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

Avaliação dos metabólitos do óxido nítrico, inibidores endógenos da
óxido nítrico sintase e homocisteína na intolerância à glicose e no
diabetes

Edimar Cristiano Pereira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla

São Paulo
2006

J8.431

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011630

Ficha Catalográfica

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

P436a Pereira, Edimar Cristiano
Avaliação dos metabólitos do óxido nítrico, inibidores
endógenos da óxido nítrico sintase e homocisteína na intolerância
à glicose e no diabetes / Edimar Cristiano Pereira. -- São
Paulo, 2006.
118p.

Tese (doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo, Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Abdalla, Dulcineia Saes Parra

I. Bioquímica clínica : Medicina 2. Diabetes mellitus
I. T. II. Abdalla, Dulcineia Saes Parra, orientador.

616.0756 CDD

Edimar Cristiano Pereira

Avaliação dos metabólitos do óxido nítrico, inibidores endógenos da
óxido nítrico sintase e homocisteína na intolerância à glicose e no
diabetes

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla
FCF - USP
(orientador/presidente)

Prof. Dr. Wilson Salgado Filho
INCOR - USP

Profa. Dra. Virginia Berlanga Campos Junqueira
UNIFESP

Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes
FCF - USP

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
INCOR - USP

São Paulo, 27 de março de 2006.

"é preciso amar as pessoas como se não houvesse amanhã"

(Dado Villa-Lobos, Renato Russo, Marcelo Bonfá)

A Deus por estar sempre iluminando o meu caminho.

Aos meus pais, Luiz e Tereza, que me educaram com tanto carinho e amor e que me ajudaram a construir o que sou hoje.

Aos meus irmãos Carlos, Marcos e Alexandre pelo apoio moral.

A minha noiva Silvana, o grande amor da minha vida, pelo carinho, compreensão e companheirismo.

Aos meus futuros sogro e sogra, Sr. Adelino e Sra. Graciete, pelo incentivo e amizade.

*A minha orientadora Profa. Titular Dulcineia Saes Parra
Abdalla pela amizade, incentivo, compreensão, paciência e
orientação ao longo dos anos.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Profa Titular Ana Campa pela grande amizade, simpatia, incentivo e convívio desses anos todos (graduação e pós-graduação) no laboratório.

Aos alunos de pós-graduação, Isabela, Emersom, Joelma, Alvorita, Elaine Apolinário, Simone, Sueli, Rita, Elaine Atanaka, Cristiane e Silvana pela saudável convivência.

Aos alunos de iniciação científica Nadjara e Fernanda e a técnica do laboratório Silene que também colaboraram de forma indireta para a realização desse trabalho.

Ao aluno de pós-graduação Tiago Pereira pela assessoria na análise estatística.

As secretárias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Márcia, Sueli, Ana e Dora e Elaine e Jorge, ambos do setor de pós-graduação, pela atenção e amizade.

Agradeço a ótima convivência com todos os professores do departamento de Análises Clínica e Toxicológicas da FCF-USP e demais departamento.

Ao coordenador do curso de Farmácia do IMES, Prof. Dr. Boni Yavo, pelo apoio e amizade.

Devo gratidão à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome da sua Diretora, Profa. Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, ao departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo, em nome de sua chefe, Profa. Titular Ana Campa e a coordenadora de pós-graduação em Farmácia - área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da

Universidade de São Paulo, em nome de sua presidente, Profa. Titular Dulcineia Saes Parra Abdalla.

Ao Dr. Marcelo Chiara Bertolami do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, o meu muito obrigado de coração por colaborar em mais um trabalho. Aos demais médicos (em especial ao Dr. André Arpad Faludi), residentes e funcionários (em especial Vera, Yara e Beth) do Ambulatório de Lípidos do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia que auxiliaram na triagem dos pacientes. Ao Dr. Mohamed Hassan Saleh pelos exames de imagem relacionados a função endotelial realizado no Setor de Ecocardiograma do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Ao Dr. Osmar Montes, endocrinologista da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e ao Dr. Hermes Toros, cardiologista da Faculdade de Medicina de Santos.

A Dra. Marina Tavares do IQ-USP pelos valiosos ensinamentos em eletroforese capilar.

O apoio financeiro da CAPES com a concessão de bolsa de doutorado.

E a todos os voluntários que participaram desse estudo.

RESUMO

A redução da biodisponibilidade óxido nítrico ($\bullet$ NO) tem sido responsável por complicações vasculares em algumas doenças, incluindo Diabetes Mellitus tipo 2 (DMII). A disfunção endotelial (DE) pode ser ocasionada pela baixa biodisponibilidade do $\bullet$ NO e estudos indicam que a hiperglicemia pode estar contribuindo para esse evento. Outro fato importante é que grande parte dos indivíduos que apresentam Intolerância à Glicose (IG) evolui para DMII. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar de que forma o estado hiperglicêmico poderia interferir sobre os metabólitos do $\bullet$ NO (S-nitrosotióis, nitrato + nitrito e nitrotirosina), inibidores endógenos da $\bullet$ NO sintase (ADMA e SDMA), homocisteína e a DE através da medida da atividade da n-acetil- β -glicosaminidase (NAG). Neste estudo participaram 140 voluntários: 12 controles (C), 32 IG e 96 DMII. A concentração de glicose foi superior nos grupos IG (109 ± 10 mg/dL) e DMII (165 ± 66 mg/dL) em relação ao grupo C (88 ± 11 mg/dL) ($p < 0.05$). Somente o grupo DMII ($8,5 \pm 1,9\%$; $4,57 \pm 2,78$ mg/dL) apresentou níveis elevados de hemoglobina glicada e frutossamina em relação ao grupo C ($6,0 \pm 0,9\%$; $2,31 \pm 0,27$ mg/dL). Entretanto, os metabólitos do $\bullet$ NO (nitrato+nitrito, S-nitrosotióis e nitrotirosina) apresentaram concentrações elevadas nos grupos IG ($35,1 \pm 12,9$ μ M; 137 ± 45 nM; 352 ± 104 nM) e DMII ($39,2 \pm 18,0$ μ M; 143 ± 73 nM; 472 ± 231 nM) em relação ao grupo C ($26,6 \pm 6,2$ μ M; 78 ± 46 nM; 260 ± 74 nM). A função endotelial também esteve alterada nos grupos IG ($28,0 \pm 7,3$ U/L) e DMII ($29,4 \pm 8,7$ U/L) em relação ao grupo C ($21,7 \pm 3,9$ U/L), como indicado pela atividade da NAG. O mesmo comportamento foi observado com os inibidores endógenos de $\bullet$ NO (ADMA e SDMA). A concentração de homocisteína plasmática não apresentou diferença significativa entre os grupos. Os dados demonstraram que os indivíduos IG apresentaram alterações bioquímicas, relacionadas ao estresse oxidativo e à disfunção endotelial, semelhantes aos pacientes com DMII, as quais poderiam contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

The nitric oxide (NO) has been responsible for vascular complications in some diseases, including Diabetes Mellitus type 2 (DMII). Endothelial dysfunction (ED) may be caused by NO low bioavailability and studies indicate that the hyperglycemia may be contributing to this event. Other important fact is that a large number of individuals who present Glucose Intolerance (GI) develop DMII. Therefore, the objective of this study was to evaluate the way the hyperglycemic state could interfere upon the NO metabolites (S-nitrosotiois, nitrate + nitrite and nitrotyrosine), endogen inhibitors of NO synthase (ADMA, and SDMA) and the DE using n-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) activity measure. In this study, 140 volunteers participated: 12 as controls (C), 32 GI and 96 DMII. Glucose concentration was superior in GI group (109 ± 10 mg/dL) and DMII group (165 ± 66 mg/dL) in relation to group C (88 ± 11 mg/dL) ($p < 0.05$). Only DMII group ($8,5 \pm 1.9\%$; $4,57 \pm 2,78$ mg/dL) showed high levels of glicade hemoglobin and frutosamine in relation to group C ($6,0 \pm 0,9\%$; $2,31 \pm 0,27$ mg/dL). However, NO metabolites (nitrate + nitrite, S-nitrosotiois and nitrotyrosine) showed high concentrations in groups GI ($35,1 \pm 12,9$ μ M; 137 ± 45 nM; 352 ± 104 nM) and DMII ($39,2 \pm 18,0$ μ M; 143 ± 73 nM; 472 ± 231 nM) in relation to group C ($26,6 \pm 6,2$ μ M; 78 ± 46 nM; 260 ± 74 nM). The endothelial function was also altered in groups GI ($28,0 \pm 7,3$ U/L) and DMII ($29,4 \pm 8,7$ U/L) in relation to group C ($21,7 \pm 3,9$ U/L), as indicated by NAG activity. The same behavior was observed with endogen inhibitors of NO (ADMA and SDMA). Plasmatic homocystein concentration has not shown significant difference between the groups. Data has shown that the individuals IG presented biochemistry alterations, related to the oxidative stress and the endothelial dysfunction, similar to the patients with DMII, which could contribute to the development of cardiovascular diseases.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMA: dimetilarginina assimétrica
ALBNO: nitroalbumina
CBS: cistationa-beta-sintetase
DAC: doença arterial coronariana
DDAH: dimetilarginina dimetilaminohidrolase
DMII: diabetes mellitus tipo II
DPT: dimetilargnina piruvato transferase
ECV: evento cardiovascular
EROs: espécies reativas de oxigênio
GSH: glutationa reduzida
GSSG: glutationa oxidada
Hb-G: hemoglobina glicada
HDL: lipoproteína de alta densidade
HPE-LIF: eletroforese capilar de alta performance acoplada ao detector de fluorescência induzida a laser
HPLC: cromatografia líquida de alta performance
IG: intolerante à glicose
IMC: índice de massa corpórea
LDL: lipoproteína de baixa densidade
LO[•]: radical alcoxila
LOO[•]: radical peroxila
MTHF: metiltetrahidrofolato
NAGase: n-acetil-β-glicosaminidase
•NO: óxido nítrico
•NO₂: dióxido de nitrogênio
NOS: óxido nítrico sintase
NOSc: óxido nítrico sintase constitutiva
NOSi: óxido nítrico sintase indutível
O₂^{•-}: ânion superóxido
•OH: radical hidroxila
ONOOO⁻: peroxinitrito
PRMT: proteína metiltransferase
RSNO: S-nitrosotiol
SDMA: dimetilarginina simétrica
SDS: dodecil sulfato de sódio
SRI: síndrome da resistência a insulina
TNF: fator de necrose tumoral
VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Fisiopatologia da Diabetes Mellitus tipo II: Óxido Nítrico vs disfunção endotelial e estresse oxidativo.....	1
1.1.1 Homocisteína e S-nitrosotióis.....	7
1.1.2 Inibidores endógenos da NO sintase.....	14
1.1.3 N-Acetil-β-glicosaminidase (NAGase): um biomarcador em potencial para a disfunção endotelial.....	18
2 OBJETIVO.....	20
2.1 Objetivos específicos.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Pacientes.....	21
3.1.1 Critérios de inclusão.....	21
3.1.2 Critérios de exclusão.....	22
3.2 Coleta.....	23
3.3 Determinação do perfil lipídico, glicose e hemoglobina glicada.....	23
3.4 Determinação da concentração de ADMA, SDMA e L-arginina.....	24
3.5 Determinação de NOx (nitrato + nitrito).....	24
3.6 Determinação de S-nitrosotióis totais.....	25
3.7 Determinação de tióis (glutathiona oxidada, glutathiona reduzida, homocisteína, cisteína e metionina).....	26
3.8 Detecção de nitrotirosina total.....	27
3.9 Determinação da atividade plasmática da n-acetil-β- glucosaminidase (NAGase).....	28
3.10 Avaliação da Função Vascular.....	29

3.11	Análise Estatística.....	29
4	RESULTADOS.....	29
4.1	Pacientes.....	29
4.1.1	Determinação das concentrações plasmáticas de glicose, hemoglobina glicada e frutossamina.....	32
4.1.2	Determinação do perfil lipídico.....	34
4.1.3	Determinação dos inibidores endógenos da óxido nítrico sintase (ADMA e SDMA) e L-arginina.....	40
4.1.4	Determinação de NOx, nitrotirosina e RSNO.....	43
4.1.5	Determinações de tióis.....	46
4.1.6	Determinação de glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG).....	48
4.1.7	Determinação da atividade enzimática da n-acetil-β-glucosaminidase (NAGase).....	51
4.2	Subdivisão do grupo DMII em DMII sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e DMII com evento cardiovascular (DMII com ECV).....	52
4.2.1	Resultados dos grupos DMII sem ECV e DMI com ECV.....	54
4.3	Análise Multivariada.....	58
4.3.1	Grupos: Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).....	58
4.3.2	Grupos: Controle, Intolerante à Glicose (IG), Diabetes Mellitus tipo II sem Evento Cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus tipo II com Evento Cardiovascular (DMII com ECV).....	62
4.3.3	Grupos: Diabetes Mellitus tipo II sem Evento Cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus tipo II com Evento Cardiovascular (DMII com ECV).....	65
4.4	Avaliação da função endotelial por Ultrassonografia (Doppler bi-dimensional).....	66
4.5	Correlações.....	69
5	DISCUSSÃO.....	71
6	CONCLUSÕES.....	82
7	APÊNDICE.....	83
8	ANEXOS.....	103
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fisiopatologia da Diabetes Mellitus do tipo II: Óxido Nítrico vs disfunção endotelial e estresse oxidativo

O óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) tem sido implicado na fisiopatologia da Diabetes Mellitus tipo II (DM II). A resistência à insulina, bem como as alterações na circulação micro e macrovascular, são características da DM II. Sabe-se que a hiperglicemia é um dos fatores responsáveis pela deficiência funcional da microcirculação vascular e pela hiperatividade plaquetária em indivíduos com DM II. Além disso, a cascata de coagulação, os níveis de fibrinogênio e do ativador de plasminogênio estão também alterados. A aderência e agregação de plaquetas na parede vascular na DM II estão mais elevadas que no indivíduo sadio. A baixa resposta à prostaciclina (PGI_2) e ao $\bullet\text{NO}$ parece estar envolvida na disfunção plaquetária, bem como à própria insulina, que é um antagonista da hiperatividade plaquetária. Assim, o defeito na ação da insulina na diabetes cria um ambiente que induz uma alteração da atividade plaquetária, prejudicando a circulação micro e macrovascular (Vinik *et al.*, 2001).

A Síndrome da Resistência à Insulina (SRI) é caracterizada por um grupo de anormalidades metabólicas e homeostáticas, as quais são fatores de risco para o desenvolvimento da DM II (**figura 1**). Essas anormalidades incluem a intolerância à glicose, a hiperinsulinemia, a hipertensão, a dislipidemia, o estado pró-trombótico/hipofibrinolítico, o estresse oxidativo e a disfunção endotelial (Reaven *et al.*, 1995; Chisholm *et al.*, 1997; McCarty *et al.*, 1994). Essas anomalias também geram um aumento do risco de macroangiopatia em ambos, diabetes e no estado de pré-diabético

representado pela SRI, resultando principalmente em alterações ateroscleróticas e trombóticas (Stamler *et al.*, 1993).

Figura 1: Hipótese esquemática da relação do estresse oxidativo, disfunção endotelial e resistência à insulina na Diabetes Mellitus do tipo II (Laight *et al.*, 2000).

A disfunção endotelial inclui a alteração da vasodilatação mediada pelo endotélio. O aumento da glicemia pode resultar na diminuição da produção de $\bullet\text{NO}$, na inativação do $\bullet\text{NO}$ por espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) ou por produtos da peroxidação lipídica, assim como, no aumento dos fatores de vasoconstrição derivados do endotélio (Cosentino *et al.*, 1998). O $\bullet\text{NO}$ está envolvido não somente no controle do tônus vasomotor mas também na homeostasia vascular e na função neuronal e imunológica. O $\bullet\text{NO}$ endógeno é produzido através da conversão do aminoácido, L-arginina à L-citrulina pela ação da enzima NO sintase (NOS). Atualmente se conhece quatro isoformas dessa enzima. As NOS-tipo I (isolada do cérebro) e tipo III (isolada de células endoteliais) são denominadas como "NOS-constitutivas", por produzirem continuamente baixas quantidades (picomolar) de $\bullet\text{NO}$. Essas isoformas são reguladas por Ca^{+2} -calmodulina com NADPH, flavina adenina dinucleotídeo/mononucleotídeo (FAD/FMN) e tetrahidrobiopterina (HB_4) como cofatores. Funcionalmente, a NOS-neuronal tipo I é importante na neurotransmissão, no controle central da homeostasia vascular e possivelmente na leitura e memória. A NOS-endotelial (eNOS) tipo III é essencial para o controle do tônus vascular em resposta a vários estímulos, incluindo o estímulo mecânico (*shear stress*) e receptor dependente (acetilcolina) e receptores independente (ionóforo de cálcio) (Furchgott *et al.*, 1993). O $\bullet\text{NO}$ produzido por NOS tipo III no endotélio difunde-se para o músculo liso vascular, atuando sobre a transformação da forma inativa da guanilato ciclase solúvel (sGCi) para sua forma ativa (sGCa), a qual atua sobre o GTP produzindo cGMP, o que induz o relaxamento muscular (**figura 2**). O $\bullet\text{NO}$ liberado do endotélio exerce outro papel importante que se baseia na inibição da adesão e agregação plaquetárias (Griendling *et al.*, 1996; Lopez-Jaramillo *et al.*, 1990; Wennmalm *et al.*, 1994). A NOS tipo II

e a NOS tipo IV (isolada de macrófago) são Ca^{+2} -calmodulina independentes e são denominadas como "NOS-indutível", pois elas são expressas somente por estímulos inflamatórios, tais como, TNF (fator de necrose tumoral), IL-1 (interleucina-1) e LPS (lipopolissacarídeo) (Nava *et al.*, 1995).

Figura 2: Síntese do óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina na célula endotelial vascular.

O $\bullet\text{NO}$ é um radical livre que reage com outros radicais como o radical superóxido ($\text{O}_2\bullet$) e os radicais peroxila ($\text{LOO}\bullet$) e alcóxila ($\text{LO}\bullet$), podendo inibir ou potencializar o dano oxidativo causado por estas espécies radicalares (O'Donnell *et al.*, 1997). A reação do $\bullet\text{NO}$ com ânion superóxido ($\text{O}_2\bullet$) leva à formação de um potente oxidante, o peroxinitrito (ONOO^-), que pode se decompor, gerando radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e dióxido de nitrogênio ($\bullet\text{NO}_2$) (Hogg *et al.*, 1993 e 1996; Ohara *et al.*, 1994). Uma importante característica desta reação é que ela não requer a participação de metais de transição (Beckman *et al.*, 1990). Além disso, o peroxinitrito pode reagir com tirosina (livre ou ligada à proteína) e formar a nitrotirosina. Elevadas concentrações de nitrotirosina têm sido detectadas em células espumosas, associadas a lesões ateroscleróticas, em coronárias humanas (Beckman *et al.*, 1990). A exposição da LDL ao peroxinitrito ou, simultaneamente, ao superóxido e óxido nítrico, resulta em várias reações que poderiam contribuir para a oxidação da LDL e a aterogenicidade destas partículas (Hogg *et al.*, 1993; Graham *et al.*, 1993). A presença de nitrotirosina na urina de indivíduos com aterosclerose e a diminuição do relaxamento das artérias ateroscleróticas de animais e humanos (Minor *et al.*, 1990) são fortes indicadores de que a inativação do óxido nítrico, com a conseqüente formação de peroxinitrito, possa ocorrer *in vivo*. Os mecanismos da reação do $\bullet\text{NO}$ com radicais lipídicos como o radical peroxila ($\text{LOO}\bullet$) ou o radical alcóxila ($\text{LO}\bullet$) não estão bem definidos, mas sabe-se que, na ausência de $\text{O}_2\bullet$, esta reação inibe a peroxidação lipídica (Rubbo *et al.*, 1994; O'Donnell *et al.*, 1997). De fato, existe uma correlação entre a maior produção de $\bullet\text{NO}$ e a menor suscetibilidade da LDL à oxidação, sugerindo que o $\bullet\text{NO}$ tem um importante papel em minimizar a oxidação da LDL (Calo *et al.*, 1998). O poder oxidante ou antioxidante do $\bullet\text{NO}$ depende da proporção entre as concentrações deste radical e as do

ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$). A geração simultânea de $O_2^{\bullet -}$ e $\bullet NO$ reduz o potencial antioxidante do $\bullet NO$, uma vez que menos $\bullet NO$ estará disponível para a reação com os radicais $LOO^{\bullet}$ e $LO^{\bullet}$. Uma proporção de $\bullet NO:O_2^{\bullet -} < 1$ aumenta a peroxidação devido à formação de peroxinitrito, mas quando esta proporção é equivalente ou > 1 o $\bullet NO$ inibe a peroxidação lipídica, interrompendo as reações de propagação da cadeia mediada por radicais lipídicos (Rubbo *et al.*, 1994; O'Donnell *et al.*, 1997).

A disfunção endotelial multifacetada, envolvendo a geração de estresse oxidativo, é a principal manifestação da SRI, incluindo a resistência à insulina e a associação à doença macrovascular (**figura 3**). De fato, o desenvolvimento paralelo da aterosclerose, a macroangiopatia diabética e a resistência à insulina no metabolismo coronário (Pinkney *et al.*, 1997), podem ser considerados como uma manifestação da disfunção endotelial nos distintos sítios vasculares. Portanto, esse eventos em comum, disfunção endotelial vascular e a relativa resistência à insulina gerada pela baixa ligação da glicose, poderiam contribuir nas desordens metabólicas no diabetes tipo II e doenças vasculares tais como aterosclerose, hipertensão essencial, falha cardíaca congestiva e síndrome cardíaca X (angina microvascular) (Stern *et al.*, 1996).

Figura 3. Hipótese multifacetada da disfunção endotelial disseminada no desenvolvimento da Síndrome de Resistência à Insulina (SRI), Macroangiopatia e Diabetes tipo II (Laight *et al.*, 2000).

1.1.1 Homocisteína e S-nitrosotióis

Os tióis são moléculas que contêm enxofre na sua estrutura molecular. Dentre eles se destacam a homocisteína, metionina, cisteína e a glutatona. A homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfurado, cujo metabolismo está situado entre duas vias metabólicas: remetilação e transulfuração (**figura 4**). Na remetilação a homocisteína adquire um grupo metil da N-5-metiltetrahidrofolato (MTHF) ou de betaina para formar a metionina. A reação com MTHF acontece em todos os tecidos e é

dependente de vitamina B₁₂, enquanto que a de betaína ocorre principalmente no fígado (e rins, em humanos). Na via de transulfuração a homocisteína se condensa com serina para formar a cistationa por meio de uma reação irreversível, dependente de piridoxal 5 fosfato (vitamina B₆), formando ao final a cisteína (Bostom & Lathrop, 1997). A betaína, trimetilglicina, é o substrato para a enzima betaína-homocisteína metiltransferase, que assim como a enzima metionina sintetase, é capaz de realizar a remetilação de homocisteína e está ativa apenas em fígado e rins, em humanos. Por auxiliar na conversão de homocisteína à metionina, a betaína é considerada um composto de incremento à metilação (Mc Keever *et al.*, 1991).

Figura 4: Ciclo da metionina mostrando a relação da homocisteína com as vias de transulfuração e remetilação (Dennis & Robinson, 1996).

Os tecidos animais contêm alguns tióis na forma livre, mas a maior parte destes compostos se encontra na forma de homocistina (um dissulfeto da homocisteína), dissulfeto misto homocisteína-cisteína e homocisteína ligada a proteínas por ligações dissulfeto (Finkelstein & Martin, 2000).

A hiperhomocisteinemia (HiperHcy) pode ser classificada como leve, moderada e severa, de acordo com as concentrações plasmáticas de 16 a 30, entre 31 e 100 e maiores que 100 μM , respectivamente. As manifestações clínicas da hiperhomocisteinemia severa incluem anormalidades neurológicas, retardo mental, episódios recorrentes de tromboembolismo e doenças vasculares na infância (Kang *et al.*, 1996).

Na maioria dos casos a hiperhomocisteinemia em uma população em geral, pode surgir de defeitos genéticos relacionados à codificação de enzimas integrantes do metabolismo da homocisteína ou de deficiências em vitaminas necessárias ao processo. Assim, a concentração de homocisteína vai depender da via metabólica alterada: um problema na via de remetilação, que pode ser causado por alteração na codificação da MTHF redutase ou deficiência de folato e vitamina B₁₂, levará a um aumento substancial na concentração plasmática de homocisteína no jejum, enquanto que um problema na via de transulfuração poderá levar a um leve aumento na concentração plasmática de homocisteína, por erros na codificação da cistationa-beta-sintetase (CBS) ou deficiência de vitamina B₆ (Bostom & Lathrop, 1997).

Dentre as causas genéticas da hiperhomocisteinemia, a heterozigose para deficiência de CBS e MTHFR apresentam prevalências de 1 e 0,5% na população em geral, respectivamente. A presença da homozigose para a deficiência de MTHFR, a chamada variante termolábil, está presente em mais de 5% da população em geral e em 14 a 17% dos pacientes com doenças vasculares (Kang *et al.*, 1992).

Existe um mecanismo celular de exportação de homocisteína que complementa seu catabolismo. Devido a esse mecanismo, o plasma normalmente contém uma pequena quantidade de homocisteína ($\sim 10 \mu\text{M}$). Quando, por alguma razão, o metabolismo de homocisteína é interrompido há uma exportação da substância acumulada no interior da célula para o sangue. Esse processo inibe a toxicidade intracelular, mas expõe o meio vascular aos efeitos deletérios do excesso de homocisteína (Bostom & Lathrop, 1997).

O acúmulo de homocisteína no plasma está implicado como fator patogênico na formação de lesões ateroscleróticas em jovens com homocisteinúria, um erro hereditário no metabolismo de metionina que pode ser caracterizado por um dentre três possíveis defeitos enzimáticos, sendo o mais comum o da cistationa-sintetase (Hirano *et al.*, 1994).

McCully (1969), um pioneiro nos estudos sobre homocisteína e doenças cardiovasculares, iniciou a elaboração de sua teoria com a observação do caso de um bebê que morreu com $7\frac{1}{2}$ semanas de vida com sérias lesões arteriais e que apresentava anormalidades no metabolismo de cobalamina, resultando em homocisteinemia, cistationemia e acidemia metilmalônica. As lesões encontradas lembravam aquelas de pacientes com deficiências em cistationa sintetase e as lesões arteriais encontradas foram relacionadas aos efeitos metabólicos de altas concentrações de homocisteína, homocistina ou seus derivados.

A "Teoria da Homocisteína" relacionada à aterosclerose, elaborada pelo autor a partir de então, foi confirmada por trabalho posterior (McCully *et al.*, 1990) onde 194 autópsias, realizadas em casos de diferentes graus de aterosclerose, mostraram que quase $2/3$ dos casos graves se desenvolveu sem evidências de elevações de colesterol sérico, diabetes ou hipertensão e em $3/4$ do total de casos, com ou sem diabetes e hipertensão, o colesterol

sérico se situava abaixo de 200 mg/dL. Assim, o autor questiona a utilidade do colesterol sérico como marcador da presença de lesões ateroscleróticas na maior parte dos casos e sugere estudos prospectivos, que utilizem substâncias capazes de facilitar o catabolismo de homocisteína, e que possam investigar se o controle dos níveis de homocisteína pode diminuir a mortalidade e morbidade proveniente de complicações ateroscleróticas. Vários estudos demonstram que a elevação de seu teor plasmática está relacionada com o maior risco de doença coronariana, além da deficiência de ácido fólico ou vitamina B₁₂. Pacientes com aterosclerose apresentam uma relação inversa entre o nível de homocisteína (aumentado) e de vitamina B₆ (diminuído) (Rimm *et al.*, 1998).

Em pacientes com insuficiência renal crônica, onde as complicações ateroscleróticas são a principal causa de morte, observou-se que os níveis de homocisteína são os mais elevados, quando comparados a outros pacientes com doença coronariana (Bostom & Lathrop, 1997). Em pacientes diabéticos com a função renal preservada, os níveis plasmáticos de homocisteína apresentam-se normais ou diminuídos, possivelmente devido a hiperfiltração glomerular observada nesse pacientes (Jones *et al.*, 1995). Em contraste, em pacientes diabéticos com proteinúria originada por doença macrovascular, os níveis de homocisteína estão aumentados (Munshi *et al.*, 1996; Agardh *et al.*, 1994; Araki *et al.*, 1993), o que poderia contribuir para o processo aterosclerótico nestes pacientes.

O aumento de homocisteína em pacientes diabéticos eleva consideravelmente a incidência de morte. Para cada 5µM de homocisteína plasmática, o risco de morte é aumentado em 17% para não-diabéticos e 60 % para os diabéticos (Hoogeveen *et al.*, 2000). Uma correlação inversa entre os níveis de insulina e de homocisteína tem sido observada em pacientes com hiperinsulinemia; embora somente alguns pacientes apresentam

homocisteína elevada (Bar-On *et al.*, 2000). No entanto, Hoogeveen *et al.* (2000) não observaram correlação entre os níveis de insulina e homocisteína em pacientes hiperhomocisteinêmicos (HH) e diabéticos (DM II).

Baliga *et al.* (2000) investigaram se a HH exacerbava outros fatores de risco cardiovascular e marcadores de coagulação e hemostasia em pacientes com DM II e se o tratamento com vitaminas do complexo B alterava esses fatores de risco. Concluíram que a coexistência de DM II e HH não teve efeito exacerbado na coagulação e na hemostasia, em relação à DM II isolada. Nesse mesmo estudo, a administração de ácido fólico e piridoxina reduziu a concentração de homocisteína sem alterar outros fatores de risco associados.

A elevação da homocisteína no diabetes pode ser explicada pela ação da própria insulina. Estudos sugerem que a insulina está envolvida na regulação da homocisteína plasmática por afetar a transulfuração hepática, a qual está envolvida no catabolismo da homocisteína (Jacobs *et al.*, 1998). Além disso, a função renal também pode influenciar o nível plasmático de homocisteína. Emoto *et al.* (2001) verificaram que a resistência à insulina e a função renal são determinantes independentes dos níveis de homocisteína nos pacientes com DM II.

O teste de sobrecarga de metionina é um exame que serve para avaliar o risco de doença coronariana através da dosagem de homocisteína. As diferenças entre os níveis de homocisteína, antes e após a sobrecarga de metionina, foram maiores em pacientes diabéticos do que nos controles (Chiarelli *et al.*, 2000). A homocisteína pode exercer uma ação aterogênica, tanto em indivíduos saudáveis como diabéticos, particularmente por inibir a produção de $\bullet$ NO em plaquetas que, conseqüentemente, pode aumentar a ativação e agregação plaquetária (Mutus *et al.*, 2001).

O óxido nítrico, gerado em sistemas biológicos, pode reagir com grupos tióis de proteínas específicas para formar S-nitrosotióis (Stamler *et al.*, 1992). Esta reação pode prolongar a vida média do $\bullet\text{NO}$ e preservar sua atividade biológica (Stamler *et al.*, 1992). Os S-nitrosotióis também têm a propriedade de causar relaxamento do endotélio e inibir a agregação plaquetária (Stamler *et al.*, 1992). Outro ponto importante é que os S-nitrosotióis podem sofrer redução e, conseqüentemente, liberar $\bullet\text{NO}$ na circulação sistêmica.

Tem sido sugerido que a S-nitrosoglutationa também representaria uma forma de armazenamento de $\bullet\text{NO}$, podendo doar o $\bullet\text{NO}$, em determinadas condições (Ji *et al.*, 1999; Hausladen *et al.*, 1999; Mannick *et al.*, 1999). Observações experimentais sugerem que a S-nitrosoglutationa (GS-NO), sob a ação da γ -glutamilttransferase (γ -GTP), pode decompor-se rapidamente à S-nitrosocisteína (Cys-NO), havendo liberação de $\bullet\text{NO}$ de ambas as formas (GS-NO e Cys-NO) (Kashiba *et al.*, 1999). O peroxinitrito (ONOO^-) também pode reagir com a GSH, formando um produto intermediário, o qual libera $\bullet\text{NO}$ (Balazy *et al.*, 1998). A secreção de insulina pode ser modulada por S-nitrosoglutationa (SNO-GSH). Estudos verificaram que tanto as citocinas IL-1 β combinada com TNF- α e INF- γ como o SNO-GSH podem reduzir a secreção de insulina. Em contraposição, as EROs aumentam a sua secreção (Hadjivassiliou *et al.*, 1998). O $\bullet\text{NO}$ também tem um efeito inibidor na secreção de insulina induzida por glicose (Eizirik *et al.*, 1994).

A S-nitrosoalbumina (SNO-ALB) também tem a propriedade de prolongar a meia-vida do $\bullet\text{NO}$. A glicação de proteínas, principalmente de albumina (ALB), diminui a capacidade da S-nitrosoalbumina glicada liberar $\bullet\text{NO}$. Estudos verificaram que o aumento de SNO-ALB glicada

diminui a atividade antiproliferativa, o transporte de glicose e a geração de cGMP. (Farkas *et al.*, 1995).

1.1.2 Inibidores endógenos da NO sintase

A síntese de $\bullet$ NO pode ser inibida experimentalmente por alguns análogos da arginina, incluindo a dimetilarginina assimétrica (ADMA). Esta é sintetizada endogenamente, possui potente ação vasoconstritora (Vallance *et al.*, 1992 a; Fickling *et al.*, 1993) e está presente em concentrações nanomolares no plasma humano e em concentrações micromolares na urina humana (Kakimoto & Akasawa, 1970; Vallance *et al.*, 1992 b). O enantiômero do ADMA, a SDMA (dimetilarginina simétrica), também é sintetizado endogenamente e está presente em fluidos biológicos em concentrações equivalentes às de ADMA, mas o SDMA é inativo e não inibe a síntese de $\bullet$ NO (Tojo *et al.*, 1997).

A ADMA é uma substância reguladora da atividade das NOS, competindo com a L-arginina pelas NO sintases (Cooke *et al.*, 1997). Ela tem sido isolada a partir do plasma e urina e os estudos quanto à sua origem ainda não são definitivos, porém indicam que ela é sintetizada e liberada por células endoteliais (Fickling *et al.*, 1993; MacAllister *et al.*, 1994).

Em humanos saudáveis, os níveis circulantes de ADMA não são suficientes para inibir a síntese do $\bullet$ NO. Contudo, altas concentrações de ADMA têm sido implicadas em diversas patologias, tais como: hipertensão (Matsuoka *et al.*, 1997), insuficiência renal crônica (Vallance *et al.*, 1992 b), aterosclerose (Miyazaki *et al.*, 1999) e insuficiência cardíaca (Usui *et al.*, 1998).

Diversos estudos em animais e em humanos mostram que as concentrações plasmáticas de ADMA estão elevadas na hipercolesterolemia e aterosclerose, o que pode explicar, em parte, a diminuição da vasodilatação dependente do endotélio evidente nestas condições patológicas. (Yu *et al.*, 1994; Azuma *et al.*, 1995; Böger *et al.*, 1996; Böger *et al.*, 1997; Miyazaki *et al.*, 1999). As concentrações plasmáticas elevadas de ADMA podem ser explicadas por uma maior síntese endógena ou por uma menor degradação (Böger *et al.*, 1997). Sugere-se que a ADMA seja produzida pelas células endoteliais; assim sendo, a síntese aumentada pode ser consequência da disfunção endotelial observada na aterosclerose. Por outro lado, a hidrólise aumentada de proteínas metiladas intracelulares também contribui para a elevação plasmática de ADMA, uma vez que McDermott (1976) demonstrou que as dimetilargininas surgem principalmente da degradação dessas proteínas metiladas (Miyazaki *et al.*, 1999). A peroxidação lipídica *in vivo* resulta em dano oxidativo a proteínas tissulares e pode acelerar a proteólise dessas proteínas metiladas (Chan *et al.*, 2000).

Estudos em mamíferos identificaram a atividade de duas proteínas metiladas diferentes, as arginina metiltransferases do tipo I e II. Quatro isoformas diferentes dessas proteínas foram caracterizadas, aos níveis protéicos e genômico, em células e tecidos humanos: a PRMT1, a PRMT2, a PRMT3 e a HMRT1L2. Todas elas contribuem para a atividade da metiltransferase tipo I, mas diferem na oligomerização, localização subcelular, especificidade do substrato e regulação (Böger *et al.*, 2000).

A maior fonte de grupos metila usados para várias reações é a S-adenosilmetionina, que é um intermediário na conversão da metionina à homocisteína (**figura 5**). Esses grupos metila provenientes da S-adenosilmetionina são incorporados ao ADMA por células endoteliais

humanas; portanto, a S-adenosilmetionina é um doador de grupos metila na síntese de ADMA. A inibição das metiltransferases dependentes de S-adenosilmetionina resulta em uma menor formação endotelial de ADMA. Também tem sido observado que a expressão das proteínas arginina N-metiltransferases é regulada na presença de LDL nativa ou oxidada e este efeito é baseado em uma maior atividade da metiltransferase (Böger *et al.*, 2000).

Figura 5: Representação esquemática das vias bioquímicas da desmetilação da metionina para a formação de homocisteína com a geração de ADMA (Boger *et al.*, 2000).

A ADMA pode ser excretada pelos rins ou metabolizada à citrulina pela enzima intracelular dimetilarginina dimetilaminohidrolase (DDAH) (figura 6), que pode regular a via L-arginina-NO, controlando a degradação de ADMA (Tojo *et al.*, 1997; Miyazaki *et al.*, 1999). Ito *et al.* (1999) verificaram que a LDL oxidada ou o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) aumentam a produção de ADMA por células endoteliais. Este efeito está associado à diminuição da atividade da DDAH, pois encontrou-

se uma menor atividade desta enzima em células endoteliais incubadas com LDL oxidada ou TNF- α . Portanto, pode-se concluir que lipoproteínas ou citocinas podem aumentar a concentração plasmática de ADMA pela atividade reduzida da DDAH. Isto pode levar ao acúmulo local ou à liberação de ADMA intracelular e inibição da NOS na hipercolesterolemia (Ito *et al.*, 1999).

Figura 6: Metabolismo do ADMA. As argininas metiladas são derivadas das proteínas sob a ação da PRMT (proteína metiltransferase). A DPT (dimetilarginina piruvato transferase) é expressa no rim e pode utilizar o ADMA e SDMA originando α -cetoácidos. Os derivados metilados são encontrados na urina, embora os mecanismos envolvidos na sua formação não estejam esclarecidos (Cooke *et al.*, 2000).

Outros estudos indicam que a ADMA altera a adesão de células mononucleares circulantes ao endotélio, especialmente monócitos e linfócitos T, em indivíduos hipercolesterolêmicos. A inibição da NOS endotelial pelo ADMA pode contribuir para a maior adesividade destas

células, o que pode predispor esses indivíduos à aterosclerose (Chan *et al.*, 2000).

Atualmente existem poucos estudos envolvendo inibidores endógenos de NO sintase no diabetes. Fard *et al.* (2000) verificaram aumento de ADMA em pacientes com DM tipo 2 após a ingestão de uma refeição rica em gordura. Esse aumento apresentou uma correlação inversa em relação à porcentagem da vasodilatação induzida pela hiperemia, indicando alteração da função endotelial.

1.1.3 N-Acetil- β -glicosaminidase (NAGase): um biomarcador em potencial para a disfunção endotelial

A NAGase é uma enzima lisossômica de estrutura glicoproteica sintetizada por várias células, incluindo as células endoteliais e musculares lisas das artérias (Hayes *et al.*, 1979). Ela é liberada para o sangue por exocitose ou através da lesão celular. Devido ao seu alto peso molecular (135.000 daltons), a NAGase não é filtrada pela membrana glomerular. Na presença de lesão do glomérulo ou túbulo renal, a atividade da NAGase urinária aumenta, sendo um indicador de disfunção renal. Vários estudos têm relatado o aumento da atividade da NAGase na hipertensão, diabetes mellitus e doença renal (Inoue *et al.*, 2000).

Yamada *et al.* (1983) demonstraram aumento da atividade da NAGase em células endoteliais da aorta em ratos espontaneamente hipertensos, quando comparados a ratos normotensos. Além disso, verificou-se que a atividade da NAGase aumentou com o avanço da idade. Outro estudo em humanos, correlacionou a atividade da NAGase

plasmática com o controle glicêmico e a função renal (Ikenaga *et al.*, 1993).

O uso de antioxidantes pode contribuir para a diminuição da disfunção endotelial. Pacientes DMII suplementados com alfa-tocoferol tiveram as concentrações de malondialdeído (MDA) e NAGase reduzidos. Verificou-se também que a NAGase correlacionou-se com a concentração de MDA e o IMC (Skrha *et al.*, 1999). Portanto, a NAGase pode ser considerada como marcador para disfunção endotelial e renal com a vantagem de sua determinação ser minimamente invasiva (coleta sanguínea) e de baixo custo.

A justificativa desse trabalho está no fato de verificar de que forma os indivíduos Intolerantes à Glicose podem apresentar alterações bioquímicas semelhantes a dos indivíduos com Diabetes Mellitus tipo II que contribuam para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

O objetivo geral do estudo foi avaliar as concentrações plasmáticas dos metabólitos do óxido nítrico, dos inibidores endógenos da óxido nítrico sintase, da homocisteína e de outros tióis, a atividade da N-acetil- β -glucosaminidase e a função endotelial em indivíduos intolerantes à glicose e em diabéticos do tipo 2.

2.1 Objetivos específicos

Determinar as concentrações plasmáticas das seguintes variáveis, nos grupos estudados:

- ➔ Tióis (homocisteína, cisteína, metionina, glutathione oxidada e glutathione reduzida) e S-nitrosotióis total;
- ➔ NOx (nitrito/nitrato) e nitrotirosina;
- ➔ L-arginina, ADMA (dimetilarginina assimétrica) e SDMA (dimetilarginina simétrica);
- ➔ Colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, triglicérides, glicose, hemoglobina glicada e frutossamina;
- ➔ Atividade plasmática da N-acetil- β -glucosaminidase (NAGase);

Comparar as variáveis estudadas nos pacientes do grupo DMII com história clínica pregressa de infarto agudo do miocárdio, diagnosticado por eletrocardiograma (DMII com ECV), com aqueles sem história clínica pregressa de infarto (DMII sem ECV).

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Participaram do estudo 140 voluntários que foram distribuídos em grupos da seguinte forma: Controle (n=12), Intolerantes à Glicose (IG=32) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII=96).

Os pacientes do estudo foram triados na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, sob a responsabilidade do Dr. Osmar Monte; no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, sob a responsabilidade do Dr. Marcelo Chiara Bertolami e na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Metodista de Santos, sob a responsabilidade do Dr. Hermes Toros Xavier. Todos os pacientes foram previamente informados sobre a utilização do material biológico para a realização do estudo e participaram como voluntários, sendo submetidos a uma única coleta de sangue e depois dispensados. Todos os protocolos nos diferentes centros foram aprovados pelos seus respectivos Comitês de Ética.

3.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo 3 (três) grupos de indivíduos: Controle (C), Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo 2 (DM II).

Os grupos Controle, Intolerantes à Glicose e Diabetes Mellitus tipo 2 apresentaram os seguintes critérios de inclusão:

- Sexo: masculino e feminino
- Raça: sem distinção
- Faixa etária: > 21 anos

O grupo Controle foi composto por indivíduos saudáveis, isto é, que não apresentavam manifestações clínicas e laboratoriais de nenhum tipo de doença ou desordem metabólica que pudesse comprometer a sua saúde, selecionados em uma comunidade adventista de Londrina, Paraná.

Os indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 (DMII) e Intolerância à Glicose (IG) foram incluídos no estudo, segundo os critérios estabelecidos pela Sociedade Americana de Diabetes (Gabir *et al.*, 2000), considerando-se as características dos exames laboratoriais descritas a seguir:

	Jejum (glicose mmol/l [mg/dl])	2 hs após carga de glicose (glicose mmol/l [mg/dl])
DMII	≥ 7.0 [126]	≥ 11 [200]
IG	6.1 - 7.0 [110 - 126]	7.8 - 11.0 [140-199]

3.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo todos aqueles pacientes que apresentaram uma ou mais das seguintes características:

- existência clínica de doenças renal e hepática;
- neoplasias;
- gravidez;
- distúrbios psiquiátricos,
- tabagismo;
- consumo de álcool (superior a 10 dose/semana)
- qualquer outra doença que pudesse reduzir a expectativa de vida ou interferir no estudo.

Os pacientes do grupo DMII foram posteriormente subdivididos em dois subgrupos, de acordo com a história clínica pregressa de eventos cardiovasculares, considerando-se aqueles que apresentaram um ou mais infartos agudos do miocárdio como DMII com evento cardiovascular (DMII com ECV), os quais foram comparados aos pacientes sem evidência de infarto (DMII sem ECV). Os infartos agudos do miocárdio foram sintomatológicos e confirmados por eletrocardiograma.

3.2 Coleta

O sangue foi coletado em diferentes tubos Vacutainer[®] (EDTA, fluoreto e seco). Em seguida, o sangue foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos, a 4°C para a obtenção do plasma e soro. Antes do armazenamento em freezer -80°C, adicionou-se inibidores de proteases (2mM benzamidina, 2µg/mL aprotinina e 1mM PMSF) e antioxidante (20mM BHT) ao material biológico.

3.3 Determinação do perfil lipídico, glicose e hemoglobina glicada

As concentrações plasmáticas de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, triglicérides, glicose, hemoglobina glicada e frutossamina foram determinadas no Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, utilizando kits comerciais (Kits BioSystems S.A, Barcelona, Espanha).

3.4 Determinação da concentração de ADMA, SDMA e L-arginina

As concentrações plasmáticas de ADMA, SDMA e L-arginina foram determinadas pela técnica de Eletroforese Capilar por Fluorescência Induzida a Laser (HPE-LIF). O sangue foi coletado com EDTA (1 mg/ml) e centrifugado a 1.000 g por 10 minutos a 4 °C. Adicionou-se ao plasma L-homoarginina como padrão interno. A curva de calibração foi realizada pela adição dos padrões de ADMA, SDMA e L-arginina em um pool de plasma. As amostras e o padrão foram precipitados com etanol e em seguida derivatizados com 5-isotiocionato fluoresceína. A injeção foi feita sob pressão (1 psi.seg), sendo a corrida realizada em um capilar de sílica fundida (85 cm comprimento e 50 µm diâmetro interno) a 20 kV. O tampão de corrida foi composto por 50 mM de ácido bórico e 20 mM ácido 3-(ciclohexilamino)1-propanosulfônico. O detector de fluorescência induzida por laser operou em 488 nm (excitação) e 515 nm (emissão) (Caussé *et al.*, 2000).

3.5 Determinação de NO_x (nitrato + nitrito)

Utilizou-se o analisador de óxido nítrico NOATM280 (Sievers, USA), com sistema detecção de alta sensibilidade para o •NO, baseado na reação de quimioluminescência entre •NO e ozônio (fase gasosa):

A redução do nitrato com cloreto de vanádio, em ácido clorídrico, foi usada para converter nitrato em $\bullet\text{NO}$. A redução foi feita a 90°C.

As curvas de calibração com níveis múltiplos foram realizadas com padrão externo (nitrato de sódio, Aldrich cod. 22,134-1), utilizando-se o software Bag Program (versão 2.2, Sievers, USA). As amostras foram extraídas com etanol gelado (0,5 mL de amostra e 1,0 mL de etanol a 0°C). Após agitação no vortex, a solução foi deixada trinta minutos no gelo e então centrifugada a 14.000 RPM por cinco minutos. O sobrenadante foi retirado e analisado no equipamento NOATM280 (Sievers, USA).

3.6 Determinação de S-nitrosotióis totais

A concentração de S-nitrosotióis totais no plasma foi determinada pelo analisador de $\bullet\text{NO}$ (NOA^{280TM}, Sievers INC., USA). O plasma foi filtrado previamente em filtros Centrifree® (Millipore) a 1500 g por 30 minutos para separação das proteínas.

No NOA, os S-nitrosotióis plasmáticos foram reduzidos a $\bullet\text{NO}$ com iodeto de potássio a 90°C, e o $\bullet\text{NO}$ formado foi detectado por quimioluminescência em fase gasosa, após reação com ozônio:

3.7 Determinação de tióis (glutathiona oxidada, glutathiona reduzida, homocisteína, cisteína e metionina)

O sangue foi coletado com EDTA (1 mg/ml) e centrifugado a 1000g por 10 minutos a 4°C para a obtenção do plasma. Em 200 µL de plasma adicionou-se 2 µL de padrão interno (1 mM n-(2-mercaptopropionil)-glicina) e 20 µL de tri-n-butilfosfina 10% (v/v em dimetilformamida). Homogeneizou-se a preparação e incubou-se por 30 minutos a 4 °C. A seguir, adicionou-se 200 µL de ácido tricloroacético 10% contendo 1mM de EDTA dissódico. Homogeneizou-se vigorosamente e centrifugou-se as amostras a 13000 x g por 5 minutos a 4 °C. A 100 µL do sobrenadante, acrescentou-se 100 µL de tampão fosfato 0,5M e ajustou-se o pH para 7,5 com Na₃PO₄ 1M. O derivatizador (5-bromometilfluoresceína) foi adicionado às amostras em um excesso molar de 5 a 10 vezes, incubando-se as preparações por 15 minutos a 60 °C. Após a derivatização, diluiu-se a amostra 1/10 (20 µL do derivatizado em 180 µL de tampão fosfato 0,25 M pH 7,6), injetando-as com uma pressão de 0,5 psi por 1,5 segundo em um capilar de 67 cm, 75 µm de diâmetro interno. A corrida eletroforética foi realizada a 25° C, em 30 kV e polaridade positiva na injeção. O detector de fluorescência induzida por laser operou em 488 nm (excitação) e 520 nm (emissão). A cada corrida o capilar foi lavado com NaOH 1M (Vecchione *et al.*, 1999).

3.8 Detecção de nitrotirosina total

A nitrotirosina total foi determinada por enzimaímunoensaio (ELISA competitivo) padronizado em nosso laboratório. O anticorpo utilizado foi o anticorpo policlonal anti-nitrotirosina produzido em coelho (Upstate, cod.:06-284). O padrão utilizado foi a albumina bovina nitrada (nitro-albumina), preparada por adição alcalina de peroxinitrito em uma concentração final de 1mM (Radi *et al.*, 1993) à uma solução de albumina bovina (ALB – 1mg/mL). A concentração de nitrotirosina na nitro-ALB foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar $4300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ em 438 nm, pH 9,0 (Khan *et al.*, 1998). A placa foi sensibilizada com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de ALBNO (100 μL) (concentração aproximada de nitrotirosina de 40 a 60 μM) diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M em pH 9,4 a 37°C, overnight. A placa foi então lavada com 300 μL de tampão TBS (TRIS-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH7,4) contendo Tween 20 (0,6%). Para bloqueio, incubou-se a placa por duas horas 37°C com 200 μL de tampão TBS contendo 0,05% de Tween 20 e 5% de leite desnatado (longa vida) por poço. Após lavagem da placa com o tampão de lavagem previamente descrito, a placa foi incubada com 100 μL por poço do anticorpo anti-nitrotirosina (diluído 1:1000 em TBS contendo 1% de leite desnatado) mais 100 μL de amostra (as amostras de plasma e albumina nitrada utilizada na curva de calibração devem ser diluídas em TBS contendo 0,1% de leite) por duas horas a 37°C. A placa foi então lavada e incubada com 100 μL por poço do conjugado (IgG anti-coelho produzido em camundongo conjugado com peroxidase (Stressgen Biotchnologies Corp., diluído 1:5000 em TBS contendo 1% de leite)) por 1 hora a 37°C. Após lavagem, adicionou-se luminol (2,3mM), p-iodofenol (0,9mM) (200 μL /poço) e peróxido de hidrogênio (3,9nM) (50 μL /poço). A leitura da

quimiluminescência produzida foi realizada imediatamente, utilizando-se uma leitora de placas de ELISA para quimiluminescência (LumiCount, Packard, Meriden, USA). Todas as lavagens foram realizadas com o mesmo tampão descrito anteriormente, lavando-se a placa pelo menos quatro vezes. As concentrações da nitrotirosina presente na amostra foram estimadas através da curva de calibração utilizando a albumina nitrada e expressas como equivalentes de nitro-Albumina. Todas as amostras e a curva de calibração foram realizadas em triplicatas. (Chakmakjian *et al*, 1982).

3.9 Determinação da atividade plasmática da n-acetil- β -glucosaminidase (NAGase)

A determinação da atividade plasmática da n-acetil- β -glucosaminidase (NAGase) foi determinada com base na metodologia descrita por Reglero *et al* (1976). Em 100 μ l de plasma foi adicionado 1,25 ml tampão citrato (0.1 M, pH 4,4) e incubado em banho-maria a 37°C com 0,25 ml 0,01M p-nitrofenil-n-acetil β -D-glucosaminida em tampão citrato por 15 minutos. A reação foi interrompida adicionando 1,5 ml carbonato de sódio (0,2 M, pH 10,4) e o produto formado foi mensurado por espectrofotômetro em 405 nm. A curva de calibração foi feita utilizando solução padrão de p-nitrofenol. A atividade de NAGase das amostras foram calculadas depois da subtração do branco. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade liberada de 1 μ mol p-nitrofenol/min.

3.10 Avaliação da Função Vascular

A resposta da vasodilatação na hiperemia reativa da artéria braquial foi medida pela técnica de ultrassom de alta resolução no modo bi-dimensional (SYSTEM0FINE, General, 7,5MHz linear array transducer). A medida do fluxo de sangue e o diâmetro da artéria braquial foram realizados inicialmente com o pacientes em repouso. A hiperemia reativa foi induzida (garroteamento) pelo esfigmomanômetro sob uma pressão de 250 mm Hg por 5 minutos. Depois de 15 segundos, o diâmetro e o fluxo da artéria braquial foi medido. Após 15 minutos da hiperemia reativa, foi administrado 400 µg nitroglicerina sublingual e, transcorrido 5 minutos, novamente foi feita a medida do diâmetro e do fluxo sanguíneo na artéria braquial. Todo o estudo foi feito em ambiente silencioso e com a temperatura controlada (22-23°C).

3.11 Análise Estatística

Os resultados foram calculados como média $\pm$ desvio padrão. As comparações das variáveis dos indivíduos nos diferentes grupos foram feitas através da Análise Univariada e as diferenças encontradas foram comparadas, dois a dois, usando-se o método de Bonferroni ($p < 0.05$). Utilizou-se a análise multivariada para a identificação das variáveis que melhor caracterizam os grupos estudados.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Pacientes

Na tabela 1 encontram-se as idades médias, índice de massa corpórea (IMC), sexo (masculino/feminino) e os medicamentos utilizados pelos 140 voluntários dos grupos estudados: Controle (n=12), Intolerantes à Glicose (IG=32) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII=96).

Tabela 1: Idade média, índice de massa corpórea (IMC), sexo (masculino/feminino) e medicamentos dos grupos estudados.

	C (n=12)	IG (n=32)	DMII (n=96)
M/F	5/7	14/18	54/42
Idade	51±8	52±10	58±8
IMC	25,2±2,1	26,9±7,4	28,4±5,7
Insulina	-	-	20
Hipoglicemiante oral	-	-	96
Anti- hipertensivo	-	32	76
Hipolipemiante	-	1	46

Os resultados expressam a média±desvio padrão.

C: Controle (indivíduo saudável)

IG: Intolerante à Glicose

DMII: Diabetes Mellitus tipo II

4.1.1 Determinação das concentrações plasmáticas de glicose, hemoglobina glicada e frutossamina

Nos gráficos 1, 2 e 3 encontram-se os dados referentes às determinações de glicose, hemoglobina glicada e frutossamina nos grupos Controle, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 1: Concentração de glicose (mg/dL) nos grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 2: Concentração de hemoglobina glicada (%) nos grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 3: Concentração de frutosamina (mg/dL) nos grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

A análise estatística de variância univariada demonstrou que existem diferenças entre os grupos quanto às variáveis glicose ($p<0.001$), hemoglobina glicada ($p<0.001$) e frutossamina ($p<0.001$). Em seguida, para detalhar as diferenças encontradas, os grupos foram comparados, dois a dois, usando-se o método de Bonferroni para comparações múltiplas (tabela 2).

Tabela 2: Comparações das variáveis glicose, hemoglobina glicada e frutossamina entre os grupos Controle, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Variável	Grupos controlados		Nível descritivo
Glicose (mg/dL)	Controle	IG	0,001
	Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,001
Hemoglobina Glicada (%)	Controle	IG	0,152
	Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,001
Frutossamina (mg/dL)	Controle	IG	0,071
	Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,001

Como esperado, as concentrações de glicose, hemoglobina glicada e frutossamina foram mais elevadas no grupo DMII, quando comparado com os demais grupos. O grupo IG apresentou concentrações de hemoglobina glicada ($p<0.152$) e frutossamina ($p<0.071$) semelhantes às do grupo Controle, porém, a glicemia foi superior.

4.1.2 Determinação do perfil lipídico

Nos gráficos 4 a 9 encontram-se os dados referentes às concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicérides, LDL-colesterol, HDL-

colesterol e a razão entre as concentrações de LDL-colesterol e HDL-colesterol nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 4: Concentração de colesterol total (mg/dL) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 5: Concentração de triglicérides (mg/dL) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 6: Concentração de LDL-colesterol (mg/dL) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 7: Concentração de HDL-colesterol (mg/dL) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 8: Concentração de VLDL-colesterol (mg/dL) nos grupos Controles, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 9: Razão da concentração de LDL-colesterol e HDL-colesterol nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

A análise estatística de variância univariada demonstrou que existem diferenças entre os grupos quanto às variáveis triglicérides ($p < 0.005$), HDL-colesterol ($p < 0.001$), VLDL-colesterol ($p < 0.005$) e a razão da concentração de LDL-colesterol/HDL-colesterol (0.001). As variáveis colesterol total ($p < 0.131$) e LDL-colesterol ($p < 0.259$) não apresentaram diferença estatística entre os grupos estudados.

Na tabela 3 estão mostradas as comparações, duas a duas, das variáveis que apresentaram diferença estatística entre os grupos, através do teste de Bonferroni.

Tabela 3: Comparações das variáveis triglicérides, HDL-colesterol, VLDL-colesterol e LDL-colesterol/HDL-colesterol entre os grupos Controles, Intolerantes a Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Variável	Grupos controlados		Nível descritivo
Triglicérides (mg/dL)	Controle	IG	0,013
	Controle	DMII	0,004
	IG	DMII	0,999
HDL-colesterol (mg/dL)	Controle	IG	0,072
	Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,070
VLDL-colesterol (mg/dL)	Controle	IG	0,015
	Controle	DMII	0,004
	IG	DMII	0,999
LDL-colesterol / HDL-colesterol	Controle	IG	0,105
	Controle	DMII	0,004
	IG	DMII	0,084

Os indivíduos que fazem parte dos grupos IG e DMII são bastante heterogêneos. Grande parte deles apresenta uma ou mais alterações associadas como hipertensão e hipercolesterolemia, além da utilização de diversos medicamentos (Tabela 1).

Observa-se que o grupo DMII apresentou concentrações médias diferentes de triglicérides, HDL-colesterol, VLDL-colesterol, assim como a razão LDL-colesterol/HDL-colesterol, em relação ao grupo Controle. As concentrações elevadas de triglicérides e VLDL-colesterol no grupo DMII se deve provavelmente ao estado hiperglicêmico desses indivíduos. A hiperglicemia inibe a lipase lipoprotéica, o que resulta na deficiência da lipólise dos remanescentes de quilomícrons e VLDL, resultando no aumento dos triglicérides circulantes. O mesmo fato se observa no grupo IG, mas em menor intensidade. Entre os grupos IG e DMII não foram observadas diferenças quanto às concentrações de triglicérides, HDL-colesterol, VLDL-colesterol e a razão LDL-colesterol/HDL-colesterol. As concentrações de HDL-colesterol e a razão LDL-colesterol/HDL-colesterol

do grupo DMII foram diferentes do grupo controle devido ao fato de existir no grupo DMII indivíduos hipercolesterolêmicos.

4.1.3 Determinação dos inibidores endógenos da óxido nítrico sintase (ADMA e SDMA) e L-arginina

Nos gráficos 10 a 13 encontram-se os dados referentes às determinações de ADMA, SDMA, L-arginina e a razão entre L-arginina e ADMA nos grupos Controle, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 10: Concentração de ADMA (μM) nos grupos Controle, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 11: Concentração de SDMA (μM) nos grupos Controle, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 12: Concentração de L-arginina (μM) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 13: Razão entre a concentração de L-arginina e ADMA nos grupos Controle, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

A análise estatística de variância univariada demonstrou que existem diferenças entre os grupos quanto às variáveis ADMA ($p < 0.001$), SDMA ($p < 0.001$) e L-arginina ($p < 0.001$). A razão entre L-arginina e ADMA ($p < 0.732$) não apresentou diferença estatística entre os grupos analisados.

Na tabela 4 estão mostradas as comparações, duas a duas, das variáveis que apresentaram diferença estatística entre os grupos (teste de Bonferroni).

Tabela 4: Comparações das variáveis (ADMA, SDMA e L-arginina) entre os grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Variável	Grupos controlados		Nível descritivo
ADMA (μM)	Controle	IG	0,003
	Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,251
SDMA (μM)	Controle	IG	0,011
	Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,001
L-arginina (μM)	Controle	IG	0,001
	Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,822

As concentrações de ADMA, SDMA e L-arginina foram maiores nos grupos IG e DMII quando comparado ao grupo Controle. Comparando os grupos Controle e IG, somente o SDMA apresentou diferença significativa.

4.1.4 Determinação de NOx, nitrotirosina e RSNO

Nos gráficos 14 a 16 encontram-se os dados referentes às determinações de NOx (nitrato + nitrito), nitrotirosina e S-nitrosotióis (RSNO) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 14: Concentração de NOx (nitrato + nitrito) nos grupos Controle, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 15: Concentração de nitrotyrosina (nM) nos grupos Controle, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 16: Concentração de S-nitrosotióis (RSNO) nos grupos Controle, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

A análise de variância univariada demonstrou que existem diferenças entre os grupos quanto às variáveis NOx ($p < 0.002$), nitrotirosina ($p < 0.001$) e RSNO ($p < 0.006$).

Na tabela 5 estão as comparações, duas a duas, das variáveis que apresentaram diferença estatística entre os grupos através do teste de Bonferroni.

Tabela 5: Comparações das variáveis (NOx, nitrotirosina e RSNO) entre os grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

<i>Variável</i>	<i>Grupos controlados</i>		<i>Nível descritivo</i>
NOx (μM)	Controle	IG	0,013
	Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,382
Nitrotirosina (nM)	Controle	IG	0,009
	Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,001
RSNO (nM)	Controle	IG	0,027
	Controle	DMII	0,005
	IG	DMII	0,999

As concentrações de NOx, Nitrotirosina e RSNO foram superiores nos grupos IG e DMII em comparação com o grupo Controle. Em relação aos grupos IG e DMII, somente a nitrotirosina apresentou diferença significativa.

4.1.5 Determinações de tióis

Nos gráficos 17 a 19 encontram-se os dados referentes às determinações de homocisteína, cisteína e metionina nos grupos Controle, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DM II).

Gráfico 17: Concentração de homocisteína (µM) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 18: Concentração de cisteína (µM) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 19: Concentração de metionina (µM) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

A análise estatística de variância univariada demonstrou que existem diferenças entre os grupos quanto às variáveis homocisteína ($p<0.014$), cisteína ($p<0.022$) e metionina ($p<0.024$).

Na tabela 6 estão as comparações, duas a duas, das variáveis que apresentaram diferença estatística entre os grupos através do teste de Bonferroni.

Tabela 6: Comparações das variáveis (homocisteína, cisteína e metionina) entre os grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Variável	Grupos controlados		Nível descritivo
Homocisteína (μM)	Controle	IG	0,113
	Controle	DMII	0,995
	IG	DMII	0,048
Cisteína (μM)	Controle	IG	0,010
	Controle	DMII	0,083
	IG	DMII	0,179
Metionina (μM)	Controle	IG	0,231
	Controle	DMII	0,999
	IG	DMII	0,024

As concentrações de homocisteína e metionina foram superiores no grupo IG em relação ao grupo DMII. Além disso, as concentrações de cisteína foram superiores em relação ao grupo Controle.

4.1.6 Determinação de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG)

Nos gráficos 20 a 22 encontram-se os dados referentes às determinações de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e a razão de GSH/GSSG nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 20: Concentração de glutathiona reduzida (GSH) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 21: Concentração de glutathiona oxidada (GSSG) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 22: Razão entre a concentração de GSH e GSSG nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

A análise de variância univariada demonstrou que existem diferenças entre os grupos quanto às variáveis GSH ($p < 0.007$), GSSG ($p < 0.004$) e GSH/GSSG ($p < 0.001$).

Na tabela 7 estão as comparações, duas a duas, das variáveis que apresentaram diferença estatística entre os grupos através do teste de Bonferroni.

Tabela 7: Comparações das variáveis (GSH, GSSG e GSH/GSSG) entre os grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Variável	Grupos controlados		Nível descritivo
GSH (μM)	Controle	IG	0,852
	Controle	DMII	0,021
	IG	DMII	0,041
GSSG (μM)	Controle	IG	0,010
	Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,637
GSH / GSSG	Controle	IG	0,316
	Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,027

A concentração de GSH foi inferior no grupo DMII em relação aos grupos Controle e IG. Já a concentração de GSSG foi inferior no grupo Controle em comparação aos grupos IG e DMII e a razão de GSH e GSSG foi inferior no grupo DMII quando comparado aos grupos Controles e IG.

4.1.7 Determinação da atividade enzimática da n-acetil- β -glucosaminidase (NAGase)

No gráfico 23 encontram-se os dados referentes às determinações da atividade plasmática da n-acetil- β -glucosaminidase (NAGase) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 23: Medida da atividade enzimática da N-acetil- β -glucosaminidase (NAGase) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

A análise estatística de variância univariada mostrou que existem diferenças entre os grupos quanto à variável NAGase ($p < 0.001$).

Na tabela 8 estão as comparações, duas a duas, da variável (NAGase) entre os grupos através do teste de Bonferroni.

Tabela 8: Comparações da variável NAGase entre os grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

<i>Variável</i>	<i>Grupos controlados</i>		<i>Nível descritivo</i>
NAGase (U/L)	Controle	IG	0.002
	Controle	DMII	0.001
	IG	DMII	0,665

A atividade enzimática da NAGase foi superior nos grupos IG e DMII quando comparado ao grupo Controle.

4.2 Subdivisão do grupo DMII em DMII sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e DMII com evento cardiovascular (DMII com ECV)

Os pacientes do grupo DMII que apresentaram um ou mais infartos agudos do miocárdio foram classificados como DMII com evento cardiovascular (DMII com ECV). Os infartos agudos do miocárdio foram sintomatológicos e confirmados por eletrocardiograma.

Os pacientes do grupo DMII que não apresentaram história clínica pregressa de infarto agudo do miocárdio foram classificados como DMII sem evento cardiovascular (DMII sem ECV).

Na tabela 9 os indivíduos do grupo DMII (n=96) foram subdivididos em DMII com evento cardiovascular (n=21) e DMII sem evento cardiovascular (n=75).

Tabela 9: Idade média, índice de massa corpórea (IMC), sexo (masculino/feminino) e medicações utilizadas pelos grupos DMII sem ECV e DMII com ECV.

	DM II sem ECV (n=75)	DM II com ECV (n=21)
M/F	32/43	10/11
Idade	58±3	59±8
IMC	28,0±5,2	29,1±5,1
Insulina	13 (17%)	7 (33%)
Hipoglicemiante oral	75 (100%)	21 (100%)
Anti-hipertensivo	58 (77%)	18 (86%)
Hipolipemiante	24 (32%)	12 (57%)

DMII sem ECV: Diabetes Mellitus tipo 2 sem evento cardiovascular

DMII com ECV: Diabetes Mellitus tipo 2 com evento cardiovascular

4.2.1 Resultados dos grupos DMII sem ECV e DMI com ECV

Nos gráficos 24 a 28 encontram-se os dados referentes às determinações NAGase, GSH, frutossamina, HDL-colesterol e NOx dos grupos Controle, IG, DMII sem ECV e DMII com ECV.

Gráfico 24: Medida da atividade enzimática da n-acetil- β -glucosaminidase (NAGase) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG), Diabetes Mellitus tipo II sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus tipo II com evento cardiovascular (DMII com ECV).

Gráfico 25: Concentração de glutathiona reduzida (GSH) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG), Diabetes Mellitus tipo II sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus tipo II com evento cardiovascular (DMII com ECV).

Gráfico 26: Concentração de frutosamina (mg/dL) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG), Diabetes Mellitus tipo II sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus tipo II com evento cardiovascular (DMII com ECV).

Gráfico 27: Concentração de HDL-colesterol (mg/dL) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG), Diabetes Mellitus tipo II sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus tipo II com evento cardiovascular (DMII com ECV).

Gráfico 28: Concentração de NOx (μM) nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG), Diabetes Mellitus tipo II sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus tipo II com evento cardiovascular (DMII com ECV).

A análise estatística de variância univariada mostrou que existem diferenças entre os grupos quanto às variáveis NAGase ($p<0.001$), GSH ($p<0.001$), frutossamina ($p<0.001$), HDL-colesterol ($p<0.001$) e NOx ($p<0.001$).

Na tabela 10 estão as comparações, duas a duas, das variáveis que apresentaram diferença estatística entre os grupos DMII sem ECV e DMII com ECV, através do teste de Bonferroni.

Tabela 10: Comparações das variáveis NAGase, GSH, frutossamina e NOx entre os grupos Diabetes Mellitus tipo II sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus tipo II com evento cardiovascular (DMII com ECV).

Variável	Grupos controlados		Nível descritivo
NAGase (U/L)	DMII sem ECV	DMII com ECV	0,049
GSH (μ M)	DMII sem ECV	DMII com ECV	0,048
Frutossamina (mg/dl)	DMII sem ECV	DMII com ECV	0,001
NOx (μ M)	DMII sem ECV	DMII com ECV	0.001

O evento cardiovascular no grupo DMII favoreceu o aumento significativo da concentração de NOx e NAGase.

Já a concentração de frutossamina e GSH apresentou uma diminuição no grupo DMII com ECV em relação ao grupo DMII sem ECV.

4.3 Análise Multivariada

4.3.1 Grupos: Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII)

A análise discriminante fornece uma ferramenta multivariada poderosa para identificar, dentre diversas variáveis de interesse, quais discriminam melhor grupos definidos a priori. Em outras palavras, a análise discriminante utiliza um grupo de variáveis para classificar observações em grupos distintos. A análise discriminante pode ser utilizada para distinguir indivíduos de populações ou comunidades, para classificar novas observações oriundas de grupos desconhecidos ou para testar se novas variáveis aumentam o poder de discriminação entre grupos. Esse tipo de análise avalia dois ou mais grupos (ou populações), que diferem com respeito a diversas variáveis, combinando essas variáveis em equações chamadas de funções lineares discriminantes. Cada função apresenta um determinado número de coeficientes discriminantes, valores que variam de -1 a +1 e indicam o quanto cada variável é ponderada para maximizar a discriminação dos grupos. Em outras palavras, quanto maior o valor absoluto dos coeficientes discriminantes, maior é sua capacidade de precisão em classificar corretamente observações em seus respectivos grupos. Por definição, variáveis com coeficientes discriminantes acima de $|0.30|$ são consideradas boas discriminantes.

A análise discriminante no modo Stepwise foi aplicada a fim de diferenciar 3 grupos (Controle, IG e DMII). A análise discriminante fornece um procedimento multivariado para identificar quais das variáveis pesquisadas específicas melhor discriminam dentre os grupos definidos a priori. A análise discriminante é sensível à razão do tamanho da amostra para com o número de variáveis independentes, com a razão mínima

recomendada de 5:1. Nossa amostra obedece este critério com uma razão de 140:23. Também é recomendado que todos os sub-grupos representados na variável dependente deveriam ter mais casos do que o número de variáveis independentes usadas para a análise. Nosso menor sub-grupo, classificado como Controle, tem 12 casos relativos à 7 variáveis independentes usadas, o qual é novamente aceitável. A análise discriminante usa o "Wilk's Lambda Estatístico" como critério de escolha de variáveis no modo Stepwise. Os resultados indicam quais variáveis são mais úteis em distinguir entre os grupos Controle, IG e DMII. Além disso, a discriminação padronizada dos coeficientes de função indica a direção e grau ao qual cada variável contribui para a classificação.

Nos gráficos e tabelas abaixo seguem o resultado dessa análise estatística.

Tabela 11: Coeficientes de função padronizada

Variável	Matriz Estrutural		Coeficiente de Variação		Wilks' Lambda			
	F ₁	F ₂	F ₁	F ₂	λ	d ₁	d ₂	Sig.
HDL	-0,329	-0,269	-0,378	-0,163	22,7	2	137	<0,001
RSNO	0,194	0,449	0,342	0,390	15,9	4	272	<0,001
GSH	-0,082	0,325	-0,607	-0,053	16,0	6	270	<0,001
Homocisteína	-0,156	0,560	-0,198	0,572	14,0	8	268	<0,001
L-arginina	0,209	0,451	0,232	0,607	13,0	10	266	<0,001
Frutosamina	0,434	-0,386	0,483	-0,502	11,9	12	264	<0,001
Hb-G	0,527	-0,137	0,527	0,057	11,0	14	262	<0,001

Gráfico 29: Gráfico da distribuição das funções 1 e 2 nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Tabela 12: Resultado da classificação da Análise Multivariada dos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

		Grupos Estatísticos			Total
		Controle	IG	DMII	
Contagem	Controle	10	2	0	12
	IG	7	21	4	32
	DMII	3	13	80	96
%	Controle	93,3	16,7	0,0	100,0
	IG	21,9	65,5	12,5	100,0
	DMII	3,1	13,5	83,3	100,0

80,1% dos Grupos Reais foram classificados corretamente (média ponderada dos 3 grupos)

A análise discriminante foi conduzida para avaliar se as 7 variáveis previstas (HDL-colesterol, RSNO, GSH, homocisteína, L-arginina, frutossamina e Hb-G) poderiam distinguir aqueles indivíduos pertencentes aos grupos Controle, IG e DMII daqueles classificados como grupo Controle, IG e DMII, respectivamente. O Wilk's lambda foi significativo, $\lambda=0,395$, $\lambda^2=124,3$, $P<0.001$ e $\lambda=0,864$, $\lambda^2=13,7$, $P<0.0013$ para as funções 1 e 2, respectivamente, indicando que as variáveis HDL-colesterol, RSNO, GSH, homocisteína, L-arginina, frutossamina e Hb-G foram capazes de discriminar significativamente os grupos Controle, IG e DMII. A tabela 11 apresenta os coeficientes de função padronizados. Os resultados da classificação mostram que o modelo previu corretamente 83,3% daqueles pertencentes ao grupo Controle, 65,6% daqueles os quais foram classificados como grupo IG e 83,3% daqueles designados como grupo DMII, resultando numa discriminação total das variáveis de 80,1% entre os

3 grupos (tabela 12). No gráfico 29 está representado o gráfico da dispersão dos valores dos grupos.

4.3.2 Grupos: Controle, Intolerante à Glicose (IG), Diabetes Mellitus tipo II sem Evento Cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus tipo II com Evento Cardiovascular (DMII com ECV)

O grupo DMII foi subdividido em DMII sem ECV e DMII com ECV. Desse modo, foi realizada a análise discriminante como descrita anteriormente englobando os grupos Controle, IG, DMII sem ECV e DMII com ECV.

Os resultados obtidos dessa análise estatística estão representados nas figuras abaixo.

Gráfico 30: Gráfico da distribuição das funções 1 e 2 nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II sem Evento Cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus tipo II com Evento Cardiovascular (DMII com ECV).

Tabela 13: Resultado da classificação da Análise Multivariada dos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II sem Evento Cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus tipo II com Evento Cardiovascular (DMII com ECV).

		Grupos Estatísticos				Total
		Controle	IG	DMII sem ECV	DMII com ECV	
Contagem	Controle	11	1	0	0	12
	IG	5	22	2	3	32
	DMII sem ECV	0	13	45	17	75
	DMII com ECV	0	2	2	17	21
%	Controle	91,7	8,3	0	0	100
	IG	15,6	68,8	6,3	9,4	100
	DMII sem ECV	0	17,3	60,0	27,7	100
	DMII com ECV	0	9,5	9,5	81,0	100

67,9% dos Grupos Reais foram classificados corretamente (média ponderada dos 4 grupos)

Os resultados da classificação mostram que as variáveis HDL-colesterol, NOx, RSNO, GSH/GSSG, frutossamina e Hb-G previu corretamente 91,7% daqueles pertencentes ao grupo Controle, 68,8% daqueles os quais foram classificados como grupo IG, 60,0% daqueles designados como grupo DMII sem ECV e 81,0% daqueles pertencentes ao grupo DMII com ECV, resultando numa discriminação total das variáveis de 67,9% entre os 4 grupos (tabela 13). No gráfico 30 está representada o gráfico da dispersão dos valores dos grupos.

4.3.3 Grupos: Diabetes Mellitus tipo II sem Evento Cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus tipo II com Evento Cardiovascular (DMII com ECV)

Analisando somente os indivíduos com Diabetes Mellitus tipo II na presença e ausência de evento cardiovascular, os resultados da Análise Multivariada estão representados na figura abaixo.

Tabela 14: Resultado da classificação da Análise Multivariada dos grupos Diabetes Mellitus tipo II sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus tipo II com evento cardiovascular (DMII com ECV).

Grupos Reais		Grupos Estatísticos		Total
		DMII sem ECV	DMII com ECV	
Contagem	DMII sem ECV	56	19	75
	DMII com ECV	3	18	21
%	DMII sem ECV	74,7	25,3	100
	DMII com ECV	14,3	85,7	100

77,1% dos Grupos Reais foram classificados corretamente (média ponderada dos 2 grupos)

Os resultados da classificação mostram que as variáveis NAGase, NOx e frutossamina previu corretamente 74,7% daqueles pertencentes ao grupo DMII sem ECV e 85,7% daqueles os quais foram classificados como grupo DMII com ECV, resultando numa discriminação total das variáveis de 77,1% entre os 2 grupos (tabela 14).

4.4 Avaliação da função endotelial por Ultrassonografia (Doppler bi-dimensional)

A avaliação da função endotelial por ultrassonografia (Doppler bi-dimensional) foi realizada em um pequeno número de voluntários do estudo (IG=6 e DMII=12) escolhidos aleatoriamente.

A medida da velocidade do fluxo sanguíneo e o diâmetro da artéria braquial em diástole e a espessura da camada média-íntima da artéria aorta foram realizados no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia no Setor de Ecocardiograma.

Nos gráficos 31, 32, 33 e 34 estão representadas a espessura da camada média-íntima da artéria carótida, a variação da velocidade do fluxo na artéria braquial após a hiperemia reativa, a variação da vasodilatação da artéria braquial após a hiperemia reativa e a variação da vasodilatação da arterial braquial após a administração de isordil, respectivamente.

Gráfico 31: Espessura da camada média-intima da artéria aorta de alguns voluntários dos grupos Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Gráfico 32: Variação da velocidade do fluxo na artéria braquial após a hiperemia reativa em alguns voluntários dos grupos Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

(*) Estatisticamente diferente em comparação com o grupo IG ($p=0.025$).

Variação da vasodilatação da artéria braquial após a hiperemia reativa

Gráfico 33: Variação da vasodilatação da artéria braquial após a hiperemia reativa em alguns voluntários dos grupos Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Variação da vasodilatação da artéria braquial após a administração de isordil

Gráfico 34: Variação da vasodilatação da artéria braquial após a administração de isordil em alguns voluntários dos grupos Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Nenhuma diferença estatística foi observada na espessura da camada média-íntima da carótida ($p=0.721$), no diâmetro da vasodilação da artéria braquial na hiperemia reativa ($p=0.321$) e após a administração de isordil ($p=0.130$) entre os grupos IG e DMII. Somente o fluxo sanguíneo na artéria braquial após a hiperemia reativa apresentou diferença estatística entre os grupos IG e DMII.

4.5 Correlações

Na tabela 15 são mostrados somente os valores dos coeficientes de correlação de Pearson significativos ($p<0.05$) calculados para as variáveis estudadas e os respectivos níveis de significância.

Tabela 15: Correlações significativas das variáveis analisadas nos grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG), Diabetes Mellitus tipo II (DMII), Diabetes Mellitus tipo II sem Evento Cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus tipo II com Evento Cardiovascular (DMII com ECV).

Grupo	Variáveis	r	p
Controle	NOx vs GSH	-0.737	0,0064
IG	Hb-G vs ADMA	0.379	0.0322
	Hb-G vs GSSG	0.450	0.0182
	Frutosamina vs GSSG	0.377	0.0336
	Triglicérides vs NAGase	0.354	0.0467
	Triglicérides vs GSSG	0.386	0.0291
DMII	Frutosamina vs Nitrotirosina	0.359	0.0003
	Frutosamina vs Triglicérides	0.278	0.0062
	Frutosamina vs L-arginina/ADMA	0.423	<0.0001
	NOx vs GSH/GSSG	-0.201	0.0497
DMII sem ECV	Frutosamina vs Nitrotirosina	0.359	0.0015
	Frutosamina vs GSH/GSSG	0.229	0.0484
	NOx vs GSH/GSSG	0.229	0.0481
DMII com ECV	GSH/GSSG vs RSNO	0.421	0.0471
	GSH/GSSG vs Nitrotirosina	-0.371	0.0475
	Frutosamina vs GSSG	0.374	0.0449
	Frutosamina vs Triglicérides	0.548	0.0102

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A Diabetes Mellitus tipo II é um fator de risco importante para a aterosclerose. Apesar de estar bem estabelecido que o aumento da glicemia é um dos fatores para o desenvolvimento da aterosclerose, os mecanismos relacionados ao desenvolvimento e à progressão da aterosclerose não estão totalmente esclarecidos. Dessa forma, é de extrema importância avaliar-se não apenas o perfil glicêmico dos indivíduos, mas também outros parâmetros que poderiam estar relacionados à aterosclerose, tais como tióis (homocisteína, cisteína, metionina, glutathione oxidada e glutathione reduzida), nitrato + nitrito (NOx), inibidores endógenos da óxido nítrico sintase (ADMA), S-nitrosotióis (RSNO), nitrotirosina, n-acetil- β -glucosaminidase (NAGase) e a avaliação da função endotelial.

A Intolerância à Glicose (IG), condição metabólica que antecede a DMII propriamente dita, tem sido alvo de pesquisa devido ao fato do perfil glicêmico estar influenciando o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Normalmente, o indivíduo IG não é tratado com medicação hipoglicemiante, mas somente através de uma dieta controlada. No entanto, diversos estudos têm verificado que a resistência periférica à insulina, principal causa do desenvolvimento tanto da IG com do DMII, tem participação importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Em nosso estudo, verificamos que o indivíduo com IG já tem alterações metabólicas significativas e que essa condição poderia estar atuando precocemente no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Essas alterações metabólicas estariam englobando os parâmetros relacionados à disfunção endotelial e ao estresse oxidativo. Os parâmetros que refletem a disfunção endotelial estariam representados pelos NOx

(nitrato + nitrito), inibidores endógenos da óxido nítrico sintase (ADMA e SDMA), S-nitrosotióis (RSNO), n-acetil- β -glucosaminidase e os testes para avaliar a função endotelial. Os marcadores de estresse oxidativo são a nitrotirosina e os tióis (homocisteína, metionina, cisteína, glutathione oxidada e glutathione reduzida).

Os metabólitos do óxido nítrico que englobam NO_x, RSNO e nitrotirosina, conjuntamente, são bons indicadores da biodisponibilidade/síntese do $\bullet$ NO. O $\bullet$ NO, em presença do oxigênio, é rapidamente oxidado à nitrito (Kelm *et al.*, 1988), o qual tem sido utilizado como um marcador da produção endógena de $\bullet$ NO. Contudo, o nitrito pode ser convertido a nitrato (>95% em 1 hora) (Moshage *et al.*, 1995; Wennmalm *et al.*, 1993; Kelm *et al.*, 1996). Portanto, a determinação de nitrato + nitrito plasmático, comumente chamado de NO_x, tem sido utilizada como um marcador da atividade da óxido nítrico sintase e da produção endógena de $\bullet$ NO. Há evidências de que, quando os níveis de O₂ $\bullet$ e $\bullet$ NO estão aumentados, pode ocorrer a formação de um poderoso oxidante, o peroxinitrito (ONOO⁻). Este por sua vez pode reagir com a tirosina (livre ou ligada à proteína) e formar a nitrotirosina, considerada como um biomarcador da formação do peroxinitrito. A elevação da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) somado ao aumento da atividade iNOS, fato que ocorre na hiperglicemia, poderia induzir o aumento de nitrotirosina (Balint *et al.*, 2001). Além disso, o $\bullet$ NO gerado em sistemas biológicos, pode reagir com grupos de proteínas específicas e formar S-nitrosotióis (RSNO) (Stamler *et al.*, 1992). Esta reação pode prolongar a vida média do $\bullet$ NO e preservar sua atividade biológica (Stamler *et al.*, 1992).

Alguns estudos recentes têm relatado a formação de ONOO⁻ no diabetes. O peroxinitrito pode atuar em diversos compartimentos, modificando a função das biomoléculas por nitração (proteínas) e/ou peroxidação lipídica.

Por exemplo, canais de potássio, os quais regulam a vasodilatação, são inibidos por nitração de tirosinas. Recentemente, Turko *et al.* (2003) demonstraram que o aumento de nitrotirosina estava associado com a apoptose de miócitos, células endoteliais e fibroblastos no diabetes. O peroxinitrito também pode diminuir a biodisponibilidade do NO[•], inibindo a vasodilatação e o efeito antiproliferativo do NO[•]. Adicionalmente, o peroxinitrito pode oxidar a tetrahidrobiopterina (BH₄), um importante cofator para a NOS, e causar desacoplamento da NOS, levando à produção de O₂⁻ ao invés de NO[•]. Além disso, a peroxidação lipídica induzida por peroxinitrito pode alterar a estrutura e a fluidez das membranas celulares. Todos esses eventos contribuem direta ou indiretamente para a patogênese da disfunção vascular no diabetes (Johansen *et al.*, 2005). Watada *et al.*, (2004) demonstraram que o peroxinitrito está envolvido na síndrome da resistência à insulina, evento presente em grande parte dos diabéticos e intolerantes à glicose e responsável pelo estado hiperglicêmico. Os resíduos de tirosina do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1: insulin receptor substrate-1), proteína responsável pela transdução da sinalização do receptor de insulina, podem ser nitrados pelo peroxinitrito, acarretando uma interrupção na cadeia de sinalização, conseqüentemente, não ocorrendo a incorporação de glicose circulante pela célula.

Em nosso estudo, a concentração dos metabólitos do [•]NO (NO_x, nitrotirosina e RSNO) foi superior nos grupos IG e DMII em relação ao grupo Controle. Somente a nitrotirosina apresentou diferença entre os grupos IG e DMII, isto é, a concentração de nitrotirosina foi superior no grupo DMII em comparação ao grupo IG. De certa forma, podemos sugerir que a resistência à insulina em ambos os grupos está ligada diretamente à produção do peroxinitrito, como discutido anteriormente, visto que a maior concentração de nitrotirosina foi detectada no grupo que apresentou maior

grau de hiperglicemia, devido à maior resistência à insulina. Esses dados estão consistentes também com outros estudos, nos quais se demonstrou que a hiperglicemia ativa a iNOS (Bardell *et al.*, 2001), ocasionando o aumento da formação de NO_x. Ceriello *et al* (2002) demonstraram que a hiperglicemia pós-prandial está relacionada ao aumento da produção de nitrotirosina de forma dependente do grau de glicemia. Konukoglu *et al* (2003) demonstraram que a biodisponibilidade do •NO na IG e DMII diminuía quando as concentrações de glicose plasmáticas apresentavam-se elevadas.

Em nosso estudo, a hiperglicemia relacionou-se ao aumento da produção de •NO, porém, houve aumento também de nitrotirosina. Isso demonstra que, apesar da maior produção de •NO, parte desse está sendo direcionado para a formação de nitrotirosina, provavelmente, devido à geração concomitante de radical superóxido e a conseqüente formação de peroxinitrito. Esse aumento de estresse oxidativo/nitrosativo é confirmado através das determinações de GSH, GSSG e GSH/GSSG mostrado em nosso estudo.

A glicação de proteínas, principalmente de albumina (Alb), aumenta a S-nitrosação, porém, diminui a capacidade da S-nitrosoalbumina (SNO-Alb) glicada de liberar •NO. Portanto, as proteínas glicadas funcionariam como "scavenger" para o •NO (Farkas *et al.*, 1995). A glicação de proteína é uma reação espontânea e depende do grau e duração da hiperglicemia.

Nossos dados demonstraram que os biomarcadores utilizados (NO_x, nitrotirosina e RSNO) foram sensíveis para indicar as alterações do metabolismo do •NO relacionadas à hiperglicemia presente nos estágios iniciais (IG) e avançados (DMII) da resistência à insulina.

Os inibidores endógenos da óxido nítrico sintase, representados pela dimetil arginina assimétrica (ADMA) e dimetil arginina simétrica (SDMA), também têm participação importante na disfunção endotelial. O ADMA é

originado em grande parte do catabolismo de proteínas contendo resíduos de arginina metilada que são liberadas quando hidrolisadas. Concentrações elevadas de ADMA, isômero ativo na inibição da óxido nítrico sintase, foram observadas nos grupos IG e DMII quando comparados com o grupo Controle. Fard *et al.* (2000) demonstraram que em pacientes DMII, após a ingestão de lipídios, os níveis de ADMA aumentaram e em paralelo houve diminuição da vasodilatação. Em outro estudo verificou-se que, na DMII, concentrações elevadas de ADMA não estão relacionadas ao tempo de manifestação da doença, ou à presença ou ausência da macroangiopatia, mas sim ao controle metabólico desta doença (Xiong *et al.*, 2005). Podemos sugerir que a hiperglicemia e/ou a hipertrigliceridemia constatada nos grupos IG e DMII, poderiam estar contribuindo para o aumento do ADMA, ocasionando menor produção de óxido nítrico e, com isso, acarretando menor vasodilatação. Essa hipótese é reforçada pelo fato da atividade enzimática da N-acetil- β -glucosaminidase (marcador de lesão endotelial) foi superior nos grupos IG e DMII. Além disso, houve uma correlação entre as variáveis Hb-G e frutossamina com ADMA e L-arginina/ADMA.

A hidrólise aumentada de proteínas metiladas intracelulares também contribuiu para a elevação plasmática de ADMA, uma vez que McDermott (1976) demonstrou que as dimetilargininas surgem principalmente da degradação dessas proteínas metiladas (Miyazaki *et al.*, 1999). A peroxidação lipídica *in vivo* resulta em dano oxidativo a proteínas tissulares e pode acelerar a proteólise dessas proteínas metiladas (Chan *et al.*, 2000). Sabe-se que o estado hiperglicêmico é um fator que contribui para o estresse oxidativo (geração de EROs e ERNs direta ou indiretamente) devido à auto-oxidação da glicose e pela via não-enzimática de glicação de proteína (Wolff *et al.*, 1987).

Algumas enzimas que são doadoras de grupos metila como a metiltransferase, intermediária da conversão da metionina à homocisteína, podem aumentar a geração de ADMA. Quando a via metabólica metionina-homocisteína está altamente ativa, nem sempre as metilações da metiltransferase são específicas para determinados substratos e com isso podem ocorrer metilações aleatórias, inclusive em resíduos de arginina que, quando hidrolisadas, poderão dar origem à ADMA (Böger *et al.*, 2000). No presente estudo, as concentrações de tióis (homocisteína, metionina e cisteína) foram significativamente elevadas somente no grupo IG. Portanto, o aumento de ADMA no grupo IG poderia ter tido uma contribuição direta do ciclo da homocisteína. Apesar da concentração média de ADMA ter mostrado tendência de aumento em relação ao grupo DMII, não houve diferença estatística.

A excreção renal também tem uma contribuição importante na manutenção da concentração plasmática do ADMA. Todos os voluntários do presente estudo apresentaram concentração plasmática de uréia e creatinina dentro dos valores de referência, apesar de que isso não descarta a possibilidade de alguns voluntários apresentarem um certo grau de disfunção renal.

O SDMA, isômero inativo dos inibidores endógenos da óxido nítrico sintase, apresentou comportamento similar ao ADMA, acrescentando-se o fato que também existiu uma diferença entre os grupos IG e DMII. No entanto, ressalta-se que esse isômero não tem ação sobre a vasodilatação ou a biodisponibilidade do óxido nítrico.

Observou-se aumento da L-arginina, aminoácido essencial para a formação do $\bullet$ NO sob ação da óxido nítrico sintase, nos grupos IG e DMII, mas a razão entre as concentrações plasmáticas de L-arginina e ADMA, parâmetro que mede indiretamente a competição desses substratos pela

enzima óxido nítrico sintase, não apresentou diferenças entre os grupos. Esse dado sugere que a disfunção endotelial, relacionada à baixa geração de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase endotelial, poderia ser induzida tanto na Intolerância à Glicose como no Diabetes Mellitus tipo 2 por aumento na geração de inibidores da óxido nítrico sintase, neste caso o ADMA, e não pela baixa biodisponibilidade de L-arginina. Essa disfunção endotelial foi confirmada nos grupos IG e DMII pela medida da atividade enzimática da NAGase.

Os tióis têm importante participação tanto no estresse oxidativo com na disfunção endotelial. A homocisteína é um aminoácido sulfurado não essencial obtido a partir da desmetilação do aminoácido essencial metionina. A homocisteína pode estar envolvida no estresse oxidativo, podendo promover lesão nas células vasculares e nas lipoproteínas mediante auto-oxidação e formação de EROs. Portanto, a elevação da concentração plasmática de homocisteína pode levar a um aumento do estado pró-oxidante. Além disso, a homocisteína pode promover a disfunção endotelial (diminuição da biodisponibilidade do $\bullet$ NO), citotoxicidade endotelial (indução de apoptose), favorecer a proliferação das células musculares lisas, promover a vasoconstrição, induzir modificações na partícula LDL-colesterol tornando-a aterogênica, atuar como pró-inflamatória, pró-trombótica, estimular a enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzima A Redutase nas células endoteliais (enzima responsável pela síntese de colesterol endógeno), promover a oxidação da tetrahidrobiopterina (com isso a eNOS passa a gerar superóxido no lugar do $\bullet$ NO) e exacerbar a aterosclerose (Hayden *et al.*, 2004).

A hiperhomocisteinemia é considerada um fator de risco independente para doenças cardiovasculares. Vários estudos têm relacionado maior incidência de complicações (microalbuminúria, insuficiência renal,

microangiopatia, macroangiopatia, retinopatia e outros) em pacientes com DMII que apresentam concomitantemente hiperhomocisteinemia (Li *et al.*, 2005; de Luiz *et al.*, 2005; Herrmann *et al.*, 2005; Sydow *et al.*, 2004; Goldstein *et al.*, 2004) Alguns estudos têm relacionado a hiperhomocisteinemia com a resistência à insulina, visto que vários estudos demonstraram claramente elevação de homocisteína plasmática, principalmente em indivíduos com diabetes mellitus tipo II em relação ao diabetes mellitus tipo I. Alguns medicamentos hipoglicemiantes como a metformina, que atua farmacologicamente no intuito de diminuir a resistência periférica à insulina, tem demonstrado reduzir a concentração plasmática de homocisteína (Elias *et al.*, 2005).

Em nosso estudo, o grupo DMII não apresentou variação dos níveis de tióis em relação ao grupo Controle. No entanto, o grupo IG apresentou concentração superior de homocisteína em relação ao grupo DMII, mas não em relação ao grupo Controle. O mesmo comportamento foi apresentado pela metionina. No caso da cisteína, as concentrações no grupo IG foram superiores em comparação com o grupo Controle. A concentração de homocisteína superior no grupo IG, em relação ao grupo DMII, pode estar relacionada ao fato de que todos os indivíduos do grupo DMII fazem uso de medicação hipoglicemiante, incluindo a metformina que atua na diminuição da resistência periférica da insulina. Em contraste, no grupo IG nenhum integrante faz uso dessa medicação. Como discutido anteriormente, a medicação hipoglicemiante, através da redução da resistência periférica à insulina, poderia justificar a concentração inferior de homocisteína do grupo DMII em relação grupo IG. Esses resultados poderão ser úteis na abordagem terapêutica dos indivíduos intolerantes à glicose. Sabe-se que o tratamento hipoglicemiante é indicado somente para o indivíduo diagnosticado como DMII. No entanto, o tratamento dos indivíduos intolerantes à glicose com

medicação hipoglicemiante poderia atenuar prováveis eventos cardiovasculares precoces.

Outro tiol importante é a glutathiona, que ocorre nas formas oxidada (GSH) e reduzida (GSSG). A determinação de GSH e GSSG é um indicador do estresse oxidativo em sistemas biológicos. A razão das concentrações de GSH e GSSG avalia o status de estresse oxidativo existente.

O grupo DMII apresentou concentrações inferiores de GSH e GSH/GSSG e superiores de GSSG em comparação ao grupo Controle. O mesmo perfil foi também verificado, em menor intensidade, no grupo IG. Aparentemente, a diminuição das concentrações de GSH e o aumento de GSSG foram proporcionais ao estado de hiperglicemia. Isso demonstra que a hiperglicemia está direta ou indiretamente contribuindo para o estresse oxidativo de forma dose-dependente. Vijayalingam *et al.* (1996) demonstraram que o status antioxidante tanto do IG como do DMII está abaixo dos valores de normalidade.

O decréscimo de GSH pode estar associado ao maior consumo de NADPH na via do poliol. Nessa via, a glicose sofre redução pelo NADPH produzindo sorbitol sob ação da enzima aldose redutase. Em seguida, ocorre oxidação do sorbitol na presença de NAD^+ e sorbitol desidrogenase, resultando em frutose. A aldose redutase tem um K_m elevado para a glicose e, portanto, essa via só é quantitativamente importante num estado de hiperglicemia. Portanto, durante o estado hiperglicêmico, a relação NADPH/NADP⁺ está diminuída, resultando na redução da regeneração de GSSG para GSH. Desse modo, com a redução da concentração de GSH, a via do poliol poderia aumentar a susceptibilidade para o estresse intracelular. Além disso, devido ao fato do NADPH ser cofator da óxido nítrico sintase, poderia haver menor síntese de óxido nítrico nessa condição (Brownlee, 2005; Cameron *et al.*, 1997).

Para avaliar a função endotelial utiliza-se frequentemente a ultrassonografia para medir a vasodilatação e o fluxo sanguíneo arterial, sob diferentes condições. Em alguns estudos, a medida da atividade plasmática da n-acetil- β -glucosaminidase (NAGase) tem sido utilizada como um biomarcador de disfunção endotelial (Skrha *et al.*, 2003). A NAGase é uma enzima lisossômica de estrutura glicoprotéica sintetizada por várias células, incluindo as células endoteliais e musculares lisas dos vasos sanguíneos (Hayes *et al.*, 1979). O estresse oxidativo pode lesar a parede celular do endotélio e estimular a liberação dessa enzima lisossômica para o meio extracelular. Skrha *et al.* (2003) verificaram alta correlação entre a atividade da NAGase, E-selectina e ICAM-1 com a medida do fluxo sanguíneo e diâmetro da artéria braquial por ultrassonografia com doppler, método utilizado rotineiramente para avaliar a função endotelial. Além disso, nesse mesmo estudo, demonstrou-se que em indivíduos com Diabetes Mellitus tipo I houve uma correlação positiva entre a atividade da NAGase, a glicação de proteínas e a pressão arterial (Skrha *et al.*, 1987). Tem-se verificado também o aumento de atividade da NAGase, conjuntamente com a concentração de insulina plasmática e resistência à insulina, em pacientes com doença arterial coronariana (Inoue *et al.*, 2000). Komosinska-Vassev *et al* (2005) propõem que a elevação da atividade enzimática da NAGase seja considerada como um indicativo do grau de disfunção celular endotelial.

Em nosso estudo, a atividade da NAGase foi estatisticamente superior nos grupos IG e DMII em comparação com o grupo Controle. O mesmo fato ocorreu no grupo de DMII com DAC em relação do grupo DMII sem DAC, além de apresentar diferenças significativas das variáveis de GSH e NOx. Vários estudos demonstraram também que a NAGase está aumentada em indivíduos com DMII, quando comparados com indivíduos saudáveis e que existe também aumento da atividade da NAGase em

indivíduos DMII com evento prévio relacionado à doença cardiovascular (infarto do miocárdio) em comparação com indivíduos DMII sem eventos cardiovasculares prévios (Sanchez-Hueso *et al.*, 1995; Skrha *et al.*, 2001; Skrha *et al.*, 2001a).

Em resumo, nosso estudo demonstrou que os indivíduos com intolerância à glicose apresentam alterações bioquímicas, relacionadas ao estresse oxidativo e à disfunção endotelial, semelhantes aos pacientes com Diabetes Mellitus tipo II, as quais poderiam contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- O estresse oxidativo nos grupos IG e DMII foram indicados pelo aumento da nitrotirosina e GSSG e diminuição de GSH e GSH/GSSG.
- O aumento de ADMA e NAGase indicou disfunção endotelial nos grupos IG e DMII.
- O aumento de nitrotirosina indicou menor biodisponibilidade do $\bullet$ NO nos grupos IG e DMII.
- O conjunto de variáveis NOx, NAGase e frutossamina discriminou os grupos DMII sem ECV e DMII com ECV com uma margem de acerto de 80,2%. Além disso, essas variáveis conjuntamente podem ser biomarcadores sensíveis das complicações macrovasculares.
- Os indivíduos intolerantes à glicose apresentam alterações bioquímicas (NOx, nitrotirosina, RSNO, GSSG, ADMA e NAGase) semelhantes às dos diabéticos tipo II, que poderiam contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

APÊNDICE

7 APÊNDICE

Tabela 16: Medidas descritivas das concentrações de frutossamina, hemoglobina glicada e glicose nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Grupo		Glicose (mg/dL)	Hemoglobina Glicada (%)	Frutossamina (mg/dL)
Controle	Média	88	6,0	2,31
	DP	10	0,9	0,27
	Mínimo	74	5,0	1,93
	Máximo	108	7,9	2,92
	Assimetria	0,46	0,96	0,90
	Curtose	-0,83	0,23	1,27
IG	Média	109	6,7	2,06
	DP	10	1,1	0,42
	Mínimo	91	4,8	1,31
	Máximo	132	10,7	4,00
	Assimetria	0,24	1,59	2,94
	Curtose	-0,36	5,35	14,46
DMII	Média	165	8,5	4,57
	DP	66	1,9	2,76
	Mínimo	74	5,3	1,31
	Máximo	369	16,3	12,83
	Assimetria	1,19	1,06	1,60
	Curtose	1,08	1,86	1,92

Tabela 17: Medidas descritivas das concentrações de Colesterol total, Triglicérides, LDL-colesterol, HDL-colesterol, VLDL-colesterol e a razão LDL-colesterol/HDL-colesterol nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Grupo		Colesterol Total (mg/dL)	Triglicérides (mg/dL)	LDL- colesterol (mg/dL)	HDL- colesterol (mg/dL)	VLDL- colesterol (mg/dL)	LDL- colesterol / HDL- colesterol
Controle	<i>Média</i>	197	105	116	60	21	2,15
	<i>DP</i>	30	55	25	21	11	0,88
	<i>Mínimo</i>	146	43	76	34	9	0,92
	<i>Máximo</i>	242	217	152	118	43	3,74
	<i>Assimetria</i>	-0,19	0,85	-0,12	2,03	0,89	0,31
	<i>Curtose</i>	-0,73	-0,19	-1,26	5,90	-0,26	-1,03
IG	<i>Média</i>	222	195	133	50	39	2,79
	<i>DP</i>	35	106	32	11	21	0,85
	<i>Mínimo</i>	156	72	85	29	15	1,35
	<i>Máximo</i>	311	536	224	75	107	4,66
	<i>Assimetria</i>	1,00	1,76	1,04	0,54	1,80	0,62
	<i>Curtose</i>	1,29	3,66	1,51	-0,11	3,62	-0,23
DMII	<i>Média</i>	215	198	130	43	39	3,24
	<i>DP</i>	49	92	42	13	18	1,41
	<i>Mínimo</i>	77	47	33	18	9	0,94
	<i>Máximo</i>	362	447	272	80	89	8,74
	<i>Assimetria</i>	0,33	0,86	0,42	0,30	0,84	0,89
	<i>Curtose</i>	0,45	0,22	0,41	0,12	0,22	1,32

Tabela 18: Medidas descritivas das concentrações de dimetilarginina assimétrica (ADMA), dimetilarginina simétrica (SDMA), L-arginina e a razão entre ADMA e L-arginina nos grupos Controle, Intolerante à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Grupo		ADMA (μM)	SDMA (μM)	L-arginina (μM)	L-arginina / ADMA
Controle	Média	0,72	0,55	33,6	49,4
	DP	0,15	0,12	7,3	17,4
	Mínimo	0,53	0,43	24,8	28,8
	Máximo	0,94	0,71	49,7	91,4
	Assimetria	0,38	0,57	0,98	1,34
	Curtose	-1,52	-1,63	0,51	1,93
IG	Média	0,96	0,69	49,6	53,71
	DP	0,29	0,17	16,8	17,0
	Mínimo	0,49	0,42	19,0	27,6
	Máximo	1,65	1,07	83,9	96,7
	Assimetria	0,21	0,50	0,12	0,73
	Curtose	-0,44	-0,63	-0,64	0,35
DMII	Média	1,08	0,94	51,7	55,5
	DP	0,53	0,58	18,4	29,6
	Mínimo	0,34	0,38	24,2	18,5
	Máximo	2,90	3,16	96,3	225,1
	Assimetria	1,42	2,01	0,52	2,53
	Curtose	1,62	3,63	-0,42	10,67

Tabela 19: Medidas descritivas das concentrações de NOx (nitrato + nitrito), nitrotirosina, e S-nitrosotióis (RSNO) nos grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Grupo		NOx (μM)	Nitrotirosina (nM)	RSNO (nM)
Controle	Média	26,6	261	78
	DP	6,2	74	46
	Mínimo	17,7	162	16
	Máximo	34,5	435	150
	Assimetria	0,03	0,92	0,07
	Curtose	-1,78	1,74	-1,14
IG	Média	35,3	352	138
	DP	12,9	104	45
	Mínimo	12,0	189	65
	Máximo	59,7	615	232
	Assimetria	0,26	0,58	0,15
	Curtose	-0,70	0,04	-0,93
DMII	Média	39,2	472	144
	DP	18,0	231	73
	Mínimo	0,00	126	23
	Máximo	87,3	1494	397
	Assimetria	0,76	1,84	1,41
	Curtose	0,05	5,58	2,34

Tabela 20: Medidas descritivas das concentrações de homocisteína, cisteína e metionina nos grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Grupo		Homocisteína (μM)	Cisteína (μM)	Metionina (μM)
Controle	Média	9,3	177	28,9
	DP	5,3	25	8,2
	Mínimo	3,8	127	18,7
	Máximo	19,7	215	40,4
	Assimetria	0,83	-0,41	0,28
	Curtose	-0,56	-0,15	-1,60
IG	Média	14,1	225	38,7
	DP	10,3	79	18,1
	Mínimo	1,5	84	11,5
	Máximo	37,6	336	101,1
	Assimetria	0,67	-0,22	1,44
	Curtose	-0,73	-1,18	3,28
DMII	Média	9,4	198	29,8
	DP	6,1	59	16,1
	Mínimo	2,4	62	12,
	Máximo	30,0	335	89,6
	Assimetria	1,54	0,58	1,83
	Curtose	2,46	0,00	3,74

Tabela 21: Medidas descritivas das concentrações de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e GSH/GSSG nos grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Grupo		GSH (μM)	GSSG (μM)	GSH / GSSG
Controle	Média	5,80	0,53	11,26
	DP	1,94	0,18	2,83
	Mínimo	2,66	0,35	7,49
	Máximo	9,17	0,92	15,05
	Assimetria	0,59	0,84	0,01
	Curtose	0,08	0,35	-1,49
IG	Média	5,41	0,92	8,99
	DP	2,41	0,64	7,43
	Mínimo	2,34	0,12	2,01
	Máximo	10,62	2,55	32,41
	Assimetria	0,94	1,16	2,03
	Curtose	-0,46	0,90	4,14
DMII	Média	4,26	1,03	5,27
	DP	1,67	0,58	3,89
	Mínimo	1,27	0,21	2,05
	Máximo	9,04	3,76	24,41
	Assimetria	0,62	1,55	2,40
	Curtose	-0,09	4,35	6,73

Tabela 22: Medidas descritivas da atividade enzimática da n-acetil- β -glucosaminidase (NAGase) nos grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Grupo	NAGase (U/L)	
Controle	Média	21,7
	DP	3,9
	Mínimo	17,6
	Máximo	30,2
	Assimetria	1,47
	Curtose	1,44
IG	Média	28,0
	DP	7,3
	Mínimo	17,8
	Máximo	53,7
	Assimetria	2,05
	Curtose	6,19
DMII	Média	29,4
	DP	8,7
	Mínimo	10,9
	Máximo	51,8
	Assimetria	0,51
	Curtose	-0,34

Tabela 23: Resultados da comparação entre os grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII) quanto a cada uma das variáveis de interesse.

Variável	Nível descritivo
Colesterol Total (mg/dL)	0,131
Triglicérides (mg/dL)	0,005
LDL-colesterol (mg/dL)	0,259
HDL-colesterol (mg/dL)	0,001
VLDL-colesterol (mg/dL)	0,005
LDL-colesterol / HDL-colesterol	0,001
NAGase (U/L)	0,001
NOx (uM)	0,002
RSNO (nM)	0,006
Nitrotirosina (nM)	0,001
GSH / GSSG	0,001
GSSG (uM)	0,004
GSH (uM)	0,007
Homocisteína (uM)	0,014
Cisteína (uM)	0,022
Metionina (uM)	0,024
L-arginina / ADMA	0,732
L-arginina (uM)	0,001
SDMA (uM)	0,001
ADMA (uM)	0,001
Frutosamina (mg/dL)	0,001
Hemoglobina Glicada (%)	0,001
Glicose (mg/dL)	0,001

Tabela 24: Comparações das variáveis entre os grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG) e Diabetes Mellitus tipo II (DMII).

Variável	Grupos controlados		Nível descritivo	Variável	Grupos controlados		Nível descritivo
Triglicérides (mg/dL)	Controle	IG	0,013	VLDL-colesterol (mg/dL)	Controle	IG	0,015
	Controle	DMII	0,004		Controle	DMII	0,004
	IG	DMII	0,999		IG	DMII	0,999
HDL-colesterol (mg/dL)	Controle	IG	0,072	RSNO (nM)	Controle	IG	0,027
	Controle	DMII	0,001		Controle	DMII	0,005
	IG	DMII	0,070		IG	DMII	0,999
LDL-colesterol / HDL-colesterol	Controle	IG	0,105	Metionina (uM)	Controle	IG	0,231
	Controle	DMII	0,004		Controle	DMII	0,999
	IG	DMII	0,084		IG	DMII	0,024
NAGase (U/L)	Controle	IG	0,002	Cisteína (uM)	Controle	IG	0,010
	Controle	DMII	0,001		Controle	DMII	0,083
	IG	DMII	0,665		IG	DMII	0,179
NOx (uM)	Controle	IG	0,013	L-arginina (uM)	Controle	IG	0,001
	Controle	DMII	0,001		Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,382		IG	DMII	0,822
Nitrotirosina (nM)	Controle	IG	0,009	SDMA (uM)	Controle	IG	0,011
	Controle	DMII	0,001		Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,001		IG	DMII	0,001
GSH / GSSG	Controle	IG	0,316	ADMA (uM)	Controle	IG	0,003
	Controle	DMII	0,001		Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,027		IG	DMII	0,251
GSSG (uM)	Controle	IG	0,010	Frutosamina (mg/dL)	Controle	IG	0,071
	Controle	DMII	0,001		Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,637		IG	DMII	0,001
GSH (uM)	Controle	IG	0,852	Hemoglobina Glicada (%)	Controle	IG	0,152
	Controle	DMII	0,021		Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,041		IG	DMII	0,001
Homocisteína (uM)	Controle	IG	0,113	Glicose (mg/dL)	Controle	IG	0,001
	Controle	DMII	0,995		Controle	DMII	0,001
	IG	DMII	0,048		IG	DMII	0,001

Tabela 25: Medidas descritivas das concentrações de frutossamina, hemoglobina glicada e glicose nos grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG), Diabetes Mellitus sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus com evento cardiovascular (DMII com ECV).

Grupo		Glicose (mg/dL)	Hemoglobina Glicada (%)	Frutossamina (mg/dL)
Controle	Média	89	6,0	2,31
	DP	10	0,9	0,27
	Mínimo	74	5,0	1,93
	Mínimo	108	7,9	2,92
	Assimetria	0,46	0,96	0,90
	Curtose	-0,83	0,23	1,27
IG	Média	109	6,7	2,06
	DP	10	1,1	0,42
	Mínimo	91	4,8	1,31
	Mínimo	132	10,7	4,00
	Assimetria	0,24	1,59	2,94
	Curtose	-0,36	5,35	14,46
DMII sem ECV	Média	164	8,5	5,00
	DP	59	1,9	2,95
	Mínimo	74	5,3	1,31
	Mínimo	343	16,3	12,83
	Assimetria	1,01	1,22	1,30
	Curtose	1,06	2,60	0,89
DMII com ECV	Média	170	8,6	3,01
	DP	88	1,9	0,84
	Mínimo	85	5,8	2,02
	Mínimo	369	12,2	5,54
	Assimetria	1,27	0,49	1,45
	Curtose	0,27	-0,69	3,04

Tabela 26: Medidas descritivas das concentrações de Colesterol total, Triglicérides, LDL-colesterol, HDL-colesterol, VLDL-colesterol e a razão de LDL-colesterol e HDL-colesterol nos grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG), Diabetes Mellitus sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus com evento cardiovascular (DMII com ECV).

Grupo		Colesterol Total (mg/dL)	Triglicérides (mg/dL)	LDL- colesterol (mg/dL)	HDL- colesterol (mg/dL)	VLDL- colesterol (mg/dL)	LDL- colesterol / HDL- colesterol
Controle	Média	197	104	116	60	21	2,15
	DP	29	55	25	21	11	0,88
	Mínimo	146	43	76	34	9	0,92
	Máximo	242	217	152	118	43	3,74
	Assimetria	-0,19	0,85	-0,12	2,03	0,89	0,31
	Curtose	-0,73	-0,19	-1,26	5,90	-0,26	-1,03
IG	Média	221	195	133	50	39	2,79
	DP	35	106	32	11	21	0,85
	Mínimo	156	72	85	29	15	1,35
	Máximo	311	536	224	75	107	4,66
	Assimetria	1,00	1,76	1,04	0,54	1,80	0,62
	Curtose	1,29	3,66	1,51	-0,11	3,62	-0,23
DMII sem ECV	Média	216	200	130	45	40	3,05
	DP	50	95	44	12	19	1,20
	Mínimo	77	47	33	20	9	0,94
	Máximo	362	447	272	80	89	5,83
	Assimetria	0,29	0,76	0,48	0,33	0,77	0,35
	Curtose	0,46	0,04	0,37	0,20	0,02	-0,42
DMII com ECV	Média	208	188	129	37	37	3,92
	DP	41	80,07	36	11	14	1,86
	Mínimo	149	100	50	18	20	1,64
	Máximo	301	386	201	56	77	8,74
	Assimetria	0,37	1,39	-0,06	0,02	1,10	0,86
	Curtose	-0,27	1,78	0,39	-1,03	1,27	0,46

Tabela 27: Medidas descritivas das concentrações de dimetilarginina assimétrica (ADMA), dimetilarginina simétrica (SDMA), L-arginina e a razão entre ADMA e L-arginina nos grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG), Diabetes Mellitus sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus com evento cardiovascular (DMII com ECV).

Grupo		ADMA (uM)	SDMA (uM)	L-arginina (uM)	L-arginina / ADMA
Controle	Média	0,72	0,55	33,6	49,3
	DP	0,15	0,12	7,3	17,4
	Mínimo	0,53	0,43	24,8	28,8
	Mínimo	0,94	0,71	49,7	91,3
	Assimetria	0,38	0,57	0,98	1,34
	Curtose	-1,52	-1,63	0,51	1,93
IG	Média	0,96	0,69	49,6	53,7
	DP	0,29	0,17	16,8	16,9
	Mínimo	0,49	0,42	18,9	27,6
	Mínimo	1,65	1,07	83,9	96,6
	Assimetria	0,21	0,50	0,12	0,73
	Curtose	-0,44	-0,63	-0,64	0,35
DMII sem ECV	Média	1,06	1,01	52,7	58,9
	DP	0,57	0,63	18,9	31,7
	Mínimo	0,34	0,38	25,6	18,4
	Mínimo	2,90	3,16	96,3	225,1
	Assimetria	1,53	1,73	0,51	2,32
	Curtose	1,69	2,24	-0,53	9,27
DMII com ECV	Média	1,15	0,69	48,0	43,4
	DP	0,38	0,21	16,2	15,5
	Mínimo	0,56	0,41	24,2	30,7
	Mínimo	1,81	1,16	85,53	105,3
	Assimetria	0,35	0,44	0,38	3,44
	Curtose	-1,20	-0,32	-0,25	13,74

Tabela 28: Medidas descritivas das concentrações de NOx (nitrato + nitrito), nitrotirosina, e S-nitrosotióis (RSNO) nos grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG), Diabetes Mellitus sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus com evento cardiovascular (DMII com ECV).

Grupo		NOx (uM)	Nitrotirosina (nM)	RSNO (nM)
Controle	Média	26,6	261	78
	DP	6,2	74	46
	Mínimo	17,7	162	16
	Mínimo	34,5	435	150
	Assimetria	0,03	0,92	0,07
	Curtose	-1,78	1,74	-1,14
IG	Média	35,3	352	138
	DP	12,9	104	45
	Mínimo	12,0	189	65
	Mínimo	59,7	615	232
	Assimetria	0,26	0,58	0,15
	Curtose	-0,70	0,04	-0,93
DMII sem ECV	Média	35,9	486	148
	DP	17,2	256	78
	Mínimo	0,0	126	37
	Mínimo	87,3	1494	397
	Assimetria	1,04	1,58	1,43
	Curtose	0,91	3,93	1,94
DMII com ECV	Média	51,0	422	127
	DP	16,0	80	53
	Mínimo	27,6	255	23
	Mínimo	81,0	573	235
	Assimetria	0,42	-0,21	0,04
	Curtose	-0,61	0,02	-0,08

Tabela 29: Medidas descritivas das concentrações de homocisteína, cisteína e metionina nos grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG), Diabetes Mellitus sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus com evento cardiovascular (DMII com ECV).

Grupo		Homocisteína (uM)	Cisteína (uM)	Metionina (uM)
Controle	Média	9,2	177	28,9
	DP	5,2	25	8,2
	Mínimo	3,8	127	18,7
	Mínimo	19,7	215	40,4
	Assimetria	0,83	-0,41	0,28
	Curtose	-0,56	-0,15	-1,60
IG	Média	14,1	225	38,7
	DP	10,2	78	18,1
	Mínimo	1,4	83	11,5
	Mínimo	37,5	336	101,0
	Assimetria	0,67	-0,22	1,44
	Curtose	-0,73	-1,18	3,28
DMII sem ECV	Média	9,6	202	29,7
	DP	5,9	61	15,9
	Mínimo	2,5	62	12,0
	Mínimo	30,0	335	89,6
	Assimetria	1,59	0,47	2,08
	Curtose	2,78	-0,15	5,21
DMII com ECV	Média	8,6	182	30,3
	DP	6,5	44	16,7
	Mínimo	2,4	123	14,9
	Mínimo	27,8	277	65,2
	Assimetria	1,60	0,72	1,10
	Curtose	2,60	-0,27	-0,44

Tabela 30: Medidas descritivas das concentrações de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e GSH/GSSG nos grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG), Diabetes Mellitus sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus com evento cardiovascular (DMII com ECV).

Grupo		GSH (uM)	GSSG (uM)	GSH / GSSG
Controle	Média	5,80	0,53	11,26
	DP	1,94	0,18	2,83
	Mínimo	2,66	0,35	7,49
	Mínimo	9,17	0,92	15,05
	Assimetria	0,59	0,84	0,01
	Curtose	0,08	0,35	-1,49
IG	Média	5,41	0,92	8,99
	DP	2,41	0,64	7,43
	Mínimo	2,34	0,12	2,01
	Mínimo	10,62	2,55	32,41
	Assimetria	0,94	1,16	2,03
	Curtose	-0,46	0,90	4,14
DMII sem ECV	Média	4,43	1,06	5,53
	DP	1,57	0,61	4,04
	Mínimo	1,82	0,21	2,05
	Mínimo	9,04	3,76	24,41
	Assimetria	0,69	1,55	2,32
	Curtose	0,03	4,07	6,41
DMII com ECV	Média	3,66	0,95	4,33
	DP	1,91	0,42	3,21
	Mínimo	1,27	0,35	2,06
	Mínimo	8,22	1,95	16,25
	Assimetria	0,96	0,72	2,95
	Curtose	0,31	0,09	9,72

Tabela 31: Medidas descritivas da atividade enzimática da n-acetil- β -glucosaminidase (NAGase) nos grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG), Diabetes Mellitus sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus com evento cardiovascular (DMII com ECV).

Grupo		NAGase (U/L)
Controle	Média	21,7
	DP	3,9
	Mínimo	17,6
	Mínimo	30,2
	Assimetria	1,47
	Curtose	1,44
IG	Média	28,0
	DP	7,3
	Mínimo	17,8
	Mínimo	53,7
	Assimetria	2,05
	Curtose	6,19
DMII sem DAC	Média	28,1
	DP	7,8
	Mínimo	10,9
	Mínimo	49,7
	Assimetria	0,53
	Curtose	-0,19
DMII com DAC	Média	34,0
	DP	10,3
	Mínimo	16,4
	Mínimo	51,8
	Assimetria	-0,03
	Curtose	-0,80

Tabela 32: Resultados da comparação entre os grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG), Diabetes Mellitus sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus com evento cardiovascular (DMII com ECV) quanto a cada uma das variáveis de interesse.

<i>Variável</i>	<i>Nível descritivo</i>
Colesterol Total (mg/dL)	0,398
Triglicérides (mg/dL)	0,013
LDL-colesterol (mg/dL)	0,652
HDL-colesterol (mg/dL)	0,001
VLDL-colesterol (mg/dL)	0,012
LDL-colesterol / HDL-colesterol	0,002
NAGase (U/L)	0,001
NOx (uM)	0,001
RSNO (nM)	0,009
Nitrotirosina (nM)	0,001
GSH / GSSG	0,001
GSSG (uM)	0,010
GSH (uM)	0,001
Homocisteína (uM)	0,139
Cisteína (uM)	0,207
Metionina (uM)	0,060
L-arginina / ADMA	0,122
L-arginina (uM)	0,004
SDMA (uM)	0,001
ADMA (uM)	0,032
Frutosamina (mg/dL)	0,001
Hemoglobina Glicada (%)	0,001
Glicose (mg/dL)	0,001

Tabela 33: Comparações das variáveis entre os grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG), Diabetes Mellitus sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus com evento cardiovascular (DMII com ECV).

Variável	Grupos comparados		Nível descritivo
Triglicérides (mg/dL)	Controle	IG	0,028
	Controle	DMII sem DAC	0,007
	Controle	DMII com DAC	0,088
	IG	DMII sem DAC	0,999
	IG	DMII com DAC	0,999
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,999
HDL-colesterol (mg/dL)	Controle	IG	0,126
	Controle	DMII sem DAC	0,003
	Controle	DMII com DAC	0,001
	IG	DMII sem DAC	0,703
	IG	DMII com DAC	0,003
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,046
VLDL-colesterol	Controle	IG	0,030
	Controle	DMII sem DAC	0,006
	Controle	DMII com DAC	0,087
	IG	DMII sem DAC	0,999
	IG	DMII com DAC	0,999
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,999
LDL-colesterol / HDL-colesterol	Controle	IG	0,214
	Controle	DMII sem DAC	0,048
	Controle	DMII com DAC	0,001
	IG	DMII sem DAC	0,999
	IG	DMII com DAC	0,107
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,158
Glicose (mg/dL)	Controle	IG	0,327
	Controle	DMII sem DAC	0,001
	Controle	DMII com DAC	0,001
	IG	DMII sem DAC	0,001
	IG	DMII com DAC	0,001
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,999
Hemoglobina Glicada (%)	Controle	IG	0,851
	Controle	DMII sem DAC	0,001
	Controle	DMII com DAC	0,001
	IG	DMII sem DAC	0,001
	IG	DMII com DAC	0,001
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,999
Frutosamina (mg/dL)	Controle	IG	0,999
	Controle	DMII sem DAC	0,001
	Controle	DMII com DAC	0,709
	IG	DMII sem DAC	0,001
	IG	DMII com DAC	0,015
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,001

Tabela 34: Comparações das variáveis entre os grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG), Diabetes Mellitus sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus com evento cardiovascular (DMII com ECV).

Variável	Grupos comparados		Nível descritivo
NOx (nM)	Controle	IG	0,601
	Controle	DMII sem DAC	0,336
	Controle	DMII com DAC	0,001
	IG	DMII sem DAC	0,999
	IG	DMII com DAC	0,003
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,001
Nitrotirosina (nM)	Controle	IG	0,225
	Controle	DMII sem DAC	0,001
	Controle	DMII com DAC	0,006
	IG	DMII sem DAC	0,040
	IG	DMII com DAC	0,470
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,999
RSNO(nM)	Controle	IG	0,053
	Controle	DMII sem DAC	0,005
	Controle	DMII com DAC	0,247
	IG	DMII sem DAC	0,999
	IG	DMII com DAC	0,999
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,999
GSH (uM)	Controle	IG	0,999
	Controle	DMII sem DAC	0,157
	Controle	DMII com DAC	0,002
	IG	DMII sem DAC	0,230
	IG	DMII com DAC	0,001
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,056
GSSG (uM)	Controle	IG	0,558
	Controle	DMII sem DAC	0,013
	Controle	DMII com DAC	0,082
	IG	DMII sem DAC	0,356
	IG	DMII com DAC	0,999
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,999
GSH/GSSG	Controle	IG	0,131
	Controle	DMII sem DAC	0,001
	Controle	DMII com DAC	0,001
	IG	DMII sem DAC	0,004
	IG	DMII com DAC	0,001
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,749
Metionina (uM)	Controle	IG	0,469
	Controle	DMII sem DAC	0,999
	Controle	DMII com DAC	0,999
	IG	DMII sem DAC	0,058
	IG	DMII com DAC	0,398
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,999

Tabela 35: Comparações das variáveis entre os grupos Controles, Intolerantes à Glicose (IG), Diabetes Mellitus sem evento cardiovascular (DMII sem ECV) e Diabetes Mellitus com evento cardiovascular (DMII com ECV).

<i>Variável</i>	<i>Grupos comparados</i>		<i>Nível descritivo</i>
ADMA (uM)	Controle	IG	0,364
	Controle	DMII sem DAC	0,131
	Controle	DMII com DAC	0,020
	IG	DMII sem DAC	0,999
	IG	DMII com DAC	0,714
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,881
SDMA (uM)	Controle	IG	0,646
	Controle	DMII sem DAC	0,001
	Controle	DMII com DAC	0,883
	IG	DMII sem DAC	0,010
	IG	DMII com DAC	0,999
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,032
L-arginina (uM)	Controle	IG	0,027
	Controle	DMII sem DAC	0,002
	Controle	DMII com DAC	0,082
	IG	DMII sem DAC	0,999
	IG	DMII com DAC	0,999
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,999
NAGase (U/L)	Controle	IG	0,059
	Controle	DMII sem DAC	0,040
	Controle	DMII com DAC	0,001
	IG	DMII sem DAC	0,999
	IG	DMII com DAC	0,165
	DMII sem DAC	DMII com DAC	0,053

ANEXOS

8 ANEXOS

ANEXO 1: Informações para os Membros de Banca Julgadora de Doutorado encaminhado pela CPG/FCF/USP

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

Presidente da CPG/FCF/USP
**ANEXO 2: Documento de Aprovação do Comitê de Ética do Instituto
 Dante Pazzanese de Cardiologia**

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
 COORDENADORIA DE SAÚDE DA REGIÃO
 METROPOLITANA DA GRANDE SÃO PAULO
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
 AV. DR. DANTE PAZZANESE, 500 - PRÉDIO EMACKSON D. DIRAPURA, 04012-100, S.P.
 FONE: (11) 5085-4000 - FAX: (11) 5579-7474

FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP -

DATA DA ENTRADA: 20 de Maio de 2002

N.º DO PROTOCOLO NO CEP: 3094/2002

DESTIN. DEVE SER CLARAS NAS CORRESPONDÊNCIAS REFERENTES A ESTE PROJETO.

INVESTIGADORES PRINCIPAIS: Dr. Marcelo Chiara Bertolami / Dr. André Arpad Falud

TÍTULO DO PROJETO: "Avaliação dos Metabólitos do Óxido Nítrico, Inibidores Endógenos da Óxido Nítrico Sintase e Homocisteína do Diabetes e na Intolerância à Glicose."

O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou o Protocolo de Estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declarando que as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais das resoluções CNS 196/96 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Solicitamos que enviem relatórios periódicos no decorrer da pesquisa, informando através de relatório final dos resultados obtidos.

Situação: Projeto Aprovado

São Paulo, 20 de Maio de 2002

MEMBROS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DR. PEDRO SILVIO FARSKY	PRESIDENTE
ENFa. FERNANDA ANAJAS CALDAS FARIAS	SECRETÁRIA
ENFa. CÉLIA HIROMI SHIOITSU	MEMBRO EFETIVO
Dr. CLÁUDIA GRAVINA TADDEI	MEMBRO EFETIVO
Dr. CLARISSE OGAWA INOJO DO BRASIL	MEMBRO EFETIVO
DR. JOÃO MANOEL ROSSI NETO	MEMBRO EFETIVO
ENG. EDDIE LUÍS ALONSO JR.	MEMBRO EFETIVO
SR. PETERNEY NEVES DA SILVA	MEMBRO EFETIVO

Dr. Pedro Silvio Farsky
 PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARDH, C.D., AGARDH, E., ANDERSSON, A. Lack of association between plasma homocysteine levels and microangiopathy in type 1 diabetes mellitus. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v.54, p.637-41, 1994.
- ARAKI, A., SAKO, Y., ITO, H. Plasma homocysteine concentrations in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of parenteral methylcobalamin treatment. *Atherosclerosis*, v.103, p.149-57, 1993.
- AZUMA, H., SATO, J., HAMASAKI, H., SUGIMOTO, A., ISOTANI, E., OBAYASHI, S. Accumulation of endogenous inhibitors for nitric oxide synthesis and decreased content of L-arginine in regenerated endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*, v.115, p.1001-1004, 1995.
- BALAZY, M., KAMINSKI, P.M., MAO, K.; TAN, J., WOLIN, M.S. S-Nitroglutathione, a product of the reaction between peroxynitrite and glutathione that generates nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, p.273, n.48, p.3209-15, 1998.
- BALIGA, B.S., REYNOLDS, T., FINK, L.M., FONSECA, V.A. Hyperhomocysteinemia in type 2 diabetes mellitus: cardiovascular risk factors and effect of treatment with folic acid and pyridoxine. *Endocr. Pract.*, v.6, n.6, p.435-41, 2000.
- BALINT B., KHARITONOV S.A., HANAZAWA T., DONNELLY L.E., SHAH P.L., HODSON M.E., BARNES P.J. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Eur Respir J.* v. 17(6), p. 1201-7, 2001.
- BARDELL, A.L., MACLEOD, K.M. Evidence for inducible nitric-oxid synthase expression and activity in vascular smooth muscle of streptozotocin-diabetic rats. *J. Pharmacol & Exper. Therap.*, v.296, p.252-59, 2001.
- BAR-ON, H., KIDRON, M., FRIEDLANDER, Y., BEN-YEHUDA, A., SELHUB, J., ROSENBERG, I.H., FRIEDMAN, G. Plasma total homocysteine levels in subjects with hyperinsulinemia. *J. Intern. Med.*, v.247, n.2, p.287-94, 2000.
- BECKMAN, J.S., BECKMAN, T.W., CHEN, J., MARSHALL, P.A., FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.87, n.4, p.1620-4, 1990.

- BÖGER, R.H., BODE-BÖGER, S.M., FRÖLICH, J.C. The L-arginine - nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications. *Atherosclerosis* v.127, p.1-11, 1996.
- BÖGER, R.H., BODE-BÖGER, S.M., THIELE, W., JUNKER, W., ALEXANDER, K., FRÖLICH, J.C. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*, v.95, p.2068-2074, 1997.
- BÖGER, R.H., SYDOW, K., BORLAK, J., THUM, T., LENZEN, H., SCHUBERT, B., TSIKAS, D., BODE-BÖGER, S.M. LDL Cholesterol Upregulates Synthesis of Asymmetrical Dimethylarginine in Human Endotelial Cells – involvement of S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases. *Circulation Research*, v.87, p.99-105, 2000.
- BOSTOM, A.G., LATHROP, L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease (ESRD): prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int.*, v.52. p.10-20, 1997.
- BROWNLEE M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. v. 54(6), p. 1615-25, 2005.
- CALO, L., SARTORE, G., BASSI, A., BASSO, C., BERTOCCO, S., MARIN, R., ZAMBON, S., CANTARO, S., D'ANGELO, A., DAVIS, P.A., MANZATO, E., CREPALDI, G. Reduced susceptibility to oxidation of low-density lipoprotein in patients with overproduction of nitric oxide (Bartter's and Gitelman's syndrome). *Journal of Hypertension*, v.16, n.7, p.1001-1008, 1998.
- CAMERON N.E., COTTER M.A., BASSO M., HOHMAN T.C. Comparison of the effects of inhibitors of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase on neurovascular function, nerve conduction and tissue polyol pathway metabolites in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*. v. 40(3), p. 271-81, 1997.
- CANNON, R.O.; SCHECHETER, A.N.; PANZA, J.A.; OGNIBENE, F.P.; SHELHAMER, J.H. Effects of inhaled nitric oxide on regional blood flow are consistent with intravascular nitric oxide delivery. *The Journal of Clinical Investigation*, v.108, p.279-87, 2001.

- CAUSSE, E., SIRI, N., ARNAL, J.F., BAYLE, C., MALATRAY, P., VALDIGUIE, P., SALVAYRE, R., COUDERC, F. Determination of asymmetrical dimethylarginine by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, v.741, n.1, p.77-83, 2000.
- CERIELLO, A., MOTZ, E. Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes Care*, v.8, p. 1439-43, 2002.
- CHAKMAKJIAN, G.J. Endocrinology. In Race GJ, ed. Laboratory medicine. Philadelphia:Haper & Row, p.1-3, 1982.
- CHAN, J.R., BÖGER, R.H., BODE-BÖGER, S.M., TANGPHAO, O., TSAO, P.S., BLASCHKE, T.F., COOKE, J.P. Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v.20, p.1040-1046, 2000.
- CHARKE, R., DALY, L., ROBINSON, K. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N. Engl. J. Med.*, v.324, p.1149-1155, 1991.
- CHIARELLI, F., POMILIO, M., MOHN, A., TUMINI, S., VANELLI, M., MORGESE, G., SPAGNOLI, A., VERROTTI, A. Homocysteine levels during fasting and after methionine loading in adolescents with diabetic retinopathy and nephropathy. *J. Pediatr.*, v.137, n.3, p.386-92, 2000.
- CHISHOLM, D.J., CAMPBELL, L.V., KRAEGEN, E.W. Pathogenesis of the insulin resistance syndrome (syndrome X). *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v.24, n.9-10, p.782-4, 1997.
- COOKE, J.P. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v.20, n.9, p.2032-7, 2000.
- COOKE, J.P., DZAU, V.J. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular disease. *Circulation*, v.96, p.379-382, 1997.
- COSENTINO, F., LUSCHER, T.F. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, n.32, Suppl 3, p.S54-61, 1998.
- DASTUR, D.K., QUADROS, E.V., WADIA, N.H. Effect of vegetarianism and smoking on vitamin B12, thiocyanate, and folate levels in the blood of normal subjects. *Br. Med. J.*, v.3, p.260-63, 1972.
- DE LUIS D.A., FERNANDEZ N., ARRANZ M.L., ALLER R., IZAOLA O., ROMERO E. Total homocysteine levels relation with chronic complications of

- diabetes, body composition, and other cardiovascular risk factors in a population of patients with diabetes mellitus type 2. *J Diabetes Complications*, v.19, p.42-6, 2005.
- DENNIS V. W., ROBINSON K., Homocysteinemia and vascular disease in end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl.* v. 57, p. S11-7, 1996.
- EIZIRIK, D.L., SANDLER, S., WELSH, N., CETKOVIC-CVRLJE, M., NIEMAN, A., GELLER, D.A., PIPELEERS, D.G., BENDTZEN, K., HELLERSTROM, C. Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation. *J. Clin. Invest.*, v.93, n.5, p.1968-74, 1994.
- ELIAS, A.N., ENG, E. Homocysteine concentrations in patients with diabetes mellitus - relationship to microvascular and macrovascular disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v.7, p.117-21, 2005.
- EMOTO, M., KANDA, H., SHOJI, T., KAWAGISHI, T., KOMATSU, M., MORI, K., TAHARA, H., ISHIMURA, E., INABA, M., OKUNO, Y., NISHIZAWA, Y. Impact of insulin resistance and nephropathy on homocysteine in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, v.24, n.3, p.533-8, 2001.
- FARD, A., TUCK, C.H., DONIS, J.A., SCIACCA, R., DI TULLIO, M.R., WU, H.D., BRYANT, T.A., CHEN, N.T., TORRES-TAMAYO, M., RAMASAMY, R., BERGLUND, L., GINSBERG, H.N., HOMMA, S., CANNON, P.J. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v.20, n.9, p.2039-44, 2000.
- FARKAS, J., MENZEL, E.J. Proteins lose their nitric oxide stabilizing function after advanced glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1245, n.3, p.305-10, 1995.
- FICKLING, S.A., WILLIAMS, D., VALLANCE, P., NUSSEY, S.S., WHITLEY, G.St.J. Plasma concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *The Lancet.*, v.342, p.242-243, 1993.
- FINKELSTEIN, J.D., MARTIN, J.J., Homocysteine *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, v.32, n.4, p.385-9, 2000.
- FURCHGOTT, R.F. Introduction to EDRF research. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v.22, Suppl 7, p.S1-2, 1993.

- GABIR MM, HANSON RL, DABELEA D, IMPERATORE G, ROUMAIN J, BENNETT PH, KNOWLER WC. The 1997 American Diabetes Association and 1999 World Health Organization criteria for hyperglycemia in the diagnosis and prediction of diabetes. *Diabetes Care*; v.23, p.1108-12, 2000.
- GIRARD, P., POTIER, P. NO, thiols and disulfides. *FEBS Lett.*, v.320, p.7-8, 1993.
- GLUECK, C.J., SHAW, P., LANG, J.E., TRACY, T., SIEVE-SMITH, L., WANG, Y. Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients. *Am. J. Cardiol.*, v.75, p.132-136, 1995.
- GOLDSTEIN, M., LEIBOVITCH, I., YEFFIMOV, I., GAVENDO, S., LOEWENSTEIN, A. Hyperhomocysteinemia in patients with diabetes mellitus with and without diabetic. *Eye*, v.18, p.460-5, 2004.
- GRAHAM, A., HOGG, N., KALYANARAMAN, B., O'LEARY, V., DARLEY-USMAR, V., MONCADA, S. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett.*, v.330, n.2, p.181-5, 1993.
- GRIENDLING, K.K., ALEXANDER, R.W. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J.*, v.10, n.2, p.283-92, 1996.
- HADJIVASSILIOU, V., GREEN, M.H., JAMES, R.F., SWIFT, S.M., CLAYTON, H.A., GREEN, I.C. Insulin secretion, DNA damage, and apoptosis in human and rat islets of Langerhans following exposure to nitric oxide, peroxynitrite, and cytokines. *Nitric Oxide*, v.2, n.6, p.429-41, 1998.
- HAIJAR, K.A. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J. Clin. Invest.*, v.91, p.2873-79, 1993.
- HARPEL, P.C., CHANG, V.T., BORTH, W. Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhances the binding of lipoprotein (a) to fibrin: a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.89, p.10193-97, 1992.
- HAUSLADEN, A, STAMLER, J.S. Nitrosative stress. *Meth. Enzymol.*, v.300, p.389-395, 1999.
- HAYASHI, T., HONDA, G., SUZUKI, K. In atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Blood*, v.79, p.2930-36, 1992.

- HAYDEN, M.R., TYAGI, S. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: the pleiotropic effects of folate supplementation. *Nutrition Journal*, v.3, p.1-23, 2004.
- HAYES, L.W., GOGUEN, C.A., STEVENS, A.L. MAGARGAL, W.W., SLAKEY, L.L. Enzyme activities in endothelial cells and smooth muscle cells from swine aorta. *Pro. Natl. Acad. Sci*, v.76, p.2532-2535, 1979.
- HERRMANN W., SCHORR H., OBEID R., MAKOWSKI J., FOWLER B., KUHLMANN M.K. Disturbed homocysteine and methionine cycle intermediates S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine are related to degree of renal insufficiency in type 2 diabetes. *Clin Chem*, v.51, p.891-7, 2005.
- HIRANO, K., OGIHARA, T., MIKI, M., YASUDA, H., TAMAI, H., KAWAMURA, N., MINO, M. Homocysteine induces iron-catalyzed lipid peroxidation of low-density lipoprotein that is prevented by alpha-tocopherol. *Free Radic. Res.*, v.21, n.5, p.267-76, 1994.
- HOGG, N., DARLEY-USMAR, V.M., WILSON, M.T., MONCADA, S. The oxidation of α -tocopherol in human low-density lipoprotein by the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Febs Letters*, v.326, n.1-3, p.199-203, 1993.
- HOGG, N., DARLEY-USMAR, VM., GRAHAM, A., MONCADA, S. Peroxynitrite and atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.*, v.21, n.2, p.358-62, 1996.
- HOOGVEEN, E.K., KOSTENSE, P.J., JAKOBS, C., DEKKER, J.M., NIJPELS, G., HEINE, R.J., BOUTER, L.M., STEHOUWER CD. Hyperhomocysteinemia increases risk of death, especially in type 2 diabetes: 5-year follow-up of the Hoorn Study. *Circulation*, v.101, n.13, p.1506-11, 2000.
- HOOGVEEN, E.K., KOSTENSE, P.J., JAKOBS, C., RAUWERDA, J.A., DEKKER, J.M., NIJPELS, G., BOUTER, L.M., HEINE, R.J., STEHOUWER, C.D. Hyperhomocysteinaemia is not associated with isolated crural arterial occlusive disease: The Hoorn Study. *J. Intern. Med.*, v.247, n.4, p.442-8, 2000.
- IKENAGA, K.P., SUZUKI, H., ISHII, N., ITOH, H., SARUTA, T. Enzymuria in non-insulin-dependent patients: Signs of tubular cell dysfunction. *Clin Sci Colch*, v.84, p.469-75, 1993.

- INONE, T., MATSUNAGA, R., MOROOKA, S., UEHARA, Y. Serum N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity increases in association with insulin resistance in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, v.129,p117-22, 2000.
- ITO, A., TSAO, P.S., ADIMOOLAN, S., KIMOTO, M., OGAWA, T., COOKE, J.P. Novel mechanism for endothelial dysfunction (dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase). *Circulation*, v.99, p.3092-3095, 1999.
- JACOBS, R.L., HOUSE, J.D., BROSNAN, M.E., BROSNAN, J.T. Effects of streptozotocin-induced diabetes and of insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat. *Diabetes*, v.47, n.12, p.1967-70, 1998.
- JU, Y., ACKERBOOM, T.P.M., SIES, H., THOMS, J.A. S-Nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryls by S-nitrosoglutathione. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.362, p.67-78, 1999.
- JOHANSEN, J.S., HARRIS, A.K., RYCHLY, A.J., ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*, v.4, p.1-11, 2005.
- JONES, S.L., VIBERTI, G. Renal functional reserve in subjects with diabetes mellitus. *Semin. Nephrol.*, v.15, p.475-81, 1995.
- KAKIMOTO, Y., AKASAWA, S. Isolation and identification of N^G , N^G - and N^G , N^G -dimethylarginine, N^G -mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl- δ -hydroxylysine from human urine. *The Journal of Biological Chemistry*, v.245, p.5751-5758, 1970.
- KANG S.S., WONG, P. W.K., COOK, H.Y., NORUSIS, M., MESSER, J.V. Protein-bound homocysteine: a possible risk factor for coronary artery disease. *J. Clin. Invest.*, v.77, p.1482-1486, 1986.
- KANG, S.S. Treatment of hyperhomocyst(e)inemia: physiological basis. *J. Nutr.*, v.126, n.4(Suppl), p.1273S-5S, 1996.
- KANG, S.S., WONG, P.W., MALINOW, M.R. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu. Rev. Nutr.*, v.12, p.279-98, 1992.
- KASHIBA, M., KASAHARA, E., CHIEN, K.C., INOUE, M. Fates and vascular action of S-nitrosoglutathione and related compounds in the circulation. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.363, n.2, p.213-218, 1999.

- KELM M., SCHAFER S., DAHMANN R., DOLU B., PERINGS S., DECKING U.K., SCHRADER J., STRAUER B.E.. Nitric oxide induced contractile dysfunction is related to a reduction in myocardial energy generation. *Cardiovasc Res.* v. 36(2), p. 185-94, 1997.
- KHAN, J., BRENNAN, D.M., BRADLEY, N., GAO, B., RCKDORFER, R., JACOBS, M. 3-nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. *Biochem. J.*, v. 330, p.795-801, 1998.
- KOMOSINSKA-VASSEV K., OLCZYK K., KOZMA E.M., OLCZYK P., WISOWSKI G., WINSZ-SZCZOTKA K. Alterations of glycosaminoglycan metabolism in the development of diabetic complications in relation to metabolic control. *Clin Chem Lab Med.* v. 43(9), p. 924-9, 2005.
- KONUKOGLU D., DOGAN E., TURHAN M.S., HUSREV HATEMI H. Impaired glucose tolerance: its relevance to early endothelial dysfunction. *Horm Metab Res.* v. 35(10), p. 607-10, 2003.
- LAIGHT, D.W., CARRIER, M.J., ANGGARD, E.E. Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc. Res.*, v.47, n.3, p.457-64, 2000.
- LENTZ, S.R., SADLER, J.E. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein-C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J. Clin. Invest.*, v.88, p.1906-14, 1991.
- LENTZ. S.R., SOBEY, C.G., PIEGORS, D.J., BHOPATKAR, M.Y., FARACI, F.M., MALINOW, M.R., HEISTAD, D.D. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J. Clin. Invest.*, v.98, n.1, p.24-9, 1996.
- LI WP, LI W, YANG T. Relationship between plasma homocysteine and chronic complications in type 2 diabetes mellitus. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Ba.* v.25, p.349-50, 2005.
- LOPEZ-JARAMILLO, P., GONZALEZ, M.C., PALMER, R.M., MONCADA, S. The crucial role of physiological Ca²⁺ concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br. J. Pharmacol.*, v.101, n.2, p.489-93, 1990.
- MacALLISTER, R.J., WHITLEY, G.St.J., VALLANCE, P. Effects of guanidino and uremic compounds on nitric oxide pathways. *Kidney International*, v.45, p.737-742, 1994.

- MANNICK, J.B., HAUSLADEN, A., LIU, L., HESS, D.T., ZENG, M., MIAO, Q.X., KANE, L.S., GOW, A.J., STAMLER, J.S., Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*, v.284, p.651-654, 1999.
- MARLEY, R; FEELISCH, M.; HOLT, S.; MOORE, K. A. Chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols. *Free Radical Research*, v. 32, p. 1-9, 2000.
- MARTIN W, VILLANI GM, JOTHIANANDAN D, FURCHGOTT RF Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 232, p. 239-247, 1985.
- MATSUOKA H., ITOH S., KIMOTO M., KOHNO K., TAMAI O., WADA Y., YASUKAWA H., IWAMI G., OKUDA S., IMAIZUMI T. Asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in experimental hypertension *Hypertensio*, v. .29(1 Pt 2), p. 242-7, 1997.
- MAYER, E.L., JACOBSEN, D.W., ROBINSON, K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v.27, n.3, p.517-27, 1996.
- MCCARTY ,M.F. Longevity effect of chromium picolinate--'rejuvenation' of hypothalamic function? *Med. Hypotheses*, v.43, n.4, p.253-65, 1994.
- McCULLY K.S. Atherosclerosis, serum cholesterol and the homocysteine theory: a study of 194 consecutive autopsies. *Am. J. Med. Sci.*, v.299, n.4, p.217-21, 1990.
- McCULLY, K.S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.*, v.56, n.1, p.111-28, 1969.
- McDERMOTT, J.R. Studies on the catabolism of N^G-methylarginine, N^G, N^G-dimethylarginine and N^G, N^G-dimethylarginine in the rabbit. *Biochemistrat Journal*, v.154, p.179-184, 1976.
- McKeever, M.P., WEIR, D.G., MOLLOY, A., SCOTT, J.M., Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. *Clin. Sci.*, v.81, n.4, p.551-6, 1991.
- MINOR, J.R., MYERS, P.R., GUERRA, J.R., BATES, J.N., HARRISON, D.G. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta *J. Clin. Invest.*, v.86, p.2109-2116, 1990.

- MIYAZAKI, H., MATSUOKA, H., COOKE, J.P., USUI, M., UEDA, S., OKUDA, S., IMAIZUMI, T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor - a novel marker of atherosclerosis. *Circulation*, v.99, p.1141-1146, 1999.
- MOSHAGE H., KOK B., HUIZENGA, J. R., JANSEN, P. L. Nitrite and nitrate determination in plasma: a critical evaluation. *Clin. Chem.*, v. 41, p. 892-96, 1995.
- MUNSHI, M.N., STONE, A., FINK, L., FONSECA, V. Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with mon-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. *Metabolism.*, v.45, p.133-35, 1996.
- MUTUS, B., RABINI, R.A., STAFFOLANI, R., RICCIOTTI, R., FUMELLI, P., MORETTI, N., MARTARELLI, D., MAZZANTI, L. Homocysteine-induced inhibition of nitric oxide production in platelets: a study on healthy and diabetic subjects. *Diabetologia*, v.44, n.8, p.979-82, 2001.
- NAVA, E., LUSCHER, T.F. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. *J. Hypertens.*, v.13, n.2, p.S39-48, 1995.
- NYGARD, O., VOLLSET, S.E., REFSUM, H. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile: the Hordaland Homocysteine Study. *JAMA*, v.274, p.1526-1533, 1995.
- O'DONNELL, V.B., CHUMLEY, P.H., HOGG, N., BLOODSWORTH, A., DARLEY-USMAR, V.M., FREEMAN, B.A. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxyl radicals and comparison with α -tocopherol. *Biochemistry*, v.36, p.15216-15223, 1997.
- OHARA, A., GATTI, R.M., RADI, R. Spin-Trapping studies of peroxynitrite decomposition and of 3-morpholinocydonimine N-ethylcarbamide autooxidation: direct evidence for metal-independent formation of free radical intermediates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.310, n.1, p.118-125, 1994.
- PADRON, J., PEIRO, C., CERCAS, E., LLERGO, J.L., SANCHEZ-FERRER, C.F. Enhancement of S-nitrosylation in glycosylated hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.271, n.1, p.217-21, 2000.
- PINKNEY, J.H., STEHOUWER, C.D., COPPACK, S.W., YUDKIN, J.S. Endothelial dysfunction: cause of the insulin resistance syndrome. *Diabetes*, v.46, Suppl 2, p.S9-13, 1997.

- PIYTHILAKE, C.J., MACALUSO, M., HINE, R.J. Local and systemic effects of cigarette smoking on folate and vitamin B-12. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.60, p.559-66, 1994.
- RADI, R., SIMS, S., CASSINA, A., TURRENS, J.F. Roles of catalase and cytochrome c in hydroperoxide-dependent lipid peroxidation and chemiluminescence in rat heart and kidney mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, v.15, n.6, p.653-9, 1993.
- REAVEN, G.M. Are insulin resistance and/or compensatory hyperinsulinemia involved in the etiology and clinical course of patients with hypertension? *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, v.19, Suppl 1, p.S2-5, 1995.
- REES, M.M., RODGERS, G.M. Homocysteinemia: association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis. *Thromb. Res.*, v.71, p.337-359, 1993.
- REGLERO, A.; CABEZAS, J.A. Glycosidases of molluscs. *Eur. J. Biochem.*, V. 66, P. 379-87, 1976.
- RIMM, E.B., WILLETT, W.C., HU, F.B., SAMPSON, L., COLDITZ, G.A., MANSON J.E., HENNEKENS, C., STAMPFER, M.J. Folate and vitamin B₆ from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA*, v.279, p.359-364, 1998.
- RODGERS, G.M., CONN, M.T. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein-C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood*, v.75, p.895-901, 1990.
- RODGERS, G.M., KANE, W.H. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J. Clin. Invest.*, v.77, p.1909-16, 1986.
- RUBBO, H., RADI, R., TRUJILLO, M., TELLERI, R., KALYANARAMAN, B., BARNES, S., KIRK, M., FREEMAN, B.A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, v.269, n.42, p.26066-26075, 1994.
- SANCHEZ-HUESO, M.C., MATEO-CAAS, J., ZAMORA-MADARIA, E. Influence of glycemic blood glucose control and incipient diabetic nephropathy on the urinary excretion of N-acetyl-glucosaminidase (NAG) in diabetes. *An. Med. Interna*, v.12, p.216-20, 1995.

- SASAHARA, M.; HAZAMA, F.; AMANO, S.; HAYASE, Y. KATAOKA, H. Effect of hypertension on lysosomal enzyme activities in aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*, v70, p. 53-62, 1988.
- SKRHA, J., HILGERTOVA, J. Relationship of serum N-acetyl-beta-glucosaminidase activity to oxidative stress in diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta*, v.282,p.167-74, 1999.
- SKRHA, J., PRAZNY, M., HAAS, T., KVASNICKA, J., KALVODOVA, B. Comparison of laser-Doppler flowmetry with biochemical indicators of endothelial dysfunction related to early microangiopathy in type 1 diabetic patients. *J. Diabetes Complications*, v.15, p.234-40, 2001.
- SKRHA, J., PRAZNY, M., KVASNICKA, J., KALVODOVA, B. Changes in microcirculation and selected laboratory parameters in the early stages of diabetic microangiopathy. *Cas lek Cesk*, v.140, p.370-4, 2001a.
- SKRHA, J.; PRÁZNÝ, M., HILGERTOVÁ, J.; WEISEROVÁ H. Serum alpha-tocopherol and ascorbic acid concentrations in type 1 and type 2 diabetic patients with and without angiopathy. *Clinica Chimica Acta*, v. 329, p. 103-8, 2003.
- SKRHA, J; PERUSICOVÁ, J.; STOLBA, P.; STIBOR, V.; PÁV, J. Comparison of N-acetyl-β-glucosaminidase and albuminuria with clinical finding of microangiopathy in type I diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta*, v. 166, p. 135-41, 1987.
- SOO-SANG, K., WONG, P.W.K., COOK, H.Y., NORUSIS, M., MESSER, J.V. Protein-bound homocysteine. *J. Clin. Invest.*, v.77, p.1482-1486, 1986.
- STAMLER, J., VACCARO, O., NEATON, J.D., WENTWORTH, D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*, v.16, n.2, p.434-44, 1993.
- STAMLER, J.S., SINGEL, D.J., LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, v.18; n.258, p.1898-1902, 1992.
- STAMLER, J.S., SLIVKA, A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutr. Ver.*, v.54, p.1-30, 1996.
- STERN, M.P. Do non-insulin-dependent diabetes mellitus and cardiovascular disease share common antecedents? *Ann. Intern. Med.*, 1996 v.124, n.1, p.110-6, 1996.

- SUBAR, A.F., HARLN, L.C., MATTSON, M.E. Food and nutrient intake differences between smokers and non-smoker in the United States. *Am. J. Publ. Health*, v.80, p.1323-29, 1990.
- SYDOW, K., HORNIG, B., BOGER, R.H. Endothelial dysfunction in patients with peripheral arterial disease and chronic hyperhomocysteinemia: potential role of ADMA. *Vasc. Med.*, v.9, p.93-101, 2004.
- TAWAKOL, A., OMLAND, T., GERHARD, M., WU, J. T., CREAGER, M. A. Hyperhomocysteinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation*, v.95, p.1119-1121, 1997.
- TOJO, A., WELCH, W.J., BREMER, V., KIMOTO, M., KIMURA, K., OMATA, M., OGAWA, T., VALLANCE, P., WILCOX, C.S. Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney International*, v.52, p.1593-1601, 1997.
- TURKO I.V., LI L., AULAK K.S., STUEHR D.J., CHANG J.Y., MURAD F. Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes. *J Biol Chem.* v. 5;278(36), p. 33972-7, 2003.
- UELAND, P.M., REFSUM, H. Plasma homocysteine, a risk factor for premature vascular disease. Plasma levels in healthy persons; during pathologic conditions and drug therapy. *Nord. Med.*, v.104, n.11, p.293-8, 1989.
- USUI, M., MATSUOKA, H., MIYASAKI, H., UEDA, S., OKUDA, S., IMAIZUMI, T. Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sciences*, v.62, n.26, p.2425-2430, 1998.
- VALLANCE, P., LEONE, A., CALVER, A., COLLIER, J., MONCADA, S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *The Lancet.*, v.339, p.572-575, 1992 b.
- VALLANCE, P., LEONE, A., CALVER, A., COLLIER, J., MONCADA, S. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v.20, n.12, p.S60-S62, 1992 a.
- VECCHIONE, G., MARGAGLIONE, M., GRANDONE, E., CAPPUCCI, G., FERMO, I., D'ANGELO, A, DI MINNO, G. Determining sulfur-containing amino acids by

- capillary electrophoresis: A fast noel method for total homocysteine human plasma. *Electroph.*, v.20, p.569-574, 1999.
- VERMAAK, W.J.H., UBBINK, J.B., BARNARD, H.C. Vitamin B-6 nutrition status and cigarette smoking. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.51, p.1058-61, 1990.
- 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(8),p. 715-9, 1996.
- VINIK, A.I., ERBAS, T., PARK, T.S., NOLAN, R., PITTENGER, G.L. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, v.24, n.8, p.1476-85, 2001.
- WATADA, H. *et al.* Reduction of insulin-stimulated glucose uptake by peroxynitrite is concurrent with tyrosine nitration of insulin receptor substrate-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.320, p.639-47, 2004.
- WENNMALM, A. A new face of atherosclerosis. New discoveries about the role of nitric oxide result in complementary therapy methods. *Lakartidningen*, v.91, n.9, p.843-7, 1994.
- WOLFF, S.P., DEAN, R.T. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of "autoxidative glycosylation" in diabetes. *Biochem J.*, v.245, p.245-50, 1987.
- XIONG, Y., LEI, M., FU, S., FU, Y. Effect of diabetic duration on serum concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in patients and rats with diabetes. *Life Sci.*, v.27, p.149-59, 2005.
- YAMADA, E., HAZAMA, F., AMANO, S., SASAHARA, M. Semiquantitative histochemical investigation of lysosomal enzyme activities in the aortic endothelial cells of spontaneously hypertensive rats. *Atherosclerosis*, v.47,p.19-26, 1983.
- YU, X.J., LI, Y.J., XIONG, Y. Increase of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in serum of high cholesterol fed rabbits. *Life Sciences*, v.54, n.12, p.753-758, 1994.