UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Determinação dos óxidos de colesterol em pacientes diabéticos e intolerantes à glicose

Simone Ferderbar

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Titular Dulcineia S.P. Abdalla

São Paulo
2004

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Ferderbar, Simone
F347d Determinação dos óxidos de colesterol em pacientes diabéticos e intolerantes à glicose / Simone Ferderbar. -- São Paulo, 2004.
92p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Abdalla, Dulcineia Saes Parra

1. Bioquímica clínica 2. Diabete : Medicina I. T. II. Abdalla, Dulcineia Saes Parra, orientador.

616.0756 CDD

Simone Ferderbar

Determinação dos óxidos de colesterol em pacientes diabéticos e intolerantes à glicose

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Titular. Dulcineia S.P. Abdalla
orientador/presidente

_____
1°. examinador

_____
2°. examinador

São Paulo, _____ de _____.

"Quando pensamos que sabemos todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas".

Agradecimentos

À Prof.ª Titular Dulcineia Saes Parra Abdalla, meus sinceros agradecimentos por toda a orientação e pela valiosa oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Hélio Alexandre Stefani pela confiança e por permitir a realização de alguns experimentos em seu laboratório.

Ao Prof. Dr Etelvino Bechara por permitir a utilização de equipamentos de seu laboratório, e não poderia esquecer de agradecer a técnica do laboratório- Adriana, pelo seu auxílio e atenção.

À Profª Drª Sílvia Berlanga, sua aluna de pós- graduação- Tânia e sua técnica Clarissa, pelo auxílio e atenção prestadas.

Aos meus amigos de laboratório, Eder, Patrícia, Isabela, Nágila, Edimar, Edgar, Elaine, Joelma, Kátia e as mais novas integrantes Daniela e Vanuska, obrigada pela força, pelos momentos de alegrias e por escutarem meus desabafos.....

Às estagiárias Andréia e Kaori pela ajuda e dedicação.

Aos meus amigos de pós-graduação John, Antônio, Ricardo, Carol, Carlindo, Diogo, Iguatemi e André, pela amizade,pelas risadas e pelas lágrimas...

Aos meus amigos do Instituto de Química/USP, Adriana, Ana, Ernani, Karina, Vanessa e é claro não poderia deixar de lembrar..... do Prof. Dr. Pio, pelos momentos de desabafo e descontração....o meu muito obrigada.

Às secretárias Ana, Dora, Márcia e Sueli do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, obrigado pelo auxílio

À equipe do ambulatório de Endocrinologia da Irmandade Santa Casa de São Paulo e à equipe do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia- Laboratório de lípides, obrigada pela colaboração.

Aos Drs Antônio Ricardo Gagliardo e Hermes Xavier Toros, obrigado pela ajuda no momento em que mais precisei.

O meu muito obrigado aos voluntários que participaram, sem os quais não seria possível a realização deste estudo.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo e pelo apoio financeiro.

Finalmente meus sinceros agradecimentos a todos que possibilitaram de forma direta ou indiretamente a realização deste estudo.

Dedico aos.....
.....meus pais pelo incentivo e por respeitarem a minha escolha....
A minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	**v**
LISTA DE TABELAS	**vii**
LISTA DE FIGURAS	**viii**
LISTA DE ABREVIATURAS	**x**
LISTA DE SÍMBOLOS	**xiii**
RESUMO	**xiv**
ABSTRACT	**xv**
1.0.-INTRODUÇÃO	**01**
1.1.- Formação de Óxidos de colesterol	**01**
1.1.1.- Formação de óxidos de colesterol por via enzimática	**01**
1.1.2.- Formação de óxidos de colesterol por via radicalar	**02**
1.1.3.- Fontes de óxidos de colesterol *in vivo*	**05**
1.2.- Efeitos biológios dos óxidos de colesterol	**06**
1.2.1.- Citotoxicidade e Aterogenicidade	**06**
1.2.2- Efeito dos óxidos de colesterol na produção óxido nítrico	**08**
1.2.3.- Diabetes, estresse oxidativo e óxidos de colesterol	**09**
2.0.- OBJETIVO	**19**
2.1.1.-Objetivo geral	**19**
2.1.2.-Objetivos específicos	**19**
3.0.-MATERIAL E MÉTODOS	**20**
3.1.1.- Pacientes	**20**
3.1.2- Critérios de inclusão	**22**
3.1.3.- Critérios de exclusão	**22**
3.1.4.- Critérios de interrupção do estudo	**23**
3.2. -Determinação dos parâmetros glicêmicos e lipídicos	**23**
3.3.-Metodologia analítica de quantificação dos óxidos de colesterol	**24**
3.3.1.- Preparação dos padrões	**24**
3.3.2.- Preparação da amostra	**24**
3.3.3- Determinação por Cromatografia gasosa com ionização de chama (GC-FID)	**25**

3.3.4.- Determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS) **25**
3.4.- Determinação de Nitrotirosina **27**
3.5.- Análise estatística **28**
4.0.- RESULTADOS **29**
4.1.1.- Validação do Método **29**
4.1.2.- Espectros de massa dos óxidos de colesterol (padrões) **29**
4.1.3.- Espectros de massa dos óxidos de colesterol presentes no plasma **34**
4.1.4.- Curvas de Calibração dos óxidos de colesterol **37**
4.1.5.- Limite de detecção dos óxidos de colesterol **37**
4.2.-Curva de calibração de nitrotirosina **40**
4.3.- Análise dos parâmetros glicêmicos. **40**
4.4.- Análise dos parâmetros lipídicos. **44**
4.5.- Quantificação dos óxidos de Colesterol. **47**
4.6.-Determinação de nitrotirosina **52**
4.7.- Correlações **53**
5.0.-DISCUSSÃO **58**
6.0.- CONCLUSÃO **69**
7.0.-ANEXOS **71**
7.1.-ANEXO A **71**
7.2.-ANEXO B **75**
7.3.-ANEXO C **79**
8.0.-REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS **81**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.-Informações relativas aos pacientes estudados **21**

Tabela 2.-Coeficiente de correlação da regressão linear das curvas de calibração dos Cox **37**

Tabela 3.- Limite de detecção dos COx determinado pela técnica de GC-MS **37**

Tabela 4.-Determinação da Frutosamina plasmática (mmol/L) **43**

Tabela 5.-Concentração de triglicérides, HDL, LDL e VLDL no plasma dos pacientes dos grupos C1 , DM1 , C2 ,DM2 e IGT **45**

Tabela 6.-Concentração de triglicérides, HDL, LDL e VLDL no plasma dos DM1, DM2 e IGT **46**

Tabela 7.- Concentração plasmática dos óxidos de colesterol nos grupos de DM2 que faz uso da associação de hipoglicemiante oral e insulina e o grupo que faz uso apenas de hipoglicemiante oral **51**

TABELA 8.-Correlações do grupo C2 **53**

TABELA 9.-Correlações do grupo DM1 **54**

TABELA 10.-Correlações do grupo DM2 **55**

TABELA 11.-Correlações do grupo IGT **56**

TABELA 12.-Correlações de COx Total/Grupo **57**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema da formação dos COx por via radicalar **04**

Figura 2.- Possível mecanismo bioquímico da morte da célula-β por EROs e citocinas **11**

Figura 3.-Conseqüências da ativação de PKC pela hiperglicemia **15**

Figura 4.- Possível ligação entre hiperglicemia , estresse oxidativo e formação de Cox **18**

Figura 5.-Organograma dos grupos estudados **22**

Figura 6.- Espectro de massa do 5α -colestano **29**

Figura 7.- Espectro de massa 7α-hidroxicolesterol (7 α-OH) **30**

Figura 8.- Espectro de massa do 7–cetocolesterol (7-Ceto) **30**

Figura 9.- Espectro de massa do colesterol β-epóxido (β-epóxido) **31**

Figura 10.- Espectro de massa do 25-hidroxicolesterol (25-OH) **32**

Figura 11.- Espectro de massa do 7β-hidroxicolesterol (7β-OH) **32**

Figura 12.- Espectro de massa do colestanotriol (Triol) **33**

Figura 13.- Espectro de massa do colesterol α-epóxido (α-epóxido) **33**

Figura 14.- Espectro de massa do α-epóxido (modo SIM) **34**

Figura 15.-Espectro de massa do colestanotriol (modo SIM) **34**

Figura 16.-Espectro de massa do 25-hidroxicolesterol (modo SIM) **35**

Figura 17.-Espectro de massa do 7-cetocolesterol (modo SIM) **35**

Figura 18.- Espectro de massa do 7-hidroxicolesterol (modo SIM) **36**

Figura 19.- Espectro de massa do β-epóxido (modo SIM) **36**

Figura 20-Formação de 3,5-colestadieno-7-one **39**

Figura 21.-Curva de Calibração de Nitrotirosina (nM) determinada por ELISA Competitivo **40**

Figura 22.- Determinação da glicose (mg/dL) nos grupos DM 1, DM 2 e IGT **41**
Figura 23.- Determinação da glicose. (mg/dL) nos grupos C 2, DM 2 e IGT **42**
Figura 24.- Determinação da glicose (mg/dL) nos grupos C1 e DM 1 **43**
Figura 25- Valores de hemoglobina glicada (%) nos grupos DM 1, DM2 IGT **44**
Figura 26.-Concentração plasmática dos óxidos de colesterol nos grupos DM 1, DM 2 e IGT **47**
Figura 27.-Concentração plasmática dos óxidos de colesterol nos grupos C2 ,DM 2 e IGT **48**
Figura 28.-Concentração plasmática dos óxidos de colesterol nos grupos C1 e DM 1 **49**
Figura 29.-Concentração plasmática do total dos óxidos de colesterol de cada grupo **50**
Figura 30.-Concentração plasmática de nitrotirosina **52**

LISTA DE ABREVIATURAS

β-epóxido: Colesterol β-epóxido

α-epóxido: Colesterol α-epóxido

25-OH: 25-Hidroxicolesterol

7β-OH:7β-Hidroxicolesterol

7α-OH:7α--Hidroxicolesterol

7-Ceto:7-Cetocolesterol

7-Ceto:dieno:3,5-colestadieno-7-one

AA:Ácido araquidônico

AGE: Produtos avançados da glicação

ALBNO:Albumina nitrada

BSTFA: Bis (trimetilsilil) trifluoracetamida

C1/C2:Controle

CAT: Catalase

CG: Cromatógrafo a gás

CuZnSOD: Superóxido dismutase Cobre e zinco dependente

DAG: Diacilglicerol

DM 1:Diabéticos tipo 1

DM 2:Diabéticos tipo 2

EDTA: Ácido etileno diaminotetra acético

eNOS:Óxido nítrico sintase endotelial

ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO: Espécies Reativas do Oxigênio

ET-1:Endotelina-1

FFA: Ácidos graxos livres

FID: Detector de ionização de chama

GC-MS: Cromatografia acoplada à espetrometria de massa

G-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócito

GM-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago

GPx: Glutationa peroxidase

Hb:Hemoglobina

HDL: Lipoproteína de alta densidade

ICA: Auto- Anticorpos contra as células das ilhotas

ICAM-1:Molécula de adesão intracelular

IFN-γ:Interferon gama

IGT: Intolereantes à glicose

IL-1:Interleucina-1

LDL eletronegativa (LDL$^-$) Lipoproteína de baixa densidade eletronegativa

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

MAPK: Proteína cinase ativada por mitógeno

M-CSF: Fator estimulador de colônia de macrófago

MnSOD: Superóxido dismutase Manganês dependente

NADP: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NF-kB:Fator nuclear kB

PKC: Proteína Quinase C

PMSF:Fenilmetil sulfonil fluoreto

RAGE: Receptores de produtos finais de glicaçãoSIM: Monitoramento de íons selecionados

SOD: Superóxido dismutase

TGF-β1:Fator transformador de crescimento beta 1

TMS: Timetilsilil

TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa

Triol:Colestan-3β, 5α, 6β-triol

VCAM: Molécula de adesão vascular

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\bullet}NO$:Óxido nítrico

$^{\bullet}OH$:Radical hidroxil

$^{1}O_2$:Oxigênio singlete

$^{3}O_2$:Oxigênio triplete

H_2O_2 :Peróxido de hidrogênio

$LO^{\bullet}$:Radical alcoxila

$LOO^{\bullet}$:Radical peroxila

$O_2^{\bullet-}$:Ânion radical superóxido

$ONOO^{-}$: Ânion Peroxinitrito

RESUMO

O estresse oxidativo pode desempenhar um papel importante na etiologia das complicações no diabetes mellitus. O aumento da produção de espécies oxidantes promove modificações em moléculas endógenas, incluindo o colesterol. Os óxidos de colesterol (Cox) são formados a partir da oxidação do colesterol, por processos enzimáticos e por processos mediados por radicais livres, apresentando importantes efeitos biológicos que podem contribuir para o desenvolvimento do processo aterosclerótico no diabetes. Nesse estudo determinou-se as concentrações dos Cox, em pacientes diabéticos e indivíduos intolerantes à glicose, para estabelecer se os COx são marcadores sensíveis da lipoperoxidação na intolerância à glicose e no diabetes As concentrações plasmáticas dos COx foram determinadas por GC-FID nos seguintes grupos: diabéticos tipo 1 (DM1), diabéticos tipo 2 (DM2), intolerantes à glicose (IGT) e normoglicêmicos (controles). As concentrações dos óxidos de colesterol totais foram mais elevadas nos grupos DM1 e DM2 em relação aos controles normoglicêmicos ($p<0,05$). As concentrações plasmáticas do 7α-hidroxicolesterol (7α-OH), 7β-hidroxicolesterol (7β-OH) e 25-hidroxicolesterol (25-OH) foram mais elevadas no grupo DM1 comparado ao grupo DM2 ($p<0.05$). A comparação entre os grupos controle, IGT e DM 2 indicou aumento significativo das concentrações de 7β-OH, colesterol-β-epóxido e colesterol-α-epóxido no grupo DM 2 ($p<0.05$). Portanto, os óxidos de colesterol podem ser considerados como um biomarcador sensível da lipoperoxidação para indicar a intensidade de modificação oxidativa dos lípides em pacientes diabéticos.

ABSTRACT

Oxidative stress can play an important role in the etiology of the complications of diabetes mellitus. The increase in the production of oxidant species promotes alterations in endogenous molecules, including cholesterol. Cholesterol oxides (COx) are formed by the oxidation of cholesterol by enzymatic processes or by processes involving free radicals. They present important biological effects that can contribute to the development of the atherosclerotic process in diabetes. In this study, the concentrations of the COx in diabetic patients and individuals who are intolerant to glucose was determined in order to establish whether the Cox are sensitive markers of lipoperoxidation in glucose intolerance and diabetes. Serum concentrations of the COx were determined by GC-FID in the following groups: Type 1 diabetics (DM1), type 2 diabetics (DM2), patients intolerant to glucose (IGT) and normoglycemic subjects (controls). The concentrations of total cholesterol oxides were found to be elevated in the DM1 and DM2 groups with respect to the normoglycemic subjects ($p<0.05$). The serum concentrations of 7α-hydroxicholesterol (7α-OH), 7β-hydroxicholesterol (7β-OH) and 25-hydroxicholesterol (25-OH) were found to be increased in the DM1 group with respect to the DM2 group ($p<0.05$). The comparison between the control, IGT and DM2 groups indicated a significant increase in the concentrations of 7β-OH, cholesterol-β-epoxide and cholesterol-α-epoxide in the DM2 group ($p<0.05$). In conclusion, cholesterol oxides could serve as suitable biomarker of lipoperoxidation to indicate the intensity of lipid oxidative mofications in diabetic patients.

1.0.-INTRODUÇÃO

1.1.- Formação dos óxidos de colesterol (COx)

O colesterol é um lipídeo insaturado, suscetível à oxidação na presença de luz, oxigênio, temperaturas elevadas, atividade de água, radiações, radicais livres, íons metálicos, agentes sensibilizantes, pH, entre outros fatores (Bösinger *et al*.,1993; Paniangvait *et al*.,1995; Smith, 1996). Os COx são um grupo de esteróis com estrutura similar à molécula de colesterol, contendo grupos cetona, hidroxila, ou epóxido em um dos anéis ou na cadeia lateral (Diane & Lin,1996). Podem ser formados através de reações enzimáticas, ou, por via radicalar, conforme discutido a seguir.

1.1.1.- Formação de COx por via enzimática

Os COx gerados *in vivo* podem ser originados a partir de reações enzimáticas intracelulares. Alguns são produzidos exclusivamente por esta via e podem parcialmente contribuir para a formação de outros (Javitt, 1990; Reiss *et al*., 1994; Pederson *et al*., 1979). Johnson *et al*. (1994) demonstraram que ratos alimentados com dieta rica em colesterol (5% de colesterol) apresentavam maior quantidade de 25-hidroxicolesterol no fígado. Alimentando os animais com óxido de deutério e comparando-se a incorporação deste no colesterol e 25-hidroxicolesterol (25-OH), concluiu-se que o 25-OH era produzido endogenamente a partir do colesterol exógeno, mas não por contaminantes da autoxidação do colesterol.

Nos hepatócitos, o colesterol pode ser convertido a COx pela ação do citocromo P-450. Dentro da família do citocromo P-450, a 27-hidroxilase é

uma enzima importante responsável pela hidroxilação da cadeia lateral do colesterol (Bjorkhem,1992). A 27-hidroxilase pode ser detectada em vários tipos celulares, incluindo fibroblastos, macrófagos, células do rim e do cérebro (Javitt, 1994; Bjorkhem *et al*., 1994). Em culturas de macrófagos alveolares humanos, enriquecida com colesterol, observa-se aumento da conversão do colesterol à 27-hidroxicolesterol. Nos fibroblastos, a conversão do colesterol à 27-hidroxicolesterol, promove a supressão da biossíntese do colesterol (Axelson & Larsson, 1995). No fígado de ratos, ocorre a conversão do colesterol à 7-cetocolesterol e a conversão de 7α-hidroxicolesterol à 7-cetocolesterol, catalisada pela ação da $NADP^+$ desidrogenase (Shoda *et al*., 1993). Estes dados evidenciam que os COx gerados enzimaticamente contribuem para o *pool* de COx, em especial, nos tecidos.

1.1.2.- Formação de COx por via radicalar

A autoxidação do colesterol envolve uma série de reações radicalares, formando mais de 60 diferentes produtos da oxidação (Smith,1981). O primeiro passo para a autoxidação do colesterol (**Fig. 1.**) é a formação de um radical no carbono 7, pela abstração do hidrogênio, em conseqüência da radiação ou outros radicais. O radical formado reage com o oxigênio molecular ($^3O_2$) produzindo o radical peroxila, estabilizado pela abstração de um hidrogênio, originando o 7-hidroperóxido de colesterol. Esse hidroperóxido é termicamente instável, decompondo-se em 7α-hidroxicolesterol (7α-OH), 7β-hidroxicolesterol (7β-OH) e 7-cetocolesterol (7-Ceto). O 7-Ceto, em meio básico e sob aquecimento, decompõe-se formando o 7 cetocolesterol dieno. A epoxidação, ou a reação de oxidação nos carbonos 5 e 6, é um processo secundário que depende da presença do 7-

hidroperóxido. Os α e β-epóxidos do colesterol são produtos resultantes do ataque da dupla ligação do colesterol, pelos hidroperóxidos e outros produtos geradores da oxidação. A hidratação destes isômeros leva à formação do colestanotriol (Triol) (Careri *et al*., 1998; Smith, 1996; Fazeli *et al*.,2000).

Fennema (1996) e Nielsen *et al*. (1996) observaram que a oxidação fotoquímica do colesterol também pode gerar COx. Um exemplo disto são as reações que ocorrem em alimentos. A energia é absorvida em forma de radiação, na presença de luz, e transferida para o $^{3}O_2$, gerando uma forma mais ativa, o $^{1}O_2$ (Smith, 1996). Assim geram-se hidroperóxidos que se decompõem dando origem ao 7-cetocolesterol e 7α-hidroxicolesterol (Guardiola *et al*., 1995).

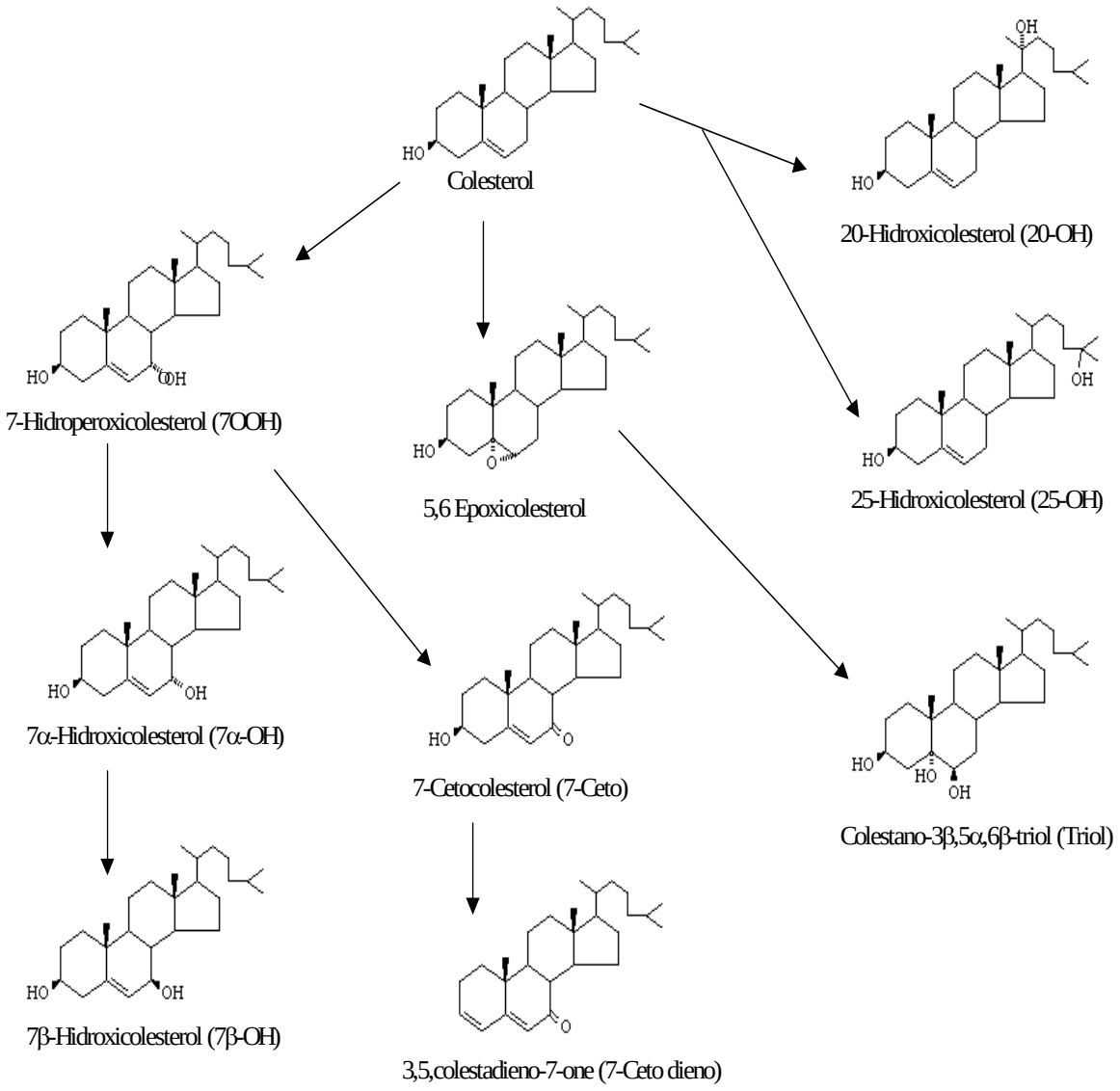

Figura 1.0.- Esquema da formação dos COx por via radicalar (Careri *et al*, 1998).

1.1.3.- Fontes de COx *in vivo*

Vários COx têm sido detectados em quantidades apreciáveis nos tecidos e fluídos biológicos de humanos, incluindo plasma, lipoproteínas aterogênicas e placas ateroscleróticas. Alguns trabalhos sugerem que a principal fonte de COx seja a dieta, porém, estes também podem ser gerados por oxidação não-enzimática do colesterol *in vivo*. Os COx plasmáticos são provenientes, em grande parte, da peroxidação *in vivo* das lipoproteínas, como tem sido demonstrado por vários estudos. Hughes *et al*. (1994) detectaram 7-cetocolesterol e 7β-hidroxicolesterol na lipoproteína de baixa densidade (LDL) depois de oxidá-la *in vitro* com íons cobre. Chisolm *et al*. (1994) identificaram o 7-hidroperoxicolesterol como o composto citotóxico primário da LDL oxidada e demonstrou sua presença em lesões ateroscleróticas. Em coelhos submetidos à uma dieta rica em colesterol, constatou-se aumento das concentrações de COx no plasma e no tecido aórtico (Hodis *et al*., 1991). Neste mesmo estudo, após a administração de probucol, um antioxidante, houve redução significativa dos COx, em especial, do 7-hidroxicolesterol, colesterol α- e β-epóxido e colestanotriol.

Uma outra via capaz de gerar COx indiretamente é a hiperglicemia crônica. Nesta condição, ocorre aumento nas concentrações de glicação não-enzimática de proteínas estruturais e circulantes, incluindo a LDL (Dato *et al*., 2000), além da autoxidação da glicose. Nesta reação de glicação formam-se produtos avançados da glicação (AGEs), que são fontes de radicais livres (superóxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio), atuando também na oxidação da LDL, o que contribui para a patogênese da doença vascular diabética e aterosclerose (Mullarkey *et al*.,1990; Hunt *et al*.,1990; Baynes, 1991).

1.2.- Efeitos biológicos dos COx

1.2.1.- Citotoxicidade e Aterogenicidade

Existem fortes evidências da correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de colesterol e a incidência de aterosclerose. Os óxidos de colesterol são mais aterogênicos do que o colesterol puro *in vivo* (Tsai *et al*., 1980; SzedLacsek *et al*., 1995), sugerindo que os COx tenham papel mais importante do que o colesterol não oxidado na patogênese da aterosclerose. Tem sido observado que os COx são tóxicos para as células endoteliais (Henning *et al*., 1987; Sevanian *et al*., 1991), musculares lisas (Peng *et al*., 1979) e fibroblastos (Imai *et al*., 1980). Os COx promovem aumento da permeabilidade vascular do endotélio, inibem a síntese de prostaglandina I_2, estimulam a agregação plaquetária, inibem a expressão dos receptores B/E e induzem o acúmulo de ésteres de colesterol em macrófagos, resultando na formação das células espumosas (Guardiola *et al*., 1995; Sevanian & Peterson, 1986). Brown e Goldstein (1975) mostraram que o 25-hidroxicolesterol diminui a incorporação da LDL pelos receptores B/E em fibroblastos humanos, reduzindo o número de receptores sem alterar a afinidade do receptor pelo ligante.

Muitos estudos sugerem que os COx são os verdadeiros agentes que induzem a formação da lesão ateromatosa. James *et al*. (1998) demonstraram que após a injeção intravenosa de uma mistura de COx em coelhos, houve acúmulo de COx circulante, aumento da permeabilidade vascular a macromoléculas, disfunção endotelial e acúmulo de colesterol nas artérias dos animais, eventos que participam no desenvolvimento da aterosclerose.

Ziedén *et al*. (1999) demonstraram que a resistência da LDL à oxidação foi menor em homens lituanos que em homens da Suécia, o que foi associado as concentrações plasmáticas elevadas dos COx no primeiro grupo. Neste, demonstrou-se correlação negativa entre as concentrações de 7β-hidroxicolesterol e a resistência à modificação oxidativa *in vitro* da LDL, sugerindo assim que o 7β-hidroxicolesterol seja um indicador do aumento da lipoperoxidação *in vivo*. Salonen *et al*. (1997) também obtiveram dados semelhantes. Um fator importante que pode contribuir para o aumento da lipoperoxidação nos diabéticos é a subfração pequena e densa da LDL (aterogênica), que é mais suscetível à oxidação e glicoxidação (Sara & Rebolledo, 2000).

As concentrações de COx encontrados na LDL eletronegativa (LDL^-) são muito mais elevados, quando comparados aos da LDL nativa, o que poderia contribuir para a maior citotoxicidade e aterogenicidade da LDL^- (Bhadra *et al*., 1991). Investigações complementares revelaram que os óxidos de colesterol formados na posição 7 do anel do colesterol (7α-hidroxicolesterol, 7β-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol), provenientes da oxidação da LDL, podem reduzir o relaxamento arterial por inibir a liberação do óxido nítrico das células endoteliais vasculares (Bhadra *et al*.,1991; Malavasi *et al*., 1992; Deckert *et al*.,1997 e 1998). Lyons & Brown (1999) observaram que o 7-cetocolesterol, em altas concentrações, além de inibir a liberação de óxido nítrico das células endoteliais vasculares, também é citotóxico para uma variedade de células, induzindo a apoptose em cultura de células musculares lisas e endoteliais. Deckert *et al*.(1998) demonstraram que o 7-cetocolesterol e o 7-hidroxicolesterol causam inibição da liberação de histamina, que é um dos agonistas para a liberação de óxido nítrico das células endoteliais.

Os COx também podem afetar a liberação de citocinas pelos macrófagos. O 25-hidroxicolesterol parece ter uma função regulatória na produção de interleucina-8 por macrófagos isolados de placas ateroscleróticas (Liu *et al*., 1997). O 7-cetocolesterol e o colesterol α-epóxido também apresentam este efeito em macrófagos, mas não em monócitos (Liu et al., 1997). Isto sugere que aumento na produção de interleucina–8, induzida pelos COx, estimula o recrutamento de linfócitos T e de células musculares lisas para o espaço subendotelial, contribuindo para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica. Outros estudos observaram que o 25-hidroxicolesterol tem papel importante no desenvolvimento da calcificação das lesões ateroscleróticas por estimular as células osteoblásticas (Watson *et al*.1994).

O 25-OH e o colestanotriol inibiram a proliferação celular e suprimiram a síntese celular de colesterol das células musculares lisas da aorta de coelhos (Guyton *et al*., 1990). Sevanian *et al*., (1991) estudaram a citotoxicidade do colesterol α/β epóxido e colestanotriol, em cultura de células aórticas de coelhos, verificando a seguinte ordem de citotoxicidade: colestanotriol > β-epóxido > α-epóxido. No entanto, o colesterol α-epóxido também inibiu o efluxo de colesterol livre em fibroblastos humanos (Fielding *et al*.,1997).

1.2.2- Efeitos do COx na produção de $^{\bullet}$NO

Nos vasos sangüíneos, o óxido nítrico ($^{\bullet}$NO) produzido pelas células endoteliais é um vasodilatador que tem papel central na regulação do tônus vascular. Na aterosclerose, ocorre diminuição acentuada da atividade do óxido nítrico, nos estágios mais adiantados da doença, que tem sido associado com estudos *in vitro*, que indicam a capacidade da LDL em inibir o relaxamento

dependente do endotélio (Jessup,1996). A inibição do relaxamento dependente do endotélio pela LDL oxidada não é devida à presença de lisolecitina na partícula de LDL, mas pela influência dos COx na expressão da caveolina-1 (Plane *et al*.,1992;Tanner *et al*.,1991). Recentemente, demonstrou-se que a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) está localizada em invaginações da membrana, denominadas de cavéolas, onde a caveolina-1 interage com a eNOS, modulando negativamente sua atividade (Boje *et al.*,1990; Forsterman *et al*,1991.). Há evidências de que os COx podem aumentar a expressão da caveolina-1, o que aumentaria a interação desta com a eNOS, inibindo a atividade da eNOS e a produção de $^{\bullet}$NO (Michel *et al*.,1997).

1.2.3.- Diabetes, estresse oxidativo e COx.

Todas as formas de diabetes mellitus apresentam anormalidades no metabolismo da glicose associadas ao estado de hiperglicemia crônica. No diabetes tipo 1 ocorre destruição das células-β do pâncreas, células produtoras de insulina localizadas nas ilhotas de Langerhans, com conseqüente insulinopenia (Rabinovitch & Suarez-Pinzon,1998). Diversas evidências sugerem o envolvimento das espécies reativas do oxigênio (ERO) na destruição das células-β e na progressão do diabetes tipos 1 e 2. A destruição das células-β ocorreria a partir da exposição direta às EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERN) produzidas por macrófagos ativados, ou indiretamente, por citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, TNF-α e IFN-γ), que lesam e induzem a morte das células-β. O $^{\bullet}$NO é considerado o principal mediador do efeito citotóxico da IL-1β, embora sua geração seja induzida também por TNF-α e IFN-γ (Eizirik *et al*.,1996). A produção exacerbada de EROs causaria dano celular por promover a oxidação dos ácidos nucléicos, proteínas e fosfolipídeos

de membrana (**Fig.2**). Além disso, EROs e citocinas ativam o NF-kB, fator de transcrição sensível ao estado redox das células, que controla a expressão gênica de numerosas moléculas envolvidas na resposta imune-inflamatória, tais como, citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão (ICAM-1, E-selectina e VCAM), fatores estimuladores de colônia (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, M-CSF) e enzimas inflamatórias (óxido nítrico sintase indutível, cicloxigenase-2 e 12-lipoxigenase) (Ho & Bray,1999).Tabatabaie *et al.* (2003) demonstraram que as citocinas podem mediar a geração de radicais livres via cicloxigenase-2. Desco *et al*. (2002) verificaram que a xantina oxidase também está envolvida na produção de radicais livres em pacientes diabéticos tipo 1.

Assim, a formação de EROs tem sido apontada como uma das causas responsáveis pela destruição das células-β pancreáticas, durante processos auto-imunes que ocorrem na instalação do DM tipo 1, ou mesmo em diabetes induzido por agentes químicos como aloxana e estreptozotocina (Oberley, 1988).

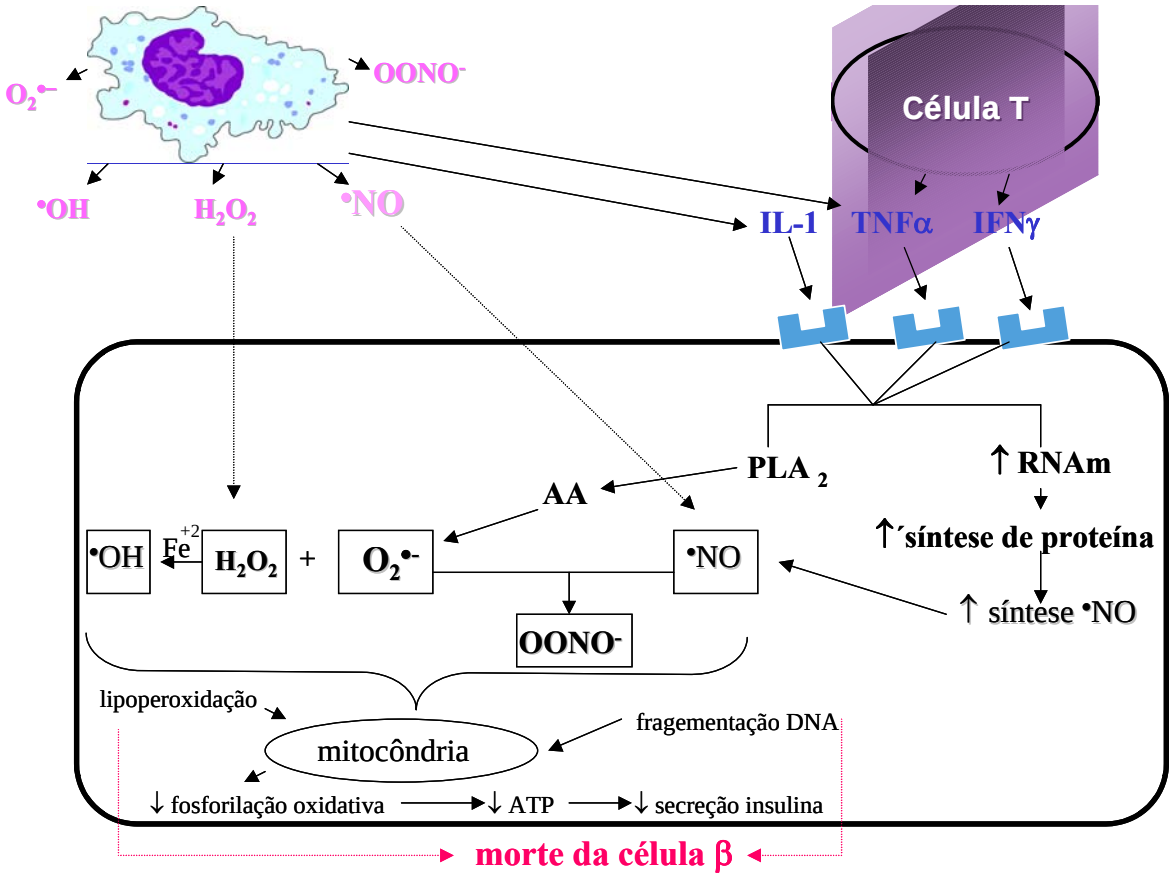

Figura 2.- Possível mecanismo bioquímico da lesão da célula-β por EROs e citocinas (Rabinovitch & Suarez-Pinzon, 1998). Na insulinite, um estado pré-hiperglicêmico, as ilhotas são infiltradas com células imunes acompanhado pela liberação de citocinas pró-inflamtórias (IL-1, TNF-α),ROS ($O_2^{\bullet-}$ / H_2O_2) e RNS ($^{\bullet}NO$/ $^{\bullet}OH$/ $ONOO^-$) dos macrófagos ativados. As células T ativadas produzem IFN-γ, TNF-α e β que se ligam a receptores específicos, ativando fosfolipase A_2 (metabolismo do ácido araquidônico-AA) e estimulando a síntese de $^{\bullet}NO$, que contribui para a geração de ERO intracelular. Estas EROs geradas pelos macrófagos podem atacar a membrana das células- β e/ou se difundir intracelularmente e formar outras espécies radicalares ($ONOO^-$, $^{\bullet}OH$) que pode inativar as proteínas da mitocôndria, causar lipoperoxidação, diminuir a fosforilação oxidativa, diminuir a glicólise e conseqüentemente diminuir as concentrações de ATP e prejudicar a secreção de insulina.

Diabetes tipo 2 é caracterizado pela resistência à insulina, que pode ser definida como uma resposta diminuída às ações biológicas da insulina, não apenas no metabolismo dos carboidratos, mas também no seu papel essencial no metabolismo de lipídeos. Uma outra situação encontrada no diabetes tipo 2 é um defeito funcional da célula β. Assim, podemos considerar que no diabetes melittus tipo 2 exista uma dupla base fisiopatológica (Polonsky *et al*,1996).

A hiperglicemia crônica pode causar aumento na produção de espécies reativas de oxigênio por vários mecanismos:

1) autoxidação da glicose - a glicose pode ser uma importante fonte de EROs, em especial na presença de metais de transição, (Sakurai *et al*., 1988; Gillery *et al*., 1988);

2) glicação de proteínas e formação de produtos finais de glicação (AGE) - a hiperglicemia favorece a formação de proteínas glicadas com conseqüente formação dos AGEs. As proteínas glicadas, incluindo a glico-hemoglobina, também podem sofrer glicoxidação (glicação+oxidação), gerando radicais livres, que podem causar a oxidação de fosfolípides da membrana dos eritrócitos. Os AGEs formados interagem com receptores celulares específicos- RAGEs (receptors para produtos finais de glicação) presentes na células endoteliais, macrófagos e células mesangiais, provocando a liberação de EROs, diminuição das concentrações de glutationa reduzida e ativação do NF-kB. Lyons *et al*. (1997) demonstraram que os produtos da glicoxidação, formados no espaço subendotelial, têm efeito quimiotático para monócitos e facilitam sua diferenciação em macrófagos. Estes, por sua vez, podem captar, por endocitose, os produtos da glicoxidação e a LDL glicoxidada presentes na matriz extracelular, favorecendo a formação das células espumosas, a liberação de citocinas e de outros fatores que contribuem para a formação da placa aterosclerótica.

3) aumento da via dos polióis - tem como conseqüência a diminuição da relação NADPH/NADP, devido à depleção intracelular de NADPH, resultando na diminuição da regeneração de glutationa oxidada para reduzida e menor síntese de óxido nítrico, deido ao fato do NADPH ser cofator da óxido nítrico sintase (Cameron & Cotter,1977).

4) Ativação da Proteína Quinase C (PKC) - o aumento intracelular de diacilglicerol (DAG), sintetizado a partir de produtos intermediários da via glicolítica como gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato, induz ativação de PKC. A hiperglicemia pode ativar a PKC indiretamente através da ligação AGEs/RAGE (Portilha *et al*., 2000) e por aumento da via do poliol (Kcogh *et al*.,1997), provavelmente devido ao aumento das EROs. Kuroki *et al.* (1998) verificaram que os ácidos graxos livres (FFA), em especial palmitato, que é o principal FFA saturado do plasma, pode estimular a síntese de DAG em cultura de células endoteliais, através de uma nova via, e ativar a PKC, a NADPH oxidase e a produção de ânion superóxido. Toyoshi *et al.*,2000 sugeriram que concentrações elevadas de glicose e palmitato poderiam estimular a produção de EROs através da ativação da NADPH oxidase, dependente de PKC, em células musculares lisas e endoteliais. Sua ativação tem importantes conseqüências para a progressão do diabetes, incluindo: diminuição da expressão da eNOS, aumento da atividade da endotelina-1 (Ishii *et al*.,1996), aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células musculares lisas (Williams *et al*.,1997), aumento da expressão de fator transformador de crescimento (TGF-β1), fibronectina e colágeno em células glomerulares (Koya *et al*.,1997), aumento da expressão de PAI-1 e NF-kB (células endoteliais e musculares lisas; Pieper *et al*.,1997; Yerneni *et al*.,1999) e modulação da atividade da NADPH oxidase (**Fig.3**). Rajagopalan *et al (*1996) demonstram que, nas

artérias, a NADPH oxidase é mais importante como fonte de EROs do que as enzimas do metabolismo do ácido araquidônico, a xantina oxidase e as mitocôndrias. Koya & King (1998) demonstraram que a hiperglicemia pode mediar os efeitos adversos via PKC-β por ativação da via DAG-PKC, sugerindo um papel nas complicações vasculares no diabetes. Entretanto, Igarashi *et al.* (1999) demonstraram que a PKCδ, mas não a β, é ativada em células musculares lisas da aorta sob condições hiperglicêmicas. Nobuhiko *et al.* (1999) verificaram que a PKC está envolvida na ativação do NF-kB por ânion superóxido em células endoteliais humanas.

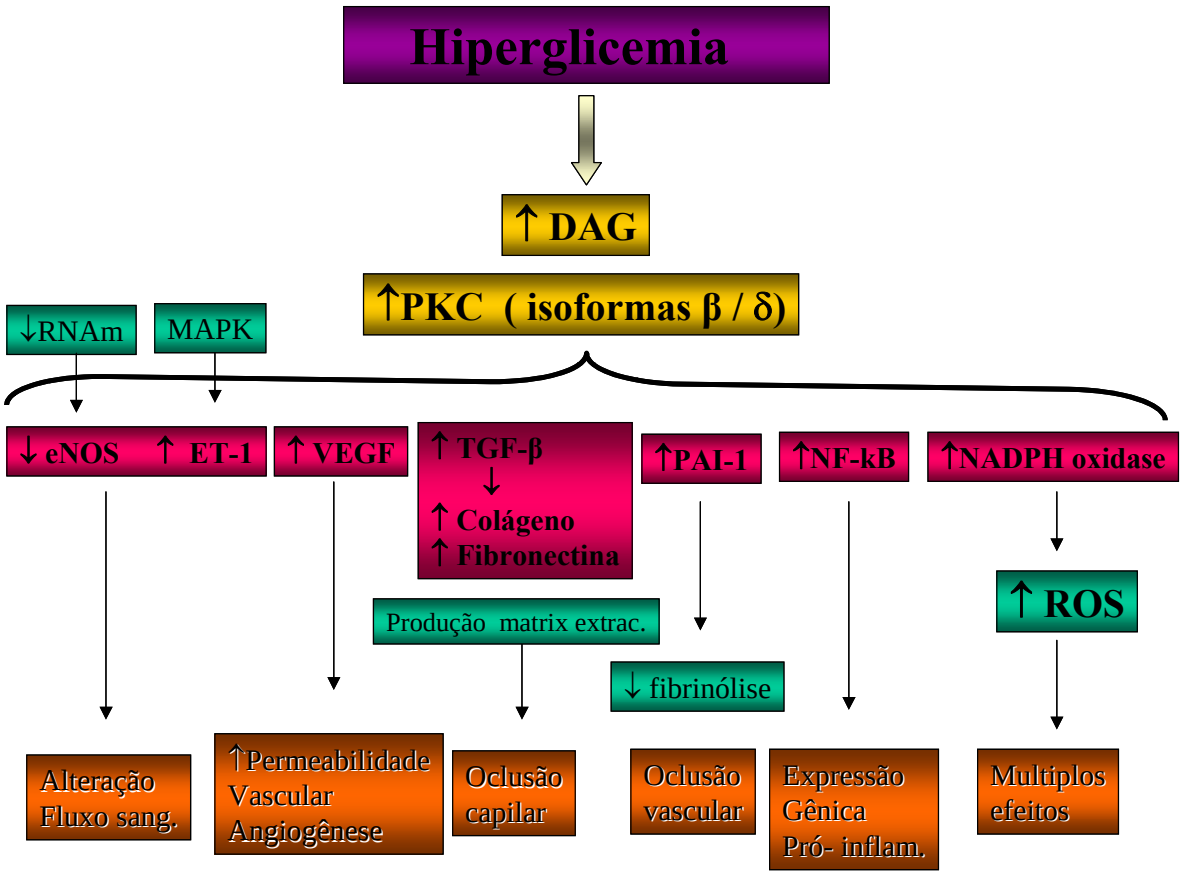

Figura 3-Consequências da ativação de PKC pela hiperglicemia (Brownlee,2001).

Vários estudos têm demonstrado diminuição das defesas antioxidantes no diabetes. Nas células-β, a expressão gênica e a atividade das principais enzimas antioxidantes, como CuZn superóxido dismutase (CuZnSOD), Mn superóxido dismutase (MnSOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx), são marcadamente mais baixas que aquelas encontradas em outros tecidos, como o fígado (Lenzen *et al.*,1996). Isso as torna as células-β particularmente suscetíveis aos ataques de ROSs e RNSs após exposição a citocinas ou células do sistema imune (Tiedge *et al.*,1997). Maxwell *et al.* (1997) demonstraram uma significativa redução na defesa antioxidante no plasma e no soro de pacientes diabéticos tipo 1, quando comparados aos

normoglicêmicos. Em crianças diabéticas tem sido encontrada diminuição significativa de glutationa total/glutationa peroxidase (eritrócitos), α-tocoferol e β-caroteno (plasma) (Dominguez *et al*.,1998). No estado pré-hiperglicêmico, as defesas antioxidantes também estariam comprometidas (Rocic *et al.*,1997). Auto-anticorpos contra as células das ilhotas pancreáticas (ICA) têm sido utilizados para identificar indivíduos com predisposição para desenvolver diabetes tipo 1. Ho & Bray (1999) estudaram indivíduos ICA-positivo e verificaram que estes apresentavam concentrações de antioxidantes significativamente reduzidos quando comparados aos ICA-negativos. Esses dados sugerem que a defesa antioxidante é um fator que contribui para o desenvolvimento do diabetes tipo 1. Em estudos realizados *in vivo* e *in vitro* demonstrou-se que a superexpressão de enzimas antioxidantes apresenta um efeito protetor, prevenindo a morte das células-β induzida por aloxana/ estreptozotocina e por citocinas (Kubisch *et al*.,1997; Hohmeier *et al*.,1998).

O estudo realizado por Akkus *et al* (1996) demonstrou diminuição significativa ($p<0.05$) do ascorbato em leucócitos de pacientes diabéticos tipo 2, sem observar diminuição das atividades da superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase. Skrha *et al*. (1996) também não encontraram diminuição da atividade da SOD em eritrócitos de diabéticos tipo 1 e 2, enquanto Atalay *et al*. (1997) detectaram atividade diminuída da CAT eritrocitária e da SOD em neutrófilos de diabéticos tipo 1. Nourooz-Zadeh *et al* (1997) encontraram aumento das concentrações de peróxidos e diminuição (64%) das concentrações de vitamina E no plasma de pacientes diabéticos tipo 2, quando comparados com controles.Yoshida *et al*. (1995) sugeriram que a hiperglicemia inibe a síntese de glutationa, provavelmente por glicação, em pacientes diabéticos tipo 2. Em individuos intolerantes à glicose e diabéticos não-insulino dependentes constatou-se redução nas concentrações de

glutationa e ácido ascórbico, da ordem de 15% nos intolerantes e de 20 % nos diabéticos (Vijayalingam *et al*., 1996).

A combinação do excesso de EROs e a diminuição da defesa antioxidante no diabetes propiciariam lesões oxidativas em moléculas endógenas, incluindo o colesterol, como indicado na **Figura 4.** Considerando**,** a importancia dos óxidos de colesterol na patofisiologia do diabetes, realizamos o presente estudo para investigar a formação desses óxidos em indivíduos intolerantes à glicose e diabéticos e a relação com os índices glicêmicos, no sentido de elucidar a importancia do processo de oxidação do colesterol na patofisiologia do estresse oxidativo nessas condições e a utilização futura dos óxidos de colesterol como marcadores da lipoperoxidação no acompanhamento clínico e terapêutico desses pacientes.

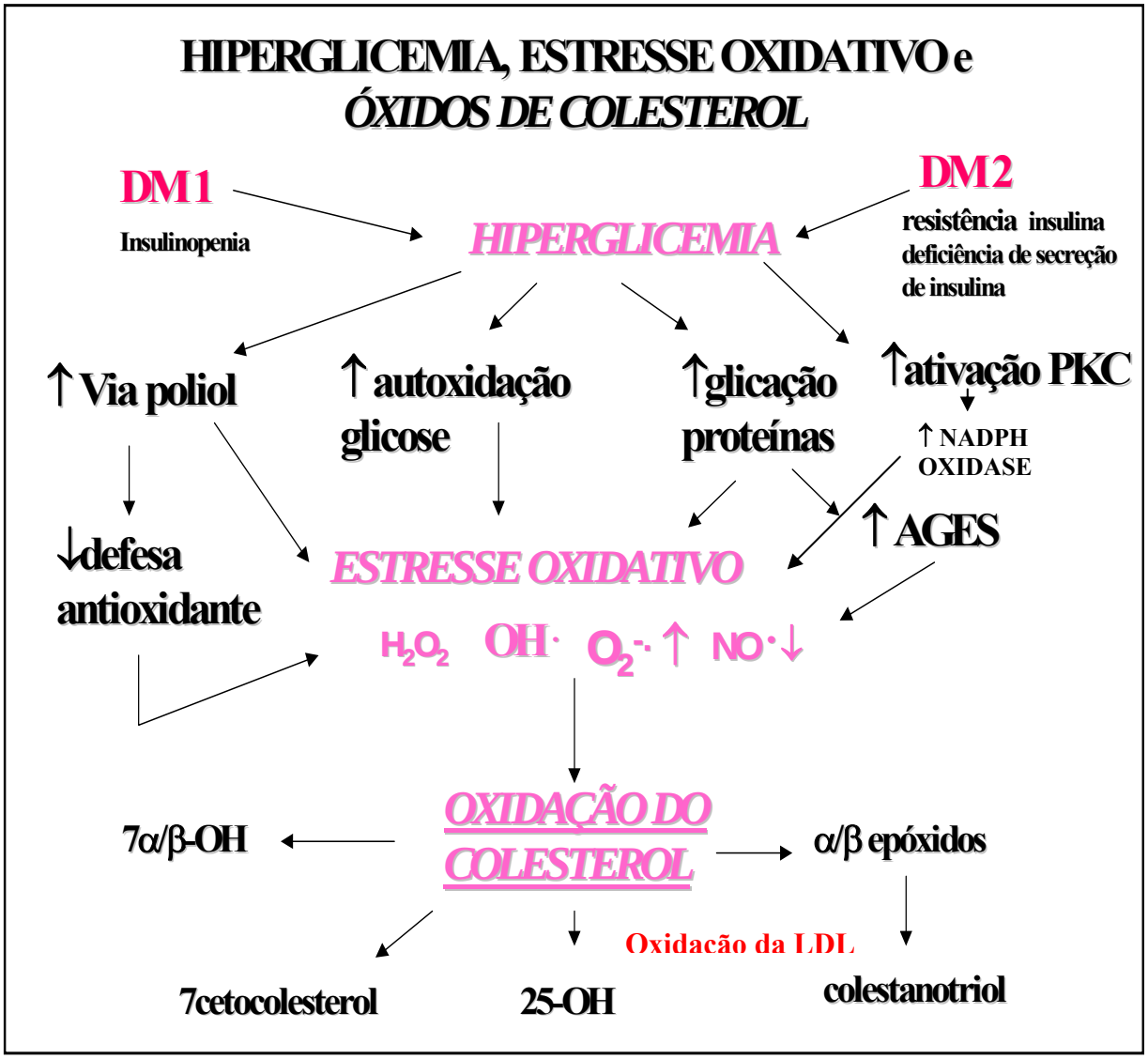

Figura 4.- Possível ligação entre hiperglicemia , estresse oxidativo e formação de COx (Hunt *et al*, 1998).

2.0.-OBJETIVO

2.1.-Objetivo geral

O objetivo geral do projeto foi determinar as concentrações dos COx, em pacientes diabéticos (tipos 1 e 2), indivíduos intolerantes à glicose e normoglicêmicos para estabelecer se os COx são marcadores sensíveis da lipoperoxidação com a finalidade de avaliar as diferenças na intensidade da peroxidação lipídica nessas condições.

2.1.2.- Objetivos específicos

- Verificar se ocorrem diferenças no grau de formação dos óxidos de colesterol no diabetes tipos 1 e 2, em relação à intolerância à glicose e à normoglicemia;
- Investigar as correlações entre as concentrações plasmáticas dos óxidos de colesterol e os indicadores de controle glicêmico (glicemia, frutosamina e hemoglobina glicada);
- Avaliar se outros fatores, como a hipertensão e as dislipidemias, modificam a formação dos óxidos de colesterol nos diabéticos;
- Discutir o efeito da medicação utilizada pelos diabéticos sobre as concentrações plasmáticas dos COx.

3.0.- MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1.- Pacientes

Os indivíduos portadores de diabetes tipo 1 (n=31), diabetes tipo 2 (n=88) e intolerantes à glicose (n=32) foram triados respectivamente na Faculdade de Ciências Médicas Santa Casa/SP e no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Para o controle da glicemia no grupo de diabéticos tipo 1 (DM1), utilizou-se apenas insulina. Os pacientes do grupo de diabéticos tipo 2 (DM2) estavam sendo tratados com anti-hipertensivo (inibidor da enzima conversora de angiotensina), hipolipemiante (estatina) e hipoglicemiantes e os Intolereantes à glicose (IGT) foram tratados com anti-hipertensivo. Os grupos controle (C1 e C2), normoglicêmicos, foram compostos por indivíduos que não apresentaram evidências clínicas para doença arterial coronariana e nenhum dos fatores de risco estudados (**Tabela 1.0./ Fig. 5**). O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética das instituições envolvidas, ou seja, Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia , Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP e Faculdade de Ciências Médicas- Santa Casa/São Paulo. A coleta do sangue dos voluntários foi feita em EDTA (1 mg/mL de sangue) para obtenção do plasma e sem EDTA, para obtenção do soro. O plasma e o soro foram separados por centrifugação a 2500 rpm a 10 minutos a 4°C.Após a obtenção do plasma foram adicionados BHT (1μL/mL) e uma combinação de inibidores de protease: benzamidina (2μL/mL), aprotinina (2μL/mL) e PMSF (2μL/mL).

Tabela 1.0.-Informações relativas aos pacientes estudados.

Variável	Controle (C1)	DM1	Controle (C2)	DM2	IGT
Idade		16,29±11,3	59,21±5,59	58,21±10.0	52,2±8,47
Sexo (M:F)	5:6	12:19	8:6	36:52	13:19
IMC	-	19,10±3,4	-	29,67±5,4	29,67±5,2
Tempo de doença	-	4,65±3,5	-	9,16±3,48	-
Insulina:agente oral	-	31	-	20:68	-
Anti-hipertensivo	-	-	-	88	32
Hipolipemiante	-	-	-	41	1

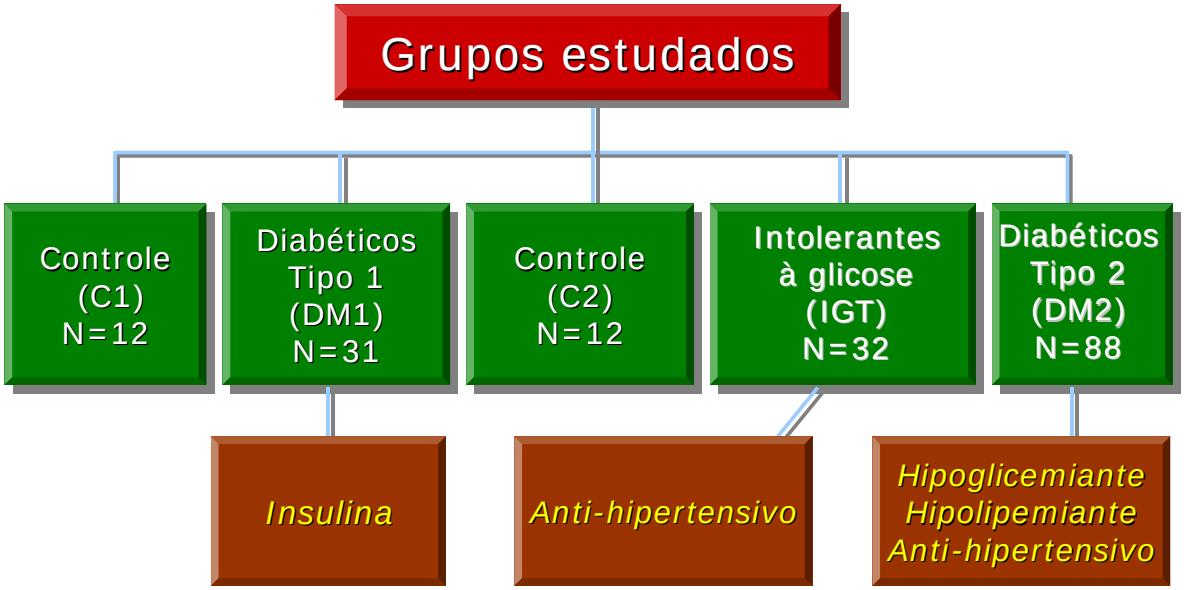

Figura 5. :Organograma dos grupos estudados.

3.1.2.Critérios de inclusão.

Fizeram parte do estudo os pacientes que apresentaram as seguintes características:

- Diabetes tipo 1 e tipo 2 (segundo os critérios estabelecidos pela *American Diabetes Assosiation*)
- ambos os sexos;
- sem distinção de raça;

3.1.3.-Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentaram uma das características relacionadas a seguir:

- gravidez;

- doença psiquiátrica severa limitando a capacidade de compreensão e aceitação para participar com a doação do material;
- Diabetes Mellitus secundário a pancreatopatia crônica;
- Doença Hepática conhecida ou transaminases superior três vezes o valor normal;

3.1.4. -Critérios de Interrupção do Estudo

Foram excluídos do estudo todos os pacientes que:

-não desejarem mais participar do estudo;

-forem hospitalizados e, neste caso, a causa principal da internação deverá ser informada.

3.2.–Determinações dos parâmetros glicêmicos e lipídicos

As concentrações de colesterol plasmático total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, VLDL-colesterol, triglicerídeos foram realizadas por métodos enzimáticos comerciais (Labtest).

O colesterol contido na HDL foi determinado após a precipitação das frações LDL e VLDL. Para a obtenção da concentração de colesterol na LDL foi utilizada a fórmula de Friedwald e cols (1972):

LDL colesterol=Colesterol total-(VLDL colesterol+HDL colesterol), onde a VLDL colesterol= triglicerídeos/5

A determinação da glicose foi feita por método enzimático, e a determinação de hemoglobina glicada foi feita por Troca Iônica, ambas determinações utilizaram kits comerciais (Labtest).

3.3.- Metodologia analítica de quantificação dos COx.

3.3.1.- Preparação dos padrões

Os padrões de óxidos de colesterol (Steraloids, Inc.) usados para as determinações foram :

- 7β-Hidroxicolesterol;
- 7α-Hidroxicolesterol;
- 7-Cetocolesterol;
- 25-Hidroxicolesterol;
- Colestan-3β, 5α, 6β-triol;
- Colesterol β-epóxido;
- Colesterol α-epóxido;
- 5α-colestano (usado como padrão interno).

Os padrões foram dissolvidos em tolueno, com exceção do colestanotriol e 25-Hidroxicolesterol, que foram dissolvidos em metanol.

3.3.2.- Preparação da amostra.

Para a extração dos lipídeos utilizou-se 500μL de plasma e adicionou-se 100μL (200ng/μL) de padrão interno (5α-colestano), clorofórmio e metanol (1:2). O extrato lipídico foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e redissolvido com 1.0 mL de tolueno: acetato de etila (1:1). A fração lipídica neutra (triglicerídeos, colesterol e óxidos de colesterol) e a fração lipídica polar (fosfolípides) foram isoladas por extração em fase sólida (Waters, Colunas de diol), com tolueno: acetato de etila, seguida de metanol. A fração lipídica

neutra foi saponificada (hidrólise dos lipídeos) e metilada com diazometano éter (conversão dos ácidos carboxílicos em metil éster).

3.3.3.-Determinação por CG com ionização de chama (GC- FID)

Os óxidos de colesterol extraídos foram derivatizados a timetilsilil (TMS) por adição de 100 μL de Bis (trimetilsilil) trifluoracetamida (BSTFA) e 100 μL de dimetilformamida, selado com prévio fluxo de nitrogênio por 30 segundos , mantidos a 80 °C por 20 minutos e injetado por injeção automática (1μL) no cromatógrafo a gás (CG 6890-Plus- Hewlett Packard), equipado com detector de ionização de chama (FID), utilizando-se a coluna HP-1 (100% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,32 mm x 0,25 μm, Hewlett Packard). O gás nitrogênio foi usado como gás carreador, com fluxo de 5 mL/min e pressão de 20 psi; a temperatura de injeção foi de 290 °C e a temperatura inicial da coluna foi de 260°C, com um *split ratio* 1:5. A temperatura do detector foi de 300°C e o programa de temperatura usado ocorreu mantendo-se a temperatura inicial por 2 minutos, seguido de aumento de 5 °C/minuto até 290 °C, sendo o tempo total de corrida de 10 minutos (Sevanian et al., 1994 modificado).

3.3.4.-Determinação por cromatografia acoplada à espetrometria de massa(GC-MS)

As amostras extraídas foram derivatizados a TMS por adição de 100 μL de Bis (timetilsilil) trifluoracetamida e 100 μL de dimetilformamida, selado com prévio fluxo de nitrogênio por 30 segundos, mantidos a 80 °C por 40 minutos e injetados por injeção automática (2μL) no cromatógrafo a gás (CG 17A-Shimadzu) acoplado ao detector de massa seletivo QP 5050, usando uma coluna HP-1 100% dimetilpolisiloxano (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm, Hewlett

Packard). O gás hélio foi usado como gás carreador, com fluxo de 5,4 mL/min e pressão de 26,6 KPa ; a temperatura de injeção foi de 290 °C e a temperatura inicial da coluna foi de 260°C, com um *split ratio* 1:5. O programa de temperatura usado foi o seguinte: temperatura inicial por 2 minutos, seguido de aumento de 15 °C/minuto até 290 °C, permanecendo durante 12 minutos. O espectro de massa foi operado com impacto de elétrons e com uma energia de ionização de 70 eV. Os íons formados foram detectados numa faixa de 100-700 unidades de massa atômica. Utilizou-se o modo Scan para obter a confirmação dos óxidos identificados, seus respectivos tempos de retenção e os espectros de massa.

As análises foram feitas no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM) e os íons selecionados foram os seguintes: 7α-hidroxicolesterol, 456 (M-90); 7β-hidroxicolesterol, 456 (M-90); colesterol β-epóxido, 474 (M); colesterol α-epóxido, 474 (M); colestanotriol, 403 (M-90); 7-cetocolesterol, 472 (M); 25-hidroxicolesterol, 271 (M-90) e 5α-colestano (padrão interno), 217. Considerando-se o pico do íon molecular do esterol trimetilsilil (TMS), os óxidos de colesterol têm um ou dois gupos hidroxi que foram identificados como mono (M) e di-TMS (M-90) éter, respectivamente.

3.4.-Determinação de Nitrotirosina

A concentração de nitrotirosina foi determinada no plasma por ELISA competitivo. As placas foram sensibilizadas com 0,5 μg/mL de albumina nitrada (ALBNO, 100 μL, concentração aproximada de nitrotirosina de 40 a 60 μM) diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M em pH 9,4 a 37°C, *overnight*. Após lavagem com 300 μL de tampão TBS (TRIS-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) contendo Tween 20 (0,5%), incubou-se as placas por duas horas a 37°C com 200 μL/poço de tampão TBS contendo 0,005% de Tween 20 e 5 % de leite desnatado. Após nova lavagem, as placas foram incubadas com 100 μL/ poço do anticorpo policlonal anti-nitrotirosina (Upstate® biotechnology, diluído 1:1000 em TBS contendo 0,005% de leite desnatado e 0,005 % de Tween 20) mais 100 uL da amostra (as amostras de plasma e a albumina nitrada utilizadas na curva de calibração foram diluídas 1:4 em TBS contendo 0,05% de leite) por duas horas a 37°C. As placas foram novamente lavadas e incubadas com 100 μL/ poço do conjugado (IgG anti-coelho produzido em camundongo conjugado com peroxidase, Stressgen Biotechnologies Corp., diluído 1:6000 em TBS contendo 0,05% de leite desnatado e 0,05 % de Tween 20 por 1 hora, a 37°C. Após lavagem, adicionou-se luminol (2,3 mM), p-iodofenol (0,9 mM) (100μL/poço) e peróxido de hidrogênio (3,9 nM) (50μL/poço). A leitura da quimiluminescência produzida foi realizada imediatamente, utilizando-se uma leitora de placas de ELISA para quimiluminecência (LumiCount, Packard, Meriden, USA). A concentração de nitrotirosina nas amostras foi estimada pela curva de calibração realizada com a nitroalbumina e expressa como equivalentes de nitro-ALB. As amostras e a curva de calibração foram

realizadas em triplicata. A albumina bovina nitrada, a qual foi utilizada como padrão para a realização das curvas de calibração (nitro-ALB; 2-4 mol de nitrotirosina/mol de proteína), foi preparada por adição de uma solução alcalina de peroxinitrito em uma concentração final de 1 mM à uma solução de albumina bovina (ALB 1 mg/mL). A concentração de nitrotirosina na nitro-ALB foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar 4300 $M^{-1}cm^{-1}$ em 438 nm, pH 9.0.

ONO_2^- E_{302nm}=1670 /Mcm

3.5.- Análise estatística

As comparações das concentrações dos parâmetros glicêmicos e lipídicos entre os grupos, foram feitas através da técnica estatística de Análise de variância e complementada com as comparações múltiplas de Bonferroni. Para a adequada utilização dessa técnica foi necessária a utilização da transformação logarítmica nas variáveis observadas, uma vez que estas não apresentavam distribuição normal. Para a comparação das concentrações dos óxidos de colesterol entre os grupos avaliados foi realizado o teste de Mann-Whitney. As correlações foram testadas pelo teste de Pearson (Software SPSS). O nível de significância estabelecido foi de $p<0,05$.

4.0.-RESULTADOS

4.1.1.- Validação do Método

4.1.2.- Espectros de massa dos óxidos de colesterol (padrões)

No modo scan, obteve-se os espectros de massa dos padrões de COx para confirmar os tempos de retenção e os dados espectrais, de cada um dos óxidos, àqueles descritos na literatura. (**Figuras 6-13**). Nas **Figuras 14-19** são mostrados os epectros de cada um dos COx detectados no plasma sangüíneo, obtidos no modo SIM.

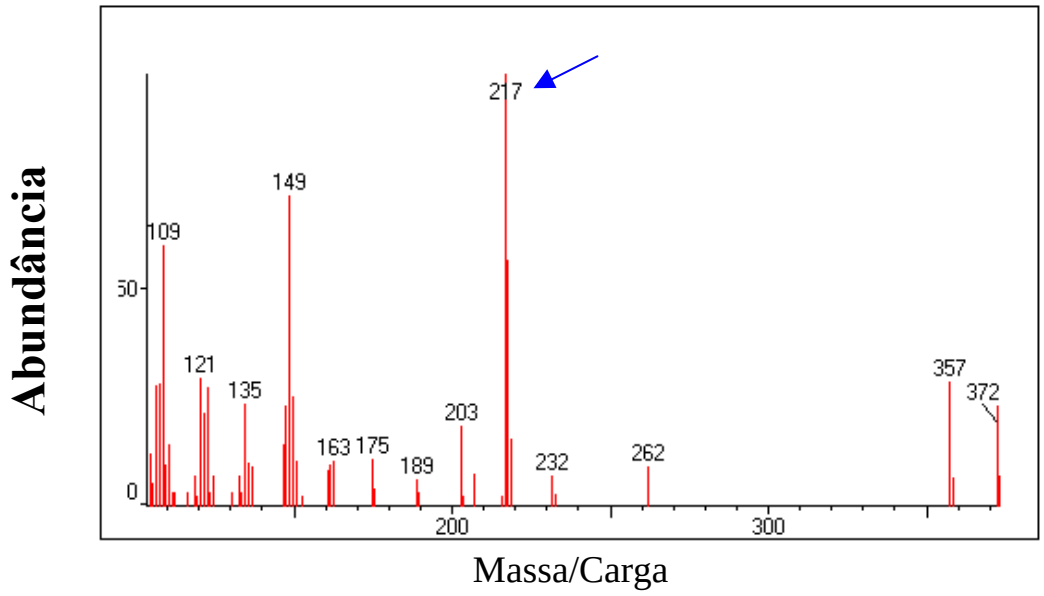

Figura 6.- Espectro de massa do 5α -colestano.

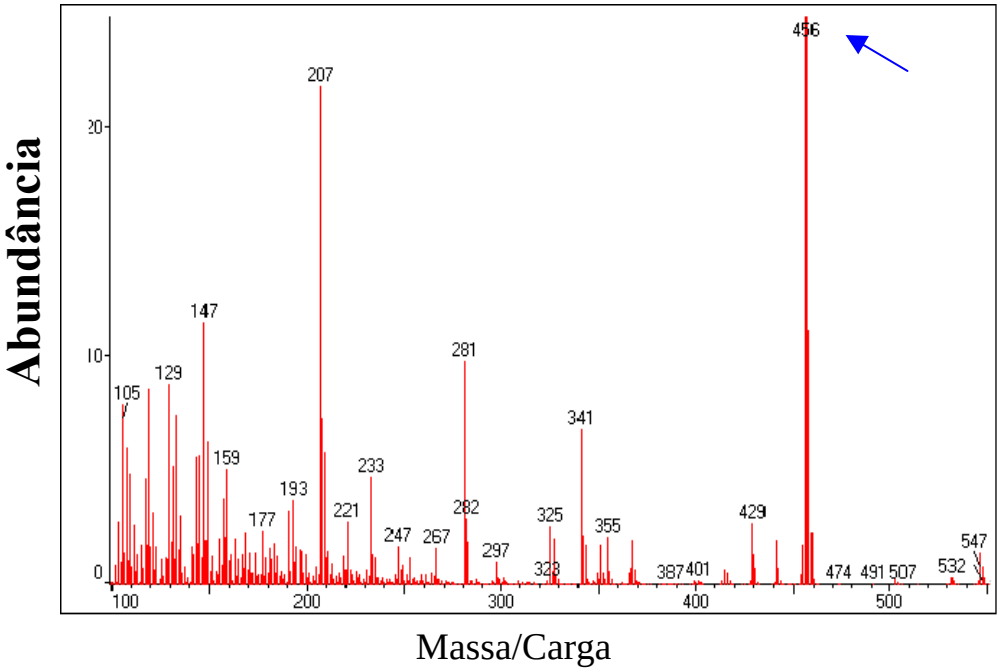

Figura 7.- Espectro de massa 7α-hidroxicolesterol (7 α-OH)

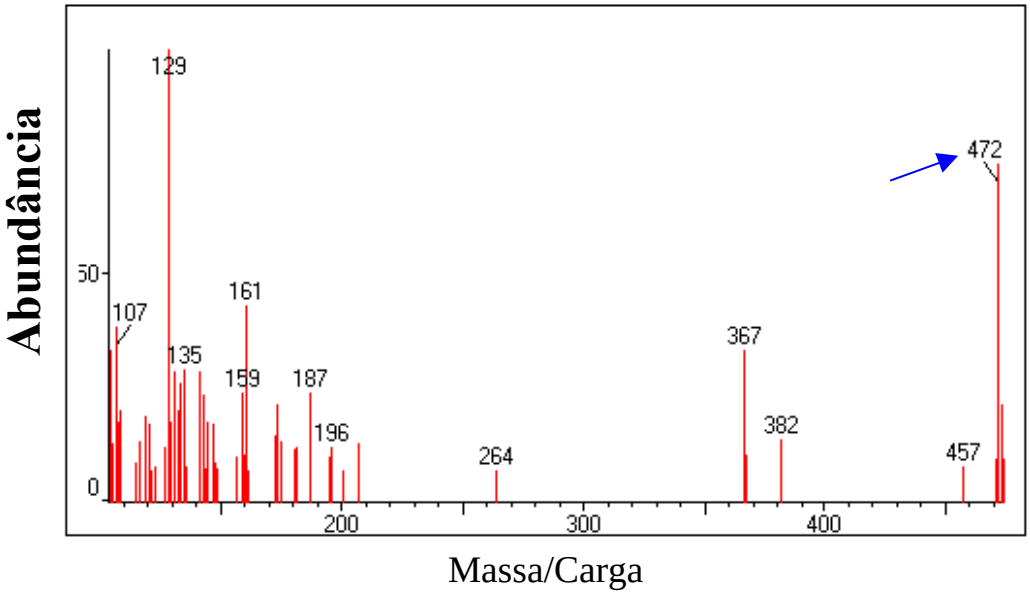

Figura 8.- Espectro de massa do 7–cetocolesterol (7-Ceto).

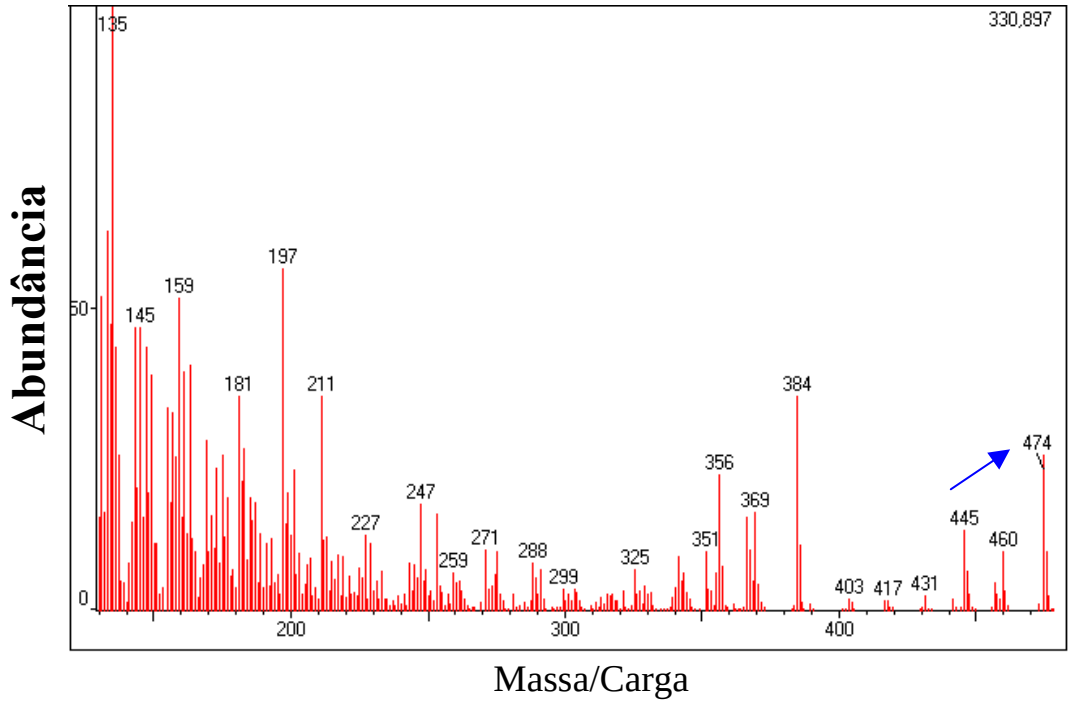

Figura 9.- Espectro de massa do colesterol β-epóxido (β-epóxido).

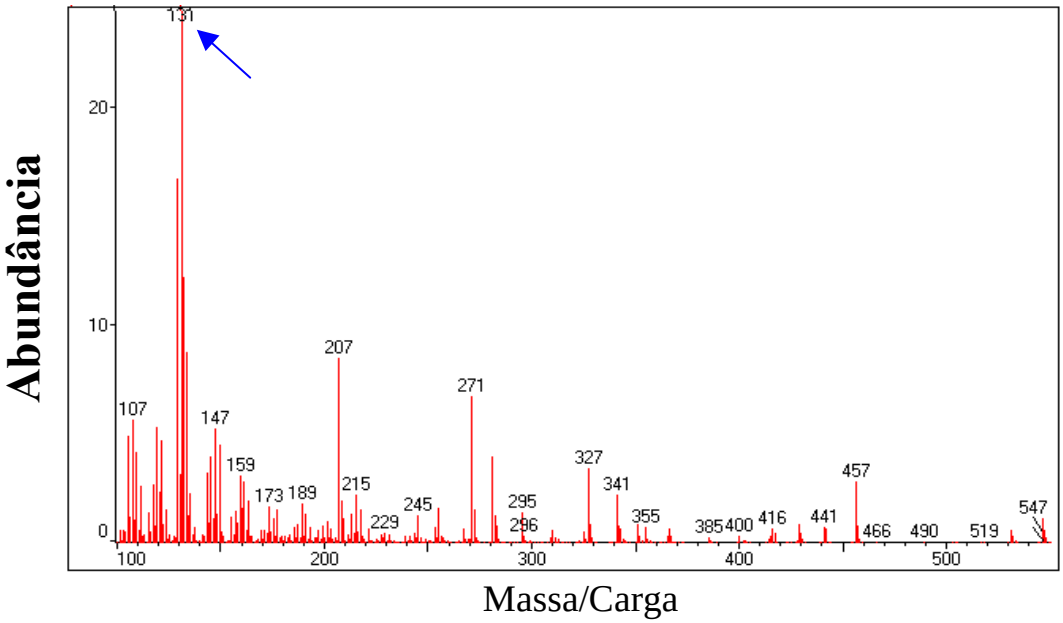

Figura 10.- Espectro de massa do 25-hidroxicolesterol (25-OH).

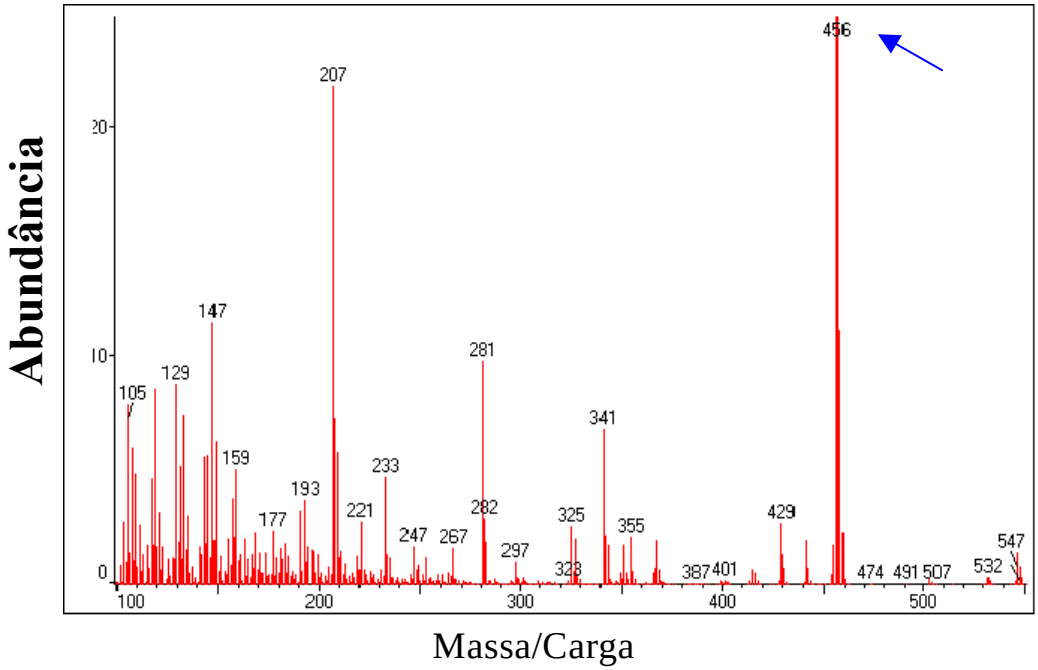

Figura 11.- Espectro de massa do 7β-hidroxicolesterol (7β-OH).

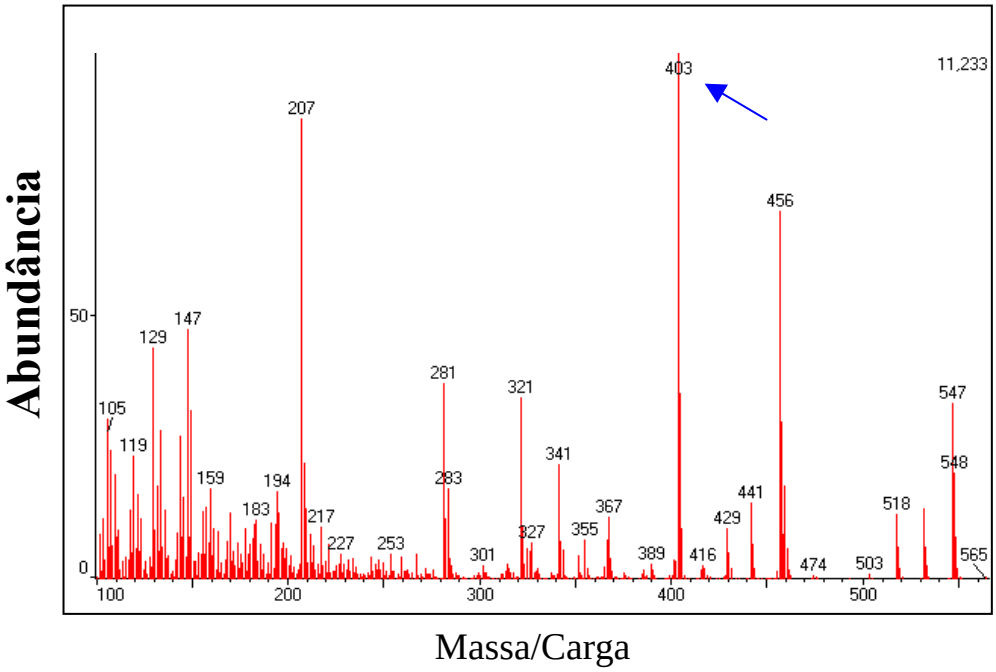

Figura 12.- Espectro de massa do colestanotriol (Triol).

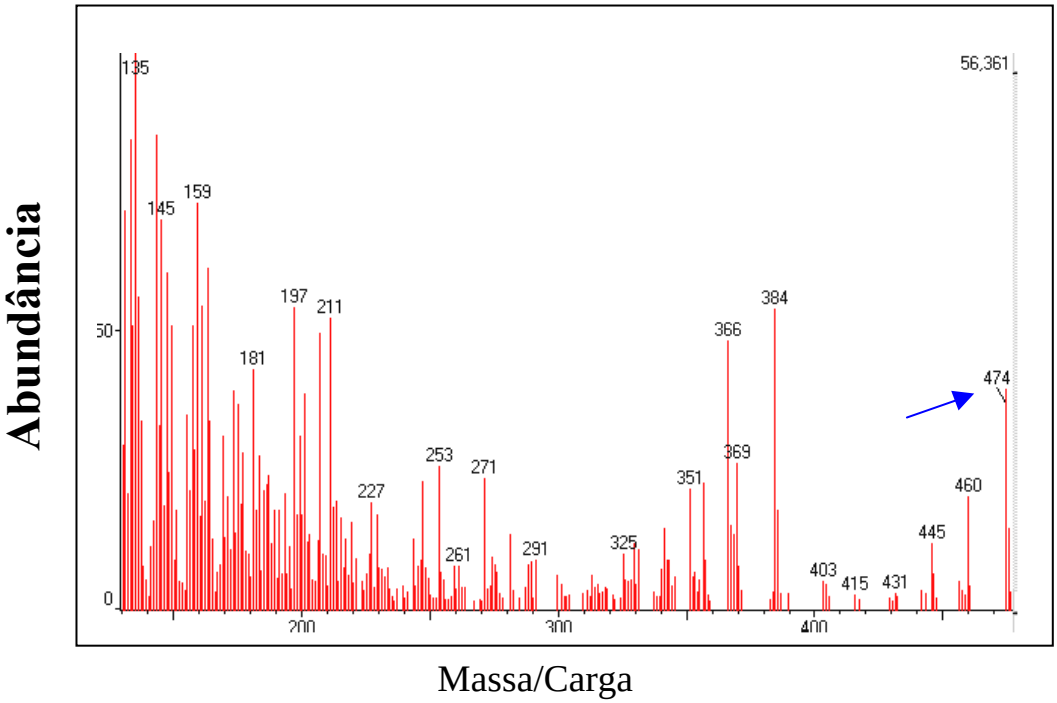

Figura 13.- Espectro de massa do colesterol α-epóxido (α-epóxido) .

4.1.3.- Espectros de massa dos óxidos de colesterol presentes no plasma

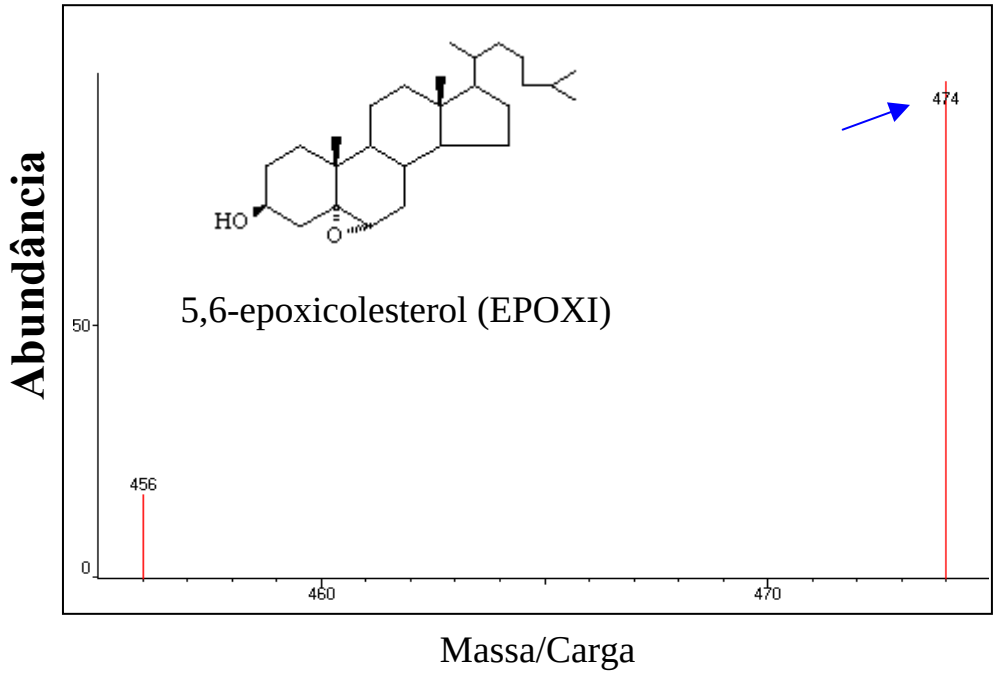

Figura 14.- Espectro de massa do α-epóxido (modo SIM)

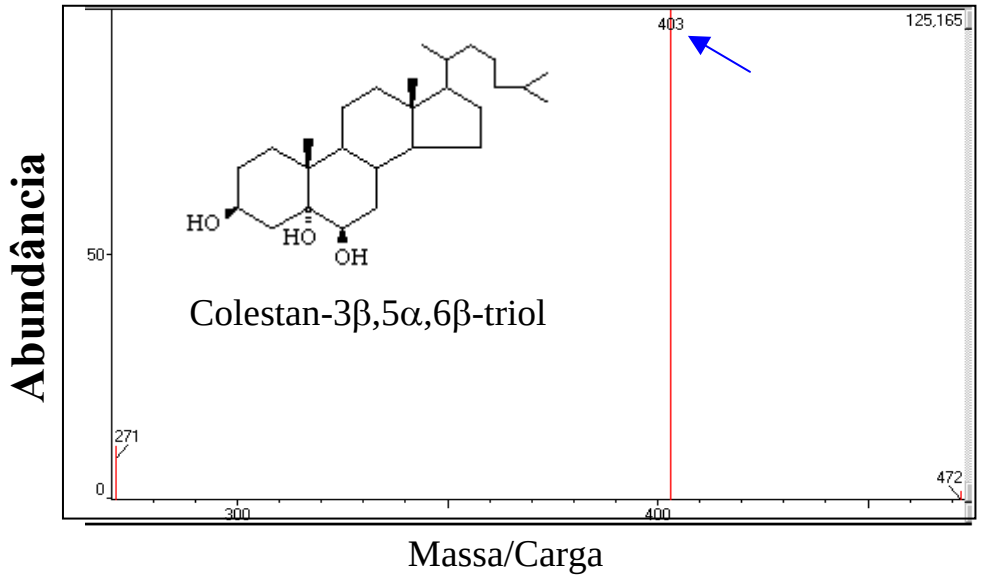

Figura 15.-Espectro de massa do colestanotriol (modo SIM).

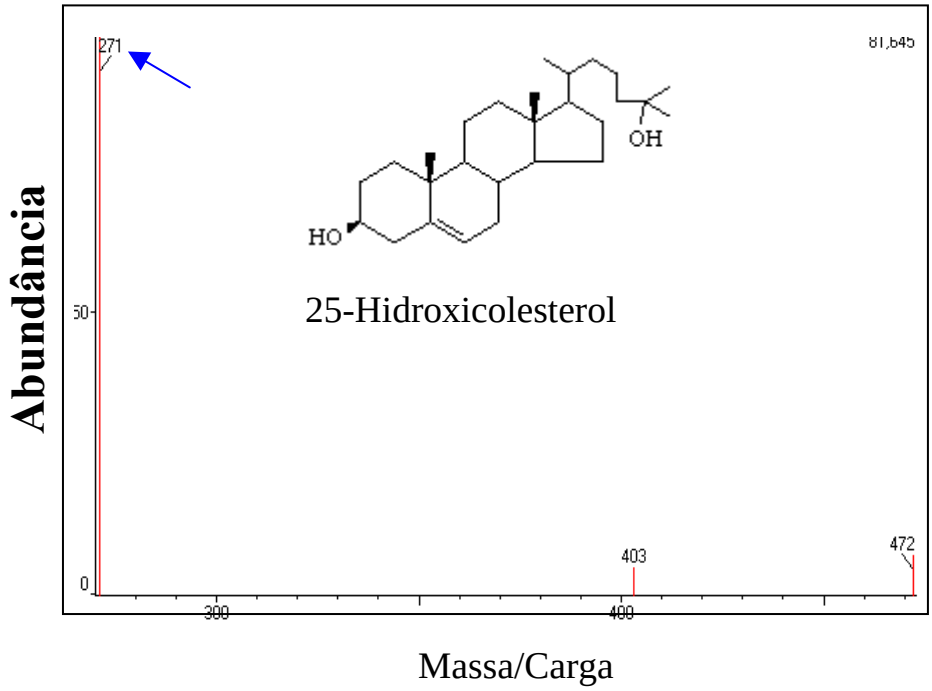

Figura 16.-Espectro de massa do 25-hidroxicolesterol (modo SIM).

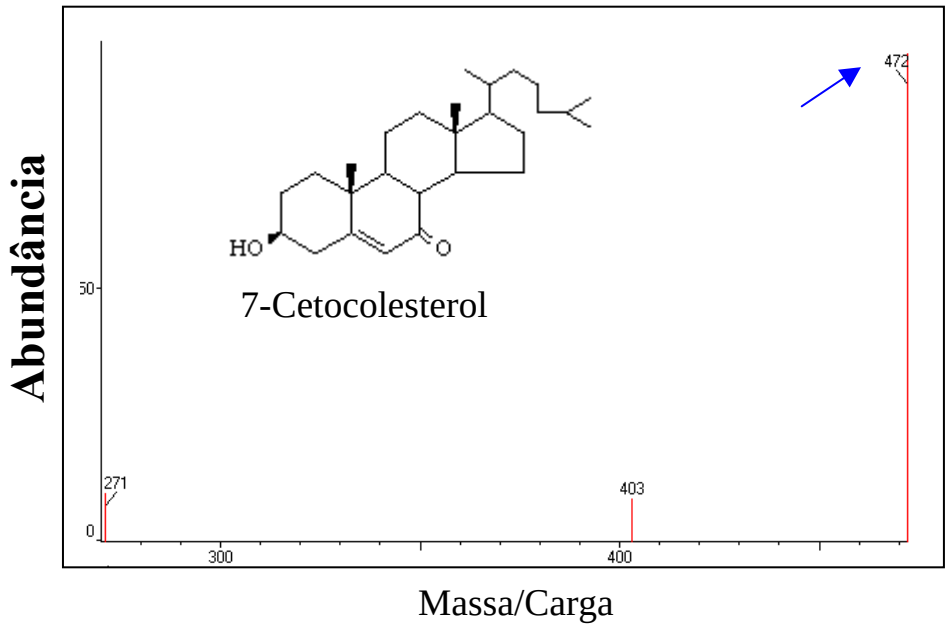

Figura 17.-Espectro de massa do 7-cetocolesterol (modo SIM).

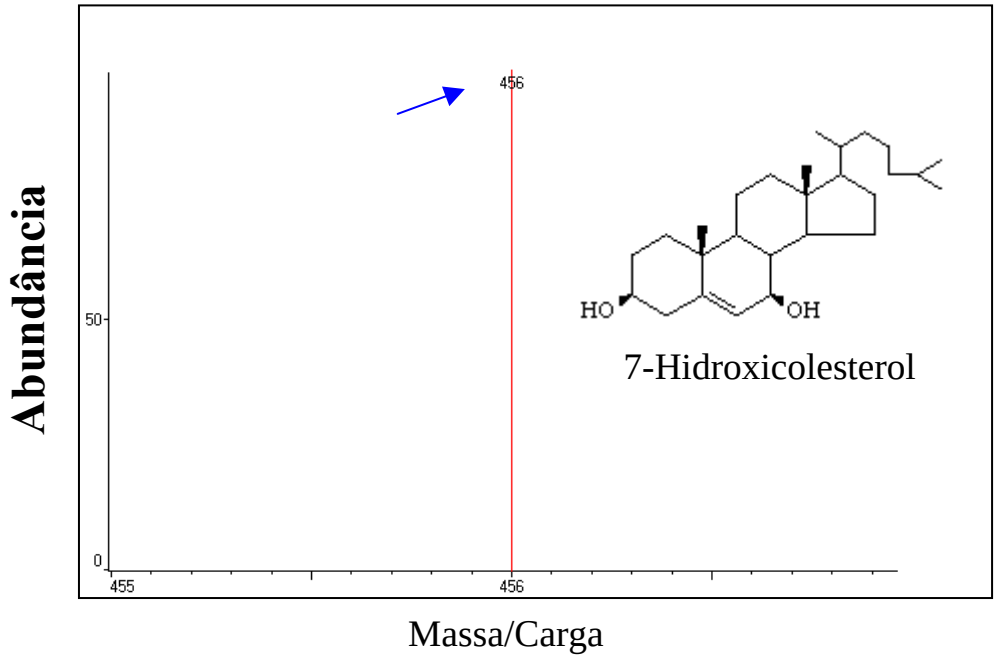

Figura 18.- Espectro de massa do 7-hidroxicolesterol (modo SIM).

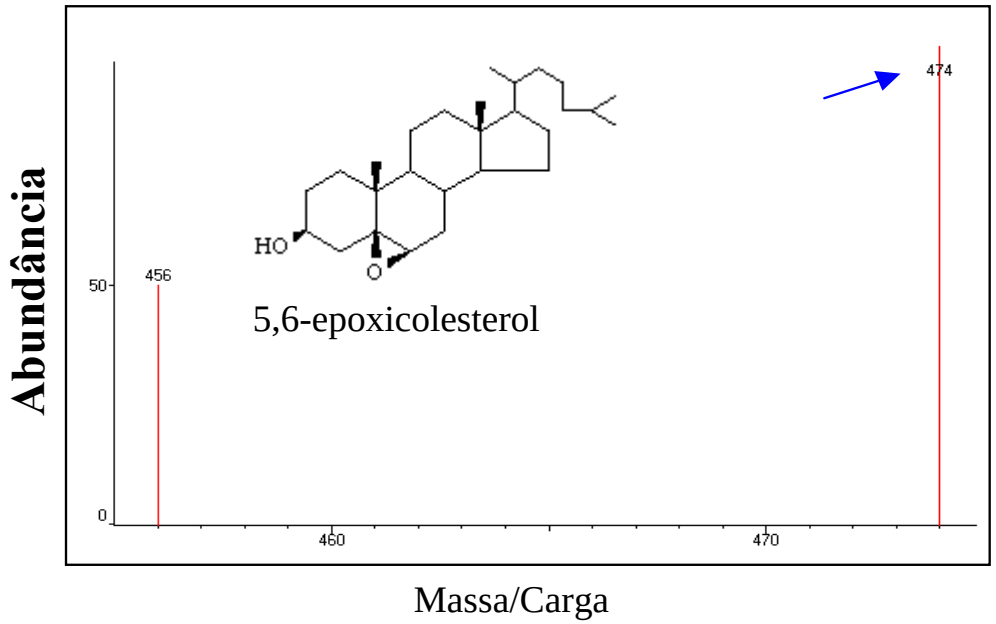

Figura 19.- Espectro de massa do β-epóxido (modo SIM).

4.1.4.- Curvas de Calibração dos óxidos de colesterol (ng/uL).

A curva de calibração foi calculada para cada óxido de colesterol, usando-se 5α-colestano como padrão interno (**Tabela 2**).

Composto	Concentração (ng/μL)	Coeficiente de correlação
7α-Hidroxicolesterol (7α-OH)	5-100	0.998
7β-Hidroxicolesterol (7β-OH)	5-100	0.997
Colesterol β-epóxido (β-epóxido)	5-100	0.996
Colesterol α-epóxido (α-epóxido)	5-100	0.992
Colestano-triol (Triol)	5-100	0.998
7-Cetocolesterol (7-Ceto)	5-100	0.995
25-Hidroxicolesterol (25-OH)	5-100	0.996

Tabela 2.-Coeficiente de correlação da regressão linear das curvas de calibração dos Cox.

4.1.5.- Limite de detecção dos COx

COMPOSTO	LIMITE DE DETECÇÃO (ng/μL)
7α- hidroxicolesterol	0.06
7β- hidroxicolesterol	0.06
colesterol β- epóxido	0.5
colesterol α- epóxido	0.5
colestanotriol	0.06
7- cetocolesterol	0.4
25- hidroxicolesterol	0.4

Tabela 3: Limite de detecção dos COx determinado pela técnica de GC-MS.

As principais dificuldades encontradas para a quantificação dos COx são: (i) similaridade estrutural, necessitando de alta resolução; (ii) a possibilidade de produção e/ou decomposição de COx durante a manipulação das amostras, que devem ser protegidas da luz, calor e O_2 (Smith,1996); (iii) as inúmeras etapas envolvidas no processo de extração e (iv) o tempo de armazenamento da amostra, até 2 meses.

Um dos principais problemas na análise dos COx é a formação de artefatos durante o preparo da amostra (Dzeletovic et al., 1995; Brown & Jessup, 1999). A oxidação do colesterol *ex vivo* durante o processamento da amostra, armazenamento e/ou análise é especialmente importante quando se analisa tecidos e fluídos biológicos, uma vez que as concentrações de COx nestas amostras é de várias ordens de magnitude menor que as concentrações do colesterol. Os interferentes podem ser formados a partir do momento da coleta do sangue. Para prevenir esta interferência é necessária adição de antioxidantes à amostra, como foi feito neste trabalho (Item 3.1.)

A maior parte dos COx presentes no plasma está na forma esterificada com ácidos graxos. Portanto, para se determinar o conteúdo total de COx é necessário efetuar-se a hidrólise destes ésteres. Nesta etapa pode ocorrer a conversão de um óxido a outro. Por exemplo, o 7-cetocolesterol pode ser desidratado para formar o 7-cetodienocolesterol (3,5-colestadieno-7-one), durante a saponificação alcalina. A formação do 3,5-colestadieno-7-one ocorre da seguinte forma: os radicais peroxil ou alquoxil provenientes da peroxidação de ácidos graxos insaturados podem inicialmente abstrair um átomo de hidrogênio alílico da posição 7 do colesterol, gerando o radical de carbono, o qual pode reagir com o oxigênio e gerar radical peroxil. Postula-se que o 7-cetocolesterol seja formado pela decomposiçao bimolecular do radical peroxil.

Assim o 3,5-colestadieno-7-one poderia ser formado por desidratação do 7-cetocolesterol via metanólise (Inouye et al.,1999).(**Figura 20**).

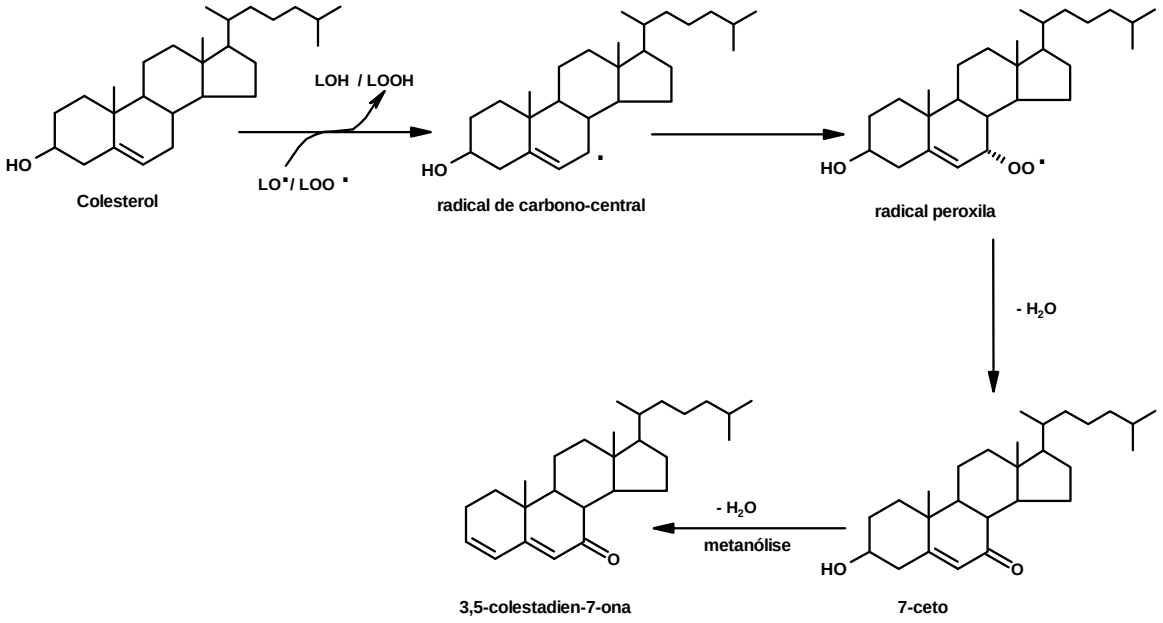

Figura 20-Formação de 3,5-colestadieno-7-one. LO·, radical alquoxil; LOO ·, radical peroxil.

4.2.-Curva de Calibração de nitrotirosina

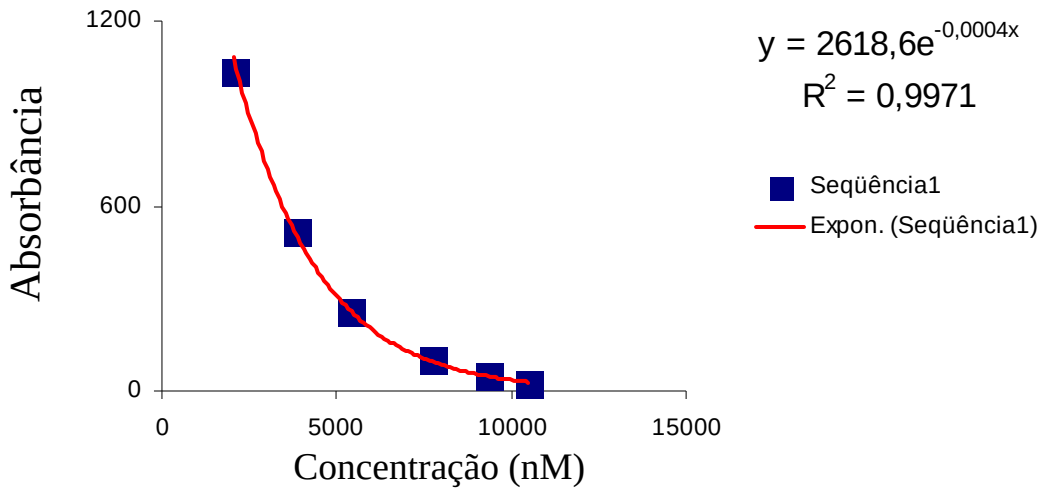

Figura 21.-Curva de Calibração de Nitrotirosina (nM) determinada por ELISA Competitivo.

4.3.- Análise dos parâmetros glicêmicos.

A figura 22 mostra as concentrações glicêmicas (mg/dL) dos grupos DM 1, DM 2 e IGT. Não houve diferença significativa das concentrações de glicose entre os grupos DM 1 e DM 2, havendo apenas diminuição significativa ($p<0.01$) no grupo IGT quando comparado aos grupos DM 1 e DM2.

A figura 23 representa os valores das glicemias dos grupos C2, DM 2 e IGT. Pode-se verificar que houve aumento significativo ($p<0.01$) nas concentrações de glicose no grupo DM 2 quando comparado aos grupos C2 e IGT. A figura 24 mostra as concentrações de glicose dos grupos C1 e DM

1.Houve aumento significativo (p<0.01) nas concentrações de glicose no grupo DM1 quando comparado ao grupo C1.

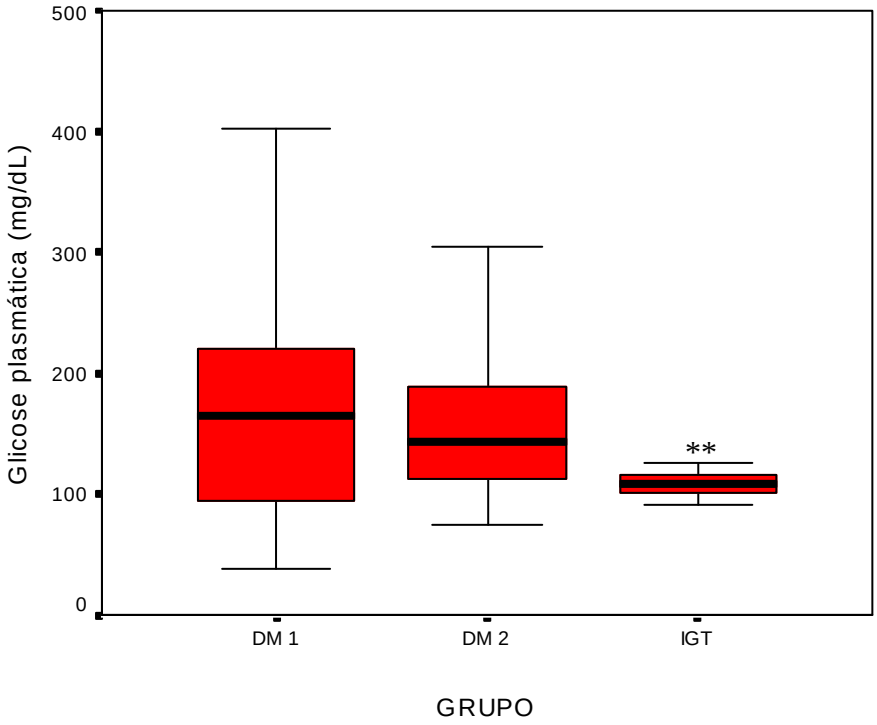

Figura 22.- Determinação da glicose (mg/dL) nos grupos DM 1, DM 2 e IGT. Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo). **(p<0,01) comparado aos grupos DM1 e DM 2.

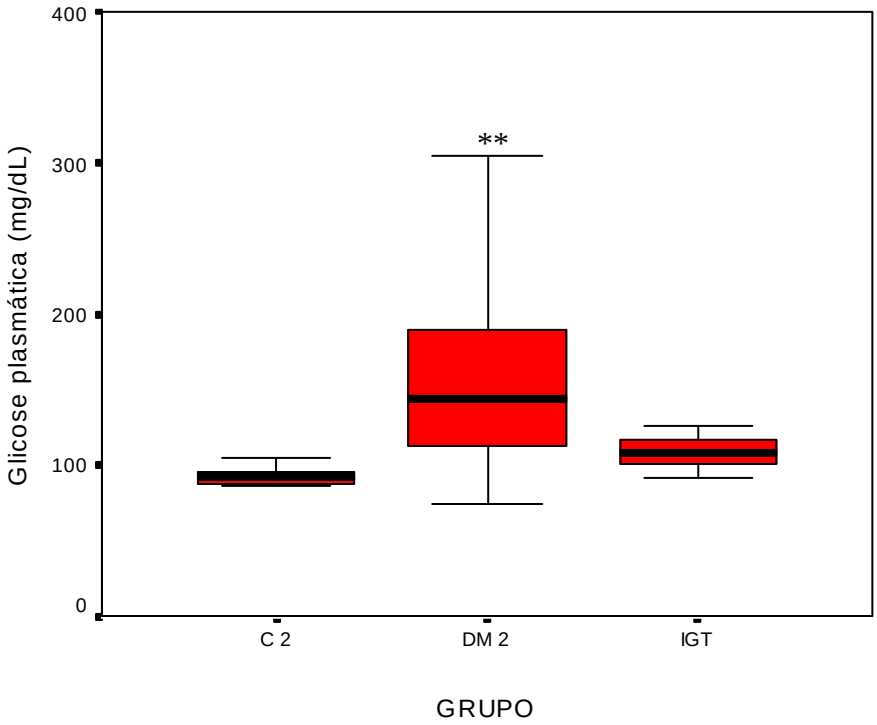

Figura 23.- Determinação da glicose. (mg/dL) nos grupos C 2, DM 2 e IGT. Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo). **(p<0,001) comparado aos grupos C 2 e IGT.

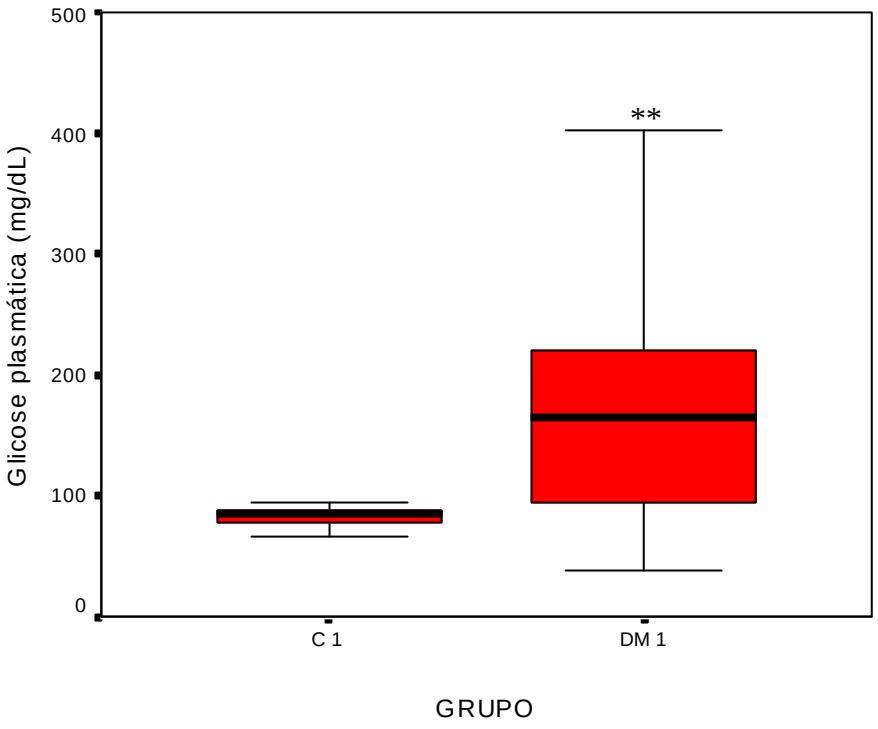

Figura 24.- Determinação da glicose (mg/dL) nos grupos C1 e DM 1 Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo).(p<0,01).**

A tabela 4 mostra os resultados da determinação da frutosamina (mmol/L) nos grupos DM 1 e DM 2. O grupo DM 2 apresentou significativo aumento p<0.01.

Grupos	**Frutosamina (mmol/L)**
DM1	2,46 ± 1,22
DM2	4,18 ± 2,80 **

Tabela 4: Determinação da Frutosamina plasmática (mmol/L).

A figura 25 mostra os valores de hemoglobina glicada (%) para os três grupos (DM 1, DM 2 e IGT). Observou-se aumento significativo ($p<0.01$) no grupo DM 1 comparado aos outros dois grupos, e diferença significativa ($p<0.01$) entre os grupos DM 2 e IGT.

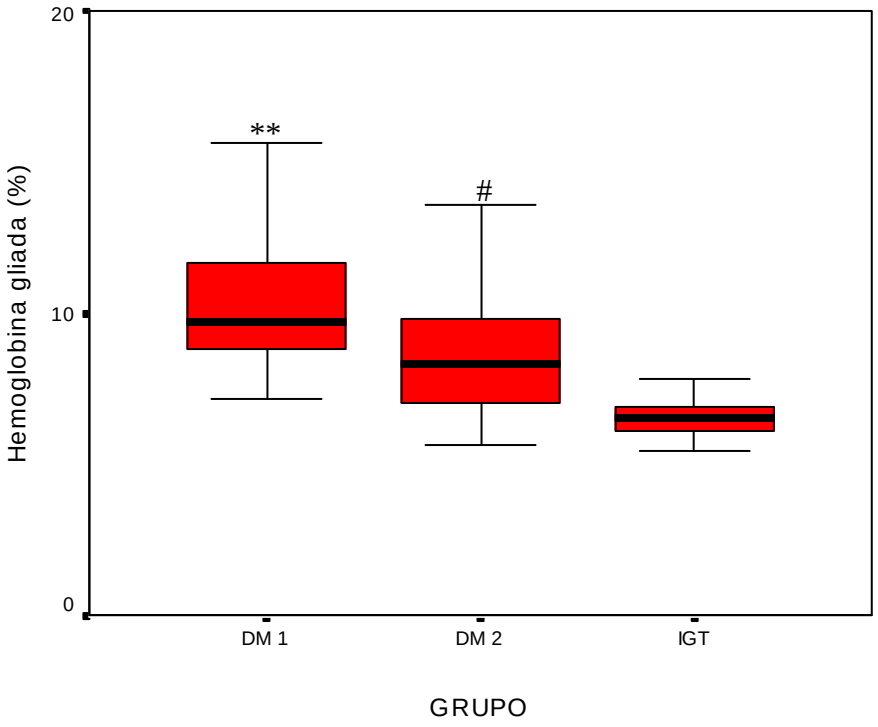

Figura 25- Valores de hemoglobina glicada (%) nos grupos DM 1, DM 2 e IG. ** (p<0,01) comparado o grupo DM 1 aos outros grupos. Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo). # (p<0,01) comparado ao grupo IGT.

4.4.- Análise dos parâmetros lipídicos.

A tabela 5 apresenta os resultados da determinação das concentrações de triglicérides,colesterol total, lipoproteína de alta densidade-colesterol (HDL), lipoproteína de baixa densidade-colesterol (LDL), lipoproteína de densidade muito baixa-colesterol (VLDL) de todos os grupos estudados.

Houve aumento significativo (p<0,05) de triglicérides e (p<0,01) de VLDL no grupo DM2 comparado ao grupo C2.O grupo IGT apresentou aumento significativo (p<0,01) de VLDL comparado ao grupo C2. Os valores das variáveis estudadas nos grupos C1 e DM1 foram estatisticamente iguais (**Tabela 5**). Houve diminuição significativa (p<0,01) das concentrações de triglicérides, colesterol total, LDL e VLDL no grupo DM 1 comparado ao grupo DM2 e IGT (**Tabela 6**).

Tabela 5.- Concentração de triglicérides, HDL, LDL e VLDL no plasma dos pacientes dos grupos C1 , DM1 , C2 ,DM2 e IGT.

	C 1	**DM 1**	**C2**	**DM 2**	**IGT**
Triglicérides (mg/dL)	64±20,78	84,47±50,92	122,66±39,4	199,45±100,28 #	178,34±91,98
HDL (mg/dL)	55,5±7,87	43,11±14,09	39±13,50	43,30±13,03	47,62±13,36
LDL (mg/dL)	100±24,85	83,95±35,50	128,8±16,28	130,39±38,88	136,79±34,85
VLDL (mg/dL)	12,75±4,136	18,88±14,46	24,5±7,88	39,68±19,62 **	35±18,60 **
Colesterol Total (mg/dL)	167,16±27,80	148,20±33,26	192,33±21,9	215,99±45,05	217,53±39,13

Os resultados expressam a média ± desvio padrão.**HDL**-lipoproteína de alta densidade, **LDL**- lipoproteína de baixa densidade,**VLDL**-lipoproteína de densidade muito baixa.
* * p<0,01 em relação ao grupo C2.# p<0,05 em relação ao grupo C2.

Tabela 6.-Concentração de triglicérides, HDL, LDL e VLDL no plasma dos grupos DM1, DM2 e IGT.

	DM1	DM2	IGT
Triglicérides (mg/dL)	84,47±50,92 **	199,45±100,28	178,34±91,98
HDL (mg/dL)	43,11±14,09	43,30±13,03	47,62±13,36
LDL (mg/dL)	83,95±35,50 **	130,39±38,88	136,79±34,85
VLDL (mg/dL)	18,88±14,46 **	39,68±19,62	35±18,60
Colesterol T Total (mg/dL)	148,20±33,26 **	215,99±45,05	217,53±39,13

Os resultados expressam a média ± desvio padrão**. HDL-** lipoproteína de alta densidade, **LDL-** lipoproteína de baixa densidade,**VLDL-**lipoproteína de densidade muito baixa.
** $p<0,01$ em relação aos outros grupos.

4.5.- Quantificação dos óxidos de Colesterol.

Nas figuras 26 a 28 são mostrados os resultados da determinação dos COx normalizados pela concentração de colesterol plasmático total. A figura 26 mostra as concentrações plasmáticas de COx entre os grupos DM1, DM2 e IGT. Observa-se aumento significativo dos COx 7α-OH, 7β-OH e 25-OH ($p<0,05$) no grupo DM1 comparado ao grupo DM 2. Quando comparado as concentrações dos COx entre os grupos DM1 e IGT, observa-se aumento significativo de 7α-OH, 25-OH, 7β-OH, β-epóxido ($p<0.05$) no grupo DM1.Os COx α-epóxido e triol. também apresentaram aumento no grupo DM1, mas não foi significativo ($p=0,07$).Houve uma diferença significativa ($p<0.05$) dos COx 7β-OH, β-epóxido e α-epóxido entre os grupos DM2 e IGT.O 7-ceto apresentou concentrações significativamente ($p<0.05$) maiores no grupo IGT quando comparado aos grupos DM1 e DM2.

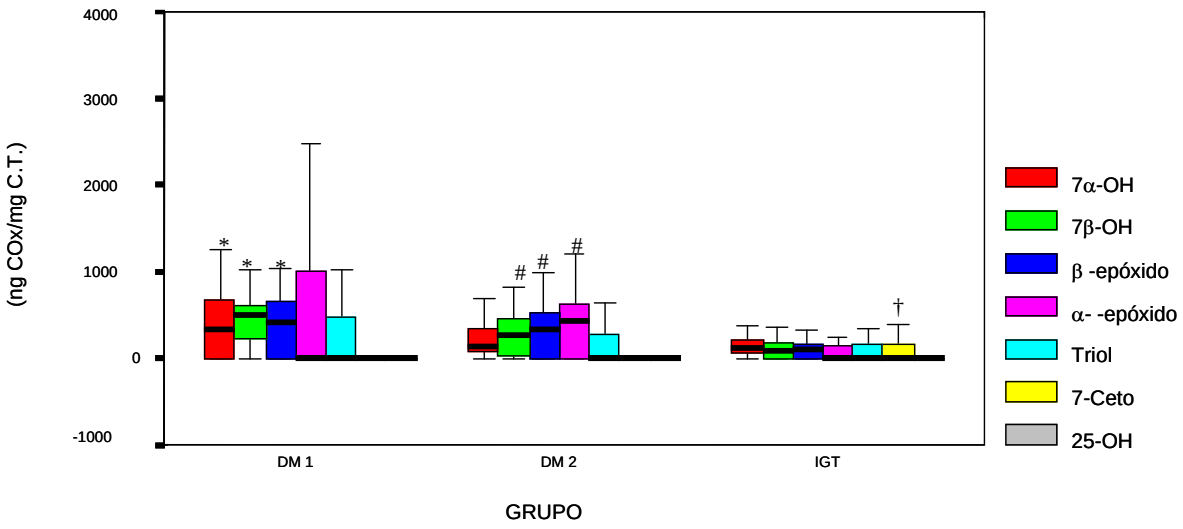

Figura 26.-Concentração plasmática dos óxidos de colesterol nos grupos DM 1, DM 2 e IGT. Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo). *p<0,05 comparado aos grupos DM2 e IGT.# p<0,05 comparado ao grupo IGT. † p<0,05 comparado ao grupo DM2.

A figura 27 mostra as concentrações de COx entre os grupos C2, DM2 e IGT. O grupo DM2 apresentou aumento significativo ($p<0.05$) dos COx 7β-OH, β-epóxido e α-epóxido comparado ao grupo C2. Os resultados das comparações das concentrações de COx entre os grupos IGT e C2 revelaram que o grupo IGT apresentou concentrações dos COx 7α-OH significativamente menores ($p<0.05$) que o grupo C2. Esses dois grupos, IGT e C2, apresentaram valores estatisticamente iguais para os demais COx.

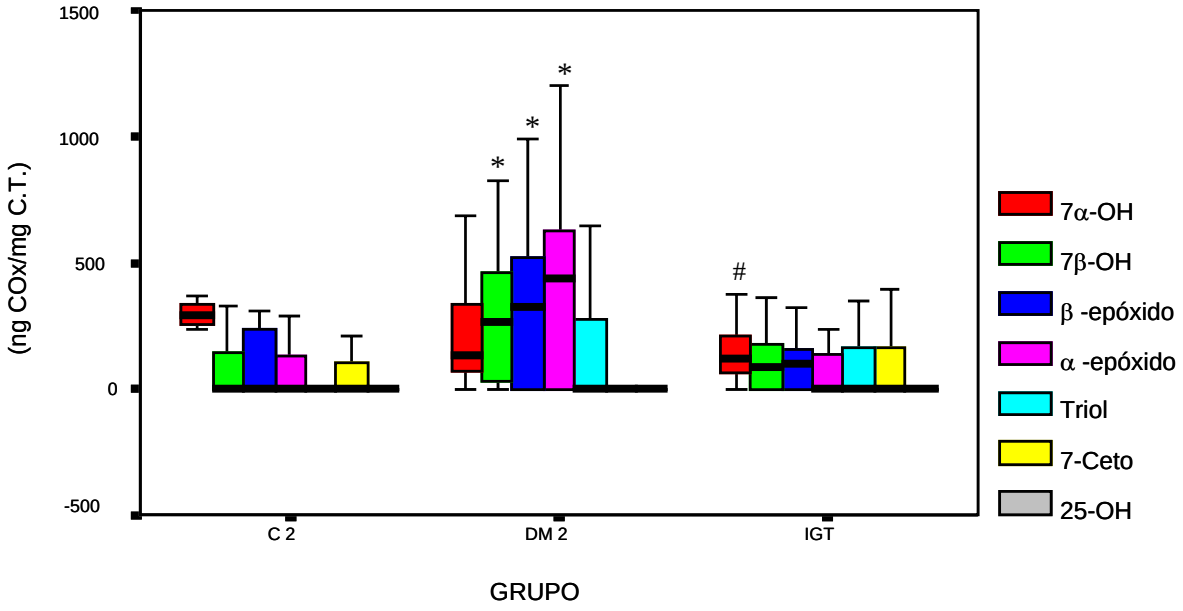

Figura 27.-Concentração plasmática dos óxidos de colesterol nos grupos C2 , DM 2 e IGT. Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo). * p<0,05 comparado ao grupo C2. # p<0,05 comparado ao grupo C2.

Nos grupos DM2, IGT e Controle o 25-OH não foi detectado possivelmente por apresentar concentrações abaixo do limite de detecção do método (0.4 ng/μL).

A figura 28 mostra as concentrações de COx entre os grupos C1 e DM1. O grupo DM1 apresentou aumento significativo ($p<0.05$) do COx 7β-OH comparado ao grupo C1. Esses dois grupos, DM1 e C1, apresentaram valores estatisticamente iguais para os demais óxidos.

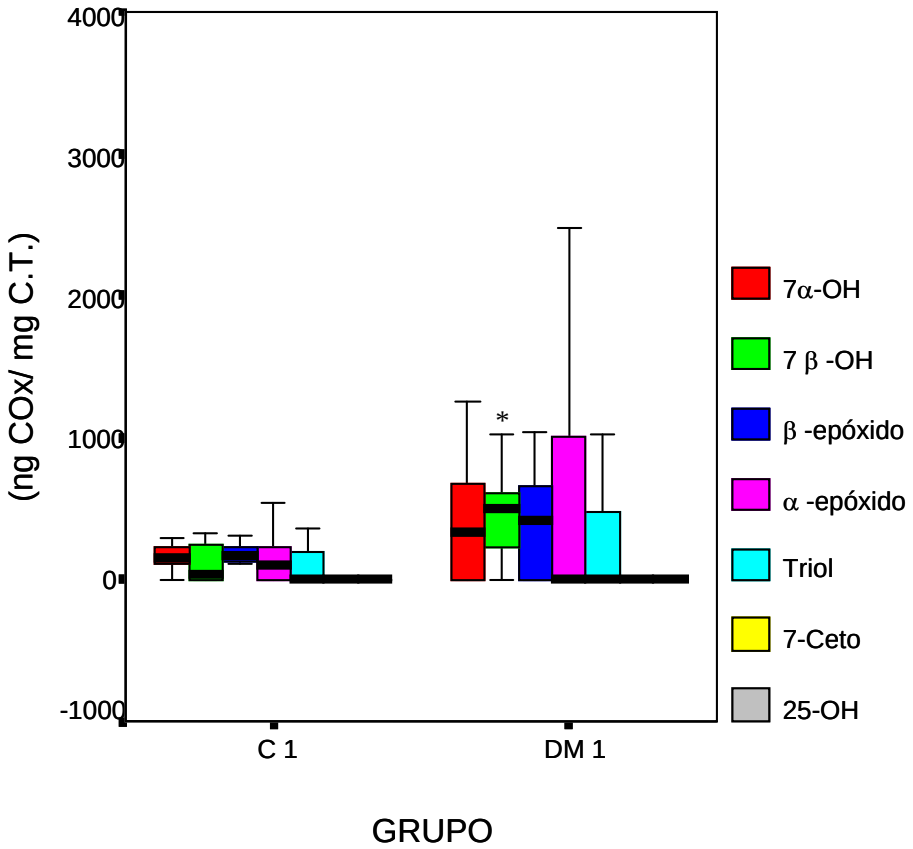

Figura 28.-Concentração plasmática dos óxidos de colesterol nos grupos C1 e DM 1. Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo).
*** p<0,05 comparado ao grupo C1.**

Quando comparamos o total de óxidos de colesterol de cada grupo, podemos observar que o grupo DM1 apresentou aumento significativo (p<0,01) comparado aos grupos DM2 e IGT. O total de óxidos de colesterol do grupo DM2 também apresentou aumento significativo (p<0,01) comparado ao grupo IGT (Fig.29).

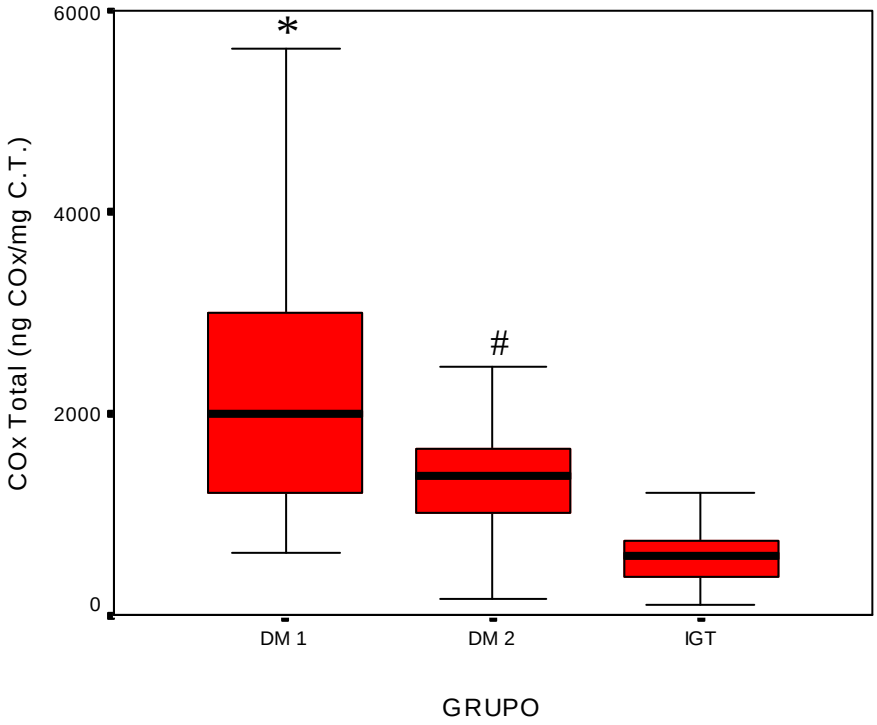

Figura 29.-Concentração plasmática do total dos óxidos de colesterol de cada grupo.* p<0,01 comparado aos grupos DM2 e IGT. Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo). # p<0,01 comparado ao grupo IGT.

A tabela 7 mostra as concentrações de COx em pacientes diabéticos tipo 2 que foram subdivididos em dois grupos: um grupo que faz uso de uma associação de hipoglicemiante oral e insulina e um outro que faz uso apenas de hipoglicemiante oral. Não teve diferença significativa entre os grupos, tendo havido apenas tendência para a diminuição da formação de alguns Cox no grupo que faz uso da associação com insulina.

	Hipoglicemiante oral + insulina	**Hipoglicemiante oral**
7α –OH (ng COx/ mg C.T.)	399,1 ± 145.7	586,4 ± 611,8
7β-OH (ng COx/ mg C.T.)	416,9 ± 186,7	620,8 ± 634,7
β-epoxido (ng COx/ mg C.T.)	452,7 ± 241	653,4 ± 551,2
α-epóxido (ng COx/ mg C.T.)	675 ± 572,3	777,2 ± 967,6
Triol (ng COx/ mg C.T.)	699,4 ± 281,2	946,7 ± 903,5
7-Ceto (ng COx/ mg C.T.)	983,5 ± 670,8	N.D.
25-OH (ng COx/ mg C.T.)	N.D.	N.D.

Tabela 7.- Concentração plasmática dos óxidos de colesterol nos grupos de DM2 que faz uso da associação de hipoglicemiante oral e insulina e o grupo que faz uso apenas de hipoglicemiante oral.Os Cox foram normalizados pela concentração de colesterol plasmático total. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão.7α -OH (7α-Hidroxicolesterol), 7β-OH (7β-hidroxicolesterol), β-epóxido (Colesterol β-epóxido), α-epóxido(Colesterol α-epóxido), Triol (Colestan-3β, 5α, 6β-triol), 7-Ceto (7-Cetocolesterol) e 25-OH (25-Hidroxicolesterol).
N.D.- Não detectado.

4.6.-Determinação de Nitrotirosina

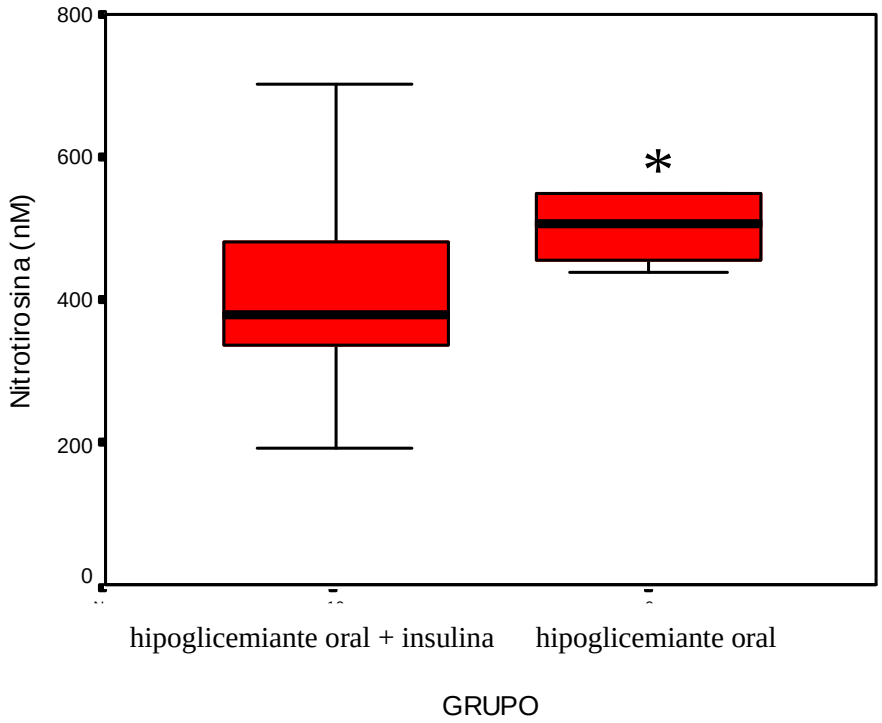

Figura 30.-Concentração plasmática de nitrotirosina.* p<0,01 comparado ao grupo hipoglicemiante oral + insulina. Resultados expressados como mediana (mínimo-máximo).

4.7.- Correlações

As tabelas de 8 a 11 mostram as correlações observadas entre as variáveis analisadas de cada grupo (DM1, DM2,IGT e C2). O grupo C1 não apresentou correlação estatisticamente significante entre as variáveis.

TABELA 8.-Correlações do grupo C2.

	Triol (ng COx/ mg C.T.)	Total COx (ng COx/ mg C.T.)
Triglicérides(mg/dL)		r = 0,568 p=0,034
Colesterol total (mmol/L)	r= -0,571 p=0,033	
LDL (mg/dL)	r= -0,616 p=0,019	
VDL (mg/dL)		r = 0,568 p=0,034

LDL- lipoproteína de baixa densidade,**VLDL**- lipoproteína de densidade muito baixa.

TABELA 9.-Correlações do grupo DM1.

	7α–OH (ng COx/ mg C.T.)	Triol (ng COx/ mg C.T.)	α-epóxido (ng COx/ mg C.T.)
Glicose (mg/dL)	r = -0,411 p=0,022		
Frutosamina (mmol/L)		r= 0,460 p=0,011	r= 0,350 p=0,053
Hemoglobina glicada (%)	r= -0,343 p=0,059		
HDL (mg/dL)	**r = -0,412** **p=0,021**		
IMC	r= -0,424 p= 0,023		
Tempo de diagnóstico		r= - 0,408 p= 0,025	

HDL- lipoproteína de alta densidade, **IMC**- índice de massa corpóreo.

TABELA 10.-Correlações do grupo DM2.

	7α –OH (ngCOx/ mgC.T.)	7β-OH (ngCOx/ mgC.T.)	β-epóxido (ngCOx/ mgC.T.)	α-epóxido (ngCOx/ mgC.T.)	Triol (ngCOx/ mgC.T.)	7-Ceto (ngCOx/ mgC.T.)
Glicose (mg/dL)			r=0,264 p=0,014			
Hemoglobina glicada (%)				r= -0,180 p=0,095		
Frutosamina (mmol/L)	r= -0,421 p=0,000	r= -0,302 p= 0,004		r=0,241 p=0,024	r= -0,233 p=0,029	
Triglicérides (mg/dL)		r= -0,264 p=0,013		r= -0,188 p=0,083	r= -0,210 p=0,051	r=0,469 P=0,00
Colesterol Total (mg/dL)		r= -0,263 p=0,013				r= 0,730 p=0,00
HDL (mg/dL)				r= 0,236 p=0,030		r= -0,198 p=0,070
LDL (mg/dL)						r= 0,748 p=0,00
VLDL (mg/dL)		r= -0,287 p=0,008			r= -0,202 p=0,066	
LDL+VLDL						r=0,719 p=0,000
IMC	r= -0,380 p=0,061			r= -0,422 p=0,040		
Tempo de diagnóstico	r= -0,361 p=0,031					

HDL- lipoproteína de alta densidade, , **VLDL**-lipoproteína de densidade muito baixa, **LDL**- lipoproteína de baixa densidade **IMC**- índice de massa corpóreo.

TABELA 11.-Correlações do grupo IGT.

	7α –OH (ngCOx/mgC.T.)	7β-OH (ngCOx/mgC.T.)	β-epóxido (ngCOx/mgC.T.)	α-epóxido (ngCOx/mgC.T.)	Triol (ngCOx/mgC.T.)
Glicose (mg/dL)		r=0,302 p=0,093			
Hemoglobina glicada (%)		r=0,487 p=0,005			
Frutosamina (mmol/L)	r= -0,367 p=0,039	r= -0,326 p= 0,068			
Triglicérides (mg/dL)		r= 0,563 p=0,001			
Colesterol Total (mg/dL)					
LDL (mg/dL)	r= -0,321 p=0,073				
VLDL (mg/dL)		r= 0,487 p=0,005			
LDL+VLDL		r=0,457 P=0,013			
Idade		r=0,436 p=0,014	r=0,309 p=0,090		r= -0,409 p=0,022
Tempo de diagnóstico	r= -0,361 p=0,031				

LDL- lipoproteína de baixa densidade,**VLDL-** lipoproteína de densidade muito baixa.

TABELA 12.-Correlações de COx Total/Grupo

	COx Total/ DM1 (ngCOx/mgC.T.)	COx total/ DM2 (ngCOx/mgC.T.)	COx total/ IGT (ngCOx/mgC.T.)
Hemoglobina glicada (%)			r=0,326 p=0,074
Frutosamina (mmol/L)		r= -0,204 p= 0,056	
Triglicérides (mg/dL)		r= -0,322 p=0,002	
Colesterol Total (mg/dL)		r= -0,321 p=0,002	
VLDL (mg/dL)		r= -0,303 p=0,005	
IMC		r= -0,382 p=0,060	
Tempo de diagnóstico	r= -0,341 p=0,061		

VLDL- lipoproteína de densidade muito baixa, **IMC**- índice de massa corpóreo,**C.T**.- colesterol total

5.0.-DISCUSSÃO

No Brasil, estima-se que o diabetes mellitus afeta 13 milhões de indivíduos, sendo que o tipo 1 corresponde a 5-10% dos casos. A prevalência do diabetes na população brasileira é de 7%, sendo que em São Paulo atinge 9.7% da faixa etária entre 30 e 69 anos e 13.4% da faixa de 60 a 69 anos (FUNASA.gov.br).

No diabetes a resistência e deficiência de insulina interfere não apenas no metabolismo dos carboidratos, mas também no seu papel essencial no metabolismo de lipídeos. A insulina tem papel modulatório na atividade da lipase lipoprotéica (LPL), enzima chave para o metabolismo lipídico, havendo diminuição da atividade da LPL em pacientes diabéticos do tipo 2 e hiperlipidêmicos (Brunzell et al, 1975 & Taylor et al,1979). Isto resulta na diminuição da remoção plasmática dos triglicerídeos da VLDL, aumento da síntese de VLDL no fígado, diminuição das concentrações de HDL e aumento das concentrações de LDL. Portanto, estas alterações resultam no aumento das concentrações plasmáticas de triglicerídeos, o que tem sido freqüentemente documentado em pacientes diabéticos. Em nosso estudo o grupo de diabéticos tipo 2 teve aumento significativo ($p<0,05$) das concentrações de triglicérides, colesterol total, LDL e VLDL comparado ao grupo DM1, o que corrobora com os dados da literatura. Os pacientes do grupo IGT apresentaram parâmetros lipídicos semelhantes ao grupo DM2 e acima dos valores considerados normais, o que demonstra comprometimento do metabolismo lipídico no estado “ pré-hiperglicêmico” e favorecimento para o aumento na formação dos óxidos de colesterol (Tabela 6).

Diversos estudos têm mostrado correlações entre as concentrações de COx e o estado de estresse oxidativo no diabetes mellitus, evidenciando-se

que os COx podem ser marcadores de estresse oxidativo nesta doença (Mol et. al.,1997; Dyer *et al*., 1997; Matsui *et al*., 1997).

Inouye *et al*. (1999) estudaram a relação entre as concentrações dos produtos da oxidação do colesterol e a HbA 1c (hemoglobina glicada) em eritrócitos de diabéticos e não diabéticos. Observaram que houve aumento significante de 7-cetocolesterol nos eritrócitos dos diabéticos comparados com os controles não diabéticos. Observaram, ainda, que o aumento do 7-cetocolesterol correlacionou-se com as concentrações de HbA1c, sugerindo que a glicação da hemoglobina, devido à hiperglicemia crônica, está intimamente relacionada com a peroxidação em eritrócitos. Jain (1988) também verificou que eritrócitos incubados com concentrações elevadas de glicose mostraram aumento significativo da lipoperoxidação das membranas.

Katsumi *et al*. (2000) fizeram uma análise comparativa entre as concentrações plasmáticas e eritrocitárias do 7-cetocolesterol, em indivíduos com diabetes mellitus, observando que as concentrações de 7-cetocolesterol, tanto no plasma como nos eritrócitos, não apresentaram associações com marcadores de tolerância à glicose, havendo, no entanto, uma correlação negativa das concentrações de HDL-colesterol com as do 7-cetocolesterol eritrocitário. Os resultados demonstram uma proteção da HDL contra a peroxidação lipídica e que os ensaios de COx, nas membranas eritrocitárias, poderiam ser importantes para complementar as informações fornecidas pelas determinações plsamáticas de COx na avaliação do papel da lipoperoxidação no diabetes. Bodzeh *et al* (2000) constataram que no diabetes gestacional também ocorre aumento de 7α- e 7β-hidroxicolesterol e dos β- e α-epóxidos de colesterol, sendo mais intenso no terceiro mês de gravidez.

Em contraste com os dados de Katsumi *et al* (2000), nós observamos uma correlação positiva das concentrações de frutosamina com as do

colestanotriol e do colesterol-α-epóxido, no grupo DM 1, e com as concentrações de colesterol-α-epóxido no grupo DM2. Também encontramos correlação negativa das concentrações de HDL-colesterol com as do 7α-hidroxicolesterol no grupo DM1 (**Tabela 9 e 10**). Esses dados sugerem que a formação dos COxs esteja relacionada à intensidade de glicação ou glicoxidação.

No estudo de Murakami *et al*. (2000) avaliou-se a oxidação do colesterol plasmático em invidíduos diabéticos, hipercolesterolêmicos e controles, verificando-se que os diabéticos apresentaram um percentual de 77,5 % do colesterol total como COx, predominantemente aqueles oxidados na posição 7 (7β-hidroxicolesterol, 7α-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol), muito acima do que foi observado para os grupos controle (36,6%) e hipercolesterolêmico (45,3%). Em nossos resultados podemos verificar que quando comparamos os grupos controle e DM 2 (Fig. 27), observamos que há uma maior formação dos COx 7β-OH, β-epóxido e α-epóxido no grupo DM2. Segundo Murakami et al (2000), isso poderia estar associado às baixas concentrações de α-tocoferol e ao aumento da formação de radicais livres nos diabéticos.

No diabetes experimental, induzido por estreptozotocina em ratos, observou-se aumento de 7β-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol no miocárdio dos ratos diabéticos, sugerindo que os COx podem ter um papel importante no desenvolvimento da cardiopatia diabética (Matsui *et al*.,1997). Nos animais tratados com 1% de probucol não houve diminuição dos COx no miocárdio. Os autores sugerem que o aumento de COx pode estar relacionado ao da deficiência de insulina no metabolismo do miocárdio (Matsui *et al*.,1997).

Em nosso estudo, quando comparamos as concentrações plasmáticas de COx entre os pacientes DM1 e DM 2, observamos que embora haja menor

oferta de substrato (colesterol) para a oxidação no grupo DM 1 (Tabela 6), houve aumento significativo ($p < 0.05$) na formação dos Cox 7α- OH, 7β-OH e 25-OH no grupo DM 1 (Figura 26). Isto poderia ser justificado pela elevada concentração plasmática de glicose no grupo DM1 (Fig.22), como também pela utilização de fármacos anti-hiperglicemiantes (metformina), anti-hipertensivos (Inibidores da enzima conversora da angiotensina II, IECA) e hipolipemiantes (estatinas), pelo fato de alguns pacientes estarem utilizando essas medicações.

O United Kingdon Prospective Diabetes Study (1998) sugeriu que a metformina, que é estruturalmente uma aminoguanidina, tem outros efeitos benéficos que poderiam estar envolvidos na prevenção das complicações cardiovasculares no diabetes. Sabe-se que a aminoguanidina atua como um antioxidante *in vivo*, prevenindo a formação de EROs e lipoperoxidação em células e tecidos (Giardino *et al*., 1998). Em modelo animal, a formação de AGEs e as complicações diabéticas são inibidas por aminoguanidina (Zhao *et al*., 1996). Estes dados podem colaborar com os nossos dados que mostram uma menor formação de COx no grupo DM2.

Vários efeitos da metformina poderiam contribuir para diminuição do estresse oxidativo, por exemplo, sua capacidade de reduzir a formação dos AGEs (Tanaka *et al*.,1997), diminuir as concentrações de metilglioxal, que é um precursor dos AGEs (Beisswenger *et al*.,1999), diminuir a produção do ânion superóxido das plaquetas (Gargiulo *et al*,. 2002), aumentar as concentrações intracelulares de glutationa reduzida (Ewis *et al*.,1995; Soliman *et al*., 1997), diminuir a lipoperoxidação (Kanigur-Sultuybek *et al*.,1995), aumentar a atividade da superóxido dismutase (Cu-SOD e Zn-SOD) e catalase (Pavlovic *et al*,2000) e atuar como um modulador da NADPH oxidase (Bonnefont-Rousselot *et al*.,2003).

Tem sido sugerido que os inibidores da ECA e as estatinas desempenham atividade antioxidante (Münzel *et al*, 2001). Os inibidores da ECA podem reduzir as concentrações de angiotensina II e a produção do ânion superóxido, além de aumentar as concentrações de bradicinina, prostaciclina e óxido nítrico (vasodilatadores), desempenhando um importante papel no estresse oxidativo vascular (Münzel *et al*, 2001).

As estatinas são fármacos que atuam na inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, uma enzima chave para a biossíntese do colesterol hepático. Wagner *et al* (2002) demonstraram que em células endoteliais incubadas por um longo período com atorvastatina (10μM, 18h) houve redução da formação de ânion superóxido. Da mesma forma, células THP-1 (derivadas de monócitos) incubadas por períodos curtos (30 min. a 3h) com sinvastatina reduziram a produção de ânion superóxido (Delbosc *et al*., 2002). Os autores sugerem que a sinvastatina poderia prevenir o processo de ativação da NADPH oxidase, uma importante enzima geradora de ânion superóxido encontrada em leucócitos e células endoteliais, por ser capaz de inibir o ancoramento da p67 phox na membrana e a translocação de p21 rac, que seria necessária para a ativação de outra subunidade (Delbosk *et al*, 2002). Esta hipótese foi comprovada por Kreck *et al*, (1996) que demonstraram uma mutação na p21 rac associada com ausência de isoprenilação, devido à redução da produção de ânion superóxido. Recentemente, outras propriedades antioxidantes das estatinas foram demonstradas. Thomas *et al*. (2000) verificaram que a sinvastatina aumenta a atividade da paroxonase, uma enzima antioxidante ligada à HDL. Uma outra possível contribuição para o efeito antioxidante das estatinas seria a capacidade desses fármacos de regular a expressão do RNAm da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), aumentando assim a produção de óxido nítrico

endotelial (Laufs *et al*, 1998; Kaesemeyer *et al*, 1999). Franzoni *et al*., (2003) estudaram a capacidade antioxidante das quatro estatinas mais utilizadas (atorvastatina, sinvastatina, pravastatina e fluvastatina).Verificaram que todas apresentavam atividade antioxidande para os radicais peroxila e hidroxila, sendo a fluvastatina e a sinvastatina mais eficazes como sequestradoras dos radicais peroxila e hidroxila, respectivamente.

Portanto, poderíamos sugerir que a inibição da NADPH oxidase, o aumento da atividade da enzima paraoxonase e da expressão do RNAm da eNOS pelas estatinas, a redução das concentrações de angiotensina II pela inibição da ECA, assim como a redução na formação dos AGEs, aumento das concentrações intracelulares de glutationa reduzida, diminuição da lipoperoxidação, aumento da atividade da superóxido dismutase (Cu-SOD e Zn-SOD) e catalase pela metformina, poderiam inibir a formação de ânion superóxido e de outras espécies radicalares, como também prevenir ou limitar o estresse oxidativo envolvido no diabetes e, conseqüentemente, diminuir a formacão dos óxidos de colesterol pela via radicalar.

Uma outra hipótese estaria relacionada às concentrações elevadas de insulina (hiperinsulinemia). Kyselová *et al*. (2002) estudaram a comparação do efeito de um curto período de tempo de hiperglicemia e hiperinsulinemia nos indicadores de estresse oxidativo em ratos Wistar, observando que a hiperinsulinemia reduziu a produção de EROs durante a hiperglicemia. A insulina exerce múltiplos efeitos na parede vascular, sendo que um dos mais importantes é o efeito vasodilatador. A ativação dos receptores da insulina nas células endoteliais resulta na ativação da via da fosfatidilinositol quinase (PI-3) e no aumento da produção de óxido nítrico, por indução do RNAm da eNOS. Ramana *et al*, (2003) demonstraram que o óxido nítrico regula a via do poliol em células musculares lisas por promover a S-tiolação da enzima aldose

redutase, o que levaria à normalização do ciclo redox da glutationa. Entretanto, esse efeito benéfico da insulina sobre a produção endotelial de óxido nítrico pode ser inibido pela PKC, ou, em situações nas quais há deficiência de insulina (diabetes tipo 1), ou, resistência à insulina (diabetes tipo 2).

Vários estudos têm demonstrado que o aumento da produção de EROs em pacientes diabéticos altera o metabolismo do óxido nítrico (Ryong *et al*., 2003). Tem sido demonstrado que a hiperglicemia aumenta as concentrações de óxido nítrico e do ânion superóxido em células endoteliais em uma estequiometria de 1:2 (Cosentino *et al*., 1997), o que favoreceria a formação de peroxinitrito (Squadrito *et al*.,1995). O peroxinitrito reage com resíduos de tirosina ou cisteína presentes em proteínas, formando nitrotirosina ou nitrocisteína. A nitrotirosina tem sido considerada um marcador indireto da produção de peroxinitrito e tem sido encontrada em concentrações elevadas em diabéticos (Ceriello *et al*., 2001). O peroxinitrito pode ainda se decompor em várias outras espécies radicalares de oxigênio e nitrogênio que promovem a peroxidação lipídica e formação dos Cox, o que contribui para a disfunção endotelial, inibe o transporte de elétrons mitocondrial, oxida os grupos sulfidrila das proteínas e interfere nas vias de sinalização por reagir com os resíduos de tirosina (Beckman et al.,1996).

Na tabela 7, quando comparamos diabéticos tipo 2 tratados com hipoglicemiante oral e insulina com o grupo de diabéticos tipo 2 tratados apenas com hipoglicemiante oral, verificamos que houve tendência na diminuição da formação dos COx no grupo que utilizou a associação de hipoglicemiante oral e insulina. Nós avaliamos também as concentrações de nitrotirosina nestes grupos e verificamos que no grupo que fazia uso da associação de hipoglicemiante oral e insulina houve diminuição significativa das concentrações de nitrotirosina (**Fig.30**). Portanto, podemos verificar que a

tendência na diminuição da formação dos COx e a diminuição das concentrações de nitrotirosina seja devido ao melhor controle metabólico quando se associa os hipoglicemiantes orais à insulina, por esta ser capaz de induzir o aumento da produção de óxido nítrico. Esse aumento de óxido nítrico contribuiria substancialmente para a normalização do ciclo redox da glutationa, diminuição da formação de espécies radicalares, da glicoxidação e da formação dos Cox, além de uma melhora da função endotelial.

No United Kingdom Prospective Study (1998), estudou-se se o controle intensivo da glicemia com sulfoniluréia e insulina reduziria o risco de complicações micro e macrovasculares no diabetes. Verificou-se que o controle glicêmico é de fundamental importância para a prevenção das complicações microvasculares (retinopatia,nefropatia), mas não para as macrovasculares (aterosclerose). Os efeitos citados do óxido nítrico poderiam explicar a relação entre o tratamento intensivo com insulina e a diminuição das complicações microvasculares, mas não as macrovasculares. É possível que os COx, por apresentam importantes efeitos biológicos, incluindo: (i) modificação da permeabilidade vascular seletiva do endotélio; (ii) inibição da síntese de prostaglandinas I_2; (iii) estímulo da agregação plaquetária (um processo importante que facilita o desenvolvimento da aterosclerose e trombose); (iv) inibição da expressão de receptores da LDL; (v) indução do acúmulo de ésteres de colesterol em macrófagos e da formação das células espumosas (Guardiola et al.,1995; Sevanian & Peterson, 1986); (vi) citotoxicidade para as células endoteliais (Henning et al.,1987; Sevanian et al.,1991), células musculares lisas (Peng et al.,1980) e fibroblastos (Imai et al., 1980), poderiam contribuir para a progressão das complicações macrovasculares no diabetes.

Quando comparamos os grupos IGT e DM2 podemos verificar que, em ambos, as concentrações de colesterol total foram elevadas (Tabela 6); contudo, as glicemias foram significativamente ($p<0.01$) mais elevados no grupo DM 2 (Fig.17). No grupo DM2 houve aumento significativo ($p< 0.05$) na formação dos COx 7β-hidroxicolesterol, colesterol-β-epóxido e colesterol-α-epóxido comparado ao grupo IGT. O grupo de intolerantes apresentou aumento significativo ($p<0,05$) apenas do óxido 7-cetocolesterol comparado ao grupo DM2 (Fig.21). Portanto, podemos verificar que a hiperglicemia é um estágio mais tardio na sequência de eventos da progressão do diabetes, enquanto que as anormalidades lipídicas e oxidativas já são manifestadas durante o estágio pré-hiperglicêmico (intolerância à glicose), o que contribui substancialmente para aumento de risco de doenças macrovasculares, como a aterosclerose. É interessante que Haffner *et al*. (1995) verificaram que o plasma de pacientes diabéticos tipo 2 do San Antonio Heart Study foi significativamente mais suscetível à peroxidação lipídica que o plasma de indivíduos controle e intolerantes à glicose. Esses dados corroboram com os resultados encontrados em nosso estudo.

As comparações das concentrações de COx entre os grupos IGT e C2 revelaram que o grupo IGT apresentou concentrações de 7α-hidroxicolesterol menores ($p<0.05$) que o grupo Controle, embora o grupo IGT tenha apresentado uma maior oferta de substrato (tabela 7). Isto poderia ser explicado pelo uso de fármacos anti-hipertensivos no grupo IGT, o que limitaria a formação de espécies radicalares e favoreria a menor formação de COx.

A figura 26 representa a comparação das concentrações de COx entre os grupos DM1 e IGT. Podemos observar que houve um aumento significativo ($p<0.05$) dos COx 7α-hidroxicolesterol , 7β-hidroxicolesterol, colesterol-β-epóxido e 25-hidroxicolesterol no grupo DM1 comparado ao grupo IGT,

embora o grupo IGT tenha apresentado valores lipídicos aumentados e índices glicêmicos normais. Esse resultado sugere que o estado de hiperglicemia crônica do grupo DM 1 seria o principal responsável pelo estresse oxidativo, que está intimamente relacionado ao aumento da formação de COx por via radicalar. Ceriello *et al* (1997) verificaram que a hiperglicemia aguda provoca estresse oxidativo que leva à uma depleção da capacidade antioxidante.

Na figura 28 comparamos os grupos C1 e DM1, podendo-se observar que há aumento na formação do 7β-hidroxicolesterol no grupo DM1. Esse resultado revela que no grupo DM1 o aumento da concentração de glicose (Fig.22) contribui substancialmente para o aumento da formação das espécies radicalares, da glicoxidação e da formação de COx.

Quando comparamos o total de óxidos de colesterol de cada grupo, podemos observar que o grupo DM1 apresentou aumento significativo ($p<0,01$) comparado aos grupos DM2 e IGT. O total de óxidos de colesterol do grupo DM2 também apresentou aumento significativo ($p<0,01$) comparado ao grupo IGT (Fig.29). Portanto, podemos verificar que nos grupos de diabéticos (DM 1 e DM2) o aumento da glicemia está relacionao ao aumento na produção de espécies radicalares por vários mecanismos (autoxidação da glicose, glicação de proteínas, aumento da via dos polióis e ativação de PKC), favorendo assim uma maior formação de COx, mesmo com a utilização de fármacos que poderiam controlar a geração das espécies radicalares no grupo DM2.

A comparação entre os grupos DM 1 e DM 2 mostrou que no grupo DM 1 houve maior formação de COx, o que poderia estar associado à elevada concentração de glicose no grupo DM1. Portanto, nossos resultados sugerem que as EROS geradas durante o estado de hiperglicemia crônica têm fundamental participação na iniciação da cascata de eventos que levam às complicações no

diabetes, sugerindo que os COx possam ser importantes para a progressão e desenvolvimento das complicações vasculares no diabetes.

6.0.-CONCLUSÃO

1) As concentrações plasmáticas dos óxidos de colesterol totais foram mais elevadas nos diabéticos, quando comparados aos intolerantes à glicose e aos normoglicêmicos.

2) O grupo de diabéticos tipo 1 apresentou maior formação dos óxidos 7α-hidroxicolesterol, 7β-hidroxicolesterol e 25-hidroxicolesterol, em relação ao grupo de diabéticos tipo 2; do 7α-hidroxicolesterol, 7β-hidroxicolesterol e colesterol-β-epóxido em relação ao grupo de intolerantes à glicose e do 7β-hidroxicolesterol, em relação ao grupo normoglicêmico.

3) O grupo de diabéticos tipo 2 apresentou maior formação dos óxidos de colesterol 7β-hidroxicolesterol, colesterol-β-epóxido e colesterol-α-epóxido, comparado aos grupos dos intolerantes à glicose e dos normoglicêmicos.

4) O grupo de intolerantes à glicose apresentou maior formação de 7-cetocolesterol, em relação ao grupo de diabéticos tipo 2, além de menor formação de 7α-hidroxicolesterol em relação ao grupo normoglicêmico.

5) As análises de correlação indicaram que a formação de alguns óxidos de colesterol, como o colestanotriol, colesterol-α-epóxido e 7β-hidroxicolesterol está relacionada à intensidade de glicação ou glicoxidação.

6) Os óxidos de colesterol são biomarcadores sensíveis da intensidade de modificação oxidativa dos lípides e poderia ser útil para o acompanhamento clínico e terapêutico de pacientes diabéticos.

7.0.-ANEXOS

7.1.-ANEXO A Comprovantes da aprovação do projeto de pesquisa no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

7.2.-ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Número do Paciente: _____ Iniciais do Paciente:._____

"DETERMINAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL EM PACIENTES INTOLERANTES À GLICOSE E DIABÉTICOS"

Proposta do Estudo: O objetivo principal deste trabalho é verificar os níveis plasmáticos do colesterol oxidado, bem como os níveis de glicose e lipídeos do sangue em pacientes com risco para o desenvolvimento do diabetes e diabéticos. Para avaliar se o colesterol oxidado poderia ser utilizado como marcador para o desenvolvimento do diabetes.

Caro colaborador,
A formulação desse documento foi realizada para informá-lo sobre os procedimentos necessários para alcançar o objetivo desse estudo. Caso concorde com a sua participação durante o desenvolvimento do estudo, vale ressaltar que todos os procedimentos adotados estão de acordo com a Declaração de Helsinque III, capítulo 50, que trata da proteção dos participantes parágrafos 50.20/27, que orienta procedimentos referentes às pesquisas que necessitam experiências com humanos.

Os procedimentos a serem seguidos serão:
Durante o estudo, você visitará seu médico. onde a história clínica e o exame físico serão realizados. Amostras de sangue para testes laboratoriais serão colhidas ao longo do estudo .
Coleta de sangue – serão coletados 20 ml a cada visita.
Local: Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia

Desconforto e riscos esperados

1. COLETA: A coleta de sangue por via endovenosa pode causar hematoma, tromboflebite, tontura, desmaio e dor local. (*Colheita de Material para Exames de Laboratório - Roberto A. de Almeida Moura - Libraria Atheneu - 1987*)

Análise crítica de riscos e benefícios

A pesquisa a ser realizada envolverá a coleta de material biológico de pacientes com risco para o desenvolvimento do diabetes e diabéticos No entanto, vale ressaltar que todos os procedimentos adotados serão acompanhados por profissionais competentes e devidamente treinados para a realização da coleta sangüínea e sob a orientação do Dr. Marcelo Chiara Bertolami do Laboratório de Lípides do Instituto Dante Pazzanese. A coleta de sangue dos pacientes, bem como sua análise estarão de acordo com a portaria Nº 721/GM, de 09.08.89, que define as Normas Técnicas destinadas a disciplinar a coleta, o processamento e a transfusão de sangue total, componentes e derivados em todo o território nacional. Portanto, a coleta desse material biológico acarretará risco mínimo para os pacientes e para a equipe envolvida nesse projeto.

Duração do estudo:
Se você aceitar participar deste estudo, sua participação será por um período de 2 anos. Além de você, outros pacientes também participarão do estudo.

Benefícios aos Participantes:
Você receberá todos os testes de laboratório sem qualquer custo.

Garantia de Informação:
Você, seu parente ou responsável legal tem o direito de fazer qualquer pergunta sobre seu estado clínico, medicação, procedimentos, riscos e benefícios ou outro aspecto qualquer com relação ao estudo ou sobre seus direitos como paciente. Se ocorrer lesão ou doença relacionada com a investigação, ou dúvidas sobre seus direitos, você deve contatar seu médico, Dr. Marcelo Bertolami. Telefone: 5549-4205 durante as manhãs.

Quem devo contatar se precisar de mais informações ou de ajuda ?

No caso de danos relacionados ao estudo ou sempre que o(a) senhor(a) tiver perguntas sobre o estudo ou necessitar de qualquer assistência, por favor entrem em contato com os médicos do estudo:

Nome: Dr. Marcelo Chiara Bertolami ou Dr. André Arpad Faludi
Endereço: Avenida Dante Pazzanese, 500 - Ibirapuera - 1ª andar - Prédio dos Ambulatórios
CEP: 04012-180 - São Paulo - SP
Telefone: (11) 5085-4047 - Telefax: (11) 5549-4205

Para perguntas sobre seus direitos como indivíduo do estudo, entre em contato com:

Nome: Dr. Pedro Silvio Farsky

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa do IDPC

Endereço: Avenida Dante Pazzanese, 500 - Ibirapuera
CEP: 04012-180 - São Paulo - SP - Cx. Postal: 215

Telefone: (11) 5085-4040

Participação voluntária e desistência:
Sua Participação neste estudo é voluntária. Da mesma forma, se você decidir participar do estudo você poderá retirar-se a qualquer momento sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico futuro não será afetado.

Confidencialidade dos dados:
Os dados e os resultados obtidos durante a investigação serão confidenciais e não serão revelados a terceiros a menos que sua autorização previa seja obtida.

Gastos adicionais:
Você não pagará pelos testes laboratoriais relacionados com a investigação. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação.

Nome do Paciente: _____

Data de Nacimento: _____

Endereço: _____

_____

Telefone para contato: _____

Registro do Hospital: _____

Número de RG: _____

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“DETERMINAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL EM PACIENTES INTOLERANTES À GLICOSE E DIABÉTICOS”

Após ter recebido todos as informações relacionadas ao estudo eu, _____

Certifico que o Dr. Marcelo Chiara Bertolami respondeu a todas as minhas perguntas sobre o estudo e minha condição, e eu voluntariamente aceito participar deste estudo. Está entendido que eu posso retirar-me do estudo a qualquer momento, e isto não afetará meus cuidados médicos ou de parentes meus no presente e no futuro. Todas as informações a meu respeito serão confidenciais.

Foi-me fornecida uma cópia das informações ao paciente, a qual eu li e compreendi por completo

Concordo que os meus dados clínicos obtidos neste estudo sejam documentados. Visando comprovar a exatidão dos dados, especialistas Autoridades de Saúde podem vir a inspecionar os dados na presença do pesquisador.

_____

Nome por extenso do paciente / representante legal

_____

Assinatura do paciente / representante legal Data

_____

Assinatura do Médico Responsável e carimbo Data

7.3.-ANEXO C

FICHA CLÍNICA

Paciente: _____ Data nasc.: ___/___/___

Endereço: _____ nº ___ Compl.:_____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: ___ CEP: _____ __

Tel.: (___)_____Tel.: (___)_____ Sexo: ( )M ( )F

Medico: _____

RG Santa Casa nº _____ Data da Coleta: __/__/__

Estratificação de risco

( ) Aterocleroses extraconaroriana

( ) Diabetes tipo I - (± anos: ___)

( ) Diabetes tipo II - (± anos: ___)

( ) Intolerância à glicose - (± anos: ___)

( )Antecedentesfamiliares:

_____

( ) Mulher pós-menopausa ou > 55 a

( ) Homem > 45 a

( ) Pai/irmão DAC < 55 a Mãe/irmã < 65 a

( ) Sedentarismo

( ) HAS

( ) Outros: _____

( ) Obesidade Altura: ___ Peso: ___

( ) Fumante Cig/dia: ___ Nº de anos:__

( ) Ex-fumante Parou há ___ anos

Nº de cig/dia: ___

Nº de anos que fumou: ___

( ) Dislipidemia: ( )hipercolesterolemia

( )hipertrigliceridemia

( )mista

( )HDL baixo

( ) etilismo crônico

Eventos

( ) Angina/DAC Desde:_____

( ) IAM Desde: _____

( ) Doença vasc. cerebral Desde: _____

( )Doença vascular periférica Desde: _____

Arritmia supraventricular Desde: ____

Arritmia ventricular Desde: ____

HVE Desde: ____

Exame Físico

PA: ___x___ mmHg Cintura: _____ Quadril: _____

( ) Presença de xantomas ( ) Presença de xantelasma ( ) Presença de arco corneano

Descrição de exame físico: _____

_____

_____

Dados Laboratoriais

Colest. Total	_____	**Glicohemoglobina**	____	**TGO**	_____
HDL	_____	**Creatinina**	____	**TGP**	_____
LDL	_____	**Ác. urico**	____	**CPK**	_____
VLDL	_____	**Potássio**	____	**Fibrinogênio**	_____
Triglicérides	_____	**Apo A1**	____	**PCR**	_____
Glic. Jejum	_____	**Apo B**	____	**Lp(a)**	_____
Pós dextrosol	_____	**TSH**	____	**Outros**	_____

Doenças Prévias

( ) Hipotiroidismo
( ) Hiperttiroidismo
( ) Hepatopatia
( ) Cálculo Biliar
( ) Pancreatite
( ) Doença Péptica
( ) Síndrome Nefrótica
( ) Insuficiência Renal
( ) Litíase Renal
( ) Quadro Psiquiátrico
( ) Outros: _____

Exames complementares: _____

_____

Medicamentos:

Secretagogo de insulina ( ) tipo _____ dose _____

Metformina ( ) dose _____

Secretagogo + insulina ( ) dose _____

Metformina + insulina ( ) dose _____

Metformina + secretagogo + insulina ( ) dose _____

_____

8.0.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKUS, I., KALAK, S., VURAL, H., CAGLAYAN, O., MENEKSE, E., CAN, G. Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocite vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clin. Chem. Acta*. v.244.p.221-227,1996.

ATALAY, M., LAAKSONEN, D.E., NISKANEN, L., UUSITUPA, M., HANNINEN, O., SEN, C.K. Altered antioxidants enzyme defences in insulin-dependent diabetic men with increased resting and exercise-induced oxidative stress. *Acta Physiol Scand*.v.161p.195-201,1997.

AXELSON, M. and LARSSON, O. Low density lipoprotein (LDL) cholesterol is converted to 27-hydroxycholesterol in human fibroblasts: evidence tht 27-hydroxycholesterol cn be an importaant meditor between LDL and the suppression of cholesterol production. J. Biol. Chem. v.270 n.25 p.15102-15110, 1995.

BAYNES, J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, v.40, p. 405-12, 1991.

BEISSWENGER, P., HOWELL, S., TOUCHETTE, A. et al., Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes* v.48 p.198-202, 1999.

BHANDRA, S., M. ARSHAD, Z. RYMASZEWSKI, E. NORMAN, R. WHERLEY, M. SUBBIAH. Oxidation of cholesterol moiety of low-density

lipoprotein in the presence of human endothelial cells or Ca^{2+} ions: Identification of major products and their effects. *Biochem. Biophys. Res. Com*. v.176,p. 773-783, 1991.

BJORKHEM, I. Mechanism of degration of the steroid side chain in the formation of bile acids. *J. Lipid. Res*, v33, p.455-471, 1992.

BJORKHEM, I., ANDERSSON, O., DICZFLUSY, U., SEVASTIK, B. XIU, R.J., DUAN, C., and LUND, E. Atherosclerosis and sterol 27- hydroxylse: Evidence for role of this enzyme im elimination of cholesterol from human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, v.91, p. 8592-8596, 1994.

BODZEK, P.,OLEJEK, A., ZAMLYNSKI, J. Concetration of oxidized cholesterol forms in normal and gestational diabetic pregnancy. *Ginekol Pol*, v.71, n.8, p.879- 882, 2000.

BOJE KM, FUNG HL. Endothelial nitric oxide generating enzyme(s) in the bovine aorta: subcellular location and metabolic characterization. *J Pharmacol Exp Ther* .v.253,p.20-6, 1990.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D., RAJI, B., WALRAND, S., GARDES-ALBERT, M., JORE, D., LEGRAND, A., PEYNET, J., VASSON, M.P. An intracellular modulation of free radicals production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress.*Metabolism*. v.52 p.586-589, 2003.

BÖSINGER, S., LUF, W., BRANDL, E. Oysterols: their occurrence and biological effects. *Int. Diry J*., Amsterdam, v.3. p.1-33, 1993.

BROWN, A. J., and W. JESSUP. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* v.142 p.1-28, 1999.

BROWN, M. S., S. E. DANA, and J. L. GOLDSTEIN. Cholesterol ester formation in cultured human fibroblasts. Stimulation by oxygenated sterols. *J. Biol.Chem.* v.250 p. 4025-4027, 1975.

BROWNLEE M.Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.*Nature*.v.414p.813-20,2001.

BRUNZELL JD, PORTE D JR, BIERMAN EL. Reversible abnormalities in postheparin lipolytic activity during the late phase of release in diabetes mellitus (postheparin lipolytic activity in diabetes).*Metabolism.* v.24 p.1123-37,1975.

CAMERON, N.E., COTTER, M.A. Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes.*, v. 46, p. S31-S37, 1977.

CARERI, M., MANGIA, A., MUSCI, M., PAROLARI, G. Development of gas chromatogrpphic method for determination of cholesterol oxides in meats products. *Chromatographia*, Wiesbaden, v.47, n.47, p. 42-48, 1998.

CARPENTER, K. L. H., S. E. TAYLOR, J. A. BALLANTINE, B. FUSSELL and M. J. MITCHINSON. Lipids in human atheroma and normal aorta. *Biocchim. Biophys. Acta.* v.1167 p.121-130, 1979.

CERIELLO, A., MERCURI, F., QUAGLIARO, L., ASSALONI, R., MOTZ, E., TONUTTI, L., TABOGA, C. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia*. v.44 p.834-838, 2001.

CERIELLO,A., BORTOLOTTI, N., FALLETI, E., TABOGA, C., TONUTTI, L., CRESCENTINI, A.Total radical- trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care*. v.20 p.194-197,1997.

CHISOLM, G.M., IRWIN, K.C., MARTIN, L.L., GUNDERSON, K.G., LINBERG, L.F., MOREL, D.W. nd DICCORLETO, P.E. 7β-hydroperoxycholest-5-en 3β-ol, a component of human atherosclerotic lesions, is the primary cytotoxin of oxidized human low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA v.91 p. 11452-114576, 1994.

COSENTINO,F.,HISHIKAWA, K., KATUSIC, Z.S., LUSCHER, T.F. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cell. *Circulation* v.96 p.25-29,1997.

COSTET, P., LUO YL, WANG N, TALL, AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J. Biol. Chem*. v.275 p.28240-28245, 2000.

CUPPELS, L.A., WILSON, P.W.F., KANNEL, W.B. Is hyperglycemia associeted with cardiovascular disease? The Framingham Study. *Am. Heart J.* v.121 p.586-590.1991.

DATO, S.M.A.; REBOLLEDO, O.R. La glicacion y glicoxidation de las lipoproteinas: su impotancia en la diabetes mellitus. *Medicina – Buenos Aires*, v.60, p.645-656, 2000.

DECKERT, V., A. BRUNET, F. LANTOINE, G. LIZARD, E. M. BRUSSEL, S. MONIER, L. LAGROST, M. D. DUFILHO, P. GAMBERT, M. A. DEVYNCK. Inhibitation by cholesterol oxides of NO release from human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol*. v.18 p.1054-1060, 1998.

DECKERT, V., L. PERSEGOL , L. VIENS, G. LIZARD, A. ATHIAS, C. LALLEMANT, P. GAMBERT, L. LAGROST. Inhibitors of arterial relaxation among componentes of human oxidized low-density lipoproteins. *Circulation* v. 95 p. 723-731, 1997.

DELBOSC, S., MORENA, M., DJOUAD, F., LEDOUCEN, C., DESCOMPS, B., CRISTOL, J.P. Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, are able to reduce superoxide anion production by NADPH oxidase in THP-1-derived monocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. v.40 p.611-617,2002.

DESCO, M.C., ASENSI, M., MARQUEZ, R., MARTINEZ-VALLS, J., VENTO, M., PALLARDO., F.V., SASTRE, J., VINA, J. Xanthina oxidase is

involved in free radical production in type 1 diabetes- protection by allopurinol. *Diabetes* v.51 p.1118-1124, 2002.

DIANE, W.M., LIN, C.Y. Cellular biochemistry of oxysterols derived from the diet or oxidation *in vivo. J. Nutr.Biochem*.v.7 p. 495-506, 1996.

DOMINGUEZ, C. RUIZ, E., GUSSINYE, M., CARRASCOSA, A. Oxidative stresse at onset and in early stage of type 1 diabetes in children and adolescents. Diabetes Care v.21p.1736-1742, 1998.

DONAHUE, R.P., ABBOTT, R.D., REED, D.M. Postchallenge glucose concentration and coronary heart disease in men of Japanese ancestry. *Honolulu Heart Program Diabetes.* v.36 p.689-696, 1987.

DYER, R.G., STEWART, M.W., MITCHESON, J., GEORGE, K., ALBERTI, M.M., LAKER, M.F. 7-Ketocholesterol, a specific indicator of lipoprotein oxidation, and malondialdehyde in non-insulin dependent diabetes and peripherl vascular disease. *Clin. Chim. Acta* v.260 n1 p.260-1, 1997.

DZELETOVIC, S., BREUER, O., LUND, E., DICZFALUSY, U. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal. Biochem*. v.225p.73-80, 1995.

EIZIRIK, D.L., Beta-cell defence and repair mechanisms in human pancreatic islets. *Horm. Met. Res.* v.28p.302-305,1996.

EWIS, S.A., ABDEL-RAHMAN, M.S. Effect of metformin on glutathione and magnesium in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Appl. Toxicol* . v.15p.387-390, 1995.

FENNEMA, O.R. Food Chemistry, 3 ed., v.765, New York, p. 1069, 1996.

FIELDING, C.J., BIST, A., FIELDING, P.E. Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.,v.94, p. 3753, 1997.

FORESTERMANN, U., POLLCK, J.S., Schmidt, H.H., Heller, M., Murad, F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* v. 88, p.1788-92, 1991.

FRANZONI, F., QUINONES-GALVAN, A., REGOLI, F., FERRANNINI, E., GALETTA, F. A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins.*Intern. J. Cardiol.* v.90 p.317-321,2003.

FRIEDWALD, W.T., LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol without the use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem*. v.18p.499-502, 1972.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Site http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE0505B.htm, acessado no dia 12 de agosto de 2003.

GARGIULO, P., CACCESE, D., PIGNATELLI, P., BRUFANI, C., DE VITO, F., MARINO, R., LAURO, R., DI MARIO, U., SANGUIGNI, V. Metformin decreases platelet superoxide anion production in diabetic patients. *Diabetes Metab. Res. Rev.* v.18p.156-159, 2002.

GIARDINO, I., FARD, A.K., HATCHELL, D.L., BROWNLEE, M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. v.47p.1114-1120, 1998.

GILLERY, P., MONBOISSE, J.C., MAQUAT, F.X. Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabete. Metab.*, v. 14, p. 25-30, 1988.

GRAY, M. F., T. D. V. LAWRIE. Isolation and identification of cholesterol α-oxide and other minor sterols in human serum. *Lipids*. 6: 836-843, 1991

GRESS, T.W. Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus.Atherosclerosis risk in communities study. *New Engl. J. Med*. v.342, p.342-905, 2000.

GRIENDLING, K.K., SORESCU, D., USHIO-FUKAI, M. NADPH Oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res*. v.86,p.494-501, 2000.

GUARDIOLA, F., CODONY, R., RAFECAS, M., BOTELLA, J. Formción de derivados oxidados del colesterol en alimentos. *Grasas Aceites*, Sevilla, v. 46, n.3, p. 202-212, 1995.

GUARDIOLA, F., R. CODONY, P. B. ADDIS, M. RAFECAS, and J. BOTELLA. Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem. Toxicol*. v.34, p. 193-211, 1996.

GUYTON JR, BLACK BL, SEIDEL CL.Focal toxicity of oxysterols in vascular smooth muscle cell culture. A model of the atherosclerotic core region. *Am J Pathol*. v.137,p.425-34, 1990.

HAFFNER, S.M., AGIL. A., MYKKANEN, L., STERN, M.P., JIALAL, I. Plasma oxidizability in subjects with normal glucose tolerance, imparied glucose tolerance and NIDDM. *Diabetes Care*. v.18,p.646-653, 1995.

HENNIG B., BOISSONNEAULT, G.A. Chorlestan- 3β, 5α, 6β-triol decreases barrier function of cultured endothelial cell monolayers. *Atherosclerosis*. v.68,p. 255-261, 1987.

HENNIG B., G.A.BOISSONNEAULT. Chorlestan- 3β, 5α, 6β-triol decreases barrier function of cultured endothelial cell monolayers. *Atherosclerosis*. v.68, p.255-261, 1987.

HERNÁNDEZ-PERERA, O., D. PEREZ-SALA, J. NAVARRO-ANTOLIN, R. SANCHEZ-PASCUALA, G. HERNÁNDEZ, C.DIAZ, and S. LAMAS. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, artorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest*. v.101,p.2711-2719, 1998.

HIGHLEY N. A., TAYLOR S. L. The steatotic and cytotoxic effects of cholesterol oxides in cultured cells. Food Chem. Toxicol. v.22,p.983-992, 1984.

HO, E. & BRAY, T.M. Antioxidants, NFKappaB activation, and diabetogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. v.222,p.205-13, 1999.

HODIS, H.N., D. W. CRAWFORD, and A. SEVANIAN. Cholesterol feeding increases plasma and aortic tissue cholesterol oxide levels in parallel: further evidence for the role of cholesterol oxidation in atherosclerosis. *Atherosclerosis* v.89, p. 117-126, 1991.

HOHMEIER, H.E., et al., Stable of maganese superoxide dismutase (MnSOD) in insulinoma cells prevents IL-1beta- induced cytotoxicity and reduces nitric oxide production. *J. Clin. Invest.* v.101,p.1811-1820, 1998.

HUGHES, H., MTHEWS, B., LENZ., .L., and GUYTON, J.R. Cytotoxicity of oxidized LDL to procine smooth musle cell is associated with the oxysterols 7-ketocholesterol and 7-hydroxycolesterol. *Arterioscler. Thromb*., v14, p. 1177-1185, 1994.

HUNT, J.V., DEAN, R.T., WOLFF,S.P. Hydroxyl radical production of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and aging. *Biohem. J.*, v. 256, p. 205-212, 1988.

HUNT, J.V., SMITH, C.T., WOLFF, S.P. Autoxidative glycosyltion and possible involvement of peroxides nd free radicals in LDL modidiction by glucose. *Diabetes*, v.39, p. 1420-4, 1990.

IGARASHI M, WAKASAKI H, TAKAHARA N, ISHII H, JIANG ZY, YAMAUCHI T, KUBOKI K, MEIER M, RHODES CJ, KING GL**.** Glucose or diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways. *J Clin Invest*. v.103, p.185-95,1999.

IMAI, H., WERTHESSEN, N.T., SUBRMANYAN, V., LEQUESNE, P.W., SOLOWAY, A.H., KANISAWA, M. Angiotoxicity of oxygenated sterols and possible precursors. Science., v.207, p. 651, 1980.

INOUYE M, MIO T, SUMINO K**.** Glycated hemoglobin and lipid peroxidation in erythrocytes of diabetic patients.*Metabolism.* v.48, p.205-9, 1999.

ISHII, H et al.,Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* v.272, p.728-731, 1996.

JAIN, S.K. Evidence for menbrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 937, p. 205- 210, 1988.

JAVITT, N.B. 26-Hydroxycholesterol: sybthesis, metabolism and biologic activities. *J. Lipid. Res*., v.31, p.1527-1533, 1990.

JAVITT, N.B. Bile acid synthesis from cholesterol: regulatory and auxiliary pathwys. *FASEB J*., v.8, p. 1308-1311, 1994.

JESSUP, W. Oxidized lipoprotein and nitric oxide. Curr Opin. Lipidol., v.7, p. 274, 1996.

JOHNSON, K., MORROW, C., KNIGHT, G.D., and SCALLEN, T.J. In vivo formation of 25-hydroxycholesterol from endogenous cholesterol after a single meal, dietary cholesterol challenge. *J. Lpid. Res*., v.35, p. 2241-2253, 1994.

KAESEMEYER, W.H., CADWELL, R.B., HUAMG, J., CADWELL, R.W. Bravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *J. An. Coll. Cardiol.* v.33:234-241, 1999.

KANIGUR-SULTUYBEK, G. GUVEN, M., ONARAM, I., TEZCAN, V., CENANI, A., HATEMI, H. The effect of metformin on insulin receptors and lipid peroxidation in alloxan and streptozotocin induced diabetes. *J. Basic. Clin. Physiol. pharmacol.* 6:271-280, 1995.

KATSUMI, ABO.,TAKAYA, MIO., and KIMIAKI SUMINO. Comparative Analysis of Plasma and Erytrocyte 7-Ketocholesterol as a Marker for Oxidative Stress in Patients with Diabetes Mellitus. *Clinial Biochemistry*, v.33, n7, p.541- 547,2000.

KCOGH, R.J., DUNLOP, M.E., LARKINS, R.G. Effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinas C, and phospholipase A2 activation. *Metabolism* v.46,p.41-47, 1997.

KLEIN, R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. Diabetes Care, v.18, p. 258-268, 1995.

KOYA D, KING GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. v.47, p.859-66, 1998.

KOYA, D. et al Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J. clin. Invest.* v.100,p.115-126, 1997.

KRECK, M.L., FREEMAN, J.L., ABO, A. Membrane association of Rac is required for hugh activity of the respiratory burst oxidative. *Biochemistry* v.35,p.15683-15692, 1996.

KUBISCH, H.M., et al., Targeted overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic beta-cells against oxidative stress. *Diabetes* v.46, p.1563-1566, 1997.

KUROKI T, INOGUCHI T, UMEDA F, NAWATA H.Effect of eicosapentaenoic acid on glucose-induced diacylglycerol synthesis in cultured bovine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*.v.247, p.473-7, 1998.

KYSELOVÁ, P.,ZOUREK, M. ROSAVÝ, Z., TREFIL, L., RACEK, J. Hyperinsulinemia and oxidative stress. *Physiol Res*. 51:591-595,2002.

LAUFS U, LIAO JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*. v.273, p.24266-71, 1998.

LENZEN, S., DRINKGERN, J., TIEDGE, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Rad. Biol. Med.* v.20, p.463-466,1996.

LIU, Y., MATTSSON, H.L., WIKLUND, O. Mcrophages isolated from human atherosclerotic plques produce IL-8, and oxysterols may have a regulatory function for IL-8 production. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.*, v.17, p. 317, 1997.

LYONS, M. A., A. J. BROWN. Molecules in focus: 7- Ketocholesterol. *The Int. J. Biochem. & Cell Bio*. v.31, p. 369-375, 1999.

LYONS, T.J., JENKINS, A. J. Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of the complications of diabetes: a carbonyl stress hypotheis. *Diabetes Rev*, v.5, p. 365-91, 1997.

MACRKER, G. Cholesterol autoxidation-current status. *J. Am. Oil Chem*, Soc. v.64,p.388-392, 1987.

MALAVASI, B. RASETTI, M.F., ROMA, P., FOGLIATTO, R., ALLEVI, P.,CATAPANO, A.L., GALLI, G. Evidence for the presence of 7-hydroperoxycholest-5-en-3β-ol in oxidized humn LDL. *Chem. Phys. Lipids.*, v.62, p. 209, 1992.

MATSUI, H., OKUMURA, K., MUKAWA, H., HIBINO, M., TOKI, Y., ITO, T. Increased oxysterol contents in diabect rat hearts: their involvement in diabetic cardiomyopathy. *Cn. J. Cardiol.* v.13, n.4, p. 373-379, 1997.

MAXWELL, R.S., THOMASON, H., SANDLER, D., LEGUEN, C., BAXTER, M.A., THORPE, G.H., JONES, A.F., BARNETT, A.H. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.* v.27,p.484-490, 1997.

MICHEL,J.B., FERON, O., SACKS, D., MICHEL, T. Reciprocal regulation of endothelial nitric oxide synthase by Ca^{2+-} calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* v.272,p.15583, 1997.

MOL, M.J., RIJKE, Y., DEMACKER, P.N., STALENHOEF, A.F. Plsma levels of lipid and cholesterol oxidation products and cytokines in diabetes mellitus and cigarette smoking: effeccts of vitamin E treatment. *Atherosclerosis*, v.129, p.169, 1997.

MOREL, D. W. and C. Y. LIN. Cellular biochemistry for oxysterols derived from the diet or oxidation in vivo. *J. Nutr. Biochem.* v.7, p.495-506, 1996.

MORIEL, P., SEVANIAN, A., AJZEN, S., ZANELLA, M.T., PLAVNIK, F.L., RUBBO, H., ABDALLA, D.S.P. Nitric oxide, cholesterol oxides and endothelium-dependent vasodilation in plasma of patientes with essential hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res*.v.35, p.1302-1309, 2002.

MOUGENOT,N., LESNIK, P., RAMIREZ-GIL, J.F., NATAF, P., DICZFALUSY, U., CHAPMAN, M.J., LECHAT, P. Effect of the oxidation state of LDL on the modulation of arterial vasomotor reponse. *Atheroscl*. v133, p.183-192, 1997.

MULLARKEY, C.J., EDELSTEIN, D., BROWNLEE, M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for ccelerted atherogenesis in diabetes. *Biochem. Biophys, Res. Commun*., v.173, p.932-9, 1990.

MÜNZEL, T.M.D. & KEANEY, J.F. Are ACE inhibitors a " Magic Bullet" against oxidative stress?. *Circ*. v.104, p.1571-1574, 2001.

MURAKAMI, H., TAMASAW, N., MATSUI, J., YASUJIMA, M. and SUDA, T. Plasma oxysterols and tocopherol in patients with Diabetes Mellitus and Hyperlipidemia. *Lipids*. v.35,p.333-338, 2000.

NIELSEN, J.H., OLSEN, C.E., JENSEN, C., SKIBSTED, L.H. Cholesterol oxidation in butter and dairy spread during storage. *J. Dairy Res., Cambridge*, v.63, p. 159-167, 1996.

NOUROOZ-ZADEH, J., RAHIMI, A., TAJADDINI-SARMAD, J., TRITSCHLER, H., ROSEN, P., HALLIWELL, B. Relationships between palsma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia*. v.40,p.647-653,1997.

O´DRISCOLL, G., GREEN, D., MAIORANA, A., STANTON, K., COLREAVY, F., TAYLOR, R. Improvement in endothelial function by angiotensin-converting enzyme inhibition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Am. Coll.Cardiol.* v.33, p.1506-1511, 1999.

OBERLEY, L.W. Free radicals and diabetes.*Free Rad. Biol. Med.* v.5, p.113-124, 1988.

PANIANGVAIT, P., KING, A.J., JONES, A.D., GERMAN, B.G. Cholesterol oxides in foods of animal origin. *J. Food Sci*., Chicago, v.60, n.6, p.1159-1174, 1995.

PAVILOVIC, D., KOCIC, R., KOCIC, G., JEVTOVIV, T., RADENKOVIC, S., MIKIC, D., STOJANOVIC, M., DJORDJEVIC, P.B. Effect of four-week metformin teratment on plasma and erutrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patientes with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesety Metab*. v.2, p.251-256, 2000.

PEDERSON, J.L., BJORKHEM, I., and GUSTAAFFSON, J. 26-Hydroxylation of C27-steroids by soluble liver mitochondril cytohrome P-450. *J. Biol. Chem*., v.254, p.6464-6469, 1979.

PEIPER, G.M. & RIAZ-UL-HAQ, J. Activation of nuclear-kappaB in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C. *Cardiovasc. Pharmacol.*v.30, p.528-532,1997.

PENG, S. K., P. THAM, B. C. TAYLOR, and B. MUKKELSON.Cytotoxic of oxidation derivatives of cholesterol on cultured aortic smooth muscle cells and their effect on cholesterol biosynthesis. *Am. J. Clin. Nutr*. v.32, p. 1033-1042, 1979.

PERRY, I.J., WANNAMETHEE, S.G., WHINCUP, P.H. Asymptomatic hyperglycemia and major ischaemic health disease events in Britain. *J.Epidemiol. Community Health*. v.48, p.538-543,1994.

PLANE, F., K. R. BRUCKDORFER, P. KERR, A. STEUER, and M. JACOBS. Oxidative modifications of low-density lipoproteins and inhibitation of relaxations mediated by endothelium-derived nitric oxide in rabbit aorta. *Br. J. Pharmacol*., v. 105, p. 216-222, 1992

POLONSKY, K.S., STURIS, J., BELL, G.L. Non-insulin-dependent diabetes mellitus-a genetically programmed failure of the beta cell to compensates for insulin resistance. *N. Engl. J.Med.* v.334, p.777-783,1996.

PORTILHA, D. et al., Etomoxir-induced PPAR alpha-modulated enzymes protect during acute renal failure. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* v.278, p.F667-F675, 2000.

RABINOVITCH, A. & SUAREZ-PINZON, W. Cytokines and their roles ina pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus.*Biochem. Pharmacol*. v.55, p.1139-1149, 1998.

RAJAGOPALAN S, KURZ S, MUNZEL T, TARPEY M, FREEMAN BA, GRIENDLING KK, HARRISON DG**.** Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone.*JClinInvest*.v.15,n.97,p.1916-23,1996.

RAMANA, K.V., CHANDRA, D., SRIVASTAVA, S., BHATNAGAR, A., SRIVASTAVA,S.K. Nitric oxide regulates the polyol pathway of glucose metabolism in vascular smooth muscle cells. *FASEB J*. v.17, p.417-425, 2003.

REISS, A.B., MRTINS, K.O., JAVITT, N.B. MARTIN, D.W., GROSSI, E.A., and GALLOWAY, A.C. Sterol 27-hydroxylaase: high levels of activity in vascular endothelium. *J.Lipid. Res*., v.35, p.1026-1030, 1994.

ROCIC, B., VUCIC, M., KNEZEVIC-CUCA, J., RADICA, A., PAVLIC-RENAR, I., PROFOZIC, V., METELKO, Z. Total plasma antioxidants in first-degree relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *Exp. clin. Endocrinol. Diabetes* v.46, p.1853-1858, 1997.

RONG, J. X., S. RANGASWAMY, L. SHEN, R. DAVE, Y. H. CHANG, H. PETERSON, H. N. HODIS, G. M. CHISOLM and A. SEVANIAN. Arterial injury by cholesterol oxidation products causes endothelial dysfunction nd

arteril wall cholesterol accumulation. *Arteriosclerosis, Thromb. and Vasc. Biol*. v.18, p.1885-1894, 1998.

SAKURAI T, BOISSEL JP, BUNN HF. Non-enzymatic glycation of antithrombin III in vitro. *Biochim Biophys Acta*.v.17, p.964:340-7, 1988.

SAKURAI, T., TSUCHIYA, S. Superoxide production from non-enzymatically glycated proteins. *FEBS Lett.*, v. 236, p. 406-410, 1988.

SARA, M. ACTIS & REBOLLEDO, O.R. La glicacion y glicoxidacion de las lipoproteinas su importancia en la diabetes mellitus. *Medicina (Buenos Aires)*, v.60, p.645-656, 2000.

SCHEIDT-NAVE, C., BARRETT- CONNOR, E., WINGARD, D.L. Sex differences in fasting glycemia asc a risk factor for ischemic heart death.*Am. J. Epidemiol.* v.133, p.565-576,1991.

SEVANIAN, A., and R. PETERSON. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem. Toxicol*. v.24, p. 1103-1110, 1986.

SEVANIAN, A., and R. PETERSON. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem. Toxicol*. v.24, p. 1103-1110, 1986.

SEVANIAN, A., J. BERLINER, and H. PETERSON. Uptake, metabolism and cytotoxicity of isomeric cholesterol-5,6-epoxides in rabbit aortic endothelial cells. *J. Lipid. Ress*. v.32,p. 147-155, 1991.

SEVANIAN, A., R. SERAGLIA, P. TRALDI, P. ROSSATO, F. URSINI and H. HODIS. Analysis of plasma cholesterol oxidation products using gas and high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Free Rad. Biol. Med.* v.17, p.397-409,1994.

SHODA, J., TOLL, A., AXELSON, M.P., PIEPER, F., WILKVALL, K., SJORVALL, J. Formation of 7α and 7β-hydroxylated bile acid precursors from 27-hydroxycholesterol in human liver mirosomes and mitochondria. *Hepat*., v. 17, p. 395, 1993.

SKRHA, J., HODINAR, A., KVASNICKA, J., HILGERTOVA, J. Relationship of oxidative stress and fribrinolysis in diabetes mellitus. *Diabet. Med.* v.13, p. 800-805, 1996.

SMITH, L.L. Cholesterol Autoxidation. Plenum Press, New York, p.49-123, 1981.

SMITH, L.L. Review of progress in sterol oxidation: 1987-1995. *Lipids*, Champaign, v.31, n.5, p.453-487, 1996.

SOLIMAN, A.,ABDEL-RAHMAN, E., ABDEL-RAHMAN, M. Influence of atenolol and/or metformin on glutathione and magnesium levels in diabetic rats. *J. Appl. Toxicol* . v.17, p.409-413, 1997.

SOLONEN, J. T., K. NYYÖNEN, R. SOLONEN, E. PORKKALA-SAARATAHO, T.-P. TUOMIDEN, U. DICZFALUZY, and I. BJÖRKHEM. Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis. *Circulation* v.95, p. 840-845, 1997.

SQUADRITO, G.L., PRYOR, W.A., The formation of peroxinitrite in vivo from nitric oxide and superoxide. *Chem. Biol. Interact*.v.96, p.203-206,1995.

SZEDLACSEK, S.E., B. WASOWICZ, S. . HULEA, H. I. NISHIDA, F.A. KUMEROW and T. NISHIDA. Esterification of oxysterols by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem*. v.270, p.11812-11819, 1995.

TABATABAIE, T., VASQUEZ-WELDON, A., MOORE, D.,YASHIGE, K. Free radicals and the pathogenesis of type 1 diabetes beta-cell cytocine-mediated free radical generation via cyclooxygenase-2. *Diabetes* v.52, p. 1994-1999, 2003.

TANAKA, Y.,IWAMOTO, H.,ONUMA, T. et al., Inhibitoory effect of metformin on formation advanced glycation end products. *Curr. Ther. Res*. v.58, p.693-697, 1997.

TANNER, F.C., G. NOLL, C.M. BOULANGER, and T. F. LÜSCHER. Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide. *Circulation* v.83, p. 2012- 2020, 1991.

TAYLOR KG, GALTON DJ, HOLDSWORTH G. Insulin-independent diabetes: a defect in the activity of lipoprotein lipase in adipose tissue. *Diabetologia*.v.16,p.313-7,1979.

THOMAS, M., SENTI, M., GARCIA-FARIA, F. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related liproproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Artherioscler Thromb Vasc. Biol.* v.20, p.2113-2119, 2000.

TIEDGE, M. et al., Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidant defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* v.46, p.1733-1742, 1997.

TOYOSHI INOGUCHI T, LI P, UMEDA F, YU HY, KAKIMOTO M, IMAMURA M, AOKI T, ETOH T, HASHIMOTO T, NARUSE M, SANO H, UTSUMI H, NAWATA H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*.v.49, p.1939-45, 2000.

TSAI, L.S., K. IJICHI, C. A. HUDSON and J. J. MEEHAN. A method for the quantitative estimations of cholesterol α-oxide in eggs. *Lipids* v.14, p. 124-128, 1980

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP: Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabestes. *Lancet.* v.352, p.854-865, 1998.

VIJAYALINGAM, S., PARTHIBAN, A., SHANMUGASUNDARAM, K.R., MOHAN, V.Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med*.v.13, p.715-719,1996.

WAGNER, A.H., KOHLER, T., RUCKSCHLOSS, U. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Artherioscler Thromb Vasc. Biol*.v.20, p.61-69, 2002.

WATSON, K. E., K. BOSTRÖM, R. RAVINDRANATH, T. LAM, B. NORTON, and L. DEER. TGF-β1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J. Clin. Invest*. v.93, 2106-2113, 1994.

WILLIAMS, B., GALLACHER,B., PATEL, H., ORME, C. Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes* v.46, p.1497-1503, 1997.

YERNENI, K.K., BAL, W., KHAN, B.V., MEDFORD, R.M., NATAARAJAN, R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* v.48, p.855-864, 1999.

YOSHIDA, K., HIROKAWA, J., TAGAMI, S., KAWAKAMI, Y., URATA, Y., KONDO, T. Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in daibetes mellitus: regulation of gluthatione synthesis and efflux. *Diabetologia.* v.38, p.201-210,1995.

YUSUF, S., SLEIGHT, P., POGUE, J., BOSCH, J., DAVIES, R., DAGENAIS, G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patientes. The Heart outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N. engl. J. Med*. v.342, p. 145-153, 2000.

ZHAO, W.TILTON, R.G. CORBETT, J.A., MCDANIEL, M.L., MISKO, T.P., WILLIAMSON, J.R., CROSS, A.H., HICKEY, W.F. Experimental allergic encephalomyelitis inthe rat is inhibited by aminoguanidine, an inhibitor of nitric oxide syntase. *J. Neuroimmunol*. v.64, p.123-133, 1996.

ZIEDÉN, B., . KAMINSKAS, . KRISTENSON, Z. KUCINSKIENÊ, B. VESSBY, A. G. OLSSON and U. DICZFALUSY. Increased plasma 7β-hydroxycholesterol concentrations in a population with a high risk for cardivascular disease. *Arteriosclerosis, Thromb. and Vasc. Biol.* v.19,p. 967-971, 1999.

ZWIRSKA-KORCZALA,K., JAGODZINSKA, J., WIELKOSZYNSKI,T., JOCHEM, J., BODZEK, D., WYLEZOL,M., PARDELA, M. Assessment of plasma lipid profile oxysterols and vitamin E concentrationin morbidity obese patients with coexisting arterial hypertension and non-insulin dependent diabetes mellitus *Pol Arch Med Wewn* v.107,p.141-147,2002.