

HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS

**INTER-RELAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL, MARCADORES
INFLAMATÓRIOS PLASMÁTICOS E IMUNOLÓGICOS EM PACIENTES COM
DIABETES *MELLITUS* NA CIDADE DE JOINVILLE-SC**

**JOINVILLE
2023**

HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS

**INTER-RELAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL, MARCADORES
INFLAMATÓRIOS PLASMÁTICOS E IMUNOLÓGICOS EM PACIENTES COM
DIABETES *MELLITUS* NA CIDADE DE JOINVILLE-SC**

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Saúde e Meio Ambiente na Universidade da Região de Joinville. Orientador: Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger.

**JOINVILLE
2023**

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

C321i Carstens, Heidi Pfitzenreuter
Inter-relação da microbiota intestinal, marcadores inflamatórios plasmáticos e imunológicos em pacientes com Diabetes mellitus na cidade de Joinville - SC / Heidi Pfitzenreuter Carstens; orientador Dr. Gilmar Sidnei Erzinger. – Joinville: Univille, 2023.

94 f.: il.

Tese (Doutorado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Diabetes mellitus tipo 2. 2. Lipopolissacarídeos. 3. Proteína C-reativa. I. Erzinger, Gilmar Sidnei (orient.). II. Título.

CDD 616.462

Termo de Aprovação

“Inter-relação da Microbiota Intestinal, Marcadores Inflamatórios Plasmáticos e Imunológicos em Pacientes com Diabetes Mellitus na Cidade de Joinville-SC”

por

Heidi Pfitzenreuter Carstens

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger
Orientador (UNIVILLE)

Prof. Dr. Rafael Dutra de Armas
(CATÓLICA DE SC)

Profa. Dra. Maristela Adamovski
(FPP)

Profa. Dra. Vanessa Cristine Kobs
(UNIVILLE)

Tese julgada para a obtenção do título de Doutora em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.



Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dr. Luciano Lorenzi

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Joinville, 30 de novembro de 2022

INTER-RELAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL, MARCADORES INFLAMATÓRIOS PLASMÁTICOS E IMUNOLÓGICOS EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS NA CIDADE DE JOINVILLE-SC

Resumo

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença caracterizada por hiperglicemia, decorrente de defeitos na secreção ou ação do hormônio insulina, que quadruplicou nos últimos 40 anos e é a sétima causa de morte no mundo. As causas do desenvolvimento do DM estão ligadas a fatores genéticos e ambientais, porém estudos recentes buscam relacionar alterações da microbiota intestinal ao seu desenvolvimento. A microbiota intestinal é naturalmente um grande reservatório de lipopolissacarídeos (LPS), componente abundante da parede bacteriana gram-negativa, e a migração do LPS para a corrente sanguínea é chamada de endotoxemia, que está relacionada à desregulação da glicose, obesidade, inflamação do tecido adiposo e beta pancreático disfunção celular, além de correlação significativa do aumento do LPS com biomarcadores inflamatórios como Proteína C Reativa (PCR), ferritina e Interleucina 1 β em pacientes com diabetes tipo 2. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar lipopolissacarídeos e marcadores inflamatórios plasmáticos em pacientes diabéticos na cidade de Joinville, Brasil. Métodos: Foram incluídos 67 indivíduos com idade entre 12 e 91 anos, divididos em 'diabéticos' e 'não diabéticos' com base na glicemia ou hemoglobina glicada. A quantificação de lipopolissacarídeos (LPS), interleucina 1 β , C5a e interleucina 10 foi realizada por ensaio imunoenzimático. A ferritina foi realizada por quimioluminescência e a proteína C Reativa (PCR) foi quantificada por imunoturbidimetria. As médias foram comparadas pelo teste t de *Student* com níveis de significância fixados em $p < 0,05$. Resultados: Observou-se aumento significativo de lipopolissacarídeos em pacientes diabéticos. A 'Proteína C Reativa' plasmática e a 'Ferritina' também estavam significativamente aumentadas em pacientes diabéticos. A quantificação de interleucina 1 β , IL-10 e fração C5a do sistema complemento não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados. Conclusões: Houve aumento significativo da concentração de lipopolissacarídeos plasmáticos, em pacientes diabéticos, marcador que está associado ao aumento da permeabilidade intestinal e marcadores inflamatórios comumente utilizados na prática clínica. A ferritina e a PCR também estão elevadas. Esses achados podem estar relacionados ao desenvolvimento de diabetes ou outras

patologias, além das complicações do DM, sendo necessários mais estudos para confirmação.

Palavras-chave: Diabetes, Lipopolissacarídeos, Marcador inflamatório

INTERRELATION OF THE INTESTINAL MICROBIOTA, INFLAMMATORY PLASMATIC AND IMMUNOLOGICAL MARKERS IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS IN THE CITY OF JOINVILLE-SC

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a disease characterized by hyperglycemia, resulting from defects in the secretion or action of the hormone insulin, which has quadrupled in the last 40 years and is the seventh leading cause of death worldwide. DM development causes are linked to genetic and environmental factors, but recent studies seek to relate changes in the intestinal microbiota to its development. The intestinal microbiota is naturally a large reservoir of lipopolysaccharides (LPS), abundant component of the gram-negative bacterial wall, and the migration of LPS into the bloodstream is called endotoxemia which is related to glucose dysregulation, obesity, adipose tissue inflammation and pancreatic beta cell dysfunction, in addition to a significant correlation of increased LPS with inflammatory biomarkers such as C-Reactive Protein (CRP), ferritin and Interleukin 1 β in patients with type 2 diabetes. Therefore, the aim of this study was to evaluate lipopolysaccharides and plasma inflammatory markers in diabetic patients in the city of Joinville, Brazil. Methods: Sixty-seven individuals aged between 12 and 91 years were included divided into 'diabetics' and 'non-diabetics' based on blood glucose or glycated hemoglobin. The quantification of lipopolysaccharides (LPS), interleukin 1 β , C5a and interleukin 10 was performed by enzyme-linked immunosorbent assay. Ferritin was performed by chemiluminescence, and C-reactive protein (CRP) was quantified by immunoturbidimetry. Means were compared by Student t test with significance levels set at $p < 0.05$. Results: A significant increase in lipopolysaccharides was observed in diabetic patients. Plasmatic 'C-Reactive Protein' and 'Ferritin' were also significantly increased in diabetic patients. The quantification of interleukin 1 β , IL-10 and the C5a fraction of the complement system showed no significant difference between the studied groups. Conclusions: There was a significant increase in the concentration of plasma lipopolysaccharides, in diabetic patients, a marker that is associated with increased intestinal permeability and inflammatory markers commonly used in clinical practice. Ferritin and CRP are also elevated. These findings may be related to the development of diabetes or other

pathologies, in addition to DM complications, and further studies are needed for confirmation.

Keywords: Diabetes; Lipopolysaccharides; Inflammatory Marker.

INTERRELACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL, MARCADORES PLASMÁTICOS INFLAMATORIOS E INMUNOLÓGICOS EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS DE LA CIUDAD DE JOINVILLE-SC

Resumen

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad caracterizada por hiperglucemia, resultante de defectos en la secreción o acción de la hormona insulina, que se ha cuadruplicado en los últimos 40 años y es la séptima causa de muerte a nivel mundial. Las causas del desarrollo de la DM están ligadas a factores genéticos y ambientales, pero estudios recientes buscan reportar cambios en el microbiota intestinal para su desarrollo. La microbiota intestinal es naturalmente un gran reservorio de lipopolisacáridos (LPS), componente abundante de la pared bacteriana gramnegativa, y la migración de LPS al torrente sanguíneo se denomina endotoxemia, que está relacionada con la desregulación de la glucosa, la obesidad, la inflamación del tejido adiposo y la beta pancreática. disfunción celular, además de una correlación significativa del aumento de LPS con biomarcadores inflamatorios como la Proteína C Reactiva (PCR), la ferritina y la Interleucina 1 β en pacientes con diabetes tipo 2. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar lipopolisacáridos y marcadores inflamatorios plasmáticos en pacientes diabéticos en la ciudad de Joinville, Brasil. Métodos: Se incluyeron 67 individuos con edades entre 12 y 91 años divididos en 'diabéticos' y 'no diabéticos' en base a la glucemia o hemoglobina glicosilada. La cuantificación de lipopolisacáridos (LPS), interleucina 1 β , C5a e interleucina 10 se realizó mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. La ferritina se realizó por quimioluminiscencia y la proteína C reactiva (PCR) se cuantificó por inmunoturbidimetría. Las medias se compararon mediante la prueba t de Student con niveles de significación fijados en $p < 0,05$. Resultados: Se observó un aumento significativo de lipopolisacáridos en pacientes diabéticos. La 'proteína C reactiva' y la 'ferritina' plasmáticas también aumentaron significativamente en pacientes diabéticos. La cuantificación de interleucina 1 β , IL-10 y la fracción C5a del sistema del complemento no mostró diferencias significativas entre los grupos estudiados. Conclusiones: Hubo un aumento significativo en la concentración de lipopolisacáridos plasmáticos, en pacientes diabéticos, marcador que se asocia con aumento de la

permeabilidad intestinal y marcadores inflamatorios de uso común en la práctica clínica. La ferritina y la PCR también están elevadas. Estos hallazgos pueden estar relacionados con el desarrollo de diabetes u otras patologías, además de complicaciones de la DM, siendo necesarios más estudios para su confirmación.

Palabras-clave: Diabetes, Lipopolisacáridos, Marcador inflamatorio.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	ácidos graxos de cadeia curta
CD	célula dendrítica
DG	diabetes gestacional
DM	diabetes mellitus
DM1	diabetes mellitus tipo 1
DM2	diabetes mellitus tipo 2
FAN	fator antinuclear
FGNA	fígado gorduroso não-alcóolico
FR	fator reumatoide
GALT	tecidos linfoides associados a mucosa gástrica
HbA1c	hemoglobina glicada A1c
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IgA	imunoglobulina A
IMC	índice de massa corporal
INF	interferon gama
IL-1b	interleucina 1 beta
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
LADA	diabetes autoimune latente em adultos
LB	linfócito B
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	linfócito T
LTCD4 +	linfócitos T CD4 positivo
NK –	natural killer
PAMP	padrões moleculares associados a patógenos
PCR	proteína C reativa
PRR	receptor de reconhecimento de padrão
SC	sistema complemento
SII	síndrome do intestino irritável
Th	linfócitos T helper

TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
Th1	linfócitos T helper 1
Th2	linfócitos T helper 2
Th17	linfócitos T helper 17
TLR	Toll-like receptor
TNF	fator de necrose tumoral
T regs	linfócitos T reguladores

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O muco e os peptídeos antimicrobianos dificultam a interação física entre a microbiota intestinal e os enterócitos.	28
Figura 2 – Processo de translocação de lipopolissacarídeos das células epiteliais intestinais para a circulação e ativação dos receptores semelhantes a toll por produtos microbianos na disbiose	31
Figura 3 – A microbiota intestinal modula a permeabilidade intestinal o que influencia no metabolismo da glicose, promovendo resistência a insulina e disfunção de células beta pancreática.....	33
Figura 4 – Influência da inflamação na sensibilidade à insulina por ação das citocinas inflamatórias sobre a sinalização intracelular e receptores de insulina.....	34
Figura 5 – O aumento de citocinas pró-inflamatórias após a migração de produtos bacterianos pela mucosa intestinal, estimula a produção de proteína C reativa e participa da geração de resistência insulínica.	36
Figura 6 - Alteração da microbiota intestinal apresenta relação com a inflamação e a autoimunidade, os quais são fatores desencadeantes e relacionáveis ao diabetes.....	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes de acordo com o índice de massa corporal.....	44
Gráfico 2 – Valores médios de proteína C reativa entre os indivíduos estudados.....	46
Gráfico 3 - Comparação dos valores médios de albumina entre os grupos de estudo.....	46
Gráfico 4 - Comparação dos valores médios de ferritina entre os grupos de estudo....	47
Gráfico 5 - Análises de correlação entre as variáveis ‘índice de massa corporal’ e ‘hemoglobina A1c’ e os marcadores inflamatórios ‘proteína C reativa’ e ‘ferritina’	48
Gráfico 6 - Comparação dos valores médios de IL-1 β entre os grupos de estudo.....	50
Gráfico 7 - Comparação dos valores médios de IL-10 entre os grupos de estudo.....	51
Gráfico 8 - Comparação dos valores médios de C5a entre os grupos de estudo.....	51
Gráfico 9 - Comparação dos valores médios de lipopolissacarídeos entre os grupos de estudo.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros gerais dos pacientes pesquisados. Sexo, idade, IMC e perfil glicêmico.....	43
Tabela 2 - Perfil de interrelação entre os marcadores inflamatórios nos grupos estudados.....	47
Tabela 3 - Distribuição dos resultados para o marcador imunológico Fator Reumatoide.....	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
3.1 DIABETES MELLITUS.....	24
3.2 MICROBIOTA INTESTINAL.....	24
3.2.1 <i>Fatores que influenciam na microbiota intestinal</i>	26
3.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO NA MUCOSA INTESTINAL	27
3.4 DESEQUILÍBRIO DA MICROBIOTA INTESTINAL E O DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS.....	29
3.5 MICROBIOTA INTESTINAL, SISTEMA IMUNOLÓGICO E FISIOPATOGENIA DO DIABETES MELLITUS.....	32
3.6 AVALIAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E IMUNOLÓGICOS NO DIABETES.....	35
4 METODOLOGIA	39
4.1 TIPO DE PESQUISA	39
4.2 COLETA DE AMOSTRAS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	39
4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	39
4.4 LOCAIS DE PESQUISA	40
4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS	40
4.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS....	40
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4.8 ANÁLISE CRÍTICA DE RISCOS E BENEFÍCIOS	41
4.9 ASPECTOS ÉTICOS	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS.....	66
ANEXOS.....	77
ANEXO A – TERMO DE ANUÊNCIA LABORATÓRIO GIMENES.....	77

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	80
ANEXO C – TERMO DE ANUÊNCIA LABORATÓRIO UNIVILLE.....	81
ANEXO D – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	83
APÊNDICE A – Dados Brutos.....	89

1 INTRODUÇÃO

Diabetes *melittus* é uma doença caracterizada pela hiperglicemia, decorrente de defeitos na secreção ou na ação do hormônio insulina, produzida pelo pâncreas e responsável por promover a entrada da glicose nas células do organismo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). A doença pode ser dividida em três principais subtipos, sendo o diabetes tipo 1 (DM1), relatada como a deficiência da produção de insulina, o diabetes tipo 2 (DM2), a mais comum delas, resultado da ineficiência do organismo em utilizar a insulina e a diabetes gestacional (DG), caracterizada pela hiperglicemia durante o período da gravidez (WHO, 2022).

As complicações decorrentes do diabetes são comuns e envolvem altas taxas de morbidade e mortalidade, sendo divididas de maneira geral em microvasculares (neuropatias, nefropatias e retinopatias) e macro vasculares (doenças cardiovasculares, acidentes vasculares encefálicos e doenças arteriais periféricas), além de pé diabético, doenças dentais, dificuldade de resposta imune às infecções e complicações do nascimento (PAPATHEODOROU et al., 2018). O número de diabéticos no mundo quadruplicou nos últimos 40 anos e em 2016, 1,6 milhões de pessoas morreram de causas diretamente a ele associados, sendo a sétima causa de mortes no mundo (WHO, 2022).

As causas do desenvolvimento de DM estão ligadas a fatores genéticos e ambientais, entre eles exposição a produtos químicos, vírus e dieta, mas recentes estudos buscam relacionar alterações da microbiota intestinal com o desenvolvimento de diabetes (MOFFA, 2019). Observa-se que combinações de grupos microbianos podem estimular linfócitos T auto-reativos por mecanismos de mimetismo molecular e a exposição de células beta pancreáticas às citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IFN- σ e interleucina 12 (IL-12) pode levar a DM1 (BIBBÓ et al., 2017; NEEDELL e ZIPRIS, 2016; VAARALA, 2011). Além disso, a microbiota parece ter um efeito relacionado à obesidade, que induz resistência à insulina e a inflamação metabólica (TILG e MOSCHEN, 2015). Considerando, que a obesidade aumenta o risco de DM2 e 80% destes pacientes são obesos, dietas ricas em gorduras, açúcares e industrializados podem alterar a microbiota intestinal, modificar o metabolismo lipídico, provocar esteatose hepática e inflamação sistêmica (EVERARD et al., 2013; GEURTS et al., 2014).

A microbiota intestinal parece ter um papel mais importante que a variação do genoma do indivíduo na patogênese da obesidade, por conta da interação desta com o ambiente (CARICILLI e SAAD, 2014). Ela é o conjunto dos microrganismos associados a tecidos ou órgãos, que colonizam sem produzir doenças (KIM; COVINGTON; PAMER, 2017) e no intestino compreendem um ecossistema predominantemente constituído de bactérias, com mais de 100 trilhões, distribuídas por centenas de espécies (KIM; COVINGTON; PAMER, 2017; TILG e MOSCHEN, 2015). A composição da microbiota intestinal depende da história do hospedeiro, da sua genética e de fatores ambientais e pode ser afetada por vários parâmetros como pH, níveis de oxigênio, disponibilidade de nutrientes e temperatura, permitindo que diferentes populações microbianas exerçam papel crítico na saúde humana (MILANI et al., 2017; DE LUCA e SHOENFELD, 2018).

A manutenção de uma microbiota benéfica requer o equilíbrio homeostático da comunidade microbiana, bem como da interface entre ela e o intestino do hospedeiro e isso é essencial para a extração de energia de substâncias digeridas, para o desenvolvimento do sistema imune local e para a não-migração de patógenos do intestino para a circulação (SOMMER et al., 2017; KIM; COVINGTON; PAMER, 2017). Destaca-se, que as células do epitélio intestinal exercem funções discrepantes, pois devem ser uma barreira física impermeável entre o hospedeiro e a microbiota ou microrganismos patogênicos, mas precisam permitir a absorção dos nutrientes (BELKAID e HARRISON, 2017).

As primeiras barreiras imunológicas intestinais são muco e peptídeos antimicrobianos produzidos pelas células de *Goblet* e *Paneth*, que formam um produto gelatinoso de glicoproteínas capaz de separar os patógenos comensais dos enterócitos e ajudam a regular a permeabilidade intestinal (CANTORNA; SNYDER; ARORA, 2019). Este muco, promove proteção física, além de ser rico em Imunoglobulinas A (IgA), diminuindo a capacidade invasiva dos microrganismos (COATES et al., 2019).

Diferente da resposta imune inata sistêmica, no intestino a ligação de patógenos aos receptores de reconhecimento de padrão (PRR) não leva à inflamação local, mas a uma reorganização e aumento das junções de oclusão dos enterócitos, criando uma maior resistência entre as células epiteliais, aumento da sua motilidade e proliferação celular (COATES et al., 2019; ZHOU, et al., 2020), além de induzir a produção de interleucina 10 (IL-10) pelos linfócitos T CD4+ (LTCD4+), promover a

expansão clonal e indução de células T reguladoras (T *regs*) e supressão de linfócitos T helper 17 (Th17) (SPILJAR et al., 2017).

As próprias bactérias também contribuem para a imunidade da mucosa intestinal, produzindo enzimas capazes de permitir a digestão de certos nutrientes em formas absorvíveis, incluindo os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como butirato, acetato e propionato, que tem conhecidos efeitos imunomoduladores (BANDER, et al., 2020; YOO et al., 2020).

A redução da diversidade microbiana ou alterações do conjunto microbiológico levam ao desequilíbrio da microbiota, também chamado de disbiose e está relacionada ao surgimento de várias patologias inflamatórias intestinais, doenças cardiovasculares, cânceres, desordens neuro inflamatórias, doenças autoimunes e distúrbios metabólicos (FERNÁNDEZ et al., 2018; SHEN; OBIN; ZHAO, 2013; MOREIRA et al., 2019; HUANG et al., 2019; TANG; KITAI; HAZEN, 2017; CARICILLI e SAAD, 2014; EVERARD e CANI, 2013). Mudanças da microbiota intestinal podem modular os níveis dos metabólitos derivados das bactérias, reduzir a apresentação de antígenos e ativação de linfócitos T e B, diminuir a produção de muco intestinal, o que culmina em aumento de permeabilidade, translocação de bactérias e inflamação (OLIVARES-VILLAGÓMEZ e KAER, 2018; SPILJAR et al., 2017; WANG; ZHU; QIN, 2019).

Além, disso, a microbiota intestinal é naturalmente um grande reservatório de lipopolissacarídeos (LPS), um componente abundante da parede bacteriana gram-negativa e a migração do LPS para a corrente sanguínea é chamado de endotoxemia, evento que pode decorrer de dietas ricas em gordura, mas principalmente em decorrência do aumento da permeabilidade intestinal na disbiose (BARRA, et al., 2021; CANDIDO; BRESSAN; ALFENAS, 2018). A endotoxemia está relacionada com desregulação da glicose, obesidade, inflamação do tecido adiposo e disfunção de células beta pancreáticas (BANDER et al., 2020), além de haver uma significativa correlação do aumento de LPS com biomarcadores inflamatórios como Proteína C Reativa (PCR), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interleucina 6 (IL-6) em pacientes com diabetes tipo 2 (SALGUERO, et al., 2019).

Níveis significativamente elevados de Proteína C reativa têm sido descritos há muito na literatura como um biomarcador inflamatório associado a DM (MISRA e SAHU, 2012, EL-MESALLAMY et al., 2007) e pode atualmente ser aplicado como marcador de prognóstico e decisão diante de complicações do diabetes (WANG et al.,

2021). A elevação dos níveis de IL-1 β em diabéticos foi apresentada em diversos estudos (BAE et al., 2019; MARGARYAN et al., 2020; TONG et al., 2017), bem como o aumento de ferritina em pacientes com diabetes e complicações microvasculares (METWALLEY et al., 2021), sendo a ferritina considerada um fator de risco independente para o desenvolvimento da patologia (LIU et al., 2020; ZHANG et al., 2021).

Vários autores descrevem a relação da microbiota intestinal e o diabetes *mellitus* (DM) (NAVAB-MOGHADAM et al., 2017; MUÑOZ-GARACH; DIAZ-PERDIGONES; TINAHONES, 2016; VAARALA, 2011; ABDELLATIF e SARVETNICK, 2019; HAN et al., 2018; BIBBÓ et al., 2017) e outros estabelecem a alteração de marcadores inflamatórios plasmáticos em pacientes diabéticos, inclusive como fatores de risco para a evolução da doença (ALFADUL; SABVICO; AL-DAGHRI, 2022; LIU et al., 2020). Dessa maneira, discute-se a possibilidade destes achados estarem relacionados aos mecanismos de desenvolvimento do diabetes, sendo os mais citados os efeitos da alteração de microbiota sobre a produção de AGCC, resistência insulínica mediada por LPS e aumento da inflamação crônica sistêmica (CARICILLI e SAAD, 2014; FASSATOUI et al., 2019; MOFFA et al., 2019; NAVAB-MOGHADAM et al., 2017; SALAMONE, 2021).

Diante do exposto, notou-se a importância e necessidade de se investigar marcadores inflamatórios e imunológicos plasmáticos em pacientes diabéticos na cidade de Joinville e discutir possíveis alterações de microbiota e permeabilidade intestinal como fatores para o desenvolvimento da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar marcadores inflamatórios plasmáticos e imunológicos e suas inter-relações com a microbiota intestinal de pacientes diabéticos na cidade de Joinville-SC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os marcadores inflamatórios plasmáticos Proteína C Reativa, Ferritina e Albumina em pacientes com e sem diabetes *mellitus*;
- Quantificar a interleucina 1 beta (IL-1 β) no soro de pacientes com e sem diabetes;
- Quantificar a interleucina 10 (IL-10) no soro de pacientes com e sem diabetes;
- Quantificar a proteína 'C5a' do sistema complemento no soro de pacientes com e sem diabetes;
- Avaliar os marcadores imunológicos 'Fator Reumatoide' e 'Fator Antinuclear (FAN)' nos pacientes com e sem diabetes;
- Quantificar os lipopolissacarídeos plasmáticos de pacientes com e sem diabetes;
- Comparar e relacionar o perfil dos biomarcadores inflamatórios plasmáticos entre pacientes diabéticos e os sem diabetes;
- Relacionar os marcadores inflamatórios Proteína C reativa, Ferritina e IL-1 β com os índices de massa corpórea (IMC) e Hemoglobina A1c (HbA1c)
- Inter-relacionar os mediadores inflamatórios plasmáticos e marcadores imunológicos com os níveis de lipopolissacarídeos dos pacientes estudados;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DIABETES MELLITUS

Diabetes Mellitus (DM) é um termo coletivo utilizado para desordens metabólicas caracterizadas por níveis cronicamente elevados de glicose sanguínea (PETERSMANN et al., 2019). Ela acomete cerca de 422 milhões de pessoas mundialmente e 1,6 milhões de mortes anuais são diretamente atribuídas a essa patologia (WHO, 2022).

Os pacientes portadores de diabetes apresentam ao diagnóstico, sintomas como fome e sede constantes, formigamento de pés e mãos, poliúria, frequentes infecções de bexiga, rins e pele, cicatrização debilitada e visão embaçada e ao longo dos anos esse distúrbio metabólico pode levar a complicações macro vasculares, como doenças cardiovasculares, doenças arteriais periféricas e acidentes vasculares encefálicos, além de complicações microvasculares, envolvendo neuropatias, retinopatias e nefropatias, podendo haver desenvolvimento de pé diabético e dificuldade de cicatrização, bem como envolver altas taxas de morbidade e mortalidade (FASSATOUI et al., 2019; PAPTAEODOROU et al., 2018).

A patologia possui três subtipos: o diabetes do tipo 1 (DM1), caracterizada pela deficiente produção de insulina, o diabetes do tipo 2 (DM2) provocado pela resistência à insulina e a diabetes gestacional (DG) que é condicionada ao aumento da glicemia no período gestacional, sendo o tipo 2 o de maior prevalência mundial (WHO, 2022).

O tratamento dessa condição varia com a necessidade de cada paciente, podendo ser prescritos hipoglicemiantes orais, como inibidores de alfa glicosidase (impedem a digestão e absorção de carboidratos no intestino), sulfonilureias e glinidas (estimulam a produção pancreática de insulina) e/ou uso do hormônio insulina, além do encorajamento a hábitos saudáveis, mantendo uma dieta diária de verduras, legumes e frutas, redução do consumo de sal, açúcares e gorduras e prática de exercícios físicos com regularidade, para controle de peso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

O fisiopatogenia do DM1 é a destruição autoimune das células beta pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina, o que a torna absolutamente deficiente, entretanto o DM2 é considerado uma doença multifatorial, associada a

uma predisposição genética (PETERSMANN et al., 2019). O DM2, que acomete majoritariamente adultos e é o subtipo mais comum, caracteriza-se pela hiperglicemia pré e pós-prandial decorrente de insuficiência insulínica, seja pela produção e secreção inadequada da insulina ou pelo desenvolvimento de resistência pelo organismo (WHO, 2022; NOGUERA et al., 2020). Classicamente, o desenvolvimento dessa patologia está diretamente relacionado ao sobrepeso, síndrome metabólica, sedentarismo, hábitos alimentares não saudáveis, elevação de triglicerídeos e hipertensão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Além dos mecanismos fisiopatológicos clássicos supracitados, nos últimos anos alterações de microbiota intestinal estão sendo estudadas como parte do desenvolvimento de diabetes (ABDELLATIF e SARVETNICK, 2019; BIBBÓ et al., 2017; HAN et al., 2018).

3.2 MICROBIOTA INTESTINAL

O intestino humano possui uma imensa área de interface entre o meio ambiente e microrganismos, com uma densidade estimada em 10^{11} a 10^{19} células bacterianas por mililitro de muco intestinal, estendida em uma área de 250 a 400m² (RINNINELA et al., 2019; THURSBY e JUGE, 2017). A microbiota intestinal é composta de diferentes espécies de microrganismos - majoritariamente bactérias - e modulada desde o início da vida até a fase adulta, sofrendo variações de acordo com o tipo do nascimento, alimentação na primeira infância, fatores ambientais e genéticos (RINNINELA et al., 2019). Esta composição nativa permanece relativamente estável durante a vida adulta, mas difere dentre os indivíduos de acordo com a mucosa intestinal, índice de massa corpórea, estilo de vida, prática de exercícios físicos e hábitos alimentares culturais, sendo que um equilíbrio saudável entre o hospedeiro e sua microbiota intestinal garante equilíbrio metabólico e boa performance do sistema imunológico, prevenindo desenvolvimento de doenças (GENSOLLEN et al., 2016).

A microbiota intestinal é composta de fungos, vírus e predominantemente de bactérias, que taxonomicamente são classificadas de acordo com o filo, classe, ordem, família, gênero e espécie, sendo *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*, os filos dominantes na microbiota intestinal, com *Firmicutes* e *Bacteroidetes* representando 90% da composição total (COSTEA et al., 2011). Estudos identificaram pelo menos 2.172 espécies de bactérias

isoladas de seres humanos, classificadas em 12 diferentes filos, com 93,5% delas pertencentes a *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* (THURSBY e JUGE, 2017).

O filo *Bacteroidetes* é composto de bactérias gram-negativas em forma de bastões, aeróbias, anaeróbias e não-esporuladas que colonizam diferentes regiões intestinais e são conhecidas por digerirem polissacarídeos complexos, os quais resistem às enzimas digestivas do hospedeiro, produzindo ácidos graxos voláteis de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato, que são reabsorvidos pelo hospedeiro (KIM; COVINGTON; PAMER, 2017). Estes compostos têm sido discutidos na regulação do crescimento do epitélio intestinal, bem como na diferenciação e estimulação do sistema imune local (LEVY et al., 2015). Os *Bacteroidetes* contribuem para a manutenção da boa relação entre hospedeiro, mucosa e funções metabólicas, sendo que a maioria dos representantes deste filo não causam doenças, com exceção ao *Bacteroides fragillis* enteropatogênico produtor de toxina capaz de causar colite e estar associado a tumorigênese (SEARS, 2009).

Bactérias gram-positivas em sua maioria anaeróbias obrigatórias e facultativas compõem mais de 200 espécies do filo *Firmicutes*, como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* e *Ruminococcus* (RINNINELLA et al., 2019). A classe *Clostridium* representa 95% deste filo, mas é um grupo heterogêneo de bactérias, sendo que os grupos XIVa e IV representam a maioria dos organismos residentes no trato gastrintestinal com papéis benéficos, promovendo homeostase imune e liberação de butirato e produtos final da fermentação - similares aos *Bacteroidetes* - , porém os membros do grupo XI, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringens* são patógenos causadores de importantes doenças em humanos (KIM; COVINGTON; PAMER, 2017).

O filo *Actinobacteria* é composto de bactérias gram-positivas aeróbias e anaeróbias e *Bifidobacteria spp.* é o gênero com maior representatividade (RAJILIC-STOJANOVIC e VOS, 2014). Certas espécies deste filo também são consideradas probióticos gerando proteção contra patógenos por competição de exclusão, imunomodulação e habilidade de aderência no muco do epitélio intestinal (BUFFIE e PAMER, 2013).

Proteobacteria é o filo composto de uma grande variedade de gram-negativos anaeróbios facultativos e normalmente estão em baixa quantidade na microbiota saudável, com alguns estudos sugerindo que o aumento da prevalência de

Proteobacteria é comum em desequilíbrios da microbiota e desenvolvimento de doenças (KIM; COVINGTON; PAMER, 2017). A família *Enterobacteriaceae*, que inclui *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* está normalmente em baixa quantidade, porém possui potencial para dominar durante processos de disbiose (TAUR e PAMER, 2013).

3.2.1 Fatores que influenciam na microbiota intestinal

Cada indivíduo é provido de uma microbiota intestinal única, que desempenha funções específicas no metabolismo dos nutrientes, manutenção e integridade da mucosa, imunomodulação e proteção contra patógenos, sendo a genética apenas um dos fatores que contribuem para esta formação particular (LIM, et al., 2017; RAJILIC-STOJANOVIC e VOS, 2014).

A via de nascimento é um fator que interfere na microbiota, sendo que partos normais estão relacionados a composições associadas a microrganismos de pele, vaginal e fecal da mãe, mas em cesáreas há maior relação com a microbiota da pele materna e do ambiente hospitalar (THURSBY e JUGE, 2017).

A idade gestacional ao nascimento é uma variável da microbiota intestinal, pois em bebês pré-termos ela é modificada pela imaturidade do tecido e componentes ambientais, como uso de antibioticoterapia, internamento hospitalar e dieta entérica mais frequente nestes recém-natos (ARBOLEYA et al., 2012).

Além das variáveis associadas à primeira infância, outros fatores podem influenciar na composição da microbiota intestinal, como índice de massa corporal (IMC), prática de exercícios físicos, etnia, hábitos de dieta e culturais (THURSBY e JUGE, 2017). Diferenças de microbiota são percebidas em diferentes idades e gêneros, o que pode estar relacionado com os vários eventos da vida como doenças, mudanças e diferenças hormonais ou funcionalidade do sistema imunológico (BANDER et al., 2020; ODAMAKI, et al., 2016). Haro e colaboradores (2016) observaram que além das diferenças de composição de microbiota entre homens e mulheres, índices de massa corporal mais elevados modificam o perfil da microbiota, ainda que distintamente entre os sexos.

A antibioticoterapia, necessária para combate de inúmeras patologias, altera a composição e a função da microbiota intestinal e pode produzir efeitos de longo prazo,

como resistência aos antibióticos, perda da diversidade de espécies da e alterações da imunidade da mucosa intestinal (BECATINNI; TAUR; PAMER, 2016).

Além disso, estudos sugerem que a dieta exerce um efeito importante sobre a microbiota. Fórmulas infantis de leite estão associadas a colonização mais frequente por *Escherichia coli*, *Bacteroides* e *Clostridium difficile* comparado ao aleitamento materno, e crianças que são alimentadas no peito geralmente tem uma maior diversidade de *Bifidobacterium* (MILANI et al., 2017). Em adultos, dietas ricas em fibras demonstram redução de proteínas de fase aguda, LPS e IL-6 no plasma, reduzem IMC e aumentam a abundância relativa de *Bifidobacterium* (OJO et al., 2021). Por outro lado, há evidências científicas que ocorre aumento da indução de disbiose e endotoxemia metabólica em dietas ricas em gorduras (CANDIDO; BRESSAN; ALFENAS, 2018).

A rápida colonização do trato gastrointestinal no neonato desempenha um importante papel no desenvolvimento do sistema imune da mucosa intestinal, sendo que em estudos com animais sem microbiota, sua ausência causa deficiência imunológica significativa (ROMANOKEELER et al., 2014).

3.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO NA MUCOSA INTESTINAL

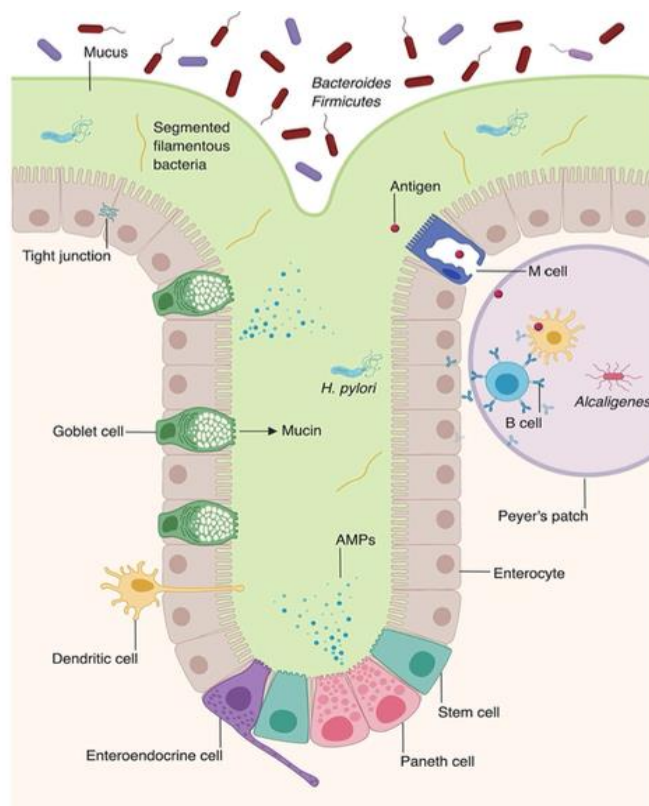
A primeira barreira física entre as bactérias e o organismo é o epitélio de células intestinais, do qual fazem parte células enteroendócrinas, células produtoras de muco (Goblet), células absortivas, células que produzem peptídeos antimicrobianos, entre outras funções (COATES, et al., 2019; SODERHOLM e PERICORD, 2019).

Os enterócitos são justapostos, apresentando junções de oclusão e desmossomos para garantir, que mesmo com a motilidade intestinal, a permeabilidade entre células fique preservada (Figura 1) e as principais constituintes da resposta imune são células dendríticas (CD), macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (FARRE et al., 2020). Neste ponto, observa-se uma interação entre a microbiota e o sistema imune: os patógenos estimulam receptores tipo-Toll (TLR) e NOD, através da interação de seus PAMPS, melhorando as junções de oclusão entre os enterócitos e aumentando a produção de peptídeos antimicrobianos pelas células de Paneth (HOOPER e MACPHERSON, 2010). Nf- κ B é uma importante via de sinalização destes receptores na manutenção da integridade epitelial intestinal, pois ela promove diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias, induz fatores anti-apoptóticos,

além de proliferação e estabilização das junções de oclusão (RAKOFF-NAHOUM; HAO; MEDZHITOV, 2006).

Além disso, o muco recobre o epitélio intestinal, mantendo a separação espacial e física entre as bactérias que colonizam o lúmen e a barreira epitelial intestinal, e a preservação desta reduz a invasão dos patógenos, enquanto as células imunes reparam eventuais danos a mucosa (KIM; COVINGTON; PAMER, 2017).

Figura 1 – O muco e os peptídeos antimicrobianos dificultam a interação física entre a microbiota intestinal e os enterócitos.



Fonte: COATES et al., 2019

Os antígenos comensais são normalmente transportados, via endocitose pelas células micropregas (Células M) aos tecidos linfóides e são apresentados pelas células dendríticas (CD) aos linfócitos T (LT) e linfócitos B (LB) (WANG; ZHU; QIN, 2019). As células T CD4+ quando ativadas, tornam-se células efetoras chamadas de T auxiliares/*helper* (Th) e dependendo do tipo de antígeno, o sítio de colonização e propriedades metabólicas da microbiota intestinal, poderá exprimir um fenótipo com

diferentes plasticidades funcionais: Th-1 induzidas por IL-1 β e produtoras de IFN- γ , Th-2 induzidas por IL-10 e produtora de IL-4 e Th-17 induzida por IL-12 e produtora de IL-17, cada qual com seu efeito sobre a imunidade da mucosa (FENG e ELSON, 2011). A produção de imunoglobulinas A (IgA) pelos linfócitos B ativados após interação com os LT nos centros germinativos, serve como uma outra linha de defesa no lúmen intestinal, neutralizando as bactérias e prevenindo da invasão de patógenos e toxinas (DAILLIERE et al., 2020).

A imunidade adaptativa da mucosa intestinal envolve os tecidos linfoides associados à mucosa gástrica (GALT), linfócitos foliculares, linfócitos intraepiteliais e uma série de moléculas reguladoras (citocinas, quimiocinas e imunoglobulinas), sendo que a homeostase intestinal depende de um equilíbrio delicado entre os linfócitos T efetores e os linfócitos T reguladores (*T regs*) (FARRE et al., 2020; WANG, ZHU, QIN, 2019). O ambiente anti-inflamatório, mediado por substâncias como AGCC e IL-10, promove a transformação dos linfócitos T intestinais em *T regs*, além de gerar tolerância imune à microbiota intestinal (NGUYEN; ALJAMAEI; STADYK, 2021; YOO et al., 2020; ZHOU et al., 2020). Na eubiose, existe maior proporção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e *T regs* na mucosa intestinal e quando ocorre uma migração para o perfil Th17, sua excessiva ativação pode desencadear doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes, mediada por citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF α (AMOROSO et al., 2020; WANG; ZHU; QIN, 2019). Dessa maneira, o desequilíbrio da resposta imune intestinal resulta em várias desordens inflamatórias, doenças infecciosas, patologias autoimunes e câncer (SUN; FU; ZHOU, 2017).

3.4 DESEQUILÍBRIO DA MICROBIOTA INTESTINAL E O DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS

Existe uma certa dificuldade em definir uma eubiose ideal, já que existe grande variação entre microbiotas intestinais saudáveis dos indivíduos, mas disbiose é o termo utilizado quando há perda do balanço da microbiota com ocorrência de perda de função ou composição (HOOCKS e O'MALLEY, 2017).

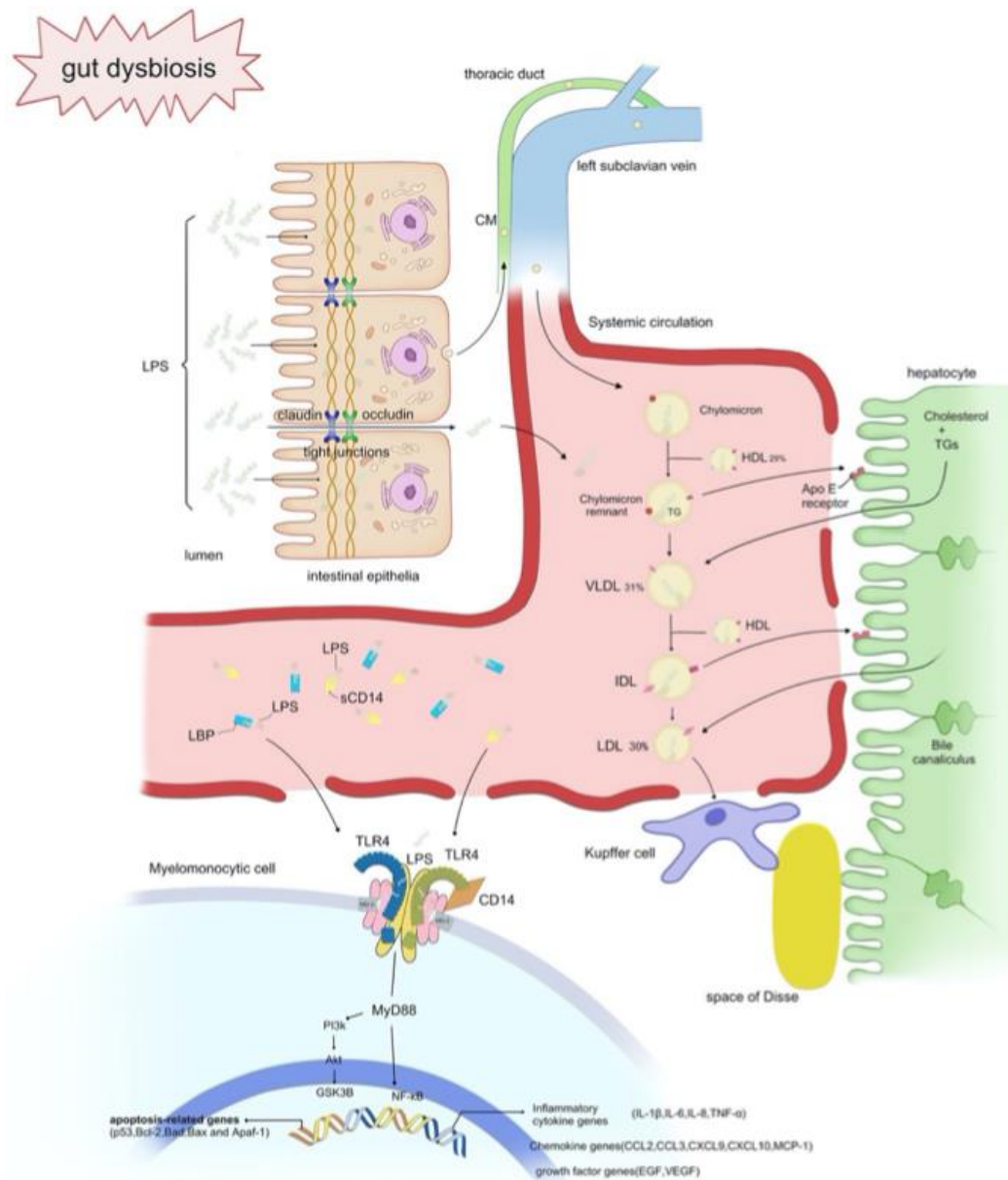
O hospedeiro e a microbiota intestinal possuem uma relação de comensalismo homeostático, porém em situações de desequilíbrio (disbiose), na qual ocorra redução da diversidade ou alterações na composição da microbiota, pode haver o desenvolvimento indesejado de bactérias, alterações anormais e impedimento do

crescimento de outras bactérias, permitindo o surgimento de patologias inflamatórias no intestino, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e outros distúrbios metabólicos (NAVAB-MOGHADAM et al., 2017; FASSATOUI et al., 2019; FERNÁNDEZ et al., 2018; SHEN; OBIN; ZHAO, 2013; MOREIRA et al., 2019; HUANG et al., 2019; TANG; KITAI; HAZEN, 2017; CARICILLI e SAAD, 2014; EVERARD e CANI, 2013).

Uma revisão mostrou o impacto da disbiose na doença inflamatória intestinal, cânceros gástrico e colorretal, fígado gorduroso não alcoólico (FGNA), síndrome do intestino irritável (SII) e infecção por *Clostridium difficile* (ORTIGÃO et al., 2020) e vários estudos nos últimos anos sugeriram que a microbiota intestinal também desempenha um papel importante em doenças como a obesidade, resistência a insulina e diabetes (TILG e MOSCHEN, 2014; EVERARD e CANI, 2013; CARICILLI e SAAD, 2014; NAVAB-MOGHDAM et al., 2017; MOFFA et al., 2019).

Um dos fatores envolvidos no desenvolvimento de doenças a partir da disbiose é o aumento da permeabilidade intestinal, que leva a translocação bacteriana do lúmen para o sangue o que ocasiona incremento de LPS e promove a endotoxemia metabólica (ANHÊ et al., 2021; QIN e ZOU, 2022). Lipopolissacarídeos são endotoxinas produzidas pelas bactérias gram-negativas e compostos por três módulos: um antígeno O (oligossacarídeos) altamente variável, um oligossacarídeo central e um lipídeo A, que alteram o metabolismo normal das células hospedeiras e atuam como toxinas em circunstâncias especiais sendo capazes de desencadear respostas imunes e inflamatórias (FERNANDES, 2005; GOMES; COSTA; ALFENAS, 2017). O intestino é um reservatório gigantesco de lipopolissacarídeos, mas uma vez que este migre para a circulação, atua se ligando a TLR-4 do tecido adiposo, aumentando a secreção de TNF, IL-1 β e IL-6 (Figura 2), citocinas pró-inflamatórias capazes de gerar uma inflamação crônica e induzir resistência insulínica (SALAZAR et al., 2020).

Figura 2 – Processo de translocação de lipopolissacarídeos das células epiteliais intestinais para a circulação e ativação dos receptores semelhantes a toll por produtos microbianos na disbiose



Fonte: QIN e ZOU, 2022(Adaptado)

Gosh e colaboradores (2020) descreveram que o aumento de LPS na circulação pode ser oriunda de declínio das junções de oclusão decorrentes de uma dieta com alto índice de gordura, o qual será absorvido incorporado às micelas e adicionado aos quilomícrons. Além dos mecanismos descritos acima, a produção de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) pode influenciar na permeabilidade intestinal. As bactérias obtêm energia no trato gastrointestinal a partir

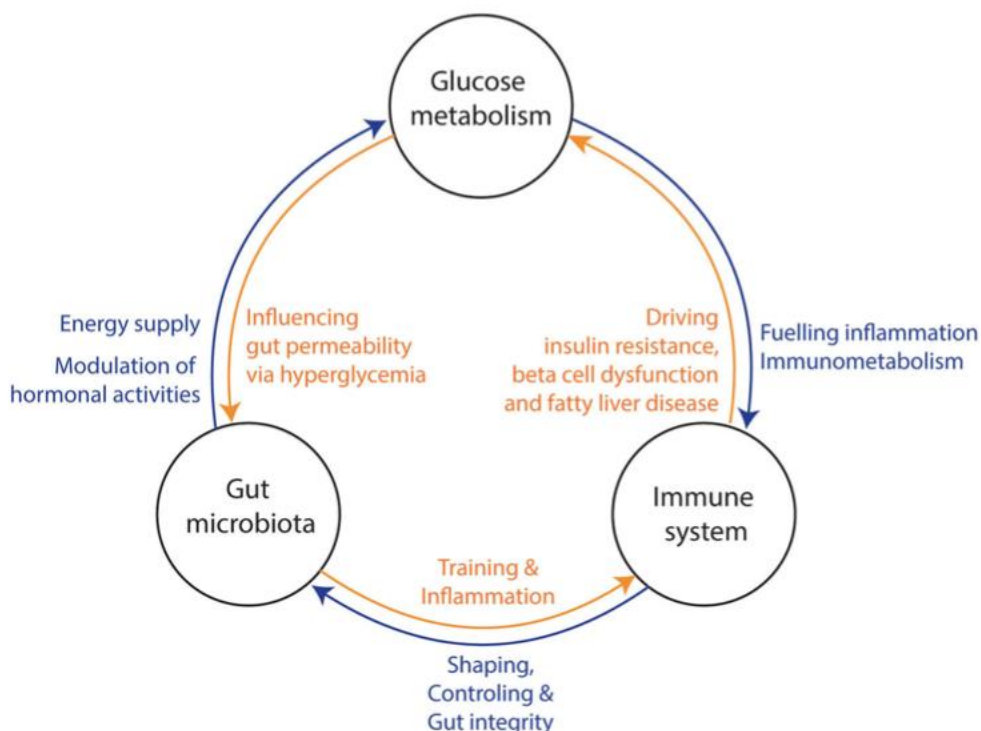
da fermentação de componentes da dieta, como fibras e carboidratos não-digeríveis, o que gera os AGCCs (SALAZAR et al., 2020).

Acetato e propionato possuem efeitos anti-inflamatórios, diminuindo a expressão de TNF, IL-1 e IL-6 e aumento das citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (SALAMONE et al., 2021). Já os níveis de butirato, modulam vias de sinalização inflamatórias, especialmente fator nuclear kappa B (NF-kB) e inibição da histona desacetilase, o que influencia a barreira intestinal e marcadores inflamatórios no intestino e periféricos, sendo sua formação ligada à ingestão e composição das fibras alimentares (BACH et al., 2018). Outro mecanismo relacionado aos ácidos de cadeia curta é o efeito imunomodulador, que age intracelularmente e promove a diferenciação de LT em T reguladores, produtores de citocinas anti-inflamatórias, além de promover a secreção de IgA em células B (SPILJAR et al., 2017; SUN; FU; ZHOU, 2017 *apud* WANG; ZHU; QIN, 2019). O efeito protetivo dos AGCC é dependente do balanço da microbiota, o que é determinado especialmente pela sua composição (SALAZAR et al., 2020)

3.5 MICROBIOTA INTESTINAL, SISTEMA IMUNOLÓGICO E FISIOPATOGENIA DO DIABETES MELLITUS

A alteração da composição da microbiota vem sendo proposta, por alguns autores, como um dos principais fatores na patogênese do diabetes, tanto em modelos animais como em humanos (ABDELLATIF e SARVETNICK, 2019; BIBBÓ et al., 2017; HAN et al., 2018), mas só faz sentido quando analisada sob o ponto de vista de interação da tríade microbiota, sistema imune e vias metabólicas da glicose (Figura 3) (SCHEITHAUER et al., 2020). A microbiota interage com os constituintes da dieta (e os produtos gerados a partir desta) e modula a permeabilidade intestinal, enquanto na disbiose, a translocação de toxinas do lúmen para a circulação ativa a resposta imune, aumentando as citocinas pró-inflamatórias com efeitos negativos sobre os tecidos e gerando resistência à insulina e intolerância a glicose (SALAZAR et al., 2020; SCHEITHAUER et al., 2020).

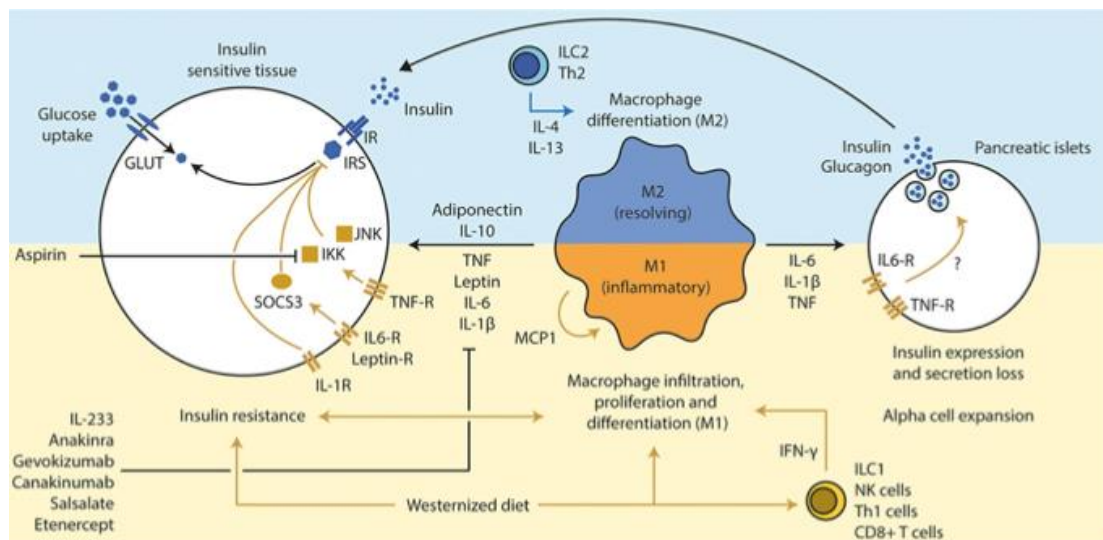
Figura 3 – A microbiota intestinal modula a permeabilidade intestinal o que influencia no metabolismo da glicose, promovendo resistência a insulina e disfunção de células beta pancreáticas.



Fonte: SCHEITHAUER et al., 2020

A consequência da resistência insulínica, na maioria das vezes, é a obesidade que precede a infiltração de macrófagos pró-inflamatórios (BANDER et al., 2020). Estes macrófagos M1, produzem IL-1 β , IL-6 e TNF cujas ações celulares incluem interferência de sinalização da insulina, através da diminuição de moléculas como JNK, IKK e SOCS (Figura 4), tornando os receptores de insulina resistentes ao hormônio e gerando hiperglicemia (SCHEITHAUER et al., 2020). A obesidade aumenta a atividade e proliferação de células Natural Killer (NK), as quais produzem interferon-gama e contribuem para o perfil M1 dos macrófagos, retroalimentando o aumento de secreção das citocinas inflamatórias (WENSVEEN et al., 2015).

Figura 4 – Influência da inflamação na sensibilidade à insulina por ação das citocinas inflamatórias sobre a sinalização intracelular e receptores de insulina.



Fonte: SCHEITHAUER et al., 2020

Outras pesquisas sugerem que a microbiota está relacionada ao desenvolvimento de DM1, por afetar a relação entre citocinas pró e anti-inflamatórias. Em um estudo com administração de bactérias probióticas ocorreu aumento de IL-10, uma citocina anti-inflamatória e o resultado foi a diminuição dos casos de DM1 (CALCINARO et al., 2005) e em outro estudo com a administração de *Lactobacillus johnsonii* ocorreu diminuição dos níveis de estresse oxidativo, também levando a proteção do desenvolvimento do distúrbio (VALLADARES et al., 2010). Em termos de composição da microbiota, em modelo animal com ratos ocorre diminuição da proporção de bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Bryantella*, *Bifidobacterium* e *Turicibacter* em animais que desenvolvem DM1 e aumento de *Bacteroides*, *Eubacterium* e *Ruminococcus*. (HAN et al., 2018). Em humanos também foram observadas mudanças no microbioma intestinal em crianças que desenvolveram DM1, sendo que há aumento de *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* e diminuição de *Bifidobacteria* e de *Prevotella* (ABDELLATIF e SARVETNICK, 2019).

Para o desenvolvimento de DM2, a microbiota parece ter um efeito relacionada a obesidade, que induz a resistência a insulina e a inflamação metabólica (TILG e MOSCHEN, 2015). ESTEVE e colaboradores (2017) descreveram os prováveis mecanismos da associação da obesidade e DM2 com a mudança da microbiota, os

quais incluem mudanças nos genes do hospedeiro, alteração da permeabilidade intestinal, endotoxemia e inflamação. As endotoxinas estão envolvidas crucialmente na DM2, pois uma dieta rica em gordura aumenta o LPS e resulta em endotoxemia, o que também foi observado através da infusão subcutânea de LPS: em ambos os casos ocorreu resistência à insulina (CANI et al., 2007). REMELY e colaboradores (2014) analisaram a abundância de algumas bactérias em pacientes com DM2 e encontraram uma maior relação de *Firmicutes/Bacteoidetes* em pacientes diabéticos, porém uma menor abundância de *Faecalibacterium prausnitzii*. Os pacientes diabéticos têm um decréscimo de bactérias produtoras de butirato como *Roseburia intestinalis* e *F. prausnitzii* e aumento de *Streptococcus mutans* e algumas bactérias no gênero *Clostridium* (MUÑOZ-GARACH; DIAZ-PERDIGONES; TINAHONES, 2016).

Pacientes diabéticos tem mais LPS circulantes que os saudáveis (HAN et al., 2018) e isto associado ao declínio de AGCC, estimula o aumento de citocinas pró-inflamatórias (ALLIN; NIELSEN; PADERSEN, 2015). Dessa maneira, foi observado em estudos recentes com pacientes diabéticos, que alterações de microbiota intestinal induzem destruição da barreira intestinal e endotoxemia, alterando tanto citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea, como outros marcadores inflamatórios plasmáticos de fase aguda (SALGUERO et al., 2019).

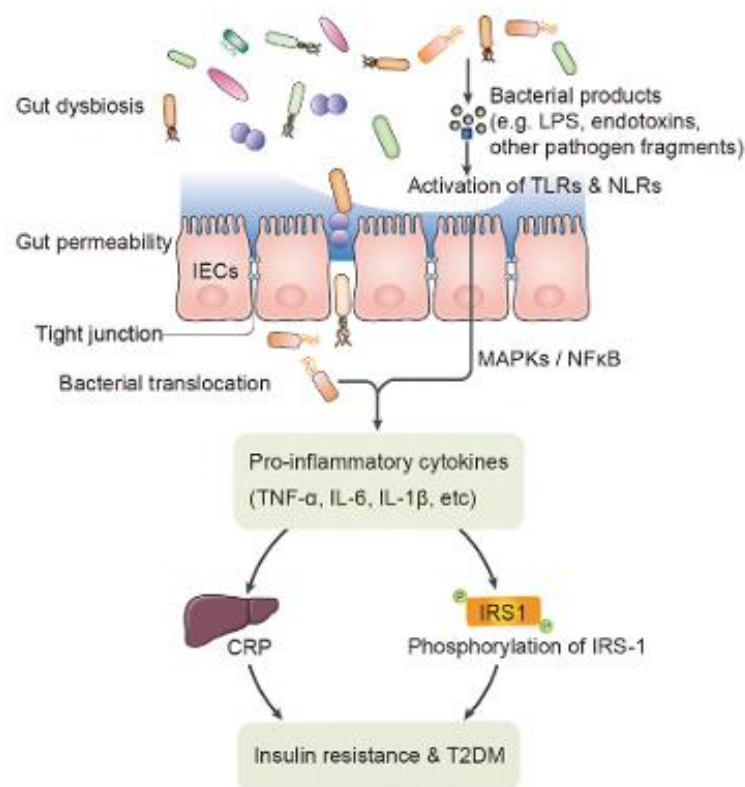
3.6 AVALIAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E IMUNOLÓGICOS NO DIABETES

Inflamação é uma resposta biológica do sistema imune que pode ser desencadeada por patógenos, danos celulares ou compostos tóxicos e a literatura vem buscando estabelecer relações entre a disbiose e marcadores inflamatórios plasmáticos (SCHEITHAUER et al., 2020).

Uma das mais conhecidas proteínas de fase aguda, utilizada como marcador inflamatório positivo, é a Proteína C Reativa que está classicamente ligada a doenças cardiovasculares, tumores, doenças crônicas e inflamações agudas, além de diabetes tipo 2 e obesidade. Ela é produzida pelo fígado em resposta a secreção de IL-6 e IL-1 pelos macrófagos e células T e aumenta rapidamente na circulação, tendo como função imunológica opsonizar os microrganismos para que sejam mais rapidamente

fagocitados (AGUIAR et al., 2019). No que tange a relação de PCR com diabetes, este marcador é conhecido como um preditor independente de DM2, já que vários estudos sobre a interação entre a microbiota, sistema imune e metabolismo de glicose realizaram a quantificação desta proteína e níveis aumentados de PCR foram reportados como tendo associação com resistência insulínica (Figura 5) (BANDER et al., 2020; LAINAMPETCH et al., 2019; SCHEITHAUER et al., 2020)

Figura 5 – O aumento de citocinas pró-inflamatórias após a migração de produtos bacterianos pela mucosa intestinal, estimula a produção de proteína C reativa e participa da geração de resistência insulínica.



Fonte: DING et al., 2021

A ferritina é uma proteína relacionada ao metabolismo do ferro, sequestrando grandes quantidades deste metal da circulação e armazenando-o intracelularmente, especialmente nos hepatócitos, porém sob ação de citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF é liberada e pode ser clinicamente usada como um marcador positivo de fase aguda (GOUVEIA et al, 2014; LIU et al., 2020). O excesso de ferro induz a produção de radicais livres de oxigênio, sendo que o stress oxidativo pode promover a falência

da célula β -pancreática e o agravamento da insulinoresistência (MOMENI et al., 2015).

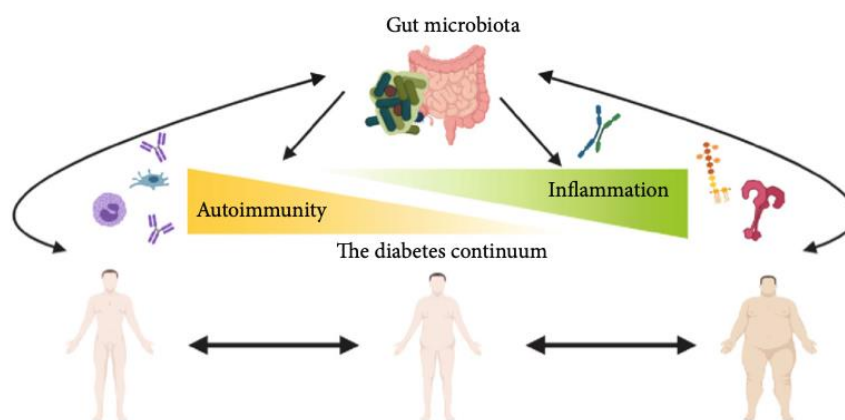
A albumina é uma proteína presente no soro humano, sintetizada pelo fígado e degradada pelos músculos, fígado e rins, sendo considerada um marcador negativo de processo inflamatório (URQUIZO AYALA; COARITE; YUCRA, 2019). Segundo CHANG e colaboradores (2019), uma menor concentração de albumina circulante no plasma é um preditor de processo inflamatório e DM2.

Citocinas são moléculas sinalizadoras produzidas pelas células imunes, cuja função é interagir e afetar numerosos processos relacionados à imunomodulação, sendo IL-1 β , IL-6 e TNF, as citocinas mais relacionadas ao processo inflamatório (BANDER et al., 2020). A interleucina 1 β tem sido estudada no desenvolvimento do DM, como por exemplo na sua infiltração nas ilhotas pancreáticas em diabéticos, o que cronicamente pode levar a falha deste tecido (SCHEITHAUER et al., 2020), além de estar relacionada com a resistência à insulina (DING et al., 2021). Ela vem sendo quantificada tanto para compreensão dos mecanismos que relacionam as alterações de microbiota intestinal e o desenvolvimento de diabetes (YOO et al., 2020), como no papel de marcador imunológico e inflamatório nas tentativas de tratamento da disbiose (AMOROSO et al., 2020; SCHEITHAUER et al., 2020).

Existem outros marcadores inflamatórios, menos “clássicos” que podem ser avaliados no diabetes. Recentemente, o sistema complemento (SC) vem sendo estudado no desenvolvimento do DM1, por acelerar processos autoimunes órgão-específicos e no DM2 como contribuinte do desenvolvimento da resistência à insulina, além de estar envolvido nos mecanismos patogênicos das complicações micro e macrovasculares (AJJAN e SCHROEDER, 2019). O SC é um conjunto de proteínas, importante parte da resposta inata, que medeia opsonização, inflamação e destruição direta do patógeno, sendo a fração C5a o mais importante ativador da resposta inflamatória, mediada por histamina e mastócitos (LI et al., 2021).

Alterações de microbiota intestinal estão relacionadas com inflamação, mas também com doenças autoimunes (Figura 6), o que contribui para o aparecimento dos dois tipos de DM mais comuns - DM1 e DM2 (MOFFA et al., 2019).

Figura 6 - Alteração da microbiota intestinal apresenta relação com a inflamação e a autoimunidade, os quais são fatores desencadeantes e relacionáveis ao diabetes.



Fonte: MOFFA et al., 2019

O fator reumatoide representa autoanticorpos capazes de reagir com determinados epítomos da porção do fragmento cristalizável da IgG e por isso, é encontrado em muitas pessoas com uma ampla variedade de doenças autoimunes, além da artrite reumatoide (GOELDNER et al., 2011). Foi associado com uma maior prevalência de manifestações articulares em pacientes diabéticos sem artrite reumatoide, mas não apresentou relação com a duração do diabetes (RAJ et al., 2014).

Anticorpos antinucleares podem ser biomarcadores ou estarem diretamente envolvidos em complicações crônicas do diabetes, uma vez que são produzidos em resposta à necrose celular ou apoptose celular (RAJAB et al., 2020). Segundo LITWINCZUK-HAJDUK e colaboradores (2016), a determinação de FAN em indivíduos diabéticos pode ser utilizado como um marcador para isolar o grupo de pacientes com risco de desenvolver complicações diabéticas. Outros biomarcadores autoimunes como anticorpos anti-GAD e anticorpos anti-insulina 2 podem ser mais específicos na associação com o desenvolvimento de diabetes (FANG et al., 2021).

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE PESQUISA

Estudo transversal, descritivo e analítico com quantificação de lipopolissacarídeos plasmáticos, marcadores inflamatórios e marcadores imunológicos comumente utilizados em prática clínica e de pacientes diabéticos e não diabéticos e sua correlação com parâmetros bioquímicos e antropométricos

4.2 COLETA DE AMOSTRAS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

Foram selecionados para participação, indivíduos que procuravam espontaneamente o laboratório de análises clínicas parceiro da pesquisa (ANEXO A), que possuíam exames laboratoriais de glicose e hemoglobina glicada A1c (HbA1c) e concordavam em participar desta pesquisa, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - ANEXO B) no momento da coleta.

As amostras de sangue total e soro foram coletadas pelo Laboratório Gimenes e separadas para esta pesquisa, somente após o término do processamento de todos os exames laboratoriais que o paciente havia solicitado.

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, de 0 a 99 anos, entre os meses de setembro de 2021 a maio de 2022, que não fizeram antibioticoterapia nos 2 meses que antecederam a coleta e que estavam em jejum no momento da coleta do soro. Foram classificados como pacientes não-diabéticos os que apresentaram níveis normais de glicemia de jejum (<126 mg/dL) ou HbA1c ($< 6,0\%$), de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (2021). Não houve distinção entre pacientes DM tipo 1 e tipo 2.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os indivíduos cuja classificação em diabético ou não diabético fosse inconclusiva a partir dos dados disponíveis e aqueles cujo material biológico fosse insuficiente para processamento desta pesquisa.

Os participantes incluídos neste estudo totalizaram 77 indivíduos, dos quais foram excluídos sete por amostra insuficiente, dois por uso de antibióticos (descoberto

a *posteriori*) e um por não possuir o exame de glicose quando consultado o banco de dados do laboratório.

4.4 LOCAIS DA PESQUISA

As amostras de soro e sangue foram armazenadas sob refrigeração no Laboratório Gimenes, sediado em Joinville-SC, até a realização dos exames de hemoglobina glicada A1c e glicemia de jejum. Após isso, os materiais biológicos foram encaminhados para realização dos parâmetros bioquímicos e imunológicos e posterior armazenagem sob congelamento (-20°C) no Laboratório de Análises Clínicas da Univille (ANEXO C). O transporte foi realizado através de caixas térmicas para material biológico com temperatura controlada entre 2 a 8°C. As amostras foram armazenadas sob congelamento (-20°C) somente até a realização das análises. A guarda esteve sob responsabilidade da pesquisadora Heidi Pfützenreuter Carstens.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS

Aos participantes foram questionadas informações sobre peso, altura e medicamentos utilizados. O estado nutricional foi classificado pelo IMC, com base nos pontos de corte propostos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2022), sendo peso normal IMC $>18,5$ e < 25 kg/m² sobrepeso IMC ≥ 25 kg/m² e < 30 kg/m² e obesidade para IMC ≥ 30 kg/m² sem distinção entre DM1 ou DM2. Os dados foram planilhados e mantidos digitalmente pela ferramenta Microsoft Excel ® com garantia do sigilo e após 5 anos serão excluídos de dispositivos digitais e destruídos.

4.6 AVALIAÇÃO PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS

Os valores de hemoglobina glicada A1c e glicemia foram adquiridos através do banco de dados do Laboratório Gimenes. O método utilizado para realização do exame HbA1c é cromatografia líquida de alta eficiência -HPLC e a glicemia é realizada por automação ADVIA 1800 Siemens ®, por colorimetria.

Para os marcadores inflamatórios, a dosagem de albumina sérica foi realizada através de teste colorimétrico (Labtest®), a Proteína C Reativa foi quantificada por

imunoturbidimetria, (PCR Turbilátex Biotécnica®) e a ferritina por automação laboratorial ABBOTT ARCHITECT® (em parceria com o Laboratório Gimenes). A sensibilidade analítica do teste de PCR era de 1,92 mg/dL e as amostras com valores abaixo deste limite foram reconsideradas para o limite mínimo de detecção.

A quantificação da IL- 1 β , IL-10 e C5a foi realizada por ensaio imunoenzimático do tipo sanduíche (ELISA), através dos kits comerciais 'Human IL-1B (Interleukin 1 Beta) ELISA – Elabscience®', 'Human IL-10 ELISA – Sigma Aldrich®' e 'Human C5a ELISA Sigma-Aldrich®', respectivamente.

A semi-quantificação do fator reumatoide (FR) foi realizada por aglutinação indireta, através de kit comercial Imuno-Látex FR WAMA® e o teste de Fator antinuclear (FAN) foi realizado por imunofluorescência indireta com o kit ANA-HEP2 Wama®.

A quantificação de lipopolissacarídeos plasmáticos foi realizada pelo kit comercial 'LPS ELISA Kit - FineTest®' por ensaio imunoenzimático competitivo.

Todos os testes passaram previamente por controle de qualidade, realizados de acordo com as indicações de cada fabricante.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabelados pelo programa Microsoft Excel®. As médias, desvio-padrão e análises estatísticas foram realizados pelo programa GraphPad Prism® 7, com níveis de significância estabelecidos em $p < 0.05$. Para comparação entre as médias, foi utilizado o Test T *Student* e para avaliação da frequência do Fator Reumatoide nos grupos estudados foi utilizado o Teste de Qui-Quadrado. Foram calculadas as correlações entre o IMC, níveis de HbA1c e marcadores inflamatórios entre pelo coeficiente de correlação de Pearson.

4.8 ANÁLISE CRÍTICA DE RISCOS E BENEFÍCIOS

As amostras utilizadas nesta pesquisa foram disponibilizadas pelo Laboratório Gimenes e eram de pacientes que foram até o laboratório de maneira voluntária para realização de exames laboratoriais com requisições médicas e/ou particulares. Portanto, os riscos aos quais os participantes da pesquisa foram expostos são considerados mínimos. Os participantes não obtiveram benefício direto, pois não

foram gerados resultados individualizados relevantes para qualquer conduta clínica. Todos os procedimentos laboratoriais e análises foram realizados conforme normas de biossegurança e os manipuladores usaram equipamentos de proteção individual (EPI's) e procedimentos padrão visando minimizar os riscos de acidentes. Todo material descartado derivado do processamento das amostras, considerado como possível infectante, foi esterilizado por autoclavação e, a seguir, recolhido pela Engepasa, empresa responsável pela coleta do lixo hospitalar em Joinville.

4.9 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIVILLE, sob o parecer 4.927.529 (ANEXO D). O banco de dados necessário à pesquisa, contendo informações como tipo de amostra biológica, data de amostragem, resultados sorológicos e imunológicos, entre outros, foi criado e utilizado exclusivamente para este fim e terão seus dados extraviados após 5 anos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados no presente estudo 33 pacientes não-diabéticos e 34 diabéticos. A idade variou entre 12 e 91 anos, com uma média geral de 52 anos, sendo significativamente maior ($p= 0,009$) no grupo de pacientes diabéticos, no qual apenas um paciente apresentou menos de 40 anos e a metade deles era idoso (>60 anos).

Com relação ao gênero, foram 39 mulheres (58,2%) e 28 homens (41,8 %), com maior número de mulheres em ambos os grupos estudados. A comparação entre os grupos para dados epidemiológicos, IMC, glicemia de jejum e hemoglobina glicada A1c estão descritos na Tabela 1. Foram encontrados níveis significativamente elevados de HbA1c a glicemia de jejum no grupo diabético, conforme esperado.

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes pesquisados.

	Não-Diabéticos (Média e desvio padrão)	Diabéticos (Média e desvio padrão)
Total de participantes	33	34
Feminino (%)	60,6	55,9
Masculino (%)	39,4	44,1
Idade (anos)	45,6 (19,1)	59,5 (14,1) *
IMC	24,7 (4,9)	30,1 (3,7) **
Glicemia jejum (mg/dL)	86 (7,7)	160 (55,3) **
Hemoglobina glicada A1c (%)	5,29 (0,37)	7,80 (1,86) **

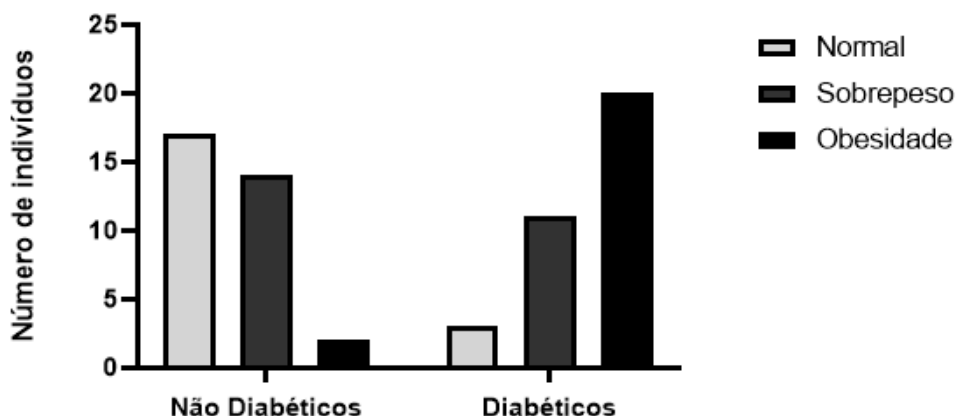
* $p = 0,0009$. ** $p < 0,0001$

Fonte: o autor

Com relação ao IMC, no grupo de pacientes não-diabéticos apenas dois pacientes apresentavam obesidade, 14 sobrepeso e 17 estavam com o índice normal, mas no grupo de diabéticos 91% dos pacientes apresentavam sobrepeso ou obesidade (Gráfico 1). A média do IMC foi significativamente maior ($p < 0,001$) no grupo dos pacientes diabéticos.

No grupo de não-diabéticos, 60% das mulheres possuíam IMC normal, enquanto a maioria dos homens (54%) apresentaram sobrepeso. No grupo dos diabéticos, a distribuição dos gêneros se mostrou semelhante naqueles classificados como tendo sobrepeso, mas havia maior número de mulheres obesas (63%) do que homens (54%).

Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes de acordo com o índice de massa corporal



Fonte: o autor.

Em 2019, o número de pessoas que possuíam diabetes do mundo foi estimado em 463 milhões e a progressão deste número sugere que em 2030 serão 578 milhões (SAEEDI et al., 2019). O risco de desenvolvimento de diabetes é o dobro em pacientes que possuem aumento moderado de peso e a incidência de diabetes, está relacionada à duração e gravidade da obesidade (BOYKO et al., 2000).

A associação entre IMC elevado e diabetes, especialmente diabetes tipo 2, é bem estabelecida na literatura e mesmo não sendo o melhor preditor para a patologia, é um indicador atraente para rastreamento de diabetes, pois é de fácil verificação (WEI et al., 2019). Neste estudo, também foi observado o maior IMC em pacientes diabéticos e pelo perfil de idade deste grupo parece estar associado ao diabetes tipo 2.

Nas últimas décadas, os hábitos alimentares mudaram e os alimentos ricos em gordura, açúcares e industrializados estão superando as dietas ricas em fibras, o que leva à microbiota intestinal modificada como resposta a esses novos hábitos e a observação de maiores IMC na população em geral (MOFFA et al., 2019). A ingestão de alimentos ricos em gordura são importantes moduladores da microbiota e aumentam a endotoxemia, que uma vez instalada é considerada um fator causador de inflamação subclínica e pode gerar doenças crônicas (MOREIRA, et al., 2012; CANDIDO, BRESSAN; ALFENAS, 2018)

A prevalência de diabetes é maior em pacientes com mais idade e com o aumento da expectativa de vida associado a mudanças no estilo alimentar, a

tendência é que o número de pessoas diabéticas aumente com o passar dos anos (SUN et al., 2022). No Brasil, uma pesquisa com 7.519 indivíduos observou associação de DM com a idade, sendo que há aumento da prevalência em pacientes mais velhos (SIQUEIRA et al., 2020), o que também foi observado no presente estudo.

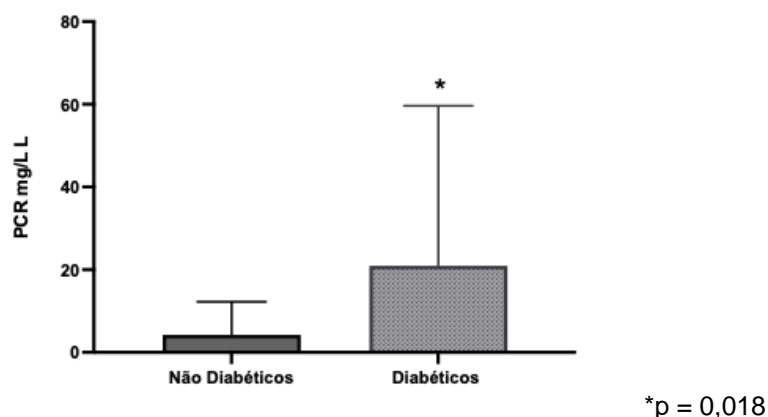
Em estudo brasileiro de MALTA e colaboradores (2019), a prevalência de diabetes foi maior no sexo feminino e naqueles com idade maior que 30 anos, o que corrobora com o presente estudo com relação ao gênero. Outros estudos brasileiros também relatam maior proporção de mulheres diabéticas, porém o crescimento da prevalência é maior em homens que em mulheres (30% contra 20%) e estimativas mundiais relatam equivalência entre os gêneros (REIS et al., 2022; SANTOS et al., 2019; SUN et al., 2022). Ainda é válido ressaltar, que as mulheres diabéticas quando comparadas ao sexo masculino, tem maior probabilidade de desenvolver complicações, entre elas doenças cardíacas, renais, depressão e ansiedade, devido a ação hormonal (KAUTZKY-WILLER, HARREITER, PACINI, 2016).

Os resultados observados em pacientes diabéticos na cidade de Joinville corroboram com a maior parte dos estudos, com maior IMC em diabéticos, maior número de mulheres diabéticas e média de idade superior no grupo dos diabéticos.

Marcadores inflamatórios

Na análise da Proteína C Reativa (n=67), a quantificação média foi de 4,20mg/L para o grupo de não-diabéticos, o que está dentro dos valores considerados normais desta proteína de fase aguda (valores referencias: até 6mg/L). Apenas 4 pacientes deste grupo tiveram PCR acima do valor referencial. Em contrapartida, o valor médio de PCR para os pacientes diabéticos foi de 20,91mg/L com 16 pacientes excedendo o limite. Esta diferença entre os valores médios foi significativa (Gráfico 2).

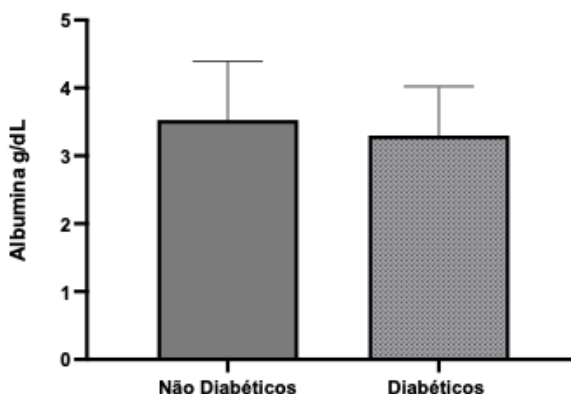
Gráfico 2 – Valores médios de proteína C reativa entre os indivíduos estudados



Fonte: o autor

A média da albumina quantificada para o grupo não-diabético foi de 3,53g/dL e para o grupo de diabéticos de 3,30 g/dL. Valores normais estão compreendidos entre 3,5 e 5,2 g/dL. Apesar da média superior no grupo controle, a diferença não apresentou significância (Gráfico 3).

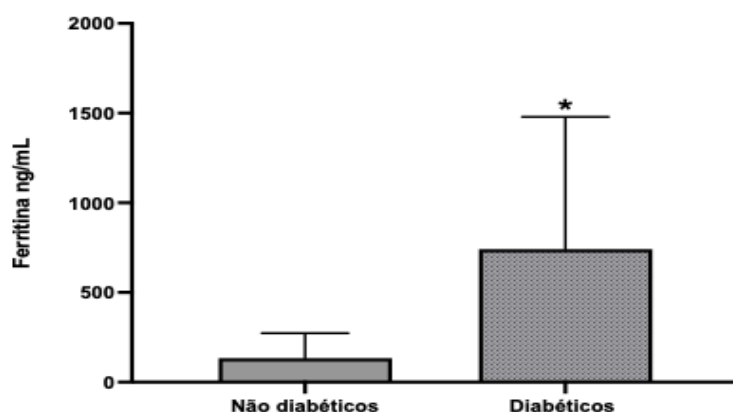
Gráfico 3 - Comparação dos valores médios de albumina entre os grupos de estudo.



Fonte: o autor

Com relação à ferritina, o grupo de pacientes não-diabéticos apresentou média de 147,6 ng/mL e para o grupo dos diabéticos, a média apresentou-se significativamente maior ($p = <0,0001$), sendo de 611,83 ng/mL (Gráfico 4). Segundo os valores de referência, quantificações entre 21,81 e 274,66 ng/mL para os homens e 4,63 e 204,00 ng/mL para as mulheres, são consideradas normais.

Gráfico 4 - Comparação dos valores médios de ferritina entre os grupos de estudo.



*p < 0,0001

Fonte: o autor

Quando comparadas as alterações de PCR e Ferritina conjuntamente, não houve elevação coincidente em todas as amostras. No grupo dos não-diabéticos, em quatro casos houve elevação da ferritina não acompanhada do PCR. Já nos pacientes diabéticos, seis obtiveram esse mesmo perfil, cinco apresentaram ambos os marcadores inflamatórios elevados e uma amostra apresentou apenas PCR fora dos limites normais. Das amostras em pacientes diabéticos que possuíam quantificação da ferritina, apenas 4 delas não apresentaram nenhum marcador alterado. As interrelações considerando todos os marcadores inflamatórios estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Perfil e interrelação entre os marcadores inflamatórios alterados nos grupos estudados

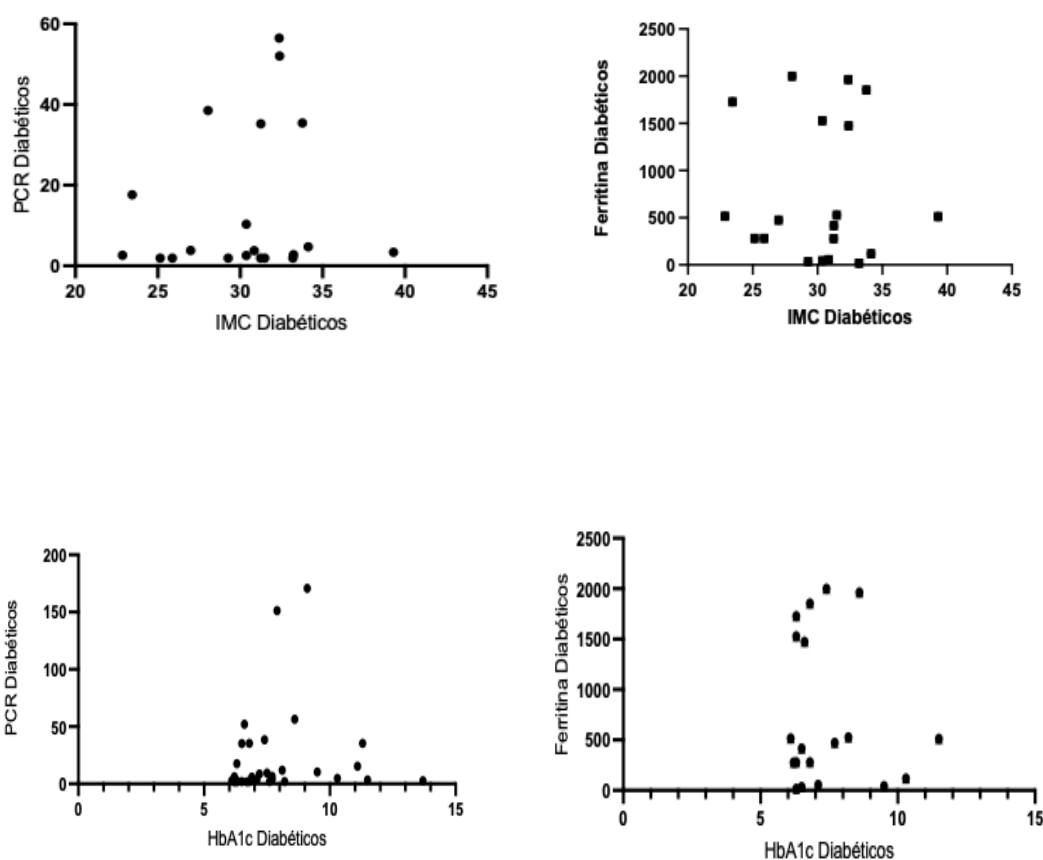
	Não-Diabéticos n (%)	Diabéticos n (%)	
Somente PCR elevado	2 (6,1)	1 (2,9)	
Somente Ferritina elevada	4 (12,1)	6 (17,6)	
Somente Albumina diminuída	10 (30,3)	2 (5,9)	
PCR e Ferritina aumentadas	0	5 (14,7)	
Ferritina e Albumina alteradas	1 (3,0)	6 (17,6)	
PCR e Albumina alteradas	2 (6,1)	5 (14,7)	
Todos os parâmetros alterados	0	5 (14,7)	
Total de pacientes com alterações	19 (57,6)	30 (88,2)	*

* p <0,001

Fonte: o autor

Com relação a análise de correlação entre IMC e PCR ou Ferritina, os valores não mostraram significância ($p=0,55$ e $p=0,88$, respectivamente), assim como na correlação entre HbA1c e os mesmos marcadores ($p=0,511$ e $p=0,598$). Os dados estão demonstrados no gráfico 5.

Gráfico 5 - Análises de correlação entre as variáveis 'índice de massa corporal' e 'hemoglobina A1c' e os marcadores inflamatórios 'proteína C reativa' e 'ferritina'



Fonte: o autor

A proteína C reativa encontra-se acentuadamente elevada em doenças inflamatórias e infecciosas (AGUIAR, et al., 2019). Um estudo de 1999, já descrevia a associação significativa entre os níveis da PCR e a hiperglicemia em pacientes diabéticos tipo 2, os quais apresentaram um resultado médio de PCR de 91 mg/L e os pacientes controle um valor de 4,7 mg/L (RODRIGUEZ-MORAN et al., 1999). Em outro estudo, de LIMA e colaboradores (2007), 59% dos pacientes com hipertensão e diabetes *mellitus* apresentaram PCR superiores a 3 mg/L, diferentemente do grupo

controle. Elimam e colaboradores (2019), avaliaram vários marcadores inflamatórios em pacientes com DM2, incluindo ferritina e proteína C reativa e observaram forte associação da inflamação e o controle glicêmico (Hba1c *versus* ferritina ou PCR), sugerindo que a inflamação desempenha um importante papel na patogênese do diabetes. Além disso, vários marcadores inflamatórios têm se mostrado úteis na avaliação do risco de desenvolver DM e suas complicações e apesar de não poderem ser considerados como causa primária no mecanismo de desenvolvimento do diabetes, são importantes na avaliação das possíveis causas (MUZUROVIC et al., 2021). Outro ponto importante é que a elevação da PCR, assim como IMC e níveis de HbA1c, já foram descritos como variáveis associadas a complicações do diabetes (AULICH et al., 2019). Por outro lado, há estudos que sugerem o uso de probióticos para diminuir os marcadores inflamatórios positivos, como o PCR (DING et al., 2021) e devem ser discutidos como alternativas na prática médica.

Com relação a albumina, uma menor concentração circulante deste marcador é um preditor de processo inflamatório e DM2, o que foi demonstrado num estudo com pacientes diabéticos comparados a um grupo de pacientes não-diabéticos e que obteve os valores 36,2g/L e 41,8g/L de albuminemia, respectivamente (CHANG et al., 2019; RODRIGUEZ-MORAN et al., 1999). Por outro lado, um estudo desenvolvido em 2013, concluiu que a resistência à insulina pode modular os níveis de albumina sérica positivamente (BAE et al., 2013). Os resultados obtidos nesta pesquisa, corroboram com os autores, onde os pacientes não diabéticos apresentaram concentração plasmática de albumina superior aos pacientes diabéticos, porém sem associação significativa.

Diversos estudos apontam que a ferritina é um fator de risco para o desenvolvimento de diabetes, a qual eleva-se significativamente em pacientes com diabetes e em pacientes com complicações microvasculares do diabetes (METWALLEY et al., 2021; LIU et al., 2020; ZHANG et al., 2021). Os resultados obtidos corroboram com essa hipótese, pois os pacientes diabéticos apresentaram uma média expressivamente maior de ferritina sérica comparado ao grupo controle e 73% dos pacientes diabéticos estavam com este marcador elevado, seja isoladamente ou em conjunto com outro marcador inflamatório.

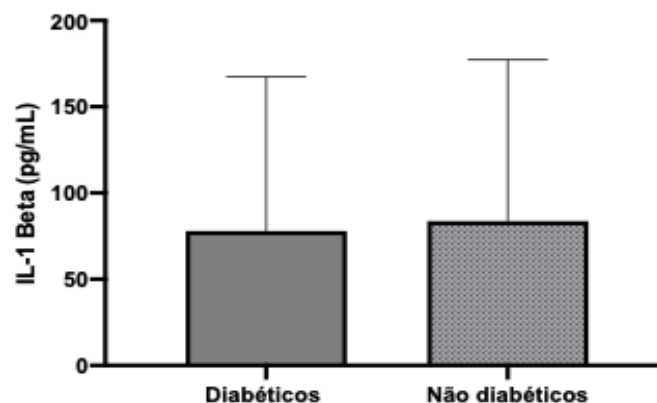
Marcadores inflamatórios comumente utilizados na prática clínica, podem servir como alertas para risco ou presença de diabetes, já que os resultados apresentados mostraram que 88% dos pacientes diabéticos, apresentaram algum marcador

inflamatório alterado, seja isoladamente ou em conjunto. Os resultados obtidos no presente estudo confirmaram os dados prévios sobre as proteínas de fase aguda, porém é a primeira vez que estes biomarcadores são explorados em pacientes diabéticos em associação a marcadores imunológicos na cidade de Joinville.

Marcadores imunológicos

A quantificação de IL-1 β apresentou valores médios de 77,81 pg/mL para o grupo de pacientes não-diabéticos e 83,70 pg/mL para os pacientes diabéticos (Gráfico 6) e apesar de o grupo diabético apresentar maior valor de Interleucina 1 β , não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,793$).

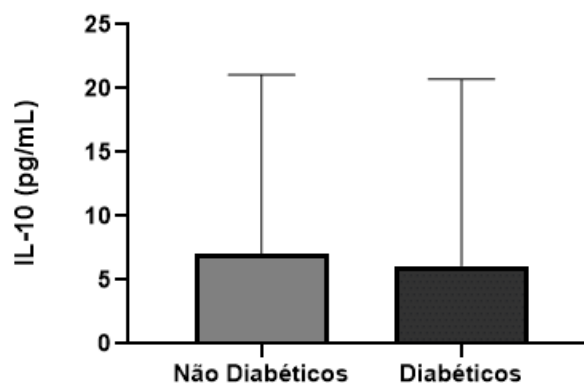
Gráfico 6 - Comparação dos valores médios de IL-1 β entre os grupos de estudo.



Fonte: o autor

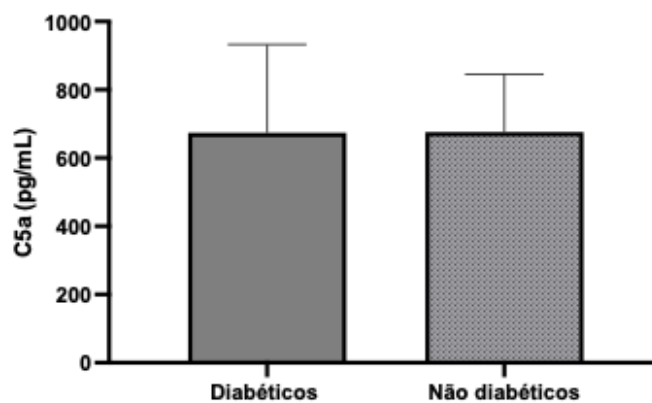
A dosagem média de IL-10 foi de 7,07 pg/mL no grupo de não-diabéticos e de 6,11 pg/mL no grupo dos diabéticos (Gráfico 7), não apresentando resultados significativos na comparação entre as médias quantificadas ($p=0,786$).

Gráfico 7 - Comparação dos valores médios de IL-10 entre os grupos de estudo



A análise de C5a mostrou medias semelhantes ($p=0,970$) entre os grupos estudados com 674,02 pg/mL para o grupo de diabéticos e 676,00 para o grupo de não diabéticos (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Comparação dos valores médios de C5a entre os grupos de estudo.



Fonte: o autor

Com relação ao Fator Reumatoide, entre os pacientes diabéticos houve maior número de resultados reagentes (Tabela 3), com títulos variando entre 1:1 e 1:16. A presença deste marcador foi significativamente maior em pacientes diabéticos ($p = 0,046$)

Tabela 3 - Distribuição dos resultados para o marcador imunológico Fator Reumatoide

	Não-Diabéticos n (%)	Diabéticos n (%)
Reagente	1 (3,0)	6 (17,6) *
Não Reagente	32 (97,0)	28 (83,4)

Fonte: o autor

Foram realizados 37 testes de fator antinuclear, com o grupo de pacientes não-diabéticos apresentando 3 pacientes com FAN positivo (dois padrões nuclear homogêneo 1:40 e um padrão nuclear pontilhado grosso 1:40) e apenas 1 paciente diabético obteve FAN reagente (Padrão nucleolar 1:80).

As citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , são produzidas de forma exacerbada quando níveis de LPS estão aumentados na corrente sanguínea, assim como marcadores inflamatórios de fase aguda, o que já foi observado em pacientes diabéticos (SALGUERO et al., 2019). Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias podem contribuir para a resistência à insulina, aumentando a relação de fosforilação de receptores do substrato 1 de insulina (IRS1), afetando células beta pancreáticas e limitando o acesso da insulina em certos tecidos (CANI et al., 2019; CHEN et al., 2015; DING, et al., 2021). Um estudo que avaliou a característica da microbiota intestinal e mensurou IL-1 β , encontrou associação significativa da elevação desta citocina em pacientes diabéticos (FANG et al., 2021) A elevação de IL-1 β encontrada em pacientes diabéticos no presente estudo corrobora com a literatura supracitada, apesar de não ter apresentado diferença significativa.

Muitas citocinas são associadas ao desenvolvimento de síndrome metabólica, mas poucos estudos relacionam a ligação delas com a alteração da microbiota intestinal. Alguns autores observaram a relação da intervenção da dieta, uso de probióticos e prebióticos ou transplante de microbiota com citocinas e foi observada redução de IL-1 β após o uso de oligofrutose (CANI et al., 2009; SCHEITHAUER, et al., 2020). LIAQAT e colaboradores (2021) avaliaram em animais, o uso de microbiota humana sintética e dieta rica em gordura e seu papel na indução de DM2 e observaram que certos tipos de bactérias aumentaram significativamente o peso dos animais e os níveis de citocinas pró-inflamatórias, o que sugere a relação entre dieta e microbiota na progressão do diabetes.

Na eubiose, há maior proporção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 que está relacionada a tolerância imune e por isso em pacientes diabéticos pode se

observar valores diminuídos desta citocina (NGUYEN; ALJAMAEI; STADYK, 2021; YOO et al., 2020; ZHOU et al., 2020). Apesar disto, no presente estudo a diminuição da IL-10 em pacientes diabéticos não foi significativa.

A fração C5a do sistema complemento tem sido reportada como um estimulante do infiltrado linfocitário em danos teciduais e por induzir fatores pro-inflamatórios como IL-1 β , IL-6 e TNF, além de estar fortemente associada a ativação anormal em fibroses renais de pacientes diabéticos (LI et al., 2014). Uma revisão de 2020, descreveu que a ativação de C5 causa disbiose intestinal por limitar a produção dos AGCC (LI et al., 2021). No presente estudo, a C5a não apresentou diferença entre os grupos estudados.

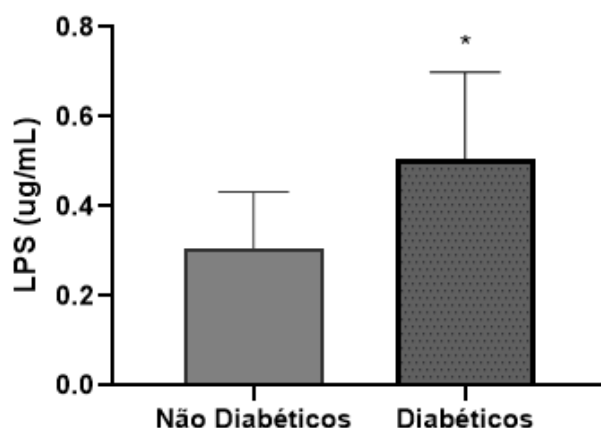
Um estudo com 192 pacientes indianos, observou elevados níveis de FR em idosos diabéticos (RAJ et al., 2014). O diabetes tipo 2 está associado a inflamação crônica de baixo grau, que pode desencadear a progressão de outras doenças inflamatórias, sendo que LU e colaboradores (2014), sugeriu que a resistência à insulina estava intimamente associada à presença de fator reumatoide. Os resultados obtidos neste estudo, ainda que de maneira tímida suportam esta hipótese, pois no grupo diabético, pôde-se perceber um aumento na prevalência de fator reumatoide positivo em comparação ao grupo não diabético.

A determinação de FAN pode ser utilizado como um marcador para rastrear pacientes com risco de desenvolver complicações diabéticas (LITWINCZUK-HAJDUK et al., 2016), mas no presente estudo o pequeno número de amostras avaliadas e a falta de informações sobre complicações nos pacientes do grupo diabético, não permitiu resultados extrapoláveis neste contexto.

Lipopolissacarídeos

A quantificação de lipopolissacarídeos plasmáticos apresentou valores médios de 0,307 ug/mL para o grupo de pacientes não-diabéticos e 0,507 ug/mL para os pacientes diabéticos (Gráfico 9), o que demonstrou média significativamente maior ($p < 0,0001$) nestes pacientes.

Gráfico 9 - Comparação dos valores médios de lipopolissacarídeos entre os grupos de estudo



*p < 0,0001

Fonte: o autor

O aumento da permeabilidade intestinal favorece a translocação de lipopolissacarídeos do lúmen para a corrente sanguínea, causando endotoxemia metabólica (ANHÊ et al., 2021). Uma barreira intestinal saudável permite a passagem de água, nutrientes e compostos bioativos e evita a passagem de substâncias nocivas como antígenos microbianos, mas diversos estudos em animais indicam que o DM favorece a translocação de endotoxinas, especialmente lipopolissacarídeos, levando ao seu aumento na concentração na corrente sanguínea (GOMES; COSTA; ALFENAS, 2016). O reconhecimento do antígeno LPS pelos *Toll-Like receptors* desencadeia reações pró-inflamatórias e distúrbios metabólicos e vários TLRs têm sido descritos com envolvimento no mecanismo para gerar inflamação e resistência à insulina (MORAES et al, 2014). Um estudo recente mostrou a associação da elevação de PCR e LPS em pacientes com DM2 (SALGUERO et al., 2019), o que também pode ser demonstrado neste estudo de pacientes de Joinville e a elevação deste marcador também vem sendo associada a complicações do diabetes *mellitus*, como a retinopatia diabética (QIN e ZOU, 2022).

RESULTADOS

Conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente da Univille, este capítulo deve ser apresentado também na forma de artigos científicos.

ARTIGO 1 - foi publicado como Capítulo de Livro “**Avaliação da microbiota intestinal de pacientes diabéticos em Joinville: reflexos em marcadores inflamatórios e imunológicos**” do livro “Ciências Farmacêuticas integradas ao processo de cuidado em saúde 2” em maio de 2022. ISBN e DOI 10.22533/at.ed.07022180519

ARTIGO 2 - *Endotoxemia and elevation of inflammatory markers in brazilian diabetic patients* – apresentado de acordo com as normas do periódico *DIABETES & METABOLIC SYNDROME: CLINICAL RESERACH & REVIEWS* para o qual foi submetido.

ENDOTOXEMIA AND ELEVATION OF INFLAMMATORY MARKERS IN BRAZILIAN DIABETIC PATIENTS

Heidi P. Carstens^{a*,b}, Andreza R. Silva^c, Bruna R. Pinheiro^c, Amanda Fagundes^c, Heloisa G. Pereira^c, Gilmar S. Erzinger^{b,d}.

a Master in Health and Environment. Health Area of University of the Region of Joinville. Rua Paulo Malshitski, 10, Joinville, SC, 89219-710, Brazil

b Program of Postgraduate in Health and Environment. University of the Region of Joinville. Rua Paulo Malshitski, 10, Joinville, SC, 89219-710, Brazil.

c Student. Graduate Program in Pharmacy, University of the Region of Joinville. Rua Paulo Malshitski, 10, Joinville, SC, 89219-710, Brazil.

d PhD in Pharmaceutical Biochemistry Technology

*Corresponding author: heidip.carstens@gmail.com

ABSTRACT

Aims

The aim of this study was to evaluate endotoxemia and inflammatory markers in Brazilian diabetic and non-diabetic patients.

Methods

Sixty-seven individuals aged between 12 and 91 years were included divided into 'diabetics' and 'non-diabetics' based on blood glucose or glycated hemoglobin. The quantification of lipopolysaccharides (LPS), interleukin 1 β , C5a and interleukin 10 was performed by enzyme-linked immunosorbent assay. Ferritin was performed by chemiluminescence and C-reactive protein (CRP) was quantified by immunoturbidimetry. Means were compared by Student t test with significance levels set at $p < 0.05$.

Results

A significant increase in lipopolysaccharides was observed in diabetic patients. Plasmatic 'C-Reactive Protein' and 'Ferritin' were also significantly increased in diabetic patients. The quantification of interleukin 1 β , IL-10 and the C5a fraction of the complement system showed no significant difference between the studied groups.

Conclusions

There was a significant increase in the concentration of plasma lipopolysaccharides, in diabetic patients, a marker that is associated with increased intestinal permeability and inflammatory markers commonly used in clinical practice. Ferritin and CRP are also elevated. These findings may be related to the development of diabetes or other pathologies, in addition to DM complications, and further studies are needed for confirmation.

Keywords Diabetes; Lipopolysaccharides; Inflammatory Markers

INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a disease characterized by hyperglycemia, resulting from defects in the secretion or action of the hormone insulin, which has quadrupled in the last 40 years and is the seventh leading cause of death worldwide¹. DM development causes are linked to genetic and environmental factors, but recent studies seek to relate changes in the intestinal microbiota to its development^{2,3}, by stimulating autoreactive T lymphocytes and exposure of pancreatic beta cells to pro-inflammatory cytokines^{4,5,6}, in addition to the obesity-related effect which induces insulin resistance and systemic inflammation^{7,8}.

The intestinal microbiota is naturally a large reservoir of lipopolysaccharides (LPS), abundant component of the gram-negative bacterial wall, and the migration of LPS into the bloodstream is called endotoxemia, event that can result from high-fat diets and the increased intestinal permeability in dysbiosis^{9,10}. Endotoxemia is related to glucose dysregulation, obesity, adipose tissue inflammation and pancreatic beta cell dysfunction¹¹, in addition to a significant correlation of increased LPS with inflammatory biomarkers such as C-Reactive Protein (CRP), Tumor Necrosis Factor (TNF) and Interleukin 6 (IL-6) in patients with type 2 diabetes¹².

Significantly high levels of C-reactive protein have long been described in the literature as an inflammatory biomarker associated with DM¹³ and can be applied as a prognostic and decision marker in the face of complications of diabetes¹⁴. Elevated IL-

IL-1 β levels in diabetics have been reported in several studies^{15,16,17} and changes in plasma inflammatory markers are risk factors for the evolution of the disease^{18,19}. The increase in ferritin is significant in patients with microvascular complications²⁰, being considered an independent risk factor for the development of the pathology^{19, 21}. Therefore, the aim of this study was to evaluate lipopolysaccharides and plasma inflammatory markers in diabetic patients in the city of Joinville, Brazil.

SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

We studied 67 participants who spontaneously sought a clinical laboratory in Joinville, Brazil, with fasting glucose and glycated hemoglobin A1c (HbA1c) tests and agreed to sign the Free and Informed Consent Form. Serum samples were separated for this investigation after all laboratory tests for the patient had been processed. Patients of any gender aged 0 to 99 years, who had not received antibiotic therapy in the last 2 months were included. Patients with normal fasting glucose levels (<126 mg/dL) or HbA1c (< 6.0%) were classified as non-diabetic, according to the Brazilian Society of Diabetes²². There was no distinction between type 1 and type 2 DM patients. Individuals whose classification as diabetic or non-diabetic was inconclusive based on the available data and those whose biological material was insufficient to process this research were excluded. The values of glycated hemoglobin A1c and blood glucose were acquired through the laboratory's database.

For inflammatory markers, C-Reactive Protein was quantified by immunoturbidimetry (PCR Turbilátex Biotécnica®) and ferritin by ABBOTT ARCHITECT® laboratory automation. The cytokines IL-1 β and IL-10 and the C5a fraction of the complement system were performed by enzyme-linked immunoassay using commercial kits 'Human IL-1B (Interleukin 1 Beta) ELISA – Elabscience®', 'Human IL-10 ELISA – Sigma Aldrich®' and 'Human C5a Sigma-Aldrich® ELISA. The quantification of plasma lipopolysaccharides was performed by the commercial kit 'LPS ELISA Kit - FineTest®' by competitive enzyme-linked immunoassay. All tests previously passed through quality control, carried out according to the indications of each manufacturer.

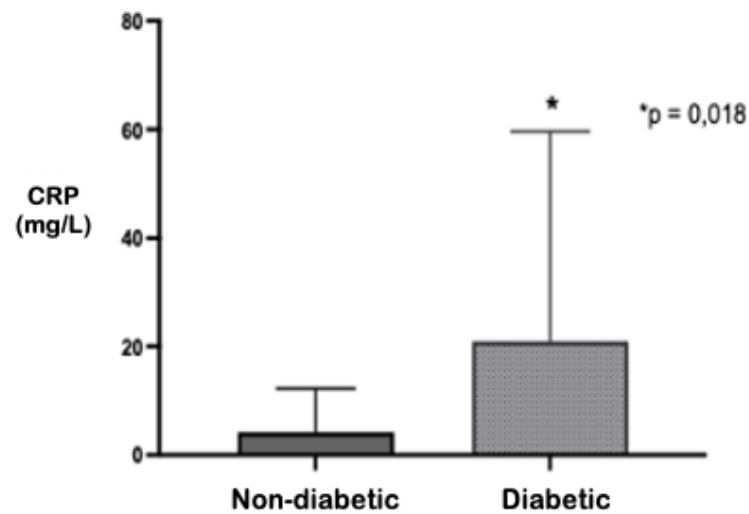
Data were tabulated using the Microsoft Excel® program. Means, standard deviation and statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism® 7 program, with significance levels set at $p < 0.05$. To compare the means, the T Student Test was used. This study was approved by the Ethics and Research Committee of UNIVILLE, under protocol number 4.927.529.

RESULTS

Inflammatory markers

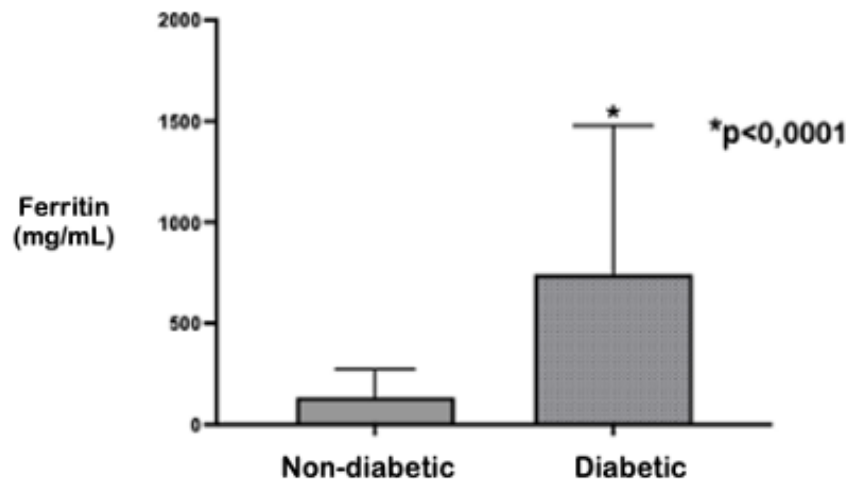
In the present study, 33 non-diabetic and 34 diabetic patients were evaluated. In the analysis of C-Reactive Protein, the average quantification was 4.20mg/L for the non-diabetic group, which is within the normal values for this acute phase protein (reference values: up to 6mg/ L). Only 4 patients in this group had CRP above the reference value. In contrast, the mean CRP value for diabetic patients was 20.91mg/L with 16 patients exceeding the limit (Figure 1). This was significant ($p=0,018$).

Figure 1 - Significantly elevated C-reactive protein in the diabetic group



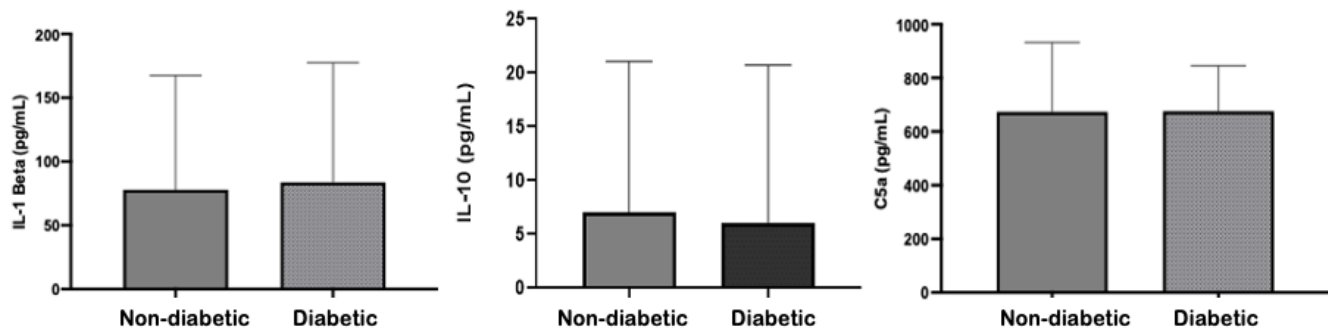
Regarding ferritin, the group of non-diabetic patients had a mean of 147.6 ng/mL and for the diabetic group, the mean was significantly higher ($p < 0.0001$), 611.83 ng/mL (Figure 2). According to reference values, measurements between 21.81 and 274.66 ng/mL for men and 4.63 and 204.00 ng/mL for women are considered normal. Of the 34 diabetic patients, 28 (82%) had some inflammatory marker altered and in the non-diabetic patients only 9 (27%).

Figure 2 - Ferritin was shown to be elevated in diabetic patients



The quantification of IL-1 β showed mean values of 77.81 pg/mL for the group of non-diabetic patients and 83.70 pg/mL for the diabetic patients ($p = 0.793$). The mean IL-10 dosage was 7.07 pg/mL in the non-diabetic group and 6.11 pg/mL in the diabetic group ($p = 0.786$) and C5a analysis showed similar means ($p = 0.970$) between the studied groups with 674.02 pg/mL for the diabetic group and 676.00 for the non-diabetic group (Figure 3)

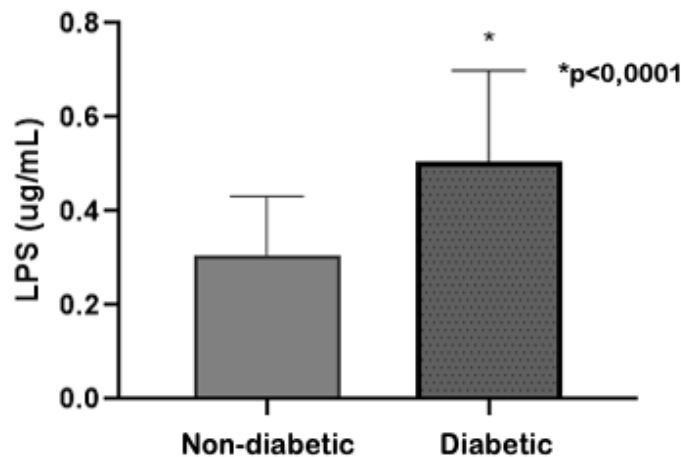
Figure 3 – Interleukin 1 beta, Interleukin 10 and Fraction C5a of the complement system showed no significant differences between the groups studied.



Lipopolysaccharides

The quantification of plasma lipopolysaccharides showed mean values of 0.307 ug/mL for the group of non-diabetic patients and 0.507 ug/mL for diabetic patients (Figure 4), which showed a significantly higher mean ($p < 0.0001$) in these patients.

Figure 4 - Endotoxemia of diabetic patients



DISCUSSION

In recent decades, dietary habits have changed, and high-fat foods are outperforming high-fiber diets, which leads to modified gut microbiota in response to these new habits and the observation of higher body mass index (BMI) in the general population³. The intake of foods rich in fat are important modulators of the microbiota and increase endotoxemia, which once installed is considered a factor that causes subclinical inflammation and can lead to chronic diseases^{23,10}.

High levels of ferritin and C-reactive protein in DM2 patients are strongly associated of inflammation and glycemic control (Hba1c versus ferritin or CRP),

suggesting that inflammation plays an important role in pathogenesis of diabetes²⁴. In addition, several inflammatory markers have been shown to be useful in assessing the risk of developing DM and its complications, although they cannot be considered as a primary cause in the mechanism of diabetes development, they are important in the assessment of possible causes²⁵. Another important point is that CRP elevation, as well as BMI and HbA1c levels, have already been described as variables associated with diabetes complications²⁶ and there are studies that suggest use of probiotics to decrease inflammatory markers positive, such as CRP²⁷.

Studies point to ferritin as a risk factor for the development of diabetes, which increases significantly in these patients and in patients with microvascular complications of diabetes^{19,20,21,28}. Inflammatory markers commonly used in clinical practice can serve as alerts for the risk or presence of diabetes, the results presented showed that 82% of diabetic patients had some altered inflammatory marker, either alone or in combination. The results obtained in the present study confirmed previous data on acute phase proteins, but this is the first time that these biomarkers are explored in diabetic patients in association with immunological markers in the city of Joinville.

Pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β , are produced in an exacerbated manner when LPS levels are increased in the bloodstream, as well as acute-phase inflammatory markers, which has already been observed in diabetic patients¹². Elevated levels of pro-inflammatory cytokines may contribute to insulin resistance, increasing the phosphorylation ratio of insulin substrate 1 receptors (IRS1), affecting pancreatic beta cells and limiting insulin access in certain tissues^{27, 29,30}. A study that evaluated the characteristics of the intestinal microbiota and measured IL-1 β found a significant association with the elevation of this cytokine in diabetic patients³¹. Many cytokines are associated with the development of metabolic syndrome, but few studies link their link with the alteration of the intestinal microbiota. Some authors have observed a relationship between diet intervention, use of probiotics and prebiotics or microbiota transplantation with cytokines, and a reduction in IL-1 β was observed after the use of oligofructose^{29,32}. LIAQAT et al³³ evaluated in animals, the use of synthetic human microbiota and high-fat diet and their role in inducing T2DM and observed that certain types of bacteria significantly increased the animals' weight and the levels of pro-inflammatory cytokines, which suggests the relationship between diet and microbiota in the progression of diabetes.

In eubiosis, there is a higher proportion of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, which is related to immune tolerance and therefore, decreased values of this cytokine can be observed in diabetic patients^{34,35,36}. Despite this, in the present study, the evaluated cytokines did not show significance. The C5a fraction of the complement system has been reported as a stimulant of the lymphocytic infiltrate in tissue damage and for inducing pro-inflammatory factors such as IL-1 β , IL-6 and TNF, in addition to being strongly associated with abnormal activation in renal fibrosis of patients diabetics³⁷ and a 2020 review described that C5 activation causes intestinal dysbiosis³⁸, but in the present study C5a showed no difference between the studied groups.

The increase in intestinal permeability favors the translocation of lipopolysaccharides from the lumen to the bloodstream, causing metabolic endotoxemia³⁹. A healthy intestinal barrier allows the passage of water, nutrients and bioactive compounds and prevents the passage of harmful substances such as microbial antigens, but several animal studies indicate that DM favors the translocation of endotoxins, especially lipopolysaccharides, leading to an increase in their

concentration in the bloodstream⁴⁰. The recognition of the LPS antigen by the Toll-Like receptors triggers pro-inflammatory reactions and metabolic disorders and several TLRs have been described with involvement in the mechanism to generate inflammation and insulin resistance⁴¹. A recent study showed the association of elevated CRP and LPS in patients with DM2¹², which can also be demonstrated in this study of patients from Joinville and the elevation of this marker has also been associated with complications of diabetes mellitus, such as diabetic retinopathy⁴².

CONCLUSIONS

It was possible to observe significant differences between the inflammatory markers 'C-Reactive Protein' and 'Ferritin' of diabetic and non-diabetic patients from Joinville and this demonstrates that inflammatory markers commonly used in clinical practice can serve as alerts for the risk or presence of diabetes. The quantification of interleukin 1 β and IL-10 and the C5a fraction of the complement system did not show significant difference between the groups studied, despite the literature pointing to quantitative changes in these markers in diabetic patients, which may be related to the small number of research participants. Subsequent studies should be considered. A limitation of this study that may have interfered with these analyzes was that part of the samples were collected in 2021, a period in which the COVID-19 pandemic was still in place, with many patients being able to present cytokine alterations resulting from this situation.

In addition, there was a significant increase in the concentration of plasma lipopolysaccharides in diabetic patients, a marker that is associated with increased intestinal permeability and inflammatory markers, with the development of diabetes and can be used in the future in medical practice as a risk marker for diabetes complications.

Finally, it is important that the evaluation of the intestinal microbiota of patients with diabetes in Joinville can continue in further research, so that these concepts can be extrapolated to the clinical area and education of the target audience, development of microbiota modifiers, improvement of intestinal immunity and disease prevention.

ACKNOWLEDGMENTS

To University of Joinville Region (UNIVILLE) for funding the project and teaching qualification. To clinical laboratory Gimenes for the partnership for sample collection.

REFERENCES

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION (org.). **Diabetes**. https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1.
2. TILG, H., e MOSCHEN, F. Food, immunity, and the microbiome. **Gastroenterology**. p. 1107-1119, mai. 2015. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016508515000128>.
3. MOFFA, Simona *et al.* The Interplay between Immune System and Microbiota in Diabetes. **Mediators of inflammation**, vol. 2019, 9367404, dec. 2019.
4. BIBBÒ, Stefano *et al.* Is there a role for gut microbiota in type 1 diabetes pathogenesis? **Annals of medicine** vol. 49, p. 11-22, feb. 2017. doi:10.1080/07853890.2016.1222449.

5. NEEDELL, J.C, ZIPRIS, D. The Role of the Intestinal Microbiome in Type 1 Diabetes Pathogenesis. **Curr Diab Rep.** vol 16, p. 89, out. 2016 doi: 10.1007/s11892-016-0781-z.
6. VAARALA, Outi. The gut as a regulator of early inflammation in type 1 diabetes. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* vol. 18, p. 241-7, ago. 2011. doi:10.1097/MED.0b013e3283488218.
7. EVERARD, A. e CANI, P. D. Diabetes, obesity and gut microbiota. **Best Practice e Research Clinical Gastroenterology.** Bélgica, p. 73-83, jun. 2013. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521691813000619?via%3Dihub>.
8. GEURTS, L. *et al.* Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. **Beneficial Microbes.** vol.5 n.1, p. 3-17, mar. 2014
9. BACH, Knudsen *et al.* Impact of Diet-Modulated Butyrate Production on Intestinal Barrier Function and Inflammation. **Nutrients.** Oct 13;10(10):1499, 2018. doi: 10.3390/nu10101499.
10. CANDIDO; BRESSAN; ALFENAS. Dysbiosis and metabolic endotoxemia induced by high-fat diet. Disbiosis y endotoxemia metabólica inducidas por la dieta rica en grasa. **Nutricion hospitalaria** vol. 35, p.1432-1440, dec. 2018.10.20960/nh.1792.
11. BANDER, Zahraa Al *et al.* The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. **International journal of environmental research and public health** vol. 17,7618, oct. 2020. doi:10.3390/ijerph17207618.
12. SALGUERO, Maria V *et al.* Dysbiosis of Gram-negative gut microbiota and the associated serum lipopolysaccharide exacerbates inflammation in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease. **Experimental and therapeutic medicine** vol. 18 p. 3461-3469, nov. 2019. doi:10.3892/etm.2019.7943.
13. MISRA DP, DAS S, SAHU PK. Prevalence of inflammatory markers (high-sensitivity C-reactive protein, nuclear factor- κ B, and adiponectin) in Indian patients with type 2 diabetes mellitus with and without macrovascular complications. **Metab Syndr Relat Disord.** 2012 Jun;10(3):209-13. doi: 10.1089/met.2011.0044. Epub 2012 Feb 8. PMID: 22316266.
14. WANG, Yuqing. An update on potential biomarkers for diagnosing diabetic foot ulcer at early stage. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol 133, e110991, jan. 2021. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110991.
15. BAE, Ji Cheol *et al.* Association between serum albumin, insulin resistance, and incident diabetes in nondiabetic subjects. **Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)**, vol 28, p. 26-32, mar. 2013.
16. MARGARYAN S. *et al.* Hypomethylation of IL1RN and NFKB1 genes is linked to the dysbalance in IL1 β /IL-1Ra axis in female patients with type 2 diabetes mellitus. **PLoS One.** 2020 May 29;15(5):e0233737. doi: 10.1371/journal.pone.0233737. PMID: 32470060; PMCID: PMC7259508.
17. TONG, H.V *et al.* Adiponectin and pro-inflammatory cytokines are modulated in Vietnamese patients with type 2 diabetes mellitus. **J Diabetes Investig.** 2017 May;8(3):295-305. doi: 10.1111/jdi.12579. Epub 2016 Oct 30. PMID: 27684566; PMCID: PMC5415486.
18. LAINAMPETCH, J. *et al.* Association of Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin 6, and C-Reactive Protein with the Risk of Developing Type 2 Diabetes: A Retrospective Cohort Study of Rural Thais. **J. Diabetes Res**, vol 2019, p. 1-9, 2019.

19. LIU J, LI Q, YANG Y, Ma L. Iron metabolism and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis and systematic review. **J Diabetes Investig.** 2020 Jul;11(4):946-955. doi: 10.1111/jdi.13216. Epub 2020 Feb 23. PMID: 31975563; PMCID: PMC7378429.
20. METWALLEY, K. et al. Ferritin levels in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: relationship with microvascular complications and glycemic control. *Arch Endocrinol Metab.* 2021 May 18;64(6):720-725. doi: 10.20945/2359-3997000000279. PMID: 34033281.
21. ZHANG, R. et al. Serum ferritin as a risk factor for type 2 diabetes mellitus, regulated by liver transferrin receptor 2. **Endocr Connect.** 2021 Nov 25;10(12):1513-1521. doi: 10.1530/EC-21-0316. PMID: 34727090; PMCID: PMC8679876.
22. BRAZILIAN SOCIETY OF DIABETES. **Diretriz oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes.** <https://diretriz.diabetes.org.br>. Acesso em 27 mar. 2021.
23. MOREIRA, Bruno Bagatin de Souza *et al.* Lymphocytes T Helper 17 in multiple sclerosis: regulation by intestinal microbiota. **Journal Of Neurology e Experimental Neuroscience.** vol.5 n.1, p. 40-47, abr. 2019.
24. ELIMAM, Hanan *et al.* Inflammatory markers and control of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes & metabolic syndrome** vol. 13, p. 800-804, 2019. doi:10.1016/j.dsx.2018.11.061.
25. MUZUROVIĆ, Emir *et al.* Inflammatory Markers Associated with Diabetes Mellitus - Old and New Players. **Current pharmaceutical design**, vol. 27, p. 3020-3035, 2021. doi:10.2174/1381612826666201125103047.
26. AULICH, Juliane *et al.* Associations between circulating inflammatory markers, diabetes type and complications in youth. **Pediatric diabetes** vol. 20, p. 1118-1127, 2019. doi:10.1111/pedi.12913.
27. DING, Li-Na *et al.* Effects of Probiotic Supplementation on Inflammatory Markers and Glucose Homeostasis in Adults With Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in pharmacology** vol. 12, 770861, dec. 2021. doi:10.3389/fphar.2021.770861.
28. CANI, P.D *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, vol. 56, p. 1761-1772, 2007.
29. CHEN, L., *et al.* Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. **Int. J. Endocrinol**, vol. 2015, p. 1-9, 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4468292/pdf/IJE2015-508409.pdf>.
30. FANG, Yuanyuan *et al.* Characteristics of the Gut Microbiota and Metabolism in Patients With Latent Autoimmune Diabetes in Adults: A Case-Control Study. **Diabetes care** vol. 44, p. 2738-2746, oct. 2021. doi:10.2337/dc20-2975.
31. SCHEITHAUER, Torsten *et al.* Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes. **Front. Immunol.** vol. 11, 571731, 2020.
32. CANI, P.D *et al.* Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2 driven improvement of gut permeability. **Gut**, vol 58, 1009, 2009.
33. LIAQAT, I. *et al.* Gut dysbiosis, inflammation, and type 2 diabetes in mice using synthetic gut microbiota from diabetic human. **Braz. J. Biol**, vol 83,242818, 2021.
34. NGUYEN; ALJAMAEI; STADYK. The Production and Function of Endogenous Interleukin-10 in Intestinal Epithelial Cells and Gut Homeostasis. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology** vol. 12, p.1343-1352, jul. 2021. doi:10.1016/j.jcmgh.2021.07.005.

35. YOO, Ji Youn *et al.* Gut Microbiota and Immune System Interactions. **Microorganisms**, vol. 8, artigo 1587, out. 2020. doi:10.3390/microorganisms8101587.
36. ZHOU, Bolun *et al.* Intestinal Flora and Disease Mutually Shape the Regional Immune System in the Intestinal Tract. **Frontiers in immunology** vol. 11 p. 575, abr. 2020. doi:10.3389/fimmu.2020.00575.
37. LI, Ling *et al.* C3a receptor antagonist ameliorates inflammatory and fibrotic signals in type 2 diabetic nephropathy by suppressing the activation of TGF- β /smad3 and I κ B α pathway. **PloS one** vol. 9, artigo 113639, nov. 2014. doi:10.1371/journal.pone.0113639.
38. LI, Ling *et al.* Complement C5 activation promotes type 2 diabetic kidney disease via activating STAT3 pathway and disrupting the gut-kidney axis. **Journal of cellular and molecular medicine** vol. 25, p. 960-974, jan. 2021. doi:10.1111/jcmm.16157.
39. ANHÊ, Fernando *et al.* Metabolic endotoxemia is dictated by the type of lipopolysaccharide. **Cell reports** vol. 36,109691, set. 2021. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109691.
40. GOMES, Júlia; COSTA, Jorge; ALFENAS, Rita. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: A sistematic review. *Metabolism*, Vol. 68, p. 133-144, mar 2017. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026049516301871?casa_token=WV_TIkCKKwIAAAAA:0bXT3B0X3yKJWDcR5fexpEj4ZHv6KnorS0zBdn4cnhTkP1mloQWKGWf3yi-jl8uPe8d5CqAxIE#bb0025.
41. QIN, X., ZOU, H. The role of lipopolysaccharides in diabetic retinopathy. **BMC Ophthalmol**22, 86 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12886-022-02296-z>

6 CONCLUSÕES

Foi possível observar diferenças significativas entre os marcadores inflamatórios 'Proteína C Reativa' e 'Ferritina' dos pacientes diabéticos e não-diabéticos de Joinville e isso demonstra que marcadores inflamatórios comumente utilizados na prática clínica, podem servir como alertas para risco ou presença de diabetes. Considerando albumina, PCR e ferritina, 88% dos pacientes diabéticos possuíam pelo um marcador inflamatório alterado, o que demonstra que mais de um marcador deve ser avaliado nestes pacientes.

A quantificação da interleucina 1 β , IL-10 e da fração C5a do sistema complemento não mostrou diferença significativa entre os grupos estudados, apesar da literatura apontar para alterações quantitativas destes marcadores em pacientes diabéticos, o que pode estar relacionado com o número pequeno de participantes da pesquisa. Estudos subsequentes devem ser considerados.

Em contrapartida, outro marcador imunológico – fator reumatoide - apareceu mais frequentemente em pacientes diabéticos e deve ser considerado na avaliação clínica destes pacientes, uma vez que o diabetes está associado a inflamação crônica e pode desencadear a progressão de outras doenças inflamatórias, como a artrite reumatoide.

Além disso, houve aumento significativo na concentração de lipopolissacarídeos plasmáticos em pacientes diabéticos, marcador que está associado ao aumento de permeabilidade intestinal e de marcadores inflamatórios, ao desenvolvimento do diabetes e pode ser futuramente utilizado na prática médica como marcador de risco de complicações do diabetes.

Por fim, é importante que a avaliação da microbiota intestinal de pacientes com diabetes em Joinville possa prosseguir em pesquisas posteriores, para que esses conceitos possam ser extrapolados para a área clínica e se busque a educação do público-alvo, desenvolvimento de modificadores da microbiota, melhora da imunidade intestinal e a prevenção de doenças.

Os resultados desta pesquisa serão discutidos e apresentados, de forma a disseminar o conhecimento entre os profissionais das áreas afins, com divulgação em eventos científicos locais e nacionais e a publicação dos principais resultados em revistas de circulação internacional.

REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF A.M. e SARVETNICK, N.E. Current understanding of the role of gut dysbiosis in type 1 diabetes. **J Diabetes**, vol 11, p. 632-644, ago.2019. Disponível em doi: 10.1111/1753-0407.12915. Acesso em 10 jun. 2022.
- AGUIAR, F.J. B, *et al.* Proteína C reativa: aplicações clínicas e propostas para utilização racional. **Revista associação médica brasileira**, vol 59, n. 1, p. 85 –92, 2019.
- AJJAN, R. A., SCHROEDER, V. Role of complement in diabetes. **Mol Immunol**, vol 114, p. 270-277, out. 2019.
- ALLIN, K.H, NIELSEN, T., PEDERSEN, O. Mechanisms in endocrinology: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. **Eur J Endocrinol**, vol 172, p. 167-177, abr. 2015. Disponível em doi: 10.1530/EJE-14-0874. Acesso em: 18 jul. 2022.
- AMOROSO, Chiara *et al.* The Role of Gut Microbiota Biomodulators on Mucosal Immunity and Intestinal Inflammation. **Cells** vol. 9, artigo 1234, mai. 2020. Disponível em doi:10.3390/cells9051234. Acesso em: 19 jul. 2022.
- ANHÊ, Fernando *et al.* Metabolic endotoxemia is dictated by the type of lipopolysaccharide. **Cell reports** vol. 36, artigo 109691, set. 2021. Disponível em doi: 10.1016/j.celrep.2021.109691. Acesso em: 20 jul. 2022.
- ARBOLEYA, S *et al.* Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. **FEMS Microbiol. Ecol**, vol 79, p. 763–772, 2012.
- AULICH, Juliane *et al.* Associations between circulating inflammatory markers, diabetes type and complications in youth. **Pediatric diabetes** vol. 20, p. 1118-1127, 2019. Disponível em doi:10.1111/pedi.12913. Acesso em 14 ago. 2022.
- BACH, Knudsen *et al.* Impact of Diet-Modulated Butyrate Production on Intestinal Barrier Function and Inflammation. **Nutrients**. Oct 13;10(10):1499, 2018. Disponível em doi: 10.3390/nu10101499.
- BAE, Ji Cheol *et al.* Association between serum albumin, insulin resistance, and incident diabetes in nondiabetic subjects. **Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)**, vol 28, p. 26-32, mar. 2013.
- BAE, J. H *et al.* Circulating cell-free mtDNA contributes to AIM2 inflammasome-mediated chronic inflammation in patients with type 2 diabetes. **Cells**, 2019 doi: 10.3390/cells8040328
- BANDER, Zahraa Al *et al.* The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. **International journal of environmental research and public health** vol. 17, artigo 7618, out. 2020. Disponível em doi:10.3390/ijerph17207618. Acesso em: 20 jul. 2022.
- BECATTINI, S., TAUR Y., PAMER, E.G. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. **Trends in molecular medicine** vol. 22, p. 458-478, mai. 2016. Disponível em doi:10.1016/j.molmed.2016.04.003. Acesso em: 5 jul. 2022.

BELKAID Y., HARRISON, O.J. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity*, vol 18, p. 562-576, abr. 2017. Disponível em doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.008. Acesso em: 20 jul. 2022.

BIBBÒ, Stefano *et al.* Is there a role for gut microbiota in type 1 diabetes pathogenesis? **Annals of medicine** vol. 49, p. 11-22, fev. 2017. Disponível em doi:10.1080/07853890.2016.1222449. Acesso em: 20 jul. 2022.

BOYKO, E. J. *et al.* Features of the metabolic syndrome predict higher risk of diabetes and impaired glucose tolerance: a prospective study in Mauritius. **Diabetes Care**, vol 23, p. 1242-1248, set. 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diabetes mellitus: sintomas, causas e tratamentos. Sintomas, Causas e Tratamentos.** Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/diabetes>. Acesso em: 18 jul. 2022

BUFFIE, C.G. e PAMER, E.G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. **Nat Rev Immunol**, vol 13, p. 790–801, 2013.

CALCINARO, F *et al.* Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. **Diabetologia** vol. 48, p.1565-75, abr. 2005. Disponível em doi:10.1007/s00125-005-1831-2. Acesso em: 18 jul. 2022.

CANDIDO; BRESSAN; ALFENAS. Dysbiosis and metabolic endotoxemia induced by high-fat diet. Disbiosis y endotoxemia metabólica inducidas por la dieta rica en grasa. **Nutricion hospitalaria** vol. 35, p.1432-1440, dez. 2018. Disponível em doi:10.20960/nh.1792. Acesso em: 20 jul. 2022.

CANI, P.D *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, vol. 56, p. 1761-1772, 2007.

CANI, P.D *et al.* Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2 driven improvement of gut permeability. **Gut**, vol 58, artigo 1009, 2009.

CANI, P. D. *et al.* Microbial Regulation of Organismal Energy. **Homeostasis. Nat. Metab**, vol 1, p. 34–46, 2019.

CANTORNA, M. T., SNYDER, L., ARORA, J. Vitamin A and vitamin D regulate the microbial complexity, barrier function, and the mucosal immune responses to ensure intestinal homeostasis. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Reino Unido, p. 184-192, mai. 2019.

CARICILLI, A.M., SAAD, M. J. A. Gut microbiota composition and its effects on obesity and insulin resistance. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. São Paulo, p. 312-318, jul. 2014.

CHANG, Douglas *et al.* Reduced plasma albumin predicts type 2 diabetes and is associated with greater adipose tissue macrophage content and activation. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, vol 7 p. 11-14, fev. 2019.

CHEN, L., *et al.* Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. **Int. J. Endocrinol.**, vol. 2015, p. 1-9, 2015. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4468292/pdf/IJE2015-508409.pdf>. Acesso em: 20 jul 2022.

CHEN, L., *et al.* Elevated serum ferritin concentration is associated with incident type 2 diabetes mellitus in a Chinese population: A prospective cohort study. **Diabetes Res Clin Pract.** 2018 May;139:155-162. doi: 10.1016/j.diabres.2018.03.001. Epub 2018 Mar 8. PMID: 29524483.

COATES, Margaret *et al.* The Skin and Intestinal Microbiota and Their Specific Innate Immune Systems. **Frontiers in immunology** vol. 10 artigo 2950, dez. 2019. Disponível em doi:10.3389/fimmu.2019.02950. Acesso em 15 jul.2022.

COSTEA, Paul *et al.* Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. **Nature microbiology** vol. 3,1 p. 8-16, dez. 2018.

DE LUCA, F. e SHOENFELD, Y. The microbiome in autoimmune diseases. **The Journal Of Translational Immunology.** Vol.195, p. 74-85, mai. 2018.

DING, Li-Na *et al.* Effects of Probiotic Supplementation on Inflammatory Markers and Glucose Homeostasis in Adults with Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in pharmacology** vol. 12 artigo 770861, dez. 2021. Disponível em doi:10.3389/fphar.2021.770861. Acesso em 15 jul. 2022.

ELIMAM, Hanan *et al.* Inflammatory markers and control of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes & metabolic syndrome** vol. 13, p. 800-804, 2019. Disponível em doi:10.1016/j.dsx.2018.11.061. Acesso em: 14 ago. 2022.

ESTEVE, E., RICART, W., FERNÁNDEZ-REAL, J.M. Gut microbiota interactions with obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: did gut microbiote co-evolve with insulin resistance? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** Vol 14, p. 483-90, set. 2011. Disponível em doi: 10.1097/MCO.0b013e328348c06d. Acesso em 18 jul. 2022.

EVERARD, A. e CANI, P. D. Diabetes, obesity and gut microbiota. **Best Practice e Research Clinical Gastroenterology.** Bélgica, p. 73-83, jun. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521691813000619?via%3Dihub> Acesso em: 09 set. 2021.

FANG, Yuanyuan *et al.* Characteristics of the Gut Microbiota and Metabolism in Patients with Latent Autoimmune Diabetes in Adults: A Case-Control Study. **Diabetes care** vol. 44, p. 2738-2746, out. 2021. Disponível em doi:10.2337/dc20-2975. Acesso em: 20 jul. 2022.

FARRÉ, Ricard *et al.* Intestinal Permeability, Inflammation and the Role of Nutrients. **Nutrients** vol. 12 artigo 1185, abr. 2020. Disponível em doi:10.3390/nu12041185. Acesso em 18 jul. 2022.

FASSATOUI, Meriem *et al.* Gut microbiota imbalances in Tunisian participants with type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Bioscience Reports.** Virgínia, p. 1-7, mai. 2019.

FENG, T. e ELSON, C. O. Adaptive immunity in the host microbiota dialog. **Mucosal Immunology**, vol. 4, no. 1, p. 15–21, 2011.

FERNANDES, Francisco. Endotoxinas em aviários. Revista Brasileira de medicina do trabalho, Volume 3, 2005. Disponível em: <http://www.rbmt.org.br/details/165/pt-BR/endotoxinas-em-aviarios>. Acesso em: 22 set. 2022.

FERNÁNDEZ, Mariana F. *et al.* Breast Cancer and Its Relationship with the Microbiota. **International Journal of Environmental Research And Public Health**. vol.15 n.08, ago. 2018.

GENSOLLEN, T. *et al.* How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. **Science**, vol 352, p. 539-544, abr. 2016.

GEURTS, L. *et al.* Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. **Beneficial Microbes**. vol.5 n.1, p. 3-17, mar. 2014.

GHOSH, Siddhartha S *et al.* Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. **Journal of the Endocrine Society** vol. 4, artigo bvz039, fev. 2020. Disponível em doi:10.1210/jendso/bvz039. Acesso em: 5 jul. 2022.

GOELDNER, Isabela *et al.* Artrite reumatoide: uma visão atual. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, vol 47, out. 2011.

GOMES, Júlia; COSTA, Jorge; ALFENAS, Rita. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: A systematic review. *Metabolism*, Volume 68, p. 133-144, março, 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026049516301871?casa_token=WV_TIkCKKwIAAAAA:0bXT3B0X3yKJWDcR5fexpEj4ZHv6KnorS0zBdn4cnhTkP1ml oQWKGWf3yi-jl8uPe8d5CqAxIE#bb0025. Acesso em: 11 out. 2022.

GOUVEIA, S., RIBEIRO, C., CARRILHO, F. Sobrecarga de ferro e diabetes mellitus. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, vol 9, p. 74-78, jan-jun. 2014

HAN, Hui *et al.* Gut Microbiota and Type 1 Diabetes. **International journal of molecular sciences** vol. 19, p. 995, mar. 2018. Disponível em doi:10.3390/ijms19040995. Acesso em: 18 jul. 2022.

HARO, Carmen *et al.* Intestinal Microbiota Is Influenced by Gender and Body Mass Index. **PloS one** vol. 11, artigo 0154090., mai. 2016. Disponível em doi:10.1371/journal.pone.0154090. Acesso em: 18 jul. 2022.

HOOKS, K. B, e O'MALLEY, M. A. Dysbiosis and Its Discontents. **mBio** vol. 8, n. 5, out. 2017.

HOOPER L. V. e MACPHERSON A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nat Rev Immunol**, vol 10, p. 159–169, 2010.

- HUANG, Shuli *et al.* The imbalance of gut microbiota and its correlation with plasma inflammatory cytokines in pemphigus vulgaris patients. **Scandinavian Journal of Immunology**. vol.89 n.6, jun. 2019.
- KAUTZKY-WILLER A., HARREITER J., PACINI G. Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. **Endocr Rev**, vol 37, p. 278-316, jun. 2016.
- KIM, S., COVINGTON, A., PAMER, E. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. **Immunological Reviews**. p. 90-105, ago. 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/imr.12563>. Acesso em: 09 set. 2021.
- LAINAMPETCH, J. *et al.* Association of Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin 6, and C-Reactive Protein with the Risk of Developing Type 2 Diabetes: A Retrospective Cohort Study of Rural Thais. **J. Diabetes Res**, vol 2019, p. 1-9, 2019.
- LEVY, Maayan *et al.* Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. **Cell** vol. 163,n. 6 p. 1428-43, dez. 2015.
- LI, Ling *et al.* C3a receptor antagonist ameliorates inflammatory and fibrotic signals in type 2 diabetic nephropathy by suppressing the activation of TGF- β /smad3 and I κ B α pathway. **PloS one** vol. 9, artigo 113639, nov. 2014. Disponível em doi:10.1371/journal.pone.0113639. Acesso em 18 jul. 2022.
- LI, Ling *et al.* Complement C5 activation promotes type 2 diabetic kidney disease via activating STAT3 pathway and disrupting the gut-kidney axis. **Journal of cellular and molecular medicine** vol. 25, p. 960-974, jan. 2021. Disponível em: doi:10.1111/jcmm.16157. Acesso em 20 jul. 2022.
- LIAQAT, I. *et al.* Gut dysbiosis, inflammation and type 2 diabetes in mice using synthetic gut microbiota from diabetic human. **Braz. J. Biol**, vol 83, artigo 242818, 2021.
- LIM, Mi Young *et al.* The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. *Gut* vol. 66, p. 1031-1038, jun. 2017. Disponível em doi:10.1136/gutjnl-2015-311326. Acesso em: 18 jul. 2022.
- LIMA, Luciana *et al.* High-sensitivity C-reactive protein in subjects with type 2 diabetes mellitus and/or high blood pressure. **Arq Bras Endocrinol Metab**, vol 51, p. 956-960, ago. 2007.
- LITWINCZUK-HAJDUK, Joanna *et al.* Autoimmunity markers in subjects with diabetes. **J. Pre. Clin. Clin. Res**, vol 10, p. 28-33, 2016.
- LIU J, LI Q, YANG Y, Ma L. Iron metabolism and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis and systematic review. **J Diabetes Investig**. 2020 Jul;11(4):946-955. doi: 10.1111/jdi.13216. Epub 2020 Feb 23. PMID: 31975563; PMCID: PMC7378429.

LU, Ming-Chi *et al.* Risk of Rheumatoid Arthritis in Patients with Type 2 Diabetes: A Nationwide Population-Based Case-Control Study. **PLoS One**, vol 9, artigo 101528, jul. 2014.

MALTA, Débora *et al.* Prevalência de diabetes mellitus determinada pela hemoglobina glicada na população adulta brasileira, Pesquisa Nacional de Saúde. **Rev. bras. Epidemiol**, vol 22, 2019.

MARGARYAN S. *et al.* Hypomethylation of IL1RN and NFKB1 genes is linked to the dysbalance in IL1 β /IL-1Ra axis in female patients with type 2 diabetes mellitus. **PLoS One**. 2020 May 29;15(5):e0233737. doi: 10.1371/journal.pone.0233737. PMID: 32470060; PMCID: PMC7259508.

METWALLEY, K. *et al.* Ferritin levels in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: relationship with microvascular complications and glycemic control. *Arch Endocrinol Metab*. 2021 May 18;64(6):720-725. doi: 10.20945/2359-3997000000279. PMID: 34033281.

MILANI, Christian *et al.* The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**. vol.81, p. 17-36, dez. 2017.

MISRA DP, DAS S, SAHU PK. Prevalence of inflammatory markers (high-sensitivity C-reactive protein, nuclear factor- κ B, and adiponectin) in Indian patients with type 2 diabetes mellitus with and without macrovascular complications. **Metab Syndr Relat Disord**. 2012 Jun;10(3):209-13. doi: 10.1089/met.2011.0044. Epub 2012 Feb 8. PMID: 22316266.

MOFFA, Simona *et al.* The Interplay between Immune System and Microbiota in Diabetes. **Mediators of inflammation**, vol. 2019, artigo 9367404, dez. 2019.

MOMENI, Ali *et al.* Serum ferritin has correlation with HbA1c in type 2 diabetic patients. **Adv Biomed Res**, vol 4, p. 74 , mar. 2015.

MOREIRA, Boroni *et al.* Gut microbiota and the development of obesity. **Nutr Hop**, vol 27, p. 1408-1414, set.-out. 2012.

MOREIRA, Bruno Bagatin de Souza *et al.* Lymphocytes T Helper 17 in multiple sclerosis: regulation by intestinal microbiota. **Journal Of Neurology and Experimental Neuroscience**. vol.5 n.1, p. 40-47, abr. 2019.

MUÑOZ-GARACH, A., DIAZ-PERDIGONES, C., TINAHONES, F.J. Gut microbiota and type 2 diabetes mellitus. **Endocrinol Nutr**. vol. 63, p. 560-568, set. 2016. Disponível em doi:10.1016/j.endonu.2016.07.008. Acesso em 10 jul. 2022.

MUZUROVIĆ, Emir *et al.* Inflammatory Markers Associated with Diabetes Mellitus - Old and New Players. **Current pharmaceutical design**, vol. 27, p. 3020-3035, 2021. Disponível em doi:10.2174/138161282666201125103047. Acesso em: 14 ago. 2022.

NAVAB-MOGHADAM, Fatemeh *et al.* The association of type II diabetes with gut microbiota composition. **Microbial Pathogenesis**. Iran, p. 630-636, set. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401017308045>. Acesso em: 09 set 2021.

NEEDELL, J.C, ZIPRIS, D. The Role of the Intestinal Microbiome in Type 1 Diabetes Pathogenesis. **Curr Diab Rep**. vol 16, p. 89, out. 2016. Disponível em doi: 10.1007/s11892-016-0781-z. Acesso em 10 jul. 2022.

NGUYEN; ALJAMAEI; STADYK. The Production and Function of Endogenous Interleukin-10 in Intestinal Epithelial Cells and Gut Homeostasis. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology** vol. 12, p.1343-1352, jul. 2021. Disponível em doi:10.1016/j.jcmgh.2021.07.005. Acesso em: 10 jul. 2022.

NOGUERA, Marcel *et al.* Intervenções farmacêuticas no diabetes mellitus tipo 2: uma revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos randomizados. **Einstein**. São Paulo, p. 1-14. 2020.

ODAMAKI, Toshitaka *et al.* Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. **BMC microbiology**, vol. 16 p. 90, mai. 2016. Disponível em doi:10.1186/s12866-016-0708-5. Acesso em: 05 jul. 2022.

OJO, Omorogieva *et al.* The Effect of Dietary Fibre on Gut Microbiota, Lipid Profile, and Inflammatory Markers in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. **Nutrients** vol. 13, artigo 1805, mai. 2021. Disponível em doi:10.3390/nu13061805. Acesso em: 20 jul. 2022.

OLIVARES-VILLAGÓMEZ, D. e KAER, L.V. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier. **Trends in immunology** vol. 39, p. 264-275, abr. 2018. Disponível em doi:10.1016/j.it.2017.11.003. Acesso em: 20 jul. 2022.

ORTIGÃO, Raquel *et al.* Gastrointestinal Microbiome - What We Need to Know in Clinical Practice. **GE Portuguese journal of gastroenterology** vol. 27,n. 5, p. 336-351, jan. 2020.

PAPATHEODOROU, Konstantinos *et al.* Complications of Diabetes 2017. **Journal Of Diabetes Research**. p. 1-4. 11, mar. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29713648/>. Acesso em: 09 set 2020.

PETERSMANN, Astrid *et al.* Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association**, vol. 127p. S1-S7, dez. 2019. Disponível em doi:10.1055/a-1018-9078. Acesso em: 18 jul. 2022.

QIN, X., ZOU, H. The role of lipopolysaccharides in diabetic retinopathy. **BMC Ophthalmol**22, 86 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12886-022-02296-z>

RAJ, Sumesh *et al.* Relationship of rheumatoid factor positivity to prevalence of joint manifestations in type 2 diabetes which are unrelated to rheumatoid arthritis. **International Journal of Research in Medical Sciences**, vol 2, n. 2, p. 489-492, 2014. Disponível em <https://doi.org/10.5455/2320-6012.ijrms20140522>. Acesso em: 18 jul. 2022.

RAJAB, Heevi Ameen *et al.* Circulating human anti nucleolus antibody (ANCAb) and biochemical parameters in type 2 diabetic patients with and without complications. **PLoS One**, vol 15, artigo 0237109, ago. 2020.

RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M. e WILLEM, V. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. **FEMS microbiology reviews** vol. 38, n. 5 p. 996-1047, jun. 2014.

RAKOFF-NAHOUM S., HAO, L., MEDZHITOV, R. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal dependent colitis. **Immunity**, vol 25, p. 319–329, 2006.

REIS, Rodrigo Citton Padilha Dos *et al.* Evolution of diabetes in Brazil: prevalence data from the 2013 and 2019 Brazilian National Health Survey. **Cadernos de saúde publica** vol. 38, artigo 00149321, mai. 2022. Disponível em doi:10.1590/0102-311X00149321. Acesso em: 14 ago. 2022.

REMELY, M *et al.* Microbiota and epigenetic regulation of inflammatory mediators in type 2 diabetes and obesity. **Beneficial microbes** vol. 5, p. 33-43, mar. 2014. Disponível em doi:10.3920/BM2013.006. Acesso em: 20 jul. 2022.

RININELLA, Emanuele *et al.* What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. **Microorganisms**, vol 7, p. 14, jan. 2019.

RODRÍGUEZ-MORÁN, F. e GUERRERO-ROMERO, F. Increased levels of C-reactive protein in noncontrolled type II diabetic subjects. **Journal of diabetes and its complications**, vol 13, p. 211-216, jul-ago, 1999.

ROMANOKEELER, J. *et al.* Early life establishment of site-specific microbial communities in the gut. **Gut Microbes**, vol p. 192 –201, 2014.

SAEEDI, Pouya *et al.* Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. **Diabetes research and clinical practice** vol. 157, artigo 107843, nov. 2019. Disponível em doi:10.1016/j.diabres.2019.107843. Acesso em 15 jul. 2022.

SALAMONE, Dominic *et al.* The relationship between gut microbiota, short-chain fatty acids and type 2 diabetes mellitus: the possible role of dietary fibre. **Acta diabetologica** vol. 58, p. 1131-1138, mai. 2021. Disponível em doi:10.1007/s00592-021-01727-5. Acesso em: 20 jul. 2022.

SALAZAR, Juan *et al.* Microbiota and Diabetes Mellitus: Role of Lipid Mediators. **Nutrients** vol. 12, artigo 3039, out. 2020. Disponível em doi:10.3390/nu12103039. Acesso em: 20 jul. 2022.

SALGUERO, Maria V *et al.* Dysbiosis of Gram-negative gut microbiota and the associated serum lipopolysaccharide exacerbates inflammation in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease. **Experimental and therapeutic medicine** vol. 18 p. 3461-3469, nov. 2019. Disponível em doi:10.3892/etm.2019.7943. Acesso em: 20 jul. 2022.

SANTOS, Carla Elane *et al.* Incidence and prevalence of diabetes self-reported on elderly in south of Brazil: results of EpiFloripa Ageing Study. **Cienc. Saúde coletiva**, vol 24, nov. 2019.

SCHEITHAUER, Torsten *et al.* Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes. **Front. Immunol.** vol. 11 artigo 571731, 2020.

SEARS, CL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: A rogue among symbiotes. **Clin Microbiol Rev**, vol 22, p.349–369, 2009.

SHEN, J., OBIN, S., ZHAO, L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. **Molecular Aspects Of Medicine**. Reino Unido, p. 39-58, nov. 2012.

SIQUEIRA, Isabela Silva Levindo de *et al.* Prevalence and Risk Factors for Self-Report Diabetes Mellitus: A Population-Based Study. **International journal of environmental research and public health** vol. 17 p.6497, set. 2020. Disponível em doi:10.3390/ijerph17186497. Acesso em: 14 ago. 2022.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretriz oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes**. Disponível em <https://diretriz.diabetes.org.br>. Acesso em 27 mar. 2021. SODERHOLM, Amelia e PEDICORD, Virginia. Intestinal epithelial cells: at the interface of the microbiota and mucosal immunity. **Immunology** vol. 158, p. 267-280, dez. 2019. Disponível em doi:10.1111/imm.13117. Acesso em 15 jul. 2022.

SPIILJAR, Martina *et al.* The Immune System Bridges the Gut Microbiota with Systemic Energy Homeostasis: Focus on TLRs, Mucosal Barrier, and SCFAs. **Frontiers in immunology** vol. 8 artigo 1353, out. 2017. Disponível em doi:10.3389/fimmu.2017.01353. Acesso em: 20 jul. 2022

SUN, L., FU, J., ZHOU, Y. Metabolism controls the balance of Th17/T-regulatory cells. **Frontiers in Immunology**, vol. 8, article 1632, 2017

SUN, Hong *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes research and clinical practice** vol. 183, artigo 109119, 2022. Disponível em doi:10.1016/j.diabres.2021.109119. Acesso em: 14 ago. 2022.

TANG, W., KITAI, T., HAZEN, S. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. **Circulation Research**. p. 1183-1196, mar. 2017. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.117.309715>. Acesso em: 09 set. 2020.

TAUR Y. e PAMER E.G. The intestinal microbiota and susceptibility to infection in immunocompromised patients. **Curr Opin Infect Dis**, vol 26, p. 332–337, 2013.

THURSBY E, JUGE N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochem J.** vol 474, n.11, p. 1823-1836, mai. 2017.

TILG, H., e MOSCHEN, F. Food, immunity, and the microbiome. **Gastroenterology.** p. 1107-1119, mai. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016508515000128>. Acesso em: 18 jul. 2022.

TONG, H.V et al. Adiponectin and pro-inflammatory cytokines are modulated in Vietnamese patients with type 2 diabetes mellitus. **J Diabetes Investig.** 2017 May;8(3):295-305. doi: 10.1111/jdi.12579. Epub 2016 Oct 30. PMID: 27684566; PMCID: PMC5415486.

URQUIZO AYALA, G., ARTEAGA, R., CHACON P. Utilidad de los reactantes de fase aguda em el diagnóstico clínico. **Rev. Méd. La Paz,** La Paz, v. 25, n. 2, p. 91-98, 2019. Disponível em <http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-89582019000200013&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 25 jul. 2022.

VAARALA, Outi. The gut as a regulator of early inflammation in type 1 diabetes. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* vol. 18, p. 241-7, ago. 2011. Disponível em doi:10.1097/MED.0b013e3283488218. Acesso em 20 jul. 2022.

VALLADARES, Ricardo *et al.* Lactobacillus *johnsonii* N6.2 mitigates the development of type 1 diabetes in BB-DP rats. **PLoS one** vol. 5 artigo 10507, mai. 2010. Disponível em doi:10.1371/journal.pone.0010507. Acesso em: 5 jul. 2022.

WANG L., ZHU L., QIN S. Gut Microbiota Modulation on Intestinal Mucosal Adaptive Immunity. **Journal of immunology research** vol. 2019 artigo 4735040, out. 2019. Disponível em doi:10.1155/2019/4735040. Acesso em 20 jul. 2022.

WANG, Yuqing. An update on potential biomarkers for diagnosing diabetic foot ulcer at early stage. **Biomedicine & Pharmacotherapy,** vol 133, e110991, jan. 2021. Disponível em doi: 10.1016/j.biopha.2020.110991.

WEI, Junxiang *et al.* Comparisons of Visceral Adiposity Index, Body Shape Index, Body Mass Index and Waist Circumference and Their Associations with Diabetes Mellitus in Adults. **Nutrients** vol. 11, artigo 1580, jul. 2019. Disponível em doi:10.3390/nu11071580. Acesso em: 14 ago. 2022.

WENSVEEN, Felix M *et al.* NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. **Nature immunology** vol. 16, p. 376-85, abr. 2015. Disponível em doi:10.1038/ni.3120. Acesso em: 20 jul. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (org.). **Diabetes.** Disponível em: https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1. Acesso em: 16 jul. 2022.

YOO, Ji Youn *et al.* Gut Microbiota and Immune System Interactions. **Microorganisms,** vol. 8, artigo 1587, out. 2020. Disponível em doi:10.3390/microorganisms8101587. Acesso em: 10 jul.2022.

ZHANG, R. et al. Serum ferritin as a risk factor for type 2 diabetes mellitus, regulated by liver transferrin receptor 2. **Endocr Connect**. 2021 Nov 25;10(12):1513-1521. doi: 10.1530/EC-21-0316. PMID: 34727090; PMCID: PMC8679876.

ZHOU, Bolun *et al*. Intestinal Flora and Disease Mutually Shape the Regional Immune System in the Intestinal Tract. **Frontiers in immunology** vol. 11 p. 575, abr. 2020. Disponível em doi:10.3389/fimmu.2020.00575. Acesso em 20 jul. 2022.

ANEXO A

Carta de anuência e autorização institucional

Solicitamos autorização institucional para realização de pesquisa intitulada 'AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS PLASMÁTICOS EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 E TIPO 2 NA CIDADE DE JOINVILLE-SC, a ser realizado no Laboratório Gimenes, sob orientação do professor Dr. Gilmar Sidnei Erzinger e responsabilidade da pesquisadora Msc. Heidi Pfitzenreuter Carstens e que utilizará a seguinte metodologia:

Serão avaliados 60 pacientes divididos em 3 grupos: não-diabéticos, diabéticos tipo 1 e diabéticos tipo 2. Serão classificados como pacientes não-diabéticos os que apresentarem níveis normais de glicemia de jejum e HbA1c de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes e não utilizarem medicamentos hipoglicemiantes orais ou insulino terapia. Serão considerados pacientes diabéticos os que apresentarem alterações nos exames de HbA1c e glicemia de jejum de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes. Serão alocados em DM2 os pacientes, que utilizam hipoglicemiantes orais e DM1 pacientes que fazem uso só de insulino terapia, além do diagnóstico auto-relatado. Esta classificação se dará inicialmente pelo questionário aplicado ao paciente (tipo de diabetes auto-relatado e perfil da terapia utilizada) e confirmada com os resultados dos testes de HbA1c e glicemia de jejum.

As amostras de soro e sangue total serão coletadas entre os meses de agosto e setembro de 2021 e armazenadas sob refrigeração no Laboratório Gimenes sediado em Joinville-SC, até a realização dos exames de Hemoglobina Glicada A1c e Glicemia de jejum. Após isso, o soro será encaminhados para realização dos parâmetros bioquímicos e imunológicos no Laboratório de Análises Clínicas da Univille. As amostras de fezes serão armazenadas a -80°C até a extração do DNA e quantificação das espécies bacterianas no Laboratório de Biologia Molecular da Univille e serão descartadas de acordo com as normas sanitárias após a análise. Os participantes que forem incluídos na pesquisa, responderão a um questionário com informações auto-relatadas sobre sexo, peso, altura, tempo do diagnóstico, tipo do diabetes e medicamentos utilizados. O estado nutricional será classificado pelo IMC, com base nos pontos de corte propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020), sendo peso normal IMC > 18,5 e < 25 kg/m² sobrepeso IMC 25 kg/m² e <30kg/m² e obesidade para IMC30 kg/m²., baseados no auto-relato de peso e altura.

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA: O DNA microbiano será extraído a partir de 180 a 220mg de amostra fecal através do kit QiAmp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen), de acordo com o procedimento do fabricante. Após a extração, a concentração do DNA bacteriano será mensurada por espectrofotômetro e a relação 260/280 será utilizada para checagem da pureza do extrato.

QUANTIFICAÇÃO MICROBIOTA: A microbiota *Firmicutes*, *Bacteroidetes*,

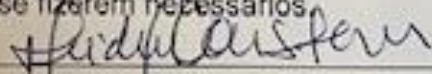


Firmicutes prausnitzii, *Akkermansia muciniphila* e *Bifidobacterium spp.* será quantificada por PCR quantitativo. As curvas de calibração serão estabelecidas a partir de DNA genômico de cepas de *F. prausnitzii*, *Bacteroides thetaioamicron*, *A. muciniphila* e *Bifidobacterium adolescentis*. PCR quantitativo (qPCR) utilizando TaqMan® Universal PCR Master Mix, SYBR® Green PCR Master Mix 50ng de DNA genômico extraído de cada amostra fecal.

AVALIAÇÃO PAR METROS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS: Os valores de hemoglobina glicosilada A1c e glicose plasmática serão adquiridos através do banco de dados do Laboratório Gimenes. O método utilizado para realização é HPLC para HBA1c por automação e a glicemia é realizada por automação ADVIA 1800 Siemens. Para os pacientes que não tiverem HBA1c ou glicemia como resultados realizados, as amostras serão submetidas a análise pela mesma metodologia, no referido laboratório. A quantificação da Proteína C Reativa será realizada através de PCR Ultrassensível por imunoturbidimetria em automação pelo equipamento Respons 910 Biosys®.

A quantificação das interleucinas IL-1, IL-6, IL-10 e IL-17, além dos marcadores imunológicos LPS e C5a serão realizadas por enzima imuno-ensaio (ELISA) - kit comercial.

A coleta de dados será iniciada mediante aprovação do Laboratório e Comitê de Ética em Pesquisa (via Plataforma Brasil). Nenhum dado, que possa identificar os pacientes serão coletados e ficarão sob posse e guarda do pesquisador responsável por 5 anos, e após esse período serão destruídos. Ressaltamos ainda, que os dados serão mantidos em absoluto sigilo de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde no. 466/2012, que trata da pesquisa envolvendo seres humanos. Salientamos em tempo, que as informações serão utilizadas tão somente para este estudo. Na certeza de contarmos com a colaboração, agradecemos antecipadamente à atenção e colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.



Heidi Plutzenreuter Carstens

Pesquisadora responsável do Projeto

Esta instituição está de acordo em coparticipar do presente projeto de pesquisa e está ciente de suas corresponsabilidades e de seu compromisso no resguardo do bem-estar dos participantes da pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura para garantir tal bem-estar e segurança. Os pesquisadores participantes desta pesquisa e que terão acesso aos dados são: Heidi Plutzenreuter Carstens (pesquisadora principal), Gilmar Erzinger (Orientador), Andreza Ramos da Silva e Bruna da Roza Pinheiro. Nomes não citados terão acesso vedado à instituição.

Concordo com a solicitação

Não concordo com a solicitação



Assinatura do responsável na Instituição

Nome completo: PAULO CESAR GIMENES HIDALGO

CNPJ da empresa: 010168920001-81

Joinville, 20 de julho de 2021.

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada **“AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS PLASMÁTICOS EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 E TIPO 2 NA CIDADE DE JOINVILLE-SC”**, coordenada pelo professor Gilmar Sidnei Erzinger. Este projeto de pesquisa tem por objetivo a avaliação da microbiota intestinal e os mediadores inflamatórios plasmáticos de pacientes com Diabetes Mellitus tipos 1 e 2 na cidade de Joinville-SC. Solicitamos sua colaboração para preenchimento de um questionário e coleta de dados referente a dados pessoais, dados antropométricos e tratamento medicamentoso. Após 5 anos, o questionário será incinerado. Com os resultados obtidos a partir do estudo, será possível compreender a microbiota de pacientes diabéticos da cidade e propor futuras pesquisa nesta área. Os riscos deste projeto são mínimos, posto que as amostras já foram coletadas pelo laboratório clínico e seriam descartadas pelo mesmo após a realização dos exames. Não haverá uso de sua imagem ou voz nesta pesquisa. Solicitamos a sua colaboração e sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo absoluto. **ATENÇÃO:** Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, você não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo ou resolva a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo (se for o caso). Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa. Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para a pesquisadora Heidi Pfutzenreuter Carstens pelo telefone (47) 99657-9117 em qualquer dia e horário. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da Univille. Endereço – Rua Paulo Malschitzki, 10 - Bairro Zona Industrial - *campus* Universitário – CEP 89219-710 Joinville – SC ou pelo telefone (47) 3461-9235.

Após ser esclarecido(a) sobre as informações do projeto, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assinie o consentimento de participação do sujeito, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

Pesquisador responsável: Nome: HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS

Assinatura: _____

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO DO SUJEITO

Eu, _____, abaixo assinado, concordo em participar do presente estudo como participante da pesquisa e declaro que fui devidamente informado e esclarecido sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos.

Local e data: _____

Assinatura do Sujeito ou Responsável legal: _____

Telefone para contato: _____

ANEXO C

FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE - FURJ
UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE



Carta de anuência e autorização da coordenação

Solicitamos autorização para realização de pesquisa intitulada 'AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS PLASMÁTICOS EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 E TIPO 2 NA CIDADE DE JOINVILLE-SC, a ser desenvolvida no Laboratório de Análises Clínicas da Univille, vinculado ao curso de Farmácia da Univille, sob orientação do professor Dr. Gilmar Sidnei Erzinger e responsabilidade da pesquisadora Msc. Heidi Pfutzenreuter Carstens e que utilizará a seguinte metodologia:

Serão avaliados 60 pacientes divididos em 3 grupos: não-diabéticos, diabéticos tipo 1 e diabéticos tipo 2. Serão classificados como pacientes não-diabéticos os que apresentarem níveis normais de glicemia de jejum e HbA1c de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes e não utilizarem medicamentos hipoglicemiantes orais ou insulinoterapia. Serão considerados pacientes diabéticos os que apresentarem alterações nos exames de HbA1c e glicemia de jejum de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes. Serão alocados em DM2 os pacientes que utilizam hipoglicemiantes orais e DM1 pacientes que fazem uso só de insulinoterapia, além do diagnóstico auto-relatado. Esta classificação se dará inicialmente pelo questionário aplicado ao paciente (tipo de diabetes auto-relatado e perfil da terapia utilizada) e confirmada com os resultados dos testes de HbA1c e glicemia de jejum.

As amostras de soro e sangue total serão coletadas entre os meses de agosto e setembro de 2021 e armazenadas sob refrigeração no Laboratório Gimenes sediado em Joinville-SC, até a realização dos exames de Hemoglobina Glicada A1c e Glicemia de jejum. Após isso o soro será encaminhado para realização dos parâmetros bioquímicos e imunológicos no Laboratório de Análises Clínicas da Univille. As amostras de fezes serão armazenadas a -80°C até a extração do DNA e quantificação das espécies bacterianas no Laboratório de Biologia Molecular da Univille e serão descartadas de acordo com as normas sanitárias após a análise. Os participantes que forem incluídos na pesquisa, responderão a um questionário com informações auto-relatadas sobre sexo, peso, altura, tempo do diagnóstico, tipo do diabetes e medicamentos utilizados. O estado nutricional será classificado pelo IMC, com base nos pontos de corte propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020), sendo peso normal IMC >18,5 e < 25 kg/m² sobrepeso IMC 25 kg/m² e <30kg/m² e obesidade para IMC30 kg/m², baseados no auto-relato de peso e altura.

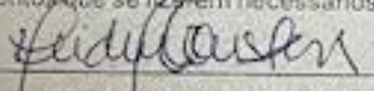
EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA: O DNA microbiano será extraído a partir de 180 a 220mg de amostra fecal através do kit QiAmp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen), de acordo com o procedimento do fabricante. Após a extração, a concentração do DNA bacteriano será mensurada por espectrofotômetro e a relação 260/280 será utilizada para checagem da pureza do extrato.

QUANTIFICAÇÃO MICROBIOTA: A microbiota *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* e *Bifidobacterium spp.* será quantificada por PCR quantitativo. As curvas de calibração serão estabelecidas a partir de DNA genômico de cepas de *F. prausnitzii*, *Bacteroides thetaioamicron*, *A. muciniphila* e *Bifidobacterium adolescentis*. PCR quantitativo (qPCR) utilizando TaqMan® Universal PCR Master Mix, SYBR® Green PCR Master Mix 50ng de DNA genômico extraído de cada amostra fecal.

AVALIAÇÃO PAR METROS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS: Os valores de hemoglobina glicosilada A1c e glicose plasmática serão adquiridos através do banco de

dados do Laboratório Gimenes. O método utilizado para realização é HPLC para HBA1c por automação e a glicemia é realizada por automação ADVIA 1800 Siemens. Para os pacientes que não tiverem HBA1c ou glicemia como resultados realizados, as amostras serão submetidas a análise pela mesma metodologia, no referido laboratório. A quantificação da Proteína C Reativa será realizada através de PCR Ultrassensível por imunoturbidimetria em automação pelo equipamento Respos 910 Biosys®. A quantificação das interleucinas IL-1, IL-6, IL-10 e IL-17, além dos marcadores imunológicos LPS e C5a serão realizadas por enzima imuno-ensaio (ELISA) - kit comercial.

A coleta de dados será iniciada mediante aprovação do Laboratório e Comitê de Ética em Pesquisa (via Plataforma Brasil). Nenhum dado, que possa identificar os pacientes serão coletados e ficarão sob posse e guarda do pesquisador responsável por 5 anos, e após esse período serão destruídos. Ressaltamos ainda, que os dados serão mantidos em absoluto sigilo de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde no. 466/2012, que trata da pesquisa envolvendo seres humanos. Salientamos em tempo, que as informações serão utilizadas tão somente para este estudo. Na certeza de contarmos com a colaboração, agradecemos antecipadamente a atenção e colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.



Heidi Plutzenreuter Carstens

Pesquisadora responsável do Projeto

Esta coordenação está de acordo em permitir a utilização do Laboratório de Análises Clínicas no presente projeto de pesquisa e está ciente de suas corresponsabilidades e de seu compromisso no resguardo do bem-estar dos participantes da pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura para garantir tal bem-estar e segurança. Os pesquisadores participantes desta pesquisa e que terão acesso aos dados são: Heidi Plutzenreuter Carstens (pesquisadora principal), Gilmar Erzinger (Orientador), Andreza Ramos da Silva e Bruna da Roza Pinheiro. Nomes não citados terão acesso vedado à instituição.

- () Concordo com a solicitação
() Não concordo com a solicitação



Assinatura da coordenadora do Curso de Farmácia

Nome completo: Melina Zetola

Joinville, 11 de agosto de 2021

ANEXO D



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS PLASMÁTICOS EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 E TIPO 2 NA CIDADE DE JOINVILLE-SC

Pesquisador: HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 48501521.0.0000.5366

Instituição Proponente: FUNDACAO EDUCACIONAL DA REGIAO DE JOINVILLE - UNIVILLE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDACAO EDUCACIONAL DA REGIAO DE JOINVILLE - UNIVILLE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.927.529

Apresentação do Projeto:

Informado no Parecer Consubstanciado do CEP – Número 4.855.231.

Objetivo da Pesquisa:

Informado no Parecer Consubstanciado do CEP – Número 4.855.231.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Informado no Parecer Consubstanciado do CEP – Número 4.855.231.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Informado no Parecer Consubstanciado do CEP – Número 4.855.231.

PENDÊNCIA 3: Solicita-se que o pesquisador informe o tempo de guarda e posse dos documentos gerados pela pesquisa, assim como, a garantia de sigilo na guarda destes documentos por parte da pesquisadora responsável (Res. CNS 466/12, item XI.2 – f);

RESPOSTA: Em adequação a CNS 466/12 e ao parecer consubstanciado do CEP/UNIVILLE, foi incluída na metodologia a forma de manutenção e guarda dos dados, período de armazenamento, sigilo na guarda e descrição do descarte dos mesmo após o período de 5 anos.

Nota: Alteração realizada na Metodologia, parágrafo V, item 5.5. O projeto com a adequação foi disponibilizado pela Plataforma Brasil.

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, nº 10. Bloco B, Sala 119. Campus Bom Retiro

Bairro: Zona Industrial

CEP: 89.219-710

UF: SC

Município: JOINVILLE

Telefone: (47)3461-9235

E-mail: comitetica@univille.br



UNIVERSIDADE DA REGIÃO
DE JOINVILLE UNIVILLE



Continuação do Parecer: 4.927.529

ANÁLISE: PENDENCIA ATENDIDA

PENDÊNCIA 4: No cronograma apresentado no documento

"PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1778162.pdf" lê-se "Coleta das amostras e dados - 01/08/2021 a 30/09/2021". No documento "PROJETO_HEIDI_CARSTENS.pdf" lê-se "Coleta das amostras e dados - Agosto a Outubro de 2021". Solicita-se à pesquisadora apresentar cronograma com o período correto de coleta dos dados. Inserir no projeto original (brochura pesquisador) e plataforma brasil. Reenviar documento para que possamos checar (CNS - Norma Operacional nº 001, item 3.3 – f);

RESPOSTA: Em adequação ao parecer consubstanciado do CEP/UNIVILLE, foi alterada a divergência na data do cronograma.

Nota: alteração realizada nas informações básicas do projeto e no cronograma do projeto.

ANÁLISE: PENDENCIA ATENDIDA

PENDÊNCIA 6: No TCLE, solicita-se ao pesquisador.

Reenviar documento para checagem documental:

a) esclarecer todos os procedimentos que serão utilizados na coleta de dados do participante, incluindo que haverá armazenamento das amostras e para qual finalidade (Res. CNS 466/12, item IV.3.a);

b) garantir o sigilo e anonimato das informações obtidas dos participantes; (Res. CNS 466/12, item IV.3);

c) incluir, também, o e-mail do CEP Univille para contato, comitetica@univille.br, telefone 47-34619235, horário comercial (Res. CNS 466/12, IV.5.d);

d) substituir a palavra "sujeito" por "participante da pesquisa".

RESPOSTA: Em relação ao item A, os procedimentos utilizados na coleta de dados e amostras dos participantes foram incluídos no TCLE. Sobre o armazenamento posterior das amostras biológicas, conforme já retificado na pendência 2, não haverá armazenamento posterior a esta pesquisa das amostras dos participantes. As informações dos itens B e C foram acrescentadas ao TCLE. De

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, nº 10. Bloco B, Sala 119. Campus Bom Retiro
Bairro: Zona Industrial **CEP:** 89.219-710
UF: SC **Município:** JOINVILLE
Telefone: (47)3461-9235 **E-mail:** comitetica@univille.br

Página 02 de 05



UNIVERSIDADE DA REGIÃO
DE JOINVILLE UNIVILLE



Continuação do Parecer: 4.927.529

acordo com o item D a palavra "sujeito" foi substituída.

Nota: Foi disponibilizada o novo documento 'TCLE' com as adequações descritas acima.

ANÁLISE: Adequações solicitadas foram realizadas. PENDENCIA ATENDIDA. Entretanto observa-se que a assinatura do participante está em página separada dos esclarecimentos. Orienta-se para que o TCLE seja formato em uma única página, caso não seja possível, incluir no documento a informação para que o participante rubrique todas as páginas do documento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

PENDÊNCIA 1: Na metodologia proposta no documento

"PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1778162.pdf" lê-se "Os participantes que forem incluídos na pesquisa, responderão a um questionário (ANEXO II)". Solicita-se à pesquisadora apresentar o questionário que será utilizado no estudo proposto (Res. CNS 466/12, item XI.2 – e);

RESPOSTA: O questionário foi anexado como documento do projeto sob o título "Questionario_doc_heidi.pdf" .

ANÁLISE: No referido documento observa-se um questionário que contém informações a serem fornecidas pelo participante como peso, altura, uso de antibiótico e de medicamentos para diabetes, além de informações referentes às dosagens laboratoriais. PENDENCIA ATENDIDA

PENDÊNCIA 2: Na metodologia proposta no documento

"PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1778162.pdf" lê-se "...o soro será encaminhado para realização dos parâmetros bioquímicos e imunológicos e posterior armazenagem sob congelamento (-20° C) no Laboratório de Análises Clínicas da Univille por 5 anos. As amostras de fezes ... e depois serão armazenados a -20° C por 5 anos no Laboratório de Análises Clínicas da Univille." Solicita-se à pesquisadora esclarecer a finalidade do armazenamento das amostras e quem será o responsável pelo material armazenado no Laboratório de Análises Clínicas da Univille (Res. CNS 466/12, item III.2 – q; Norma Operacional nº 001, item 3.4.2 – b);

RESPOSTA: Retifico que as amostras biológicas serão armazenadas sob congelamento somente até a realização das análises. A guarda será de responsabilidade da pesquisadora Heidi Pfitzenreuter Carstens.

Nota: Alteração realizada na Metodologia, parágrafo V item 5.4 e nas informações básicas do projeto (Plataforma Brasil). O projeto com a adequação foi disponibilizado pela Plataforma Brasil.

ANÁLISE: PENDENCIA ATENDIDA

PENDÊNCIA 5: Apresentar a Folha de rosto totalmente preenchida, incluindo o campo 10 do

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, nº 10. Bloco B, Sala 119. Campus Bom Retiro

Bairro: Zona Industrial

CEP: 89.219-710

UF: SC

Município: JOINVILLE

Telefone: (47)3461-9235

E-mail: comitetica@univille.br



UNIVERSIDADE DA REGIÃO
DE JOINVILLE UNIVILLE



Continuação do Parecer: 4.927.529

documento (CNS - Norma Operacional no 001, item 3.3 – a);

RESPOSTA: Em adequação ao parecer consubstanciado do CEP/UNIVILLE, o campo 10 da folha de rosto foi preenchido.

Nota: Foi disponibilizada o novo documento 'Folha_de_rosto_Revisada.pdf' com todos os campos preenchidos.

ANÁLISE: PENDENCIA ATENDIDA

PENDÊNCIA 7: Apresentar as Cartas de anuência do Laboratório Gimenes e da coordenação do Laboratório de Análises Clínicas da Univille, datadas e assinadas pelos responsáveis. Inserir nome completo do gestor do local e não apenas solicitar assinatura (Res. CNS 466/12, item XI.2 – e).

RESPOSTA: Em adequação a CNS 466/12 e ao parecer consubstanciado do CEP/UNIVILLE, foram incluídos nos documentos do projeto as cartas de anuência do Laboratório Gimenes (arquivos "Gimenes1.pdf", "Gimenes2.pdf" e "Gimenes3.pdf" e da Coordenação do Laboratório de Análises Clínicas da Univille ("Coordenacao_Farmacia1.pdf" e "Coordenacao_Farmacia2.pdf").

ANÁLISE: PENDENCIA ATENDIDA

Recomendações:

Observa-se, no TCLE, que a assinatura do participante de pesquisa está em página separada dos esclarecimentos. Orienta-se para que o TCLE seja formato em uma única página, caso não seja possível, incluir no documento a informação para que o participante rubrique todas as páginas do documento assinando na página final.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto "AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS PLASMÁTICOS EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 E TIPO 2 NA CIDADE DE JOINVILLE-SC", sob CAAE "48501521.0.0000.5366" teve suas pendências esclarecidas pelo (a) pesquisador(a) "HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS", de acordo com a Resolução CNS 466/12 e complementares, portanto, encontra-se APROVADO.

Informamos que após leitura deste parecer, é imprescindível a leitura do item "O Parecer do CEP" na página do Comitê no site da Univille, pois os procedimentos seguintes, no que se refere ao enquadramento do protocolo, estão disponíveis na página. Segue o link de acesso https://www.univille.edu.br/pt_br/institucional/proreitorias/prppg/setores/coordenacao_pesquisa/comite_etica_pesquisa/s

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, nº 10. Bloco B, Sala 119. Campus Bom Retiro
Bairro: Zona Industrial **CEP:** 89.219-710
UF: SC **Município:** JOINVILLE
Telefone: (47)3461-9235 **E-mail:** comitetica@univille.br

Continuação do Parecer: 4.927.529

tatus-parecer/645062.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade da Região de Joinville - Univille, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1778162.pdf	18/08/2021 23:20:30		Aceito
Outros	Questionario_doc_Heidi.pdf	18/08/2021 23:19:05	HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS	Aceito
Outros	Carta2_Resposta_CEP_Microbiota.pdf	18/08/2021 23:08:11	HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS	Aceito
Outros	Coordenacao_Farmacia2.pdf	18/08/2021 23:04:46	HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS	Aceito
Outros	Coordenacao_Farmacia1.pdf	18/08/2021 23:04:26	HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS	Aceito
Outros	Gimenes3.pdf	18/08/2021 23:04:05	HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS	Aceito
Outros	Gimenes2.pdf	18/08/2021 23:03:45	HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS	Aceito
Outros	Gimenes1.pdf	18/08/2021 23:03:16	HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DOC_HEIDI_CARSTENS_REVISADO.pdf	18/08/2021 22:46:27	HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_Heidi_REVISADO.pdf	18/08/2021 22:42:41	HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_revisada.pdf	18/08/2021 22:39:27	HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS	Aceito

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, nº 10. Bloco B, Sala 119. Campus Bom Retiro

Bairro: Zona Industrial

CEP: 89.219-710

UF: SC

Município: JOINVILLE

Telefone: (47)3461-9235

E-mail: comitetica@univille.br



UNIVERSIDADE DA REGIÃO
DE JOINVILLE UNIVILLE



Continuação do Parecer: 4.927.529

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOINVILLE, 24 de Agosto de 2021

Assinado por:

**Marcia Luciane Lange Silveira
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Paulo Malschitzki, nº 10. Bloco B, Sala 119. Campus Bom Retiro

Bairro: Zona Industrial

CEP: 89.219-710

UF: SC

Município: JOINVILLE

Telefone: (47)3461-9235

E-mail: comitetica@univille.br

APÊNDICE A – Dados Brutos

Dados características clínicas						
Não Diabéticos						
Paciente	Idade	Peso	Altura	IMC	Glicemia	HbA1c
1	44	91	1,78	28,7	84	4,9
2	83	68	1,58	27,2	73	5,5
3	68	66	1,6	25,8	90	5
4	70	76	1,7	26,3	87	5,6
5	12	32	1,4	16,3	98	4,6
6	83	62	1,6	24,2	91	5
7	67	86	1,7	29,8	78	5,4
8	15	44	1,59	17,4	74	4,7
9	69	67	1,6	26,2	87	5,3
10	46	22	1,21	15,0	84	5,2
11	77	27	1,31	15,7	85	4,8
12	32	85	1,73	28,4	80	5
13	67	60	1,65	22,0	96	5,7
14	28	56	1,65	20,6	80	4,9
15	33	63	1,68	22,3	71	5
16	43	62	1,61	23,9	89	5,5
17	27	70	1,65	25,7	94	5,8
18	35	91	1,58	36,5	85	5,7
19	47	63	1,63	23,7	96	5,6
20	40	75	1,71	25,6	90	5,1
21	32	77	1,75	25,1	85	5,2
22	24	60	1,7	20,8	81	4,7
23	22	80	1,65	29,4	91	4,9
24	65	78	1,8	24,1	98	5,9
25	43	75	1,6	29,3	77	5,2
26	35	97	1,65	35,6	81	6
27	27	55	1,57	22,3	94	5,6
28	46	82	1,86	23,7	93	5,6
29	41	84	1,74	27,7	97	5,4
30	54	77	1,77	24,6	88	5,3
31	42	57	1,66	20,7	72	5,4
32	43	80	1,78	25,2	88	5,6
33	44	59	1,54	24,9	83	5,6

Dados características clínicas						
Diabéticos						
Paciente	Idade	Peso	Altura	IMC	Glicemia	HBa1c
1	63	80	1,6	31,3	119	6,5
2	47	102	1,8	31,5	195	8,2
3	73	85	1,6	33,2	160	6,3
4	53	84	1,65	30,9	127	7,1
5	85	82	1,78	25,9	154	6,3
6	74	83	1,63	31,2	139	6,2
7	51	77	1,75	25,1	133	6,8
8	64	93	1,75	30,4	160	6,3
9	56	82	1,55	34,1	121	10,3
10	62	93	1,75	30,4	231	9,5
11	72	74	1,59	29,3	101	6,5
12	50	85	1,62	32,4	112	6,6
13	45	78	1,7	27,0	163	7,7
14	57	70	1,75	22,9	122	6,1
15	62	107	1,78	33,8	135	6,8
16	42	98	1,74	32,4	183	8,6
17	62	70	1,58	28,0	144	7,4
18	46	60	1,6	23,4	215	6,3
19	43	107	1,65	39,3	245	11,5
20	44	120	1,9	33,2	310	13,7
21	37	108	1,87	30,9	199	7,7
22	67	92	1,65	33,8	112	6,7
23	51	80	1,81	24,4	294	11,3
24	64	78	1,6	30,5	120	7,6
25	45	80	1,6	31,3	159	9,1
26	55	75	1,67	26,9	258	11,1
27	62	76	1,58	30,4	139	8,1
28	71	76	1,73	25,4	102	6,9
29	73	101	1,84	29,8	196	7,9
30	84	88	1,57	35,7	111	7,5
31	81	92	1,76	29,7	129	7
32	52	105	1,78	33,1	112	7,2
33	91	66	1,62	25,1	125	6,2
34	40	85	1,7	30,1	106	6,2

Dados marcadores bioquímicos			
Não Diabéticos			
Paciente	Ferritina ng/mL	PCR mg/dL	Albumina g/dL
1	200,11	1,96	3,55
2	18,56	1,92	3,24
3	21,92	1,92	2,37
4	251,4	1,92	3,82
5	90,87	1,95	3,53
6	139,63	1,92	3,55
7	440,65	1,92	4,22
8	44,22	2,61	3,09
9	16,9	1,92	3,27
10	197,01	1,92	2,58
11	18,16	1,92	5,15
12	471,02	1,92	3,58
13	97,55	2,65	3,08
14	39,05	1,92	3,8
15	94,23	2,7	5,28
16	30,64	2,56	4,69
17	202,51	7,2	4,23
18	37,87	1,92	4,99
19	198,34	1,92	2,45
20	23,4	1,92	2,2
21	51,6	47,9	2,45
22	245,8	1,92	3,2
23	78,5	9,45	2,7
24	140,6	5,9	2,5
25	387,9	1,92	2,99
26	58,9	1,92	3,07
27	134,6	2,88	4,2
28	85,6	7,22	4,13
29	175,9	4,33	2,98
30	567,45	1,92	3,3
31	99,6	2,4	3,83
32	67,8	2,4	5,27
33	142,5	1,92	3,14

Dados marcadores bioquímicos			
Diabéticos			
Paciente	Ferritina ng/mL	PCR mg/dL	Albumina g/dL
1	416,18	35,2	3,48
2	527,36	1,92	3,13
3	16,73	1,92	2,91
4	55,01	3,75	3,66
5	279,4	1,92	3,87
6	277,58	1,93	3,61
7	279,47	1,92	4,21
8	1527,93	2,58	4,29
9	118,34	4,7	3,82
10	41,74	10,33	3,61
11	34,43	1,53	3,32
12	1473,09	52,04	3,74
13	473,18	3,82	3,12
14	516,48	2,61	2,7
15	1852,83	35,42	3,33
16	1962,59	56,46	3,27
17	2000	38,54	3,55
18	1728,25	17,6	3,52
19	510,65	3,35	2,82
20	45,7	2,78	5,09
21	145,8	6,5	2,83
22	346,8	1,86	3,23
23	244,76	35,3	1,78
24	489,9	1,92	3,84
25	178,6	170,8	2,26
26	32,6	15,3	3,4
27	76,5	11,82	3,27
28	768,8	5,9	2,72
29	1734,6	151,2	1,73
30	345,7	9,45	2,57
31	1456,2	3,45	1,91
32	367,9	8,67	3,58
33	134,5	1,92	3,98
34	342,5	6,09	4

Dados marcadores imunológicos e LPS					
Não Diabéticos					
Paciente	IL-1 beta pg/mL	C5A pg/mL	IL-10 pg/mL	LPS (ug/mL)	FR
1	43,28	1043,33	1	0,29	Neg
2	43,28	916,67	30,53	0,34	Neg
3	231,51	1451,67	1	0,43	Neg
4	27,1	953,33	1	0,39	Neg
5	65,34	653,33	2,41	0,38	Neg
6	98,72	840,83	1	0,29	Neg
7	164,75	722,5	9,28	0,22	Neg
8	24,9	525	1	0,25	Neg
9	52,4	993,33	1	0,12	Neg
10	285,04	1120,83	1	0,18	Neg
11	150,93	825	18,66	0,26	Neg
12	285,34	810,83	9,28	0,2	Neg
13	267,25	693,33	3,03	0,19	Neg
14	117,69	627,5	8,34	0,82	Neg
15	0	704,17	1	0,2	Neg
16	0	789,17	1	0,28	Neg
17	9,31	515	1	0,26	Neg
18	125,49	745,83	1	0,22	Neg
19	20,04	590,83	1	0,47	Neg
20	0	660	1	0,19	Neg
21	119,6	513,33	7,09	0,28	1:4
22	149,01	645	5,84	0,35	Neg
23	5,04	502,5	10,22	0,24	Neg
24	1,07	309,17	1	0,24	Neg
25	9,9	660	1	0,23	Neg
26	0	381,67	1	0,27	Neg
27	0	344,17	8,34	0,28	Neg
28	33,13	449,83	13,66	0,4	Neg
29	137,99	720,83	8,66	0,35	Neg
30	99,46	360,83	1	0,39	Neg
31	0	545	3,34	0,39	Neg
32	0	267,5	76,47	0,42	Neg
33	0	369,17	1	0,31	Neg

Dados marcadores imunológicos e LPS					
Diabéticos					
Paciente	IL-1 beta pg/mL	C5A pg/mL	IL-10 pg/mL	LPS (ug/mL)	FR
1	1,51	431,67	2,09	0,28	Neg
2	104,16	382,5	1	0,3	Neg
3	15,04	801,67	1	0,67	Neg
4	225,78	705,83	18,34	0,42	Neg
5	25,19	934,17	1	0,58	Neg
6	0	830,83	1	0,53	Neg
7	33,13	591,67	1	0,93	1:1
8	119,31	635	1	0,8	Neg
9	34,75	802,5	8,66	0,55	1:4
10	9,31	745,83	80,53	0,63	1:4
11	123,28	1055,83	1	0,7	Neg
12	33,13	931,67	1	0,6	Neg
13	303,42	648,33	1	0,6	Neg
14	22,99	985	1	0,35	Neg
15	21,51	707,5	23,97	0,32	1:4
16	48,57	902,5	1	0,52	Neg
17	77,1	541,67	5,22	0,83	Neg
18	165,48	676,67	1	0,28	Neg
19	172,39	602,5	1	0,35	Neg
20	38,72	494,17	1	0,4	1:16
21	0	503,33	1	0,37	Neg
22	203,28	547,5	1	0,9	Neg
23	20,78	580	1	0,42	Neg
24	0	792,5	1	0,26	Neg
25	4,75	896,67	19,28	0,76	Neg
26	142,84	673,33	1	0,74	Neg
27	246,96	630	19,59	0,32	1:4
28	289,015	652,5	1	0,46	Neg
29	0	640	5,22	0,39	Neg
30	111,37	451,67	1	0,48	Neg
31	228,28	660	1	0,45	Neg
32	0	494,17	1	0,38	Neg
33	23,87	554,17	1	0,3	Neg
34	0	500,83	1	0,37	Neg

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) a disponibilizar em ambiente digital institucional, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/IBICT) e/ou outras bases de dados científicas, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto integral da obra abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data 02/02/2023.

1. Identificação do material bibliográfico: (X) Tese () Dissertação () Trabalho de Conclusão

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor: HEIDI PFÜTZENREUTER CARSTENS

Orientador: PROF. DR. GILMAR SIDNEI ERZINGER

Data de Defesa: 30/11/2022

Título: INTER-RELAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL, MARCADORES INFLAMATÓRIOS PLASMÁTICOS E IMUNOLÓGICOS EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS NA CIDADE DE JOINVILLE-SC

Instituição de Defesa: UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE - Univille

3. Informação de acesso ao documento:

Pode ser liberado para publicação integral (X) Sim () Não

Havendo concordância com a publicação eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese, dissertação ou relatório técnico.


Assinatura do autor

Joinville, 02 de fevereiro de 2023.

Local/Data