



**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO DE PACIENTES DIABÉTICOS  
COM A COMPLICAÇÃO DO PÉ DIABÉTICO**

**RANA PEREIRA DOS SANTOS BASTOS**

**Salvador – Bahia**

**2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental**

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO DE PACIENTES DIABÉTICOS  
COM A COMPLICAÇÃO DO PÉ DIABÉTICO**

**RANA PEREIRA DOS SANTOS BASTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental para obtenção do grau de Mestra.

**Orientadora:** Profa. Dra. Natália Machado Tavares

**Salvador – Bahia**

**2023**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

**B327c** Bastos, Rana Pereira dos Santos.

Caracterização do perfil inflamatório de pacientes diabéticos com a complicação do pé diabético. / Rana Pereira dos Santos Bastos. \_ Salvador, 2023.

58 f.: il.: 30 cm

Orientadora: Profa. Dra. Natália Machado Tavares

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

1. Diabetes. 2. Inflamação. 3. Úlcera de pé diabético. 4. Cicatrização. I. Título.

CDU 616.379-008.64

**"CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO DE PACIENTES DIABÉTICOS COM A  
COMPLICAÇÃO DO PÉ DIABÉTICO".**

**Rana Pereira dos Santos Bastos**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Salvador, 25 de maio de 2023.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

*Simone Garcia Macambira*

---

Dra. Simone Garcia Macambira  
Professora  
UFBA

*Valéria de Matos Borges*

---

Dra. Valéria de Matos Borges  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

*Natália Machado Tavares*

---

Dra. Natália Machado Tavares  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.”  
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo sustento nessa jornada.

Aos meus pais, Raul e Nali, pelo amor, dedicação, compreensão durante toda a minha vida. Amo vocês.

À Dra. Natália Tavares, por ser uma orientadora acolhedora e amável, pelo apoio e amizade que vão além de uma simples orientação, e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

À Dra. Sara Nunes, por ser minhas mãos e braços, meus pés e pernas. Sem você nada disso teria acontecido. Obrigada pelos ensinamentos, pelo ombro amigo, pela paciência e pela dedicação. Te amo e te admiro.

Ao Grupo NT, pela amizade, companheirismo, pelas risadas, pelo abraço, choro, dificuldades e aprendizados. Vocês fizeram a experiência da Fiocruz ser tão importante.

À Raíssa, por estar comigo nos experimentos, pelo olhar atento, pela escuta ativa, por seu riso frouxo e sua mão disposta. Sem a sua ajuda esse projeto não seria realizado.

À MSc. Elaine Carvalho, pelo carinho e amor adorados todos os dias no laboratório, que são transformadores. Sou alguém melhor por ter você em minha vida.

Aos meus familiares, especialmente à Carol, por segurar minha mão e ser meu apoio em todo tempo. Minha irmã, amo você mais do que consigo dizer.

Aos meus muitos amigos, muito obrigada por tudo. Amo vocês.

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Patologia Humana.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

À Universidade Federal da Bahia.

À Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal (UFBA).

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

BASTOS, Rana Pereira dos Santos. **Caracterização do perfil inflamatório de pacientes diabéticos com a complicação do pé diabético**. 2023. 58 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana). Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2023.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O diabetes é uma síndrome crônica caracterizada pelo aumento nos níveis de glicose circulante. Alterações metabólicas e doenças cutâneas estão entre suas complicações. A úlcera de pé diabético é causada pelo comprometimento de nervos e vasos periféricos, e apresenta dificuldade de cicatrização pela inflamação crônica de baixo grau sistêmica. **OBJETIVO:** Investigar mediadores inflamatórios na úlcera de pé diabético. **MÉTODOS:** O estudo inclui pacientes sem diabetes, diabéticos e diabéticos com lesão, além de pacientes com lesão ativa e em processo de cicatrização. A coleta do sangue foi realizada para obtenção de plasma e células mononucleares. Amostras da lesão foram coletadas na rotina de atendimento. A dosagem sérica de mediadores inflamatórios foi realizada por ELISA e Luminex. A expressão de genes-alvo de interesse foi avaliada nas biópsias da lesão. **RESULTADOS:** Diabéticos com úlcera de pé apresentam níveis séricos de IFN- $\gamma$  significativamente maiores em comparação aos demais grupos. Subgrupos de diabéticos alto produtores de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e LTB $_4$  foram identificados, além de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  para diabéticos com lesão. A avaliação de mediadores por Luminex mostrou que os níveis de IL-21, IL-31 e IL-33 são maiores em diabéticos cuja lesão está em cicatrização. Além disso, a expressão do gene PGE $_2$  sintase é maior nas lesões, enquanto o gene do receptor para LTB $_4$  encontra-se reduzido. **CONCLUSÃO:** Os pacientes com úlcera de pé diabético possuem níveis circulantes de IFN- $\gamma$  elevados, o que pode estar relacionado com o direcionamento inflamatório de macrófagos no diabetes para a lesão. A modulação positiva de *PTGS2* na lesão evidencia a participação de PGE $_2$  na inflamação. Além disso, os níveis elevados de IL-21, IL-31 e IL-33 em pacientes com lesão em cicatrização podem estar relacionados com a mudança de fase do reparo tecidual.

**Palavras-chave:** Diabetes. Inflamação. Úlcera de pé diabético. Cicatrização.

BASTOS, Rana Pereira dos Santos. **Characterization of the inflammatory profile of diabetic patients with diabetic foot ulcer complication**. 2023. 58 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana). Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2023.

### ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Diabetes is a chronic syndrome characterized by increased levels of circulating glucose. Metabolic alterations and cutaneous diseases are among its complications. Diabetic foot ulcers are caused by impairment of peripheral nerves and vessels, and present healing difficulties due to chronic low-grade systemic inflammation. **AIM:** To investigate inflammatory mediators in diabetic foot ulcers. **METHODS:** The study includes patients without diabetes, diabetics and diabetics with injury, as well as patients with active injury and healing process. Blood collection was performed to obtain plasma and mononuclear cells. Injury samples were collected during routine care. Serum dosage of inflammatory mediators was performed by ELISA and Luminex. The expression of target genes of interest was evaluated in the lesion biopsies. **RESULTS:** Diabetics with foot ulcers have significantly higher serum levels of IFN- $\gamma$  compared to the other groups. Subgroups of diabetics with high IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and LTB4 production were identified, in addition to TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  for diabetics with lesions. The evaluation of mediators by Luminex showed that the levels of IL-21, IL-31 and IL-33 are higher in diabetics whose wound is healing. In addition, the expression of the PGE<sub>2</sub> synthase gene is higher in the lesions, while the LTB4 receptor gene is reduced. **CONCLUSION:** Patients with diabetic foot ulcers have elevated circulating levels of IFN- $\gamma$ , which may be related to the inflammatory targeting of macrophages in diabetes to the lesion. The positive modulation of *PTGS2* in the lesion evidences the participation of PGE<sub>2</sub> in inflammation. Furthermore, the elevated levels of IL-21, IL-31 and IL-33 in patients with wounds in healing may be related to the phase change of tissue repair.

**Keywords:** Diabetes. Inflammation. Diabetic foot ulcer. Wound healing.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Úlcera de pé diabético	22
<b>Figura 2</b>	Dificuldade de cicatrização do pé diabético	24
<b>Figura 3</b>	Características gerais dos participantes do estudo	30
<b>Figura 4</b>	Caracterização inflamatória dos indivíduos SDM, DM e DM+Lesão por ELISA	33
<b>Figura 5</b>	Caracterização inflamatória de indivíduos alto produtores SDM, DM e DM+L por ELISA	34
<b>Figura 6</b>	Perfil de mediadores inflamatórios de indivíduos altos produtores e características associadas	36
<b>Figura 7</b>	Agrupamento hierárquico de indivíduos alto produtores dos grupos SDM, DM e DM+L	37
<b>Figura 8</b>	Parâmetros clínicos associados ao perfil inflamatório do grupo DM+L	38
<b>Figura 9</b>	Caracterização dos indivíduos DM+LA e DM +LE por ELISA	39
<b>Figura 10</b>	Caracterização inflamatória dos indivíduos DM+LA e DM+LE alto produtores por ELISA	40
<b>Figura 11</b>	Perfil de mediadores inflamatórios e suas interseções nos grupos de Diabetes e lesão de pé diabético	41
<b>Figura 12</b>	Produção de mediadores inflamatórios avaliados por Luminex.	43
<b>Figura 13</b>	Expressão gênica de mediadores inflamatórios na lesão	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Características gerais dos participantes dos grupos	29
<b>Tabela 2</b>	Características clínicas dos pacientes com Diabetes Mellitus	31
<b>Tabela 3</b>	Características dos pacientes com úlcera de pé diabético	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AA</b>	Ácido Araquidônico
<b>AGE</b>	Produtos Finais da Glicação Avançada
<b>ALOX5</b>	Araquidonato 5-lipoxigenase
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>AVC</b>	Acidente Vascular Cerebral
<b>BLT</b>	Receptor de Leucotrieno
<b>CAAs</b>	Células Apresentadoras de Antígenos
<b>CCL</b>	Ligantes de Quimiocinas CC
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CEDEBA</b>	Centro de Endocrinologia e Diabetes do Estado da Bahia
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>CXC</b>	Ligantes de Quimiocinas CXC
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>DAC</b>	Doença Arterial Coronariana
<b>DAMPs</b>	Padrões Moleculares Associados ao Dano
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>EET</b>	Ácidos Epoxieicosatrienoicos
<b>ELISA</b>	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
<b>EP</b>	Receptores Prostanoides
<b>GLUT4</b>	Receptor de Glicose 4
<b>HbA1c%</b>	Hemoglobina Glicada
<b>HLA</b>	Antígeno Leucocitário Humano
<b>HMGB1</b>	Proteína de Alta Mobilidade Box 1
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IGF-1</b>	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Ikappa Kinase
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INS</b>	Gene de Insulina
<b>IRS</b>	Substrato do Receptor de Insulina

<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal quinase
<b>LOX</b>	Lipoxigenase
<b>LT</b>	Leucotrienos
<b>LTB4R</b>	Gene do Receptor 1 de LTB4 – BLT1
<b>MAPK</b>	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>MFI</b>	Intensidade de Fluorescência Média
<b>MMP</b>	Metaloproteinases de Matriz
<b>MyD88</b>	Proteína de Resposta Primária de Diferenciação Mielóide 88
<b>NADPH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
<b>NLRs</b>	Receptores do tipo NOD
<b>PBMC</b>	Células Mononucleares de Sangue Periférico
<b>PG</b>	Prostaglandinas
<b>PLA2</b>	Fosfolipase A2
<b>PTGS2</b>	Prostaglandina Endoperóxido Sintase 2
<b>ROS</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>RT-qPCR</b>	Reação de Transcriptase Reversa em Cadeia de Polimerase em Tempo Real
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de Crescimento Transformador-beta
<b>TLRs</b>	Receptores do tipo Toll
<b>TNFAR</b>	Receptor do TNF- $\alpha$
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral-alfa
<b>VEGF</b>	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
1.1	DIABETES MELLITUS	15
1.1.1	<b>Aspectos gerais e epidemiológicos</b>	15
1.1.2	<b>Formas clínicas</b>	15
1.1.3	<b>Imunopatogênese do Diabetes</b>	16
1.1.4	<b>Inflamação no Diabetes</b>	17
1.1.5	<b>Complicações associadas</b>	19
1.2	PÉ DIABÉTICO	21
1.2.1	<b>Cicatrização de feridas</b>	23
2	<b>JUSTIFICATIVA</b>	25
2.1	HIPÓTESE	25
2.2	OBJETIVOS	25
2.2.1	<b>Objetivo Geral</b>	25
2.2.2	<b>Objetivos específicos</b>	25
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	26
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	26
3.2	PARTICIPANTES	26
3.3	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	26
3.4	SEPARAÇÃO DE PLASMA E DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)	27
3.5	QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	27
3.6	EXPRESSÃO GÊNICA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA LESÃO	27
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4	<b>RESULTADOS</b>	29
4.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO	29
4.2	NÍVEIS CIRCULANTES DE IFN- $\gamma$ ESTÃO AUMENTADOS EM DM+L ENQUANTO OS DE PGE <sub>2</sub> ESTÃO REDUZIDOS	33
4.3	DEFINIÇÃO DE INDIVÍDUOS ALTOS PRODUTORES DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS (ELISA)	34
4.4	IDENTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	35

	COMPARTILHADOS ENTRE ALTO PRODUTORES	
4.5	O STATUS DA CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES NÃO ALTERA O PERFIL INFLAMATÓRIO	39
4.6	DEFINIÇÃO DE INDIVÍDUOS ALTOS PRODUTORES E IDENTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DE INDIVÍDUOS COM LESÃO DE PÉ DIABÉTICO	40
4.7	NÍVEIS SÉRICOS DE IL-21, IL-31 E IL-33 ESTÃO AUMENTADOS EM INDIVÍDUOS COM LESÃO EM CICATRIZAÇÃO	42
4.8	A EXPRESSÃO DO GENE DE PGE <sub>2</sub> ESTÁ AUMENTADO, E DE BLT1 DIMINUÍDO NA LESÃO DE PÉ DIABÉTICO	44
5	<b>DISCUSSÃO</b>	45
6	<b>CONCLUSÃO</b>	50
7	<b>PERSPECTIVAS</b>	51
	<b>REFERÊNCIAS</b>	52

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 DIABETES MELLITUS

#### 1.1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos

O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome metabólica crônica caracterizada por níveis circulantes de glicose elevados, que pode ser causada pela deficiência na produção de insulina ou por defeitos na sinalização e resistência tecidual a esse hormônio (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). Cerca de 537 milhões de pessoas no mundo possuem a doença, com 1,5 milhão de mortes associadas a cada ano (WHO, 2023). No Brasil, cerca de 13 milhões de pessoas possuem o diagnóstico de diabetes, o que equivale a 9,4% da população, mas o número de acometidos pode ser ainda maior, visto que boa parte não conhece o diagnóstico. Em 2019, cerca de 108 mil óbitos no país foram associados à doença (MALTA et al., 2019).

Dados do International Diabetes Federation (IDF) de 2021 mostram que 3 em cada 4 adultos entre 20 e 79 anos com diabetes vivem em países de baixa e média renda, e que a doença causou um gasto de US\$ 966 bilhões na área da saúde mundial (IDF, 2021). No Brasil, em 2018, cerca de 30% dos gastos do Sistema Único de Saúde (SUS) foram atribuídos à doença e suas complicações (NILSON et al., 2020).

#### 1.1.2 Formas clínicas

O diabetes tipo 1 (DM1) é uma condição autoimune consequente da destruição das células beta pancreáticas por células imunológicas, o que leva à incapacidade do organismo de produzir a insulina (DIMEGLIO; EVANS-MOLINA; ORAM, 2018). Antígenos das células-beta pancreáticas são apresentadas a linfócitos T CD4+ e CD8+, causando seu reconhecimento e destruição (BLUESTONE; HEROLD; EISENBARTH, 2010). Os principais sintomas associados ao DM1 são sede e fome excessivas, aumento do volume urinário, perda de peso e alterações na visão (DIABETES UK, 2023). O indivíduo com DM1 é dependente de insulina exógena para sobreviver, e algumas abordagens terapêuticas voltadas para o controle do avanço da destruição das células beta vem sendo cada vez mais investigadas, como redirecionamento

de células T autorreativas e bloqueio de sinalização de citocinas inflamatórias (VON SCHOLTEN et al., 2021).

O Diabetes tipo 2 (DM2) é a forma mais comum da doença, acometendo cerca de 90% dos casos. Está associado a hábitos de vida, sedentarismo, obesidade, fatores genéticos e envelhecimento, que favorecem um estado de resistência à insulina tecidual e consequente hiperglicemia circulante (IDF, 2023). O tratamento consiste no uso de fármacos antidiabéticos, como metformina e glicazida, e nos casos mais graves, onde a hiperglicemia resultou em disfunção das células beta, a insulina também é utilizada (LANDMAN et al., 2014; (BERBUDI et al., 2020).

### 1.1.3 Imunopatogênese do Diabetes

O desenvolvimento do DM1 está relacionado com fatores ambientais, como infecções virais, infecções bacterianas, além de gatilhos químicos e nutricionais, como consumo de trigo e laticínios, e com mutações gênicas, como no gene das moléculas de antígenos leucocitários humanos (*HLA*) e Insulina (*INS*) (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011). Tais fatores associados promovem a liberação de autoantígenos das células beta, como insulina e GAD65, que são apresentados pelas células apresentadoras de antígeno (CAAs) a linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Estas células interagem com linfócitos B, que promovem a produção de autoanticorpos que são reconhecidos por CD8<sup>+</sup> autorreativas (BLUESTONE; HEROLD; EISENBARTH, 2010; VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011). Esse estresse inflamatório estimula a produção de citocinas como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) por macrófagos residentes nas ilhotas pancreáticas e linfócitos T CD4<sup>+</sup>, além de espécies reativas de oxigênio (ROS), amplificando a resposta inflamatória e diminuindo consideravelmente a população de células beta no pâncreas (CHEN et al., 2018).

No DM2, a resistência tecidual a insulina decorre de processos que inviabilizam o reconhecimento da insulina no receptor, como a obesidade (DONATH; SHOELSON, 2011). A obesidade é o principal fator de risco para desenvolvimento do DM2, e essa relação se dá por conta do estresse oxidativo estimulado por ácidos graxos livres, citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , interleucina-6 (IL-6) e IL-1 $\beta$ , e ROS produzidos no tecido adiposo. Esses fatores ativam receptores ativadores de *Ikappa kinase* B (IK $\kappa$ B) e a quinase I c-Jun N-terminal (JNK1), vias associadas à proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (BERBUDI et al., 2020). Essas



enzimas realizam a fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS), o que impede o reconhecimento e a atividade do hormônio, e conseqüentemente a translocação do receptor de glicose 4 (GLUT-4) para a membrana (BERBUDI et al., 2020).

#### 1.1.4 Inflamação no Diabetes

A inflamação é um processo biológico essencial, que em situações normais, leva à resolução e eliminação do estímulo inflamatório, mas quando exacerbada e persistente, causa dano tecidual (CHEN; NUÑEZ, 2010). No diabetes, a hiperglicemia crônica causa um processo inflamatório persistente em ambas as formas da doença, associado às diversas complicações (KANTER; BORNFELDT, 2016).

A inflamação de baixo grau, relacionada à resistência à insulina na obesidade, é induzida por acúmulo de células imunes, especialmente macrófagos. Eles são essenciais em diversos processos biológicos, devido a sua grande plasticidade. Eles são derivados de monócitos circulantes, e seu fenótipo e resposta inflamatória dependem do microambiente em que são diferenciados (CHAWLA; NGUYEN; GOH, 2011). Os macrófagos clássicos (M1) são ativados por IFN- $\gamma$ , apresentando um perfil pró-inflamatório, com produção de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (MURRAY et al., 2014). Estudos mostram que o TNF- $\alpha$  está envolvido tanto na destruição das ilhotas pancreáticas quanto na resistência à insulina, e o bloqueio da sua sinalização via receptor TNFAR restaura a sensibilidade tecidual em camundongos diabéticos não obesos (KOULMANDA et al., 2012).

Os macrófagos alternativos, denominados M2, com função anti-inflamatória, são ativados principalmente por prostaglandinas (PGs), IL-4, IL-13 e IL-10 (AITCHESON et al., 2021). Em síndromes metabólicas, os macrófagos M1 estão diretamente associados à resistência à insulina e a obesidade, por meio da ativação de receptores do tipo *Toll* (TLRs), como TLR2 e TLR4 por ácidos graxos (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007). A sinalização promove a ativação da proteína de resposta primária de diferenciação mieloide 88 (*MyD88*), desencadeando na produção de citocinas inflamatórias induzida por I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B e JNK, caracterizando a inflamação na resistência à insulina (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006).

Outros receptores de resposta imune inflamatória também são envolvidos na resposta à inflamação de baixo grau na resistência à insulina tecidual, como os receptores do tipo NOD (NLRs), especialmente o NLRP3, relacionados à via de ativação de inflamassoma (CHAWLA;

NGUYEN; GOH, 2011). O NLRP3 é ativado a partir do reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) em TLRs, e ativam a caspase-1, promovendo a ativação de NF- $\kappa$ B e a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 (SWANSON; DENG; TING, 2019). Estudos mostram que camundongos deficientes para o gene *NLRP3* apresentam maior tolerância tecidual à glicose (ZHOU et al., 2010), evidenciando a relação do inflamassoma na resistência à insulina.

Além das citocinas inflamatórias, os mediadores lipídicos também são associados à inflamação no diabetes. Eles são produzidos a partir do metabolismo do ácido araquidônico (AA) derivado dos fosfolipídios de membrana pela enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) em resposta a diferentes estímulos inflamatórios (BENNETT; GILROY, 2016). O AA é metabolizado pela via das cicloxigenases (COX), gerando as prostaglandinas (PG), das lipoxigenases (LOX), gerando os leucotrienos (LT), ou do citocromo P450 (CYP), gerando os ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) (BENNETT; GILROY, 2016).

A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) é um mediador lipídico produzido por COX-1 e 2, e possui quatro receptores prostanoídes (EP) descritos, EP1, 2, 3 e 4 (WANG et al., 2022). A PGE<sub>2</sub> tem sido amplamente descrita por suas funções fisiológicas anti-inflamatórias, como regeneração de tecidos e angiogênese em quadros de isquemia (HUANG et al., 2022). Além disso, a PGE<sub>2</sub> é essencial na cicatrização de feridas, promovendo angiogênese e migração celular na lesão, induzindo o fenótipo M2 em macrófagos e regulando a deposição de matriz extracelular (CHENG et al., 2021). Por outro lado, o Leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) é produzido por ALOX5 e possui dois receptores (BLT), BLT1 e BLT2, com maior afinidade pelo BLT1. O eixo LTB<sub>4</sub>/BLT1 induz resistência à insulina por promover o fenótipo M1 no tecido adiposo, por mecanismos associados à indução de JNK (CALLEGARI; OLIVEIRA, 2022). Em camundongos diabéticos, aqueles deficientes para o gene do receptor BLT1 ou o tratamento farmacológico com seu antagonista resultou numa redução significativa da inflamação e resistência à insulina (LI et al., 2015). Além disso, trabalhos anteriores do nosso grupo evidenciaram a produção exacerbada de LTB<sub>4</sub> em pacientes diabéticos infectados com *Leishmania braziliensis*, bem como uma maior dificuldade de resolução da lesão cutânea (BONYEK-SILVA et al., 2020).

### 1.1.5 Complicações associadas

O diabetes é associado a diferentes complicações macrovasculares, que envolvem principalmente as doenças cardiovasculares e arteriais; e microvasculares, que são as retinopatias, nefropatias e neuropatias, afetando capilares e terminações nervosas (FORBES; COOPER, 2013). Além disso, os indivíduos diabéticos possuem maior susceptibilidade a infecções e maior dificuldade de cicatrização de lesões (CASQUEIRO; CASQUEIRO; ALVES, 2012).

As cardiomiopatias são as principais complicações diabéticas macrovasculares, sendo a maior causa de morte dentre os portadores da doença, com redução de expectativa de vida de até 10 anos (EINARSON et al., 2018). As principais doenças associadas a esse grupo são a doença arterial coronariana (DAC) e o acidente vascular cerebral (AVC), e geralmente estão relacionadas também com acúmulo de ácidos graxos e dislipidemias (JIA; HILL; SOWERS, 2018). A patogênese das doenças cardiovasculares diabéticas está relacionada principalmente com disfunções mitocondriais causadas pela hiperglicemia, com aumento da atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e consequente aumento de produção de ROS, e produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido, como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (RITCHIE; ABEL, 2020; SAAD et al., 2023).

A nefropatia diabética se caracteriza por lesões renais e diminuição de taxa de filtração glomerulares, que por fim, resultam em insuficiência renal (GROSS et al., 2005). Há aumento de excreção de albumina, o que leva à proteinúria, com presença de infiltrado inflamatório nos glomérulos, marcado pela produção de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo (ARAÚJO et al., 2020; LIM, 2014). Além disso, a restrição de metaloproteinases de matriz (MMP) por estímulo de TGF- $\beta$  produzido por macrófagos M2 aumenta a deposição de matriz extracelular (MEC), resultando em fibrose renal (CHEN et al., 2022). A via de sinalização de TLR2 é de grande importância no desenvolvimento da nefropatia, por induzir a ativação de NF $\kappa$ B e produção de citocinas, e a deficiência neste gene em camundongos diabéticos resultou em menor hipertrofia e fibrose glomerulares em comparação com camundongos selvagens (MA et al., 2014).

A retinopatia diabética é a principal causa de cegueira em adultos, associada a descontrole glicêmico, tempo de diabetes e hipertensão arterial (FORBES; COOPER, 2013; LIN et al., 2021). Pode ser classificada em retinopatia não proliferativa e proliferativa; a não

proliferativa consiste em microaneurismas na parede capilar que prejudicam a perfusão sanguínea e que podem se romper, causando hemorragias pontuais. A proliferativa surge como resultado da hipoperfusão, com formação de novos vasos de forma compensatória, por meio da ação de VEGF. Esse quadro resulta em edema e espessamento da retina, que pode avançar para a cegueira (KOLLIAS; ULBIG, 2010). Além disso, a retinopatia está associada ao acúmulo de produtos finais da glicação avançada (AGEs), que são formados a partir de ligações covalentes entre a glicose e proteínas ou lipídios (BEHL; KAUR; KOTWANI, 2016). Os AGEs são capazes de estimular a produção de ROS por aumento de NADPH oxidase, que também promovem a expressão de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias por meio da ativação das vias de MAPK e NF- $\kappa$ B (GUI et al., 2020).

A neuropatia diabética é a complicação mais comum do diabetes, que afeta cerca de 50% dos indivíduos com a doença. Ela é caracterizada pela degeneração axonal, que pode ser ocasionada por isquemia ou hipóxia relacionadas à hiperglicemia (TESFAYE et al., 2010). Tem um padrão de distribuição conhecido como “meia-luva”, que se inicia pelos membros inferiores avançando para os superiores, conhecida como polineuropatia diabética (ALBERS; POP-BUSUI, 2014). Seu principal sintoma é a perda de sensibilidade periférica, porém pacientes com níveis mais graves da doença demonstram sintomas como formigamento, queimação e podem avançar para a dor neuropática e desenvolvimento de lesões na pele (ROSENBERGER et al., 2020). Esse quadro pode evoluir para formas mais agravadas, afetando o sistema nervoso autônomo (neuropatia autonômica diabética), que comprometem o funcionamento dos órgãos e resultam em complicações cardiovasculares, gastrointestinais, geniturinários, pupilares, entre outras (POP-BUSUI et al., 2017).

O desenvolvimento da neuropatia é multifatorial, no entanto não completamente compreendido. Sabe-se que o dano a axônios de neurônios motores periféricos causados pela isquemia pode levar à diminuição da expressão de proteínas nos gânglios da raiz dorsal e consequente retração das células de Schwann da bainha de mielina. Esse quadro impede a transferência ribossomal das células de Schwann para os axônios, o que promove a degeneração axonal por inadequação do citoesqueleto (GONÇALVES et al., 2017). O estresse oxidativo causado pela hiperglicemia compromete a fosforilação oxidativa e a beta-oxidação, promovendo o aumento da produção de ROS impedindo a formação de mecanismos antioxidantes, levando à disfunção mitocondrial (FELDMAN et al., 2019; VIADER et al., 2013). Além disso, a formação de AGEs e a ligação com seus receptores (RAGEs) associados

à produção de ROS, ativam NFκB e promovem a produção de mediadores inflamatórios (PANG et al., 2020). Estudos relatam o aumento de TNF-α (S.E. et al., 2019) e de produtos da COX-2, como PGE<sub>2</sub> (KELLOGG et al., 2007) em pacientes e camundongos diabéticos, respectivamente. Ademais, a presença de TGF-β no sistema nervoso de camundongos diabéticos induz lesão neuronal por clivagem de caspase-1 (ANJANEYULU et al., 2008), reforçando o envolvimento de vias inflamatórias no mecanismo patogênico da complicação.

## 1.2 PÉ DIABÉTICO

O pé diabético é uma complicação causada pelo desenvolvimento de úlceras nos membros inferiores, associada a neuropatia periférica e a doenças vasculares periféricas (Figura 1) (REARDON et al., 2020). Possui altas taxas de morbidade e mortalidade, com um risco de desenvolvimento da lesão de 34% entre os diabéticos, e risco de amputação em 60 a 90% dos casos, além de altos níveis de incidência de recidiva da lesão, em 40% após cinco anos da cicatrização (CERQUEIRA et al., 2022). Além disso, as taxas de mortalidade em cinco anos são de até 45% (MADER et al., 2019).

O desenvolvimento da úlcera de pé diabético é associado a diversos fatores como uso de calçados inadequados, busca por atendimento médico tardio e desenvolvimento de hiperqueratose (calos) causados por pressão pontual e neuropatia periférica (MURRAY et al., 1996). Além disso, fatores sociais como uso de transporte público para acesso ao centro de tratamento da lesão e dúvidas quanto ao atendimento médico apresentaram maior prevalência entre pacientes com amputação (CERQUEIRA et al., 2022).



**Figura 1.** Úlcera de pé diabético  
**Fonte:** (VOLMER-THOLE; LOBMANN, 2016).

Deformidades na estrutura óssea do pé, conhecidas como osteoartropatias neuropáticas de Charcot, são comumente associadas ao desenvolvimento de lesões nos membros inferiores (AKKUS; SERT, 2022). O pé de Charcot é causado pela neuropatia periférica, com destruição de estrutura óssea e microfraturas associadas à perda de sensibilidade, que favorecem o desenvolvimento de lesões e amputações (TRIEB, 2016). Estudos mostram que pacientes com pé de Charcot apresentam uma expectativa de vida reduzida em cerca de 14 anos em relação à população geral (VAN BAAL et al., 2010).

A dificuldade na cicatrização do pé diabético acontece devido a um conjunto de complicações, envolvendo inflamação, doença arterial periférica, neuropatia e hipóxia (ARMSTRONG; BOULTON; BUS, 2017). Os mecanismos de cicatrização de feridas prejudicadas no diabetes vêm sendo estudadas, com atenção especial às lesões do pé diabético. Os tratamentos mais utilizados nas lesões incluem desbridamento, uso de pressão negativa, além de curativos e diminuição da carga sobre o pé lesionado (BRAUN et al., 2014).

### 1.2.1 Cicatrização de feridas

O reparo tecidual e cicatrização das lesões é um processo que envolve diferentes fases e a progressão entre elas precisa ser cuidadosamente regulada. No DM, essa progressão é

impedida como consequência da inflamação crônica e disfunção da reepitelização. A cicatrização é composta por quatro estágios que se sobrepõem: fase hemostática, fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação ou cicatrização (RAZIYEVA et al., 2021).

A hemostasia ocorre nos momentos iniciais após a lesão, visando impedir o sangramento. As plaquetas iniciam a cascata de coagulação pela sua degranulação e liberação do fibrinogênio solúvel, permitindo a formação de fibrina (MARTIN; NUNAN, 2015). A fase inflamatória é a seguinte, com infiltrado de células imunes e produção de mediadores inflamatórios. As células do infiltrado inflamatório são ativadas em resposta à sinalização por DAMPs liberados pelas células teciduais danificadas (RODRIGUES et al., 2019).

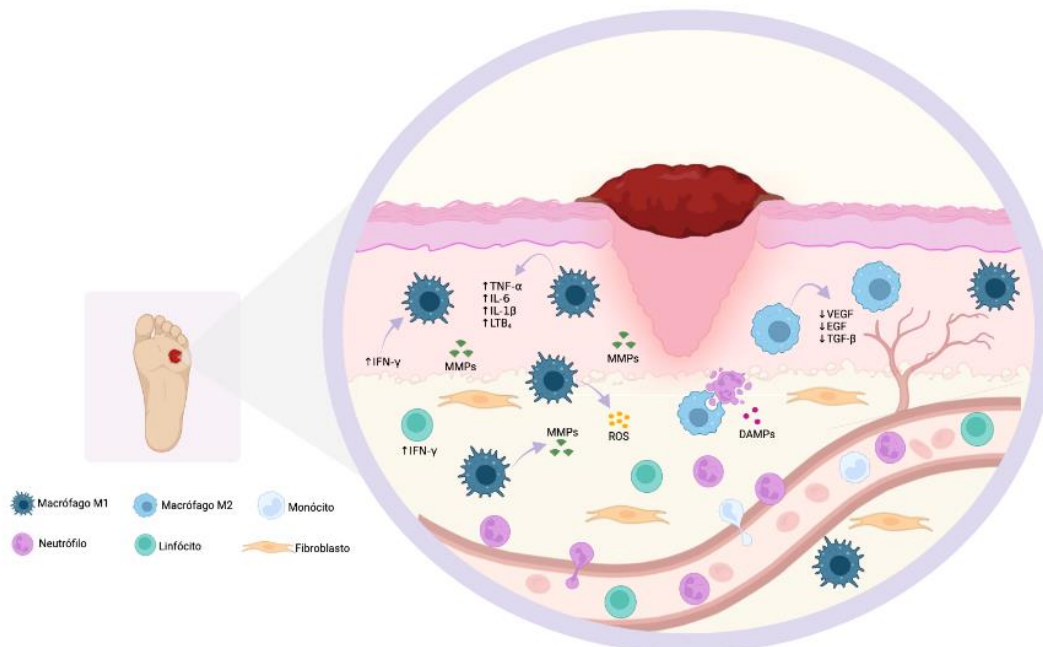
Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local da lesão, por serem mais abundantes na circulação e possuírem um curto período de vida, visando a rápida destruição de possíveis patógenos por meio da produção de ROS e fagocitose. Fatores como IL-8, citocinas da família IL-1, ATP, proteína de alta mobilidade *box 1* (*High mobility group box 1 protein* – HMGB1), ligante de quimionas CXC (CXCL) e CC (CCL), entre outros, são alguns dos DAMPs com papel quimioatratador, que são reconhecidos por receptores como TLR nas células imunes (RAZIYEVA et al., 2021; WILGUS, 2018).

Os macrófagos se tornam as células predominantes no tecido danificado em cerca de 48 horas, e são as principais células imunes em todo o processo de resolução da lesão (ELLIS; LIN; TARTAR, 2018). Tanto macrófagos M1, quanto linfócitos Th1 secretam citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2), mediadores lipídicos (LTB<sub>4</sub>) e ROS em resposta à lesão. Além disso, as enzimas MMPs, especialmente MMP-2 e MMP-9, são secretadas por macrófagos e degradam a MEC para permitir a ação das demais células imunes e a proliferação celular. Os macrófagos também são responsáveis por eliminar neutrófilos apoptóticos do tecido, um processo denominado de eferocitose (LAROUICHE et al., 2018).

O predomínio de macrófagos M2 inicia a fase proliferativa da resolução de lesões, produzindo fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), TGF- $\beta$  e VEGF, que promovem a angiogênese e a remodelação da MEC por modulação das MMPs, com auxílio das células Th2, também com perfil resolutivo (AITCHESON et al., 2021; RAZIYEVA et al., 2021). O tecido de granulação é formado a partir da deposição colágeno tipo III, com a proliferação de fibroblastos e formação de vasos, visando a reepitelização dos queratinócitos (KRZYSZCZYK et al., 2018).

Por fim, a fase de remodelação consiste na transição do tecido de granulação para a cicatriz, com a deposição do colágeno tipo I. Os miofibroblastos e os macrófagos secretam MMPs para degradação da MEC e substituição do colágeno (SORG et al., 2017). A depender da extensão da lesão, a cicatriz formada pode comprometer a função e ter uma aparência hipertrófica, com deposição desorganizada de colágeno tipo I e tipo III, formando um queloide (WANG et al., 2018).

Em diabéticos, o equilíbrio da resposta de macrófagos M1 e M2 é comprometida. A inflamação causada pela hiperglicemia e ácidos graxos livres induzem a mudança de fenótipo M2 para M1, e a diferenciação de monócitos pela via clássica (CHAWLA; NGUYEN; GOH, 2011). Além disso, a evolução para as demais fases da cicatrização é comprometida, já que a produção de fatores de crescimento como VEGF, TGF- $\beta$  e EGF e de citocinas anti-inflamatórias é majoritariamente feita pelos macrófagos M2 (LIN et al., 2022). A produção exacerbada de MMPs por macrófagos M1 traz dano à MEC, impedindo que mais células sejam recrutadas para a resolução da lesão. Sua capacidade fagocítica é diminuída, causando acúmulo de neutrófilos e fibroblastos apoptóticos, mantendo o ambiente inflamatório e tornando a lesão mais susceptível a infecções (AITCHESON et al., 2021). Em conjunto, essas alterações mantêm o microambiente da úlcera em pé diabético com predomínio de mediadores inflamatórios, retardando os mecanismos resolutivos e cronificando a lesão.



**Figura 2.** Dificuldade de cicatrização do pé diabético. A lesão de pé diabético é caracterizada pelo aumento do infiltrado inflamatório, especialmente de macrófagos de perfil M1 em detrimento de macrófagos de perfil M2.

**Fonte:** Elaborado pela autora



## 2 JUSTIFICATIVA

O Diabetes Mellitus está associado a complicações secundárias que comprometem a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. As lesões ulceradas nos membros inferiores de pacientes com diabetes têm ganhado grande importância nos últimos anos, afetando em média 2-4% dos pacientes. Essas lesões apresentam uma grande dificuldade e escassez de tratamentos, possuindo assim, uma taxa de progressão de até 85%, resultando na amputação dos membros comprometidos. Sendo assim, se faz necessário estudos com a finalidade de identificar potenciais biomarcadores relacionados com o desenvolvimento dessas lesões, possibilitando um melhor acompanhamento e tratamento desses pacientes.

### 2.1 HIPÓTESE

Os pacientes com a complicação do pé diabético apresentam níveis elevados de mediadores inflamatórios, que comprometem a cicatrização da úlcera.

### 2.3 OBJETIVOS

#### 2.3.1.1 Objetivo Geral

Investigar mediadores inflamatórios na úlcera de pé diabético.

#### 2.3.2 Objetivos específicos

- Identificar o perfil de mediadores inflamatórios séricos em pacientes diabéticos com e sem úlcera cutânea em membros inferiores;
- Definir uma bioassinatura de mediadores inflamatórios associada ao desenvolvimento do pé diabético;
- Associar o perfil de mediadores inflamatórios com parâmetros da lesão de pé diabético;
- Avaliar a expressão de mediadores inflamatórios em amostras da lesão de pé diabético.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios da Declaração de Helsinque e nas diretrizes éticas locais. Trata-se de um estudo transversal observacional desenvolvido em colaboração com o Centro de Endocrinologia e Diabetes do Estado da Bahia (CEDEBA), localizado em Salvador. O projeto possui aprovação no Conselho de Ética em Pesquisa do Instituto Gonçalo Moniz (IGM), sob número CAAE: 29874020.7.0000.0040.

#### 3.2 PARTICIPANTES

O estudo é constituído por 3 grupos, com erro amostral de 5% e intervalo de confiança de 95%. Resultando em um grupo controle (sem diabetes, n=21), grupo com diabetes (n=44) e acometidos com a lesão de pé diabético (n=42).

Foram incluídos nesse estudo apenas indivíduos maiores de idade (18 anos), com diagnóstico de diabetes confirmado por médico e que consentiram em participar do estudo, sob aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram considerados pacientes com pé diabético os que apresentam lesão ulcerada em membros inferiores, atendidos regularmente no CEDEBA. Foram excluídos os indivíduos que possuíssem outras doenças endócrinas, como hipotireoidismo e hipertireoidismo, doenças hepáticas e histórico de malignidades.

#### 3.3 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram coletados 10 ml de sangue periférico de cada paciente usando tubo a vácuo com o anticoagulante heparina sódica. As amostras de lesão de pé diabético (curetagem e biópsia) foram coletadas durante procedimento de curetagem feitas rotineiramente no CEDEBA para limpeza e troca de curativo, e armazenadas em meio RPMI. Após seu processamento, as curetagens e biópsias foram armazenadas nos reagentes TRIzol (Invitrogen, CA) e congeladas em -80 °C.

### 3.4 SEPARAÇÃO DE PLASMA E DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

As amostras de sangue foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos a 24 °C para obtenção do plasma, que foi aliquoteado e armazenado a -80 °C para análises posteriores. O material restante foi utilizado para separação de PBMC, utilizando o reagente HISTOPAQUE (Sigma Aldrich, MO), que permite a formação de uma nuvem de células na interface entre as hemácias e o sobrenadante restante. O sangue sobreposto no HISTOPAQUE foi centrifugado a 400 x g por 30 minutos a 24 °C, e as células obtidas foram lavadas com salina estéril a 4 °C, contadas em câmara de Neubauer e criopreservadas em nitrogênio líquido.

### 3.5 QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$  e IL-2 (R&D Systems, MN), e os mediadores lipídicos LTB<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> (Cayman, MI) foram quantificados por meio de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) sanduíche e de competição, de acordo com as instruções do fabricante.

Para a caracterização do perfil de citocinas inflamatórias no plasma dos pacientes subdivididos em Lesão Ativa e Lesão Em Cicatrização, foi utilizado o kit MILLIPLEX® MAP Human TH17 Magnetic Bead Panel para os mediadores IL-17F, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, CCL20/MIP3a, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-22, IL-9, IL-1 $\beta$ , IL-33, IL-2, IL-21, IL-4, IL-23, IL-5, IL-6, IL17E/IL-25, IL-27, IL-31, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  e IL-28A no plasma. O método do Luminex se baseia na análise da fluorescência emitida por meio de microesferas (*beads*) magnéticas ligadas a anticorpos específicos para cada mediador. A intensidade de fluorescência média (MFI) foi convertida para concentração em picogramas por mililitro (pg/mL).

### 3.6 EXPRESSÃO GÊNICA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA LESÃO

Para avaliação da expressão de mediadores lipídicos na lesão de pé diabético, foi realizada a extração do RNA total das amostras de biópsia ou curetagem armazenadas em TRIzol utilizando miRNeasy Mini Kit (Qiagen, NL), seguindo as orientações do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi obtido utilizando miRScript® SYBR Green PCR Kit

(Invitrogen, San Diego, CA, EUA). Em seguida, foi realizada a reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) para os genes *PTGS2* (Prostaglandina endoperóxido sintase 2, COX-2, que produz PGE2), *LTB4R* (receptor 1 de LTB4 – BLT1), *ALOX5* (Araquidonato 5-lipoxigenase, que produz LTB4) e *IFNG* (IFN- $\gamma$ ). A expressão relativa foi analisada por método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , com parâmetro do gene constitutivo  $\beta$ -actina.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, San Diego, CA). Foram realizados testes de Kolmogorov-Smirnov para avaliação da distribuição dos dados. Para análise de comparação de dois grupos, o teste t de Student foi utilizado para os dados paramétricos, e para não paramétricos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Os grupos não paramétricos foram analisados por teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, para comparação de três grupos. Para identificação dos dados discrepantes em relação a distribuição, foi realizada a análise de *outliers*.

Para definição de assinatura de altos produtores, o valor da mediana global para cada mediador inflamatório foi definido como ponte de corte (*cut-off*). Os indivíduos foram considerados altos produtores quando apresentaram valores de citocinas acima da mediana global (percentil 50%). Para análise de agrupamento hierárquico e confecção do mapa de calor (*heatmap*), foi utilizado o software Orange 3.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Os indivíduos participantes do estudo foram definidos entre os seguintes grupos: controle ou sem diabetes (SDM), Diabetes (DM) e Diabetes com Lesão de pé diabético (DM+L) (Tabela 1). Ademais, foi feito o pareamento entre os grupos de acordo com a idade. Não foi possível parer os grupos por sexo, já que a maioria (65%) dos indivíduos do grupo DM+L são do sexo masculino.

**Tabela 1.** Características gerais dos participantes dos grupos

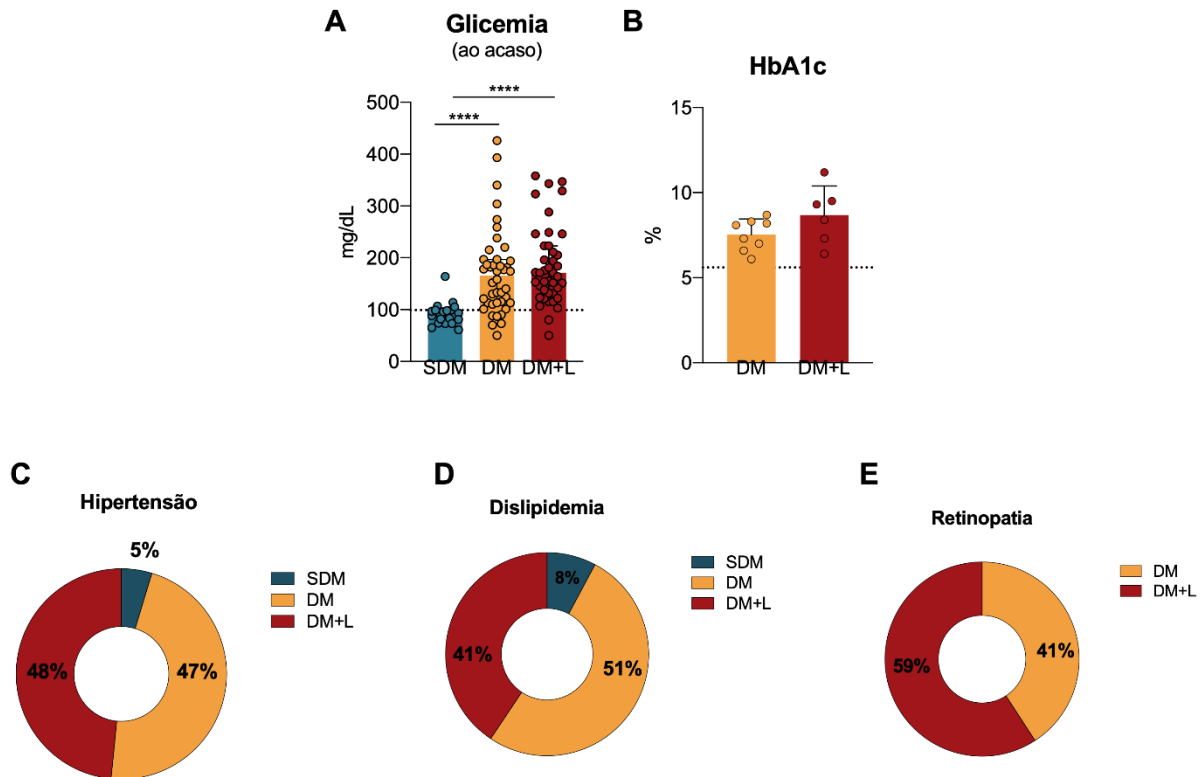
<b>Grupos</b>	<b>Sem diabetes (n = 21)</b>	<b>Diabetes (n = 44)</b>	<b>Pé diabético (n = 42)</b>	<b>p valor</b>
<b>Características</b>				
<b>Idade</b>	55 (41-60)	59 (51-69)	60 (55-68)	0,0559
<b>Sexo, n (%)</b>				<b>0,0004</b>
Masculino	3 (15)	16 (36)	28 (65)	
Feminino	17 (85)	28 (64)	15 (35)	
<b>Índice de massa corporal (IMC)</b>	25,97 (23-30)	26,34 (24-32)	26,28 (23-32)	0,7984
<b>Glicemia ao acaso (mg/dL)</b>	93 (76-99)	166 (113-197)	171 (132-223)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Comorbidades, n (%)</b>				
Hipertensão	3 (19)	30 (70)	31 (77)	<b>0,0001</b>
Obesidade	5 (33)	15 (40)	14 (33)	0,8294
Dislipidemia	5 (31)	33 (77)	26 (65)	<b>0,0051</b>

Dados apresentados em mediana (intervalo interquartil 25-75%).

Fonte: Elaborado pela autora

O valor da glicemia ao acaso evidenciou a diferença entre os grupos, em que o grupo SDM está dentro dos parâmetros internacionais de glicemia normais ( $\leq 99$  mg/dL) (Figura 3A). Não houve diferença significativa nos níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) dos participantes dos grupos DM e DM+L (Figura 3B). Em relação às comorbidades, os grupos de pacientes

diabéticos (DM e DM+L) apresentam maior número de indivíduos com hipertensão e dislipidemia em comparação ao grupo SDM (Figura 3 C e D).



**Figura 3. Características gerais dos participantes do estudo.** A) Valores de Glicemia ao acaso (mg/dL) dos grupos SDM, DM e DM+L. Linha pontilhada em 99 mg/dL. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. B) Valores de Hemoglobina glicada (HbA1c%) dos grupos DM e DM+L. Linha pontilhada em 5,6%. Teste *t* de student. C) Porcentagem dos indivíduos com hipertensão dos grupos SDM, DM e DM+L. D) Porcentagem dos indivíduos com dislipidemia dos grupos SDM, DM e DM+L. Teste de chi-quadrado. E) Porcentagem dos indivíduos com retinopatia dos grupos DM e DM+L. Teste exato de Fisher; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Fonte: Elaborado pela autora

Com relação aos indivíduos diabéticos (DM e DM+L), ambos os grupos têm predomínio de pacientes com DM2, com média de tempo de diabetes de aproximadamente 18 anos (Tabela 2). Os parâmetros laboratoriais dos grupos foram obtidos, e não há diferença significativa em nenhum deles entre os dois grupos. Nas complicações diabéticas, não há diferença significativa entre os grupos para neuropatia periférica, nefropatia e doença cardiovascular, mas o grupo DM+L apresenta maior número de indivíduos com retinopatia em comparação com o grupo DM.

**Tabela 2.** Características clínicas dos pacientes com Diabetes Mellitus.

<b>Grupos</b>	<b>Diabetes (n = 44)</b>	<b>Pé diabético (n = 42)</b>	<b>p valor</b>
<b>Características</b>			
<b>Diabetes, n (%)</b>			0,4326
Tipo 1	5 (12)	2 (5)	
Tipo 2	37 (88)	40 (95)	
Tempo de DM (anos)	17,91 ± 9,6	17,83 ± 9,8	0,9726
<b>Complicações, n (%)</b>			
Neuropatia periférica	33 (78)	32 (80)	>0,9999
Retinopatia	20 (46)	29 (74)	0,0134
Nefropatia	12 (28)	11 (27)	>0,9999
Doença cardiovascular (IAM/AVC)	11 (26)	11 (28)	0,0695
<b>Parâmetros laboratoriais</b>			
Hemoglobina glicada (HbA1c%)	7, ± 0,92	8,6 ± 1,7	0,1311
Colesterol total (mg/dL)	176,3 ± 40,3	162,5 ± 64,2	0,6379
HDL (mg/dL)	44 (40-55)	47 (34-55)	0,9452
LDL (mg/dL)	100,1 ± 28	93,2 ± 41	0,7261
<b>Medicamento antidiabético, n (%)</b>			
Insulina	30 (68)	29 (69)	>0,9999
Metformina	21 (48)	22 (51)	0,8313
Glicazida	8 (18)	5 (12)	0,5502
Acarbose	1 (2)	0 (0)	0,4944

Dados em média+Desvio Padrão e mediana (intervalo interquartil 25-75%).

**Fonte:** Elaborado pela autora

No grupo DM+L, 71% dos indivíduos possuem lesão ativa, enquanto 29% possuem lesão em processo de cicatrização (Tabela 3). A maioria das lesões ativas (69%) possuem

diagnóstico de lesão neuropática, com mediana de área de 200 mm<sup>3</sup> e tempo de lesão de 28,2 semanas. Ademais, 65% destes pacientes deles possuem histórico de amputação, onde 87% delas são em nível de pé.

**Tabela 3.** Características dos pacientes com úlcera de pé diabético.

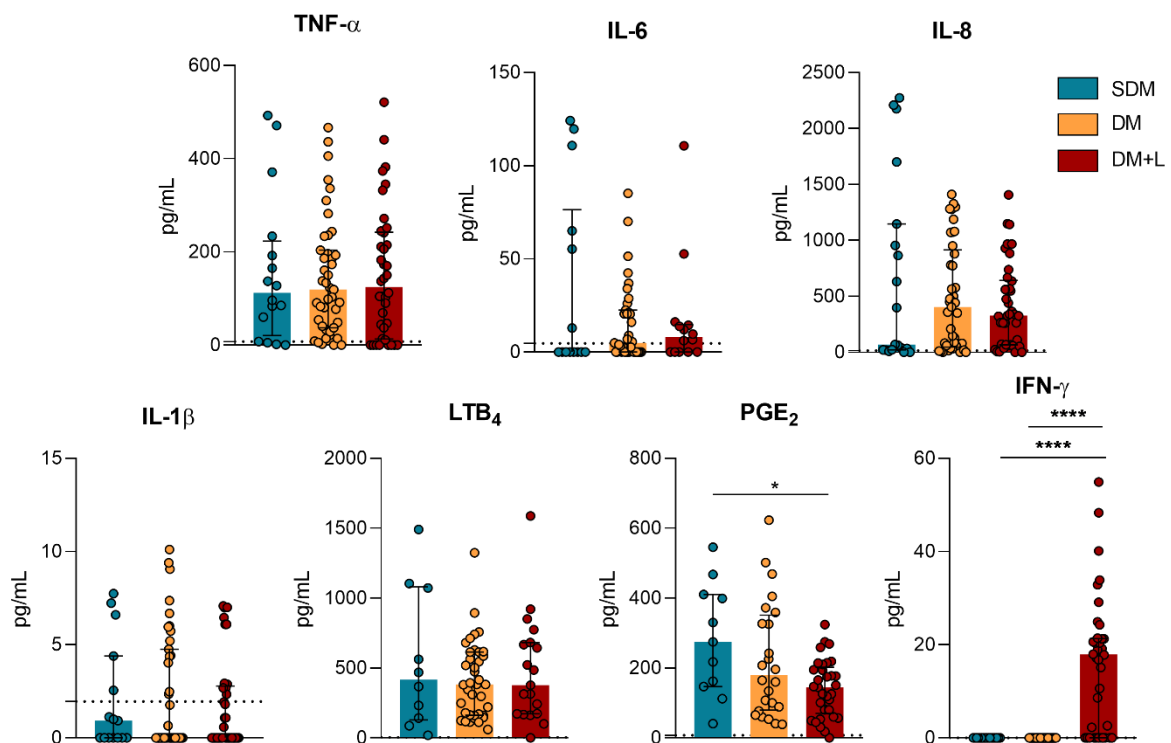
<b>Características</b>	<b>Pé diabético (n = 42)</b>
<b>Situação da lesão, n (%)</b>	
Ativa	30 (71)
Em cicatrização	12 (29)
<b>Diagnóstico da lesão ativa, n (%)</b>	
Neuropática	16 (69)
Neuroisquêmica	6 (26)
Hipertensiva	1 (4)
<b>Área da lesão ativa (mm<sup>3</sup>)</b>	200 (60-1225)
<b>Tempo de lesão (sem.)</b>	28,2 (5-83)
<b>Local da lesão, n (%)</b>	
Dedos	5 (23)
Antepé	7 (32)
Mediopé	7 (32)
Retropé	1 (4)
Perna	2 (9)
<b>Amputação</b>	15 (65)
<b>Nível da amputação, n (%)</b>	
Pé	13 (87)
Dedo	2 (13)

**Fonte:** Elaborado pela autora



#### 4.2 NÍVEIS CIRCULANTES DE IFN- $\gamma$ ESTÃO AUMENTADOS EM DM+L, ENQUANTO OS DE PGE<sub>2</sub> ESTÃO REDUZIDOS

A produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  e dos mediadores lipídicos LTB<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> foi avaliada no plasma dos participantes por ELISA. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos na produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  e LTB<sub>4</sub>. A produção de IL-2 também foi avaliada, porém todos os indivíduos dos grupos exibiram valores abaixo do limite de detecção (dados não mostrados). Os indivíduos do grupo SDM apresentam níveis séricos de PGE<sub>2</sub> significativamente maiores quando comparados com o grupo DM+L, mas não há diferença entre o grupo DM e os demais (Figura 4F). Ademais, indivíduos do grupo DM+L apresentam níveis significativamente mais elevados de IFN- $\gamma$  em comparação com SDM e DM (Figura 4G).

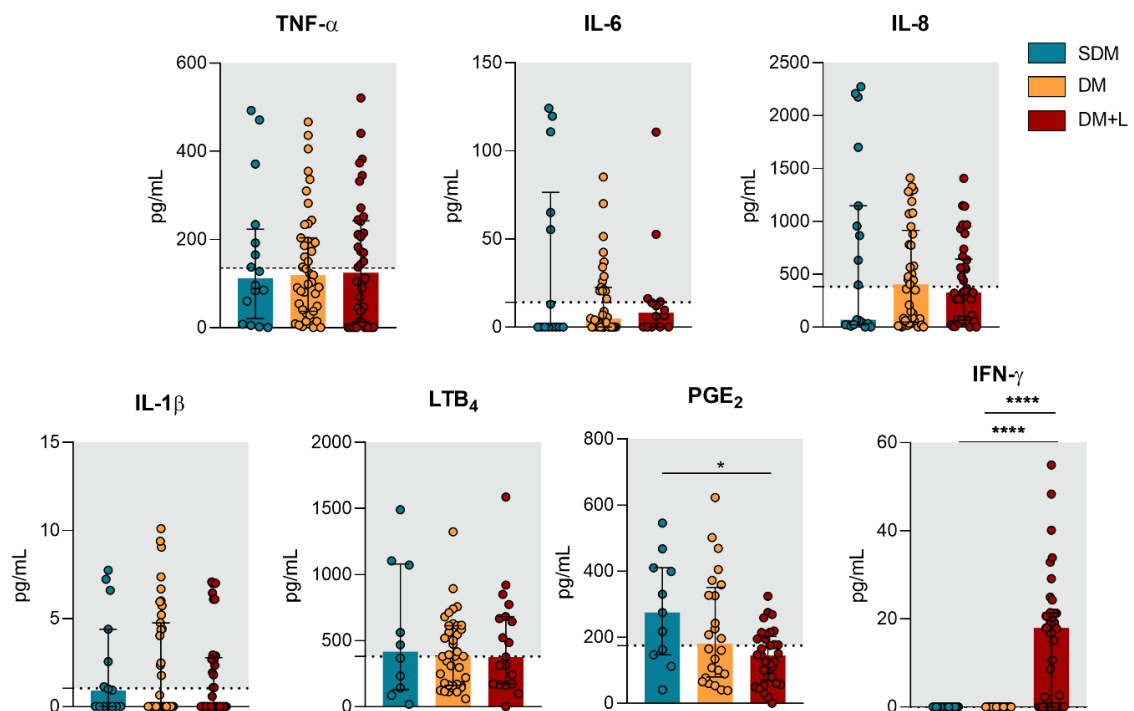


**Figura 4. Caracterização inflamatória dos indivíduos SDM, DM e DM+Lesão por ELISA.** A) TNF- $\alpha$ ; B) IL-6; C) IL-8; D) IL-1 $\beta$ ; E) LTB<sub>4</sub>; F) PGE<sub>2</sub>; G) IFN- $\gamma$ . Indivíduos sem diabetes, com diabetes e com diabetes + pé diabético. Linha pontilhada no limite de detecção do kit. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn; \*\*\*\* p < 0,001.

Fonte: Elaborado pela autora

### 4.3 DEFINIÇÃO DE INDIVÍDUOS ALTOS PRODUTORES DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS (ELISA)

Diante da distribuição dos pacientes entre os diferentes níveis de produção de mediadores, é notável a ocorrência de indivíduos altos e baixos produtores dentro de um mesmo grupo. Dessa forma, decidimos identificar quem são esses indivíduos e se eles apresentam um perfil amplo de mediadores inflamatórios, a fim de o associar com parâmetros clínicos. Para tanto, a mediana global foi definida como *cut-off* para cada mediador inflamatório avaliado. O grupo DM teve uma distribuição de pacientes acima da mediana global para a maioria dos mediadores inflamatórios (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  e LTB<sub>4</sub>), quando comparado com a distribuição dos pacientes dos demais grupos. O grupo SDM teve uma maior distribuição de indivíduos acima da mediana global nos mediadores TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-1 $\beta$ . Já o grupo DM+L se destacou como sendo o único grupo a ter indivíduos altos produtores para IFN- $\gamma$ , além de apresentar um número considerável de pacientes acima da mediana global em TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-1 $\beta$  (Figura 5).



**Figura 5. Caracterização inflamatória de indivíduos alto produtores SDM, DM e DM+L por ELISA.** A) TNF- $\alpha$ ; B) IL-6; C) IL-8; D) IL-1 $\beta$ ; E) LTB<sub>4</sub>; F) PGE<sub>2</sub>; G) IFN- $\gamma$ . Linha pontilhada na mediana global (*cut-off*); o sombreado cinza separa os altos produtores (acima da linha) dos baixos produtores (abaixo da linha). Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

**Fonte:** Elaborado pela autora

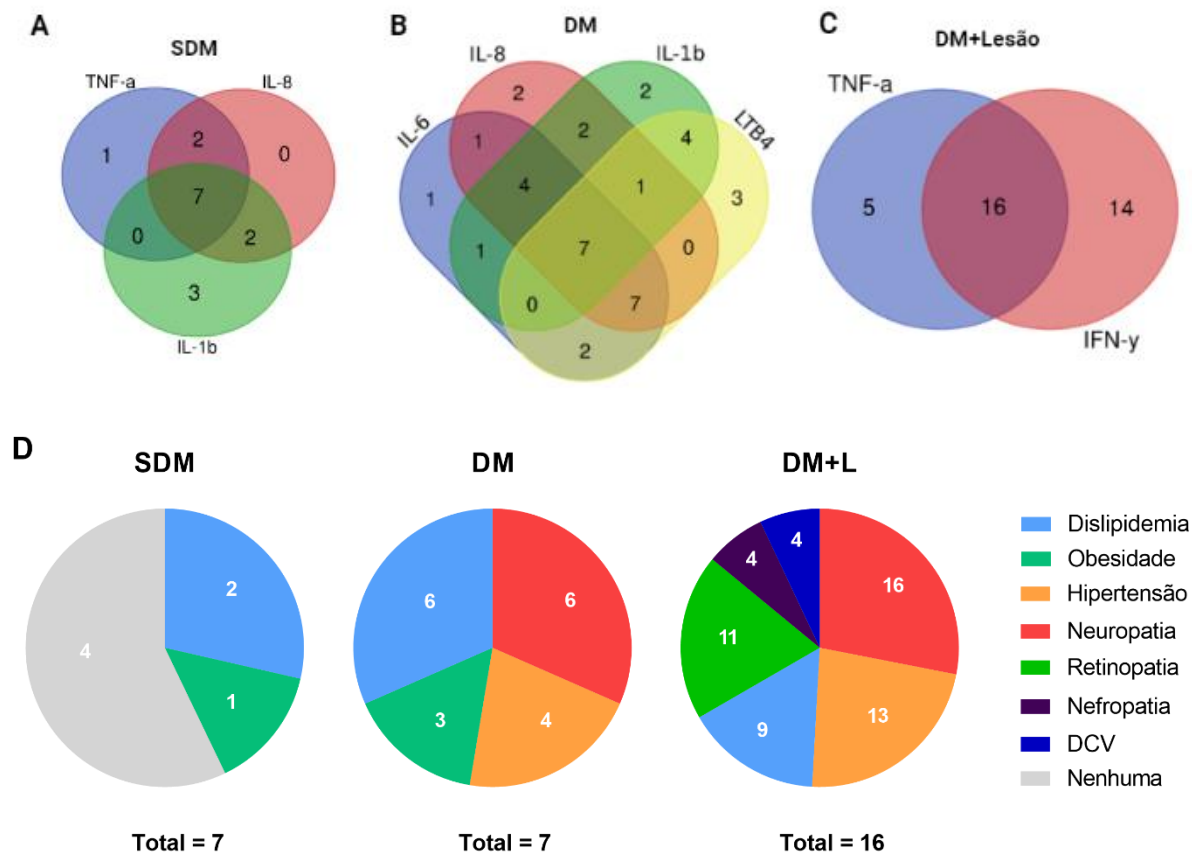
#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS COMPARTILHADOS ENTRE ALTO PRODUTORES

Para avaliar o perfil de mediadores inflamatórios associados aos altos produtores, foi feito um Diagrama de Venn para cada grupo de indivíduos. Foram incluídos os mediadores em que 50% ou mais dos indivíduos do grupo foram classificados como altos produtores (Figura 6).

No grupo SDM, os mediadores que 50% ou mais indivíduos tiveram perfis de altos produtores são TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-1 $\beta$  (Figura 6A). Dos 7 pacientes que apresentaram interseção para todos os mediadores, 2 (30%) relataram ter dislipidemia e 1 (15%) possui obesidade como comorbidades. É importante salientar que os indivíduos desse grupo foram recrutados no mesmo centro de referência, onde há atendimento para tratamento de outras doenças endócrinas. Não era esperado que o grupo SDM apresentasse um perfil inflamatório elevado, porém outras condições não relatadas pelos participantes durante a entrevista de recrutamento podem ter interferido nesse resultado, tornando o nosso grupo controle enviesado. Diante disso, já foi solicitado ao CEP um adendo para uma re-coleta de amostras de indivíduos saudáveis em outro centro de recrutamento.

Na análise dos perfis inflamatórios compartilhados no grupo DM (Figura 6B), os mediadores em que 50% ou mais dos indivíduos foram altos produtores são IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e LTB<sub>4</sub>, sendo sete deles altos produtores para todos. Destes pacientes, 6 deles (86%) possuem neuropatia periférica e dislipidemia, 4 (57%) possuem hipertensão, e 3 (43%) possuem obesidade.

Já no grupo DM+L, somente as citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  tiveram 50% ou mais de indivíduos altos produtores (Figura 6C), todos os 16 indivíduos desta interseção possuem neuropatia periférica. Dentre eles, 13 (81%) relataram ter hipertensão, 9 (56%) dislipidemia, 11 (69%) retinopatia, 4 (25%) nefropatia e histórico de doença cardiovascular, e 12 (75%) possuem lesão ativa, enquanto 4 (25%) possuem lesão em processo de cicatrização.

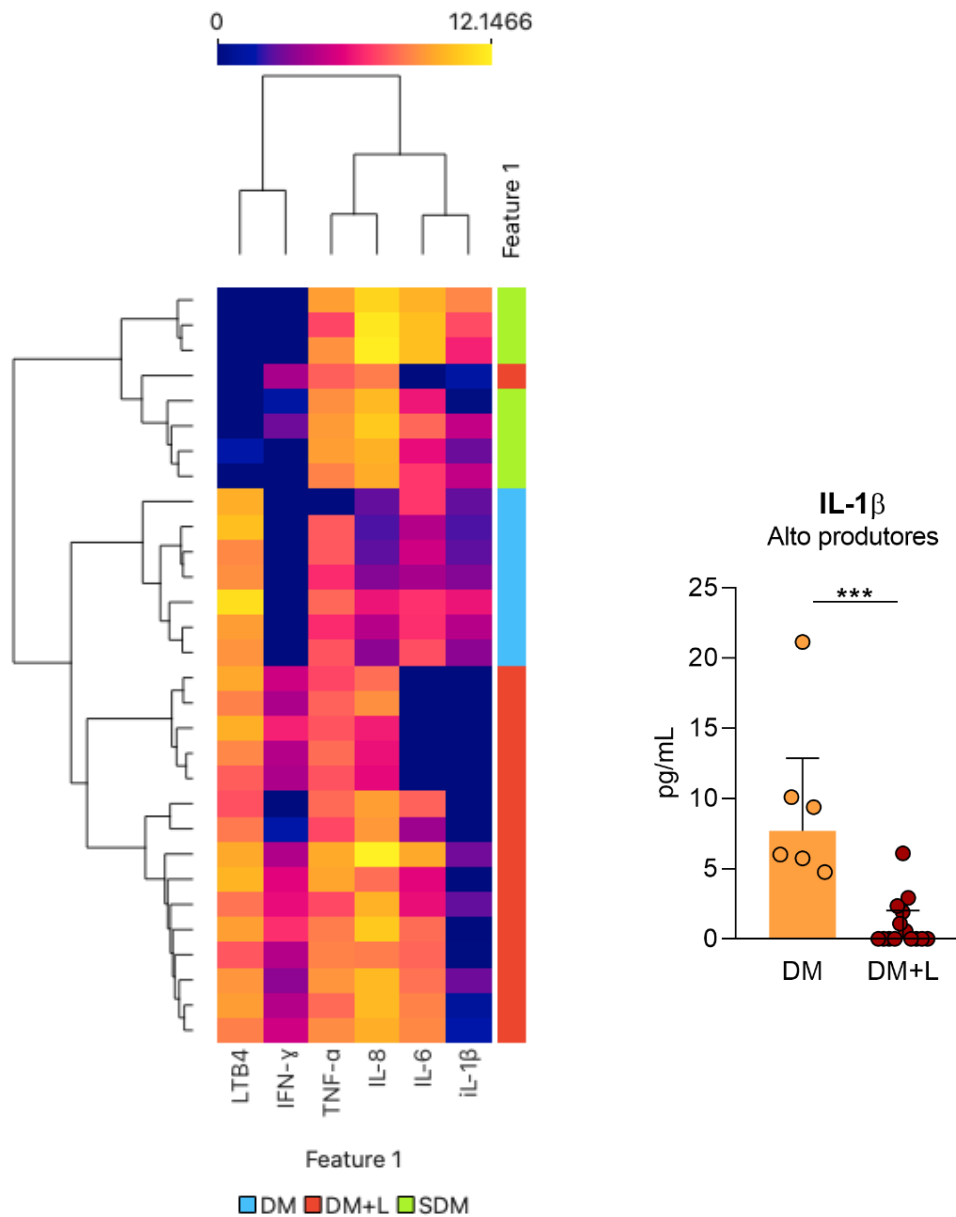


**Figura 6. Perfil de mediadores inflamatórios de indivíduos altos produtores e características associadas.** A) Pacientes Sem diabetes. B) Pacientes Diabéticos. C) Pacientes diabéticos com lesão de pé diabético. Os valores internos representam o número de indivíduos com perfil alto produtor. Análise realizada através do site *Bioinformatics & Evolutionary Genomics* (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>), que utiliza o Diagrama de Venn como ferramenta para identificar as interseções dos elementos; D) Comorbidades e complicações associadas aos indivíduos da interseção.

**Fonte:** Elaborado pela autora

A partir da identificação dos indivíduos e de seu perfil inflamatório, os valores séricos dos mediadores listados dos altos produtores foram utilizados para avaliação de agrupamento hierárquico por mapa de calor (*heatmap*). A análise mostrou que o perfil inflamatório dos indivíduos foi capaz de diferenciá-los em três conjuntos principais compostos pelos indivíduos do grupo SDM, DM e DM+L, respectivamente. Os grupos de indivíduos diabéticos (DM e DM+L) se destacaram em relação a LTB4, conforme dados anteriores do nosso grupo com Leishmaniose e COVID-19. A diferença entre esses grupos foi evidenciada pelos níveis de IL-1 $\alpha$ , que foram significativamente maiores no grupo DM em comparação com DM+L. Além disso, o agrupamento dos mediadores inflamatórios evidenciou as semelhanças na produção de

LTB<sub>4</sub> e IFN- $\gamma$ , exclusivos nos grupos DM e DM+L, bem como de TNF- $\alpha$  e IL-8, que se mostraram elevados em todos os grupos (Figura 7).

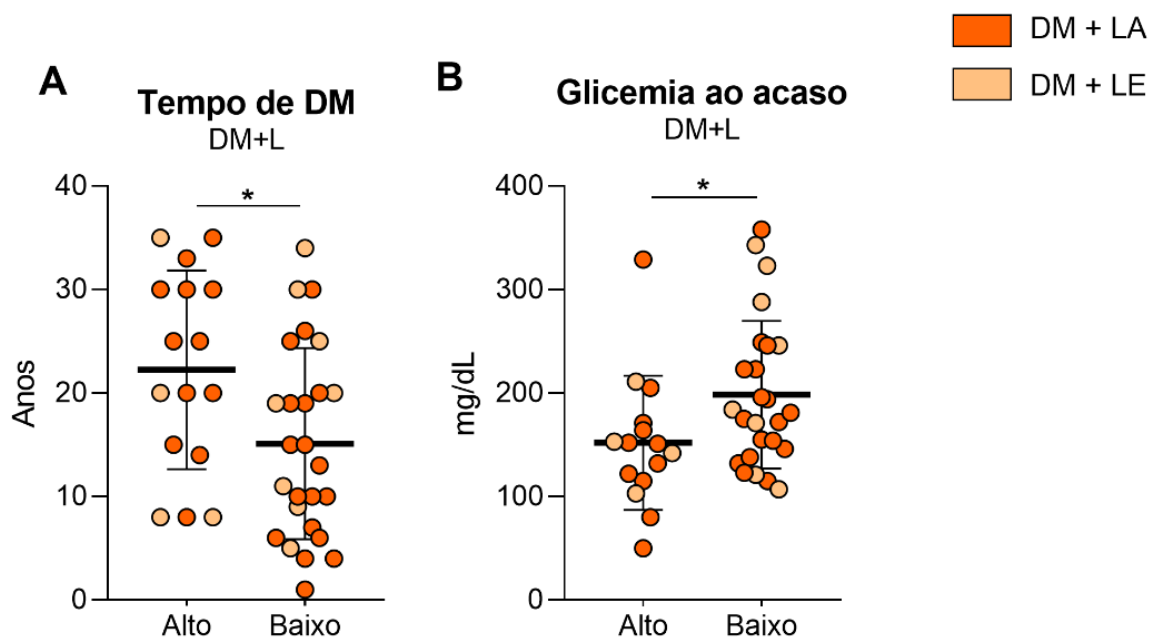


**Figura 7. Agrupamento hierárquico de indivíduos alto produtores dos grupos SDM, DM e DM+L.** (a) O *Heatmap* mostra o perfil de produção de mediadores inflamatórios de cada indivíduo identificado na análise de interseção. Linhas: grupos; Colunas: mediadores; Escala em Log2. (b) Comparação dos níveis de IL-1 $\beta$  de indivíduos alto produtores dos grupos DM e DM+L. Teste de Mann-Whitney;  $p < 0,001$ .

**Fonte:** Elaborado pela autora

Utilizando a estratégia de identificação dos altos produtores do grupo DM+L, foram analisados os parâmetros clínicos e o perfil inflamatório comparando com os baixos produtores. A análise mostrou que o tempo de diabetes dos indivíduos altos produtores é significativamente maior em comparação com os baixos produtores do mesmo grupo (Figura 8A). Foi evidenciada também a posição dos indivíduos com lesão ativa (na cor laranja escuro) e com lesão em cicatrização (na cor laranja claro) neste gráfico, na qual é possível observar que não há diferença na distribuição destes indivíduos para o tempo de doença (Figura 8A).

Além disso, a glicemia ao acaso dos indivíduos alto produtores é menor em comparação aos baixos produtores (Figura 8B). É importante destacar que a glicemia ao acaso é um parâmetro de avaliação dos níveis circulantes de glicose no momento da coleta do material biológico, e que não representa os níveis glicêmicos habituais dos indivíduos. Todavia, esses resultados indicam que o perfil inflamatório exacerbado para as citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  está relacionado com o tempo de doença entre os indivíduos com úlcera de pé diabético.

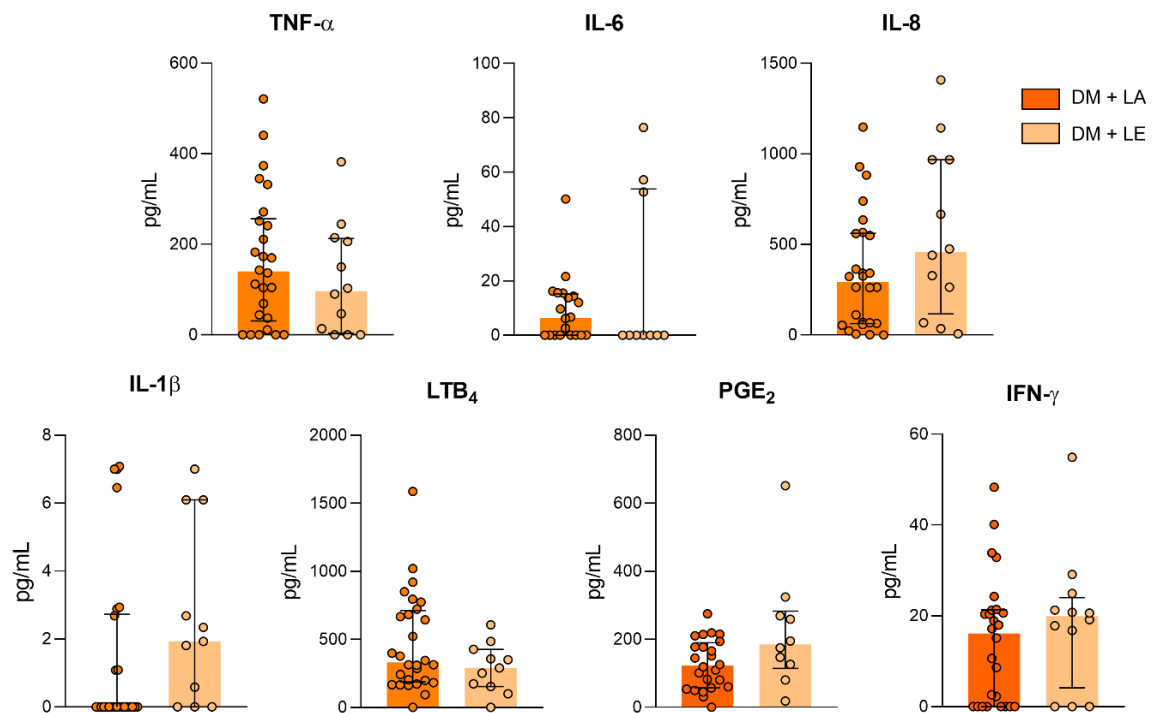


**Figura 8. Parâmetros clínicos associados ao perfil inflamatório do grupo DM+L.** (a) Tempo de diabetes em anos. (b) Glicemia ao acaso (mg/dL). Laranja escuro: DM+LA; Laranja claro: DM+LE; Teste de Mann-Whitney; \*  $p < 0,05$ .

**Fonte:** Elaborado pela autora

#### 4.5 O STATUS DA CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES NÃO ALTERA O PERFIL INFLAMATÓRIO

A fim de identificar alterações no perfil inflamatório após iniciada a cicatrização das lesões, o grupo DM+L foi subdividido de acordo com o status da cicatrização entre lesão ativa (DM+LA) e em processo de cicatrização (DM+LE) e comparado entre eles. Não foram observadas diferenças entre os grupos na produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e para os mediadores lipídicos LTB $_4$  e PGE $_2$ . Apesar disso, o grupo DM+LA apresentou uma maior distribuição em torno da mediana dos indivíduos em TNF- $\alpha$ , IL-8 e LTB $_4$  (Figura 9).



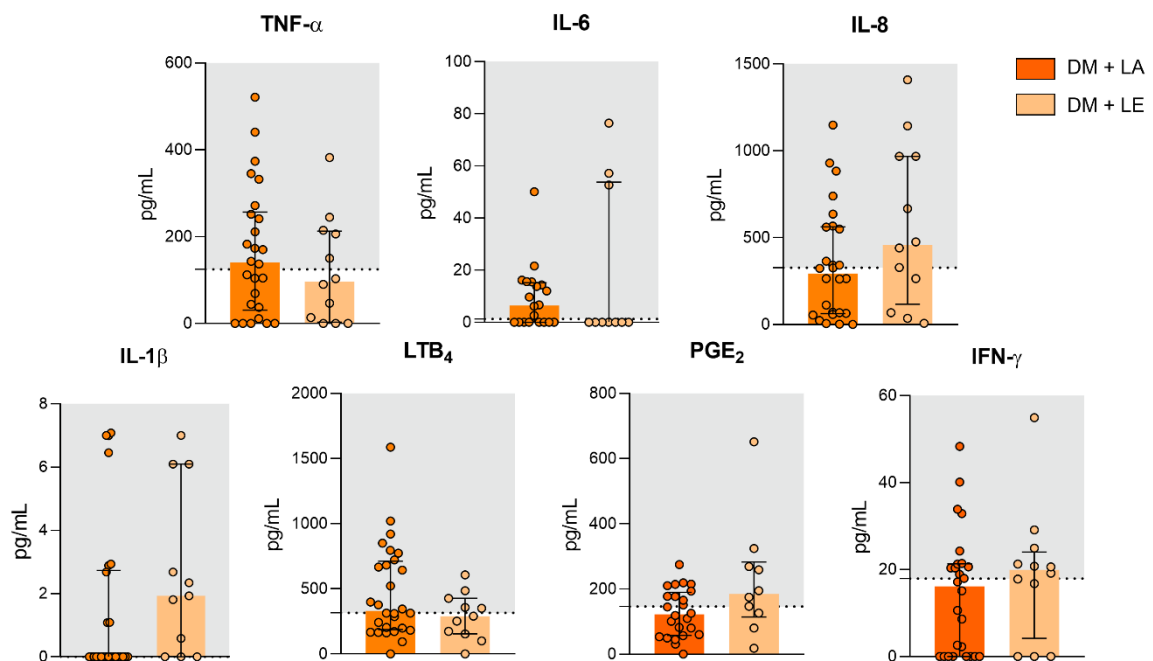
**Figura 9. Caracterização dos indivíduos DM+LA e DM+LE por ELISA.** A) TNF- $\alpha$ ; B) IL-6; C) IL-8; D) IL-1 $\beta$ ; E) LTB $_4$ ; F) PGE $_2$ ; G) IFN- $\gamma$ . Indivíduos diabéticos com lesão de pé diabético ativa e em cicatrização. Teste de Mann-Whitney.

**Fonte:** Elaborado pela autora

#### 4.6 DEFINIÇÃO DE INDIVÍDUOS ALTOS PRODUTORES E IDENTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DE INDIVÍDUOS COM LESÃO DE PÉ DIABÉTICO

Novamente, a mediana global por mediador inflamatório foi utilizada para definir o ponto de corte de altos produtores para os mediadores inflamatórios por ELISA para os grupos DM+LA e DM+LE (Figura 10).

Observa-se uma grande distribuição de indivíduos acima do *cut-off* do grupo DM+LA para TNF- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub> e IL-6 (Figura 10A e E). Ambos os grupos tiveram a maior parte dos seus indivíduos apresentando valores acima da mediana global para IL-1 $\beta$  (Figura 10D), enquanto em IFN- $\gamma$  os grupos DM+Ativa e DM+Em cicatrização se destacam como altos produtores de IFN- $\gamma$  (Figura 10G).



**Figura 10. Caracterização inflamatória dos indivíduos DM+LA e DM+LE alto produtores por ELISA.** A) TNF- $\alpha$ ; B) IL-6; C) IL-8; D) IL-1 $\beta$ ; E) LTB<sub>4</sub>; F) PGE<sub>2</sub>; G) IFN- $\gamma$ . Indivíduos com lesão de pé diabético ativa e em cicatrização. Linha pontilhada na mediana global (*cut-off*); o sombreado cinza separa os altos produtores (acima da linha) dos baixos produtores (abaixo da linha). Teste de Mann-Whitney.

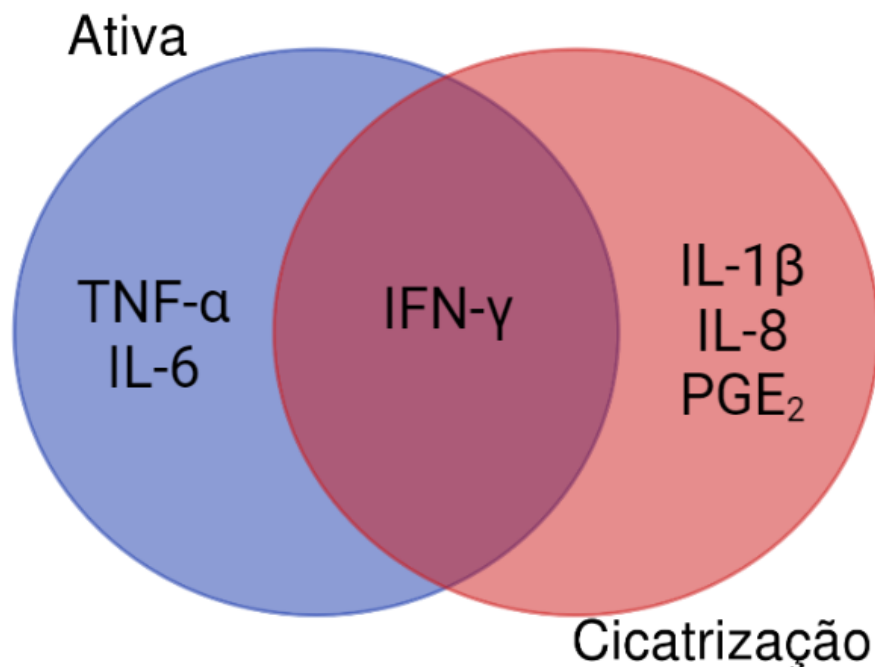
Fonte: Elaborado pela autora

O valor da mediana global de cada mediador foi utilizado para identificar aqueles em que 50% ou mais dos indivíduos dos grupos DM+LA e DM+LE apresentaram perfil de altos



produtores. A partir disso, foi feito um Diagrama de Venn, para identificar os mediadores compartilhados e exclusivos de cada grupo, a fim de associá-los às fases da lesão (Figura 11).

Apenas IFN- $\gamma$  foi o mediador compartilhado entre os grupos. As citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  foram exclusivas do grupo DM+LA. Os mediadores em destaque do grupo DM+LE foram IL-1b, IL-8 e PGE2. Esses resultados indicam que o IFN- $\gamma$  pode ser um mediador capaz de diferenciar os indivíduos com lesão de pé diabético. Além disso, os indivíduos de lesão ativa se destacam na produção de TNF- $\alpha$  e IL-6, e os de lesão em cicatrização para IL-1b, IL-8 e PGE2, o que pode indicar que os níveis séricos desses mediadores podem ser capazes de diferenciá-los quanto ao status de cicatrização da lesão (Figura 11).



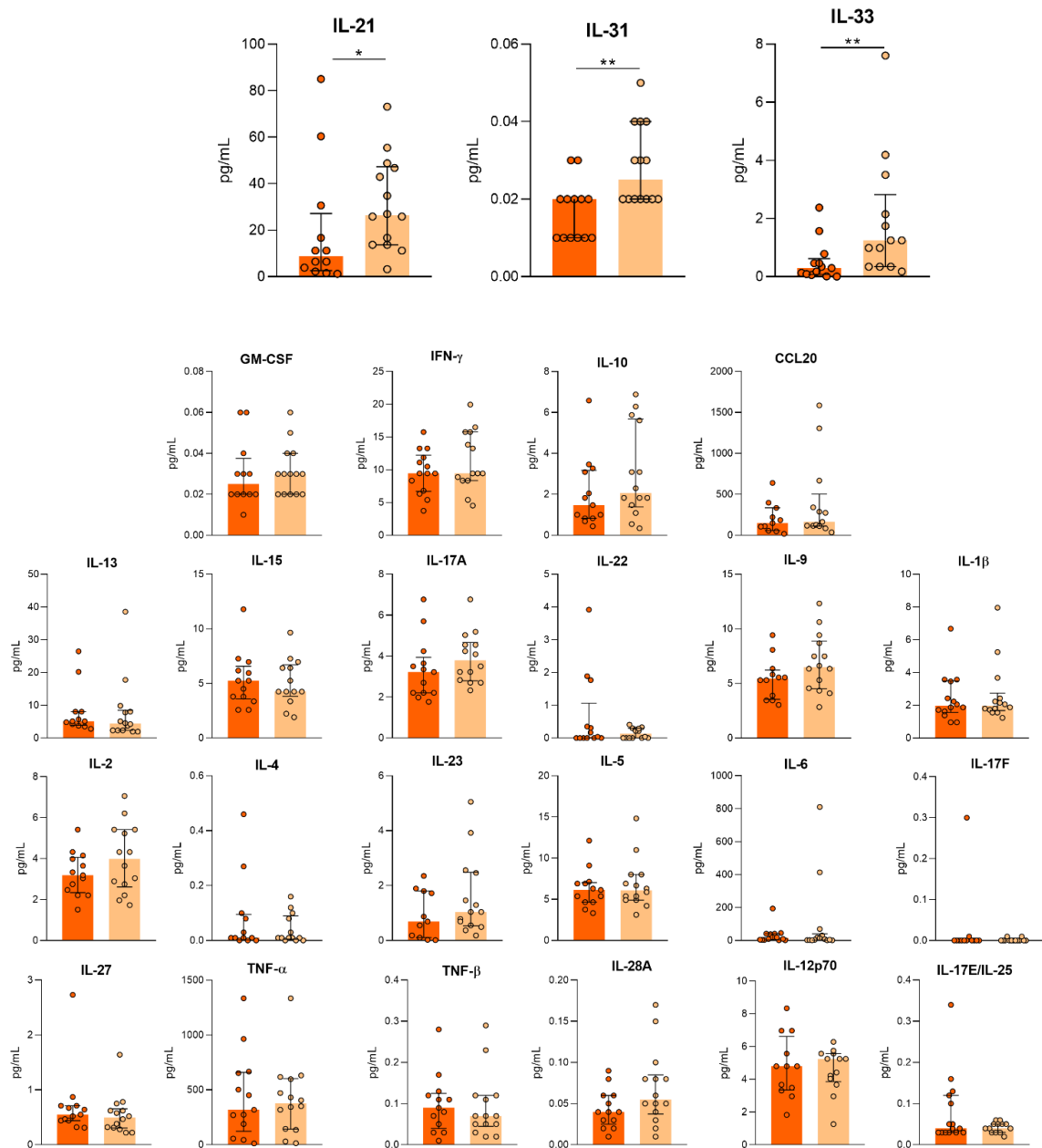
**Figura 11. Perfil de mediadores inflamatórios e suas interseções nos grupos de Diabetes e lesão de pé diabético.** Análise realizada através do site *Bioinformatics & Evolutionary Genomics* (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>), que utiliza o Diagrama de Venn como ferramenta para identificar as interseções dos elementos.

**Fonte:** Elaborado pela autora

#### 4.7 NÍVEIS SÉRICOS DE IL-21, IL-31 E IL-33 ESTÃO AUMENTADOS EM INDIVÍDUOS COM LESÃO EM CICATRIZAÇÃO

Os indivíduos dos grupos DM+LA e DM+LE foram novamente comparados, através da avaliação de produção mediadores inflamatórios característicos de um padrão de resposta Th17 no plasma dos mesmos, por método de Luminex (Figura 12).

O grupo que caracteriza os indivíduos com lesão diabética em cicatrização demonstrou níveis séricos aumentados para as citocinas IL-21, IL-31 e IL-33 em comparação com os de lesão ativa. É importante destacar que este grupo também apresentou uma maior distribuição de indivíduos em torno da mediana em IL-9, IL-1 $\beta$  e IL-28A. Os valores dos grupos para IFN- $\gamma$  foram semelhantes às análises anteriores realizadas por ELISA (Figura 12G).



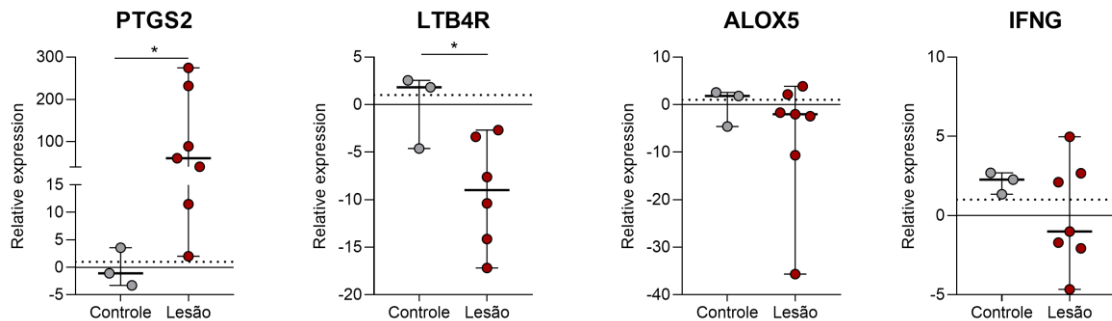
**Figura 12. Produção de mediadores inflamatórios avaliados por Luminex.** Laranja escuro: DM+Ativa; n=15. Laranja claro: DM+Em cicatrização; n=14. Teste de Mann-Whitney; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

Fonte: Elaborado pela autora

#### 4.8 A EXPRESSÃO DO GENE DE PGE<sub>2</sub> ESTÁ AUMENTADO, E DE BLT1 DIMINUÍDO NA LESÃO DE PÉ DIABÉTICO

Buscando avaliar o perfil de expressão dos genes de mediadores inflamatórios em biópsias de lesão de pé diabético ativa, o RT-qPCR foi realizado, utilizando biópsias de pele de pacientes saudáveis como controle.

A expressão relativa da enzima que sintetiza a PGE<sub>2</sub> (COX-2, sintetizado pelo gene *PTGS2*) em biópsias de indivíduos com lesão de pé diabético foi significativamente maior em comparação ao controle, indicando uma participação importante do PGE<sub>2</sub> na lesão. Interessantemente, o gene que codifica o receptor BLT1 (*Ltb4r1*) encontrou-se significativamente reduzido nas lesões em relação às biópsias de pele normal. Não houve diferença estatística na expressão do gene de 5-lipoxigenase (*ALOX5*), que codifica a enzima que gera o LTB<sub>4</sub>, e de *IFNG* entre os grupos (Figura 13).



**Figura 13. Expressão gênica de mediadores inflamatórios na lesão.** A) *PTGS2*; B) *LTB4R*; C) *ALOX5*; D) *IFNG*. Expressão relativa (método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ); Controle: n=3 (a, b, c); n=4 (d); Lesão: n=7 (a, c, d); n=6 (b). a, c: Teste de Mann-Whitney; b, d: Teste *t* de Student. \*  $p < 0,05$ .

Fonte: Elaborado pela autora

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, buscamos avaliar e caracterizar os pacientes com a complicação do pé diabético em relação a controles saudáveis e diabéticos, e identificar perfis inflamatórios característicos do grupo de lesão que pudessem diferenciar tais indivíduos e os mecanismos possivelmente relacionados ao desenvolvimento do pé diabético.

Não foi possível parear os grupos de acordo com o sexo, já que a maioria dos acometidos com a lesão de pé diabético pertenciam ao sexo masculino. De fato, os homens são 1,6 vezes mais acometidos, e esse número é associado a fatores sociais e atividades laborais com maiores cargas físicas, bem como com menor cuidado com dieta e controle glicêmico (BOWLING; RASHID; BOULTON, 2015; CERQUEIRA et al., 2022).

A relação entre hipertensão, dislipidemia e diabetes, bem estabelecida na literatura, também foi encontrada no presente estudo, onde os grupos de pacientes diabéticos (DM e DM+L) relataram possuir as comorbidades em maior frequência em comparação ao controle (Figura 3C e D). A hipertensão, 2 vezes mais comum em pacientes diabéticos, também é relacionada com aumento da idade, risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como insuficiência cardíaca congestiva, hipertrofia ventricular e AVC (GROSSMAN; GROSSMAN, 2017). Estudos mostram que a retinopatia não diabética tem forte relação com a hipertensão, o que pode indicar risco de desenvolvimento de outras cardiopatias (OJAIMI et al., 2011).

A dislipidemia diabética é causada pela liberação de ácidos graxos livres dos adipócitos resistentes à insulina, promovendo a produção de triglicerídeos e apolipoproteína B (MOORADIAN, 2009). A dislipidemia e a hipertensão estão associadas a diversos processos comuns ao diabetes, como a disfunção endotelial e rigidez vascular, inflamação de baixo grau na obesidade, que promovem a ativação de receptores da angiotensina, além da formação de AGEs, gerando produtos inflamatórios (SHEN et al., 2019).

Os pacientes com lesão de pé diabético apresentaram uma maior taxa de retinopatia diabética em comparação com os pacientes diabéticos em nosso estudo (Figura 3E). A associação entre a neuropatia e a retinopatia diabéticas já é amplamente estudada, e ambas se relacionam com o tempo da doença e com níveis glicêmicos descontrolados (RASHEED et al., 2021). Em alguns casos, a retinopatia é considerada uma consequência da neuropatia, por conta da neurodegeneração axonal em fibras nervosas na retina causada pela hiperglicemia

(MARTINS, 2020). Carmichael e colaboradores utilizaram a microscopia confocal da córnea como um biomarcador de desenvolvimento de neuropatia, que se mostrou um bom parâmetro quantitativo de detecção de neuropatia subclínica em diabéticos (CARMICHAEL et al., 2022).

No presente estudo, analisamos os perfis inflamatórios de alto produtores dos grupos (Figura 6). Identificamos os mediadores IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  e LTB<sub>4</sub> em destaque no grupo DM (Figura 6B). IL-6 é associada à resistência à insulina através da fosforilação do IRS1 e por ativação da via JAK/STAT (REHMAN et al., 2017), e pode ser considerado um biomarcador de doença periodontal em diabéticos (BABADI, 2020). IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$  são associados ao desenvolvimento e patogênese de retinopatia diabética (FENG et al., 2018). Adicionalmente, altos níveis de LTB<sub>4</sub>, que conhecidamente é indutor de resistência à insulina na obesidade, também já foi relacionado à neuropatia autonômica cardiovascular diabética, bem como com o desenvolvimento de aterosclerose (NEVES et al., 2020). Esses trabalhos reforçam a importância desses mediadores inflamatórios na patogênese da inflamação sistêmica no diabetes, o que corrobora com nossos achados.

A análise de altos produtores do grupo DM+Lesão evidenciou TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  como os mediadores inflamatórios com maior número de pacientes com o perfil (Figura 6C). Estudos mostram que altos níveis de TNF- $\alpha$  está relacionada com a dificuldade de cicatrização em pacientes com lesão diabética, por inibir a migração e induzir a ativação de NF- $\kappa$ B (XU; ZHANG; GRAVES, 2013). Além disso, em modelo animal diabético, o TNF- $\alpha$  estimulou a ativação do fator de transcrição pró-apoptótico *forkhead box O1* (FOXO1) em fibroblastos, comprometendo a cicatrização por diminuição da proliferação celular e morte (SIQUEIRA et al., 2010). Interessantemente, os indivíduos altos produtores de TNF- $\alpha$  no nosso estudo possuem lesão ativa (Figura 11), o que reafirma a importância dessa citocina na patogênese da lesão.

Dos mediadores inflamatórios avaliados no plasma dos pacientes, o IFN- $\gamma$  se destacou no grupo de pacientes com lesão de pé diabético em comparação com os pacientes controle e diabéticos (Figura 4G). IFN- $\gamma$  é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por linfócitos Th1, CD8 e células Natural Killers (NK), e a sinalização do seu receptor (IFNGR) ocorre por meio da via de JAK/STAT, promovendo a modulação de diversos genes e diferentes funções como ativação de macrófagos M1 e quimioatração de neutrófilos (SCHRODER et al., 2004). Além disso, o IFN- $\gamma$  tem um papel importante no câncer, visto que diversos estudos mostram que células tumorais são insensíveis à sinalização de IFN- $\gamma$  em camundongos como

mecanismo de escape de vias apoptóticas (CASTRO et al., 2018). No diabetes, o IFN- $\gamma$  tem sido associado à destruição das células beta por meio da indução expressão de ligante de morte programada intrínseca-1 (PD-L1), induzindo a infiltração de células T em camundongos (OSUM et al., 2018).

No estudo de Hammad e colaboradores, em relação à úlcera de pé diabético, os níveis séricos de IFN- $\gamma$  de pacientes DM2 e com lesão não foram diferentes, porém houve uma diminuição nos níveis da citocina no grupo de paciente com lesão com infecção em comparação com lesão sem infecção (HAMMAD et al., 2021). Kartika e colaboradores também destacaram a diminuição de IFN- $\gamma$  no sobrenadante da cultura de linfócitos de pacientes diabéticos em relação ao grupo controle (KARTIKA et al., 2020). Ambos os trabalhos são contrários aos nossos achados, em que o IFN- $\gamma$  só foi detectado na circulação nos indivíduos com úlcera de pé diabético (Figura 4). Os participantes incluídos nesse estudo não possuíam infecção na lesão, visto que são regularmente atendidos no centro de referência para realização de desbridamento e curativo e, em caso de infecção, realizam o tratamento com antibióticos e o formulário de “Infecções Secundárias” do estudo seria preenchido pela médica responsável.

Por outro lado, Theocharidis e colaboradores identificaram a expressão aumentada de IFN- $\gamma$  em análises de sequenciamento de RNA de célula única (*single-cell RNA*) de amostras da lesão de pé diabético, bem como no plasma de indivíduos com lesão cicatrizada (THEOCHARIDIS et al., 2020). Em nosso estudo, não houve diferença nos níveis séricos de IFN- $\gamma$  entre pacientes com lesão ativa e em cicatrização (Figura 8), mas não foram realizadas análises com indivíduos com lesão cicatrizada, o que poderia reafirmar tal achado. Também não observamos diferença na expressão do gene de IFN- $\gamma$  na lesão de pé diabético em comparação com o controle (Figura 13D), contrariando os achados de Theocharidis. Outro estudo identificou um aumento significativo nos níveis de IFN- $\gamma$  em úlceras de insuficiência venosa crônica (não diabéticas), bem como uma diminuição rápida após cicatrização utilizando um tratamento de compressão (BEIDLER et al., 2009), e sugere que o IFN- $\gamma$  pode estar relacionado com o processo de inflamação crônica. A nossa hipótese é de que a produção exacerbada de IFN- $\gamma$  no grupo de lesão seja associada a seu papel ativador de macrófagos M1, característico da cronicidade da inflamação sistêmica no diabetes, que pode influenciar na persistência da lesão, além de quimioatratador de células imunes para o sítio da úlcera.

Ao avaliar a expressão de genes de mediadores inflamatórios nas biópsias da lesão, observamos um aumento significativo no gene de PGE<sub>2</sub> em comparação com a pele normal

(Figura 13A). Zhang e colaboradores mostraram que a adição de PGE<sub>2</sub> em matriz de hidrogel resultou em maior reparo tecidual e cicatrização em modelo de lesão murino, por meio da diminuição de IL-6 e polarização de M2 teciduais (ZHANG et al., 2018). No contexto do diabetes, alguns estudos evidenciam a que a expressão de COX-1, enzima considerada constitutiva, é prejudicada, enquanto COX-2 foi fortemente estimulada, principalmente em fases tardias de reparo tecidual (KÄMPFER et al., 2005). Outros trabalhos mostram uma diminuição de PGE<sub>2</sub> no local da lesão e não diferenciação de células Th17, essenciais para defesa contra infecções, em camundongos diabéticos infectados com *Staphylococcus aureus*, que restauram sua capacidade de diferenciação após tratamento tópico com fármaco análogo do mediador lipídico (DEJANI et al., 2016).

Em nosso estudo, a expressão de PGE<sub>2</sub> aumentada significativamente na lesão não reflete nos níveis séricos. Na verdade, há uma redução de PGE<sub>2</sub> na circulação de pacientes com úlcera de pé diabético em comparação com o controle (Figura 4F). Nossa hipótese é de que a produção do mediador parece estar voltada para a lesão e estímulo de mecanismos de reparo, ainda que prejudicados no diabetes. Além disso, o PGE<sub>2</sub> foi um dos mediadores exclusivos dos indivíduos com lesão em cicatrização, o que pode reforçar seu envolvimento nesse processo (Figura 11). A razão para a persistência da lesão e dificuldade de cicatrização apesar da alta expressão de PGE<sub>2</sub> pode ser justificada pelo aumento da expressão do transportador de prostaglandina (PGT) intracelular estimulado pela hiperglicemia, que promove o catabolismo de PGE<sub>2</sub> pelas enzimas PLAs citosólicas (cPLAs) e impede sua sinalização adequada (SYEDA et al., 2012), e pela inflamação sistêmica característica do diabetes.

A expressão de BLT1 foi significativamente menor nas biópsias da lesão de pé diabético em relação ao controle (Figura 13B). Esse resultado é contrário a outros achados da literatura, onde a expressão do receptor foi significativamente maior em lesões de camundongos diabéticos (BRANDT et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2018). Isso pode indicar que, em nosso estudo, há uma indução de resposta pró-resolutiva na lesão, já que a expressão do receptor de LTB<sub>4</sub> está diminuída, enquanto o PGE<sub>2</sub> encontra-se aumentado. Análises mais detalhadas sobre a função e sinalização desse mediador lipídico na lesão devem ser realizadas.

A análise de níveis séricos dos mediadores inflamatórios realizada por Luminex mostrou que IL-21, IL-31 e IL-33 estavam aumentados no grupo de DM+LE em relação a DM+LA (Figura 12). IL-21 é produzida por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e TNK, conhecido por regulação de células T e B, e tem sido associada ao desenvolvimento de diabetes tipo 1 em camundongos



(SPOLSKI et al., 2008). Sua possível relação com a cicatrização é desconhecida, mas estudos evidenciam que IL-21 está aumentada no tecido cardíaco em camundongos infartados, e que o nocaute do gene resultou numa maior deposição de colágeno e produção de MMP-12, além de maior sobrevivência (KUBOTA et al., 2021).

IL-31 é uma citocina da família IL-6, produzida principalmente por linfócitos Th2, que sinaliza vias JAK/STAK e JNK, e levam a inibição de proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS) 1 e SOCS3. Em queratinócitos, sua sinalização é associada a inibição da proliferação celular (NEMMER et al., 2021), e é a principal citocina relacionada a prurido em doenças de pele, como dermatite atópica e psoríase (BORGIA et al., 2022). Altos níveis de IL-31 foram encontrados em pacientes com retinopatia diabética proliferativa (TAKEUCHI et al., 2015), mas seu papel no diabetes ainda não é compreendido.

IL-33 pertence à família de IL-1, e foi inicialmente associada a respostas auxiliares, mas foi descoberto que também possui funções inflamatórias, tendo caráter pleiotrópico (TU; YANG, 2019). É liberado do núcleo a partir de estímulos danosos, e sua sinalização leva a proliferação e sobrevivência celular, e estimula a secreção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, por ativação de NF $\kappa$ B, JNK e p38 (LIEW; GIRARD; TURNQUIST, 2016). Estudos mostram que a expressão local de IL-33 é aumentada em caso de lesão de pele, e que a administração exógena da citocina acelerou a cicatrização, tanto em camundongos não diabéticos quanto diabéticos (HE et al., 2017; YIN et al., 2013), o que indica que os níveis aumentados dessa citocina nos pacientes com lesão em cicatrização possam corroborar com sua relação com o reparo tecidual.

Embora os papéis dessas citocinas não estejam claros, esses resultados indicam a relação de tais mediadores Th17 e Th2 com o processo de cicatrização, sendo necessárias análises mais detalhadas, bem como a inclusão dos demais grupos na análise.

Como limitações do nosso estudo, destacam-se a falta de informações laboratoriais dos indivíduos, a idade como fator de risco de desenvolvimento de doenças, e o grupo controle não homogêneo. Todas as informações obtidas foram autorrelatadas. Além disso, não foi possível obter dados da lesão de pacientes em processo de cicatrização. Informações sobre tempo de lesão, histórico de amputação, intervenção cirúrgica e área da lesão foram obtidas durante coleta da amostra da lesão pela médica responsável.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que os indivíduos diabéticos com a complicação da úlcera do pé diabético apresentam um perfil inflamatório sistêmico exacerbado, especialmente nos níveis de IFN- $\gamma$ . Essa citocina pode estar relacionada com a persistência da lesão, por induzir a diferenciação de macrófagos para um perfil M1 e recrutamento celular, característicos da inflamação sistêmica no diabetes.

Identificamos o perfil inflamatório dos indivíduos DM+L composto por TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , bem como um maior tempo de doença nos altos produtores desse grupo, o que pode justificar a exibição desse perfil. Além disso, ao observarmos os perfis de mediadores exclusivos dos grupos do status da lesão, identificamos TNF- $\alpha$  e IL-6 em DM+LA e PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$  e IL-8 em DM+LE, que podem estar relacionadas com a fase de cicatrização da úlcera.

A modulação positiva no gene de PGE<sub>2</sub> Sintase nas análises de expressão gênica da lesão evidencia a relação do mediador lipídico no reparo de lesões, induzindo uma resposta anti-inflamatória na úlcera de pé diabético. Ademais, os pacientes com lesão de pé diabético exibiram níveis séricos aumentados das citocinas IL-21, IL-31 e IL-33, que podem estar relacionadas com a mudança de fase inflamatória para a proliferativa da cicatrização da lesão.

## 7 PERSPECTIVAS

- Avaliar a produção de citocinas inflamatórias em macrófagos cultivados em ambiente normoglicêmico e hiperglicêmico.
- Identificar o perfil inflamatório dos grupos SDM e DM por Luminex e aumentar o *n* de DM+Lesão.
- Avaliar a expressão gênica de mediadores inflamatórios na lesão.
- Avaliar o ensaio de fechamento de lesão *in vitro* na cultura de queratinócitos de linhagem utilizando o sobrenadante da cultura de macrófagos.
- Identificar os subtipos celulares (circulantes e diferenciados em cultura) dos indivíduos dos grupos.

## REFERÊNCIAS

AITCHESON, S. M. et al. Skin Wound Healing: Normal Macrophage Function and Macrophage Dysfunction in Diabetic Wounds. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 4917, 13 ago. 2021.

AKKUS, G.; SERT, M. Diabetic foot ulcers: A devastating complication of diabetes mellitus continues non-stop in spite of new medical treatment modalities. **World Journal of Diabetes**, v. 13, n. 12, p. 1106–1121, 15 dez. 2022.

ALBERS, J. W.; POP-BUSUI, R. Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Emerging Treatments, and Subtypes. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 14, n. 8, p. 473, ago. 2014.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 36, n. Suppl 1, p. S67–S74, jan. 2013.

ANJANEYULU, M. et al. Transforming Growth Factor- $\beta$  Induces Cellular Injury in Experimental Diabetic Neuropathy. **Experimental neurology**, v. 211, n. 2, p. 469–479, jun. 2008.

ARAÚJO, L. S. et al. Renal expression of cytokines and chemokines in diabetic nephropathy. **BMC Nephrology**, v. 21, n. 1, p. 308, 28 jul. 2020.

ARMSTRONG, D. G.; BOULTON, A. J. M.; BUS, S. A. Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. **The New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 24, p. 2367–2375, 15 jun. 2017.

BABADI, F. Salivary and Serum Levels of IL-6 and IL-8 in Diabetic Patients with Periodontal Disease: A Review Article. **Jundishapur Journal of Health Sciences**, v. 12, n. 2, 2020.

BEHL, T.; KAUR, I.; KOTWANI, A. Implication of oxidative stress in progression of diabetic retinopathy. **Survey of Ophthalmology**, v. 61, n. 2, p. 187–196, 1 mar. 2016.

BEIDLER, S. K. et al. Inflammatory cytokine levels in chronic venous insufficiency ulcer tissue before and after compression therapy. **Journal of vascular surgery**, v. 49, n. 4, p. 1013–1020, abr. 2009.

BENNETT, M.; GILROY, D. W. Lipid Mediators in Inflammation. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 6, p. 4.6.06, 11 nov. 2016.

BERBUDI, A. et al. Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System. **Current Diabetes Reviews**, v. 16, n. 5, p. 442–449, maio 2020.

BONYEK-SILVA, I. et al. Unbalanced production of LTB<sub>4</sub>/PGE<sub>2</sub> driven by diabetes increases susceptibility to cutaneous leishmaniasis. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 1275–1286, 1 jan. 2020.

BORGIA, F. et al. IL-31: State of the Art for an Inflammation-Oriented Interleukin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6507, jan. 2022.

BOWLING, F. L.; RASHID, S. T.; BOULTON, A. J. M. Preventing and treating foot complications associated with diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 10, p. 606–616, out. 2015.

BRANDT, S. L. et al. Excessive localized leukotriene B4 levels dictate poor skin host defense in diabetic mice. **JCI Insight**, v. 3, n. 17, p. e120220, [s.d.].

BRAUN, L. R. et al. Diabetic Foot Ulcer: An Evidence-Based Treatment Update. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 15, n. 3, p. 267–281, 1 jul. 2014.

CALLEGARI, I. O. M.; OLIVEIRA, A. G. The Role of LTB4 in Obesity-Induced Insulin Resistance Development: An Overview. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, 2022.

CARMICHAEL, J. et al. Implementation of corneal confocal microscopy for screening and early detection of diabetic neuropathy in primary care alongside retinopathy screening: Results from a feasibility study. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 891575, 12 out. 2022.

CASQUEIRO, J.; CASQUEIRO, J.; ALVES, C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. Suppl1, p. S27, mar. 2012.

CASTRO, F. et al. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

CERQUEIRA, M. M. B. D. F. et al. Complications related to diabetic foot ulcer and associated social vulnerability factors at a referral centre in Brazil. **Journal of Wound Care**, v. 31, n. 11, p. 946–960, 2 nov. 2022.

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

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826–837, dez. 2010.

CHEN, J. et al. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Type 1 Diabetes. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 29, n. 14, p. 1361–1372, 10 nov. 2018.

CHEN, J. et al. Immune responses in diabetic nephropathy: Pathogenic mechanisms and therapeutic target. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022.

CHENG, H. et al. Role of prostaglandin E2 in tissue repair and regeneration. **Theranostics**, v. 11, n. 18, p. 8836–8854, 13 ago. 2021.

DEJANI, N. N. et al. Topical Prostaglandin E Analog Restores Defective Dendritic Cell-Mediated Th17 Host Defense Against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in the Skin of Diabetic Mice. **Diabetes**, v. 65, n. 12, p. 3718–3729, dez. 2016.

EINARSON, T. R. et al. Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007–2017. **Cardiovascular Diabetology**, v. 17, 2018.

ELLIS, S.; LIN, E. J.; TARTAR, D. Immunology of Wound Healing. **Current Dermatology Reports**, v. 7, n. 4, p. 350–358, 2018.

FELDMAN, E. L. et al. Diabetic neuropathy. **Nature reviews. Disease primers**, v. 5, n. 1, p. 42, 13 jun. 2019.

FENG, S. et al. Levels of Inflammatory Cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17A, and TNF- $\alpha$  in Aqueous Humour of Patients with Diabetic Retinopathy. **Journal of Diabetes Research**, v. 2018, p. 8546423, 4 abr. 2018.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of Diabetic Complications. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 137–188, jan. 2013. GONÇALVES, N. P. et al. Schwann cell interactions with axons and microvessels in diabetic neuropathy. **Nature reviews. Neurology**, v. 13, n. 3, p. 135–147, mar. 2017.

GROSS, J. L. et al. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. **Diabetes Care**, v. 28, n. 1, p. 164–176, 1 jan. 2005.

GROSSMAN, A.; GROSSMAN, E. Blood pressure control in type 2 diabetic patients. **Cardiovascular Diabetology**, v. 16, p. 3, 6 jan. 2017.

GUI, F. et al. Endothelial Dysfunction in Diabetic Retinopathy. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 591, 4 set. 2020.

GUIMARÃES, F. R. et al. The inhibition of 5-Lipoxygenase (5-LO) products leukotriene B4 (LTB4) and cysteinyl leukotrienes (cysLTs) modulates the inflammatory response and improves cutaneous wound healing. **Clinical Immunology (Orlando, Fla.)**, v. 190, p. 74–83, maio 2018.

HAMMAD, R. et al. T-Natural Killers and Interferon Gamma/Interleukin 4 in Augmentation of Infection in Foot Ulcer in Type 2 Diabetes. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 14, p. 1897–1908, 29 abr. 2021.

HE, R. et al. IL-33 improves wound healing through enhanced M2 macrophage polarization in diabetic mice. **Molecular Immunology**, v. 90, p. 42–49, 1 out. 2017.

HUANG, H. et al. The sustained PGE2 release matrix improves neovascularization and skeletal muscle regeneration in a hindlimb ischemia model. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, p. 95, 24 fev. 2022.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas 2021**. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>. Acesso em: 03 mar. 2023a.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Type 2 diabetes**. 2023. Disponível em: <https://idf.org/aboutdiabetes/type-2-diabetes.html>. Acesso em: 03 mar. 2023b.

JIA, G.; HILL, M. A.; SOWERS, J. R. Diabetic cardiomyopathy: an update of mechanisms contributing to this clinical entity. **Circulation research**, v. 122, n. 4, p. 624–638, 16 fev. 2018.

KÄMPFER, H. et al. Wound Inflammation in Diabetic ob/ob Mice : Functional Coupling of Prostaglandin Biosynthesis to Cyclooxygenase-1 Activity in Diabetes-Impaired Wound Healing. **Diabetes**, v. 54, n. 5, p. 1543–1551, 1 maio 2005.

KANTER, J. E.; BORNFELDT, K. E. Recent highlights of ATVB: impact of diabetes. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 36, n. 6, p. 1049, jun. 2016.

KARTIKA, R. et al. <p>Impact of Low Interferon- $\gamma$ ; and IL-10 Levels on TNF- $\alpha$ ; and IL-6 Production by PHA-Induced PBMCs in Type 2 Diabetes Mellitus</p>. **Journal of Inflammation Research**, v. 13, p. 187–193, 22 abr. 2020.

KELLOGG, A. P. et al. Protective Effects of Cyclooxygenase-2 Gene Inactivation Against Peripheral Nerve Dysfunction and Intraepidermal Nerve Fiber Loss in Experimental Diabetes. **Diabetes**, v. 56, n. 12, p. 2997–3005, 1 dez. 2007.

KOLLIAS, A. N.; ULBIG, M. W. Diabetic Retinopathy. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 107, n. 5, p. 75–84, fev. 2010.

KRZYSZCZYK, P. et al. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2018.

KUBOTA, A. et al. Inhibition of Interleukin-21 prolongs the survival through the promotion of wound healing after myocardial infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 159, p. 48–61, 1 out. 2021.

LANDMAN, G. W. D. et al. Safety and Efficacy of Gliclazide as Treatment for Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e82880, 12 fev. 2014.

LAROUCHE, J. et al. Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. **Advances in Wound Care**, v. 7, n. 7, p. 209–231, jul. 2018.

LI, P. et al. LTB4 causes macrophage-mediated inflammation and directly induces insulin resistance in obesity. **Nature medicine**, v. 21, n. 3, p. 239–247, mar. 2015.

LIEW, F. Y.; GIRARD, J.-P.; TURNQUIST, H. R. Interleukin-33 in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 11, p. 676–689, nov. 2016.

LIM, A. K. Diabetic nephropathy – complications and treatment. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 7, p. 361–381, 15 out. 2014.

LIN, C.-W. et al. New Horizons of Macrophage Immunomodulation in the Healing of Diabetic Foot Ulcers. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, p. 2065, 27 set. 2022.

LIN, K. et al. Update in the epidemiology, risk factors, screening, and treatment of diabetic retinopathy. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 12, n. 8, p. 1322–1325, ago. 2021.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2 jan. 2007.

MA, J. et al. Requirement for TLR2 in the development of albuminuria, inflammation and fibrosis in experimental diabetic nephropathy. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 2, p. 481–495, 15 jan. 2014.

MADER, J. K. et al. Patients with healed diabetic foot ulcer represent a cohort at highest risk for future fatal events. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 10325, 17 jul. 2019.

MARTIN, P.; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. **The British Journal of Dermatology**, v. 173, n. 2, p. 370–378, ago. 2015.

MARTINS, T. G. DOS S. Diabetic retinopathy: a neuropathy. **Einstein**, v. 19, p. eED6110, [s.d.].

MOORADIAN, A. D. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 3, p. 150–159, mar. 2009.

MURRAY, H. J. et al. The Association Between Callus Formation, High Pressures and Neuropathy in Diabetic Foot Ulceration. **Diabetic Medicine**, v. 13, n. 11, p. 979–982, 1996.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14, 7 jul. 2014.

NEMMER, J. M. et al. Interleukin-31 Signaling Bridges the Gap Between Immune Cells, the Nervous System and Epithelial Tissues. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 2021.

NEVES, J. A. J. et al. Increased leukotriene B4 plasma concentration in type 2 diabetes individuals with cardiovascular autonomic neuropathy. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 12, n. 1, p. 99, 12 nov. 2020.

NILSON, E. A. F. et al. Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2018. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 44, p. e32, 10 abr. 2020.

OJAIMI, E. et al. Retinopathy Signs in People without Diabetes: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Ophthalmology**, v. 118, n. 4, p. 656–662, abr. 2011.

OSUM, K. C. et al. Interferon-gamma drives programmed death-ligand 1 expression on islet  $\beta$  cells to limit T cell function during autoimmune diabetes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8295, 29 maio 2018.

PANG, L. et al. Understanding Diabetic Neuropathy: Focus on Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 9524635, 31 jul. 2020. POP-BUSUI, R. et al. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 40, n. 1, p. 136–154, jan. 2017.



- RASHEED, R. et al. Relationship between diabetic retinopathy and diabetic peripheral neuropathy - Neurodegenerative and microvascular changes. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 69, n. 11, p. 3370–3375, nov. 2021.
- RAZIYEVA, K. et al. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. **Biomolecules**, v. 11, n. 5, p. 700, 8 maio 2021.
- REARDON, R. et al. The diabetic foot ulcer. **Australian Journal of General Practice**, v. 49, n. 5, p. 250–255, maio 2020.
- REHMAN, K. et al. Role of Interleukin-6 in Development of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. **Critical Reviews & Trade in Eukaryotic Gene Expression**, v. 27, n. 3, 2017.
- RITCHIE, R. H.; ABEL, E. D. Basic Mechanisms of Diabetic Heart Disease. **Circulation research**, v. 126, n. 11, p. 1501, 5 maio 2020.
- RODRIGUES, M. et al. Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 665–706, 1 jan. 2019.
- ROSENBERGER, D. C. et al. Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy. **Journal of Neural Transmission**, v. 127, n. 4, p. 589–624, 2020.
- SAAD, H. et al. The Pathogenic Role of Oxidative Stress, Cytokine Expression, and Impaired Hematological Indices in Diabetic Cardiovascular Diseases. **Inflammation**, v. 46, n. 1, p. 146, 2023.
- SCHRODER, K. et al. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163–189, 2004.
- ELZINGA, S. et al. Toll-like receptors and inflammation in metabolic neuropathy; a role in early versus late disease? **Experimental neurology**, v. 320, p. 112967, out. 2019.
- SHEN, Y. et al. Searching for optimal blood pressure targets in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. **Cardiovascular Diabetology**, v. 18, p. 160, 16 nov. 2019.
- SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1793–1801, 3 jul. 2006.
- SIQUEIRA, M. F. et al. Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF- $\alpha$  dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1). **Diabetologia**, v. 53, n. 2, p. 378–388, 1 fev. 2010.
- SORG, H. et al. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research**, v. 58, n. 1–2, p. 81–94, 2017.
- SPOLSKI, R. et al. IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 37, p. 14028–14033, 16 set. 2008.

SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P.-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 8, p. 477–489, ago. 2019.

SYEDA, M. M. et al. Prostaglandin Transporter Modulates Wound Healing in Diabetes by Regulating Prostaglandin-Induced Angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 181, n. 1, p. 334–346, 1 jul. 2012.

TAKEUCHI, M. et al. Elevated Levels of Cytokines Associated with Th2 and Th17 Cells in Vitreous Fluid of Proliferative Diabetic Retinopathy Patients. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0137358, 9 set. 2015.

TESFAYE, S. et al. Diabetic Neuropathies: Update on Definitions, Diagnostic Criteria, Estimation of Severity, and Treatments. **Diabetes Care**, v. 33, n. 10, p. 2285–2293, out. 2010.

THEOCHARIDIS, G. et al. Integrated Skin Transcriptomics and Serum Multiplex Assays Reveal Novel Mechanisms of Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers. **Diabetes**, v. 69, n. 10, p. 2157–2169, out. 2020.

THE BRITISH DIABETIC ASSOCIATION (DIABETES UK). **Type 1 diabetes**. Disponível em: <https://www.diabetes.org.uk/diabetes-the-basics/types-of-diabetes/type-1>. Acesso em: 03 mar. 2023.

TRIEB, K. The Charcot foot: pathophysiology, diagnosis and classification. **The Bone & Joint Journal**, v. 98-B, n. 9, p. 1155–1159, 1 set. 2016.

TU, L.; YANG, L. IL-33 at the Crossroads of Metabolic Disorders and Immunity. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, 2019.

VAN BAAL, J. et al. Mortality Associated With Acute Charcot Foot and Neuropathic Foot Ulceration. **Diabetes Care**, v. 33, n. 5, p. 1086–1089, maio 2010.

VIADER, A. et al. Aberrant Schwann Cell Lipid Metabolism Linked to Mitochondrial Deficits Leads to Axon Degeneration and Neuropathy. **Neuron**, v. 77, n. 5, p. 886–898, 6 mar. 2013.

VON SCHOLTEN, B. J. et al. Current and future therapies for type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 64, n. 5, p. 1037–1048, 2021.

WANG, L. et al. Roles of EP Receptors in the Regulation of Fluid Balance and Blood Pressure. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 875425, 23 jun. 2022.

WANG, P.-H. et al. Wound healing. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 2, p. 94–101, 1 fev. 2018.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 15 dez. 2003.

WILGUS, T. A. Alerting the body to tissue injury: The role of alarmins and DAMPs in cutaneous wound healing. **Current pathobiology reports**, v. 6, n. 1, p. 55–60, mar. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diabetes**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1)>. Acesso em: 3 mar. 2023.

XU, F.; ZHANG, C.; GRAVES, D. T. Abnormal Cell Responses and Role of TNF-  $\alpha$  in Impaired Diabetic Wound Healing. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

YIN, H. et al. IL-33 accelerates cutaneous wound healing involved in upregulation of alternatively activated macrophages. **Molecular Immunology**, v. 56, n. 4, p. 347–353, 31 dez. 2013.

ZHANG, S. et al. Prostaglandin E2 hydrogel improves cutaneous wound healing via M2 macrophages polarization. **Theranostics**, v. 8, n. 19, p. 5348–5361, 22 out. 2018.

ZHOU, R. et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. **Nature Immunology**, v. 11, n. 2, p. 136–140, fev. 2010.