coletado no plexo braquial e colocado em eppendorffs, que passaram por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o soro foi transferido para um novo tubo para ser utilizado na próxima etapa. As dosagens realizadas foram de colesterol plasmático, triglicerídeos e glicose, utilizando kits comerciais

(enzimáticos colorimétricos - Labtest) de acordo com a bula e normas do fabricante, a leitura foi realizada por espectrofotometria.

#### 4.9 MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA

O modelo experimental de isquemia de membro posterior utilizado no trabalho foi o modelo de oclusão unilateral permanente da artéria femoral (OAF) comum esquerda, adaptado de Barcelos *et al.*, 2009. Para o procedimento cirúrgico, os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal com xilazina (10 mg/kg) e cetamina (100 mg/kg), submetidos à tricotomia e à assepsia da região inguinal dos membros posteriores. No membro posterior do lado esquerdo a artéria femoral foi exposta e dissecada até a região da artéria poplítea, amarrada por dois nós (fio de nylon 6-0); em seguida a região entre os nós foi eletrocoagulada (eletrocoagulador Deltronix, Brasil). No membro posterior do lado direito (contralateral) também foi feita uma abertura da pele e as incisões foram suturadas também com fio de nylon 5-0. Após as suturas foi feita novamente a assepsia do local e os animais foram mantidos sob aquecimento artificial até a completa recuperação. Os dias escolhidos para as análises foram baseados no tempo de fechamento das feridas diabéticas isquêmicas, de acordo com o trabalho publicado por (BARCELOS *et al.*, 2009).

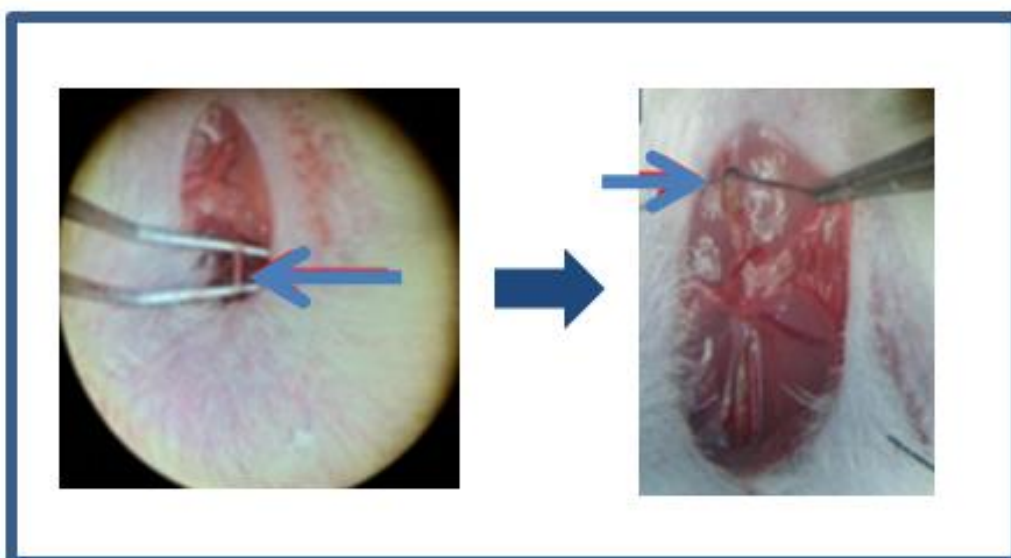


Figura 10- Cirurgia de Oclusão da Artéria Femoral. Modelo animal de isquemia de membros posteriores.

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO HEMODINÂMICA PÓS-ISQUÊMICA

O fluxo sanguíneo dos membros posteriores de camundongos anestesiados foi escaneado, antes (condição basal) e imediatamente após a oclusão unilateral da arterial femoral através de imagem de perfusão por laser Doppler (Moor Instruments, UK). Os animais foram mantidos à temperatura constante de 37°C por 5 minutos antes e durante as mensurações.

O equipamento de imagem de perfusão por Laser Doppler (MoorLDPI-2, Inglaterra) é utilizado para o monitoramento não-invasivo (e sem contato físico) da circulação sanguínea, permitindo a avaliação do fluxo sanguíneo na microcirculação (Figura 11). A técnica permite o acompanhamento de alterações no fluxo de uma área ao longo do tempo ou a avaliação de diferenças no fluxo entre mais de uma área.



Figura 11- Equipamento de imagem de perfusão por laser Doppler (MoorLDPI-2, Inglaterra).  
Laboratório de Angiogênese e Células Tronco/UFMG.

#### 4.11 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NO SANGUE

A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer. A contagem total do número de células foi feita nos quatro quadrantes das duas câmaras de contagem seguindo sempre a mesma direção para que a mesma célula não fosse contada duas vezes. Para preparo das células antes da contagem, 5  $\mu$ L

de sangue da cauda do animal foi retirado e diluído em 45  $\mu$ L de solução de Turk (ácido acético 2% com azul de metileno) que atuou lisando as hemácias que não seriam contadas. Essa solução de células e Turk foi então homogeneizada e 10  $\mu$ L desta colocada em cada um dos lados da câmara de Neubauer para contagem com auxílio do microscópio óptico (Olympus, Philippines), no aumento de 40x. Foram feitas duas contagens e a média do número de células calculada.

Para realização da contagem diferencial dos leucócitos também foram retirados 5  $\mu$ L de sangue da cauda dos animais e realizado um esfregaço sanguíneo em uma lâmina de vidro. Após secagem do esfregaço foi então corado com a coloração do Panótico. Após as lâminas serem confeccionadas e coradas, foi realizada a contagem diferencial das células em neutrófilos, linfócitos e monócitos, com o auxílio do microscópio ótico. Foi contado um total de cem células e o valor expresso em porcentagem.

## **4.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HIF1 NA PELE ÍNTEGRA DE MEMBROS POSTERIORES POR PCR TEMPO REAL**

### **4.12.1 EXTRAÇÃO DE RNA**

As amostras de pele foram retiradas e uma quantidade entre 50 a 100 mg de cada amostra foi separada, armazenada em eppendorfs contendo um volume de 0,75 mL de TRIzol®. Em seguida, foram homogeneizadas no vortex e, por fim, congeladas utilizando nitrogênio líquido para posterior utilização. Para a realização da extração de RNA, as amostras foram descongeladas e novamente homogeneizadas no vortex. Inicialmente, em cada eppendorf foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio e as amostras homogeneizadas no vortex por 15 segundos e então, incubadas por 15 minutos no gelo. Decorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C, e então o sobrenadante foi removido e coletado em outro eppendorf para dar continuidade ao processo. Na próxima etapa foi adicionado 0,5 mL de isopropanol, as amostras incubadas por 10 minutos no gelo e então centrifugadas em 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então desprezado e ao pellet adicionados 1 mL de álcool e as amostras foram novamente homogeneizadas no vortex por 30 segundos. Por fim foram centrifugadas a 7.500 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante

descartado. Os eppendorfs contendo o pellet foram posicionados virados para baixo, para poder secar por 10 minutos. Decorrido esse tempo o pellet de RNA foi ressuspensionado com 40  $\mu$ L de água livre RNase e incubado a 60°C por 15 minutos.

#### 4.12.2 QUANTIFICAÇÃO DE RNA

Uma alíquota de 1  $\mu$ L de cada amostra de RNA total foi quantificada através de leitura em espectrofotômetro (Nanovue) usando-se comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. A pureza das amostras foi verificada a partir da relação 260/280 nm, considerando a relação (260/280) das densidades ópticas (OD) igual ou maior que 1.8, como referência de boa qualidade para uso. A quantificação de RNA é recomendável para avaliar a qualidade do RNA extraído e verificar se este está adequado para as análises.

#### 4.12.3 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

O cDNA foi obtido utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Foi adicionada uma alíquota de 2  $\mu$ L de cada iniciador 10 $\times$  RT (RandomPrimers) em cada tubo e, em seguida, adicionado 0,8  $\mu$ L do mix RNA RT (Tabela 5). Em cada tubo de RT foram adicionados 30 ng da amostra de RNA. O volume final de reação foi de 20  $\mu$ L por tubo. Os tubos foram devidamente fechados e centrifugados. Para a síntese do cDNA a reação foi incubada a 25°C por 10 min; 37°C por 120 min; seguido de aquecimento a 85°C por 5 min para desnaturação da enzima empregada. Os tubos foram armazenados a -80°C até o momento de uso.

Componentes	Volume por reação
10 $\times$ RT Buffer	2.00 $\mu$ L
25XdNTP Mix (100 mM)	0.8 $\mu$ L
MultiScribe™ reverse transcriptase	1.00 $\mu$ L
RNase Inhibitor	0 $\mu$ L
Nuclease-freeWater	4.2 $\mu$ L
<b>TOTAL</b>	<b>8.00 <math>\mu</math>L</b>

Tabela 5: Preparo do mix de RT- PCR.

#### 4.12.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Uma vez sintetizado, este cDNA foi submetido à amplificação pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para quantificação relativa da expressão de HIF1 utilizando o sistema Syber Green (Life) conforme protocolo. A PCR foi realizada no equipamento Step one Real Time PCR System (Applied Biosystems). A quantificação de cada amostra foi realizada em duplicata e o método utilizado foi o de comparação de  $\Delta\Delta C_T$ . O gene m 18s foi usado como controle endógeno da reação (Tabela 6).

<b>m 18s</b>
FW: 5'- GCA ATT ATT CCC CAT GAA CG -3'
RV: 5'- TTG GAT GGT TTA GTG AGG CC -3'
<b>HIF1</b>
FW: 5'- TCA AGT CAG CAA CGT GGA AG -3'
RV: 5'- TAT CGA GGC TGT GTC GAC TG -3'

Tabela 6: Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para o PCR em tempo real.

Na ativação da polimerase o equipamento foi programado para aquecer até 95°C por 10 minutos, em seguida foram feitos 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos), anelamento e amplificação (60°C por 1 minuto). A quantificação relativa descreve mudanças de nível de expressão de um gene de interesse em uma amostra teste, relacionando esses valores a uma amostra utilizada como referência (calibrador). Após o processo de amplificação, as amostras foram submetidas a curva melt que representa a temperatura na qual a metade das fitas de cDNA está na forma de fitas simples e a outra metade na forma de dupla hélice.

#### 4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE N-ACETIL-B-D-GLICOSAMINIDASE (NAG) – PRESENÇA DE MACRÓFAGOS

A atividade da enzima NAG foi avaliada para quantificação da presença de macrófagos na pele. Inicialmente foi feito o processamento da pele que consistiu na homogeneização das amostras, previamente coletadas e pesadas nos dias 1, 3 após a realização da isquemia, em solução salina 0,9%/ Triton x-100 0,1%

v/v. Em seguida esse homogeneizado foi centrifugado e o sobrenadante foi coletado. Para o ensaio enzimático, as amostras foram diluídas em tampão citrato/fosfato, pH 4,5. Às amostras diluídas, foi adicionado o substrato P-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminida (Sigma) também diluído em tampão citrato/fosfato (pH 4,5), seguindo-se um período de incubação a 37°C por 10 minutos. Após esse intervalo, a reação foi interrompida através da adição de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6). A leitura da absorbância foi realizada em 400 nm (COUTINHO, 2015; LIMA, 2015).

#### **4.14 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO) – PRESENÇA DE NEUTRÓFILOS**

A atividade de MPO foi utilizada como índice da presença de neutrófilos. As amostras de pele foram previamente coletadas e pesadas nos dias 1 e 3 após a isquemia, e então foram homogeneizadas em tampão fosfato (pH 4,7) e por fim centrifugadas. Ao precipitado remanescente foi adicionado NaCl 0,2% p/v e após incubação, foi então adicionado NaCl 1,6%, glicose 5% p/v e as amostras novamente centrifugadas. O precipitado foi ressuscitado em brometo de hexadeciltrimetilamonio 0,5% diluído em tampão fosfato (pH 5,4). Após homogeneização às amostras sofreram processo de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido. Para o ensaio enzimático, foi adicionado as amostras o substrato TMB diluído em DMSO seguindo-se um período de incubação. Após esse período, foi adicionado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,003% e as amostras novamente incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida, a reação foi interrompida através da adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4M. A leitura da absorbância foi realizada em 450 nm (COUTINHO, 2015; LIMA, 2015).

#### **4.15 DOSAGEM DA CITOCINA TNF $\alpha$**

Para avaliar a expressão do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), as amostras de pele do membro posterior foram ressuscitadas em 1,0 mL/100 mg de solução Tampão de extração de citocinas (PBS contendo inibidor de proteases: PMSF 0,1mM, cloreto de benzetônio 0,1mM, EDTA 10mM e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% Tween-20. Em seguida, os homogeneizados foram

centrifugados a 4°C por 10 minutos a 10000 rotações por minuto (rpm) e os sobrenadantes coletados e armazenados a -20°C para posterior dosagem. Os kits para citocinas foram obtidos da R&D System® e as instruções do fabricante para a realização dos ensaios foram seguidas para as dosagens de TNF $\alpha$  pelo método de ELISA (COUTINHO, 2015).

#### **4.16 MARCAÇÃO DOS LEUCÓCITOS COM <sup>99m</sup>Tc-ECD**

##### **4.16.1 ISOLAMENTO DOS LEUCÓCITOS DO SANGUE TOTAL**

O sangue total coletado para o isolamento dos leucócitos totais foi retirado através do corte do plexo braquial dos camundongos. O sangue foi então colocado em um tubo de fundo cônico (Falcon) de 15,0 mL estéril contendo 3,0 mL do anticoagulante EDTA e o volume foi completado com uma solução de lise de hemácias ACK (da expressão Ammonium-Chloride-Potassium). O tubo Falcon foi homogeneizado por 3 minutos, e em seguida foi centrifugado a 1600 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Desprezou-se o sobrenadante e o volume foi completado novamente com ACK. O procedimento foi repetido a fim de lisar mais hemácias e obter um sedimento mais puro. Após desprezar novamente o sobrenadante, foi acrescentado 13,0 mL de PBS, homogeneizado e centrifugado a 1600 rpm durante 10 minutos a 4°C pela última vez. O sedimento de leucócitos obtido, foi ressuspenso com 500  $\mu$ L de PBS, obtendo-se dessa forma uma suspensão de leucócitos que foi posteriormente marcada com <sup>99m</sup>Tc-ECD (COUTINHO, 2015).

##### **4.16.2 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR**

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do corante azul de Tripano na câmara de Neubauer. Foi realizada após a separação dos leucócitos do sangue total e após marcação dos leucócitos com <sup>99m</sup>Tc-ECD. Neste método tem-se a diferenciação das células viáveis e não viáveis, pois as células mortas coram-se de azul uma vez que sua membrana se torna permeável ao corante, enquanto que a membrana das células viáveis não. Ao visualizar as células ao microscópio, observam-se as células mortas coradas em azul e as



vivas transparentes. Para o cálculo do percentual de células viáveis, a média de células vivas foi dividida pela média total de células (vivas e mortas) contadas na câmara de Neubauer. O valor obtido foi multiplicado por 100 e, dessa forma, a viabilidade é dada em porcentagem.

$$\text{Viabilidade} = \frac{\text{Células vivas}}{\text{Células totais}} \times 100$$

A viabilidade celular deve ser maior que 85%, garantindo que o procedimento utilizado para o isolamento dos leucócitos totais foi executado da maneira correta (COUTINHO, 2015).

#### **4.16.3 MARCAÇÃO DO ETILENODICISTEÍNA DIETIL ÉSTER (ECD) COM <sup>99m</sup>Tc**

A marcação foi realizada de acordo com a bula desenvolvida pela fabricante. Um frasco com 1,0 mg de ECD fornecido pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN) foi colocado em uma blindagem de chumbo. A este frasco foi adicionado 1,0 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9% estéril), 1,0 mL da solução contendo tampão fosfato de sódio e uma solução de pertecnetato de sódio (Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>) contendo 1295 MBq (35 mCi) de atividade, conforme instruções contidas na bula. A solução de pertecnetato de sódio (Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>) foi obtida de uma segunda eluição recente do gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99m (IPEN/CNEN). O controle de qualidade da marcação do ECD para avaliação da pureza radioquímica foi realizado conforme instruções do fabricante. Foram utilizadas fitas de sílica gel em alumina como suporte de 1,5 cm de largura x 12,5 cm de comprimento utilizando NaCl 20% como solvente e fita de papel whatman de 1,5 cm de largura x 9,0 cm de comprimento utilizando acetato de etila:etanol (3:7) como solvente. As fitas foram cortadas no ponto 5,5 cm e a leitura foi realizada em contador de poço.

#### **4.16.4 MARCAÇÃO DOS LEUCÓCITOS**

O método utilizado para a marcação de leucócitos com <sup>99m</sup>Tc-ECD baseou-se na descrição de MARTIN-COMIN *et al.*, (2002) com modificações. No

recipiente contendo os leucócitos previamente isolados, adicionou-se por gotejamento 2,0 mL de solução de  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD contendo 1073 MBq (29 mCi) de atividade. Após cinco minutos em temperatura ambiente, adicionou-se 0,1 mL de EDTA 2,2% e incubou-se as células por 15 minutos a 37°C. As células então foram centrifugadas a 1200 rpm durante cinco minutos. Para a determinação do rendimento da marcação, retirou-se uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e 10  $\mu\text{L}$  do sedimento. As alíquotas foram contadas em um Calibrador de dose CRC-15R (Capintec - U.S.A).

#### 4.17 ESTUDO *EX VIVO* DA PELE DO MEMBRO POSTERIOR

Após marcação dos leucócitos, os animais foram anestesiados e os  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD-Leucócitos foram injetados na veia da cauda dos animais. Após 2 horas da injeção a pele do membro posterior dos animais foram retiradas, pesadas e a radioatividade foi determinada utilizando o contador de poço Wizard (Turku, Finlândia). Padrões de dose foram utilizados para corrigir o decaimento físico do  $^{99m}\text{Tc}$  e para calcular o percentual de dose injetada por grama de tecido (% DI/g), conforme a fórmula representada abaixo.

$$\% \text{ DI/g} = \frac{\text{cpm (pele/g)}}{\text{cpm do padrão}} \times 100$$

\*cpm = contagem por minuto



Figura 12- Contador de radiação gama – Wizard (Turku/Finlândia)

Fonte: Lab. de Radioisótopos/UFMG

#### 4.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados serão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados da curva tempo-resposta foram analisados utilizando o teste de análise

de variância de duas vias (two-way ANOVA), para verificar a interação entre as variáveis independentes tempo e dieta, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Para os outros dados, as comparações foram feitas utilizando a análise de variância de uma via (one-way ANOVA) para a comparação entre três ou mais grupos, seguido do pós-teste de Newman-Keuls para comparação entre os grupos. O teste *t* de Student foi realizado para a comparação entre os dois grupos. Os valores de  $p < 0,05$  serão considerados significantes.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

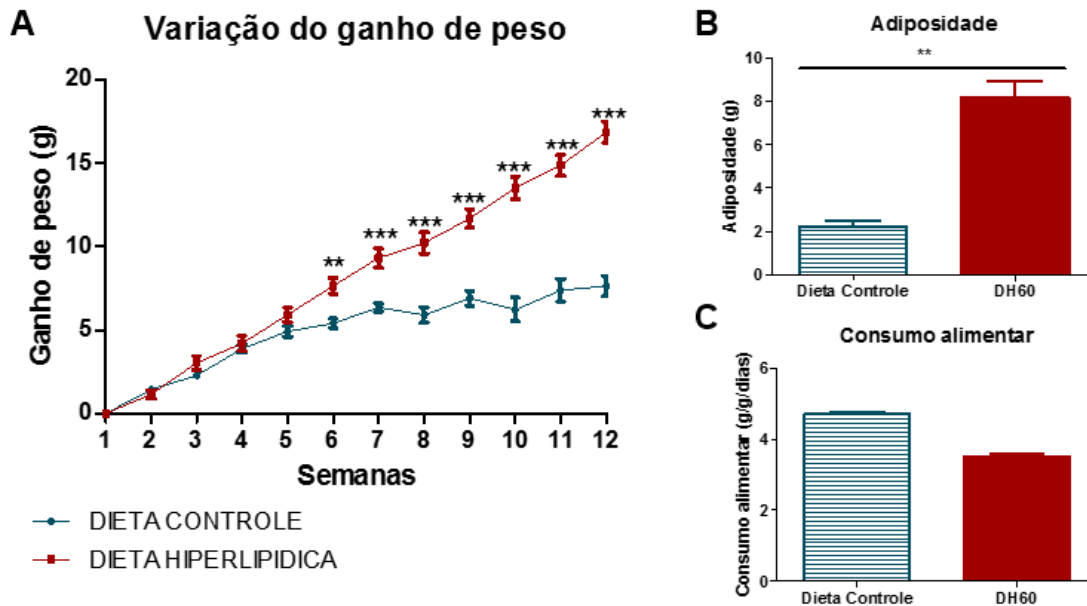
### 5.1 VALIDAÇÃO DO MODELO DE DIABETES *MELLITUS* TIPO 2.

O modelo de DM2 foi desenvolvido a partir de uma dieta contendo 60% de gordura (DH60) na sua composição de acordo com Souza et al. (2013) em camundongos machos C57BL/6. O modelo de obesidade provoca uma síndrome metabólica no animal com consequente indução de DM2 (ANDRADE *et al.*, 2014; HENRIQUE *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2015). O grupo de animais que recebeu essa dieta foi denominado Diabético (D). O grupo que consumiu a dieta padrão foi denominado Não Diabético (ND), pois a dieta ingerida não provoca nenhuma alteração metabólica. Desta forma, os animais do grupo ND foram considerados grupo controle para o DM2.

Durante as 12 semanas de dieta para indução da obesidade, os animais foram pesados duas vezes por semana para avaliação do ganho de peso induzido pelo consumo crônico das rações durante o experimento. Os resultados encontrados demonstram que após a 5ª semana de consumo, os animais que receberam DH60 começam a ganhar mais peso quando comparado aos que receberam a dieta padrão, diferença que continuou aumentando até o final do experimento (Figura 13A).

Associado ao aumento do ganho de peso do grupo D, também foi observado maior adiposidade desse grupo (Figura 13B), que foi calculada a partir da análise da gordura abdominal (inguinal, mesentérica e retroperitoneal). O resultado encontrado já era esperado devido ao alto teor de gordura presente na ração.

Por fim, a avaliação no consumo alimentar dos animais que receberam a dieta padrão e a DH60 não demonstrou diferença estatística entre os grupos (Figura 13C). Apesar das dietas possuírem composições diferentes, o que poderia provocar um consumo de ração alterado devido a palatabilidade das rações, o consumo foi o mesmo. Com isso, foi possível afirmar que todas as alterações observadas nas análises realizadas para padronização do modelo foram decorrentes da composição da dieta e não de um maior consumo de um dos grupos.

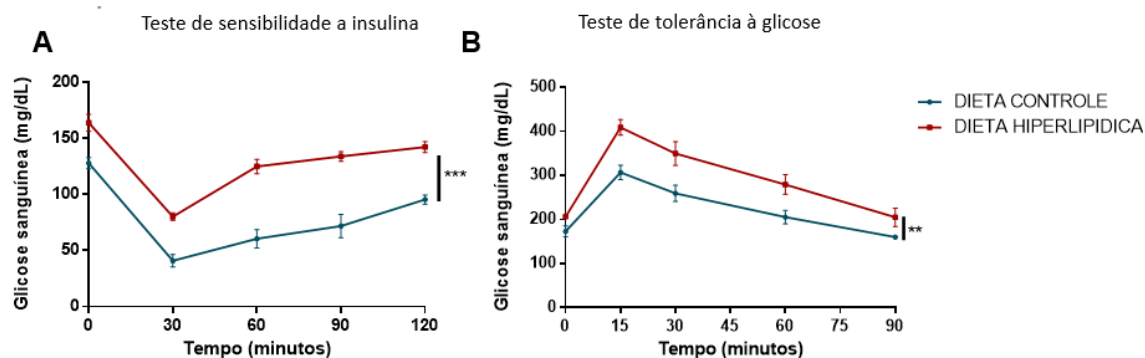


**Figura 13- Perfil corporal.** (A) Variação do ganho de peso; o peso inicial nos animais foi considerado igual a zero, para que fosse avaliado somente o peso em função das dietas. (B) Adiposidade. (C) Consumo Alimentar. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, n=5-6 animais/grupo. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Após as 12 semanas de indução do diabetes por ingestão da dieta DH60, foram realizados os TSI e TTG para validação do modelo de diabetes através do perfil glicêmico e metabólico. No TSI observou-se uma elevação mais rápida nos valores da glicemia e manutenção desses valores mais altos nos animais que receberam a DH60, em comparação ao grupo que recebeu a dieta padrão que apresentou uma recuperação mais gradual (Figura 14A).

No TTG os animais do grupo que recebeu a dieta com alto teor de lipídeos apresentaram um aumento acentuado nos valores de glicemia, demorando mais tempo para retornar aos valores iniciais, e o grupo que recebeu dieta padrão, apresentou essa resposta em tempo menor (Figura 14B). Nos dois testes foram demonstrados perfil semelhante de resposta entre os grupos, os níveis de glicose nos animais diabéticos foram sempre superiores aos valores encontrados nos animais não diabéticos, indicando maior resistência à insulina e intolerância à glicose (Figura 14). Essas alterações nas respostas glicêmicas do grupo diabético em relação ao não diabético foram relatados em outros estudos, demonstrando a capacidade do consumo crônico da dieta em induzir a obesidade, com conseqüente desenvolvimento de síndrome metabólica e

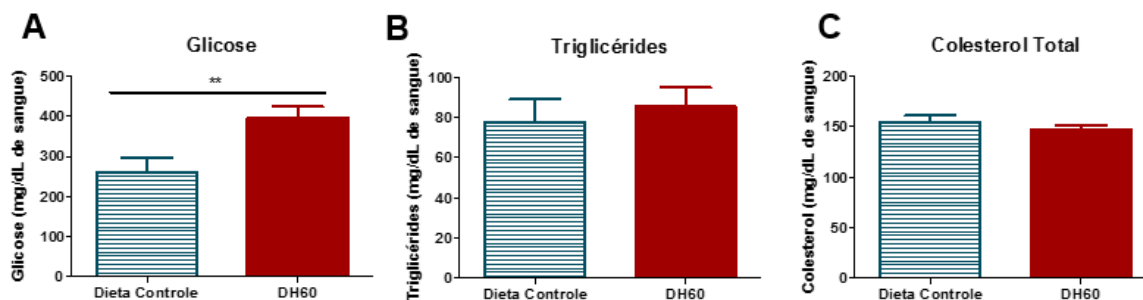
indução do DM2 (LIMA, 2015; MING ZHANG *et al.*, 2008; WINZELL e AHREN, 2004).



**Figura 14- DH60 promove resistência à insulina e tolerância à glicose.** (A) Teste de sensibilidade insulínica, (B) Teste de tolerância à glicose. Avaliação realizada para confirmar o diabetes e excluir os animais que não apresentaram resistência à insulina. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, n=5-6 animais/grupo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Testes bioquímicos também foram realizados para avaliação dos grupos do estudo. Na glicemia em jejum, observou-se que os animais que receberam DH60 apresentaram níveis glicêmicos mais elevados que o grupo que recebeu dieta controle (Figura 15A), demonstrando com isso o estado hiperglicêmico dos animais do grupo Diabético (WINZELL e AHREN, 2004). Dados da literatura descrevem que a glicemia para camundongos C57Bl/6 é de 150 a 275 mg/dL (SANTOS *et al.*, 2016). Os resultados referentes a triglicérides e colesterol total não demonstraram diferença significativa entre os grupos (Figura 15B e 15C). Uma possível explicação para esse resultado é o fato de ter sido realizada apenas a avaliação do colesterol total, sem analisar separadamente as frações. Se a análise tivesse sido realizada considerando as diferentes frações, possivelmente poderiam ter sido observadas diferenças entre os grupos. Estudos envolvendo o modelo de dieta hiperlipídica com teor de 60% de gordura em animais C57Bl/6 demonstram resultados diferentes para as análises de colesterol e triglicérides. No estudo de Lima (2016) não foi relatado diferença entre os grupos na dosagem de triglicérides e colesterol, entretanto, Lima (2015) observou diferença entre os parâmetros observados. Com isso, é possível

afirmar que esses parâmetros sofrem variações, e vários fatores como linhagem, idade, peso e período da dosagem podem influenciar essas dosagens.



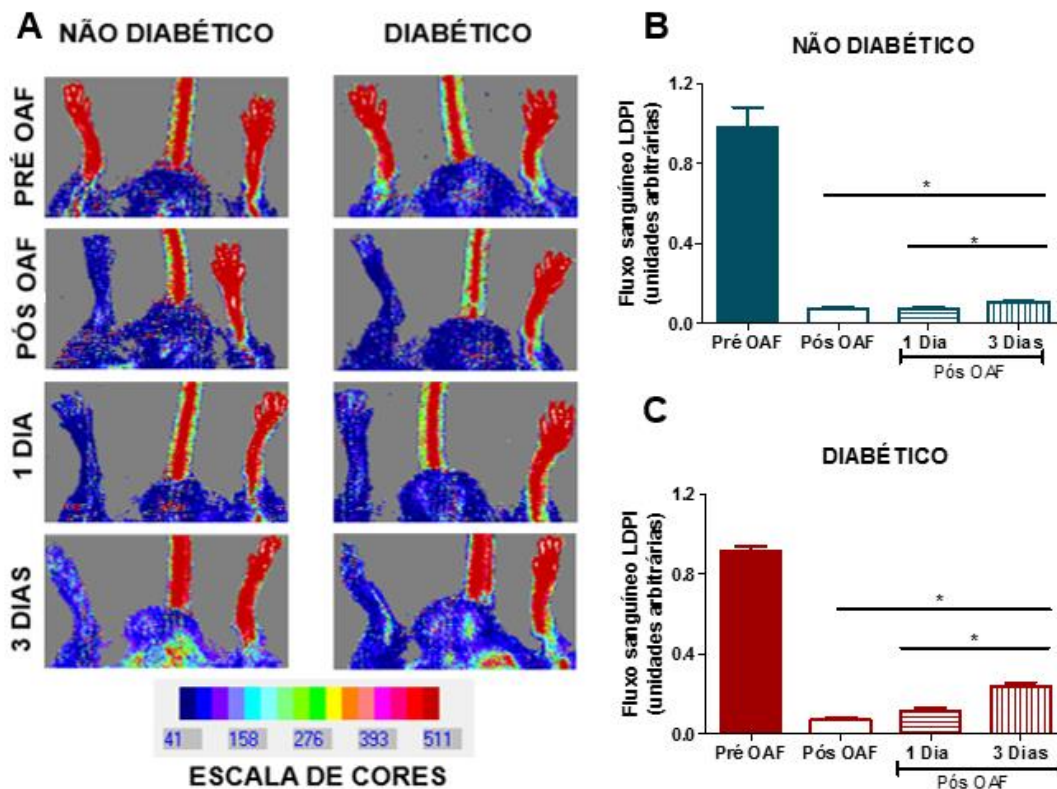
**Figura 15- Alterações bioquímicas provocadas pela DH60.** Os testes bioquímicos de (A) glicose plasmática, (B) triglicérides e (C) colesterol foram realizados 12 semanas após o início da dieta. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, n=5-6 animais/grupo. \*\*p<0,01.

Após a conclusão dessas análises foi possível afirmar que a dieta utilizada no estudo induziu distúrbios metabólicos compatíveis com o quadro de síndrome metabólica. Foram encontradas diferenças no aumento do peso, adiposidade, perfil glicêmico dos animais diabéticos em comparação aos não diabéticos. Esse perfil alterado provocado por dietas hiperlipídicas já é descrito na literatura sendo utilizado como modelo de diabetes (ANDRADE *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015; WINZELL e AHREN, 2004), e devido aos resultados encontrados, foi possível prosseguir os estudos utilizando esses animais como modelo. Os animais que receberam a DH60 foram classificados, portanto, como Diabéticos (D) e os animais que receberam a dieta padrão foram denominados Não Diabéticos (ND).

## 5.2 AVALIAÇÃO DA ISQUEMIA TECIDUAL DE MEMBROS POSTERIORES

O DM corresponde a um aumento significativo do risco para DAP (LEPÄNTALO *et al.*, 2011), e a desregulação do controle glicêmico, frequente nos pacientes com diabetes, associado ao quadro isquêmico é condição favorável à gênese de ulcerações (BEVILACQUA *et al.*, 2008). A partir dessa informação foi promovida a isquemia tecidual de membros posteriores ocasionada devido a oclusão da artéria femoral (OAF) unilateral (membro posterior esquerdo) em camundongos diabéticos e não diabéticos para avaliação dos efeitos dessa isquemia na pele íntegra, antes da abertura da ferida diabética. Para a confirmação da redução do fluxo sanguíneo após a OAF (Figura 16A),

utilizou-se a técnica de Imagem de Perfusão por Laser Doppler – LDPI (da expressão inglesa Laser Doppler perfusion imaging), essa técnica é comumente utilizada na clínica para monitorização de DAP (TEHAN *et al.*, 2015). Os resultados mostraram fluxo normal nos membros posteriores esquerdo na condição pré OAF (Figura 16B e 16C). Observa-se nítida redução do fluxo sanguíneo no membro posterior esquerdo após a OAF para os animais de ambos os grupos, ou seja, não diabéticos e diabéticos. Esse perfil manteve-se inalterado no primeiro dia após OAF, entretanto, pode-se notar no terceiro dia ligeira recuperação do fluxo sanguíneo no membro posterior esquerdo dos animais dos dois grupos ocasionado pela presença de outros vasos colaterais a artéria femoral no membro posterior.

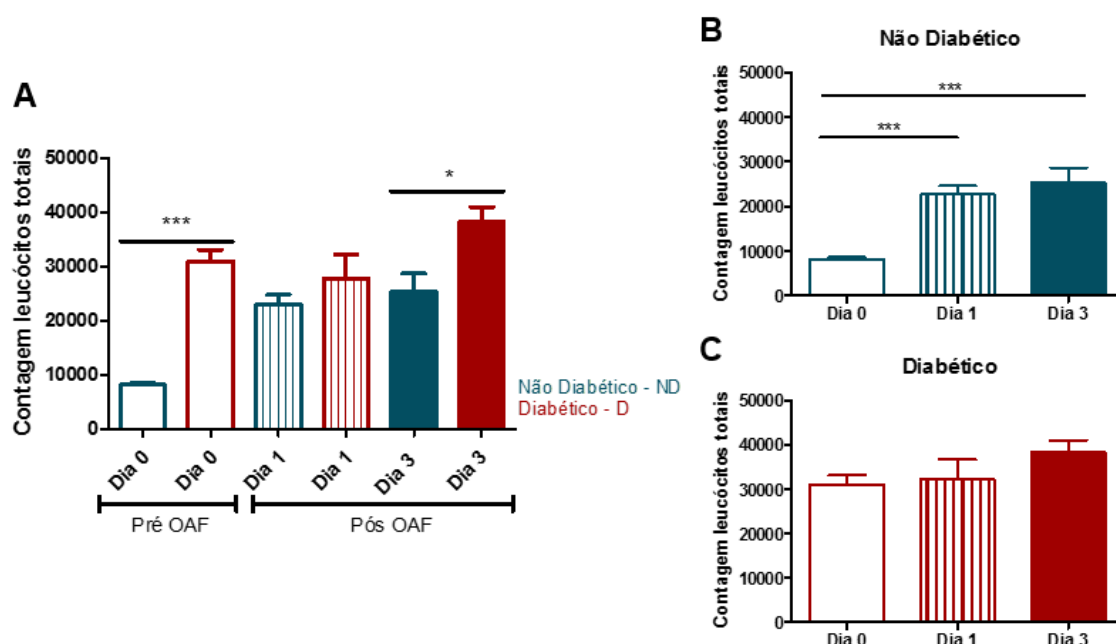


**Figura 16- Avaliação do Fluxo Sanguíneo de membro posterior por meio da imagem de perfusão por laser Doppler.** (A) Imagens representativas do fluxo sanguíneo no membro isquemiado de camundongos diabéticos e não diabéticos por LDPI (Laser Doppler perfusion imaging), antes (pré OAF), imediatamente após (pós OAF), 1 e 3 dias após OAF. A cor azul escura indica pouca ou nenhuma perfusão sanguínea e a vermelha indica perfusão sanguínea máxima. (B) Quantificação do fluxo sanguíneo no membro isquemiado dos animais Não Diabéticos antes (pré OAF), imediatamente após (pós OAF), 1 e 3 dias após a OAF. (C) Quantificação do fluxo sanguíneo no membro isquemiado dos animais diabéticos antes (pré OAF), imediatamente após (pós OAF), 1 e 3 dias após a OAF. Os valores foram obtidos pela razão entre a medida do fluxo sanguíneo do membro isquêmico pelo não isquêmico. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M., n=5 camundongos por grupo. \* $p < 0,05$ .



### 5.3 PERFIL LEUCOCITÁRIO DOS ANIMAIS

Os animais foram avaliados quanto ao perfil de leucócitos no sangue total no tempo 0, antes de realizar a oclusão da artéria femoral (OAF), para obtenção de informações a respeito do perfil leucocitário basal anterior a qualquer estímulo. Nos dias 1 e 3 após a OAF também foram realizadas avaliações da resposta leucocitária (Figura 17).



**Figura 17- Avaliação leucocitária dos animais antes e após a OAF.** Comparação da contagem de leucócitos totais no sangue (A) entre os grupos ND e D, (B) entre os dias no grupo ND e (C) entre os dias no grupo D. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, n=5-6 animais/grupo. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

A avaliação no dia 0 demonstrou que os animais diabéticos (grupo D), antes de serem submetidos a OAF apresentaram níveis de leucócitos no sangue total significativamente mais elevados quando comparado com os animais do grupo ND (Figura 17A). Esse resultado indica um perfil inflamatório dos animais diabéticos, o que está de acordo com trabalho publicado recentemente com pacientes diabéticos, em que esses pacientes apresentaram uma contagem fisiológica de leucócitos totais significativamente maior do que o grupo sem a doença (PLACZKOWSKA *et al.*, 2014).

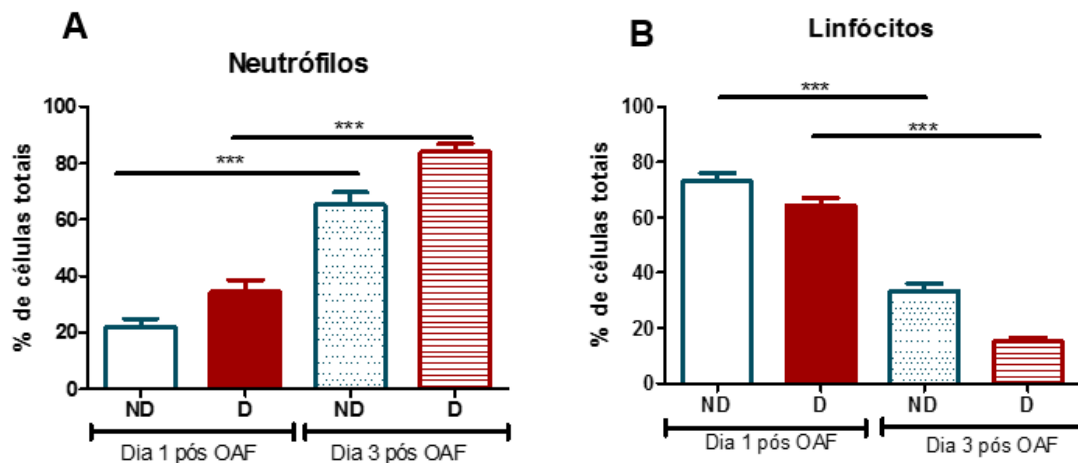
Em seguida os animais dos dois grupos foram então submetidos a OAF e foi observado aumento na produção de leucócitos nos grupos, nos tempos

investigados. No dia 1 pós OAF, os animais do grupo ND apresentaram maior responsividade ao estímulo provocado pela OAF e com isso, houve um aumento no número total de leucócitos quando comparado com o dia 0. Os animais do grupo D, entretanto, não apresentaram essa diferença, indicando que os animais não foram capazes de responder da mesma forma que o grupo ND. Ao comparar os grupos no mesmo dia (dia 1), foi possível observar que não há diferenças entre os grupos no que se refere ao número total de leucócitos, como era observado no dia 0. A análise feita no dia 3 demonstra que o grupo D manteve a produção mais elevada de leucócitos, sem diferenças estatísticas entre os dias 1 e 3 (Figura 17B).

No grupo D não foram observadas diferenças estatísticas na contagem dos leucócitos entre os três dias analisados (Figura 17C), contudo, ao considerar apenas o dia 3, foi possível observar que os animais diabéticos apresentaram produção de leucócitos significativamente superior àquela do grupo não diabético.

Após essas análises ficou evidente que os animais diabéticos possuem naturalmente um caráter pró-inflamatório, onde a produção de leucócitos está elevada, e assim permanece independente do estímulo da OAF. Os animais não diabéticos, inicialmente apresentaram contagem basal de leucócitos, que após o estímulo da OAF, provocou aumento na quantidade total de leucócitos no sangue, demonstrando a capacidade desses animais de responderem ao estímulo inflamatório provocado pela isquemia.

Os animais foram avaliados também de acordo com o seu perfil de leucócitos diferenciais (Figura 18). É descrito que camundongos, ao contrário dos humanos, possuem uma quantidade significativamente maior de linfócitos do que de neutrófilos (SANTOS *et al.*, 2016).



**Figura 18- Contagem diferencial de leucócitos relativa.** Porcentagem de (A) neutrófilos nos dias 1 e 3 pós OAF, e porcentagem de (B) Linfócitos nos dias 1 e 3 pós OAF. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, n=5-6 animais/grupo. \*\*\*p<0,001.

Um dia após a OAF os animais do grupo D apresentaram uma quantidade maior de neutrófilos quando comparado com os animais não diabéticos. Contudo no dia 3, não apresentaram diferenças estatisticamente significativa entre as contagens de neutrófilos dos grupos (Figura 18A). Já na análise de linfócitos, os dois grupos apresentaram contagens similares no dia 1. Entretanto, no dia 3, o grupo D apresentou redução significativa no número de linfócitos quando comparado aos animais do grupo não diabético, que mantiveram a contagem mais elevada de linfócitos (Figura 18B).

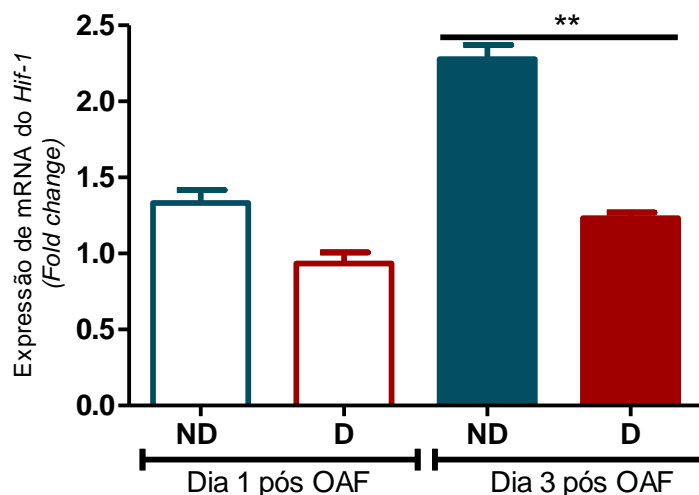
A comparação do número de neutrófilos no sangue total entre os dias 1 e 3 pós OAF demonstrou que os dois grupos apresentaram um aumento significativo no número de neutrófilos no dia 3 quando comparado com o dia 1. A análise dos linfócitos indicou perfil contrário, em que ocorreu diminuição na quantidade de linfócitos decorridos três dias da OAF. A contagem de monócitos não demonstrou diferença entre os dias e grupos analisados. Os resultados da quantificação dos leucócitos estão apresentados como contagem diferencial relativa, e com isso é possível observar o balanço na produção de células produzidas, onde o aumento de um tipo celular acarreta na diminuição relativa de outro tipo. O processo inflamatório e infeccioso promove produção de interleucina-1 e TNF $\alpha$  que atuam estimulando a produção de fatores de crescimento e de células de defesa. Como resposta inicial da medula óssea diante desse processo ocorre a liberação da população de neutrófilos de reserva

e aceleração do processo de maturação e liberação dessas células (HOKAMA e MACHADO, 1997; WALTERS *et al.*, 1996).

#### **5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HIF1 NA PELE ÍNTEGRA DE MEMBROS POSTERIORES POR PCR TEMPO REAL**

O HIF1 é composto por duas subunidades: HIF1 $\alpha$  e HIF1 $\beta$ , sendo que em condições normóxicas, HIF1 $\alpha$  é rapidamente degradado e indetectável. A presença de um ambiente hipóxico desencadeia a regulação de células através das subunidades do fator indutor de hipóxia (HIF1 $\alpha$ ). Centenas de genes são regulados por HIF1 $\alpha$ , sendo que mais de 90 genes são alvos diretos dele. Esses genes estão envolvidos em uma infinidade de adaptações e mecanismos de sobrevivência, como angiogênese, cicatrização de feridas, metabolismo da energia da glicose anaeróbica, eritropoiese e crescimento celular, proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose. Entre estes, incluem o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), óxido nítrico sintase (NOS), endotelina, eritropoietina (EPO), lactato desidrogenase A (LDH-A), transportador de glicose 1 (GLUT-1), transportador de glicose 3 (GLUT-3) e p53 (BENTO e PEREIRA, 2011). A análise da expressão de HIF1 na pele isquêmica após OAF, demonstrou expressão nas peles analisadas dos dois grupos, e com isso podemos confirmar que a pele realmente estava hipóxica diante da indução de isquemia provocada pela OAF. A análise dos dados indica que o grupo não diabético possui maior expressão gênica de mRNA do HIF1 no terceiro dia após a OAF em relação aos animais diabéticos (Figura 19).

Estudos mostram que a atividade de HIF1 $\alpha$  está prejudicada no ambiente com altas taxas de glicose, como ocorre no DM2 (THANGARAJAH *et al.*, 2010). Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram uma menor expressão de HIF1 pelos animais diabéticos, o que acarretará em menor regulação de diversos genes que podem estar diretamente relacionados a alterações na pele e podem ter relação com a abertura das feridas diabéticas.



**Figura 19- Expressão de mRNA do HIF1 na pele isquêmica dos animais diabéticos (D) e não diabéticos (ND).** Os resultados da expressão gênica foram analisados utilizando-se o programa “Sigma Stat” versão 2.03. Os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, no qual foi empregado análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparação múltipla de Holm-Sidak. Foi considerado significativo valor de  $p < 0,05$ .

## 5.5 ANÁLISE DO PERFIL INFLAMATÓRIO DA PELE ÍNTEGRA POR MEIO DE DOSAGENS DE BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS E CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA

Os estudos disponíveis na literatura atualmente possuem como principal objeto de pesquisa as feridas diabéticas e a avaliação da cicatrização dessas feridas, sendo que não existe na literatura modelos animais de abertura da ferida diabética espontânea, em todos, elas são provocas mecanicamente. (EMING; MARTIN *et al.*, 2014; GUO e DIPIETRO, 2010). A avaliação da pele íntegra diabética, antes do processo de abertura da ferida, associada à isquemia de membro não é comumente relatada na literatura e tem como importância a avaliação das alterações que ocorrem na pele de membros isquêmicos de camundongos com DM2, antes da abertura das feridas. Essa avaliação precoce permite a identificação das alterações decorrentes da resposta inflamatória, bem como modificações morfofuncionais que ocorrem diante do quadro de isquemia, o que pode indicar a presença de possíveis alvos moleculares para tratamento e possibilitar uma identificação precoce.

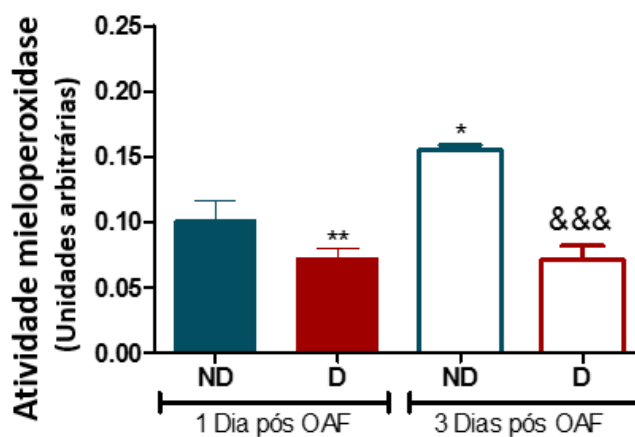
A doença arterial periférica culmina na oclusão de vasos sanguíneos não coronarianos, que resulta em prejuízo crônico do suprimento sanguíneo (PENUELAS *et al.*, 2007) nos membros inferiores dos pacientes diabéticos, o que propicia o surgimento das lesões na pele desses pacientes (LEPÄNTALO *et al.*, 2011). Desta forma, foi realizada a oclusão da artéria femoral, promovendo a isquemia dos membros posteriores para avaliação das alterações decorrentes na pele. Como ainda não há na literatura estudos a respeito, as análises foram realizadas nos períodos de tempo baseados no tempo de fechamento das feridas diabéticas isquêmicas em modelo experimental desenvolvido por BARCELOS *et al.* (2009).

Mesmo na ausência de lesão, a isquemia desencadeia respostas moleculares e celulares que irão determinar o remodelamento do tecido isquêmico (SILVESTRE *et al.*, 2013). Para avaliação da resposta inflamatória celular realizou-se a análise do recrutamento e concentração de neutrófilos e macrófagos na pele íntegra, uma vez que são as primeiras células recrutadas na fase aguda do processo inflamatório e, conseqüentemente, para a área da ferida (EMING *et al.*, 2007; JUNIOR *et al.*, 2005).

Os neutrófilos são as células de defesa que atuam nas fases iniciais da resposta inflamatória, sendo as primeiras células a deixar os vasos sanguíneos e migrar para o tecido, atraídos por quimiocinas e mediadores inflamatórios (JUNIOR *et al.*, 2005). A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima que é liberada de grânulos citoplasmáticos de neutrófilos durante o processo de degranulação e é amplamente utilizada para avaliação indireta do acúmulo de neutrófilos no tecido.

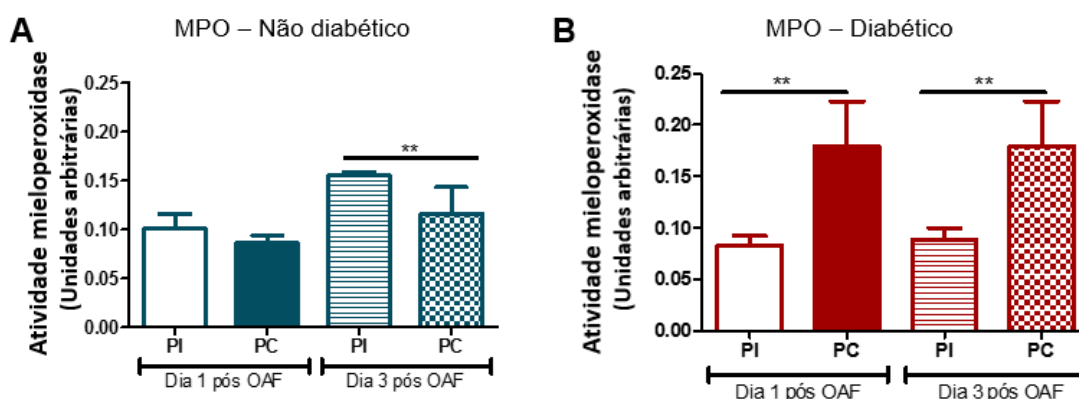
Ao avaliar a quantidade de neutrófilos na pele dos animais pelo método indireto da MPO (Figura 20), observou-se que nos dias 1 e 3 pós-OAF o grupo ND apresentou maior quantidade de neutrófilos quando comparado com o grupo D. Esse resultado indica que os animais diabéticos não são capazes de produzir a mesma resposta de neutrófilos na pele como os animais não diabéticos. Apesar dos diabéticos apresentarem maior número de neutrófilos no sangue total, como descrito anteriormente, esses neutrófilos aparentemente não estão sendo dirigidos para a pele. Uma possível explicação é que, provavelmente, os neutrófilos nos animais diabéticos encontram-se no tecido mais próximo ao local da isquemia, por exemplo nos músculos próximos a artéria femoral, enquanto

que no grupo ND estes neutrófilos se encontram mais distribuídos, o que permite encontra-los também na pele. Foi realizada também a avaliação da contagem de neutrófilos na pele nos três dias seguintes a OAF dentro de cada grupo. No grupo não diabético a quantidade de neutrófilos foi maior no terceiro dia após a OAF, entretanto não houve diferença entre os dias no grupo diabético. Esse resultado está de acordo com os resultados encontrados na contagem de neutrófilos do sangue total, em que houve um aumento desse tipo celular no 3º dia de isquemia, e conseqüentemente, esse aumento também foi visualizado no tecido do animal não diabético. E demonstra que os animais diabéticos mesmo com a global de leucócitos elevada não são capazes de recrutar com eficiência os neutrófilos para região da pele no terceiro dia. Coutinho (2015) realizou um estudo avaliando perfil inflamatório da pele íntegra de animais com DM1, e observou que esses animais diabéticos apresentaram uma quantidade maior de neutrófilos no dia 1 após a isquemia na pele. Resultado diferente do encontrado no presente trabalho, onde não foi observada alteração entre os dias analisados no recrutamento de neutrófilos para a pele nos animais diabéticos. Uma possível explicação para esse achado seria o fato do DM2 promover uma resposta mais lenta para recrutar essas células na pele.



**Figura 20- Avaliação do Infiltrado de neutrófilos na pele do membro posterior isquêmico de camundongos.** Detecção enzimática de neutrófilos pela avaliação da atividade de MPO comparação entre os grupos não diabético e diabético, no dia 1 e 3 pós OAF. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M., n=5 camundongos por grupo. \*p<0,05, \*\*p<0,01. vs. Não diabético dia 1 pós OAF. &&& p<0,001 vs. Não diabético dia 3 pós OAF.

Ainda foi realizada uma análise comparativa entre os níveis de MPO nas amostras de pele do membro no lado isquêmico (PI), local onde foi realizada a OAF, e da pele do membro contralateral (PC), que não foi submetido a isquemia (Figura 21). Essa comparação indicou que os animais ND apresentaram dosagens maiores de MPO na pele isquêmica no dia 3 (Figura 21A), enquanto que nos animais diabéticos a PI apresentou nível de MPO menor comparado com o lado contralateral (Figura 21B), que pode ser justificado pelo fato das células nos animais diabéticos estarem mais deslocadas para os locais mais próximos da cirurgia, e por isso apresentarem uma resposta menor na pele. Esses resultados sugerem que os animais diabéticos apresentam maior concentração de células de defesa em determinados tecidos, o que faz com que alguns tecidos não recebam adequadamente essas células e demonstra a não-coordenação na resposta inflamatória, que pode gerar consequências a longo prazo. Estudos demonstram que algumas infecções são mais propensas a ter um curso complicado em pacientes diabéticos do que em pacientes não diabéticos devido desregulação na quimiotaxia celular (GEERLINGS *et al.*, 1999). Enquanto os animais saudáveis são capazes de responder melhor aos estímulos, e recrutar as células em diferentes locais, inclusive na pele.



**Figura 21- Avaliação do Infiltrado de neutrófilos na pele do membro posterior isquêmico e na pele do membro contralateral de camundongos.** Detecção enzimática de neutrófilos pela avaliação da atividade de MPO comparação entre os membros isquêmicos e contralaterais dos grupos (A) não diabético e (B) diabético, nos dias 1 e 3 pós OAF. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M., n=5 camundongos por grupo. \*\*p<0,01.

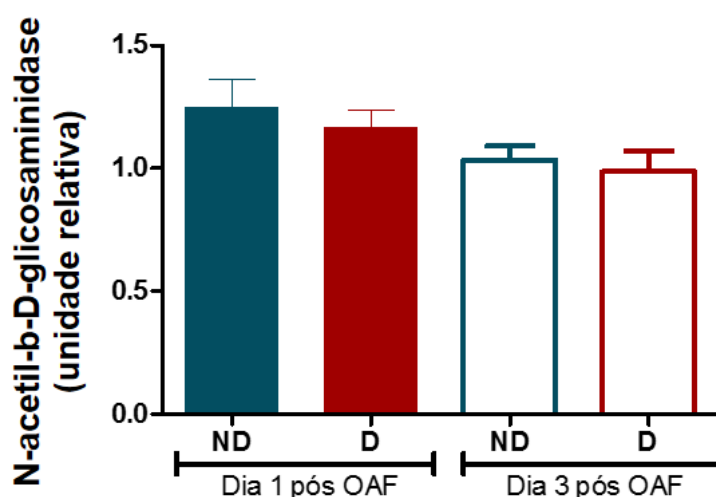
Estudos relatam que uma quimiotaxia significativamente menor foi encontrada em polimorfonucleares de pacientes diabéticos (tipo 1 e tipo 2) do



que nos controles, o que poderia justificar a diminuição dessas células na pele no animal diabético (DELAMAIRE *et al.*, 1997; GEERLINGS *et al.*, 1999).

Os monócitos sanguíneos também são recrutados para os sítios inflamatórios, sendo atraídos por mediadores inflamatórios pelo mecanismo de quimiotaxia. Após a migração do meio intravascular para o tecido eles se diferenciam em macrófagos e fazem parte do sistema de defesa da imunidade inata, mas atuam também como indutores da resposta adaptativa (JUNIOR *et al.*, 2005). A enzima N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) está presente nos grânulos de macrófagos sendo utilizada como índice da presença desses macrófagos na pele. Assim a avaliação da quantidade de macrófagos na pele foi feita através do método indireto da dosagem de NAG.

A análise não identificou diferenças estatísticas nos níveis de NAG entre os grupos nos dias 1 e 3 após a OAF (Figura 22). Esse resultado corrobora com os resultados encontrados na avaliação do sangue total, em que não houve alteração nos valores encontrados de monócitos. A ausência de recrutamento de macrófagos na região após a isquemia se justifica pelo fato do processo instalado ser inicial, sendo o tempo insuficiente para o recrutamento dessas células. Acredita-se que se a avaliação continuasse a ser feita em dias mais tardios seria observado uma diferença nos resultados.

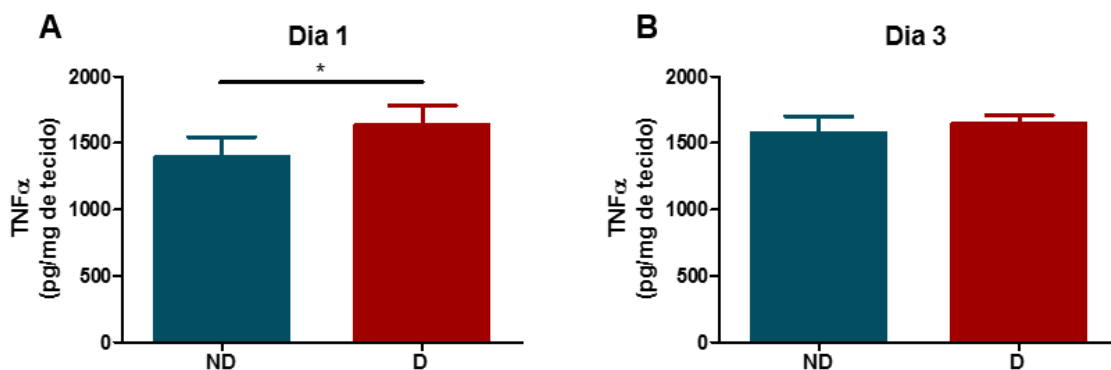


**Figura 22- Avaliação do Infiltrado de macrófagos na pele do membro posterior isquêmico de camundongos.** Detecção enzimática de macrófagos pela avaliação da atividade de NAG comparação entre os grupos não diabético e diabético, no dia 1 e 3 pós OAF. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M., n=5 camundongos por grupo. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

A comparação dos resultados de NAG entre a pele do membro que foi submetida a OAF e a pele do membro contralateral não apresentou diferenças estatísticas, demonstrando mais uma vez que no tempo analisado não foi possível captar a alteração no recrutamento desse tipo celular. O estudo realizado por Coutinho (2015) avaliando pele íntegra em DM1 demonstrou resultado semelhante aos encontrados no presente trabalho para DM2, indicando o mesmo perfil de recrutamento dos macrófagos. No estudo foi realizada ainda a avaliação 7 dias após a OAF, e observou-se que mesmo após um tempo maior, ainda não havia recrutamento característico das células para o tecido.

A migração das células circulantes para os tecidos em resposta ao processo inflamatório instalado é direcionada pela presença de um gradiente de substâncias quimiotáticas no sítio inflamatório. A citocina TNF $\alpha$  atua como mediador pró-inflamatório, ativando o endotélio e atraindo as células de defesa para o local da inflamação (MEDZHITOV, 2008).

A avaliação de TNF $\alpha$  foi realizada pelo método de ELISA, utilizando as amostras de pele retiradas após a OAF. No dia 1 pós OAF observa-se que o grupo D possui uma produção maior de TNF $\alpha$  quando comparado com o grupo ND, entretanto no dia 3 não há mais essa diferença na produção da citocina pró-inflamatória (Figura 23). Esse resultado está de acordo com relatos da literatura, em que doenças crônicas, como DM2 e a obesidade estão associadas a níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias (CARVALHO *et al.*, 2006). Além disso, alterações da produção de adipocinas provocam aumento da expressão de TNF $\alpha$ , interleucina 6, inibidor do fator ativador de plasminogênio 1 (MONTANI *et al.*, 2002), o que poderia explicar o fato de após 1 dia da OAF ser encontrado uma quantidade maior de TNF $\alpha$  nos animais diabéticos, uma vez que naturalmente eles já possuem essa característica.



**Figura 23- Concentração da citocina pró-inflamatória TNF $\alpha$  na pele.** Determinação da concentração de TNF $\alpha$  nos dias (A) 1 e (B) 3 após a OAF. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M., n=5 camundongos por grupo. \*p<0,05.

## 5.6 ANÁLISE DOS LEUCÓCITOS RADIOMARCADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA PELE

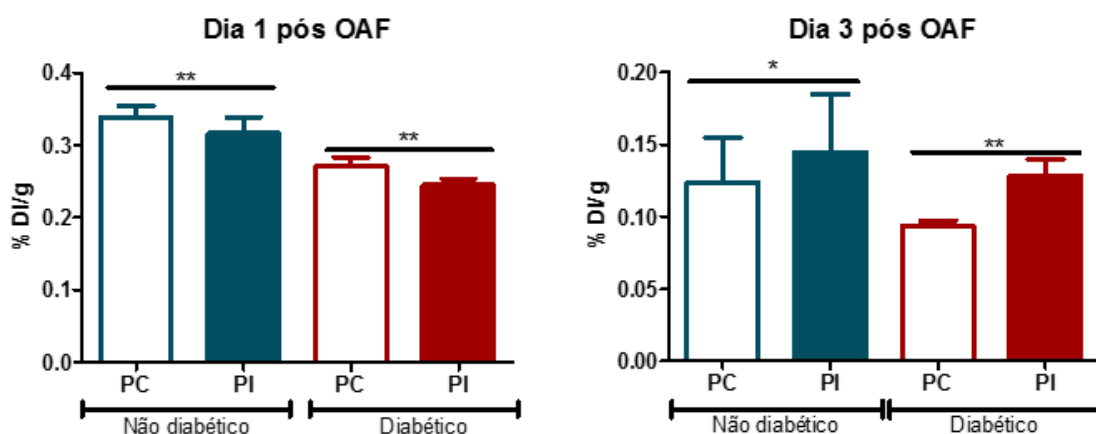
Uma vez identificadas as alterações ocorridas, utilizamos leucócitos radiomarcados para fazer a avaliação *ex vivo* da pele íntegra. Os leucócitos radiomarcados têm sido utilizados em processos inflamatórios e infecciosos (GOLDSMITH e VALLABHAJOSULA, 2009). Entretanto não há relatos do uso na pele de animais diabéticos. Portanto, buscamos avaliar a possibilidade de usar essa técnica para a identificação precoce dessas alterações inflamatórias.

Os leucócitos foram separados do sangue total, e em seguida, marcados com o radiofármaco. Após a separação foi realizado o teste de viabilidade celular que teve um resultado superior a 85%, sendo assim as células foram consideradas viáveis para continuar o experimento. O ECD é um composto lipofílico capaz de marcar células polimorfonucleares e mononucleares do sangue, indicando a presença de todos esses tipos celulares na pele, sem fazer distinção de um tipo celular específico. A pureza radioquímica da marcação do ECD com  $^{99m}\text{Tc}$  foi acima de 95%.

Após a marcação com  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD foi realizada a lavagem do pellet e avaliação do rendimento de marcação cujo resultado foi superior a 90%. Além disso, foi realizado novamente o teste de viabilidade celular, permanecendo os resultados superiores a 85%. Após 2 horas da injeção dos  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD-leucócitos, os animais foram eutanasiados e as amostras de pele foram retiradas e quantificadas em um contador de radiação de poço. A análise do dia 1 após OAF

dos animais dos dois grupos indicou que uma menor quantidade de radiação foi captada na PI, demonstrando menor recrutamento desses leucócitos para a pele no primeiro dia. A análise do dia 3 demonstra uma maior captação de radiação na PI dos dois grupos, sendo possível afirmar que há um recrutamento maior dos leucócitos totais na pele isquêmica no dia terceiro dia (Figura 24). A análise do Doppler demonstra que no 3º dia há uma discreta reperfusão dos membros, permitindo assim que um maior número de células sejam capazes de atingir o tecido.

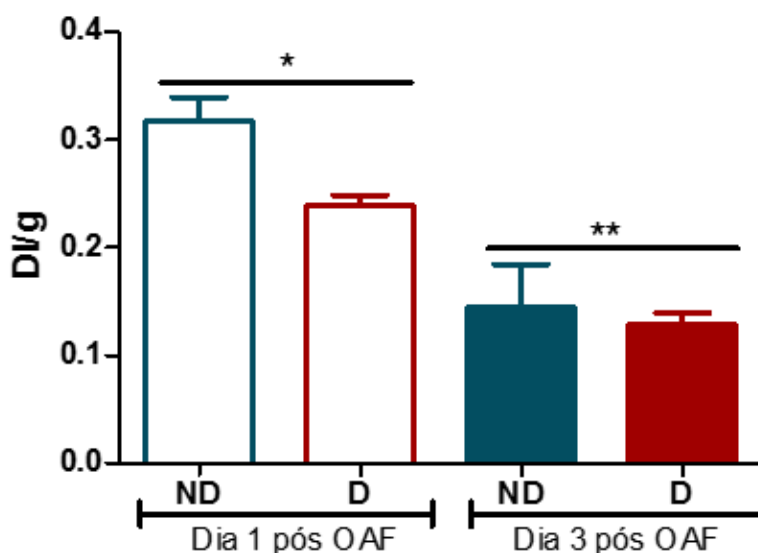
Os resultados encontrados por Coutinho (2015) no estudo do DM1 não indicaram diferença de captação da radiação na pele nos dias analisados, o que difere dos resultados encontrados no DM2. Isso demonstra que há uma diferença na resposta do sistema imune frente ao processo inflamatório quando se compara o diabetes do tipo 1 e do tipo 2.



**Figura 24- Percentual da dose injetada por grama de tecido (%DI/g) dos leucócitos radiomarcados nos grupos não diabético e diabético, 2 horas após a injeção.** As análises comparativas foram feitas entre a amostra de pele do lado isquêmico com a do lado contralateral. A- Não Diabético: dia 1 e 3 pós OAF. B- Diabético: dia 1 e 3 pós OAF. A contagem de radiação da pele isquêmica foi representada por PI e da pele do membro contra lateral como PC. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M., n=5 camundongos por grupo. \*p<0,05, \*\*p<0,01.

Por fim, quando comparamos a captação dos leucócitos da pele apenas do membro isquêmico nos dias 1 e 3 pós OAF entre os dois grupos estudados, observa-se que a quantidade total de leucócitos radiomarcados que foram recrutados para a pele no grupo ND é maior que no grupo D (Figura 25). Assim, esse resultado corrobora os outros dados já discutidos que demonstram uma melhor resposta dos animais não diabéticos frente ao processo inflamatório decorrente da indução da OAF. Conforme apresentado anteriormente os animais diabéticos possuem uma contagem maior de leucócitos do que os animais não

diabéticos, entretanto não possuem uma resposta inflamatória tão eficiente para recrutá-los para o sítio da inflamação.



**Figura 25- Percentual da dose injetada por grama de tecido (%DI/g) dos leucócitos radiomarcados comparando os grupos não diabético e diabético, 2 horas após injeção.** A análise realizada comparou a captação da radiação entre os grupos no dia 1 e no dia 3 após oclusão da artéria femoral. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M., n=5 camundongos por grupo \*p<0,05, \*\*p<0,01.

Dessa forma, observa-se que os animais não diabéticos, que receberam a dieta padrão, apresentaram uma global de leucócitos menor, assim como menor concentração de TNF $\alpha$  na pele. Entretanto foram encontrados maior quantidade de neutrófilos e captação maior de  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD-leucócitos na pele. Em contrapartida, os animais diabéticos que receberam a dieta hiperlipídica, apresentaram global de leucócitos maior, antes mesmo do estímulo da OAF e maior concentração de TNF $\alpha$  na pele. Porém houve menor recrutamento de neutrófilos, assim como menor captação dos  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD-leucócitos na pele isquêmica.

Esses resultados demonstram alterações provocadas nos animais devido a presença do DM2 e sugerem uma alteração no perfil de recrutamento dos leucócitos e abre perspectivas para que novas análises sejam feitas.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que:

- A dieta obesogênica hiperlipídica contendo 60% de teor de lipídeos foi capaz de induzir o diabetes mellitus do tipo 2 nos animais;
- Os animais diabéticos apresentam fisiologicamente global de leucócitos sanguíneos maior em relação aos não diabéticos;
- Os animais não diabéticos possuem uma resposta após a OAF com aumento gradual dos leucócitos circulantes nos dias 1 e 3 e os animais diabéticos não apresentam esse aumento;
- A OAF provoca um aumento do número de neutrófilos circulantes e uma queda dos linfócitos tanto nos animais diabéticos quanto nos não diabéticos;
- A OAF estimula a expressão de HIF1a na pele de membros posteriores isquêmicos e essa expressão é reduzida em animais diabéticos quando comparados aos animais não diabéticos;
- O infiltrado de neutrófilos na pele de membros posteriores isquêmicos é maior no grupo não diabético quando comparado ao diabético;

Como **conclusão geral**, os leucócitos radiomarcados com  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD podem ser utilizados para indicar o processo inflamatório decorrente da isquemia na pele tanto em animais não diabéticos quanto em animais diabéticos.

## 7 PERSPECTIVAS

- Avaliar a ativação endotelial (expressão de VCAM e ICAM)
- Avaliar quimiocinas recrutadoras de leucócitos
- Analisar a pele por histologia
- Realizar imagens cintilográficas do membro posterior isquêmico após injeção dos  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD-Leucócitos
- Analisar estresse oxidativo

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARON I. V. Inflammation: The Root of all Evil in Diabetes and the Dysmetabolic Syndrome. *Medscape*. Dec 20, 2004.

ALTABAS, V. Diabetes , Endothelial Dysfunction , and Vascular Repair : What Should a Diabetologist Keep His Eye on . *International Journal of Endocrinology*, v. January, p. 1–15, 2015.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 524 p, 2008.

ABOYANS, V. & CRIQUI, M. H. In *Peripheral Arterial Disease* (eds Dieter, R. S. & Dieter, R. A.) 1–25, McGraw Hill, 2009.

AHMED, I.; GOLDSTEIN, B. Diabetes mellitus. *Clinics in Dermatology*, v. 24, n. 4, p. 237-246, 2006.

ALBERTI, K. G.; ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z.; CLEEMAN, J. I.; DONATO, K. A. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, v. 120, p. 1640–1645, 2009.

ANDERSEN, C. A. Noninvasive assessment of lower extremity hemodynamics in individuals with diabetes mellitus. *Journal Vascular Surgery*, v. 52, 76S–80S, 2010.

ANDRADE, J. M. O.; PARAISO, A. F.; *et al.* Peptides Cross talk between angiotensin- ( 1 – 7 )/ Mas axis and sirtuins in adipose tissue and metabolism of high-fat feed mice. *Peptides*, v. 55, p. 158–165, 2014.

ARAUJO, E. B.; LAVINAS, T.; COLTURATO, M. T.; MENGATTI, J. Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, n. 1, 2008.

ASSOCIATION, American Diabetes. Peripheral arterial disease in people with diabetes. *Diabetes Care*, v. 26, p. 3333–3341, 2003.

ASSOCIATION, American Diabetes. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, v. 37, 2004.

ASSOCIATION, American Diabetes. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, v. 36, 2013.

ASSOCIATION, AMERICAN DIABETES. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, v. 38, p.S8-S16, 2015.



BARCELOS, L. S. *et al.* Human CD133+ progenitor cells promote the healing of diabetic ischemic ulcers by paracrine stimulation of angiogenesis and activation of Wnt signaling. *Circulation research*, v. 104, n. 9, p. 1095–1102, 2009.

BENTO CF, PEREIRA P. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 and the loss of the cellular response to hypoxia in diabetes. *Diabetologia*, p. 1946–1956, 2011.

BIRNBAUM, M. J. Turning down insulin signaling. *Journal of Clinical Investigation*, v. 108, p. 655-659, 2001.

BOERMAN, O. C.; RENNEN, H.; OYEN, W.J.G.; CORSTEN, F.H.M. Radiopharmaceuticals to image infection and inflammation. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 31, n. 4, p. 286-295, 2001.

BOIKE, A. M.; HALL J. O. A practical guide for examining and treating the diabetic foot. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, v. 69, n.4, p.342-348, 2002.

BONI-SCHNETZLER, M.; EHSES, J. A.; FAULENBACH, M.; DONATH, M. Y. Insulinitis in type 2 diabetes. *Diabetes Obesity and Metabolism*, v. 10, p. 20–24, 2008.

BÖNI-SCHNETZLER, M.; DONATH, M. Y. How biologics targeting the IL-1 system are being considered for the treatment of type 2 diabetes. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 76, n. 2, p. 263–268, 2013.

BRASILEIRO, C. B.; *et al.* Avaliação de processos inflamatórios na ATM empregando leucócitos autólogos. *Radiologia Brasileira*, v. 39, n.4, p. 283–286, 2006.

BROOKS-WORRELL, B.; PALMER, J. P. Immunology in the Clinic Review Series; focus on metabolic diseases: development of islet autoimmune disease in type 2 diabetes patients: potential sequelae of chronic inflammation. *The Journal of Translational Immunology*, v. 167, p. 40–46, 2012.

CASSAR, K.; BACHOO, P. Peripheral arterial disease. *Clinical Evidence Concise*, v. 15, p. 35-37, 2006.

CAIAFA, J. S. *et al.* Atenção integral ao portador de pé diabético. *Jornal Vasculoso Brasileiro*, v.10, n.4(2), p. 1-32, 2011.

CARDOSO, V. N.; ROCA, M.; ARMERO, F.; MARTÍN-COMIN, J. Assessment of inflammatory bowel disease by using two different <sup>99m</sup>Tc leucocyte labelling methods. *Nuclear medicine communications*, v. 23, n. 8, p. 715-720, 2002.

CALDER, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1851, n. 4, p. 469–484, 20 ago. 2014.

CARVALHO, M. H. C.; COLAÇO, A.L.; FORTES, Z. B. Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*, v. 50, n.2, São Paulo, 2006.

CESARETTI M. L. R.; KOHLMANN O.JR. Modelos experimentais de Resistência à Insulina e Obesidade: Lições Aprendidas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo*, v. 50, n. 2, p. 190-197, 2006.

CHATZIGEORGIOU, A. *et al.* The Use of Animal Models in the Study of Diabetes Mellitus. *In vivo*, v. 23, p. 245–258, 2009.

CHAUDRU, S. DE MULLENHEIM, P. Y.; LE FAUCHEUR, A.; KALADJI, A.; JAQUINANDI, V.; MAHE, G. Training to perform ankle-brachial index: systematic review and perspectives to improve teaching and learning. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, v. 51, n. 2, p. 240–247, 2016.

CHAWLA, A.; NGUYEN, K. D.; GOH, Y. P. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, p. 738–749, 2011.

CHEN, L.; MAGLIANO, D. J.; ZIMMET, P. Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 8, p.228–236, 2012.

CHIANELLI, M.; MATHER, S. J.; MARTIN-COMIN, J.; SIGNORE, A. Radiopharmaceuticals for the study of inflammatory processes: A review. *Nuclear Medicine Communications*, v. 18, p. 437-455, 1997.

CLAIR, D.; SHAH, S.; WEBER, J. Current state of diagnosis and management of critical limb ischemia. *Current cardiology reports*, v. 14, p. 160–170, 2012.

CRIQUI, M. H.; ABOYANS, V. Epidemiology of peripheral artery disease. *Circulation Research*, v. 116, p. 1509–1526, 2015.

CORREIA-SANTOS, A. M.; SUZUKI, A.; ANJOS, J. S.; RÊGO, T. S.; ALMEIDA, K. C. L.; BOAVENTURA, G. T. Modelo animal de diabetes tipo 2. *Medicina (Ribeirão Preto)*; v. 45, n. 4, p. 436-44, 2012.

CORSTENS, F. H. M.; MEER, J. W. M. Nuclear medicine's role in infection and inflammation. *The Lancet*, v. 354, p. 765-770, 1999.

COUTINHO, C. R. Avaliação da inflamação na pele de membro posterior isquêmico em modelo experimental de diabetes tipo 1. 2015. 79 F. Dissertação de mestrado. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2015.

DANAEI, G.; FINUCANE, M. M.; LU, Y.; SINGH, G. M.; COWAN, M. J.; PACIOREK, C. J.; *et al.* National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. *Lancet*. v. 378, p. 31–40, 2011.

DELAMAIRE, M.; MAUGENDRE, D.; MORENO, M.; LE GOFF, M.; ALLANNIC, H.; GENETET, B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabetic Medicine*. v. 14, p. 29–34, 1997.

DIPIETRO, L. A. *et al.* Modulation of JE/MCP-1 Expression in Dermal Wound Repair. *American Journal of Pathology*, v. 146, n. 4, p. 868–875, 2010.

DONATH, M. Y.; SCHUMANN, D. M.; FAULENBACH, M.; ELLINGSGAARD, H.; PERREN, A.; EHSES, J. A. Islet inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, v. 31, p. 161–164, 2008.

DONATH, M. Y.; BONI-SCHNETZLER, M.; ELLINGSGAARD, H.; EHSES, J. A. Islet inflammation impairs the pancreatic  $\beta$ -cell in type 2 diabetes. *Physiology*, v. 24, p. 325–331, 2009.

DONATH, M.Y.; SHOELSON, S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, p. 98–107, 2011.

DUMITRIU, I. E.; ARAGUAS, E. T.; BABOONIAN, C.; KASKI, J. C. CD4+CD28<sup>null</sup> T cells in coronary artery disease: when helpers become killers. *Cardiovascular Research*, v. 81, p. 11–19, 2009.

DUARTE, N.; GONÇALVES, A. Pé Diabético. *Angiologia e Cirurgia Vascular*, v.7, n. 2, 2011.

EHSES, J. A.; ELLINGSGAARD, H.; BONI-SCHNETZLER, M.; DONATH, M. Y. Pancreatic islet inflammation in type 2 diabetes: from  $\alpha$  and  $\beta$  cell compensation to dysfunction. *Arch Physiol Biochem*, v. 115, p. 240–247, 2009.

EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. STATE OF THE ART REVIEW Wound repair and regeneration : Mechanisms, signaling , and translation. State of the art review, v. 6, n. 265, 2014.

ENGRONYAT, M. R.; MARTIN-COMIN, J.; BRULLES, Y. R.; SALVADÓ, J. M.; LÁZARO, M. T. B.; AÑÉ, R. P. In: MARTIN-COMIN, J. *Diagnóstico de la Inflamación y de la Infección en Medicina Nuclear*. [S.l.: s.n.], cap. 4, p. 77-92, 2005.

ESSER, N.; LEGRAND-POELS, S.; PIETTE, J.; SCHEEN, J. A.; PAQUOT, N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 105, Issue 2, p. 141–150, 2014.

FAGLIA, E.; CLERICI, G.; CLERISSI, J.; GABRIELLI, L.; LOSA, S.; MANTERO, M.; CAMINITI, M.; CURCI, V.; QUARANTIELLO, A.; LUPATTELLI, T.;

MORABITO, A. Long-term prognosis of diabetic patients with critical limb ischemia: a populationbased cohort study. *Diabetes Care*, v. 32, p. 822–827, 2009.

FAGLIA, E. Characteristics of peripheral arterial disease and its relevance to the diabetic population. *International Journal of Lower Extremity Wounds*. v. 10, p. 152–166, 2011.

FERREIRA, S. R. G., *et al.* Intervenções na Prevenção do Diabetes Mellitus Tipo 2: É viável Um Programa Populacional no nosso meio?. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica*, v. 49, 2005.

FILIPPI, L. *et al.* Diabetic foot infection: usefulness of SPECT/CT for 99mTc-HMPAOlabeled leukocyte imaging. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, v. 50, n. 7, p. 1042–1046, 2009.

FOWKES, F. G.; RUDAN, D.; RUDAN, I.; *et al.* Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: A systematic review and analysis. *Lancet*. 382: p. 1329–1340, 2013.

FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J. B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W. B. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. *Rev Bras Cir Cardiovasc* [online]. v. 25, n. 4, p. 575-584, 2010.

FRYKBERG, R. G. *et al.* Diabetic Foot Disorders: A Clinical Practice Guideline. *The Journal of Foot & Ankle Surgery*, 2006.

GABRIEL, M. L.; PIATTO, V. B.; SOUZA, A. S. Aplicação clínica da ultrassonografia craniana com Doppler em neonatos prematuros de muito baixo peso. *Radiologia Brasileira* [online], v. 43, n. 4, p. 213-218, 2010.

GEERLINGS, E. S.; ANDY I. M.; HOEPELMAN. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Medical Microbiology and Immunology*, v. 26, (3-4), p. 259-265, 1999.

GERRY, F.; FOWKES, V.; ABOYANS, F.; MARY M.; *et al.* Peripheral artery disease: epidemiology and global perspectives *Nature Reviews Cardiology*, 2016.

GHOSH, S., ARONOW, W. S. Utilization of lipid-lowering drugs in elderly persons with increased serum low-density lipoprotein cholesterol associated with coronary artery disease, symptomatic peripheral arterial disease, prior stroke, or diabetes mellitus before and after an educational program on dyslipidemia treatment. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Science and Medical Sciences*, v. 58, p. 432-435, 2003.

GOTTHARDT, G.; CHANTAL, P. B.; BOERMAN, C. O.; OYEN, J. G. W. Imaging of Inflammation by PET, Conventional Scintigraphy, and Other Imaging Techniques. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 51, n. 12, p. 1937-1949, 2010.

GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P; CAMARGO, J. L.; AZEVEDO, M. J. Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo*, v. 46, n.1, 2002.

GUARIGUATA, L. et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 103, p. 137–149, 2014.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, v. 89, n. 3, p. 219–29, mar. 2010.

HARVEY, A.; ZIESSMAN, J.; O'MALLEY, P.; JAMES, H. Thrall. *Nuclear Medicine: The Requisites*. 4a edição, 2014.

HEIDEMANN, C.; DU, Y.; SCHUBERT, I.; RATHMANN, W.; SCHEIDT-NAVE C. Prävalenz und zeitliche Entwicklung des bekannten Diabetes mellitus. *Bundesgesundheitsbl*, v. 56, p. 668–677, 2013.

HENRIQUE, S. et al. Peptides Oral Angiotensin- ( 1 – 7 ) prevented obesity and hepatic inflammation by inhibition of resistin / TLR4 / MAPK / NF-kB in rats fed with high-fat diet. *Peptides*, v. 46, p. 47–52, 2013.

HINCHLIFFE, R. J.; ANDROS, G.; APELQVIST, J.; BAKKER, K.; FRIEDERICHS, S.; LAMMER, J.; et al. A systematic review of the effectiveness of revascularization of the ulcerated foot in patients with diabetes and peripheral arterial disease. *Diabetes Metabolism Research Review*, v. 28, p. 179–217, 2012.

HOI-KEI, L.; DONGYANG, L.; WILLIAM, J. JUSKO. Pharmacokinetic/ Pharmacodynamic Modeling in Inflammation. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, v. 40, n. 4, p. 295-312, 2012.

HOKAMA. N.K., MACHADO, P.E.A. Interpretação clínica do hemograma nas infecções. *Jornal Brasileiro de Medicina*, v. 72, n. 3, p. 38- 49, 1997.

ISMAIL-BEIGI, F. Glycemic Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine*, v. 366, p.1319-1327, 2012.

JONES, A. G. Technetium in nuclear medicine. *Radiochimica Acta*, v. 70/71, p. 289-297, 1995.

JUDE, E. B., OYIBO, S. O., CHALMERS, N. & BOULTON, A. J. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes Care*, v. 24, p. 1433–1437, 2001.

JUDE, E. B.; ELEFThERIADOU, I.; TENTOLOURIS, N. Peripheral arterial disease in diabetes: A review. *Diabetic Medicine*, v. 27, p. 4–14, 2010.

JUNIOR, D. P.; ARAUJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C.; CRUVINEL, W. M. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. *Sinapse de reumatologia*, v. 3, p. 8-10, 2005.

JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A. E. Diabetogenic action of streptozotocin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 126, p. 201-205, 1967.

KALLIO, M., FORSBLOM, C., GROOP, P. H., GROOP, L.; LEPANTALO, M. Development of new peripheral arterial occlusive disease in patients with type 2 diabetes during a mean follow-up of 11 years. *Diabetes Care*, v. 26, p. 1241–1245, 2003.

KIRSTEN, V. R.; SESTERHEIN, P.; SAITOVITCH, D. Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v. 43, p. 3-10, 2010.

KOLLURU, G. K.; BIR, S. C.; KEVIL, C. G. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *International journal of vascular medicine*, v. 2012, n. 1, p. 918-926, 2012.

KRISTEN, M.; WATERSTRAM-RICH.; PAUL, E.; CHRISTIAN. *Nuclear Medicine and PET/CT: Technology and Techniques*. 7 edição, 2012.

LADEIRA, P. R. S.; ISAAC, C.; PAGGIARO, A. O.; HOSAKA; E. M.; FERREIRA, M. C. *Úlceras nos membros inferiores de pacientes diabéticos: mecanismos moleculares e celulares*, 2011.

LEPANTALO, M. et al. Chapter V: Diabetic foot. *European journal of vascular and endovascular surgery. Journal of the European Society for Vascular Surgery*, v. 42, Suppl 2, p. 60–74, 2011.

LEVER, S. Z. et al. Design, preparation, and biodistribution of a technetium-<sup>99m</sup>, triaminedithiol complex to assess regional cerebral blood flow. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 26, p. 1287-1294, 1985.

LI, H. et al. Therapeutic angiogenesis in ischemic muscles after local injection of fragmented fibers with loaded traditional Chinese medicine. *Nanoscale*, 2015.

LI VOLTI, S.; CARUSO-NICOLETTI, M.; BIAZZO, F.; SCIACCA, A.; MANDARA, G.; MANCUSO, M.; MOLLICA F. Hyporesponsiveness to intradermal administration of hepatitis B vaccine in insulin dependent diabetes mellitus. *Archives of Disease in Childhood*, v. 78, p. 54–57, 1998.

LIEBL, A., NEISS, A.; SPANNHEIMER. A.; REITBERGER, U.; WIESELER, B.; STAMMER, H.; et al. Complications, co-morbidity, and blood glucose control in type 2 diabetes mellitus patients in Germany--results from the CODE-2 study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, v. 110, p. 10–16, 2012.

LIMA, L. C. F. Cicatrização de feridas cutâneas isquêmicas em modelos murinos de diabetes tipo 1 e do tipo 2. 2015. 124 F. Tese de doutorado. Departamento

de fisiologia e farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

LIMA, L. D. C. Implicações do diabetes tipo 1 e do diabetes tipo 2 induzido por dietas obesogênicas sobre a neovascularização pós-isquêmica em camundongos. Tese de doutorado. Departamento de fisiologia e farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

LIVINGSTON, J. N. Genetically engineered mice in drug development, *Journal of Internal Medicine*, v. 245, p. 627-635, 1999.

MADONNA, R.; DE CATERINA, R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes - Part II: Cellular mechanisms and therapeutic targets. *Vascular Pharmacology*, v. 54, n. 3-6, p. 75-79, 2011.

MALAISSE, W. J. Alloxan toxicity to the pancreatic B-cell. A new hypothesis. *Biochemical Pharmacology*, v. 31, p. 3527-3534, 1982.

MARQUES-LOPES, I.; MARTI, A.; MORENO-ALIAGA, M. J.; MARTINEZ, A. Genetics of obesity. *Revista de Nutrição*, v.17, n.3, p. 327-338, 2004.

MARSO, S. P.; HIATT, W. R. Peripheral arterial disease in patients with diabetes. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 47, p. 921-929, 2006.

MARTIN, S. D.; MCGEE, S. L. The role of mitochondria in the aetiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta*, v. 1, p. 1303-1312, 2014.

MASCARENHAS, J. V. et al. Peripheral Arterial Disease. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v. 43, n. 1, p. 149-166, mar. 2014.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. v. 454, p. 428-35, 2008.

MENKE, N. B. et al. Impaired wound healing. *Clinics in dermatology*, v. 25, n. 1, p. 19-25, 2014.

MITROULIS, I. et al. Leukocyte integrins: Role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacology & therapeutics*, v. 147C, p. 123-135, 2015.

MITCHELL, R. N.; COTRAN, R. S. *Acute and Chronic Inflammation. In: Robbins Basic Pathology*. 7. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, cap. 2, p. 33-59, 2003.

MOHAMMEDI, K.; WOODWARD, K.; HIRAKAWA, Y.; ZOUNGAS, S.; WILLIAMS, B.; LISHENG, L.; RODGERS, A.; MANCIA, G.; NEAL, B.; HARRAP, S.; MARRE, M.; CHALMERS, J. Microvascular and Macrovascular Disease and Risk for Major Peripheral Arterial Disease in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, v. 39, n. 10, p. 1796-1803, 2016.

MONTANI, J. P.; ANTIC, V.; YANG, Z.; DULLOO, A. Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triagle. *The International Journal of Obesity*, v. 26, p. S28-S38, 2002.

MOULIK, P. K.; MTONGA, R.; GEOFFREY, V. Amputation and Mortality in New-Onset Diabetic Foot Ulcers Stratified by Etiology. *Diabetes Care*, v. 26, n.2, 2003.

MURABITO, J. M.; EVANS, J. C.; NIETO, K.; LARSON, M. G.; LEVY, D.; WILSON, P. W. Prevalence and clinical correlates of peripheral arterial disease in the Framingham Offspring Study. *American Heart Journal*, v. 143, n. 6, p. 961-965, 2002.

NANDI, A.; KITAMURA, Y.; KAHN, C. R.; ACCILI, D. Mouse models of insulin resistance. *Physiological Reviews*, v. 84, p. 623-647, 2008.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 871-882, 2010.

NDIP, A.; EBAH, L.; MBAKO, A. Neuropathic diabetic foot ulcers – evidence-to-practice. *International Journal of General Medicine*, v. 5, n. 5, p. 129–134, 2012.

NG, E. L. et al. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in older adults in an Australian emergency department. *Vascular*, v. 22, n. 1, p. 1–12, 2014.

NOLAN, C. J.; DAMN, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*, v. 378, p. 169-81, 2011.

OLIVEIRA, M. C. D. E.; et al. Platelet-activating factor modulates fat storage in the liver induced by a high-refined carbohydrate-containing diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 26, n. 9, p. 978–985, 2015.

OUCHI, N.; PARKER, J. L.; LUGUS, J. J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, p. 85–97, 2011.

OURIEL, K. Peripheral arterial disease. *Lancet*, v. 358, p.1257–1264, 2001.

PANICO, A. et al. Advances in peripheral arterial disease endovascular revascularization. *Cardiology clinics*, v. 33, n. 1, p. 89–98, 2015.

OYIBO, S. O.; CHALMERS, N.; BOULTON, A. J. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes Care*, v. 24, p. 1433–1437, 2001.

OZTURK, Y.; ATLAN, V. M.; YILDIZOGLU-ARI, N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacological Reviews*, v. 48, p. 69-112, 1996.

PEACH, G.; GRIFFIN, M.; JONES, K. G.; THOMPSON, M. M.; HINCHLIFFE, R. J. Diagnosis and management of peripheral arterial disease. *BMJ*, 2012.



PEDROSA, H. C.; NERY E. S.; SENA F. V.; NOVAES, C.; FELDKIRCHER, T. C.; DIAS, M. S. O.; et al. O desafio do projeto salvando o pé diabético. *Terapia em Diabetes*, v. 4, n. 19, p. 1-10, 1998.

PENUELAS, I.; ARANGUREN, X. L.; ABIZANDA, G.; MARTI-CLIMENT, J. M.; URIZ, M.; ECAY, M.; et al. <sup>13</sup>N-ammonia PET as a measurement of hindlimb perfusion in a mouse model of peripheral artery occlusive disease. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, v. 48, p. 1216–1223, 2007.

PETERS, A. M.; DANPURE, H. J.; OSMAN, S.; HAWKER, R. J.; HENDERSON, B. L.; HODGSON, H. J.; KELLY, J. D.; NEIRINCKX, R. D. Preliminary clinical experience with <sup>99m</sup>Tc-Hexamethylpropylene-amineoxine for labelling leucocytes and imaging infection. *Lancet*, v. 2, p. 945-949, 1986.

PLACZKOWSKA, S. et al. Associations between basic indicators of inflammation and metabolic disturbances. *Postepy Hig Med Dosw*, v. 68, p. 1374–1382, 2014.

POOVATHUMKAL, J. A.; GOPALSAMY R. G.; ANTONY S.; KEDIKE B.; ERENIUS T.; KUPPUSAMY S.; SAVARIMUTHU I.; NAIF A. A. Myoinositol ameliorates high-fat diet and streptozotocin-induced diabetes in rats through promoting insulin receptor signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. April, p. 1098–1113, 2017.

PORTHA, B.; BLONDEL, O.; SERRADAS, P. et al. The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabetes Metabolism*, v. 31, p. 61-75, 1989.

PROSPECTIVE UK, DIABETES STUDY (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*, v.352, p. 837–53, 1998.

QUONDAMATTEO, F. Skin and diabetes mellitus: what do we know? *Cell and tissue research*, v. 355, n. 1, p. 1–21, 2014.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. (Trad. Do Nascimento, A. P.); *Farmacologia*, 6ª ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2007.

RATHUR, H. M.; BOULTON, A. J. M. The diabetic foot. *Clinics in Dermatology*, v. 25, n. 1, p. 109–120, 2007.

RENNEN, H. J. J. M.; BOERMAN, O. C.; OYEN, W. J. G.; CORSTENS, F. H. M. Imaging infection/inflammation in the new millenium. *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 28, n. 2, p. 241-251, 2001.

RERUP, C. C.; Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacological reviews*, v. 22, p. 485-518, 1970.

ROBERTS, A. C.; PORTER, K. E. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes & vascular disease research: official journal of the international society of diabetes and vascular disease*, v. 10, n. 6, p. 472–82, 2013.

ROBILOTTA, C. C. A Tomografia por Emissão de Pósitrons: uma nova modalidade na medicina nuclear brasileira. *Rev. Panam Salud Publica*, v. 20(2/3), p.134–42, 2006.

SAAB, F.; MUKHERJEE, D.; GURM, H.; MOTIVALA, A.; MONTGOMERY, D.; KLINE-ROGERS, E.; EAGLE, K. Risk Factors in first presentation acute coronary syndromes (ACS): how do we move from population to individualized risk prediction? *Angiology*, v. 60, n. 6, p. 663-667, 2009.

SAHA, G.B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 4. ed. Cleveland, USA: Springer-Verlag, 1998.

SANTOS, E. W.; et al. Hematological and biochemical reference values for c57bl/6, swiss webster and balb/c mice. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, São Paulo, v. 53, n. 2, p. 138-145, 2016.

SANTOS, V. P.; SILVEIRA, D. R.; CAFFARA, R. A. Risk factors for primary major amputation in diabetic patients. *São Paulo Med. J.*, v.124, p. 66-70, 2006.

SANTOS, E. E.; OLIVEIRA, C. D.; HASTREITER, A.; SILVA, G. B.; BELTRAN J. S. O.; TSUJITA, M.; CRISMA, A. R.; NEVES, S.M.P.; FOCK, R.A.; BORELLI, P. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 53, n. 2, p. 138-145, 2016.

SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. Trends in diabetes mellitus in Brazil: the role of the nutritional transition. *Cad. Saúde Pública*, v. 19, (Sup. 1), p. S29-S36, 2003.

SCHEFFEL, R. S.; et. al. Prevalência de Complicações Micro e Macrovasculares e de Seus Fatores de Risco em Pacientes com Diabetes Melito do tipo 2 em Atendimento Ambulatorial. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 50, p. 263- 267, 2004.

SHOELSON, S.E.; LEE, J.; GOLDFINE. A.B. Inflammation and insulin resistance. *Journal Clinic Investigation*, v. 116, p. 1793–1801, 2006.

SELVIN, E. et al. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*, v. 141, p. 421–431, 2004.

SESHASAI, S. R. K.; KAPTOGE, S.; THOMPSON, A.; DI ANGELANTONIO, E.; GAO, P.; SARWAR, N.; et al. Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *New England Journal of Medicine*, v. 364, p. 829–841, 2011.

SCHUNK, M.; REITMEIR, P.; SCHIPF, S.; VÖLZKE, H.; MEISINGER, C.; THORAND, B.; et al. Health-related quality of life in subjects with and without Type 2 diabetes: pooled analysis of five population-based surveys in Germany. *Diabetic Medicine*, v. 29, p.646–53, 2012.

SIGNORE, A.; ANNOVAZZI, A.; CORSERTTI, F.; CAPRIOTTI, G.; CHIANELLI, M.; DE WINTER, F.; SCOPINARO, F. Biological Imaging for the diagnosis of inflammatory conditions. *Biodrugs*, v. 16, n. 4, p. 241-259, 2002.

SILVA, P. A.; NAVARRO, V. G.; PALUMBO, M. N.; FRANCESCONI, E. P. M. S. Radioactivity for health. *Revista Multidisciplinar da Saúde*. Ano 03. N.03, 2011.

SIMON, R.; CHERRY; J. A. SORENSON, M. E. P. *Physics in Nuclear Medicine*. 4ª edição 2012.

SMYTH, S.; HERONNATURE, A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nature Medicine*, v. 12, n1, 2005.

SOUZA, C. F. DE et al. Pré-diabetes: diagnóstico, avaliação de complicações crônicas e tratamento. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 56, n. 5, p. 275–284, 2012.

SRINIVASAN. K.; VISWANAD. B.; ASRAT, L.; KAUL, C. L.; RAMARAO, L. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological Research*, v. 52, Issue 4, p. 313–320, 2005.

STACY, M. R.; ZHOU, W.; SINUSAS, A. J. Radiotracer imaging of peripheral vascular disease. *Journal of society of Nuclear Medicine Technology*, v. 43, p. 185–192, 2015.

SUMNER, A. D.; KHALIL, Y. K.; REED, J. F. 3rd (2012) The relationship of peripheral arterial disease and metabolic syndrome prevalence in asymptomatic US adults 40 years and older: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (1999–2004). *Journal of Clinical Hypertension*, v. 14, p. 144–148, 2012.

SUMPIO, B. E. Contemporary evaluation and management of the diabetic foot. *Scientifica*, v. 2012, p. 435-487, 2012.

TANII, M. et al. Diabetic microangiopathy in ischemic limb is a disease of disturbance of the platelet-derived growth factor-BB/protein kinase C axis but not of impaired expression of angiogenic factors. *Circulation research*, v. 98, n. 1, p. 55–62, 2006.

TAVARES, D. M. S.; DIAS, F. A.; ARAUJO, L. R.; PEREIRA, G. A. Perfil de clientes submetidos a amputações relacionadas ao diabetes mellitus. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 62 (6), p. 825-830, 2009.

TEHAN, P. E.; CHUTER, V. H. Use of hand-held Doppler ultrasound examination by podiatrists: a reliability study. *Journal of Foot and Ankle Research*, v. 8, n. 1, p. 36, 2015.

THANGARAJAH, H.; VIAL, I. N.; GROGAN, R. H.; YAO, D. *et al.* HIF-1 $\alpha$  dysfunction in diabetes. *Cell Cycle*, v. 9, Iss. 1, 2010.

THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H.A. *Medicina nuclear*. 2. ed. London: Mosby, 2003.

THIRUVOIPATI, T. Peripheral artery disease in patients with diabetes: Epidemiology, mechanisms, and outcomes. *World Journal of Diabetes*, v. 6, n. 7, p. 961, 2015.

TRICHES, C.; *et al.* Complicações macrovasculares do diabetes melito: peculiaridades clínicas, de diagnóstico e manejo. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica*, v. 56, 2009.

TSCHÖP, M.; HEIMAN, M. L. Rodent obesity models: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, v. 109, n. 6, p. 307-919, 2001.

TSOPELAS, C. Radiotracers used for the scintigraphic detection of infection and inflammation. *The Scientific World Journal*, v. 2015, p. 676-719, 2015.

VALDIVIELSO, P.; RAMÍREZ-BOLLERO, J.; PÉREZ-LÓPEZ, C. Peripheral arterial disease, type 2 diabetes and postprandial lipidaemia: Is there a link? *World journal of diabetes*, v. 5, n. 5, p. 577–85, 2014.

VAN DAMME, H.; RORIVE, M.; MARTENS DE NOORTHOUT, B.; QUANIERS, J.; SCHEEN, A.; LIMET, R. Amputations in diabetes patients: a plea for footsparing surgery. *Acta chirurgica Belgica*, v. 101, p. 123-129, 2001.

VEMULAPALLI, S.; PATEL, M. R.; JONES, W. S. Limb ischemia: cardiovascular diagnosis and management from head to toe. *Current cardiology reports*, v. 17, n. 7, p. 611, 2015.

VIGO, K. O.; *et al.* Caracterização de pessoas com diabetes em unidades de atenção primária e secundária em relação a fatores de risco desencadeantes do pé diabético. *Acta Paul Enfermagem*, v. 19, p. 296-303, 2006.

VINIK A, MEHRABYAN A. Diabetic neuropathies. *Medical Clinics of North America*, v. 88, p. 947-999, 2004.

WALTERS, M. C., ABELSON, H. T. *Interpretação do hemograma completo. Clínicas Pediátricas da América do Norte*. Rio de Janeiro. Interlivros. v. 3, p. 577-599, 1996.

WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. *The Clinical Biochemist Reviews*, v. 26, p. 19–39, 2005.

WINZELL, M. S.; AHREN, B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 53, Suppl 3, p. 215-219, 2004.

ZHANG, M.; XIAO-YANL, V.; LI, J.; XU, Z.X.; CHE, L. The Characterization of High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model. *Experimental Diabetes Research*. V. 2008, Article ID 704045, 9 pages, 2008.