UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Adutos de DNA relacionados ao estresse oxidativo e glicação avançada em ratos diabéticos

Fabiana Almeida dos Santos

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof[a]. Dr[a]. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Adutos de DNA relacionados ao estresse oxidativo e glicação avançada em ratos diabéticos

Fabiana Almeida dos Santos

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof[a]. Dr[a]. Ana Paula de Melo Loureiro

São Paulo

2014

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

Santos, Fabiana Almeida dos
S237a Adutos de DNA relacionados ao estresse oxidativo e glicação avançada em ratos diabéticos / Fabiana Almeida dos Santos. -- São Paulo, 2014.
197p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Loureiro, Ana Paula de Melo

1. Toxicologia experimental 2. Diabetes mellitus 3. Hiperglicemia 4. Insulina I. T. II. Loureiro, Ana Paula de Melo, orientador.

615.90028 CDD

Fabiana Almeida dos Santos

Adutos de DNA relacionados ao estresse oxidativo e glicação avançada em ratos diabéticos

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro

Orientadora/presidente

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno

1°. Examinador

Dra. Suzana Maria de Souza Vieira

2°. examinador

São Paulo, 17 de outubro de 2014.

APOIO FINANCEIRO

CAPES – COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍEL SUPERIOR

CNPq – CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO

FAPESP – FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO. BOLSA PROCESSO NÚMERO 2011/16225-6 E APOIO FINANCEIRO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

RESUMO

SANTOS, F. A. **Adutos de DNA relacionados ao estresse oxidativo e glicação avançada em ratos diabéticos.** 2014. 197 f. Dissertação de mestrado – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, 2014.

O diabetes mellitus é considerado um dos problemas de saúde globalmente mais desafiadores do século 21. De acordo com as estimativas recentes do *International Diabetes Federation* – IDF, cerca de 382 milhões de pessoas são diabéticas e esse número tende a aumentar para além de 592 milhões em menos de 25 anos. Para melhor compreensão do Diabetes mellitus e suas complicações torna-se necessário buscar novos marcadores para a doença. O DM promove estresse oxidativo, inflamação e a formação de produtos avançados de glicação não enzimática (AGES), o que leva a dano tecidual no paciente diabético. Marcadores de dano oxidativo em proteínas e lipídeos na vigência do DM têm sido amplamente abordados na literatura, no entanto o estudo de lesões em DNA ainda requer mais atenção em modelos *in vivo.* Este trabalho teve como objetivo avaliar o dano oxidativo e resultante de glicação avançada em rim, fígado, cerebelo, sangue e urina de animais diabéticos, assim como a modulação do dano por diferentes períodos de tratamento com insulina, a fim de verificar se o controle da glicemia nos animais diabéticos protege contra a indução dos danos em biomoléculas. Para a indução do DM nos ratos Sprague-Dawley foram administrados 40 mg de STZ por kg de peso corpóreo por via intravenosa. Os níveis de MDA e 5-metildC foram avaliados por HPLC-DAD. A quantificação de HbA1c e dos adutos 1,N^2-εdGuo, 1,N^6-εdAdo, 8-oxodG e CEdG foi realizada por sistema HPLC-ESI-MS/MS. Os níveis de nitrito sérico foram determinados por leitura da absorbância em espectrofotômetro e a concentração de creatinina plasmática foi determinada por analisador bioquímico. Os resultados mostraram que as alterações metabólicas desencadeadas pela condição de hiperglicemia persistente não são prontamente revertidas após o controle da glicemia. Os níveis glicêmicos e de HbA1c apresentam diferença significativa entre os grupos de animais hiperglicêmicos e sadios, sendo observada uma queda dos valores de HbA1c somente a partir do tratamento com insulina por 6 semanas. Em plasma, rim e fígado as concentrações de MDA seguem o perfil de concentração de hemoglobina glicada (HbA1c), indicando que os eventos de glicação e estresse oxidativo podem estar relacionados. O controle glicêmico também apresentou efeito benéfico para a excreção de CEdG e 1,N^6-εdAdo em urina, apesar de ser observado a partir dos níveis de 8-oxodG que a hiperinsulinemia leva a um quadro de estresse oxidativo. As três lesões são geradas por vias distintas: glicação avançada, peroxidação lipídica e ROS. Portanto, além do controle glicêmico, é importante que se desenvolvam estratégias de intervenção nas vias bioquímicas alteradas pela condição de hiperglicemia, a fim de reduzir os riscos das complicações decorrentes do diabetes mellitus.

Palavras chave: Diabetes mellitus, hiperglicemia, insulina, complicações crônicas, HPLC-MS/MS.

ABSTRACT

SANTOS, F. A. **DNA adducts related to Oxidative stress and advanced glycation in diabetic rats.** 2014. 197 f. Master's Dissertation – Departament of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil, 2014.

Diabetes mellitus is generally considered one of the most challenging health problems of the 21st century. According to recent estimates from the International Diabetes Federation - IDF, about 382 million people have diabetes and this number is expected to increase beyond 592 million in less than 25 years. For a better understanding of diabetes mellitus and its complications becomes necessary to search for new biomarkers for the disease. The DM promotes oxidative stress, inflammation and the formation of advanced glycation end products (AGEs), which leads to tissue damage in the diabetic patient. Markers of oxidative damage to proteins and lipids in the presence of DM have been widely discussed in literature, however the study of DNA lesions *in vivo* models still requires more attention. This study aimed to evaluate the oxidative damage and advanced glycation in the kidney, liver, cerebellum, blood and urine of diabetic animals, as well as damage modulation for different periods of insulin treatment in order to verify that the glycaemic control in diabetic animals protects against induction of biomolecules damage. For induction of diabetes in Sprague-Dawley rats were administered 40 mg STZ per kg body weight intravenously. MDA and 5-metildC were evaluated by HPLC-DAD. The quantification of HbA1c and adducts 1,N^2-εdGuo, 1,N^6-εdAdo, 8-oxodG and CEdG was performed by HPLC-ESI-MS / MS system. The serum nitrite was determined by reading the absorbance in a spectrophotometer and the plasma creatinine concentration was determined by biochemical analyzer. The results showed that metabolic changes triggered by the condition of persistent hyperglycemia are not readily reversed after glycemic control. Blood glucose and HbA1c levels are significantly different between the groups of hyperglycemic and healthy animals, and was observed a fall in HbA1c only from insulin treatment for 6 weeks. In plasma, kidney and liver concentrations follow the profile of MDA concentration of glycated hemoglobin (HbA1c), indicating that the events of glycation and oxidative stress may be related. Glycemic control also showed beneficial effect for urine excretion of CEdG and 1, N^6-εdAdo despite could be seen from 8-oxodG levels that the hyperinsulinaemia leads to a frame of oxidative stress. The three lesions are generated by distinct pathways: advanced glycation, lipid peroxidation and ROS. Therefore, beyond glycaemic control, it is important to develop intervention strategies in biochemical pathways altered by the condition of hyperglycemia in order to reduce the complications risk of diabetes mellitus.

Keywords: Diabetes mellitus, hyperglycemia, insulin, chronic complications, HPLC-MS/MS.

Dedico este trabalho

À minha **mãe Eliana** e meu **pai José Roberto**, por todo o amor e carinho que me deram. Foram vocês que me ensinaram a viver, a correr pelos sonhos e fazer o possível para conquistar vitórias em cada etapa da minha vida;

À minha **irmã Jéssica**, que sempre foi minha melhor amiga, o presente mais valioso que poderia ganhar dos meus pais;

Ao meu amor, **Felipe**, por fazer parte da minha vida, partilhando comigo os melhores momentos e me fazendo ainda mais feliz. Agradeço por você ser um eterno companheiro, até nos momentos de maior correria como nos finais de semana infindáveis no laboratório durante o mestrado.

Agradeço a vocês intensamente, por terem me apoiado em todos os instantes, iluminando meus pensamentos e me incentivando nas horas mais críticas. Sem vocês essa jornada não teria tantas vitórias.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a *Deus*, pela dádiva que é a vida, por sempre iluminar os meus pensamentos e caminhos, por me orientar e proteger nas horas necessárias.

À **minha família**, pelo apoio e carinho incondicionais. Por acreditarem no meu sucesso e por terem entendido a minha ausência em muitos momentos importantes que aconteceram durante o período de mestrado.

À **Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro**. Todas as etapas das nossas vidas nos trazem crescimento profissional e pessoal: obrigada pela orientação e todos os ensinamentos durante este trabalho, tornando-o possível de ser realizado.

À **Profa. Dra. Tânia Marcourakis**, minha primeira orientadora na vida da pesquisa. Foi durante a iniciação científica que percebi o quanto esse caminho é importante para mim. Obrigada pela confiança e ensinamentos, que puderam se estender durante a Pós-Graduação a partir do convívio, disciplinas cursadas e participação no meu exame de qualificação do mestrado.

À **Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros** e ao **Prof. Dr. Paolo Di Mascio**, por serem colaboradores essenciais desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno**, ao **Prof. Dr. Joilson Martins**, à **Dra. Suzana Maria de Souza Vieira** e **Profa. Dra. Tânia Marcourakis,** por todas as observações e conselhos valiosos durante os exames de qualificação e/ou defesa desse trabalho.

Aos colegas e amigos que fazem ou fizeram parte do grupo de pesquisa do laboratório: **Ana Paula Gusman**, **Carla Baquedano França**, **Jéssica Ferreira Loiola**, **Larissa Letícia Bobadilla** e **Tiago Franco de Oliveira**. Em especial ao **André Luiz Teroso Ribeiro**, **Antonio Anax Falcão de Oliveira** e **Felipe Pereira,** pelos momentos de trabalho na bancada, durante o período de tratamento dos animais no biotério e durante os estudos; pelo auxílio nos experimentos mais trabalhosos; e pelo bom humor e apoio durante as nossas conversas.

Às minhas queridas amigas do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental: **Fernanda Santana**, **Fernanda Shinagawa**, **Graziela Biude**, **Illana Louise**, **Janaína Donadio**, **Kaluce Almondes**, **Kátia Callou**, **Luciane Alencar**, **Ariana Rocha**, **Verônica da Silva Bandeira**, e **Leila Leiko Hashimoto**. Gostaria de agradecer especialmente à **Ana Mara de Oliveira e Silva** e **Liliane Viana Pires**, que, ao me auxiliarem no meu projeto de pesquisa, deram início a uma grande amizade. Vocês estarão para sempre em meu coração.

À **Aline Martins**, pela amizade sincera, perdurando não só na rotina do laboratório, como no dia a dia.

À minha amiga, **Ana Carolina Cardoso dos Santos Durão**, que fez a diferença nos meus dias de trabalho. Obrigada por todos os momentos de convivência desde a faculdade, tanto nas horas de descontração como nas horas de trabalho árduo; por ter me incentivado a procurar o Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo; por ter feito parte deste trabalho. Obrigada, enfim, pela sua amizade sincera.

À **Isadora Weidner**, por ter me ajudado neste trabalho em um momento tão difícil no início de 2013. Sua amizade e auxílio foram essenciais para a minha recuperação.

A todos os amigos que fazem parte da minha vida, cada qual com seu jeito único de transmitir boas vibrações. Obrigada por tudo.

A todos os professores, funcionários e alunos do Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

"Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho
e sobre ele lança toda a força de sua alma,
todo o universo conspira a seu favor."

Johann Goethe

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\Delta gO_2$ - Oxigênio singlete

1,*N*^{2}– εdA - 1,*N*^{2}– eteno– 2'–desoxiguanosina

1,*N*^{6}– εdG - 1,*N*^{6}– eteno– 2'–desoxiadenosina

5mdC – 5-methyl-2'-desoxicitidina

8-Cl-dG - 8-cloro-2'-desoxiguanosina

ACN - Acetonitrila

CEdG - *N*^{2}-carboxietil-2'-desoxiguanosina

dA – 2'–desoxiadenosina

DAG – Diacilglicerol

dG – 2'–desoxiguanosina

DM – Diabetes mellitus

DM 1 – Diabetes mellitus tipo 1

DM 2 – Diabetes mellitus tipo 2

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNAse 1 – Desoxiribonuclease 1

DNMT – DNA metiltransferase

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

EROs –Espécies reativas do oxigênio

ERONs- Espécies reativas do oxigênio e nitrogênio

ESI – Ionização por eletrospray

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

HOCl - Ácido hipocloroso

HPLC – Cromatografia Liquida de alta eficiência

HPLC–DAD – Cromatografia Liquida de alta eficiência acoplada à um detector de arranjo de diodos

HPLC– ESI– MS/MS – Cromatografia Liquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com ionização por eletrospray e análise de massa após fragmentação da molécula selecionada

IDF – International Diabetes Federation

LPS - Lipopolissacarídeo

MeOH - Metanol

MRM – Monitoramento de reações múltiplas

MDA – Malonaldeído

MPO - Mieloperoxidase

MS – Sigla em inglês para espectrometria de massa

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADP – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NOS – Óxido nítrico sintase

$O_2^{\bullet-}$ - Radical superóxido

O_3 - Ozônio

$^{\bullet}OH$ – Hidroxila

$ONOO^-$ - Peroxinitrito

PBS – Tampão salina fosfato

PDE 1- Fosfodiesterase 1

PKC – Proteína cinase C

PUFAs – Ácidos graxos poli-insaturados

RAGE – Receptores de produtos avançados de glicação

RNAse - Ribonucease

RNS – Espécies reativas do nitrogênio

RO - Alcoxil

RO_2 - Peroxil

ROS – Espécies reativas do oxigênio

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes

STZ – Estreptozotocina

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Projeções globais do número de casos de Diabetes mellitus por região para 2035 (Modificado de IDF, 2013). Página 30

Figura 02. Estruturas dos adutos N^2-(1-carboxietil)-2'-desoxiguanosina (CEdG); 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG); 1,N^6-eteno-2'-desoxiadenosina (1,N^6-εdAdo); e 1,N^2-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N^2-εdGuo).Página 32

Figura 03. Critérios para diagnóstico do Diabetes mellitus pela Associação Americana de Diabetes (ADA) e aprovados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Página 34

Figura 04. Categorias de agentes antidiabéticos e seus respectivos fármacos disponíveis no Brasil (modificado de Diretrizes SBD, 2013). Página 40

Figura 05. (A) Estrutura da insulina, identificada em 1955 por Sanger e colaboradores. A insulina é composta por 2 cadeias polipeptídicas: 21 aminoácidos na cadeia A e 30 aminoácidos na cadeia B, ligados por pontes dissulfeto; (B) Mudanças nas sequências dos aminoácidos dos análogos da insulina (modificado de PIRES, CHACRA, 2008). Página 44

Figura 06. Perfis de ação e características farmacocinéticas aproximadas das preparações de insulina disponíveis no Brasil (modificado de Diretrizes SBD, 2013). Página 47

Figura 07. Ativação das cinco vias que levam ao estresse oxidativo e consequente dano tecidual a partir da hiperglicemia (modificado de BROWNLEE, 2001). Página 51

Figura 08. Estágios da reação de glicação não enzimática e produtos finais de glicação avançada (AGEs) (modificado de HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). Página 53

Figura 09. Mecanismos pelos quais os AGEs promovem dano tecidual em células endoteliais (modificado de BROWNLEE, 2001). Página 54

Figura 10. *N*^{2}-(1-carboxietil)-2'-desoxiguanosina (CEdG): principal resultado da interação do metilglioxal (ou ainda glicose e gliceraldeído) com DNA (modificado de VOULGARIDOU *et al.*, 2011). Página 56

Figura 11. Via dos polióis (modificado de BROWNLEE, 2001). Página.57

Figura 12. Modificações estruturais e funcionais decorrentes da ativação da via DAG-PKC por hiperglicemia. ET-1 = endotelina 1; eNOS = enzima óxido nítrico sintase endotelial; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular; TGF-β = fator transformador do crescimento beta; PAI-1 = inibidor do ativador de plasminogênio 1; NFκB = fator nuclear κ-B; NAD(P)H= forma reduzida de $NADP^+$; ROS = espécies reativas do oxigênio (modificado de BROWNLEE, 2001). Página 59

Figura 13. Aumento do fluxo na via das hexosaminas. Glicose 6-P = glicose 6-fosfato; Frutose 6-P = frutose 6-fosfato; Glucosamina 6-P = Glucosamina 6-fosfato; UDP-GlcNAc = uridina difosfato-N-acetil Glucosamina; GFAT = glutamina-frutose-6-fosfato amiotransferase; OGT = O-GlcNAc transferase (modificado de BROWNLEE, 2001). Página 60

Figura 14. Aspectos biológicos e químicos da inflamação crônica (modificado de LONKAR, DEDON, 2011). Página 65

Figura 15. Danos induzidos pela interação do DNA com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) (modificado de VOULGARIDOU et al., 2011). Página 67

Figura 16. Etapas de iniciação, propagação e término do processo de peroxidação lipídica (modificado de HALIWELL, GUTTERIDGE, 2007)**. P**ágina 69

Figura 17. Formação dos adutos 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG); 1,N^6-eteno-2'-desoxiadenosina (1,N^6-εdAdo); e 1,N^2-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N^2-εdGuo) (modificado de ALMEIDA *et al*., 2003). Página 72

Figura 18. Esquema de tratamento dos grupos CTL 7d, STZ 7d, CTL 6 sem, STZ 6 sem, INT 6 sem, INS 2 sem e INS 6 sem. Página 89

Figura 19. (A) e (B) Cromatogramas (λ = 255 nm); e (C) espectro de absorbância obtidos por HPLC-DAD referentes ao aduto N^2-(1-carboxietil)-2'-desoxiguanosina (CEdG) (pico indicado em azul). Página 116

Figura 20. Cromatogramas do aduto CEdG obtidos no sistema HPLC-ESI-MS/MS utilizando duas condições cromatográficas distintas: (A) Sistema cromatográfico 3, sendo possível visualizar os picos dos dois diasteroisômeros do aduto; (B) Cromatograma obtido ao utilizar a Condição Cromatográfica 4. Página 117

Figura 21. Espectros de massas do aduto CEdG (A) e [$^{15}N_5$]CEdG (B). Página 118

Figura 22. (A) e (B) Cromatogramas (λ = 255 nm); e (C) espectro de absorbância obtidos por HPLC-DAD referentes ao aduto 8-cloro-2'-desoxiguanosina (8-CldG) (pico indicado em verde). Página 120

Figura 23. Espectros de massas dos adutos 8-cloro-2'-desoxiguanosina (8-CldG) (fragmentação do íon *m/z* 302) (A) e [$^{15}N_5$]8-CldG (espectro total, sendo possível observar a distribuição isotópica devido à presença do átomo de cloro) (B). Página 121

Figura 24. Níveis glicêmicos do grupo *CTL 6 sem* (Média ± desvio padrão). Página 124

Figura 25. Níveis glicêmicos do grupo *INT 6 sem* (Média ± desvio padrão; N=5). Página.124

Figura 26. Níveis glicêmicos do grupo *STZ 6 sem* (Média ± desvio padrão, N=8). Página 125

Figura 27. Níveis glicêmicos do grupo *INS 2 sem* (Média ± desvio padrão, N=13). Página 125

Figura 28. Níveis glicêmicos do grupo *INS 6 sem* (Média ± desvio padrão, N=14). Página 126

Figura 29. Níveis glicêmicos médios de todos os grupos do período experimental de 6 semanas. (CTL 6 sem, N= 10; INT 6 sem, N = 5; STZ 6 sem, N = 8; INS 2 sem, N = 13; INS 6 sem, N = 14). Página 126

Figura 30. Níveis glicêmicos médios dos diferentes grupos durante o período experimental de 6 semanas (Média ± desvio padrão). CTL 6 sem, n= 10; INT 6 sem, n = 5; STZ 6 sem, n = 8; INS 2 sem, n = 13; INS 6 sem, n = 14. *P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 de acordo com ANOVA não paramétrico com pós-teste de Dunn, comparando-se os diferentes grupos com grupo controle. Página 127

Figura 31. Níveis glicêmicos do grupo INS 2 sem (n = 13) em diferentes períodos sem e com tratamento com insulina (Média ± desvio padrão). *P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 de acordo com ANOVA não paramétrico com pós-teste de Dunn, comparando-se os diferentes grupos com: (A) Grupo controle CTL 6 sem, n = 10; (B) Grupo tratado com insulina por 6 semanas (INS 6 sem), n = 14. Página 128

Figura 32. Níveis glicêmicos do grupo *CTL 7d* (Média ± desvio padrão, N=4). O primeiro ponto refere-se ao dia da administração i.v. de solução salina. Na sequência, a glicemia foi mensurada em 24 h, 48 h, 72 h e 7 dias após a administração da solução salina. Página 130

Figura 33. Níveis glicêmicos do grupo *STZ 7d (*Média ± desvio padrão, N=4). O primeiro ponto refere-se ao dia da administração i.v. de STZ. Na sequência, a glicemia foi mensurada em 24 h, 48 h, 72 h e 7 dias após a administração de STZ. Página130

Figura 34. Níveis glicêmicos médios dos grupos do período experimental de 7 dias (CTL 7d, N=4; STZ 7d, N=4). Página 131

Figura 35. Níveis glicêmicos do grupo STZ 7d (n = 4) em comparação ao grupo controle CTL 7d (n = 4), (Média ± desvio padrão) *P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 de acordo com teste t não paramétrico. Página 131

Figura 36. Concentração de hemoglobina glicada nos ratos dos diferentes grupos experimentais (A) Grupos do período experimental de 6 semanas. CTL (6 sem): controle, N = 10; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 8; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 13; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 14; INT 6 sem = glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle de acordo com ANOVA não

paramétrico com pós teste de Dunn. (B) Grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Página 133

Figura 37. Média de peso corpóreo (g) de todos os grupos do período experimental de 6 semanas. Página 135

Figura 38. Peso corpóreo (g) dos diferentes grupos experimentais referente a última pesagem (dia da eutanásia) (Média ± desvio padrão). CTL 6 sem, n = 10; INT 6 sem, n = 5; STZ 6 sem, n = 8; INS 2 sem, n = 13; INS 6 sem, n = 14. *P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 de acordo com ANOVA não paramétrico com pós-teste de Dunn. Observa-se diferença significativa entre os animais do grupo diabético sem tratamento (STZ 6 sem) e animais do grupo tratado com insulina por 6 semanas (INS 6 sem). Página 135

Figura 39. Média de peso corpóreo (g) dos grupos do período experimental de 7 dias. O primeiro ponto refere-se ao dia da administração i.v. de solução salina ou STZ. Na sequência, o peso foi mensurado em 72 h e 7 dias após a administração da solução salina ou STZ. Página 137

Figura 40. Peso corpóreo (g) do grupo STZ 7d (n = 4) em comparação ao grupo controle CTL 7d (n = 4). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 de acordo com teste t não paramétrico. Página 137

Figura 41. Níveis de creatinina em plasma dos ratos dos diferentes grupos experimentais (A) Grupos do período experimental de 6 semanas. CTL (6 sem): controle, N = 8; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 8; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 10; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 13; INT 6 sem = glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle, de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. (B) Grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Página 140

Figura 42. Níveis de nitrito sérico dos ratos dos diferentes grupos experimentais. (A) Grupos do período experimental de 6 semanas. CTL 6 sem: controle, N = 10; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 8; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 10; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 10; INT 6 sem:Glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle, de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. (B) Grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Página 145

Figura 43. Concentrações plasmáticas de malonaldeído nos ratos dos diferentes grupos experimentais (A) Grupos do período experimental de 6 semanas. CTL (6 sem): controle, N = 9; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 6; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 10; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 10; INT 6 sem = glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle e (B) com o grupo de glicemia intermediária; de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. (C) Grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Página 148

Figura 44. Níveis de malonaldeído em (A) fígado e (B) rim dos ratos dos diferentes grupos experimentais (A) Grupos do período experimental de 6 semanas. CTL (6 sem): controle, N = 9; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 6; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 10; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 10; INT 6 sem = glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. Página 152

Figura 45. Níveis de malonaldeído em (A) fígado e (B) rim dos ratos dos grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Página 153

Figura 46. Níveis de 8-oxodG em urina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas. CTL: controle, N = 10; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 8; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 13; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 12; Glicemia intermediária, N = 5. A) Níveis totais excretados em 10 h. B) Concentração na urina de 10 h. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle, de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. Página 157

Figura 47. Níveis de CEdG em urina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas. CTL: controle, N = 10; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 8; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 12; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 11; Glicemia intermediária, N = 5. A) Níveis totais excretados em 10 h. B) Concentração na urina de 10 h. *P < 0,05 ** P < 0,01*** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle, de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. Página 158

Figura 48. Níveis de 1,N^6-etenodA em urina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas. CTL: controle, N = 9; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 7; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 11; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com

insulina por 6 semanas, N = 10; Glicemia intermediária, N = 5. A) Níveis totais excretados em 10 h. B) Concentração na urina de 10 h. *P < 0,05 **P < 0,01 ***P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle, de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. Página 159

Figura 49. Níveis de 8-oxodG em urina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. A) Níveis totais excretados em 10 h. B) Concentração na urina de 10 h. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Página 160

Figura 50. Níveis de CEdG em urina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. A) Níveis totais excretados em 10 h. B) Concentração na urina de 10 h. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Página 161

Figura 51. Níveis 3de 1,N^6-etenodA em urina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. A) Níveis totais excretados em 10 h. B) Concentração na urina de 10 h. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Página 162

Figura 52. Níveis de 8-oxodG em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas. CTL: controle, N = 7; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 6; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 13; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 10. Glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle, de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. Página 167

Figura 53. Níveis de CEdG em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas. CTL: controle, N = 10; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 7; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 11; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 10; Glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle, de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. Página 168

Figura 54. Níveis de 1,N^6-etenodA em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas. CTL: controle, N = 7; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 7; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 11; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 11; Glicemia intermediária, N = 5. Não existem diferenças significativas comparando-se os diferentes grupos de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. Página 169

Figura 55. Níveis de 1,N^2-etenodG em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas. CTL: controle, N = 7; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 7; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 11; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 11; Glicemia intermediária, N = 5. Não existem diferenças significativas comparando-se os diferentes grupos de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. Página 170

Figura 56. Níveis de 8-oxodG dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Página 171

Figura 57. Níveis de CEdG dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Página 172

Figura 58. Níveis de 1,N^6-etenodA dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Página 173

Figura 59. Níveis de 1,N^2-εdGuo dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Página 174

Figura 60. Níveis de 5-metil-2'-desoxicitidina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo. CTL (6 sem): controle, N = 10; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 8; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 13; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 14; INT 6 sem = glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle e (B) com o grupo de glicemia intermediária; de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. Página 178

Figura 61. Níveis de 5-metil-2'-desoxicitidina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Página 179

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Evolução da insulina, de 1921 aos dias atuais (modificado de BARNETT, KRALL, 2009). Página 41

Tabela 2: Níveis glicêmicos dos animais após 72h da injeção de STZ ou solução salina, para confirmação da hiperglicemia ou normoglicemia dos animais, respectivamente (Média ± desvio padrão). Página 123

Tabela 3: Níveis de hemoglobina glicada nos diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Página 132

Tabela 4: Valores médios de peso (g) e respectivos desvios-padrão dos grupos de período experimental de 6 semanas. Página 134

Tabela 5: Valores médios de peso (g) e respectivos desvios-padrão dos grupos de período experimental de 6 semanas. Página 136

Tabela 6: Volume urinário dos diferentes grupos experimentais coletado por 10 horas. Página 138

Tabela 7: Creatinina plasmática dos diferentes grupos experimentais. Página 139

SUMÁRIO

RESUMO 07

ABSTRACT 08

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 15

LISTA DE FIGURAS 17

LISTA DE TABELAS 24

1. INTRODUÇÃO 29

1.1 Diabetes mellitus 33

1.2 Tratamento do DM e métodos para avaliaçãodo controle glicêmico 37

1.2.1 Agentes antidiabéticos 39

1.2.2 Insulinoterapia 40

1.3 Complicações crônicas decorrentes do Diabetes mellitus 48

1.4 Hiperglicemia e mecanismos de lesão tecidual 50

1.4.1 Formação dos produtos finais de glicação avançada (AGES) 52

1.4.2 Aumento do fluxo de glicose pela via dos polióis 56

1.4.3 Ativação de isoformas da proteína cinase C (PKC) 58

1.4.4 Aumento no fluxo da via das hexosaminas 59

1.5 ERONs e danos a biomoléculas 60

1.5.1 Espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ERONs) 60

1.5.2 Inflamação crônica 63

1.5.3 Halogenação 65

1.5.4 Lesões no material genético 66

1.5.5 Peroxidação lipídica 67

1.5.6 Dano oxidativo ao DNA 70

1.6 Indução de DM em animais para experimentação 73

2. OBJETIVOS 77

3. MATERIAL E MÉTODOS 79

3.1 Reagentes 79

3.2 Equipamentos 79

3.2.1 Equipamentos básicos 79

3.2.2 Espectrofotômetros 80

3.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) 81

3.2.3.1 HPLC-DAD 81

3.2.3.2 HPLC-ESI-MS/MS 81

3.3. Síntese, purificação e caracterização de adutos de DNA 82

3.3.1 Aduto N2-(1-carboxietil)-2'–desoxiguanosina (CEdG) 83

3.3.2 Aduto 8-cloro-2'-desoxiguanosina (8-CldG) 85

3.4 Protocolo de tratamento dos animais 87

3.4.1 Indução ao Diabetes mellitus 89

3.4.2 Monitoramento glicêmico 91

3.4.3 Administração de insulina 92

3.4.4 Peso corpóreo dos animais 93

3.4.5 Coleta de urina 94

3.4.6 Condições da eutanásia 94

3.5 Avaliação de nitrito sérico 95

3.6 Análise de creatinina plasmática e urinária 95

3.7 Determinação de malonaldeído em plasma 96

3.7.1 Preparo das amostras 96

3.7.2 Sistema analítico 97

3.8 Determinação de malonaldeído em fígado e rins 98

3.8.1 Preparo dos homogenatos 98

3.8.2 Preparo das amostras 98

3.8.3 Sistema analítico 99

3.8.4 Quantificação de proteínas 99

3.9 Quantificação de Hemoglobina glicada (HbA1c) 100

3.9.1 Preparo das amostras 100

3.9.2 Determinação de hemoglobina total 100

3.9.3 Clivagem enzimática 101

3.9.4 Sistema analítico 101

3.10 Extração de DNA de fígado, rins e cerebelo para quantificação das lesões 102

3.11 Hidrólise enzimática do DNA 105

3.12 Determinação dos níveis de 5-metil-2'-desoxicitidina em DNA 106

3.13 Quantificação das Lesões 8-OxodG, CEdG, 1,N^6-εdAdo e 1,N^2-εdGuo em DNA 107

3.14 Quantificação das Lesões 8-oxodG, CEdG e 1,N^6-εdAdo em urina 110

3.14.1 Preparo das amostras 110

3.14.2 Sistema Analítico 110

3.15 Análise estatística 113

4 **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 115

4.1 Síntese, purificação e caracterização de adutos de DNA 115

4.1.1 Aduto N2-(1-carboxietil)-2'–desoxiguanosina (CEdG) 115

4.1.2 Aduto 8-cloro-2'-desoxiguanosina (8-CldG) 119

4.2 Animais 122

4.2.1 Níveis glicêmicos 122

4.2.2 Quantificação de Hemoglobina Glicada (HbA1c) 132

4.2.3 Peso corpóreo 134

4.2.4 Volume urinário 138

4.3 Análise de creatinina plasmática 139

4.4 Avaliação de nitrito sérico 143

4.5 Determinação de malonaldeído em plasma 146

4.6 Determinação de malonaldeído em fígado e rim 149

4.7 Quantificação de Lesões 8-8-OxodG, CEdG, 1,N^2-εdGuo e 1,N^6-εdAdo em urina 154

4.7 Quantificação de Lesões 8-8-OxodG, CEdG, 1,N^2-εdGuo e 1,N^6-εdAdo em DNA 164

4.9 Análise da metilação global em DNA de fígado, rim e cerebelo 175

5 CONCLUSÃO 181

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 183

7 ANEXOS 191

Certificado de aprovação do Comitê de Ética

Currículo Lattes

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é considerado um dos problemas de saúde globalmente mais desafiadores do século 21. De acordo com as estimativas recentes do *International Diabetes Federation* – IDF, cerca de 382 milhões de pessoas são diabéticas, o que representa 8,3% da população mundial adulta, e esse número tende a aumentar para além de 592 milhões em menos de 25 anos. Do número total de casos de DM no mundo, estima-se ainda que 175 milhões de pessoas tem diabetes mellitus mas ainda não foram diagnosticadas, o que representa 46% da população diabética. Esse alto índice se deve ao fato de o diabetes mellitus ser assintomático em proporção significativa dos casos ou os sintomas apresentados pelo paciente não serem relacionados com a doença pelos profissionais de saúde. Nesses casos, o diagnóstico é realizado apenas quando se manifestam sinais de complicações, como doenças cardiovasculares, neuropatias, falência renal, retinopatia e nefropatia. Como 80% do número total de afetados vivem em países de baixa e média rendas, onde a epidemia está ganhando ritmo em taxas alarmantes, os números mais recentes do IDF Diabetes Atlas fornecem uma indicação preocupante sobre o futuro impacto do diabetes como uma grande ameaça para o desenvolvimento global. A projeção é de que o número da população diabética na America do Sul e Central, por exemplo, aumente em 60% até 2035 (**Figura 01**) (IDF, 2013). E apesar de o Brasil definir diretrizes para uma política de prevenção da doença e atenção integral a saúde do diabético no âmbito SUS (SANTOS, 2011), o país ocupa o 4° lugar entre os 10 países com maior número de casos da doença, com 11,9 milhões de diabéticos (IDF, 2013).

Regiões e projeções globais do número de pessoas com Diabetes mellitus (20 – 79 anos)
2013 - 2035

REGIÃO	2013 MILHÕES	2035 MILHÕES
ÁFRICA	19,8	41,4
ORIENTE MÉDIO E NORTE DA ÁFRICA	34,6	67,9
SUDESTE ASIÁTICO	72,1	123
AMÉRICA DO SUL E CENTRAL	24,1	38,5
PACÍFICO OCIDENTAL	138,2	201,8
AMÉRICA DO NORTE E CARIBE	36,7	50,4
EUROPA	56,3	68,9

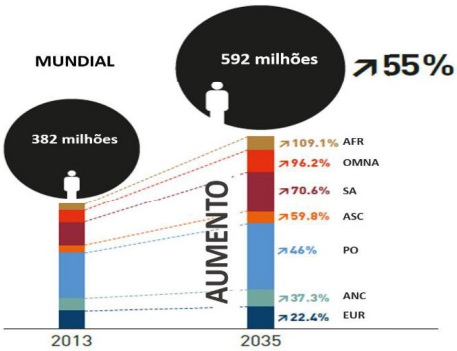


Figura 01. Projeções globais do número de casos de Diabetes mellitus por região para 2035 (Modificado de IDF, 2013).

Em 2013 o diabetes foi responsável por pelo menos 548 milhões de dólares americanos em despesas mundiais de saúde (11% dos gastos com adultos) e pela morte de cerca de 5,1 milhões de diabéticos entre 20 e 79 anos de idade (8,4% de todas as causas de morte nessa faixa etária). Isso representa uma morte a cada 6 segundos, sendo as complicações crônicas da doença as responsáveis por esse quadro (IDF, 2013).

Para melhor compreensão do Diabetes mellitus e suas complicações torna-se necessário buscar novos marcadores para a doença e criar padrões internacionais para sua prevenção e diagnóstico (IDF, 2013). Atualmente é postulado que o estresse oxidativo decorrente do quadro de hiperglicemia crônica exerce papel central nas complicações do DM. Espécies reativas de oxigênio podem lesar macromoléculas celulares, como proteínas, lipídeos e DNA, e atuar como agentes pró-apoptóticos. Marcadores de dano oxidativo em proteínas e lipídeos na vigência do DM têm sido amplamente abordados na literatura, no entanto o estudo de lesões em DNA ainda requer mais atenção, principalmente em modelos *in vivo* (KOWLURU, ABBAS, ODENBACH, 2004).

Uma vez apresentada a necessidade da busca de novos marcadores para o Diabetes mellitus e o estudo da formação de lesões ao DNA na vigência da doença, nesse trabalho foram quantificados os níveis dos adutos N^2-(1-carboxietil)-2'-desoxiguanosina (CEdG), 1,N^2-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N^2-εdGuo), 1,N^6-eteno-2'-desoxiadenosina (1,N^6-εdAdo) e 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), (**Figura 2**) em urina, fígado, rim e cerebelo de ratos induzidos ao Diabetes mellitus por estreptozotocina, ratos diabéticos tratados com insulina, e ratos sadios, para comparação.

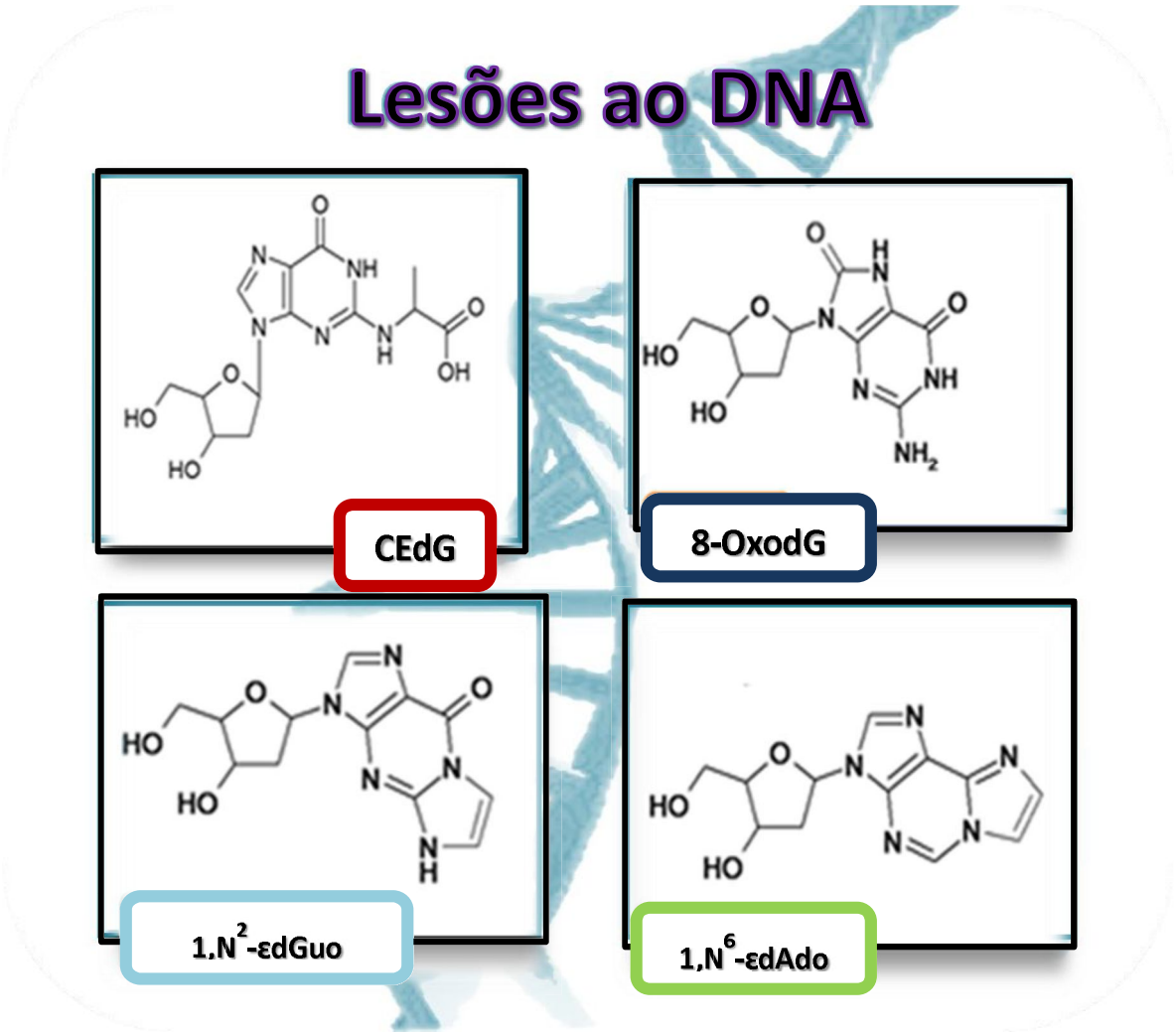


Figura 02. Estruturas dos adutos N^2-(1-carboxietil)-2'-desoxiguanosina (CEdG); 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG); 1,N^6-eteno-2'-desoxiadenosina (1,N^6-εdAdo); e 1,N^2-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N^2-εdGuo).

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus é uma síndrome metabólica complexa caracterizada por deficiência de insulina ou desenvolvimento de resistência ao hormônio, que levam à hiperglicemia e metabolismo alterado de glicose, lipídeos e proteínas (ARYA, YADAV, SHARMA, 2011).

A história da doença remonta a aproximadamente 3500 anos, desde sua descoberta, descrição e pesquisas sobre causas e tratamentos. Porém, apenas na década de 1980, a partir da necessidade de se encontrar critérios universais para o diagnóstico e classificação do DM, a Associação Americana de Diabetes (ADA) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) originaram diversas publicações de caráter normativo (BARNETT, KRALL, 2009).

A fim de se prevenir de maneira efetiva as complicações decorrentes da doença, os critérios para diagnóstico foram atualizados em 1997 pela Associação Americana de Diabetes (ADA) e aprovados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (**Figura 03**). O paciente é considerado diabético quando atende a pelo menos um dos quatro critérios descritos a seguir. O primeiro critério consiste na apresentação de sintomas de poliúria, polidipsia e perda de peso pelo paciente, junto a valores glicêmicos superiores a 200 mg/dL a qualquer hora do dia. Como segundo critério utiliza-se a glicemia em jejum igual ou superior a 126 mg/dL, havendo a necessidade de repetição da análise em outro dia caso os valores representem pequenas elevações. O terceiro critério se refere à glicemia maior ou igual a 200 mg/dL

analisada 2 horas após a ingestão de 75 g de glicose. E o último, reconhecido recentemente, se trata de valores de hemoglobina glicada (HbA1c) maior ou igual a 6,5% (Diretrizes SBD, 2013).

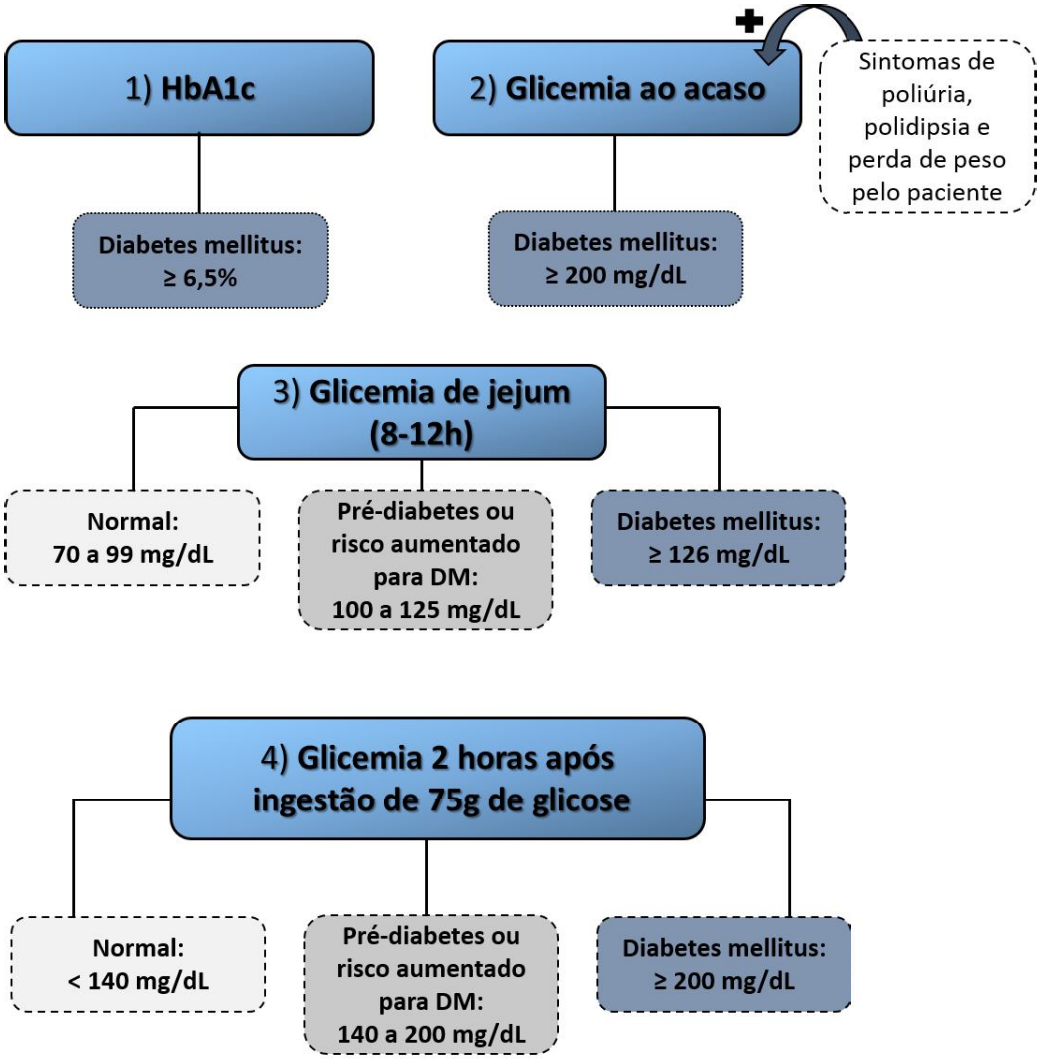


Figura 03. Critérios para diagnóstico do Diabetes mellitus pela Associação Americana de Diabetes (ADA) e aprovados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD).

A classificação do diabetes mellitus baseia-se na etiologia e é dividida em quatro classes clínicas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (AD): DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Existem ainda duas categorias que compõem o estado denominado pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída, que não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (Diretrizes SBD, 2013).

O Diabetes mellitus tipo 1 é a forma da doença decorrente da destruição de células β do pâncreas com consequente deficiência na produção de insulina. A destruição das células apresenta taxa variável, mas pode levar à deficiência absoluta do hormônio. A doença é iniciada de forma repentina principalmente em crianças e representa de 5 a 10% dos casos de DM. É causada geralmente por reação autoimune e caracterizada pela presença de anticorpos contra a insulina. Porém, existem casos não relacionados ao processo autoimune que são classificados como forma idiopática de DM1 e caracterizados pela ausência de marcadores de autoimunidade (BENNETT, KNOWLER, 2009; Diretrizes SBD, 2013; IDF, 2013).

O Diabetes mellitus tipo 2 é caracterizado por distúrbios da ação e da secreção da insulina e representa de 90 a 95% dos casos. Geralmente ambos os defeitos estão presentes quando o diabetes se manifesta clinicamente, mas um deles pode se tornar a característica predominante. Essa forma de diabetes é associada com insuficiência progressiva das células β e os pacientes com DM2 no geral têm resistência à insulina e deficiência relativa desse hormônio. Diferentemente do DM1 do tipo autoimune, o DM2 não possui indicadores

específicos. Embora a doença seja cada vez mais frequente em jovens, o diagnóstico ocorre geralmente a partir dos 40 anos de idade (BENNETT, KNOWLER, 2009; Diretrizes SBD, 2013; IDF, 2013).

O Diabetes mellitus gestacional se refere à intolerância à glicose associada com hiperglicemia de gravidade variável, tendo seu início ou primeiro reconhecimento durante a gestação. Esse tipo de DM tende a ocorrer próximo à 24ª semana de gravidez e desaparecer após o parto. Porém, mulheres que tiveram diabetes gestacional apresentam maior risco de desenvolver a doença novamente em outras gestações ou DM2 futuramente, uma vez que as duas formas da doença estão associadas à resistência à insulina e diminuição da função das células beta (BENNETT, KNOWLER, 2009; Diretrizes SBD, 2013; IDF, 2013).

Os outros tipos específicos de diabetes são aqueles nos quais pode-se identificar o defeito ou processos causadores da doença. Essa categoria abrange defeitos genéticos na função das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, indução por medicamentos ou agentes químicos, infecções, e síndromes específicas, como a síndrome de Down (Diretrizes SBD, 2013; IDF, 2013).

Quando os níveis glicêmicos não estão dentro dos valores para classificação do Diabetes mellitus mas são maiores que os valores normais de referência, que compreendem os valores menores que 100 mg/dL em jejum de ao menos 8 horas e menores que 140 mg/dL duas horas após a refeição, o paciente pertence ao grupo de classes intermediárias no grau de tolerância à glicose, composta por duas categorias: glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída. A glicemia de jejum alterada é caracterizada por concentrações de glicemia mais elevadas (>

100 a < 126 mg/dL) apenas após o período de jejum de no mínimo 8 horas, enquanto que a tolerância à glicose diminuída é caracterizada por níveis elevados de glicose (≥ 140 a < 200 mg/dL) após as refeições (2 horas após a ingestão de 75g de glicose). Tais estágios são decorrentes de uma combinação de resistência à ação da insulina e disfunção das células beta, podendo progredir para o DM2, uma vez que a evolução para a doença ocorre em estágios (Diretrizes SBD, 2013; IDF, 2013).

1.2 Tratamento do Diabetes mellitus e métodos para avaliação do controle glicêmico

Os objetivos terapêuticos gerais do Diabetes mellitus consistem no controle dos sintomas agudos da doença, prevenção das complicações crônicas e promoção da qualidade de vida do paciente. O tratamento do DM pode ser não-medicamentoso, através da mudança de estilo de vida caracterizada por dieta e prática de exercícios físicos, aliado ou não a medicamentos (antidiabéticos e/ou insulinoterapia) (FUCHS, 2006). Para tanto, é primordial que o tratamento promova a obtenção de níveis glicêmicos o mais próximo possível da normalidade. Dessa forma, existem níveis aceitáveis de tolerância para valores de glicemia (exceto para glicemia de jejum) e metas terapêuticas individualizadas, de acordo com: a duração do diabetes; comorbidades; complicações micro, macro e cardiovasculares; e a idade do paciente. No caso de pacientes com Diabetes mellitus do tipo 1, cuja insuficiência de insulina tende a ser total, o tratamento é baseado na reposição direta do hormônio através da administração de insulina exógena (humana ou análogos). Já o tratamento do Diabetes mellitus do tipo 2, consiste em situação

heterogênea, uma vez que para alguns pacientes apenas a mudança do estilo de vida é suficiente para a normalização da glicemia, como existem outros que além de dieta e exercícios físicos dependem da administração de antidiabéticos e/ou insulina para controle da doença (BAZZOTE, 2010; Diretrizes SBD, 2013).

Para que se faça a avaliação do controle glicêmico e da eficácia do tratamento escolhido, além das dosagens de glicemia de jejum, ao acaso e pós-prandial, foram desenvolvidos métodos que avaliam o controle glicêmico a longo prazo, como a hemoglobina glicada (HbA1c) e outros que detectam alterações glicêmicas ao longo do dia, como o auto monitoramento da glicemia capilar (AMGC) e o sistema de monitoramento contínuo da glicose em líquido intersticial (SMCG) (BAZZOTE, 2010; Diretrizes SBD, 2013).

A Associação Americana de Diabetes (ADA) preconiza que para o controle metabólico, além das dosagens glicêmicas usuais seja realizada a dosagem de hemoglobina glicada ao menos duas vezes ao ano em pacientes com níveis estáveis de glicemia e quatro vezes ao ano em pacientes diabéticos cujo tratamento está sendo alterado ou que não estejam alcançando as metas glicêmicas recomendadas. A hemoglobina glicada (HbA1c ou apenas A1c), refere-se a um conjunto de substâncias formadas com base em reações entre a hemoglobina A (HbA), que é a fração principal e nativa da hemoglobina, e alguns açúcares (NETTO, 2009). Apesar de existirem vários subtipos de HbA1, distintos cromatograficamente, apenas a fração HbA1c é considerada marcador do índice de glicemia média, por ter o terminal valina da cadeia beta ligado de forma estável e irreversível à glicose. A quantidade de glicose ligada à hemoglobina é diretamente proporcional à concentração média de glicose no sangue. Como os eritrócitos apresentam um

tempo de vida médio de 120 dias, a medida da concentração de glicose ligada à hemoglobina permite avaliar o controle glicêmico médio no intervalo de 90 a 120 dias antes da data do exame. São considerados valores normais de referência valores de 4 a 6% de HbA1c, dessa forma, o conceito atual de tratamento do diabetes define o valor de 6,5 a 7% de HbA1c como meta (Diretrizes SBD, 2013).

1.2.1 Agentes antidiabéticos

Os agentes antidiabéticos são fármacos que apresentam como finalidade alcançar níveis glicêmicos menores que 100 mg/dL em estado de jejum e menores que 140 mg/dL após as refeições (glicemia pós-prandial). Por apresentarem diferentes modos de ação, são classificados em três categorias: os sensibilizadores de insulina; os secretagogos de insulina (estimulam a secreção do hormônio); e os moduladores da absorção de nutrientes no trato gastrointestinal (TGI) (aumentam a secreção de insulina após as refeições e promovem a supressão do glucagon). Os antidiabéticos disponíveis no Brasil estão listados na **figura 04** (BAZZOTE, 2010; Diretrizes SBD, 2013).

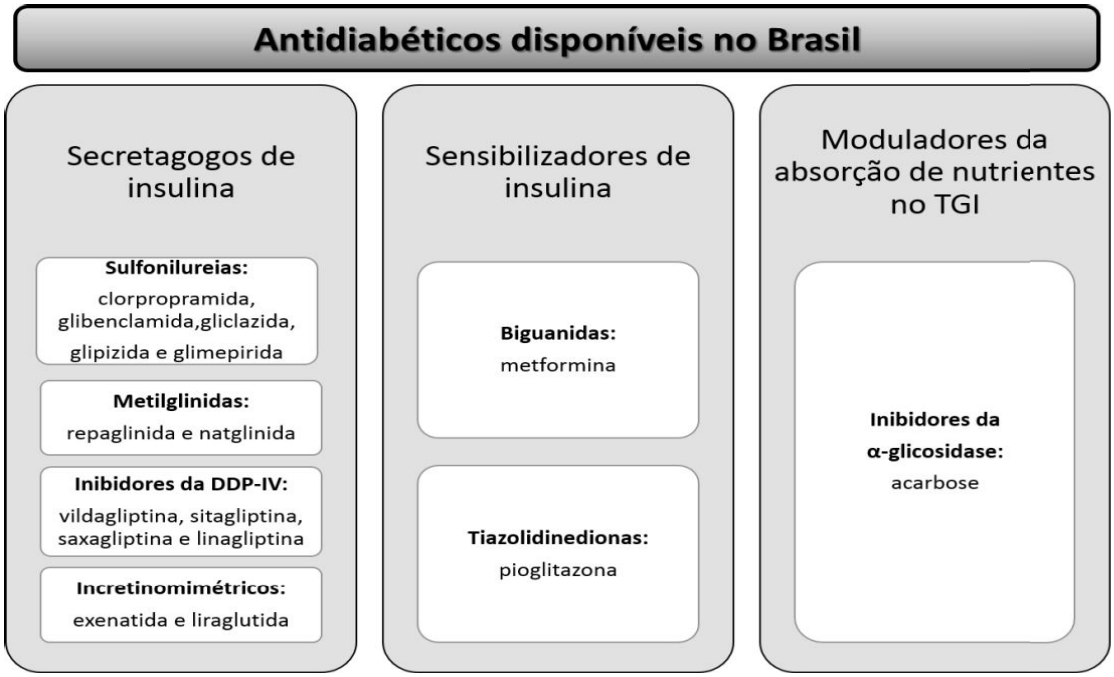


Figura 04. Categorias de agentes antidiabéticos e seus respectivos fármacos disponíveis no Brasil (modificado de Diretrizes SBD, 2013).

1.2.2 Insulinoterapia

A descoberta da insulina pelos pesquisadores Banting, Macleod, Best e Collip, da Universidade de Toronto foi de extrema relevância na história do Diabetes mellitus. No período decorrido desde a descoberta em 1921 até a década de 1950, os efeitos da administração da insulina foram responsáveis pelo aumento da expectativa de vida de pacientes com DM1, pelo surgimento de interesse na compreensão do mecanismo da ação da insulina sobre o metabolismo intermediário e pelo melhor reconhecimento das complicações crônicas do Diabetes mellitus (tabela 1) (BARNETT, KRALL, 2009).

Tabela 1: Evolução da insulina, de 1921 aos dias atuais (modificado de BARNETT, KRALL, 2009).

1921	Descoberta a possibilidade de diminuir os níveis glicêmicos, a partir da administração de extrato pancreático, em cachorros diabéticos experimentais pancreatectomizados (Benting, Best, Macleod; Toronto).
1922	A insulina foi administrada pela primeira vez em humanos (Leonard Thompson, 14 anos, Toronto).
1923	Início da produção e comercialização em larga escala da insulina (Eli Lilly Company).
1925	Definição da primeira unidade intenacional de insulina (1 unidade = 0,125 mg de material padrão). As insulinas U 40/80 foram lançadas no mercado.
1926	A insulina foi reconhecida como hormônio proteico e a cristalização da insulina aumenta a estabilidade da formulação (John Jacob Abel).
1936	Adição de zinco na insulina de protamina (PZI) para prolongar a duração da ação do hormônio (Scott, Fisher e Hagedorn).
1950	Desenvolvida a insulina NPH, com quantidades controladas de protamina (Nordisk Company).
1951	Insulina lenta desenvolvida a partir do tamponamento da insulina de zinco com acetato (Novo Company, Hallas-Moller).
1955	Delineamento da estrutura da insulina (Sanger e colaboradores).
1967	Descoberta da pró-insulina (Steiner).
1971	Definição do receptor de insulina (Roth, Cuatrecasus e colaboradores).
1972	Introdução da insulina U 100 no mercado com a finalidade de melhorar a precisão da administração.
1977	Clonagem do gene da insulina (Ullrich, Rutter, Goodman e outros).
1981	Descrição da atividade de quinase do receptor de insulina (Kahn e colaboradores).
1982	Lançamento da insulina humana recombinante no mercado (Eli Lilly Company).
1996	Introdução do análogo de insulina de ação rápida, insulina Lispro (Humalog).
2001	Introdução do análogo de insulina de ação prolongada, insulina Glargina (Lantus, Aventis Company).

Em 1923, ano seguinte à descoberta da insulina, clínicos do Hospital Geral de Toronto prescreveram a primeira preparação de insulina para o tratamento do Diabetes mellitus em um jovem de 14 anos de idade diagnosticado como portador de DM1 por quatro anos. O paciente apresentou melhoras após a administração da preparação purificada, que se mostrou eficaz na diminuição dos níveis glicêmicos e demonstrou de forma definitiva a relação da secreção interna pancreática e o

Diabetes mellitus. Em razão destas descobertas Banting e Macleod receberam o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1923. O marco para a prática clínica foi o posterior acordo dos pesquisadores com a empresa americana *Eli Lilly*, que lançou a primeira insulina comercial (PIRES; CHACRA, 2008).

Apesar de ser utilizada há mais de 90 anos, a preparação de insulina passou pelos maiores avanços quanto à produção e formas de utilização apenas nas últimas três décadas. As diversas preparações de insulina diferem entre si quanto a origem, concentração, grau de purificação e tempo de ação (FUCHS, 2006). A insulina é apresentada em Unidades Internacionais (UI) e é disponibilizada nas concentrações de 500,100 ou 40 unidades/mL, sendo as preparações U-100 as mais utilizadas no Brasil. Quanto maior a concentração da insulina, mais rápida a sua absorção. Outra característica que deve ser considerada é o grau de purificação das formulações de insulina, por determinar a quantidade presente de proteínas pancreáticas não insulínicas (pró-insulina). No Brasil, as insulinas são altamente purificadas, o que confere menor potencial alergênico aos pacientes (BARNETT, KRALL, 2009).

As primeiras insulinas lançadas no mercado apresentavam origem animal, sendo obtidas a partir unicamente do extrato pancreático de boi (insulina bovina) ou de porco (insulina porcina) ou pela combinação de ambos (insulina mista). Entretanto, devido à necessidade de sucessivas administrações de insulina ao longo do dia, as indústrias farmacêuticas passaram a ter interesse em prolongar o tempo de ação das formulações. Após a identificação da estrutura molecular da insulina (**figura 5A**) e a utilização da biologia molecular via DNA recombinante, foi lançada a insulina sintética, que por ser composta pela mesma sequência de

aminoácidos da insulina humana endógena é denominada insulina humana. A partir da mesma técnica foram disponibilizados os denominados análogos de insulina humana (**figura 5B)**, que são preparações cuja estrutura da insulina humana sofreu adição, substituição ou troca na posição de aminoácidos, conferindo diferentes tempos de ação para a formulação (BARNETT, KRALL, 2009; Diretrizes SBD, 2013; PIRES; CHACRA, 2008).

Considerando-se que os picos endógenos de insulina em indivíduos normais se iniciam dentro de 15 a 45 minutos e retornam ao basal dentro de 90 a 180 minutos após o início das refeições para manter os níveis de glicose entre 70-125 mg/dL, para mimetizar o padrão da secreção endógena normal da insulina nos pacientes diabéticos os esforços são voltados para que sejam sintetizadas preparações de insulina com tempos de ação distintos, evitando quadros tanto de hiperglicemia como de hipoglicemia (ROOS, SIQUEIRA, CLAUDIO, 2009).

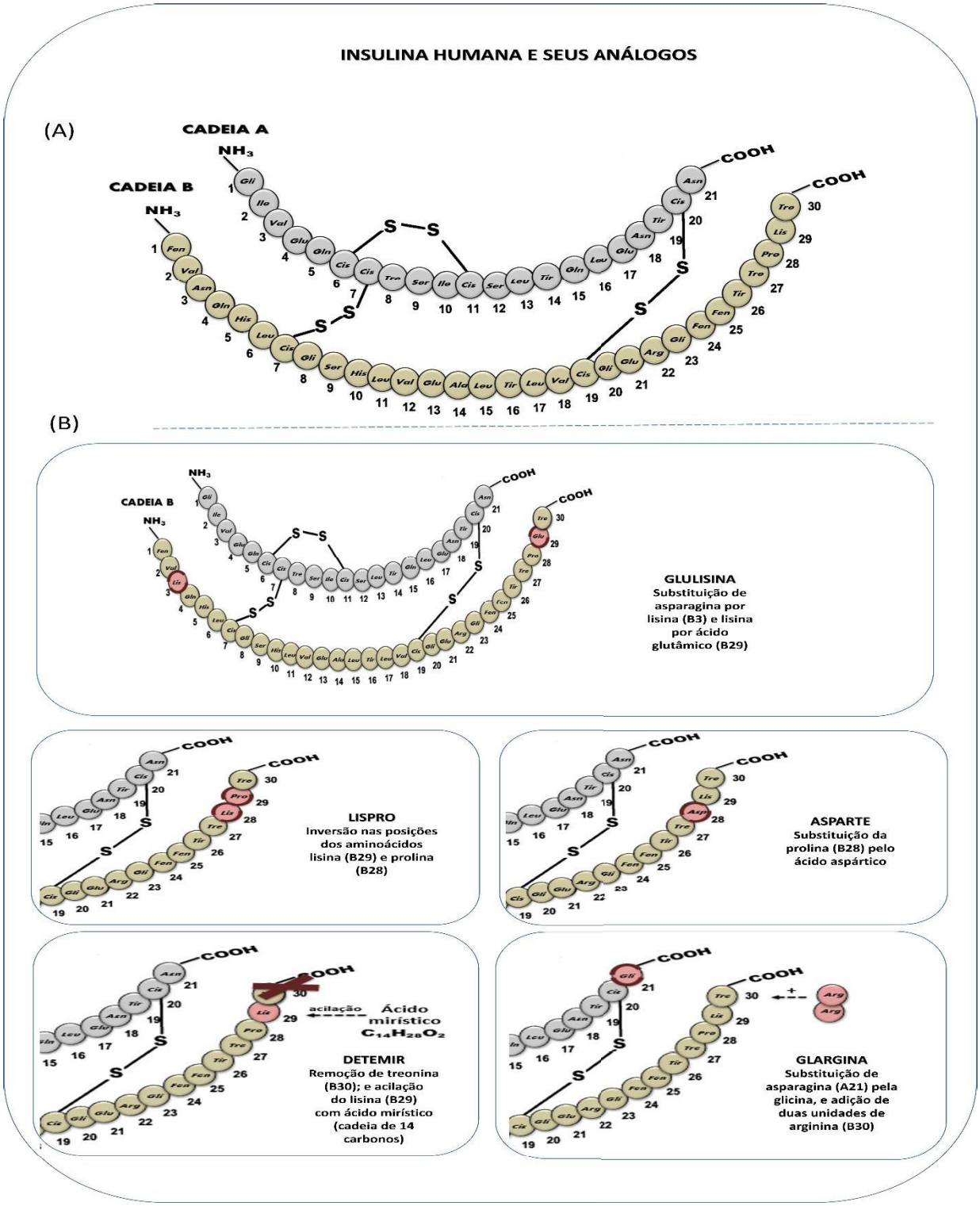
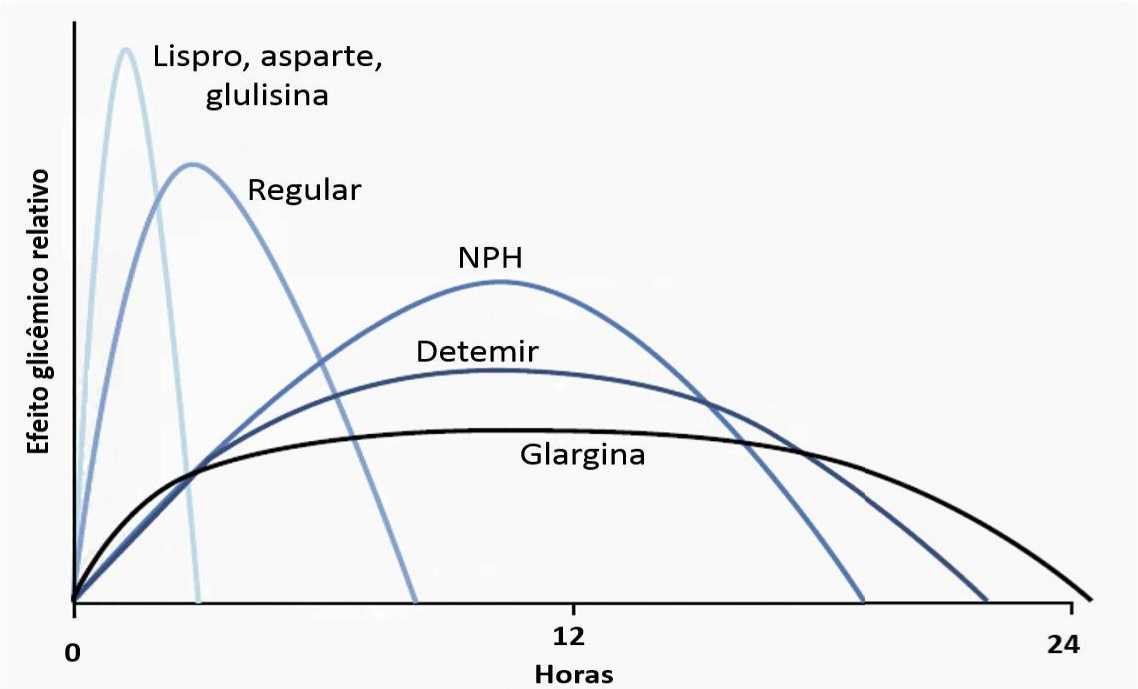


Figura 05. (A) Estrutura da insulina, identificada em 1955 por Sanger e colaboradores. A insulina é composta por 2 cadeias polipeptídicas: 21 aminoácidos na cadeia A e 30 aminoácidos na cadeia B, ligados por pontes dissulfeto; (B) Mudanças nas sequências dos aminoácidos dos análogos da insulina (modificado de PIRES, CHACRA, 2008).

As preparações podem ser divididas quanto seu tempo de ação como: rápida, ultrarrápida, intermediária, prolongada e bifásica. A insulina regular, primeira a ser lançada no mercado, apresenta ação com início rápido, entre 30 e 60 minutos, pico de ação entre 2 e 4 horas e término entre 6 e 9 horas. É geralmente administrada por via subcutânea 30 minutos antes das refeições com o objetivo de reduzir a hiperglicemia pós-prandial. Porém, devido seu perfil farmacológico com início de ação e duração mais prolongado em relação à insulina endógena, nem sempre apresenta êxito na redução da hiperglicemia pós-prandial e pode aumentar o risco de hipoglicemia noturno ou entre as refeições. O grupo de insulinas de ação ultrarrápida, representado pelas insulinas lipro, asparte e glulisina, apresenta rápida absorção, com início de ação entre 10 e 15 minutos, pico entre 30 e 90 minutos e término de ação entre 3 e 4 horas. São indicadas para administração imediatamente antes ou depois das refeições e em picos hiperglicêmicos esporádicos ao longo do dia, além de serem opções para as bombas de infusão contínua subcutânea de insulina. A insulina classificada como insulina de ação intermediária é a denominada NPH, suspensão com baixa concentração de protamina (P) e pH neutro (N), desenvolvida pelo cientista dinamarquês Hagedorn (H). É administrada em regimes basais em duas ou mais aplicações diárias, pois apresenta início de ação entre 1 e 2 horas, pico entre 3 e 8 horas e término entre 12 e 15 horas. O grupo de análogos de ação prolongada ou basal, composto pelas insulinas glargina e detemir, apresenta início de ação entre 1 e 2 horas, duração total de até 24 horas, atingindo o platô de ação biológica entre 6 e 8 horas, sem picos, o que simula a secreção basal normal de insulina. Existem ainda as insulinas e análogos bifásicos,

resultantes da mistura de formulações, como: a associação de 70% de insulina NPH com 30% de insulina regular (Humulin®70/30); a insulina lispro não cristalizada com a cristalizada com protamina (comercialmente conhecidos como Humalog® Mix 75/25 e Humalog® Mix 50/50); e a associação de diferentes porcentagens de asparte solúvel e asparte ligada à protamina (NovoMix® 30). Apesar de existirem todas essas formulações de insulina e haver a variabilidade de absorção entre indivíduos frente à administração das mesmas, atualmente são financiadas pelo Ministério da Saúde como política nacional de combate ao diabetes apenas as insulinas NPH e Regular, pelo seu baixo custo. Fica a critério dos Estados e Municípios solicitar a inclusão de outras insulinas conforme particularidades locais, e cabe ao MS aprovar tal fornecimento de acordo com evidências científicas comprovadas até o momento (BARNETT, KRALL, 2009; BRASIL, 2009; Diretrizes SBD, 2013; PIRES; CHACRA, 2008).

As características farmacocinéticas aproximadas e perfis de ação das preparações de insulina disponíveis no Brasil são apresentadas na figura 06.



Insulina	Início de ação	Pico de ação	Duração total
Rápida/Ultrarrápida			
Regular	30-60 min	2-4 horas	6-9 horas
Aspart/Lispro/Glulisina	10-15 min	30-90 min	3-4 horas
Ação intermediária			
NPH	1-2 horas	3-8 horas	12-15 horas
Insulina basal			
Glargina	1-2 horas	Sem pico	24 horas
Detemir	1-2 horas	Sem pico	20 horas
Pré-misturas			
70/30 NPH/Regular	30-60 min	3-8 horas (duplo)	12-15 horas
75/25 NPH/Lispro	10-15 min	30 min-8 h (duplo)	12-15 horas

Figura 06. Perfis de ação e características farmacocinéticas aproximadas das preparações de insulina disponíveis no Brasil (modificado de Diretrizes SBD, 2013).

1.3 Complicações crônicas decorrentes do Diabetes mellitus

A relação entre o controle metabólico em pacientes diabéticos e o desenvolvimento das complicações da doença a longo prazo ainda é assunto controverso. Somente nos últimos 15 anos foi demonstrado que as formas intensivas de terapia do diabetes, que apresentam como objetivo atingir valores glicêmicos próximos à normalidade, previnem o desenvolvimento e/ou reduzem a progressão das complicações associadas ao DM (NATHAN, 2009).

As complicações comprovadamente resultantes do diabetes mellitus não controlado decorrem de alterações microvasculares, que incluem retinopatia, neuropatia e nefropatia; e macrovasculares, como aterosclerose acelerada, acidente vascular cerebral e doença cardiovascular (ARYA, YADAV, SHARMA, 2011).

A partir de estudos em células β in vivo, foi verificado que altas concentrações de glicose aumentam a apoptose das células. A glicotoxicidade nas ilhotas de Langerhans do pâncreas é potencialmente irreversível, causada ao longo da exposição crônica a concentrações elevadas de glicose na condição do DM, com a diminuição característica da síntese e secreção da insulina (WAJCHENBERG, 2007).

O diabetes também foi identificado em estudos epidemiológicos como fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCC), que é um dos tipos de câncer de maior mortalidade no mundo. Sugere-se que a lesão crônica ao fígado, seguida por inflamação e regeneração irregular do órgão sejam aspectos importantes na hepatocarcinogênese (PAN, FU, HUANG, 2011).

Os efeitos do diabetes mellitus no sistema reprodutivo do homem ainda não foram totalmente esclarecidos, porém já foram descobertos altos níveis de fragmentação de DNA nuclear e deleções em DNA mitocondrial em espermatozóides de homens com DM 1 quando em comparação com os de homens não diabéticos, sendo que o dano genômico evidente pode ter implicações na fertilidade desses homens diabéticos (AGBAJE *et al.*, 2008).

Além dessas complicações classicamente conhecidas, a literatura científica tem chamado a atenção mais recentemente para a associação do DM2 e maior risco de desenvolvimento de Alzheimer e doença vascular. Além disso, o quadro de hiperglicemia causa consequências neurológicas, que embora ainda não sejam totalmente esclarecidas, podem influenciar largamente o metabolismo cerebral. Um ambiente com elevada concentração de glicose provoca, por exemplo, alterações nas células gliais, contribuindo para a fisiopatologia das desordens do SNC observadas na hiperglicemia e podem ser devido a um efeito direto da glicose, não envolvendo necessariamente um déficit de insulina. Alguns estudos mostram ainda que astrócitos em presença de elevada concentração de glicose apresentam diminuição de captação de glutamato, o que pode contribuir para o desenvolvimento da excitotoxicidade, que está relacionada com o aumento da excitabilidade neuronal com hiperativação dos receptores glutamatérgicos e influxo excessivo de Ca^{2+}. Essa elevação no influxo de Ca^{2+} juntamente à ativação de diversas proteínas, como proteases, fosfatases e fosfolipases, faz com que haja um aumento na produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, originando um quadro de estresse oxidativo sobre as células neurais, que levam a dano e morte neuronal (BANKS,

OWEN, ERICKSON, 2012; HUANG *et al*., 2012; MELLO, QUINCOZES-SANTOS, FUNCHAL, 2012; VALENTE *et al*., 2012).

Apesar de as complicações do Diabetes mellitus apresentarem origem multifatorial, atualmente a suspeita é de que a hiperglicemia crônica e consecutivo estresse oxidativo sejam as principais causas de lesão tecidual no paciente diabético. Foi evidenciado a partir de estudos epidemiológicos e clínicos em seres humanos, estudos in vivo em animais induzidos a diabetes mellitus e estudos para a elucidação de mecanismos bioquímicos, que a gravidade dessas complicações está relacionada com o tempo e severidade da hiperglicemia durante as formas de DM. Um desses estudos foi o *Diabetes Control and Complication Trial (DCCT)* em 1993 que confirmou que o controle mais rigoroso do DM1 permite redução substancial na incidência de complicações: de 54 a 76% no risco de desenvolvimento de retinopatia, 39 a 54% para microangiopatia e de 60% para neuropatia. O mesmo perfil foi obtido para o DM2, através do estudo *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS), publicado em 1998 (GIACCO, BROWNLEE, 2010; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; NATHAN, 2009; STITT, JENKINS, COOPER, 2002).

1.4 Hiperglicemia e mecanismos de lesão tecidual

Existem cinco hipóteses principais que explicam como a hiperglicemia resulta nas complicações crônicas do Diabetes mellitus: (1) o aumento da formação de produtos finais de glicação avançada (Advanced Glycated End-Products, AGE), gerando aumento de glicação de proteínas plasmáticas e da matriz extracelular; e

(2) consequente aumento da expressão dos seus receptores;(3) aumento do fluxo de glicose e outros açúcares na via dos polióis, gerando estresse oxidativo; (4) a ativação de isoformas da proteína cinase C (PKC), gerando aumento de citocinas, estresse oxidativo e fatores proliferativos; e (5) aumento no fluxo da via das hexosaminas, gerando aumento de citocinas. As evidências indicam que os cinco mecanismos são ativados por um único evento: a superprodução mitocondrial de espécies reativas do oxigênio (figura 07) (GIACCO, BROWNLEE, 2010).

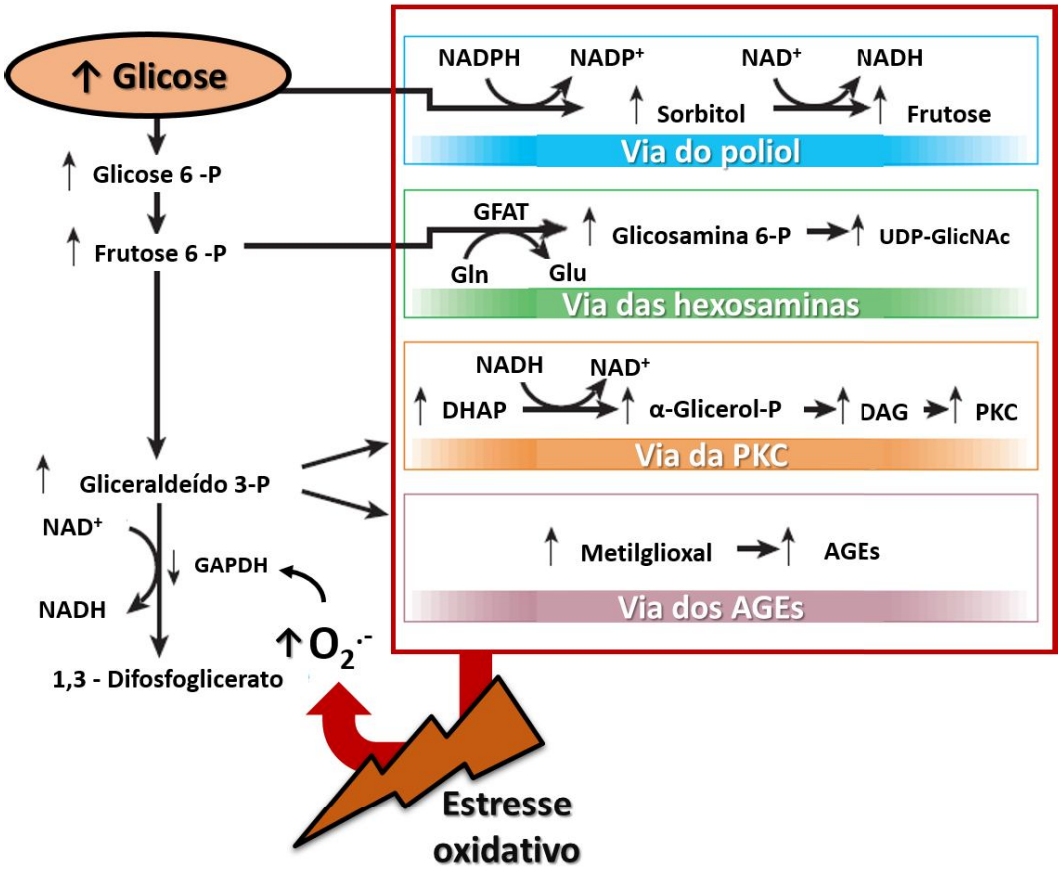


Figura 07. Ativação das cinco vias que levam ao estresse oxidativo e consequente dano tecidual a partir da hiperglicemia (modificado de BROWNLEE, 2001).

1.4.1 Formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs)

Os produtos finais de glicação avançada representam substâncias formadas por diferentes precursores a partir de glicação não enzimática. Por ser um processo independente de enzimas, a reação é modulada pelas concentrações de glicose e grupos amino livres, além da reatividade entre ambos e a meia-vida da molécula glicada. Dessa forma, o processo de glicação quando in vivo ocorre lentamente e é reversível em níveis de glicose fisiológicos, porém, é mais rápida quando existem elevados níveis de glicose, como em indivíduos diabéticos. A via clássica da glicação, também denominada reação de Maillard, apresenta três estágios: inicial, intermediário e tardio (figura 08). A reação é iniciada com a formação de base de Schiff instável, gerada pela reação de grupamento carbonila da glicose ou outros açúcares redutores (frutose, manose, galactose e xilose), com grupamentos amino livres, provenientes de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Na sequência, a base de Schiff sofre rearranjos, tornando-se uma estrutura mais estável, o produto de Amadori. No estágio intermediário, a partir de reações de oxidação e eliminação, os produtos de Amadori são degradados em compostos carbonil (glioxal, metilglioxal e deoxiglicosona), que apresentam maior reatividade em relação aos seus açúcares de origem. Dessa forma, no último estágio da reação, esses intermediários reativos são propagadores de reações com grupamentos amino de proteínas diversas, gerando de forma irreversível compostos insolúveis, os produtos finais de glicação avançada (BEM, KUNDE, 2006; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

Em pacientes diabéticos esses produtos estão presentes em diversos tecidos, sendo detectados em plasma humano, urina e fluido cerebroespinhal, além

de se acumularem em tecidos como retina e rins (BARBOSA, OLIVEIRA, SEARA,2008; MIYATA *et al*., 1998; THORNALLEY, 2005).

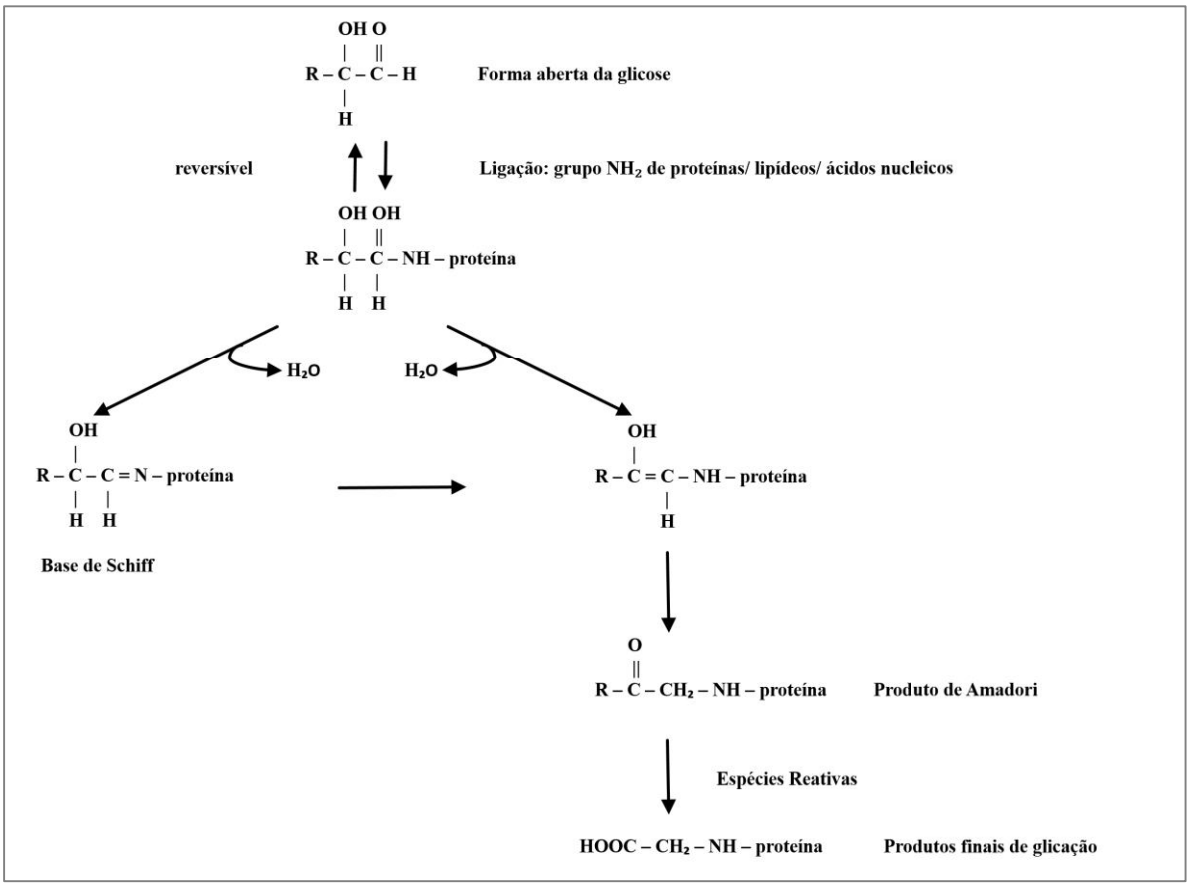


Figura 08. Estágios da reação de glicação não enzimática e produtos finais de glicação avançada (AGEs) (modificado de HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

Os AGEs podem causar lesão tecidual diretamente a partir de ligação cruzada com proteínas, ou indiretamente pela ligação a receptores específicos para AGE (RAGEs); e o dano tecidual se dá por três diferentes mecanismos (figura 09). O primeiro é decorrente da modificação de proteínas intracelulares pelos AGEs em células do endotélio, incluindo proteínas envolvidas na regulação de transcrição de

genes. O segundo se trata da modificação de componentes da matriz extracelular após os precursores de AGEs serem difundidos para o exterior da célula, apresentando como consequência a alteração da sinalização entre célula e matriz. Ao se difundirem para fora da célula, os precursores podem ainda alterar proteínas circulantes (como a albumina), que podem então se ligar aos receptores de AGEs (RAGEs) em células endoteliais, mesangiais e macrófagos, ativando-os, caracterizando o terceiro mecanismo de dano tecidual: essa ativação sinaliza reações em série que resultam na expressão de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, associados com as complicações vasculares (BROWNLEE, 2001; MIYATA *et al*., 1998; THORNALLEY, 2005).

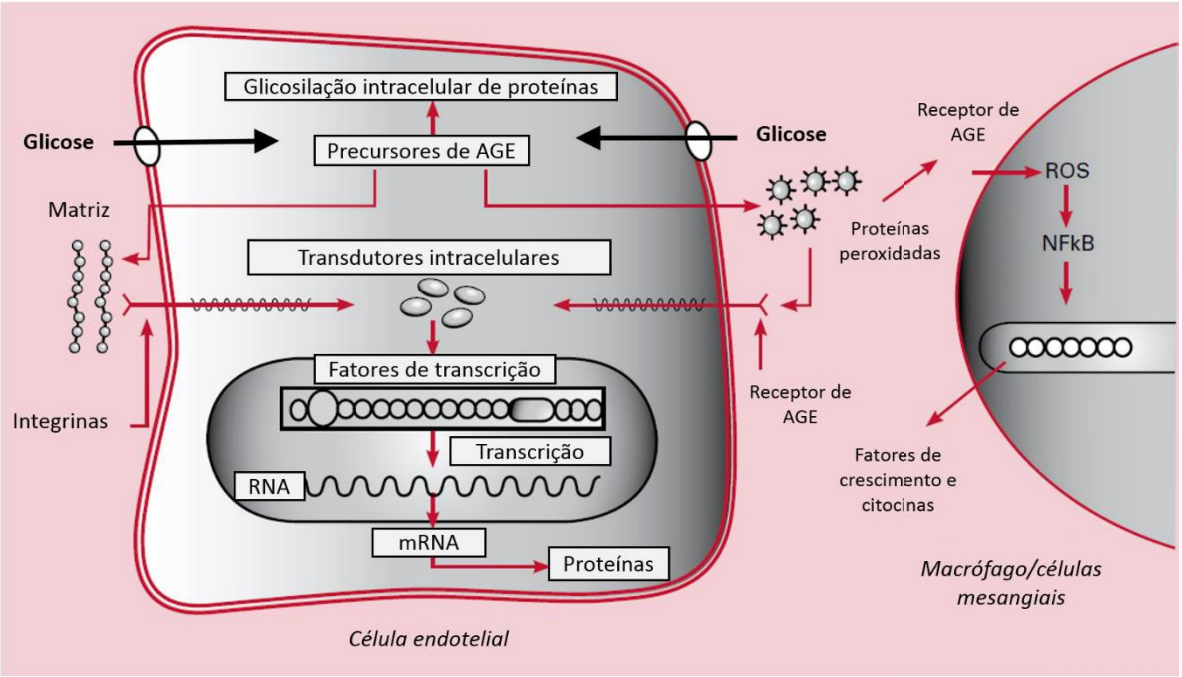


Figura 09. Mecanismos pelos quais os AGEs promovem dano tecidual em células endoteliais (modificado de BROWNLEE, 2001).

Nos últimos anos foi dada maior atenção para a caracterização de compostos proteína-AGEs e respectivas quantificações por métodos de HPLC-MS/MS. A escolha de um biomarcador para avaliar o processo de glicação em tecidos ou órgãos específicos ainda é complicada devido à distribuição desigual dos adutos proteína-AGEs pelo organismo, variação da estabilidade e disponibilidade limitada de padrões isotópicos estáveis para as quantificações. Produtos de glicação do DNA são potenciais biomarcadores, uma vez que todas as células contêm o mesmo conteúdo genético, podendo refletir os níveis dos precursores de AGEs nos tecidos alvos. Como principal resultado da interação da glicose (ou ainda metilglioxal e gliceraldeído) com DNA in vitro é obtida uma mistura diastereoisomérica do aduto N^2-(1-carboxietil)-2'-desoxiguanosina (CEdG) (figura 10) (SYNOLD *et al*., 2008; VOULGARIDOU *et al.*, 2011).

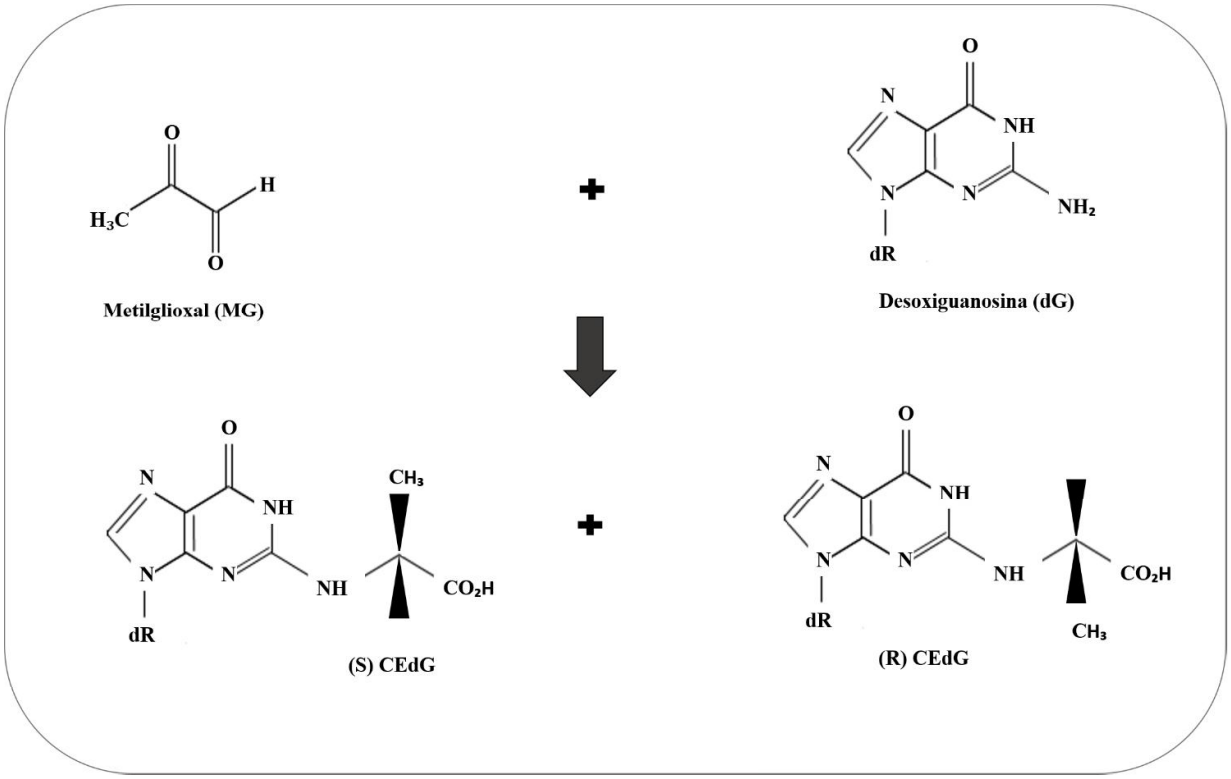


Figura 10. *N*²-(1-carboxietil)-2'-desoxiguanosina (CEdG): principal resultado da interação do metilglioxal (ou ainda glicose e gliceraldeído) com DNA (modificado de VOULGARIDOU *et al.*, 2011).

1.4.2 Aumento do fluxo de glicose pela via dos polióis

O principal mecanismo proposto para explicar como a ativação da via do poliol induzida pela hiperglicemia provoca dano tecidual é o aumento da suscetibilidade ao estresse oxidativo causado pelo consumo de NADPH e redução da concentração de agentes antioxidantes intracelulares (figura 11). A aldose redutase é uma enzima oxido-redutase citosólica que catalisa a redução de uma variedade de compostos carbonílicos, como a glicose, a seus respectivos polióis. É

encontrada em tecidos como nervos, retina, cristalino, glomérulos e células do endotélio vascular. Como a aldose redutase apresenta baixa afinidade pela glicose (alto k_m), em condições normoglicêmicas sua principal função é reduzir aldeídos tóxicos na célula em álcoois inativos. Nesse quadro, portanto, a via do poliol representa pequena porcentagem no metabolismo da glicose. Porém, a partir do aumento da captação celular de glicose na condição de hiperglicemia ocorre elevação do fluxo de glicose nessa via, havendo a conversão enzimática de glicose a sorbitol pela aldose redutase, e posterior oxidação à frutose pela enzima sorbitol desidrogenase (SDH). No processo de conversão de glicose a sorbitol, a aldose redutase consome o co-fator NADPH que é essencial no processo de regeneração de glutationa reduzida (GSH), ocorrendo a depleção desse agente antioxidante (BRONWLEE, 2001; BROWNLEE; GIACCO, 2010).

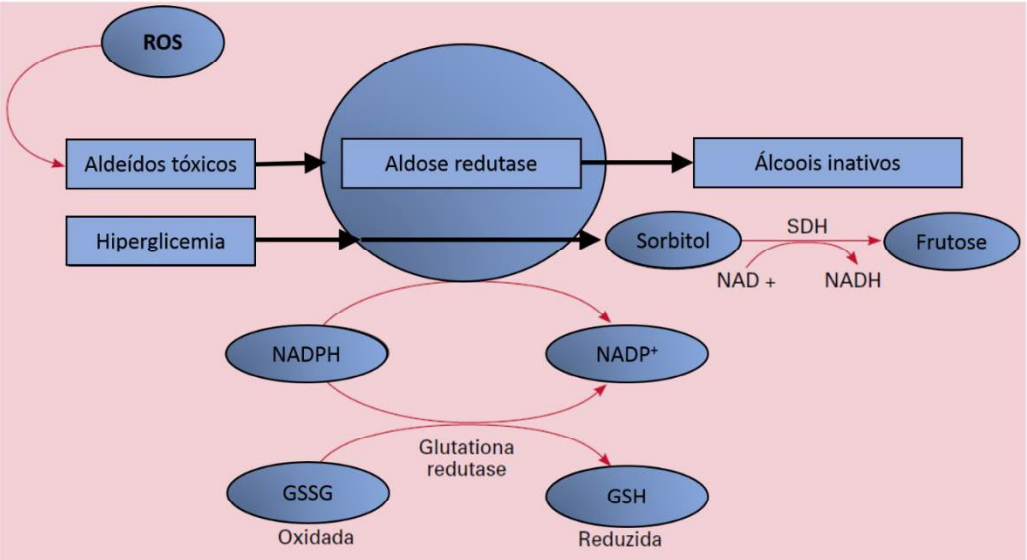


Figura 11. Via dos polióis (modificado de BROWNLEE, 2001).

1.4.3 Ativação de isoformas da proteína cinase C (PKC)

As proteínas cinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosfato do ATP (adenosina tri-fosfato) e, em casos excepcionais, de GTP (guanosina tri-fosfato), para treonina, serina (quinase específica para Ser/Tre) ou resíduos de tirosina (quinase específica para Tir). A fosforilação destes resíduos é responsável por estímulos extracelulares e intracelulares, que fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade de proteínas. A família de proteínas cinases C (PKC) de mamíferos compreende 10 isoenzimas. Da mesma forma que é responsável pela fosforilação de proteínas, a PKC também sofre fosforilações antes de ser ativada, o que ocorre durante sua translocação do citosol para a membrana da célula. Sua ativação e translocação do citosol à membrana plasmática ocorrem em resposta ao aumento de DAG (diacilglicerol) *in vivo* (ou ésteres de forbol, *in vitro*). O DAG é derivado de fontes como hidrólise de fosfatidilinositídeos, metabolismo da fosfatidilcolina por ação de fosfolipases ou pela síntese “de novo”. A ativação da PKC promove modulação na expressão de genes (figura 12): a atividade das enzimas NADPH oxidases é elevada, assim como ocorre o aumento na ativação do fator de transcrição NF-κB e da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), enquanto que a expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é diminuída, o que resulta no aumento do processo de angiogênese e permeabilidade vascular no Diabetes mellitus (BRONWLEE, 2001; ROCHA *et al.*, 2006).

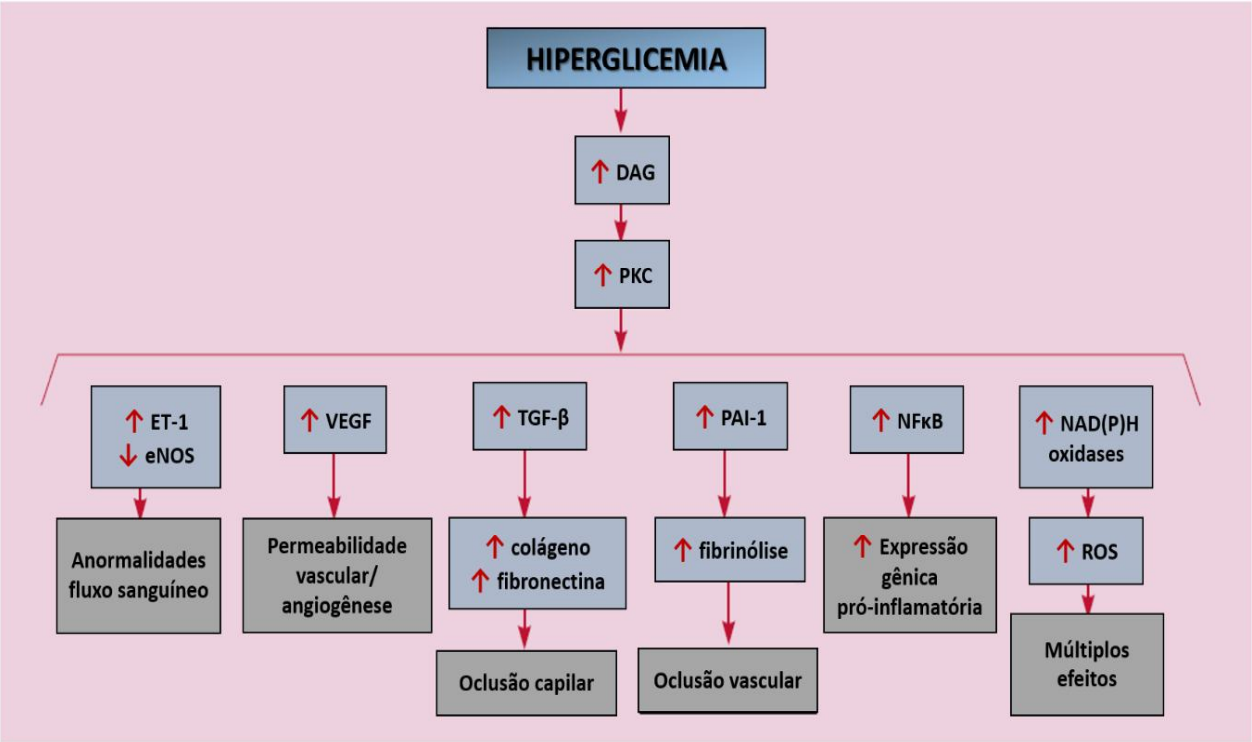


Figura 12. Modificações estruturais e funcionais decorrentes da ativação da via DAG-PKC por hiperglicemia. ET-1 = endotelina 1; eNOS = enzima óxido nítrico sintase endotelial; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular; TGF-β = fator transformador do crescimento beta; PAI-1 = inibidor do ativador de plasminogênio 1; NFκB = fator nuclear κ-B; NAD(P)H= forma reduzida de $NADP^+$; ROS = espécies reativas do oxigênio (modificado de BROWNLEE, 2001).

1.4.4 Aumento no fluxo da via das hexosaminas

O aumento da glicose intracelular tem como consequência o aumento do fluxo de frutose-6-fosfato, intermediário da via glicolítica, na via das hexosaminas, que promove a metabolização final deste composto a uridina difosfato-N-acetil glucosamina (UDP-GIcNAc), sendo sua formação em excesso responsável por modificações da expressão de genes, aumentando a produção de citocinas

inflamatórias e fatores de transcrição (figura 13) (BRONWLEE, 2001; ROCHA *et al.*, 2006).

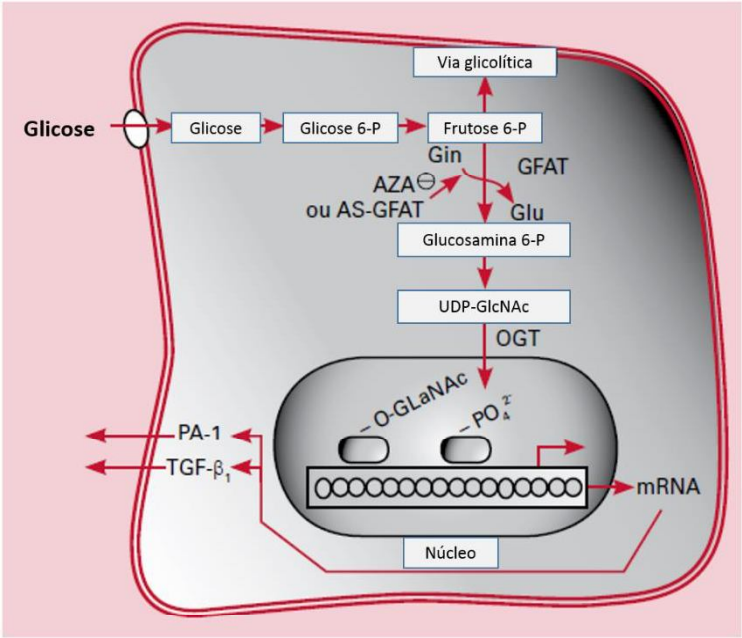


Figura 13. Aumento do fluxo na via das hexosaminas. Glicose 6-P = glicose 6-fosfato; Frutose 6-P = frutose 6-fosfato; Glucosamina 6-P = Glucosamina 6-fosfato; UDP-GlcNAc = uridina difosfato-N-acetil Glucosamina; GFAT = glutamina-frutose-6-fosfato aminotransferase; OGT = O-GlcNAc transferase (modificado de BROWNLEE, 2001).

1.5 ERONs e danos a biomoléculas

1.5.1 Espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ERONs)

Todas as formas de vida aeróbia estão constantemente sujeitas ao efeito oxidante dos metabólitos reativos do oxigênio, uma vez que estas espécies são

produzidas durante o metabolismo aeróbico. As espécies reativas do oxigênio (EROs) incluem os compostos químicos radicalares ou não, formados durante a ativação ou redução do oxigênio molecular. As espécies reativas do oxigênio apresentam papel fundamental em diversas funções fisiológicas, incluindo a sinalização celular, expressão gênica e regulação da resposta imune, e compreendem: os radicais superóxido ($O_2^{\bullet -}$), hidroxila ($^{\bullet}OH$), peroxil (RO_2) e alcoxil (RO); as espécies não radicalares peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$), oxigênio singlete ($^1\Delta gO_2$), ácido hipocloroso (HOCl) e ozônio (O_3); que apresentam diferenças no potencial de reatividade e tempo de meia-vida (DE OLIVEIRA, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2005).

Desde quando os organismos passaram a utilizar o O_2 para a respiração, na tentativa de impedir a ação tóxica das EROs, foram desenvolvidos os sistemas antioxidantes, que minimizam os efeitos nocivos da oxidação excessiva nos sistemas biológicos. Porém, quando ocorre alteração da sinalização *redox* e do controle das suas vias, é instalado o estado de estresse oxidativo. O sistema de defesa antioxidante pode ser classificado por dois mecanismos distintos: enzimático e não enzimático. O sistema enzimático é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx), e glutationa redutase (GR). Entre os componentes do sistema não enzimático atuam as vitaminas A, C e E (retinol, ascorbato e tocoferol, respectivamente), carotenoides e quelantes de metais (AUGUSTO, 2006; RABÊLO *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2005).

Quanto às fontes de espécies reativas do oxigênio, a mitocôndria é o principal local de produção. Grande parte da energia produzida no organismo é gerada por

meio de fosforilação oxidativa, correspondente a cinco complexos enzimáticos: os complexos de I a IV (cadeia de transporte de elétrons), que estão envolvidos no transporte de elétrons através de uma série de proteínas via reações de redução/oxidação, tendo como destino final uma molécula de oxigênio. Em circunstâncias normais, o oxigênio é, então, convertido em água no complexo IV, e a energia é estocada e usada para a produção de ATP no complexo V. Porém, durante esse processo, cerca de 2 a 5% do oxigênio consumido pela mitocôndria no complexo IV é convertido em uma das várias espécies reativas do oxigênio. A produção de EROs e seus derivados ocorre não só pela cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, mas também por múltiplos sistemas enzimáticos, incluindo ciclooxigenase, lipoxigenase, citocromo P-450, xantina oxidase (XO), mieloperoxidase (MPO), óxido nítrico sintase (NOS) e NADPH oxidase, sendo este último complexo de destaque na formação de EROs, por ser responsável, no Diabetes mellitus, pela principal geração de ânion superóxido (RABÊLO *et al.*, 2010; RIBEIRO et al., 2005).

As NAPH oxidases constituem uma família de complexos enzimáticos transmembrana, cuja função biológica é gerar ROS, por catalisar a redução do oxigênio molecular para ânion superóxido e peróxido de hidrogênio em compartimentos intracelulares e extracelulares. A NADPH oxidase é composta por seis subunidades: duas proteínas transmembrana (p22phox e gp91phox), que formam o flavocitocromo b558 e são formadoras do sítio catalítico da enzima; três proteínas citosólicas (p40phox, p47phox e p67phox); e uma GTPase (Rac1 ou Rac2). A separação destes dois grupos de componentes em compartimentos distintos garante a regulação do complexo enzimático, e a ativação da enzima se

dá pela fosforilação da proteína citoplasmática p47phox, levando todo o complexo citoplasmático a migrar para a membrana e se associar ao citocromo b558. São conhecidas sete isoformas desse complexo enzimático, que compreende as subunidades catalíticas NOX1-5 (NADPH oxidase 1,2,3,4 e 5) e DUOX 1 e 2 (dual oxidase 1 e 2). Estes sete complexos apresentam entre si diferenças quanto a localização nos tipos celulares, preferência por substratos e tempo de atividade. Combinando a localização diversificada das enzimas Nox na célula e a sua justaposição com vias de sinalização específicas, ocorre a modulação precisa dos níveis de ROS para controlar os eventos de sinalização celular dependentes destas espécies químicas. A exposição elevada a glicose, como ocorre durante a hiperglicemia crônica, promove a ativação do complexo NADPH oxidase pela fosforilação da subunidade citosólica p47phox com sua subsequente translocação para a membrana, ativando o complexo e aumentando a produção de espécies reativas. A geração do ânion superóxido pela NADPH oxidase também depende da disponibilidade de equivalentes redutores, ou seja, do NADPH gerado na via das pentoses (GHOULEH *et al.*, 2011; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; RABÊLO *et al.*, 2010).

1.5.2 Inflamação crônica

Quando ocorre lesão em tecidos, é desenvolvida uma resposta inflamatória aguda, caracterizada por calor, rubor, inchaço, dor e perda parcial de função (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). Entretanto, quando a causa de tal inflamação persiste, como no caso do diabetes em que ocorre lesão celular em diversos tecidos,

é desenvolvida a inflamação crônica, tendo como características principais o acúmulo e ativação de macrófagos, que contribuem para dano tecidual adicional (KINDT, GOLDSBY, OSBORNE, 2008).

Como ilustrado na figura 14, fagócitos ativados geram uma variedade de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio que podem causar danos diretos a todos os tipos de biomoléculas, além de alterar a fisiologia da célula. Esses mediadores da inflamação participam de uma ampla gama de reações, incluindo nitrosação, nitração, oxidação e halogenação. Macrófagos ativados geram óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), que em baixas concentrações (na ordem de nM), em condições normais (de não inflamação) é uma importante molécula sinalizadora e reguladora dos sistemas cardiovascular, nervoso e imunológico. Porém, a produção de altas concentrações de $NO^{\bullet}$ (da ordem de µM) por macrófagos em locais de inflamação é considerada patológica devido à interferência em vias de sinalização do $NO^{\bullet}$ ou por reações com oxigênio e superóxido ($O_2^{\bullet-}$), gerando uma variedade de espécies reativas de nitrogênio (LONKAR, DEDON, 2011).

A partir da auto-oxidação do $NO^{\bullet}$, é gerado o anidrido nitroso (N_2O_3), que é considerado um agente de nitrosação, enquanto que a reação de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) com $NO^{\bullet}$ leva à geração de peroxinitrito ($ONOO^-$), que na sua forma protonada sofre lise rápida para produzir radicais hidroxila ($^{\bullet}OH$) e o radical dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\bullet}$). A reação adicional de peroxinitrito ($ONOO^-$) com dióxido de carbono leva à formação de nitrosoperoxicarbonato ($ONOOCO_2^-$), que também sofre cisão homolítica para formar ânion radical carbonato ($CO_3^{\bullet-}$) e radical dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\bullet}$). Os neutrófilos, pela mediação da mieloperoxidase (MPO), contribuem para

a inflamação com a geração de ácido hipocloroso (HOCl), que é um potente agente de oxidação e halogenação (LONKAR, DEDON, 2011).

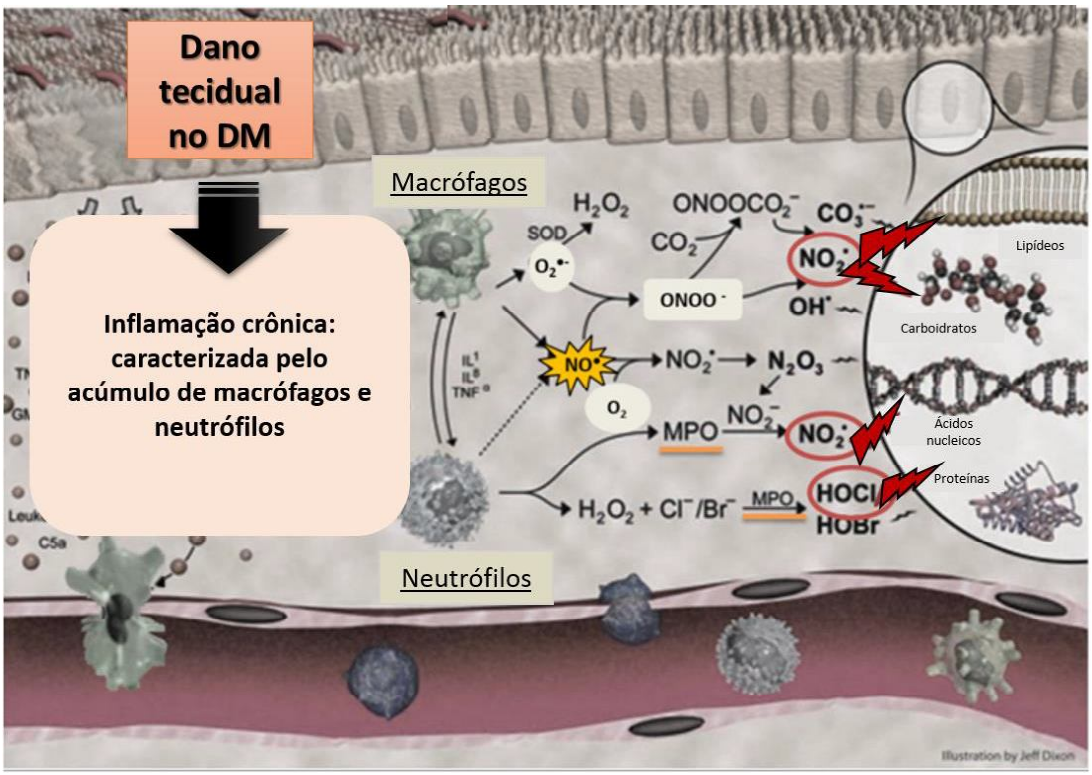


Figura 14. Aspectos biológicos e químicos da inflamação crônica (modificado de LONKAR, DEDON, 2011).

1.5.3 Halogenação

A ativação de macrófagos, monócitos e neutrófilos em tecidos inflamados resulta na indução da heme proteína mieloperoxidase (MPO). Essa enzima gera oxidantes reativos, que são responsáveis pela defesa contra microorganismos invasores a partir de oxidação dos seus constituintes celulares. Um dos potentes

oxidantes citotóxicos provenientes da ação da MPO é o ácido hipocloroso (HOCl), que também promove o aumento significativo na lesão celular, refletindo na peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA. Foram identificados como produtos de cloração do DNA pelo HOCl os adutos 8-cloro-2'-desoxiadenosina (8- Cl-dA) e 8-cloro-2'-desoxiguanosina (8-Cl-dG), sendo este último recentemente detectado em DNA hepático de ratos tratados com lipopolissacarídeo (LPS) e na urina de pacientes com carcinoma hepatocelular. (ASAHI *et al.*, 2010; BADOUARD *et al.*, 2005; MASUDA *et al.*, 2001; SASSA *et al.*, 2013).

1.5.4 Lesões no material genético

Os mediadores químicos reativos do estresse oxidativo são capazes de danificar os ácidos nucleicos por duas vias. Uma envolve a reação direta com DNA e RNA, pela nitrosação, oxidação e halogenação; e a outra consiste em dano indireto com formação de adutos de DNA com eletrófilos gerados de outras reações com ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), proteínas, lipídeos e até mesmo com os próprios ácidos nucleicos (figura 15). Além da indução de lesões, o estresse oxidativo contribui para a expressão anormal de genes, bloqueio de comunicação célula a célula e modificação de sistemas de mensageiros secundários (LONKAR, DEDON, 2010; REUTER *et al.*, 2010).

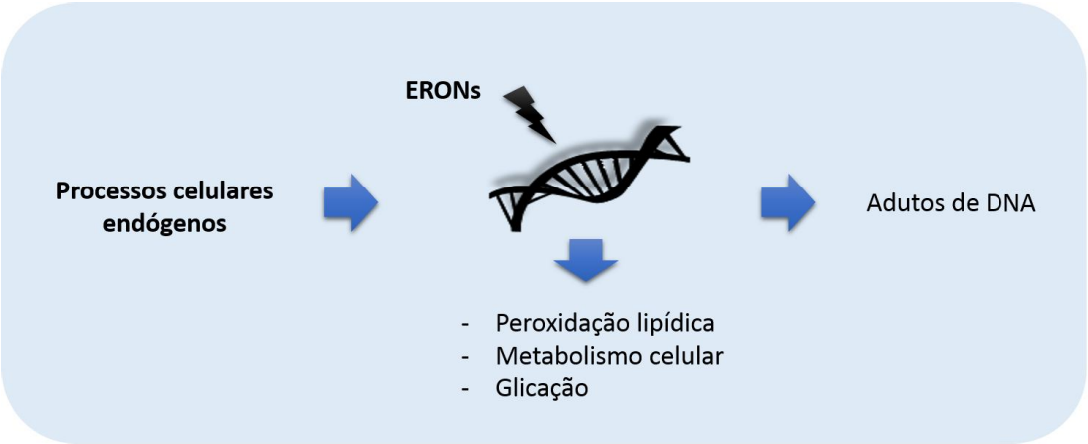


Figura 15. Danos induzidos pela interação do DNA com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) (modificado de VOULGARIDOU et al., 2011).

1.5.5 Peroxidação lipídica

ERONs muito reativas, como o radical hidroxila, são capazes de abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo bis alílico metileno em diferentes pontos da cadeia de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) de membranas celulares, em um processo denominado peroxidação lipídica, resultando em hidroperóxidos e produtos secundários. Uma vez que esse processo é iniciado, se processa como uma reação em cadeia mediada por radical livre, envolvendo iniciação, propagação e término (Figura 16). A fase de iniciação é caracterizada pela abstração do átomo de hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado, que leva à formação de um radical lipídico, sendo estabilizado por um rearranjo molecular, e depois adquire a estrutura de dieno conjugado. A fase de propagação é caracterizada pela rápida adição de uma molécula de oxigênio ao radical lipídico, levando à formação do radical peroxil,

que é capaz de reagir com outro ácido graxo, iniciando nova cadeia de oxidação e formando novo radical lipídico. O término da peroxidação lipídica ocorre quando o radical lipídico e o radical peroxil produzidos na etapa anterior reagem entre si gerando produtos não radicalares. A decomposição dos hidroperóxidos, além de gerar radicais que propagam a peroxidação lipídica, resulta em produtos não radicalares (aldeídos, cetonas e epóxidos, por exemplo) que são mais estáveis do que as espécies reativas que deram início ao processo, o que permite a sua difusão pela célula para reagir com proteínas e DNA (AUGUSTO, 2006; FERREIRA, MATSUBARA, 1997; KLAUNIG *et al.*, 2011; LOUREIRO, MASCIO, MEDEIROS, 2002).

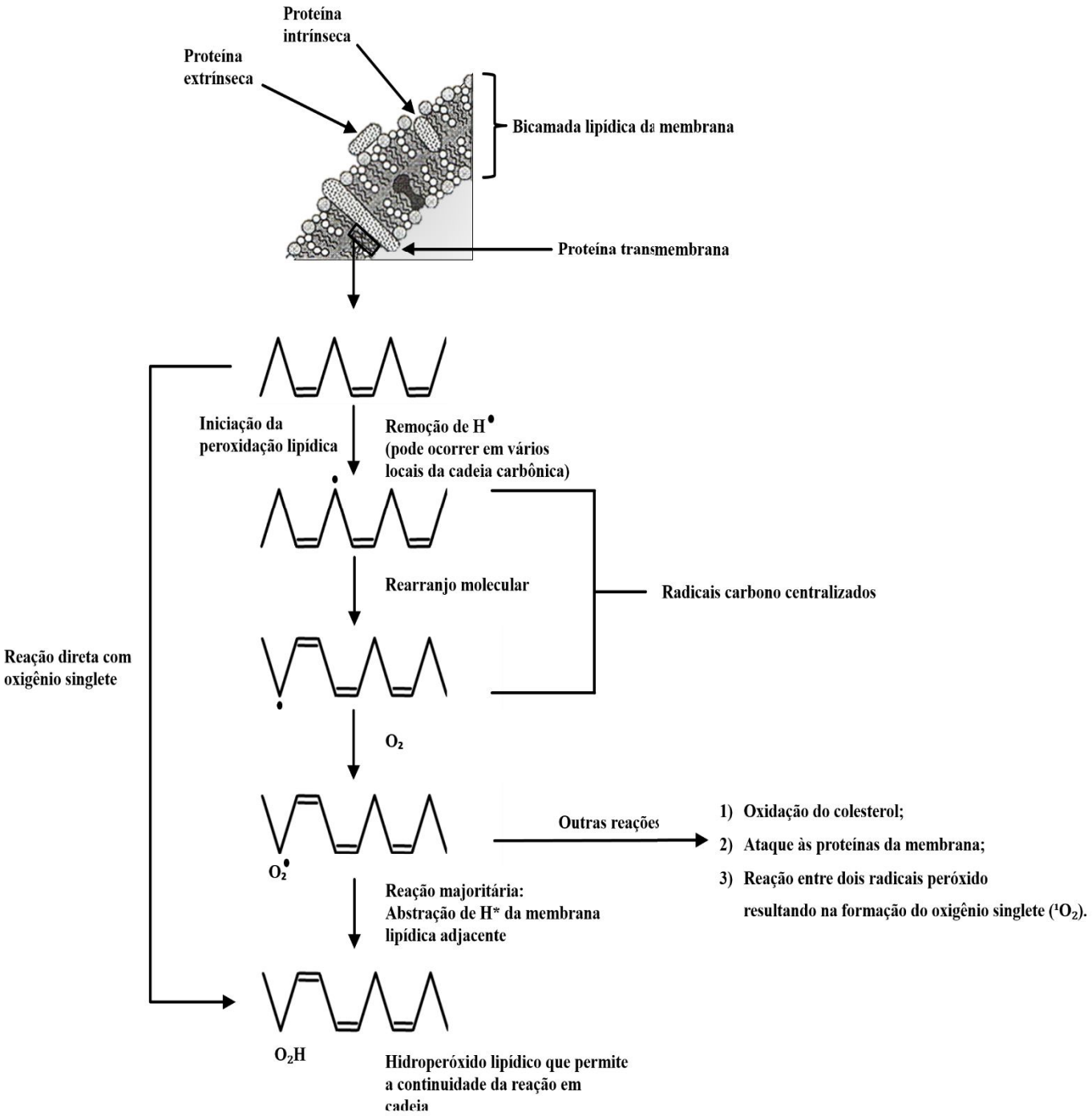


Figura 16. Etapas de iniciação, propagação e término do processo de peroxidação lipídica (modificado de HALIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

1.5.6 Dano oxidativo ao DNA

A frequência estimada de ocorrência do dano oxidativo ao DNA é de 10^4 lesões/célula/dia em humanos. Os radicais livres podem atacar tanto as bases púricas como as pirimidínicas, assim como a desoxirribose da cadeia principal. Os danos induzidos por interações de espécies reativas com as bases de DNA incluem quebras de fitas, modificações de bases, modificação na desoxirribose e ligação cruzada; além de ser possível a reação de intermediários de processo oxidativo de proteínas e lipídeos com o DNA, com posterior formação de adutos de DNA. (HALLIWELL, GUTERIDGE, 2007; KLAUNIG *et al.*, 2011).

Já foram identificadas ao menos 24 modificações de bases relacionadas com ataque de ROS ao DNA. Dentre essas bases modificadas, um dos biomarcadores de estresse oxidativo mais estudados *in vitro* e *in vivo* é a 7,8-diidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), que é formada a partir do ataque direto do radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) ou oxigênio singlete ($^1\Delta gO_2$) à 2'-desoxiguanosina (dGuo). Os níveis de 8-oxodG em diferentes tipos celulares em humanos e animais na situação do Diabetes mellitus se apresentaram elevados, indicando que a indução de estresse oxidativo ocorre de forma generalizada na doença. As evidências sobre os níveis teciduais de 8-oxodG são na maioria derivadas de estudos com animais. Em ratos induzidos ao DM por estreptozotocina, os níveis da lesão se demonstraram mais elevados, em comparação aos animais controles, em tecidos como rim, fígado, coração e retina. Estudos de células humanas mostraram um aumento dos níveis de 8-oxodG no vítreo de pacientes com retinopatia diabética, em células pancreáticas de pacientes com DM2 e em células endoteliais humanas isoladas

expostas a elevadas concentrações de glicose. Além dos estudos em células de mamífero, as propriedades biológicas da 8-oxodG também foram amplamente investigadas em bactérias, sendo apresentada capacidade de mutagenicidade, levando principalmente a transversões G → T (encontradas em genes supressores de tumor e proto-oncogenes mutados) ou bloqueando o processo de transcrição. Evidencia-se ainda a importância da lesão 8-oxodG pela existência de mecanismos de reparo específicos, capazes de identificar e remover esta lesão do DNA (BROEDBAEK *et al*., 2011; CADET, DOUKI, RAVANAT, 2008; DE OLIVEIRA, 2012; KLAUNIG *et al.*, 2011; LOUREIRO, MASCIO, MEDEIROS, 2002).

Os hidroperóxidos provenientes da peroxidação lipídica promovem danos ao DNA a partir da sua decomposição catalisada por metais, que gera radicais alcoxil e peroxil, além de produtos secundários, como os aldeídos. Os principais aldeídos formados na peroxidação lipídica são o malonaldeído (MDA), 4-hidroxinonenal, crotonaldeído (2-butenal) e acroleína (2-propenal). Por sua vez, esses aldeídos geram lesão ao DNA a partir da formação de adutos exocíclicos, como propanoadutos, adutos de MDA e etenoadutos. Os etenoadutos são adutos com um anel de cinco membros. São estruturas geradas pela ligação de epóxidos reativos provenientes de oxidação de aldeídos α,β-insaturados, com o DNA. Dentre os adutos já encontrados em amostras de DNA humano estão 1,N^6-eteno-2'-desoxiadenosina (1,N^6-εdAdo) e 1,N^2-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N^2-εdGuo). (GARCIA *et al*, 2010; MEDEIROS, 2009; NAIR, BARTSCH, NAIR, 2007).

A formação dos adutos 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG); 1,N^6-eteno-2'-desoxiadenosina (1,N^6-εdAdo); e 1,N^2-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N^2-εdGuo) está representada na figura a seguir.

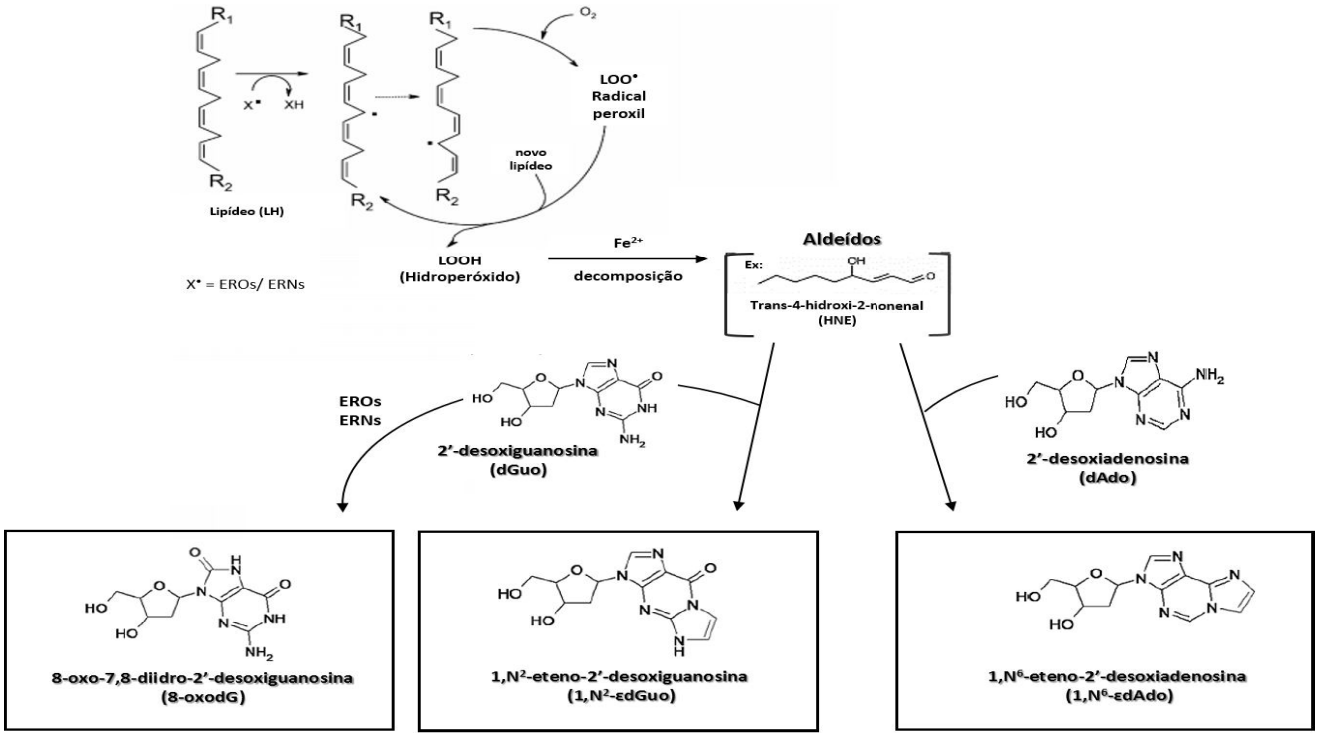


Figura 17. Formação dos adutos 8-oxo-7,8-diidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG); 1,N^6-eteno-2'-desoxiadenosina (1,N^6-εdAdo); e 1,N^2-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N^2-εdGuo) (modificado de ALMEIDA *et al*., 2003).

1.6 Indução de DM em animais para experimentação

Uma vez que estudos em humanos para compreensão das alterações metabólicas causadas pelo DM acabam apresentando limitações, seja por razões éticas ou por múltiplas variáveis de difícil controle, torna-se necessária a utilização de modelo animal adequado para estudar tal doença. Animais para experimentação têm sido extensivamente utilizados em pesquisas sobre o diabetes mellitus. Além de promover a compreensão dos mecanismos de patogênese e complicações decorrentes da doença, é possível delinear estratégias preventivas e investigar os possíveis tratamentos para pacientes diabéticos. A indução do DM em animais tem sido realizada principalmente a partir da administração de agentes químicos β-citotóxicos como a aloxana e a estreptozotocina, que por sua semelhança estrutural com a glicose são transportados para dentro da célula β através dos transportadores GLUT 2. As células β do pâncreas são mais sensíveis a ação desses agentes químicos em relação a outros tipos celulares devido à sua baixa expressão gênica de enzimas antioxidantes, o que confere a essas células alta capacidade em acumular a droga e consequente suscetibilidade aos danos provocados pela mesma. Embora os dois compostos apresentem a mesma seletividade tóxica às células beta do pâncreas em roedores, os mecanismos de ação citotóxica dos dois compostos são distintos (LENZEN, 2008; MATHEUS, LEITER, 2009)

A aloxana apresenta dois mecanismos distintos de ação. Primeiramente promove a inibição seletiva da secreção de insulina induzida pela glicose a partir da inibição da enzima glicoquinase, que funciona como um sensor para a entrada de

glicose nas células β. Dessa forma, uma vez inibida, ocorre a diminuição na oxidação da glicose e respectiva formação de ATP. O segundo mecanismo de ação da aloxana é caracterizado pela geração de espécies reativas do oxigênio. Na presença de tióis intracelulares, especialmente a glutationa, a aloxana gera EROs em uma reação *redox*, que forma seu produto de redução, o ácido dialúrico. A auto-oxidação do ácido dialúrico gera radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e na etapa final de reação catalisada por ferro, radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), que é responsável pela morte das células beta devido a sua capacidade de defesa antioxidante particularmente baixa (LENZEN, 2008).

A estreptozotocina (STZ) é uma glicosamina pertencente à classe das nitrosoureias, originalmente derivada do micro-organismo do solo *Streptomyces achromogenes*. A STZ foi identificada na década de 1950 e foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de câncer metastático de células das ilhotas pancreáticas devido sua capacidade de reduzir a secreção excessiva de insulina pelos insulinomas. O tratamento clínico com estreptozotocina contra o câncer envolve doses repetitivas e significativamente baixas, muito menores que a necessária para a indução de diabetes em modelo animal e além disso as células β humanas apresentam-se resistentes a essa substância. Esses dois fatores explicam porque o diabetes não é um efeito colateral comum nos pacientes tratados com estreptozotocina (LENZEN, 2008; SKUDELSKI, 2001).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os danos provocados às células β pancreáticas de ratos experimentais expostos a STZ. Sugere-se que o composto atua como agente alquilante sobre a estrutura do DNA por radical $^{\bullet}CH3$. Além disso, o grupo N-metil-nitrosoureia inibe a atividade da enzima superóxido

dismutase (SOD) permitindo o acúmulo de EROs, como radical superóxido($O_2^{\bullet -}$), radical hidroxila (•OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que provocam elevação na peroxidação lipídica e diminuição na atividade das outras enzimas antioxidantes das células β. O acúmulo dessas espécies tóxicas promove degradação do DNA nuclear, e assim ocorre a ativação da poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1), enzima reparadora de DNA, que utiliza como substrato a forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD+). A elevação da atividade desta enzima provoca a depleção de NAD+ intracelular, levando à inibição do ciclo do ácido tricarboxílico e diminuição substancial do consumo de oxigênio pela mitocôndria, limitando a produção de ATP, que resulta em apoptose celular. A administração de STZ tem sido amplamente utilizada para a indução de diabetes mellitus em animais. Por se tratar de um modelo bem caracterizado do DM1, por apresentar os principais sintomas da doença: polidipsia, polifagia, poliúria, perda de peso; assim como insuficiência na produção de insulina; é possível estudar *in vivo* os mecanismos de danos às biomoléculas provocados pela doença, tais como estresse oxidativo, glicação avançada e inflamação, que promovem o aparecimento das complicações crônicas nos pacientes diabéticos (LENZEN, 2008; MATHEUS, LEITER, 2009; SKUDELSKI, 2001).

Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar o dano oxidativo e resultante de glicação avançada em rim, fígado, cerebelo, sangue e urina de animais diabéticos, assim como a modulação do dano por diferentes períodos de tratamento com insulina, a fim de verificar se o controle da glicemia nos animais diabéticos protege contra a indução dos danos em biomoléculas.

Dessa forma foi desenvolvido o seguinte plano:

a. Síntese dos adutos de DNA (CEdG e 8-CldG) e respectivos padrões isotópicos.

b. Tratamento dos animais a partir da administração de estreptozotocina em ratos da linhagem Sprague-Dawley para indução à DM e posterior tratamento com insulina NPH (Humulin® N, *Eli lilly*).

c. Quantificação de malonaldeído em plasma, fígado e rim; nitrito no soro e creatinina no plasma e na urina.

d. Extração de DNA de fígado, rins e cerebelo; e hidrólise enzimática imediatamente antes das análises.

e. Quantificação dos adutos 1,N^2-εdGuo, 1,N^6-εdAdo, 8-oxodG e CEdG nas amostras de DNA.

f. Quantificação dos adutos 1,N^2-εdGuo, 1,N^6-εdAdo, 8-oxodG e CEdG por HPLC-MS/MS em urina.

g. Análise da metilação global do DNA.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Todas as substâncias empregadas neste trabalho foram do mais alto grau de pureza disponível comercialmente: Metanol e Acetonitrila, ambos grau HPLC, foram obtidos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha); insulina Humulin® N (NPH) da Eli Lilly (São Paulo, Brasil); os kits para a extração de DNA (Gentra Puregene® Kit) foram fornecidos pela empresa QIAGEN Sciences (Mayland, EUA); os kits para determinação de creatinina e reagentes para quantificação de hemoglobina glicada foram obtidos da Labtest (Minas Gerais, Brasil); isoflurano foi obtido pela Abbott (Rio de Janeiro, Brasil); e a água utilizada nos experimentos e sistemas analíticos foi purificada por sistema MilliQ® (Millipore, Bedford, EUA). Todos os outros reagentes utilizados foram provenientes da empresa Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, EUA).

3.2 Equipamentos

3.2.1 Equipamentos básicos

Foram utilizados no decorrer deste trabalho: Balança semi-analítica, modelo FA210N (marca Bioprecisa, Japão); balança analítica modelo AT261 (marca Mettler Toledo, EUA); pHmetro modelo PHS-3B (marca PHTEK, Brasil); agitador de tubos modelo AP56 (marca Phoenix, Brasil); e agitador magnético modelo 78HW-1 (marca Biomixer, Brasil).

As centrifugações de tubos de 1,5 e 2 mL foram realizadas em microcentrífuga modelo Mikro 120 (marca Hettich, Alemanha), e de tubos de 15 e 50 mL em centrífuga modelo 5702R (marca Eppendorf, Alemanha) disponibilizada pela Profa. Dra. Tânia Marcourakis (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF-USP, São Paulo, Brasil).

As incubações que necessitavam de aquecimento e agitação foram feitas em incubadora modelo Vortemp56 (marca Labnet, EUA), ou Termomixer R (marca Eppendorf, Alemanha) e as incubações em banho-maria foram feitas em banho modelo 245 (marca Cientec, Brasil).

Para as liofilizações foi utilizado um concentrador a vácuo da marca *miVAC* (Ipswich, UK) do tipo modular, composto por uma câmara de concentração (*quattro concentrator*), um condensador de solvente (*speed trap*), um módulo de controle de pressão e uma bomba de vácuo.

3.2.2 Espectrofotômetros

Os espectros de absorbância foram adquiridos em um espectrofotômetro modelo Libra S12 da Biochrom (Cambridge, Reino Unido). As leituras de absorbância em UV/VIS para amostras cujo preparo foi realizado em placas para cultura de células de 96 poços foram conduzidas no espectrofotômetro modelo *SpectraMAx 190*® (marca Molecular Devices, USA) e os dados gerados foram analisados pelo software *SoftMax Pro* versão 5.4, disponibilizado pela Profa. Dra. Tânia Marcourakis (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF-USP, São Paulo, Brasil).

3.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

3.2.3.1 HPLC-DAD

Todas as análises e purificações realizadas com UV/VIS foram conduzidas em um equipamento da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, uma válvula FCV-20AH2, um detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A, um auto-injetor (Proeminence SIL-20AC), e um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação CBM-20A. Os dados foram processados pelo software LC-Solution 1.21. (Shimadzu, Japão). Os sistemas e respectivas condições cromatográficas são descritos no decorrer de cada método.

3.2.3.2 HPLC-ESI-MS/MS

As análises por ESI-MS/MS foram realizadas utilizando-se dois espectrômetros de massas disponibilizados no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP, São Paulo, Brasil) e descritos a seguir. A otimização do sistema e as condições de eluição empregadas são descritas no decorrer de cada método.

ESI-MS/MS 1. O sistema analítico é constituído por HPLC da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AD,uma válvula SPD-M20A, um detector de arranjo de fotodiodos DGU-20A/ 3R, um auto-injetor (Proeminence SIL-20AC), e um forno para colunas (CTO-10AC) controlado por

um módulo de comunicação CBM-20A; acoplado ao espectrômetro de massas modelo AmaZon Speed (Bruker Daltonics), com fonte ESI, duplo funil de íons e analisador tipo Ion Trap, disponibilizado pela Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros.

***ESI-MS/MS 2*.** O sistema analítico é constituído por HPLC Agilent 1200 (Wilmington, DE, USA), equipado com uma bomba binária (Agilent 1200 G1312B), uma bomba isocrática (Agilent 1200 G1310A), um forno para coluna (Agilent 1200 G1316A), um detector de absorbância de arranjo de diodos (Agilent 1200 DAD G1315C), e um injetor automático (Agilent 1200 G1367C). O sistema de HPLC é integrado a um espectrômetro de massas Linear Quadrupole Ion Trap modelo 4000 QTRAP (Applied Biosystems/MDS Sciex Instruments, Foster City), disponibilizado pelo Prof. Dr. Paolo Di Mascio.

3.3 Síntese, purificação e caracterização de adutos de DNA

Os adutos CEdG e 8-CldG foram preparados tendo como base os métodos apresentados a seguir. Os padrões 8-oxodG e 1,N^6-εdAdo foram provenientes da empresa Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, EUA); e 1,N^2-εdGuo, assim como todos os respectivos padrões internos foram sintetizados e purificados pelo nosso grupo de pesquisa.

3.3.1 Aduto N2-(1-carboxietil)-2'–desoxiguanosina (CEdG)

As etapas de síntese do aduto CEdG foram realizadas de acordo com método desenvolvido por Synold *et al*. (2008), em que DL-gliceraldeído é utilizado para geração de metilglioxal *in situ* por desidratação catalisada pela guanina. Para tanto, DL-gliceraldeído (9,5 mg) foi adicionado a 10 mg de desoxiguanosina, 12,3 mg de fosfato de potássio diidrogenado e 24 mg de fosfato dissódico hidratado em 88 µL de H_2O. Após 14 dias de incubação a 40ºC foi obtida uma solução viscosa de coloração amarelo-avermelhada.

Em seguida o produto obtido foi purificado por sistema HPLC-DAD utilizando o equipamento descrito no item **3.2.3.1** de Material e Métodos. A condição cromatográfica é descrita a seguir (**Condição Cromatográfica 1**). O produto correspondente à CEdG, com $\lambda_{máx}$ em 255 nm foi coletado e liofilizado até o volume final de 1 mL. Alíquotas dessa nova solução foram injetadas novamente no sistema HPLC-DAD, sendo utilizada a **Condição Cromatográfica 2** para a remoção do sal da amostra.

O pico com espectro de absorbância correspondente à CEdG foi coletado, seco e ressuspenso em 200 µL de água. A concentração foi determinada pela intensidade de absorbância em 255 nm (ε_{255nm} = 12300), a partir de solução preparada em água.

O padrão interno foi obtido substituindo-se desoxiguanosina por [$^{15}N_5$]-desoxiguanosina na reação, para sua posterior utilização como padrão interno na quantificação das lesões.

A identidade e pureza isotópica do aduto foram confirmadas pelos sistemas analíticos **ESI-MS/MS 1** e **ESI-MS/MS 2**, descritos no ítem **3.2.3.2** de

Material de Métodos, utilizando as **Condições Cromatográficas 3 e 4**, respectivamente.

Condição Cromatográfica 1: Coluna Cromatográfica Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), eluída com um gradiente de tampão acetato de amônio (50 mM, pH 7) (Bomba A) e acetonitrila (ACN) (Bomba B), com fluxo de 1 mL/min, a 18°C. A concentração de ACN foi aumentada de 0 a 4% nos primeiros 5 minutos, de 4 a 6,5% nos próximos 30 minutos, mantida em 6,5% por 5 minutos e então levada a 100% para retirada de material residual da coluna. A análise do produto CEdG foi feita a 255 nm, com tempo de retenção de aproximadamente 23-25 min.

Condição Cromatográfica 2: Coluna Cromatográfica Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), eluída com água (Bomba A) e metanol (Bomba B), com fluxo de 1 mL/min a 18°C. A concentração de metanol foi aumentada de 10% a 100% durante os primeiros 45 minutos da corrida cromatográfica, sendo depois mantida em 100% durante 10 minutos para retirada de material residual da coluna. A análise do produto CEdG foi feita a 255 nm, com tempo de retenção de aproximadamente 28-30 min.

Condição Cromatográfica 3: Coluna cromatográfica Luna C18 (2) 150 mm x 2 mm, 3 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x

3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), eluída com um gradiente de água e ácido fórmico 0,1% (Bomba A) e Acetonitrila (Bomba B), com fluxo de 0,25 mL/min a 25°C. A concentração de ACN foi iniciada em 5% e aumentada para 100% em 30 minutos.

Condição Cromatográfica 4: Coluna cromatográfica Luna C18 (2) 150 mm x 2 mm, 3 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), eluída com um gradiente de água e ácido fórmico 0,1% (Bomba A) e Metanol (Bomba B), com fluxo de 0,25 mL/min a 25°C. A concentração de metanol foi iniciada em 8%, aumentada de 8% a 100% em 35 minutos e mantida em 100% durante os próximos 5 minutos, o que permite a visualização dos picos dos dois diasteroisômeros.

3.3.2 Aduto 8-cloro-2'-desoxiguanosina (8-CldG)

As etapas de síntese do aduto 8-CldG foram realizadas de acordo com método desenvolvido por Masuda *et al.* (2001), em que dG (1 mM) é suplementada com nicotina (50 µM) em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,4). A reação foi iniciada pela adição de NaOCl (1 mM) à solução anterior a temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos e terminada pela adição de metionina (10 mM).

Em seguida o produto obtido foi purificado por sistema HPLC-DAD utilizando o equipamento descrito no item **3.2.3.1** de Material e Métodos. Foi utilizada a **Condição Cromatográfica 5** descrita a seguir. O produto correspondente à 8-CldG, com $\lambda_{máx}$ em 260 nm foi coletado e liofilizado até o

volume final de 1 mL. Alíquotas dessa solução foram injetadas novamente no sistema HPLC-DAD para melhor separação entre dGuo residual da reação de síntese e o aduto formado, sendo utilizada a **Condição Cromatográfica 6**.

O pico com espectro de absorbância correspondente à 8-CldG foi coletado, seco e ressuspenso em 200 µL de água. A concentração foi determinada pela intensidade de absorbância em 260 nm (ε_{260nm} = 15400), a partir de solução preparada em tampão fosfato pH 7,0.

O padrão interno foi obtido substituindo-se desoxiguanosina por [$^{15}N_5$]-desoxiguanosina na reação, para sua posterior utilização como padrão interno na quantificação das lesões.

A identidade e pureza isotópica do aduto foram confirmadas no sistema analítico **ESI-MS/MS 1**, descrito no ítem **3.2.3.2** de Material de Métodos, utilizando a **Condição Cromatográfica 7.**

Condição Cromatográfica 5: Coluna Cromatográfica Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), eluída de forma isocrática com água (Bomba A) e acetonitrila (ACN) (Bomba B) a 10%, com fluxo de 1 mL/min, a 18°C, sendo a concentração de ACN aumentada para 100% apenas em 15 minutos para retirada de material residual da coluna. A análise do produto 8-CldG foi feita a 260 nm, com tempo de retenção de aproximadamente 6,5-8 min.

Condição Cromatográfica 6: Coluna Cromatográfica Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), eluída com um gradiente de água

(Bomba A) e acetonitrila (ACN) (Bomba B), sendo a concentração de ACN aumentada de 0 - 15% nos primeiros 20 minutos, de 15 – 100% durante os próximos 5 minutos e mantida em 100% até os 30 minutos da análise cromatográfica, com fluxo de 1 mL/min, a 18°C. A análise do produto 8-CldG foi feita a 260 nm, com tempo de retenção de aproximadamente 22-24 min.

Condição Cromatográfica 7: Coluna cromatográfica Luna C18 (2) 150 mm x 2 mm, 3 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), eluída com um gradiente de água e ácido fórmico 0,1% (Bomba A) e Metanol (Bomba B), com fluxo de 0,25 mL/min a 25°C. A concentração de metanol foi iniciada em 8%, aumentada de 8% a 100% em 35 minutos e mantida em 100% durante os próximos 5 minutos.

3.4 Protocolo de tratamento dos animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Sprague-Dawley fornecidos pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O estudo utilizando animais de laboratório foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, protocolo CEUA/FCF/347. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O certificado de aprovação consta no anexo 1.

Os animais foram alocados em pares nas gaiolas durante todo o tratamento, sendo separados em gaiolas metabólicas apenas para coleta de urina um dia antes da eutanásia de cada grupo. Todos os animais tiveram acesso à água e à ração comercial padrão (Nuvilab CR-1) *ad libitum*.

A sala de experimentação do biotério foi mantida em temperatura média de 20 ± 3°C, ciclos alternados 12h claro/12 h escuro (com as luzes acesas das 7:00 – 19:00 h), umidade relativa de 55% e trocas de ar de 15-20 trocas/hora.

Para início de qualquer procedimento com os animais respeitou-se o período de duas semanas de adaptação e aclimatação ao novo ambiente.

Foram utilizados animais com 8 semanas de vida, com peso corpóreo superior a 250 g.

Dessa forma, os animais foram divididos em 7 grupos para estudo. A descrição de cada grupo e o esquema de tempo referente ao tratamento dos animais (**Figura 18**) são apresentados a seguir.

- ✓ Grupo CTL 6 sem: Animais sadios (controles) eutanasiados 6 semanas após administração de solução salina;
- ✓ Grupo STZ 6 sem: Animais induzidos a diabetes eutanasiados 6 semanas após a confirmação do diabetes;
- ✓ Grupo INT 6 sem: Animais que após a administração de STZ apresentaram hiperglicemia, mas não suficiente para serem classificados como diabéticos, sendo portanto sua glicemia classificada como intermediária. Permaneceram sem tratamento e a eutanásia foi realizada 6 semanas após a confirmação do diabetes;

✓ Grupo INS 6 sem: Animais tratados com insulina por 6 semanas após 72h da indução ao diabetes a partir da administração de STZ;

✓ Grupo INS 2 sem: Animais induzidos a diabetes que foram tratados com insulina 2 semanas após 4 semanas da confirmação do diabetes;

✓ Grupo CTL 7d: Animais sadios (controles) com eutanásia 10 dias após injeção de solução salina;

✓ Grupo STZ 7d: Animais induzidos a diabetes com eutanásia 10 dias após a confirmação do diabetes.

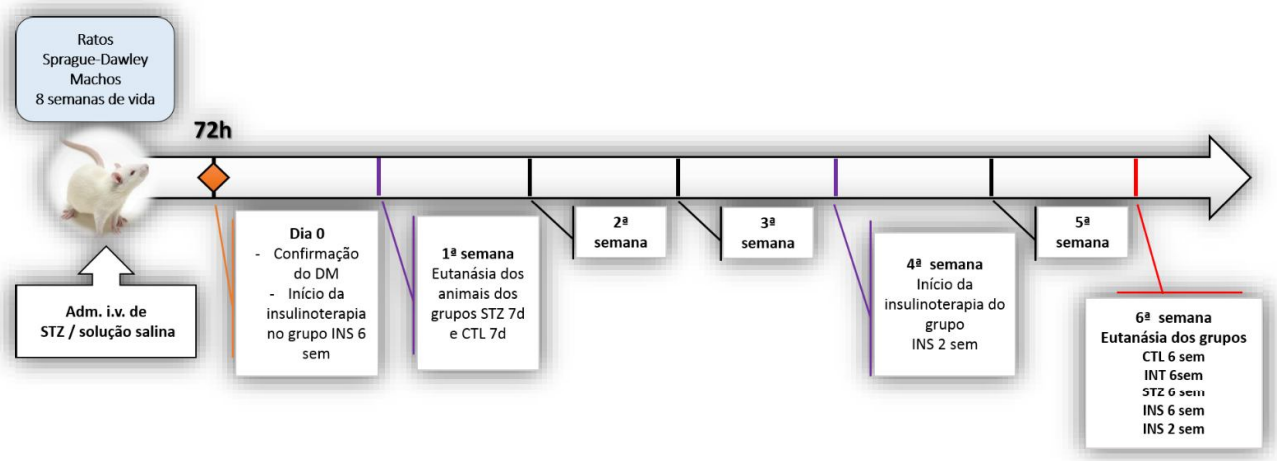


Figura 18. Esquema de tratamento dos grupos CTL 7d, STZ 7d, CTL 6 sem, STZ 6 sem, INT 6 sem, INS 2 sem e INS 6 sem.

3.4.1 Indução ao Diabetes mellitus

Para a indução de DM tivemos a colaboração da Dra. Ana Mara de Oliveira e Silva, que trabalhou com ratos diabéticos em seu mestrado e doutorado no grupo de Pesquisa do Prof. Jorge Mancini Filho (Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, FCF/USP). O grupo utiliza o protocolo de

administração de 40 mg/kg de STZ por injeção intravenosa (punção da veia peniana).

Para a solubilização da estreptozotocina (Sigma, Saint Louis, MI), foi utilizada solução salina 0,9% como descrito por Wiœniewski *et al.* (2003) ao invés de tampão citrato de sódio 0,1 M. Essa decisão foi tomada porque o tampão citrato possui pH ácido (pH 4,5) e já foi comprovado que a injeção de soluções ácidas no organismo, principalmente pela via subcutânea, provoca dor e pode causar necrose quando em contato com o epitélio (KARGES *et al*., 2006), o que poderia acontecer caso a solução de estreptozotocina em tampão citrato não fosse administrada com êxito. Nosso grupo decidiu então evitar que os animais passassem por esse risco de forma desnecessária.

Dessa forma, após os animais serem submetidos ao jejum por 12 horas, recebendo água *ad libitum*, foram anestesiados com Forane® (Isoflurano 4%; Abbott, Rio de Janeiro, Brasil) através de um sistema adaptado de nebulização desenvolvido pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Cada animal foi exposto ao isoflurano por menos de 1 min, uma vez que são rápidas a indução e, particularmente, a recuperação da anestesia por essa substância (NEVES et al, 2013).

Posteriormente foram administrados 40 mg/kg de peso corpóreo de estreptozotocina (dose única) em cada animal (SILVA, 2011) preparada na forma de solução (50 mg de STZ em 1 mL de solução salina 0,9%) imediatamente antes da aplicação.

A glicemia de cada animal foi controlada por Kit de monitoramento da glicose (Breeze 2, Bayer) dentro das 72 h após a injeção de STZ, período em que se estabelece a hiperglicemia referente à indução do DM.

É importante ressaltar que a glicemia de todos os animais foi medida logo que foram fornecidos pelo biotério, antes de qualquer procedimento para a indução do diabetes, a fim de confirmar que se encontravam na condição normoglicêmica; e que os animais do grupo controle (não diabético) foram submetidos aos mesmos procedimentos, tendo recebido apenas o veículo por via intravenosa.

3.4.2 Monitoramento glicêmico

Para a determinação da glicemia foi realizada a coleta de uma gota de sangue da cauda de cada animal a partir de um pequeno pique com agulha e posterior contato direto da gota de sangue com a tira reagente do kit de monitoramento. Os valores glicêmicos detectados pelo kit estão na faixa de 10 mg/dL a 600 mg/dL, sendo que os valores abaixo do valor mínimo são indicados no monitor como “LO” (Low value) e os acima do superior como “HI” (High value).

A glicemia de todos animais foi monitorada diariamente dentro das 72h após a injeção de STZ (grupos de animais diabéticos) ou de solução salina (grupos de animais sadios/ controle) para confirmação de DM ou de condição normoglicêmica (como descrito anteriormente no item **3.4.1** de Material e Métodos). O monitoramento diário foi mantido nos 5 dias posteriores para averiguação do protocolo de insulinoterapia, iniciado no grupo INS 6, a fim de que a administração de insulina NPH resultasse na condição normoglicêmica do

grupo. Após esse período, o monitoramento glicêmico foi realizado uma vez por semana durante os procedimentos, sendo todas as medições citadas realizadas no período vespertino (entre 14-15h). A última medição foi realizada anteriormente à eutanásia de cada animal.

3.4.3 Administração de insulina

O tratamento precoce com insulina nesse trabalho teve como objetivo alcançar a condição normoglicêmica dos animais o mais breve possível, então a aplicação da insulina foi iniciada logo após 72h de administração de STZ, sendo esse período o correspondente à última fase do processo de indução do DM, caracterizado por níveis glicêmicos próximos a 16 mmol/L (300 mg/dL).

Utilizou-se o protocolo de insulinoterapia de Fang *et al*. (2012), no qual a glicemia dos animais é mantida abaixo de 8 mmol/L (equivalente a 144 mg/mL) durante 8 semanas, a partir de tratamento precoce do diabetes mellitus induzido por STZ em ratos Sprague-Dawley machos com 7-8 semanas de vida.

Para tanto, foram administradas de 6-10 UI de Insulina NPH (Humulin N, Eli Lilly) fracionadas durante o dia, por via subcutânea na área dorsolateral do pescoço. Os horários de fracionamento das unidades de insulina administradas não foram apresentados no trabalho citado. Portanto, foi seguido o protocolo de controle dos níveis glicêmicos em que a dose total diária é dividida em 1/3 na parte da manhã (07h30min – 08h) e 2/3 na parte da tarde (16h – 17h) (HAUGHTON, DILLEHAY, PHILLIPS, 1999; MATHEUS, LEITER, 2009; OKAMOTO et al., 2011;).

Para o início do tratamento foram administradas 10 UI de insulina NPH/dia, que representa a maior dose do protocolo de Fang *et al.* (2012). Porém, devido à resposta rápida dos animais frente à essa dosagem, representando risco de hipoglicemia (abaixo de 60 mg/dL) (HAUGHTON, DILLEHAY, PHILLIPS, 1999), a dose foi ajustada logo no quarto dia de tratamento com insulina, sendo utilizada então a dose de 6 UI/dia. Foram, portanto, administradas 2 UI às 7h30 e 4 UI às 16h até o final do tratamento de 6 semanas.

Para que todos os animais tratados recebessem a mesma quantidade de insulina nos primeiros dias de tratamento, utilizou-se no grupo INS 2 sem (administração de insulina por 2 semanas após 4 semanas sem tratamento), o mesmo protocolo: 10 UI somente nos três primeiros dias de tratamento e posterior dose diária de 6 UI até o fim do mesmo.

3.4.4 Peso corpóreo dos animais

O peso corpóreo dos animais foi obtido antes das 12h de jejum para injeção i.v. de STZ (para indução de DM) ou de solução salina (grupos controle); no dia da indução para cálculo de dose individual para cada animal (considerando a dose de 40 mg/kg de peso corpóreo); e desse momento em diante uma vez por semana. A última pesagem foi realizada anteriormente à eutanásia de cada animal.

3.4.5 Coleta de urina

Para a coleta de urina os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individualizadas, confeccionadas em aço inoxidável (25 cm comprimento x 22 cm largura x 22 cm altura). A coleta foi realizada apenas no dia anterior à eutanásia de cada animal pelo período de 10 h. Todos os animais tiveram livre acesso à água e à ração padrão. Após a coleta, a urina foi congelada a -80°C e armazenada para posterior análise.

3.4.6 Condições da eutanásia

Após serem submetidos a jejum de 6 horas, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma solução de cetamina (75 mg/kg; Syntec, Hortolândia, SP) associada à xilazina (10 mg/kg; Syntec, Hortolândia, SP) em uma proporção de 2:1 (v:v). A anestesia é atingida após um período de latência de 2 a 5 minutos com período hábil de 30 minutos para duração de seu efeito. Após a anestesia profunda, foi realizada coleta de sangue terminal por punção da aorta abdominal e os órgãos foram coletados e imediatamente congelados em gelo seco após lavagem em solução salina. As estruturas encefálicas foram dissecadas sobre uma placa de petri gelada coberta por papel de filtro embebido em solução salina gelada e congeladas em gelo seco. Todos os órgãos e estruturas foram armazenados em freezer a -80°C até o preparo das amostras.

3.5 Avaliação de nitrito sérico

A determinação de nitrito no soro foi realizada pela reação de Griess. Em uma placa de 96 poços foram pipetados 100 µL das amostras (ou padrões da curva) e 100 µL do Reagente de Griess (sulfanilamida 1% e α-naftiletilenamida 0,1%; 1:1) recém-preparado. Após 10 min de incubação em temperatura ambiente, a absorbância de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. A concentração de NO_2^- das amostras foi determinada a partir de uma curva padrão com valores entre 1 µM e 200 µM de $NaNO_2$ e água como branco.

3.6 Análise de creatinina plasmática e urinária

As análises foram realizadas utilizando-se kit de Creatinina K da Labtest (Lagoa Santa, Minas Gerais), com leitura de absorbância em 520 nm pelo Analisador Bioquímico Labmax 240, sendo o equipamento disponibilizado pela Profa. Silvia Cozzolino (Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, FCF/USP). Para a análise de creatinina plasmática não existe a necessidade de preparo da amostra e foram utilizados 200 µL de plasma; e para creatinina urinária realizou-se uma diluição da urina em água (1:25) para 2 mL totais de amostra. Os resultados são expressos em mg/dL.

3.7 Determinação de malonaldeído em plasma

3.7.1 Preparo das amostras

O método se baseia na reação de MDA com ácido tiobarbitúrico (TBA), que produz o aduto de cor rosa, MDA - $(TBA)_2$, determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/DAD), com detecção por absorbância a 532 nm.

Em 250 μL de plasma foram adicionados 36 μL de hidroxitoluenobutilado (BHT) (0,2 % em etanol) e 12,5 μL de NaOH 10 N. Após incubação a 60 ^{o}C por 30 minutos sob agitação, foram adicionados 1500 μL de uma solução contendo 7,2% de ácido tricloroacético e 1% de iodeto de potássio. A solução foi mantida em gelo por 10 minutos para precipitação das proteínas e centrifugada a 1000 *x g* por 10 minutos. O volume de 1000 μL do sobrenadante foi coletado, transferido para tubo com tampa rosqueável, adicionado a 500 μL de solução de ácido tiobarbitúrico (0,6% em água) e aquecido a 90 ^{o}C por 45 min sob agitação. O produto gerado foi extraído com *n*-butanol (250 μL) sob agitação vigorosa (vórtex) por 15 segundos e centrifugação a 2000 rpm por 10 min.

Uma curva de calibração no intervalo de 0,5 a 10 μM de MDA em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) foi processada em conjunto com as amostras para possibilitar a quantificação. A curva foi construída a partir de uma solução estoque de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) (Sigma, Saint Louis, MI), que em condições ácidas sofre hidrólise e promove a liberação de malonaldeído. Uma solução estoque foi preparada a partir de 22 μL de TMP adicionados a ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1% para o volume final de 10 mL, com posterior incubação

por 2 horas, à temperatura ambiente e protegido de luz. A segunda diluição é preparada a partir de 34 µL da solução obtida, adicionados a H_2SO_4 a 1%, para o volume final de 10 mL. A concentração foi determinada pela intensidade de absorbância em 245 nm (ε_{245nm} = 13700) contra um branco de H_2SO_4 a 1%.

3.7.2 Sistema analítico

Alíquotas de 50 µL da fase *n*-butanólica foram injetadas no sistema analítico de HPLC-DAD descrito no item **3.2.3.1** de Material e Métodos, utilizando-se a **Condição Cromatográfica 8** descrita a seguir.

Condição Cromatográfica 8: Coluna cromatográfica Luna C18 (2) 150 mm x 4,6 mm ID, 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com 65% de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 e 35% de metanol a um fluxo de 1 mL/min por 10 min. A análise do produto MDA-$(TBA)_2$ foi feita a 532 nm, com tempo de retenção de aproximadamente 6 min.

3.8 Determinação de malonaldeído em fígado e rins

3.8.1 Preparo dos homogenatos

Os tecidos foram homogeneizados em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, em banho de gelo, na proporção de 50 mg de tecido para 500 µL de solução salina fosfato tamponada (PBS) pH 7,0 e 72 µL de hidroxitolueno butilado (BHT) 0,2%.

3.8.2 Preparo das amostras

Em 100 µL de homogenato, foram adicionados 10 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 4 M. Após incubação a 60°C por 30 minutos sob agitação (100 rpm), adicionou-se 150 µL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1% e a amostra foi centrifugada por 10 min a 16000 *g*. Posteriormente as amostras permaneceram no gelo por 5 min e o volume de 175 µL do sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo. Foram adicionados 25 µL de dinitrofenilhidrazina (DNPH, 1 mg/mL em HCl 2M) e a amostra foi incubada por 30 min em temperatura ambiente, sob proteção de luz. Uma curva de calibração no intervalo de 0,5 a 10 µM de MDA em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) foi processada em conjunto com as amostras para possibilitar a quantificação. O método foi validado no laboratório pelo bolsista de Pós-Doutorado Tiago Franco de Oliveira.

3.8.3 Sistema Analítico

Da solução final obtida, são transferidos 150 µL para o vial e injetados 100 µL no sistema HPLC/PDA descrito em **3.2.3.1** de Material e Métodos, sendo utilizada a **Condição Cromatográfica 9**.

Condição Cromatográfica 9: Coluna cromatográfica Luna C18 (2) 150 mm x 4,6 mm ID, 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) eluída com um gradiente de água e ácido acético 0,2% (Bomba A) e ACN com ácido acético 0,2% (Bomba B). Utilizou-se o seguinte gradiente: 0-28 min, 20-100% B; 28-30 min, 100 a 20% B; 30-40 min, 20% B; fluxo de 1 mL/min a 30°C. A análise do produto MDA-DNPH foi feita a 306 nm, com tempo de retenção de aproximadamente 21,5-22 min.

3.8.4 Quantificação de proteínas

A determinação da concentração de proteínas em fígado e rins foi realizada utilizando-se o método de Bradford (1976), utilizando o kit da Bio-Rad (kit II, n° 500-00020) de acordo com o protocolo do fabricante. O principal componente do reagente de Bradford é o corante Coomassie Brilliant Blue G-250, que em meio ácido forma um complexo com proteínas, sendo possível a leitura de sua absorbância no comprimento de onda de 595 nm. A quantificação de proteínas presentes nas amostras foi obtida a partir de uma curva padrão de albumina no intervalo de 0 a 40 µg/mL.

3.9 Quantificação de Hemoglobina Glicada (HbA1c)

O método foi padronizado no laboratório pelos bolsistas Antonio Anax Falcão de Oliveira (doutorado) e Tiago Franco de Oliveira (pós-doutorado) a partir de modificações do método de Jeppsson *et al.* (2002).

3.9.1 Preparo das amostras

Alíquotas de 100 µL de hemácias foram lavadas com 1 mL de solução salina e após homogeneização as amostras foram centrifugadas a 500 *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e repetiu-se o mesmo procedimento. Ao *pellet* de células formado adicionou-se novamente 1 mL de solução salina, homogeneizando os tubos levemente por inversão, sem desprender as células, e a seguir os mesmos foram incubados em banho-maria a 37ºC por 4 horas, com o propósito de remover a pré-HbA1c (base de Schiff). Finalizado o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e preparou-se o hemolisado com a adição de 1 mL de água deionizada e posterior homogeneização.

3.9.2 Determinação de hemoglobina total

Hemoglobina total foi quantificada utilizando-se kit comercial (Labtest®). Uma alíquota de 10 µL do hemolisado foi adicionada em 2,5 mL de reagente de cor. Os tubos foram agitados em vórtex e após 5 minutos determinaram-se as absorbâncias a 540 nm em leitor de placa. O mesmo procedimento foi realizado

com 1 µL de uma solução padrão de hemoglobina (Labtest®). O cálculo da concentração de hemoglobina total foi realizado utilizando-se as médias das absorbâncias de cada amostra e um fator de correção, com base nas instruções do fabricante.

3.9.3 Clivagem enzimática

A uma alíquota do hemolisado, correspondendo a 50 µg de hemoglobina total, foram adicionados 2,5 µL de uma solução de endoproteinase Glu-C (200 µg/mL) e completou-se o volume para 100 µL com tampão de digestão (acetato de amônio, pH 4,3). As amostras foram incubadas a 37ºC, 70 rpm, por 18 horas. Uma vez transcorrido o período de incubação, a digestão foi interrompida pelo congelamento das amostras a -20ºC. Imediatamente antes da análise, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 12.200 *g* por 2 min.

3.9.4 Sistema analítico

Alíquotas de 15 µL foram injetadas no sistema HPLC-ESI-MS/MS 1 descrito em **3.2.3.2** de Material e Métodos seguindo a **Condição Cromatográfica 10**. As análises foram realizadas em modo positivo e considerou-se que durante a ionização as moléculas de interesse são duplamente protonadas. Portanto, as massas observadas corresponderiam à massa da molécula adicionada a 2 prótons e dividida por 2 (*m/z*). Sendo assim, os íons com *m/z* = 392 e *m/z* =473,2, correspondendo ao heptapeptídeo não glicado e glicado, respectivamente, foram monitorados para quantificação.

Condição Cromatográfica 10: Coluna Cromatográfica Luna C18(2) (150 x 2.0 mm i.d., 3.0 µm, 100A Phenomenex) eluída em um gradiente de ácido trifluoroacético 0,025% em água (bomba A) e ácido trifluoroacético 0,023% em acetonitrila (bomba B), seguindo o gradiente: 0-3 min, 7% B; 3-19 min, 7-20% B; 19-21 min, 20-100% B; 21-25 min, 100% B; 25-27 min, 100-7% B; 27-37 min, 7% B. O fluxo da fase móvel foi de 0,2 mL/min e temperatura de 35ºC.

3.10 Extração de DNA de fígado, rins e cerebelo para quantificação das lesões

Amostras de DNA foram extraídas utilizando-se o método modificado descrito a seguir para evitar a formação artefatual de 8-oxodG e CEdG durante o processo de extração, como relatado por Synold *et al.* (2008).

As extrações de DNA de fígado e rins dos animais foram realizadas da seguinte forma: para cada 1 g de tecido a ser analisado foram adicionados 10 mL de solução de lise de células (GentraPuregene® Kit) contendo 0,5 mM de desferoxamina/10 mM de D-penicilamina e 150 µL de proteinase K (20 mg/mL). Após homogeneização e incubação à temperatura ambiente por 1 noite, adicionaram-se 40 µL de RNAse A (15 mg/mL) e as amostras foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente ao abrigo de luz. Posteriormente adicionaram-se 5 mL de solução de precipitação de proteínas (GentraPuregene® Kit), a amostra foi agitada vigorosamente e centrifugada por 10 minutos a 2000 x *g*. Em seguida o sobrenadante foi vertido sobre 10 mL de isopropanol gelado para precipitação do DNA. O DNA precipitado foi então transferido para 4 mL de solução de tampão Tris 10 mM e desferroxamina 1 mM (pH 7), contendo 10 mM

de D-penicilamina, e após completa solubilização por agitação, adicionou-se 4 mL de uma solução clorofórmio/álcool isoamílico 4%. Após agitação vigorosa, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 2000 x *g*. O sobrenadante foi coletado e a extração com clorofórmio/álcool isoamílico 4% foi repetida mais duas vezes. Foram adicionados então 400 µL de NaCl 5 M e solução gelada de etanol 100% e inverteu-se os tubos até completa precipitação do DNA. Após centrifugação por 10 minutos a 2000 x *g*, o sobrenadante foi desprezado e o DNA precipitado foi lavado com 8 mL de etanol 70% e mais uma vez centrifugado por 10 minutos a 2000 x *g*, sendo essa etapa repetida por mais duas vezes. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado de DNA foi seco ao ar. Em seguida foram adicionados 400 µL de desferroxamina 0,1 mM, contendo 10 mM de D-penicilamina e os tubos foram mantidos sob refrigeração por 1 noite.

Após completa solubilização do DNA, aferiu-se a concentração da amostra com leitura de absorbância em 260 nm e a pureza foi obtida pela razão das absorbâncias em 260 e 280 nm. As amostras de DNA foram congeladas a –20 °C para posterior hidrólise imediatamente antes das análises.

No caso da extração de DNA de estruturas do SNC, foi possível ter êxito apenas com cerebelo, por ser a maior estrutura disponível (~ 300 mg). Foi utilizada uma etapa de lise das células e precipitação dos núcleos utilizando tampão A (320 mM sacarose, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris, 0,1 mM desferoxamina, 1% Triton X-100 em pH final de 7,5) (RAVANAT *et al*, 2002), sendo incluído 10 mM da solução de D-penicilamina em dois momentos do protocolo: na solução de lise das células e na solução de estocagem com desferoxamina a fim de evitar formação artefatual de lesões. Portanto, para 300 mg de tecido foram adicionados 6 mL de tampão A. Após homogeneização, centrifugou-se a amostra

a 1500 x *g* por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Repetiu-se o procedimento. Então, adicionou-se ao *pellet* formado, 3 mL da solução de lise de células (GentraPuregene® Kit) contendo 0,5 mM de desferoxamina/10 mM de D-penicilamina. Após completa dissolução do precipitado adicionou-se 105 µL de SDS 10% e os tubos foram invertidos por 20 vezes. Em seguida foram adicionados 42 µL de proteinase K (20 mg/mL), inverteu-se os tubos 25 vezes e as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora. Foram então adicionados 12 µL de RNAse A e as amostras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente ao abrigo de luz. Posteriormente foram adicionados 1,5 mL da solução de precipitação de proteínas (GentraPuregene® Kit), agitou-se a amostra vigorosamente e centrifugou-se por 10 minutos a 2000 x *g*. Em seguida o sobrenadante foi vertido sobre 10 mL de isopropanol gelado para precipitação do DNA. O DNA precipitado foi então lavado com 10 mL de etanol 70% e mais uma vez centrifugado por 10 minutos a 2000 x *g*, sendo essa etapa repetida por mais uma vez. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado de DNA foi seco ao ar. Em seguida adicionou-se 400 µL de desferroxamina 0,1 mM, contendo 10 mM de D-penicilamina e os tubos foram mantidos sob refrigeração por 1 noite.

Após completa solubilização do DNA, aferiu-se a concentração da amostra com leitura de absorbância em 260 nm e a pureza foi obtida pela razão das absorbâncias em 260 e 280 nm. As amostras de DNA foram congeladas a –20 °C para posterior hidrólise imediatamente antes das análises.

Não houve êxito na extração de DNA das estruturas de córtex pré-frontal e hipocampo (SNC), assim como de leucócitos, uma vez que foi obtida quantidade insuficiente de DNA para as respectivas análises.

3.11 Hidrólise enzimática do DNA

Para a análise de adutos em fígado, rim e cerebelo, a alíquotas correspondentes a 150 µg de DNA, adicionou-se água deionizada para volume final de 200 µL. Foram adicionados 7,5 µL de tampão Tris-HCl/$MgCl_2$ 200 mM (pH 7,4), 1,4 µL de solução contendo os padrões isotópicos [$^{15}N_5$] 8-oxodG (2000 fmol/ µL) e [$^{15}N_5$] CEdG (250 fmol/ µL), e 6 µL (15 unidades) de DNAse I. As amostras foram incubadas a 37°C, 90 rpm por 1 hora. Após a incubação foram adicionados 6 µL (0,006 unidades) de fosfodiesterase I e 7,5 µL (15 unidades) de fosfatase alcalina, sendo as amostras então novamente incubadas a 37°C, com agitação de 90 rpm por 1 hora. Finalmente as amostras foram centrifugadas a 14000 x *g* por 10 minutos. Alíquotas de 10 µL do sobrenadante foram retiradas para quantificação de desoxinucleosídeos (dCyd, dAdo e dGuo) e 5-mdC (metilação global do DNA) por HPLC-DAD (ítem 3.12 de Material e Métodos) e o volume restante foi reservado para quantificação das lesões 8-oxodG e CEdG pelo sistema HPLC-ESI-MS/MS (item **3.13** de Material e Métodos).

O mesmo procedimento foi utilizado para a quantificação das lesões 1,N^6-εdAdo e 1,N^2-εdGuo, sendo adicionados 1,4 µL de solução contendo os respectivos padrões isotópicos [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo e [$^{15}N_5$]1,N^2-εdGuo (250 fmol/ µL). Após a retirada das alíquotas de 10 µL para quantificação de desoxinucleosídeos (dCyd, dAdo e dGuo) e 5-mdC (metilação global do DNA), o volume residual da amostra foi submetido à extração em fase sólida. Foram utilizados cartuchos de SPE Strata-X (Phenomenex®; 33u Polymeric Reversed Phase; 30 mg/1 mL), sendo o cartucho primeiramente condicionado com Metanol 100%, depois com Água MilliQ®. Em seguida adicionou-se a amostra e foi

seguida novamente lavagem com água MilliQ® e depois Metanol 10%. Por fim foi coletada a fração com Metanol 100% e a amostra passou por secagem completa a vácuo. Foi, finalmente, feita a ressuspensão da amostra de forma a se obter 200 fmol de padrão interno em 50 µL de injeção no sistema HPLC-ESI-MS/MS (ítem 3.13 de Material e Métodos).

3.12 Determinação dos níveis de 5-metil-2'-desoxicitidina em DNA de fígado, rins e cerebelo

Após hidrólise enzimática, alíquotas de 5 µL de DNA foram injetadas no sistema analítico de HPLC-DAD descrito no item **3.2.3.1** de Material e Métodos. Foi utilizada a seguinte condição cromatográfica para as análises:

Condição Cromatográfica 11: Coluna Cromatográfica Luna C18(2) (250 x 4.6 mm i.d., 5.0 µm, Phenomenex) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), eluída em um gradiente de ácido fórmico 0,1% em água (bomba A) e metanol com 0,1% de ácido fórmico (bomba B), com um fluxo de 1 mL/min, 30ºC. A concentração de metanol é aumentada de 0% a 36% em 25 minutos. O detector de DAD foi fixado em 260 nm para a quantificação da dC e 286 nm para a quantificação da 5-metil-dC. Curvas de calibração foram feitas no intervalo de 0,05-6 nmol para dC e de 0,005-0,4 nmol para 5-metil-dC. A porcentagem da metilação global do DNA foi calculada usando a seguinte equação:

$$\textbf{5-metil-dC}_{(\%)} = (\text{5-metil-dC}_{(nmol)} \times 100) \div (\text{5-metil-dC}_{(nmol)} + \text{dC}_{(nmol)})$$

3.13 Quantificação das Lesões 8-OxodG, CEdG, 1,N^6-εdAdo e 1,N^2-εdGuo em DNA de fígado, rins e cerebelo

Após as etapas de extração e hidrólise de DNA (itens **3.10** e **3.11** de Material e Métodos), alíquotas de 50 µL foram injetadas no sistema HPLC-ESI-MS/MS.

O método para quantificação das lesões 8-OxodG, CEdG, 1,N^6-εdAdo e 1,N^2-εdGuo foi desenvolvido no grupo com a participação dos bolsistas Tiago Franco de Oliveira (pós-doutorado) e Antonio Anax Falcão de Oliveira (doutorado).

Os adutos foram analisados com ionização por eletrospray no modo positivo e detecção por monitoramento de reação múltipla (MRM), em um espectrômetro de massas triplo quadrupolo, sendo o terceiro quadrupolo uma câmara híbrida íon trap linear: sistema **ESI-MS/MS 2** do ítem **3.2.3.2** de Material e Métodos. Foram utilizados como parâmetros otimizados: gás de nebulização, 40 psi; gás na fonte de íons, 50 psi; gás de dissociação induzida por colisão, LOW; temperatura da fonte do ESI, 600°C; potencial de dissociação, 51 V; potencial de entrada, 10 V; energia de colisão, 21 eV; potencial de saída da célula, 51 V; e tensão do spray de íons, 5500 V. As seguintes fragmentações foram escolhidas para detecção e quantificação das lesões:

- ✓ Para detecção de **1,N^6-εdAdo**: *m/z* 276 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 160 [M – 2'-desoxirribose + H]$^+$; e respectivo padrão interno **[$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo**: *m/z* 281 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 165 [M – 2'- desoxirribose + H]$^+$.

✓ Para detecção de **1,N^2-εdGuo**: *m/z* 292 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 176 [M – 2'-desoxirribose + H]$^+$; e respectivo padrão interno **[$^{15}N_5$]1,N^2-εdGuo**: *m/z* 297 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 181 [M – 2'- desoxirribose + H]$^+$.

✓ Para detecção de **8-oxodGuo**: *m/z* 284 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 168 [M – 2'-desoxirribose + H]$^+$; e respectivo padrão interno **[$^{15}N_5$]8-oxodGuo**: *m/z* 289 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 173 [M – 2'- desoxirribose + H]$^+$.

✓ Para detecção de **CEdG**: *m/z* 340 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 224 [M – 2'-desoxirribose + H]$^+$; e respectivo padrão interno **[$^{15}N_5$]CEdG**: *m/z* 345 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 229 [M – 2'- desoxirribose + H]$^+$.

As razões entre as áreas (aduto/padrão interno) foram utilizadas para quantificação. Curvas de calibração foram injetadas no intervalo de 250 a 4000 fmol de 8-oxodG (1000 fmol de [$^{15}N_5$]8-oxodGuo); 2 a 500 fmol de CEdG; 0,5 a 10 fmol de 1,N^6-εdAdo; e 1 a 40 fmol de 1,N^2-εdGuo; (200 fmol de [$^{15}N_5$]CEdG, [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo, e [$^{15}N_5$]1,N^2-εdGuo). Os dados foram processados utilizando-se o software Analyst 1.6 (Applied Biosystems, USA). O aduto 8-CldG foi excluído das análises em virtude de não ter sido possível obter sensibilidade suficiente do equipamento para sua quantificação nos níveis que estariam presentes nas amostras de DNA. O limite de quantificação desse aduto injetado diretamente na coluna foi superior a 100 fmol.

Foi utilizado um sistema de SPE *online* com a **Condição Cromatográfica 12**, descrita a seguir:

Condição Cromatográfica 12: (A) Para a análise de CEdG e 8-OxodG foi utilizada coluna Luna C18 (2) 50 mm x 4,6 mm, ID, 2.6 µM (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), eluída com um gradiente de água com ácido fórmico 0,1% (Solução A) e metanol com ácido fórmico 0,1% (Solução B), a um fluxo de 0,150 mL/min, 25 °C. O gradiente foi de: 0-6 min, 0-4% B; 6-16 min, 4-10% B; 16-25 min, 10-60% B; 25-26 min, 60-80% B; 26-33 min, 80% B; 33-35 min, 80-0% B; 35-47 min, 0%. Concomitantemente uma coluna Luna C18 (2) 150 mm x 2.0 mm, ID, 3 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) é eluída de forma isocrática com solução de 15% de Metanol em água com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 0,150 mL/min, 25 °C. O sistema é integrado a um detector DAD, espectrômetro de massas API 4000 QTRAP e ao descarte, sendo a posição da válvula o determinante para o direcionamento da amostra e para o fluxo. A válvula foi utilizada de forma a direcionar as amostras para o sistema ESI-MS/MS no tempo entre 10-33 min da corrida cromatográfica. (B) Para a análise de 1,N^6-εdAdo e 1,N^2-εdGuo foi utilizada coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5,0 µM (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), eluída com um gradiente de água com ácido fórmico 0,1% (Solução A) e acetonitrila (Solução B), a um fluxo de 0,130 mL/min, 30 °C. O gradiente foi de: 0-25 min, 0-58% B; 25-27 min, 58-0% B. Concomitantemente uma coluna Luna C18 (2) 150 mm x 2.0 mm, ID, 3 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) é eluída de forma isocrática com solução de água e acetonitrila (50:50; v:v) com 0,1% de

ácido fórmico, fluxo de 0,150 mL/min, 25 °C. A válvula foi utilizada de forma a direcionar as amostras para o sistema ESI-MS/MS no tempo entre 15-20 min da corrida cromatográfica.

3.14 Quantificação das Lesões 8-oxodG, CEdG e 1,N^6-εdAdo em urina

3.14.1 Preparo das amostras

Alíquotas de 100 µL de urina foram adicionadas a 200 µL de água MilliQ®, 2 µL da solução contendo 75 fmol/µL de [$^{15}N_5$]CEdG, [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo e [$^{15}N_5$]1,N^2-εdGuo, e 1,5 µL da solução contendo 1000 fmol/µL de [$^{15}N_5$]8-oxodG. As amostras foram então homogeneizadas em vórtex e secas completamente a vácuo. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de metanol às amostras, que foram novamente homogeneizadas em vórtex e centrifugadas por 10 minutos a 16000 *x* g. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo para nova secagem completa a vácuo. As amostras foram então ressuspensas em 75 µL de Água MilliQ® contendo 0,1% de ácido fórmico e então centrifugadas por 5 minutos a 16000 *x* g.

3.14.2 Sistema Analítico

Após o preparo das amostras, foram injetados 50 µL no sistema HPLC-ESI-MS/MS e foi utilizada a **Condição Cromatográfica 13**, descrita a seguir.

O método para quantificação das lesões 8-oxodG, CEdG, 1,N^6-εdAdo e 1,N^2-εdGuo foi desenvolvido no grupo com a participação do bolsista Tiago Franco de Oliveira (pós-doutorado).

Os adutos foram analisados com ionização por eletrospray no modo positivo e detecção por monitoramento de reação múltipla (MRM), em um espectrômetro de massas triplo quadrupolo, sendo o terceiro quadrupolo uma câmara híbrida íon trap linear: sistema **ESI-MS/MS 2** do ítem **3.2.3.2** de Material e Métodos. As seguintes fragmentações foram escolhidas para detecção e quantificação das lesões:

- ✓ Para detecção de **1,N^6-εdAdo**: *m/z* 276 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 160 [M – 2'-desoxirribose + H]$^+$; e respectivo padrão interno **[$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo**: *m/z* 281 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 165 [M – 2'- desoxirribose + H]$^+$.

- ✓ Para detecção de **1,N^2-εdGuo**: *m/z* 292 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 176 [M – 2'-desoxirribose + H]$^+$; e respectivo padrão interno **[$^{15}N_5$]1,N^2-εdGuo**: *m/z* 297 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 181 [M – 2'- desoxirribose + H]$^+$.

- ✓ Para detecção de **8-oxodGuo**: *m/z* 284 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 168 [M – 2'-desoxirribose + H]$^+$; e respectivo padrão interno **[$^{15}N_5$]8-oxodGuo**: *m/z* 289 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 173 [M – 2'- desoxirribose + H]$^+$.

✓ Para detecção de **CEdG**: *m/z* 340 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 224 [M – 2'-desoxirribose + H]$^+$; e respectivo padrão interno **[$^{15}N_5$]CEdG**: *m/z* 345 $[M+H]^+ \rightarrow$ *m/z* 229 [M – 2'- desoxirribose + H]$^+$.

Para as quantificações foram injetadas curvas de calibração no intervalo de 50 a 4000 fmol de 8-oxodG (1000 fmol de [$^{15}N_5$]8-oxodGuo); 5 a 400 fmol de CEdG; 0,5 a 10 fmol de 1,N^6-εdAdo; e 1 a 40 fmol de 1,N^2-εdGuo (100 fmol de [$^{15}N_5$]CEdG, [$^{15}N_5$]1,N^6-εdAdo, e de [$^{15}N_5$]1,N^2-εdGuo). As razões entre as áreas (aduto/padrão interno) foram utilizadas para quantificação. Os dados foram processados utilizando-se o software Analyst 1.6 (Applied Biosystems, USA). Como os animais permaneceram em gaiolas metabólicas pelo período de 10 h para a coleta de urina, os resultados estão expressos em pg/10h e pg/mL/10h para cada uma das lesões. Não foi possível detectar o aduto 1,N^2-εdGuo nas amostras de urina.

Condição Cromatográfica 13: Coluna Luna C18 (2) 150 mm x 2.0 mm, ID, 3.0 µM, 100A (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em água (Solução A) e ácido fórmico 0,1% em metanol (Solução B), a um fluxo de 0,130 mL/min, 35°C. Foram utilizadas as seguintes condições: 0-30 min, 0-50% B; 30-31 min, 50-80% B; 31-33 min, 80-0% B; 33-45 min, 0% B. A válvula foi utilizada de forma a direcionar as amostras para o sistema ESI-MS/MS nos tempos 5-7 min, 12-14 min e 18-27 min durante a corrida cromatográfica.

3.15 Análise Estatística

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Para verificar a significância das diferenças entre os grupos foi utilizado o teste *One way* ANOVA não paramétrico (Kruskal-Wallis) com pós teste de Dunn. Foi utilizado o software de análise estatística *GraphPrism*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas usando $p<0,05$.

Resultados e discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese, purificação e caracterização de adutos de DNA

4.1.1 Aduto *N*^{2}-(1-carboxietil)-2'-desoxiguanosina (CEdG)

A síntese e purificação do aduto CEdG foram realizadas como descrito no item **3.3.1** de Material e Métodos. Os cromatogramas obtidos pela primeira (**Figura 19 A**) e segunda purificações (**Figura 19 B**) por HPLC-DAD são apresentados a seguir.

Na **Figura 20** são apresentados dois cromatogramas obtidos no sistema HPLC-ESI-MS/MS utilizando duas condições cromatográficas distintas (**Condições Cromatográficas 3 e 4**), permitindo a visualização dos picos dos dois diasteroisômeros.

Os espectros de massas apresentados na **Figura 21** confirmam a identidade e pureza isotópica dos adutos CEdG (**A**) e [$^{15}N_5$]CEdG (**B**). É possível observar os íons *m/z* 340.1 ([M+H]$^+$) e os fragmentos *m/z* 224 ([M-dR+H]$^+$) e *m/z* 178 ([M-dR-HCOOH+H]$^+$, característicos do aduto CEdG (SYNOLD *et al*., 2008). O espectro de massas do aduto [$^{15}N_5$]CEdG apresenta os íons correspondentes à adição de 5 unidades de massa à molécula: *m/z* 345.1 ([M+H]$^+$), *m/z* 229 ([M-dR+H]$^+$) e *m/z* 183 ([M-dR-HCOOH+H]$^+$.

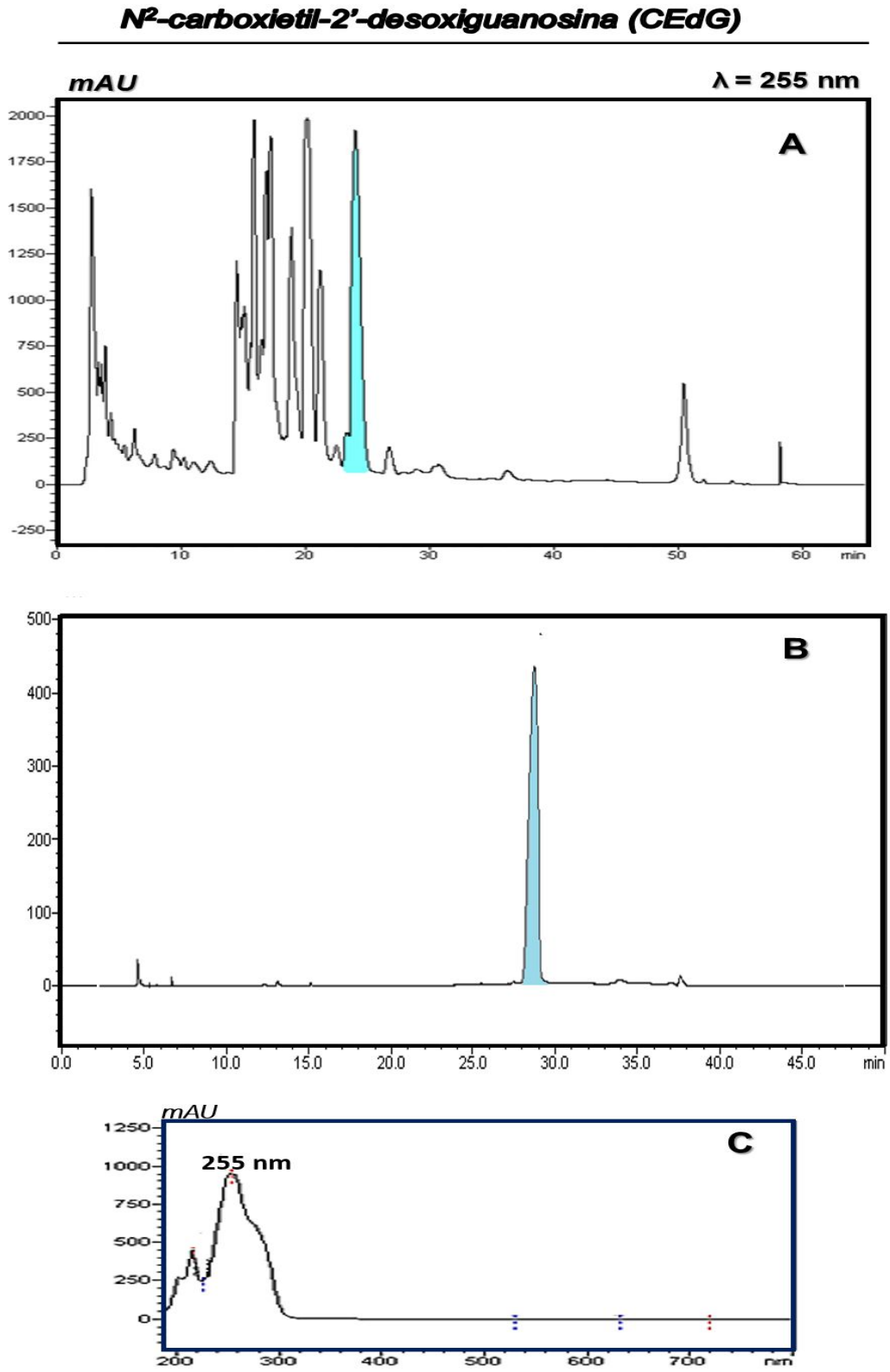


Figura 19. (A) e (B) Cromatogramas (λ = 255 nm); e (C) espectro de absorbância obtidos por HPLC-DAD referentes ao aduto *N*²-(1-carboxietil)-2'-desoxiguanosina (CEdG) (pico indicado em azul).

CEdG

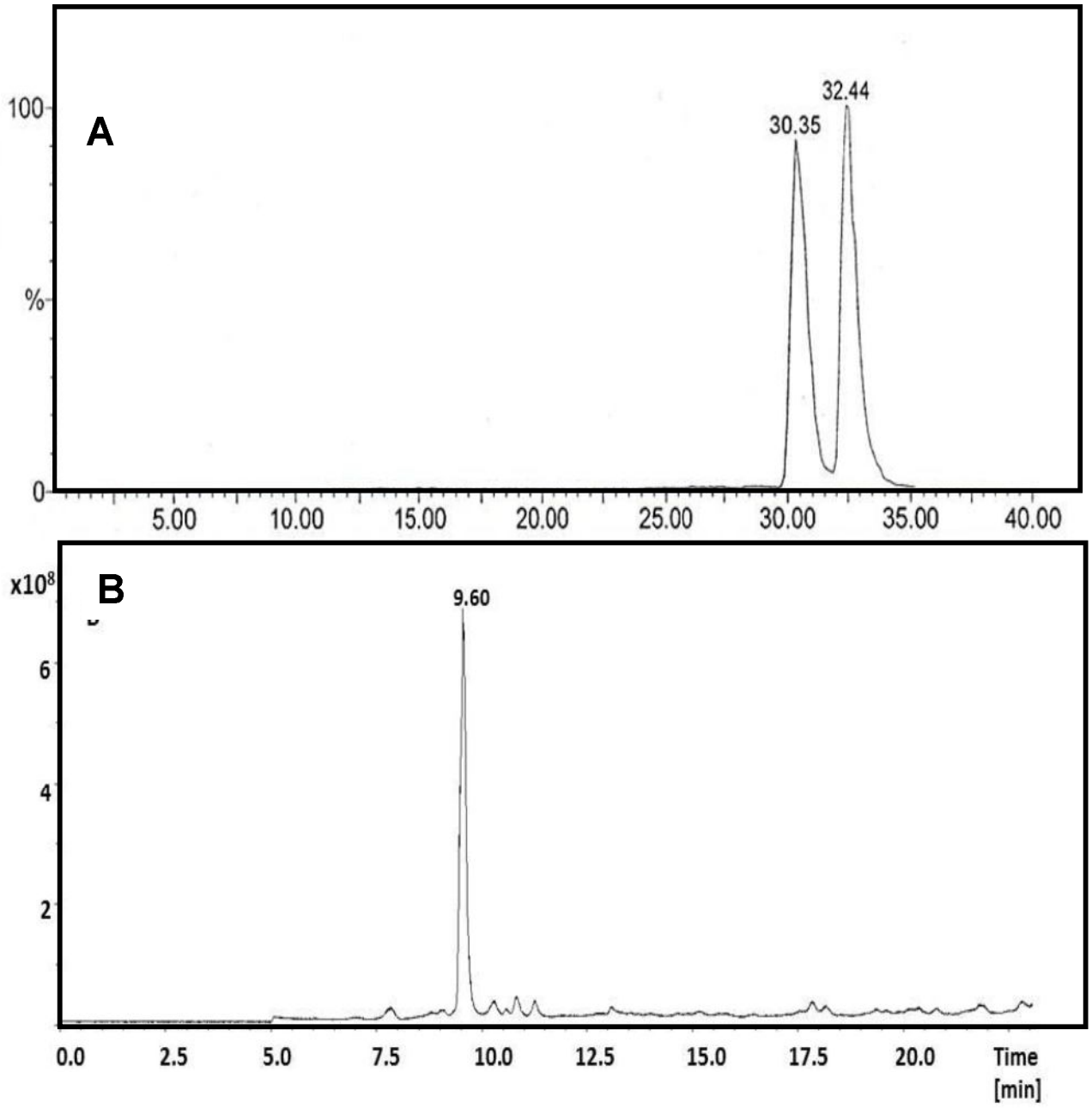


Figura 20. Cromatogramas do aduto CEdG obtidos no sistema HPLC-ESI-MS/MS utilizando duas condições cromatográficas distintas: (A) Condição cromatográfica 3, sendo possível visualizar os picos dos dois diasteroisômeros do aduto; (B) Cromatograma obtido ao utilizar a Condição Cromatográfica 4.

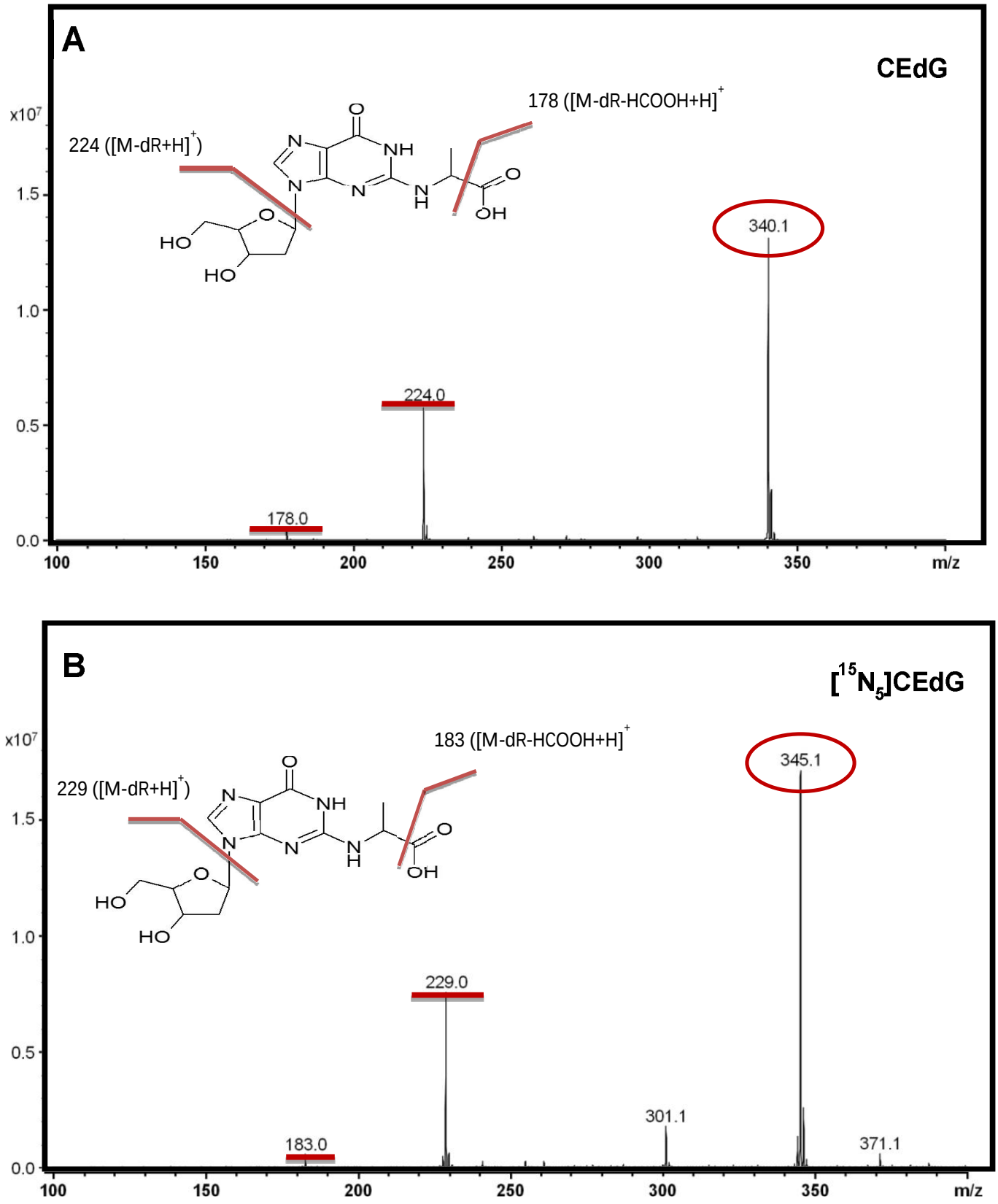


Figura 21. Espectros de massas do aduto CEdG (A) e [$^{15}N_5$]CEdG (B).

4.1.2 Aduto 8-cloro-2'-desoxiguanosina (8-CldG)

A síntese e purificação do aduto 8-CldG foram realizadas como descrito no item **3.3.2** de Material e Métodos. Os cromatogramas obtidos pela primeira (**Figura 22 A**) e segunda purificações (**Figura 22 B**) por HPLC-DAD são apresentados a seguir.

Os espectros de massas apresentados na **Figura 23** confirmam a identidade e pureza isotópica do aduto 8-CldG (**A**) e [$^{15}N_5$]8-CldG (**B**). É possível observar os íons 302 ($[M+H]^+$) e o fragmento *m/z* 186 ($[M-dR+H]^+$), característicos do aduto 8-CldG (BADOUARD *et al.*, 2005). O espectro de massas do aduto [$^{15}N_5$]8-CldG apresenta os íons correspondentes à adição de 5 unidades de massa à molécula: *m/z* 307 ($[M+H]^+$) e *m/z* 191 ($[M-dR+H]^+$). É possível observar também a distribuição isotópica devido à presença do átomo de cloro (^{35}Cl e ^{37}Cl) na molécula.

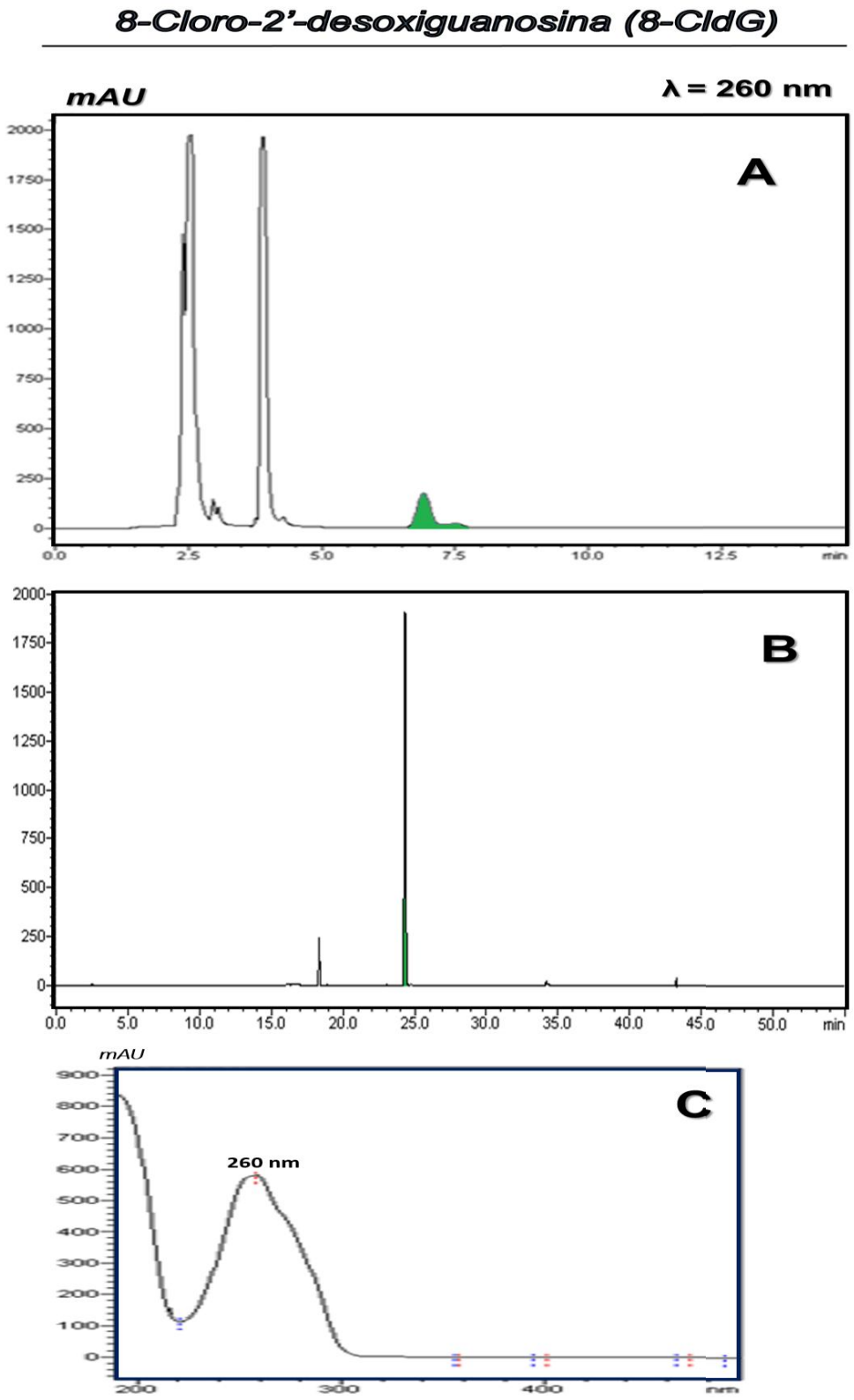


Figura 22. (A) e (B) Cromatogramas (λ = 255 nm); e (C) espectro de absorbância obtidos por HPLC-DAD referentes ao aduto 8-cloro-2'-desoxiguanosina (8-ClдG) (pico indicado em verde).

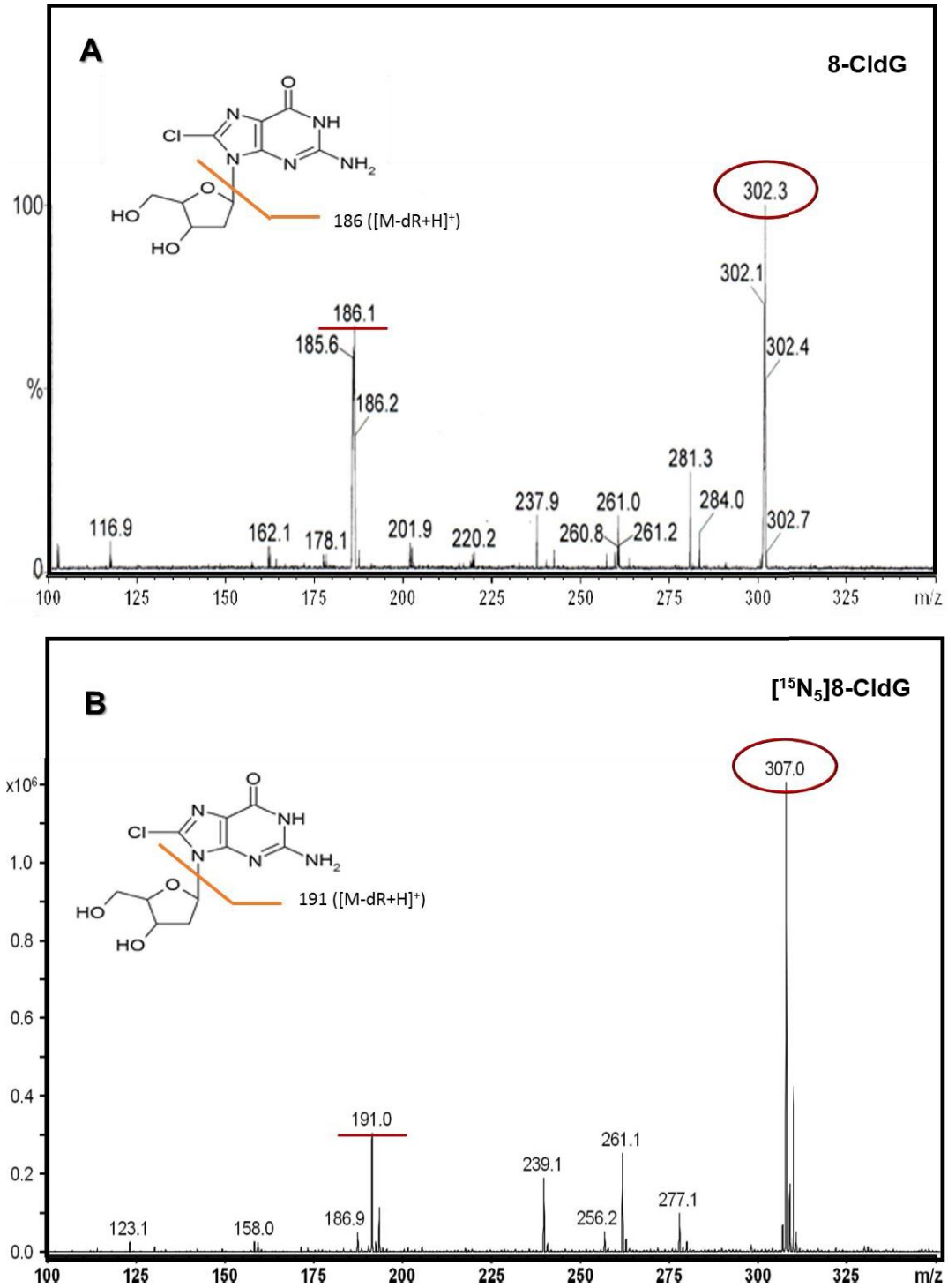


Figura 23. Espectros de massas dos adutos 8-cloro-2'-desoxiguanosina (8-CldG) (fragmentação do íon *m/z* 302) (A) e [$^{15}N_5$]8-CldG (espectro total, sendo possível observar a distribuição isotópica devido à presença do átomo de cloro) (B).

4.2 Animais

O protocolo de tratamento dos animais e a descrição os grupos de animais tratados estão descritos no item **3.4** de Material e Métodos.

4.2.1 Níveis glicêmicos

Os níveis glicêmicos de cada grupo foram obtidos conforme descrito no item **3.4.2** de Material e Métodos.

Tendo como base o trabalho de Abeeleh *et al.* (2009), foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia superior a 250 mg/dL após 72h da injeção i.v. de STZ. Os animais do grupo controle do presente estudo apresentaram níveis glicêmicos no intervalo 84 **–** 120 mg/dL.

Após 72h da administração de STZ (como descrito no ítem **3.4.1** de Material e Métodos), parte dos animais apresentou níveis glicêmicos entre 160 e 298 mg/dL. Como ao longo do período experimental os níveis glicêmicos desses animais se mantiveram superiores aos dos animais controles e inferiores aos dos diabéticos sem tratamento, foi criado o grupo glicemia intermediária (INT 6 sem).

Os níveis médios de glicemia de cada grupo após 72h da injeção de STZ ou de solução salina (**Tabela 2**) são apresentados a seguir.

Tabela 2: Níveis glicêmicos dos animais após 72h da injeção de STZ ou solução salina, para confirmação da hiperglicemia ou normoglicemia dos animais, respectivamente (Média ± desvio padrão)

Glicemia 72 h após injeção (mg/dL)						
CTL 6 sem	INT 6 sem	STZ 6 sem	INS 2 sem	INS 6 sem	CTL 7d	STZ 7d
118 ± 4	235 ± 64	419 ± 116	445 ± 63	446 ± 129	118 ± 6	346 ± 158

4.2.1.1 Grupos do período experimental de 6 semanas

Os níveis glicêmicos dos animais de cada grupo do período experimental de 6 semanas (CTL 6 sem, INT 6 sem, STZ 6 sem, INS 2 sem e INS 6 sem) estão apresentados nas **Figuras 24** a **29**. A análise dos níveis glicêmicos dos animais ao longo do estudo permite observar que a glicemia retorna ao nível normal após 1 semana da administração de insulina (INS 6 sem e INS 2 sem).

Nas **Figuras 30** e **31** são apresentados os dados com a comparação estatística da glicemia dos diferentes grupos de animais. Observa-se na **Figura 30** que o grupo “STZ 6 sem” apresentou glicemia significativamente elevada em relação ao controle ao longo do período experimental ($p < 0,001$). Os animais do grupo “INT 6 sem” apesentaram glicemia acima dos níveis dos animais do grupo controle, porém sem diferença estatística. É possível observar na **Figura 31** que a glicemia dos animais do grupo “INS 2 sem” volta ao nível normal após 1 semana da administração da insulina. Ao final da segunda semana da administração de insulina, a glicemia se iguala aos níveis dos animais do grupo tratado precocemente por 6 semanas (INS 6 sem) e dos animais controle (CTL 6 sem).

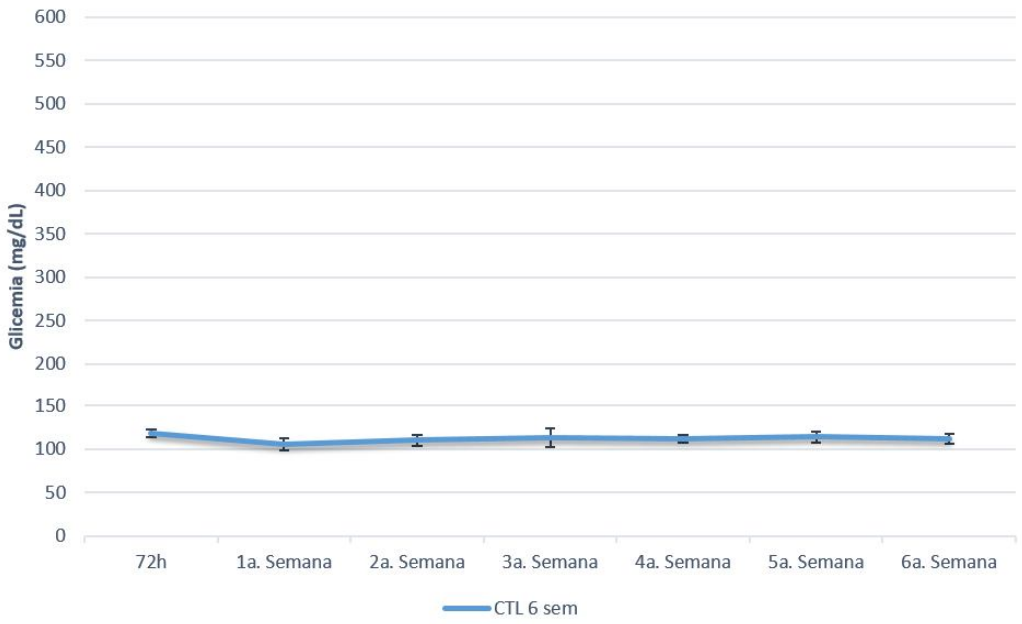


Figura 24. Níveis glicêmicos do grupo *CTL 6 sem* (Média ± desvio padrão; N=10).

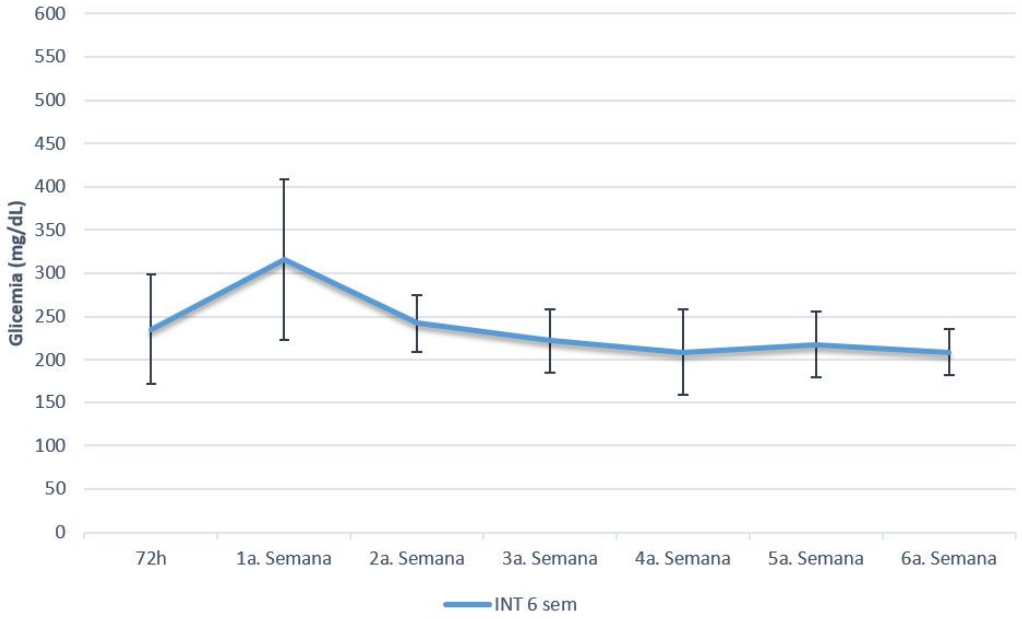


Figura 25. Níveis glicêmicos do grupo *INT 6 sem* (Média ± desvio padrão; N=5).

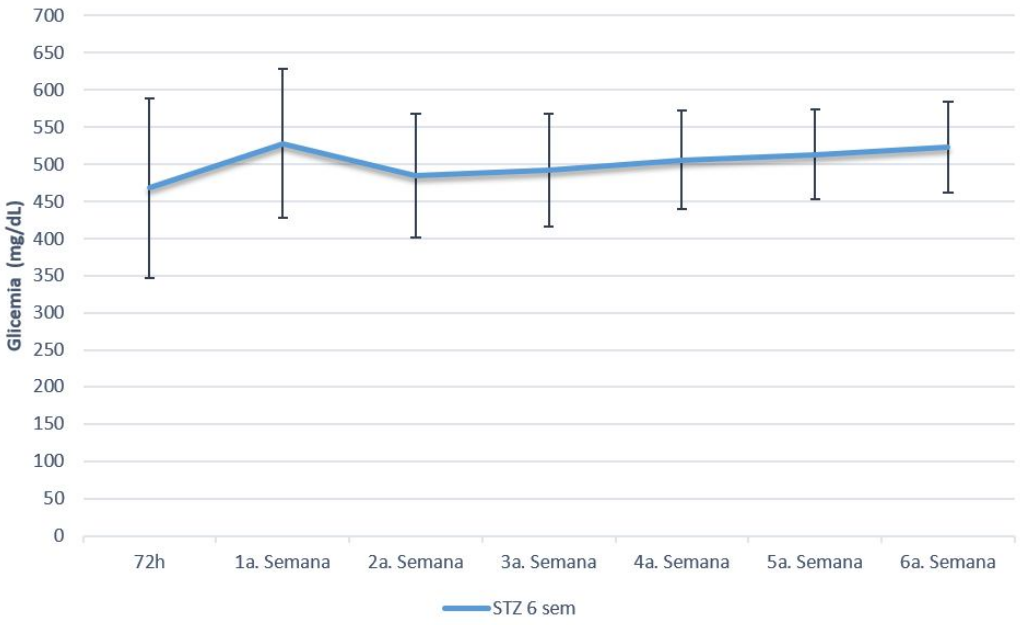


Figura 26. Níveis glicêmicos do grupo *STZ 6 sem* (Média ± desvio padrão, N=8).

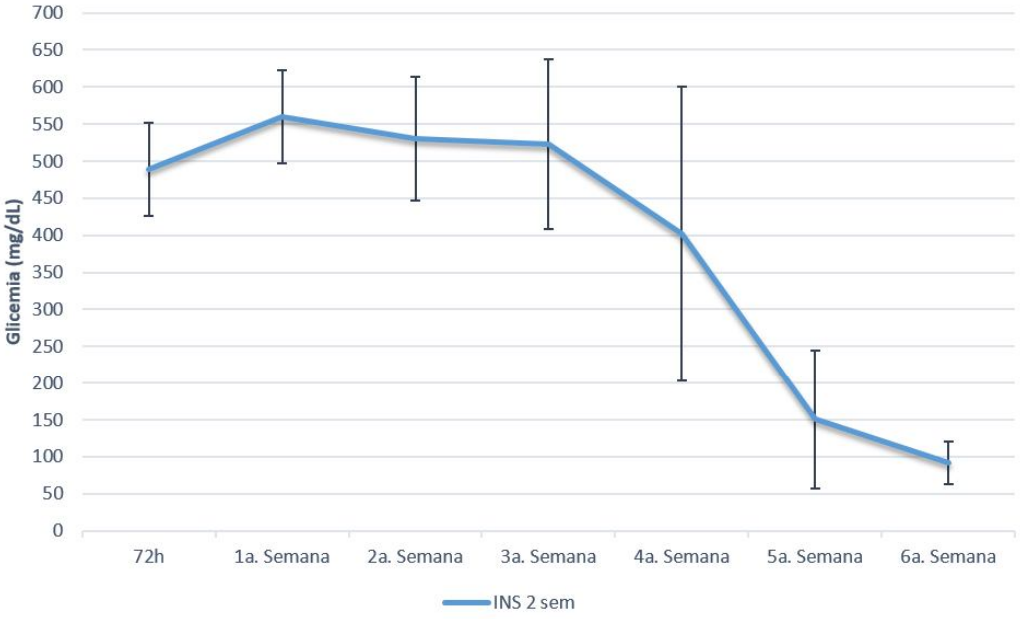


Figura 27. Níveis glicêmicos do grupo *INS 2 sem* (Média ± desvio padrão, N=13).

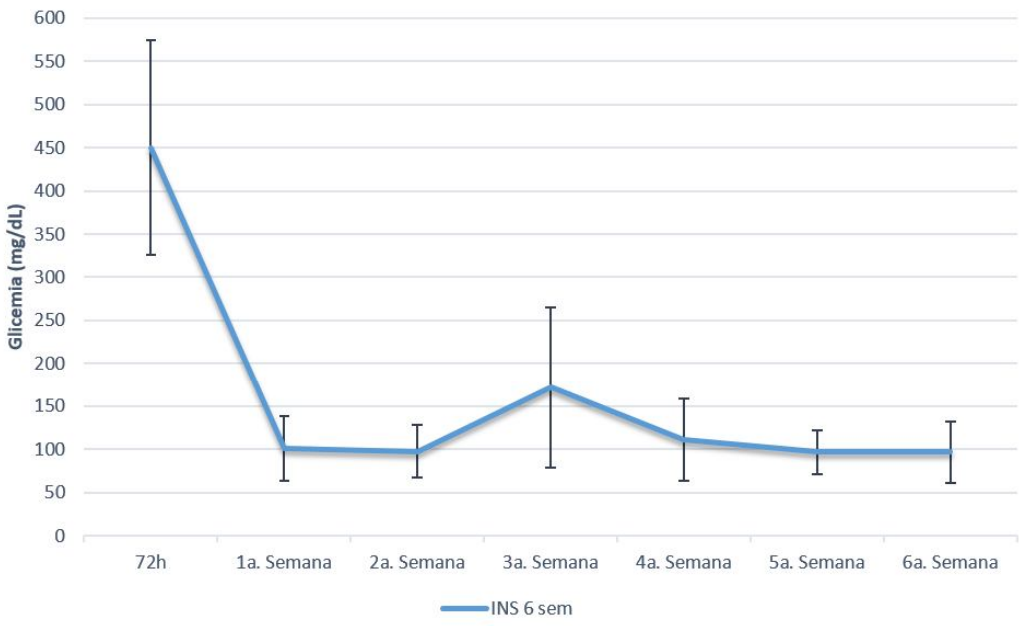


Figura 28. Níveis glicêmicos do grupo *INS 6 sem* (Média ± desvio padrão, N=14).

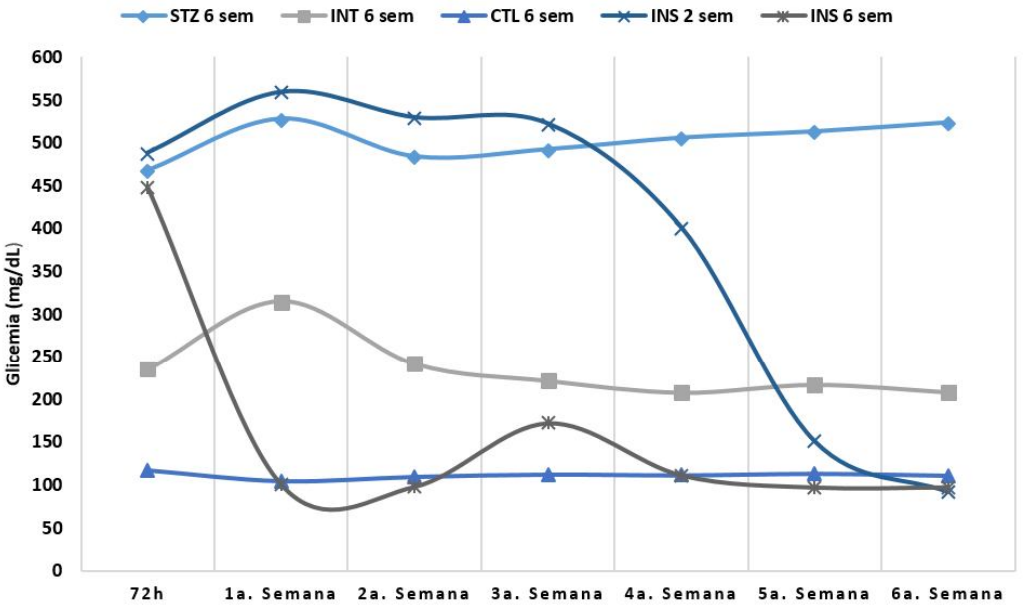


Figura 29. Níveis glicêmicos médios de todos os grupos do período experimental de 6 semanas. (CTL 6 sem, N= 10; INT 6 sem, N = 5; STZ 6 sem, N = 8; INS 2 sem, N = 13; INS 6 sem, N = 14).

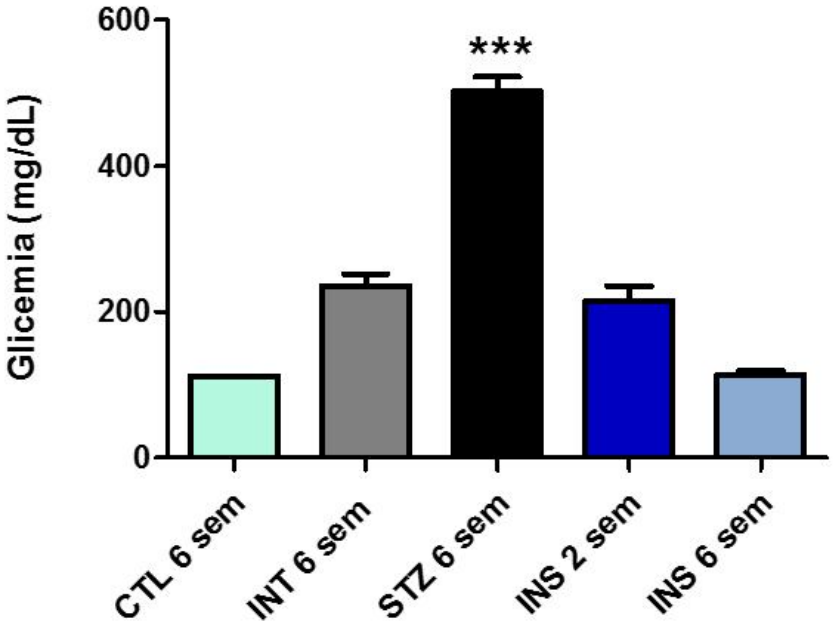


Figura 30. Níveis glicêmicos médios dos diferentes grupos durante o período experimental de 6 semanas (Média ± desvio padrão). CTL 6 sem, n= 10; INT 6 sem, n = 5; STZ 6 sem, n = 8; INS 2 sem, n = 13; INS 6 sem, n = 14. *P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 de acordo com ANOVA não paramétrico com pós-teste de Dunn, comparando-se os diferentes grupos com grupo controle.

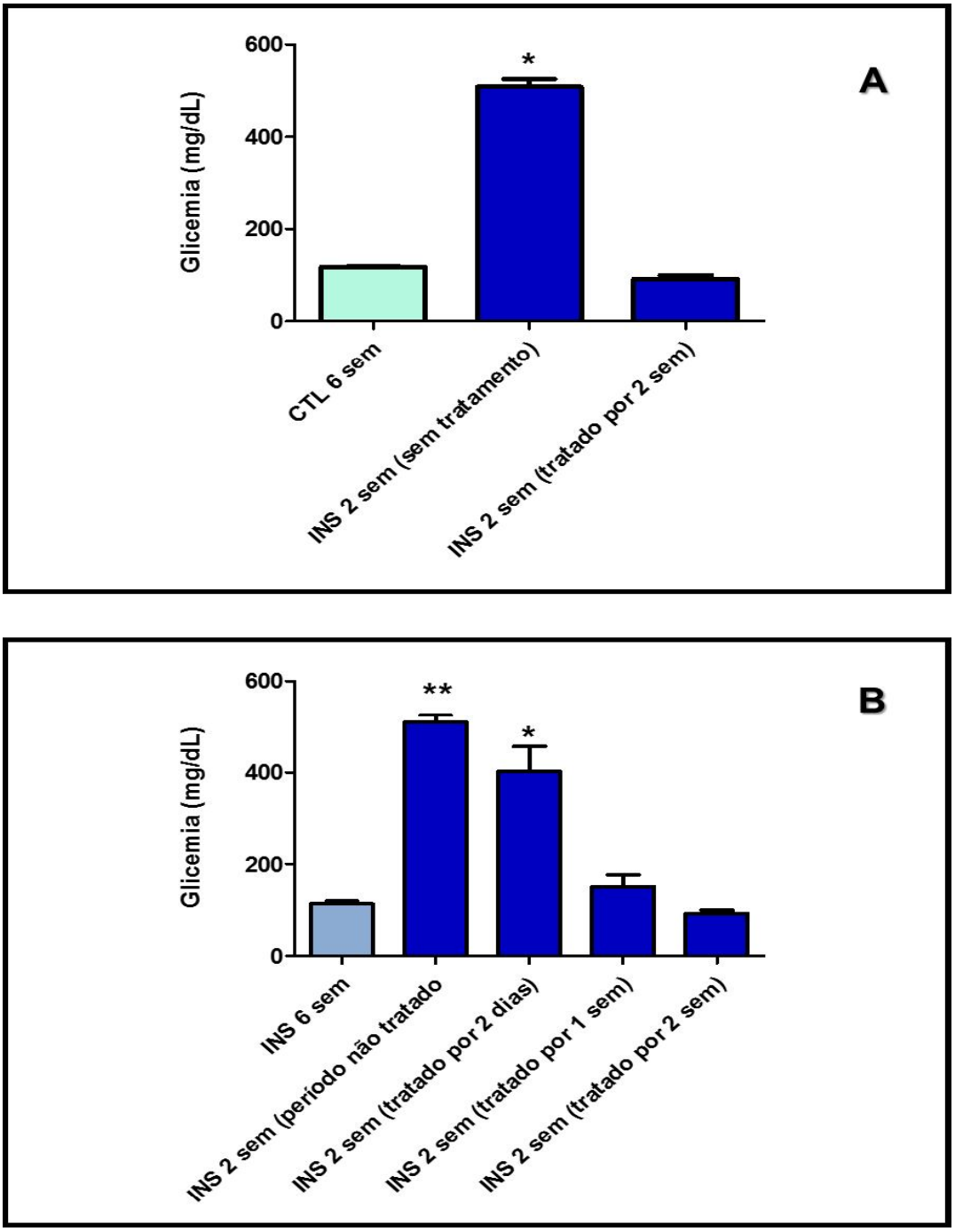


Figura 31. Níveis glicêmicos do grupo INS 2 sem (n = 13) em diferentes períodos sem e com tratamento com insulina (Média ± desvio padrão). *P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 de acordo com ANOVA não paramétrico com pós-teste de Dunn, comparando-se os diferentes grupos com: (A) Grupo controle CTL 6 sem, n = 10; (B) Grupo tratado com insulina por 6 semanas (INS 6 sem), n = 14.

4.2.1.2 Grupos do período experimental de 7 dias

Os níveis glicêmicos dos animais de cada grupo do período experimental de 7 dias (CTL 7d e STZ 7d) são apresentados nas **Figuras 32** a **34**; e na **figura 35** são apresentados os dados com a comparação estatística da glicemia dos dois grupos de animais.

Observa-se que a partir das 24 h da administração de STZ os animais diabéticos por 7 dias (STZ 7d) apresentaram níveis glicêmicos entre 400-450 mg/dL (**Figura 34**). Dessa forma, é apresentado na **Figura 35** que o grupo "STZ 7d" apresentou glicemia significativamente elevada em relação ao controle ao rr

A hiperglicemia apresentada pelos animais do grupo "STZ 7d" possibilitou neste trabalho a visualização dos danos causados por estresse oxidativo e glicação avançada que são rapidamente induzidos após o estabelecimento do diabetes mellitus.

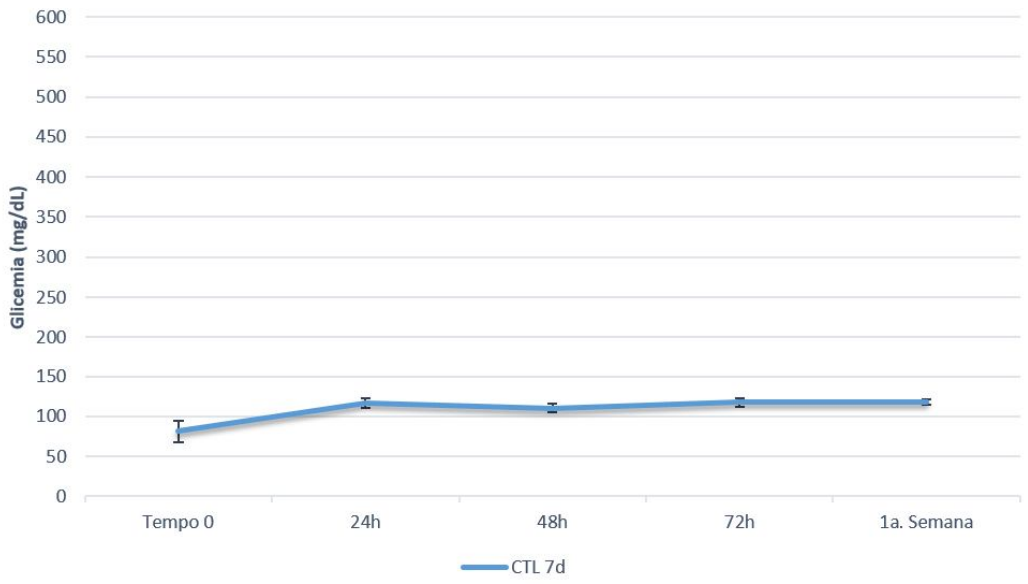


Figura 32. Níveis glicêmicos do grupo *CTL 7d* (Média ± desvio padrão, N=4). O primeiro ponto refere-se ao dia da administração i.v. de solução salina. Na sequência, a glicemia foi mensurada em 24 h, 48 h, 72 h e 7 dias após a administração da solução salina.

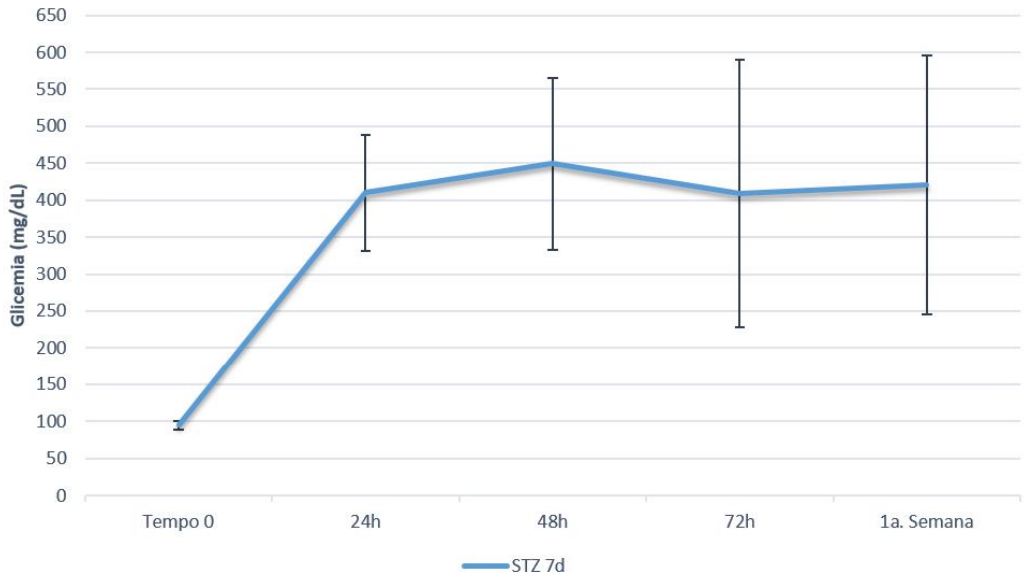


Figura 33. Níveis glicêmicos do grupo *STZ 7d (*Média ± desvio padrão, N=4). O primeiro ponto refere-se ao dia da administração i.v. de STZ. Na sequência, a glicemia foi mensurada em 24 h, 48 h, 72 h e 7 dias após a administração de STZ.

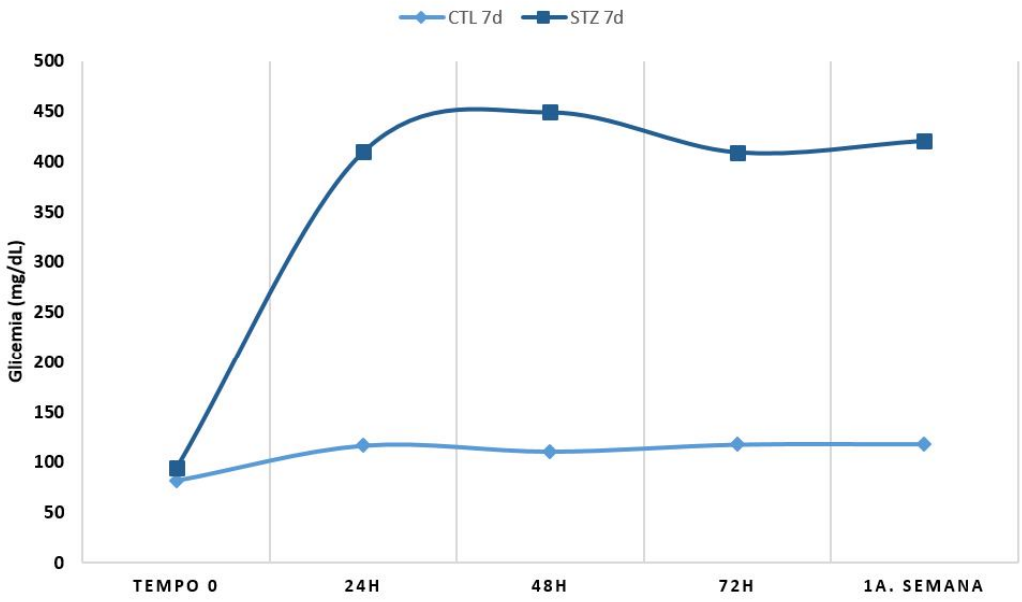


Figura 34. Níveis glicêmicos médios dos grupos do período experimental de 7 dias (CTL 7d, N=4; STZ 7d, N=4).

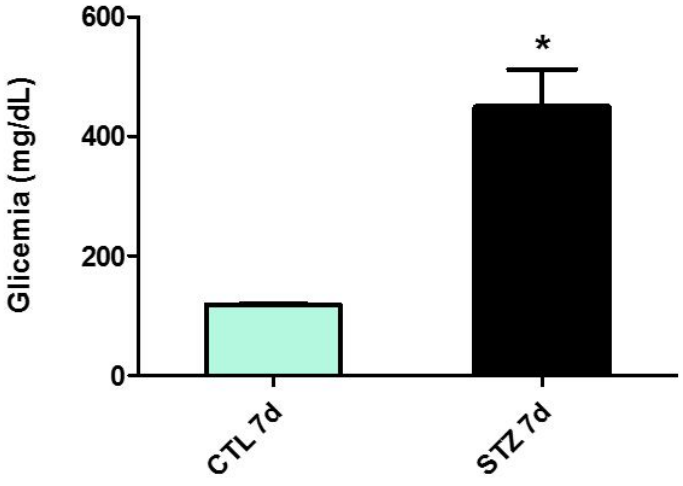


Figura 35. Níveis glicêmicos do grupo STZ 7d (n = 4) em comparação ao grupo controle CTL 7d (n = 4), (Média ± desvio padrão) *P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

4.2.2 Quantificação de Hemoglobina Glicada (HbA1c)

As análises foram conduzidas como descrito no item **3.9** de Material e Métodos. Os dados obtidos estão apresentados na **tabela 3** e **figura 36**.

Como pode ser observado, o período de diabetes por 6 semanas levou ao aumento dos níveis de HbA1c, não havendo completa recuperação após 2 semanas de tratamento com insulina apesar do controle glicêmico. Porém, é possível observar que a redução dos níveis de HbA1c apresentada pelos animais do grupo "INS 2 sem" foi significativa, com $p < 0,01$; enquanto que os animais diabéticos não tratados apresentam valor de $p < 0,001$. O tratamento precoce com insulina, iniciado logo que houve a indução do diabetes mellitus, por sua vez, apresentou efeito protetor contra a formação de hemoglobina glicada, de acordo com Nagisa *et al* (2003). O nível elevado de hemoglobina glicada também é observado após 7 dias de diabetes (grupo STZ 7d), indicando que as reações de glicação não enzimática são rapidamente induzidas na condição de hiperglicemia.

Tabela 3: Níveis de hemoglobina glicada nos diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

Níveis de HbA1c (%)						
CTL 6 sem	INT 6 sem	STZ 6 sem	INS 2 sem	INS 6 sem	CTL 7d	STZ 7d
1,98 ± 0,22	3,02 ± 0,7	8,41 ± 1,72	5,39 ± 1,75	1,87 ± 0,4	1,67 ± 0,14	3,38 ± 0,8

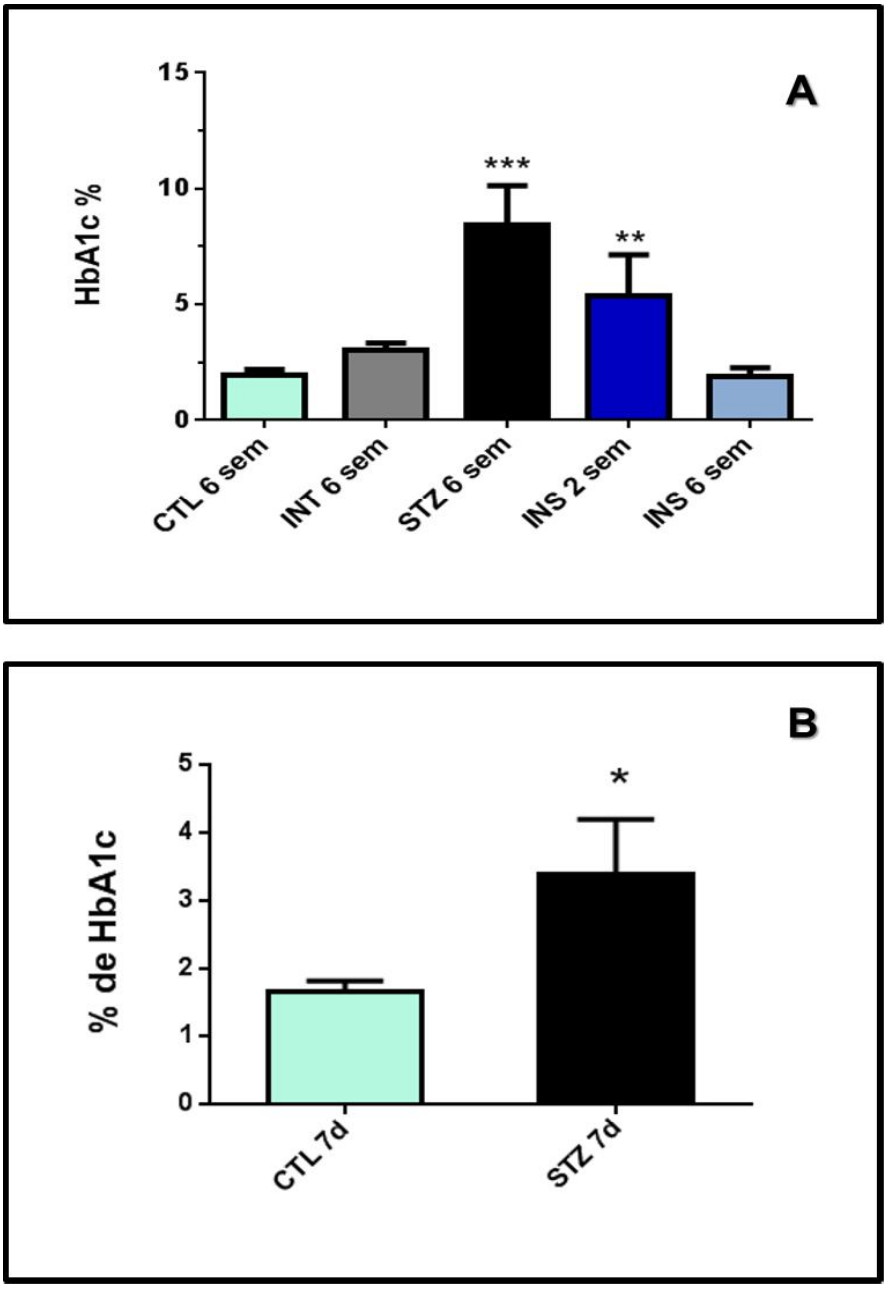


Figura 36. Concentração de hemoglobina glicada nos ratos dos diferentes grupos experimentais (A) Grupos do período experimental de 6 semanas. CTL (6 sem): controle, N = 10; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 8; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 13; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 14; INT 6 sem = glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. (B) Grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

4.2.3 Peso corpóreo

Os dados de variação do peso corpóreo dos animais nos diferentes grupos experimentais (item **3.4.4** de Material e Métodos) são apresentados a seguir.

4.2.3.1 Grupos de período experimental de 6 semanas

Os dados obtidos estão apresentados na **tabela 04** e **figuras 37 e 38**. Assim como nos estudos de Delfino *et al*. (2002) e Vidotti *et al.* (2008) foi possível observar que os animais diabéticos sem tratamento adquiriram menos peso ao longo do período em relação aos animais controle; e que os animais tratados com insulina, de forma oposta aos animais sem tratamento, adquiriram mais peso que os animais controle. Houve diferença estatística com $p < 0,05$ entre os animais do grupo diabético sem tratamento (STZ 6 sem) e animais do grupo tratado com insulina por 6 semanas (INS 6 sem).

Tabela 4: Valores médios de peso (g) e respectivos desvios-padrão dos grupos de período experimental de 6 semanas.

Grupo	Tempo 0	1a. Semana	2a. Semana	3a. Semana	4a. Semana	5a. Semana	6a. Semana
CTL 6 sem	246 ± 10	276 ± 16	309 ± 12	332 ± 15	343 ± 19	358 ± 25	353 ± 23
INT 6 sem	256 ± 6	299 ± 6	326 ± 9	345 ± 14	353 ± 21	369 ± 26	370 ± 20
STZ 6 sem	250 ± 11	280 ± 13	292 ± 17	300 ± 25	297 ± 30	304 ± 34	289 ± 37
INS 2 sem	270 ± 19	298 ± 27	305 ± 34	320 ± 36	330 ± 39	373 ± 42	365 ± 44
INS 6 sem	276 ± 18	330 ± 24	361 ± 21	375 ± 25	387 ± 27	409 ± 31	400 ± 24

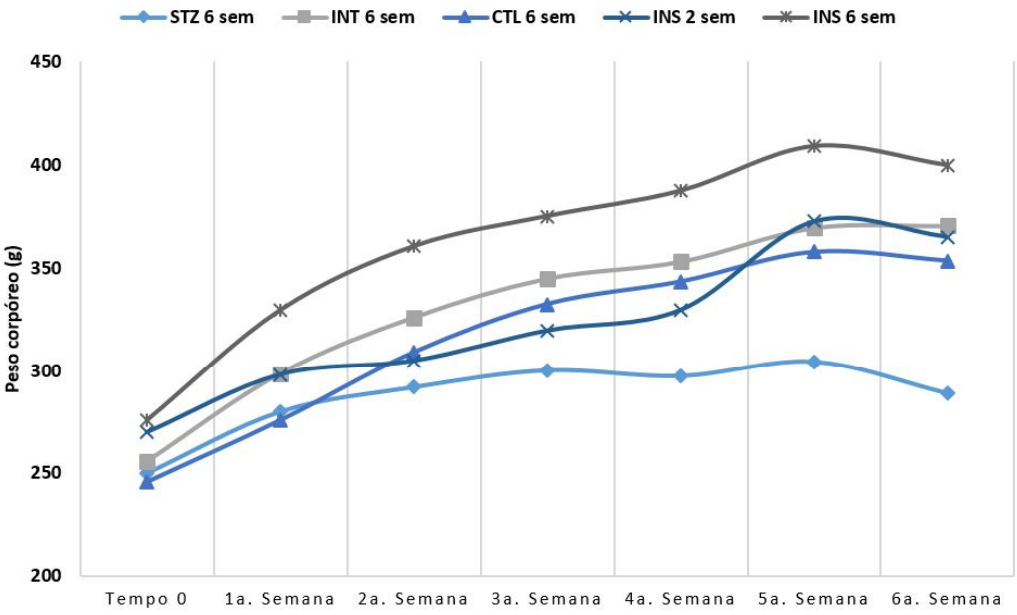


Figura 37. Média de peso corpóreo (g) de todos os grupos do período experimental de 6 semanas.

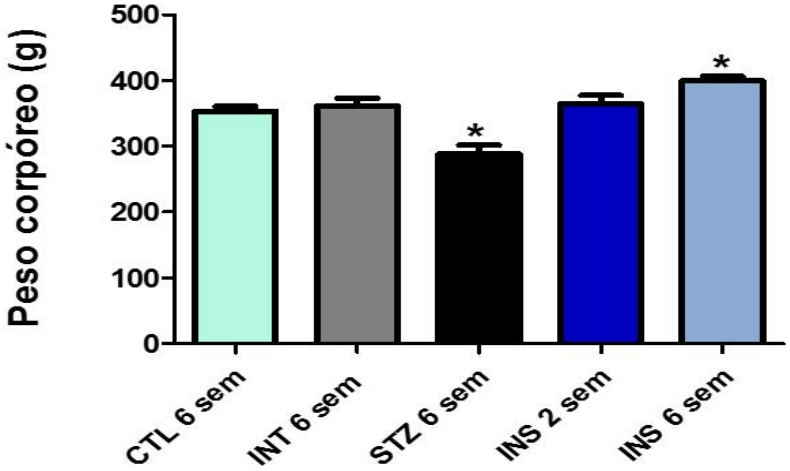


Figura 38.Peso corpóreo (g) dos diferentes grupos experimentais referente a última pesagem (dia da eutanásia) (Média ± desvio padrão). CTL 6 sem, n = 10; INT 6 sem, n = 5; STZ 6 sem, n = 8; INS 2 sem, n = 13; INS 6 sem, n = 14. *P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 de acordo com ANOVA não paramétrico com pós-teste de Dunn. Observa-se diferença significativa entre os animais do grupo diabético sem tratamento (STZ 6 sem) e animais do grupo tratado com insulina por 6 semanas (INS 6 sem).

4.2.3.2 Grupos do período experimental de 7 dias

Os grupos do período experimental de 7 dias passaram por apenas 3 medições de peso corpóreo devido ao curto período do experimento (no dia da administração de STZ ou solução salina; 72 horas e 7 dias após a administração). Os dados são apresentados na **tabela 05** e **figuras 39 e 40**.

Observa-se nas **figuras 39 e 40** que os animais do grupo controle apresentaram peso corpóreo menor que os animais diabéticos sem tratamento. Isso ocorreu porque, dentre os animais com 8 semanas de vida fornecidos pelo biotério, 4 animais apresentavam inicialmente 168-182 g, enquanto outros 4 apresentavam 276-287 g. Dessa forma, como os animais a serem submetidos à indução de DM por STZ devem apresentar peso corpóreo superior a 250 g para evitar complicações decorrentes do procedimento, foram selecionados para o grupo diabético (STZ 7d) os 4 animais com peso no intervalo 276-287 g. Entretanto, ao longo do período de 7 dias houve ganho de peso nos animais controle e perda de peso nos animais diabéticos.

Tabela 5: Valores médios de peso (g) e respectivos desvios-padrão dos grupos de período experimental de 6 semanas.

Grupo	Jejum	72 h	Eutanásia
CTL 7d	178 ± 7	205 ± 4	234 ± 9
STZ 7d	278 ± 8	268 ± 19	259 ± 36

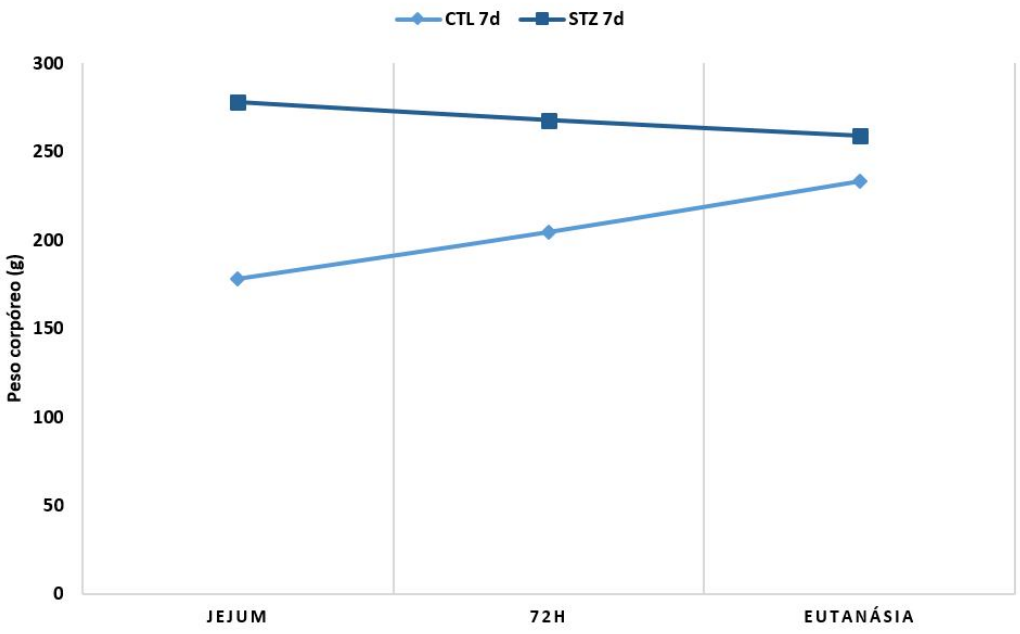


Figura 39. Média de peso corpóreo (g) dos grupos do período experimental de 7 dias. O primeiro ponto refere-se ao dia da administração i.v. de solução salina ou STZ. Na sequência, o peso foi mensurado em 72 h e 7 dias após a administração da solução salina ou STZ.

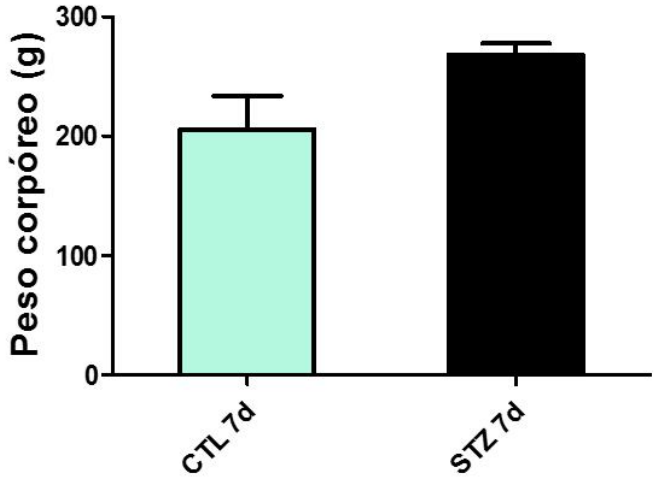


Figura 40. Peso corpóreo (g) do grupo STZ 7d (n = 4) em comparação ao grupo controle CTL 7d (n = 4). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 de acordo com teste t não paramétrico.

4.2.4 Volume urinário

Foi realizada coleta de urina por 10 horas antes da eutanásia (como descrito no ítem **3.4.5** de Material e Métodos). Os resultados são expressos em média ± desvio padrão na **tabela 6**.

Pode-se verificar que a diurese dos animais diabéticos é cerca de 8 vezes maior que do grupo controle. Mesmo os animais tratados com insulina pelos períodos de 6 semanas (INS 6 sem) e 2 semanas (INS 2 sem) e os animais com glicemia intermediária (INT 6 sem) apresentaram volume urinário aumentado, comprovando o mecanismo de diurese osmótica nos animais diabéticos.

Tabela 6: Diurese apresentada pelos diferentes grupos experimentais. Coleta realizada por 10 horas.

Diurese em 10 horas (mL/kg)						
CTL 6 sem	INT 6 sem	STZ 6 sem	INS 2 sem	INS 6 sem	CTL 7d	STZ 7d
21 ± 4	154 ± 14	202 ± 35	155 ± 28	87 ± 13	30 ± 6	231 ± 37

Segundo Vidotti *et al*. (2008), o aumento do volume urinário em indivíduos ou animais na vigência do DM está associado a adaptação renal para limitar os danos causados pelos altos níveis de glicose circulante. Porém também existem mecanismos compensatórios para limitar as perdas de eletrólitos e água, que acarretam em alterações no túbulo proximal e em mecanismos de transporte de glicose. Os autores, apesar de ainda não terem o mecanismo completamente elucidado, analisaram em seus estudos, um grupo de ratos diabéticos não

tratados e um grupo de ratos diabéticos tratados com insulina, ambos durante o período experimental de oito semanas. Houve o aumento persistente da expressão de proteínas SGLT1, que se referem a um dos tipos de transportadores de glicose das células dos túbulos renais. Foi proposto que o aumento dos SGLTs pode evitar perdas maiores de sódio durante a etapa de filtração renal no diabetes, porém também ocorre o aumento do fluxo de glicose através da membrana luminal dos túbulos proximais, o que pode resultar em glicotoxicidade celular e posterior formação de produtos avançados de glicação quando ocorre absorção excessiva da glicose, como no DM. Esses eventos causam lesão renal e podem ser relevantes para o estabelecimento da nefropatia diabética. Em relação à insulinoterapia, estudos recentes apontam que a insulina está relacionada ao estímulo do transporte de sódio no túbulo proximal e sugere-se que a insulina é diretamente responsável na modulação da expressão de SGLT1.

4.3 Análise de creatinina plasmática

As análises foram realizadas conforme descrito no item **3.6** de Material e Métodos. Os níveis de creatinina no plasma apresentados pelos grupos do período experimental de 6 semanas e de 7 dias estão apresentados na **Tabela 7** e **Figura 41**.

Tabela 7: Creatinina plasmática dos diferentes grupos experimentais

Creatinina plasmática (mg/dL)						
CTL 6 sem	INT 6 sem	STZ 6 sem	INS 2 sem	INS 6 sem	CTL 7d	STZ 7d
0,43 ± 0,07	0,46 ± 0,05	0,47 ± 0,09	0,59 ± 0,04	0,53 ± 0,05	0,33 ± 0,03	0,36 ± 0,1

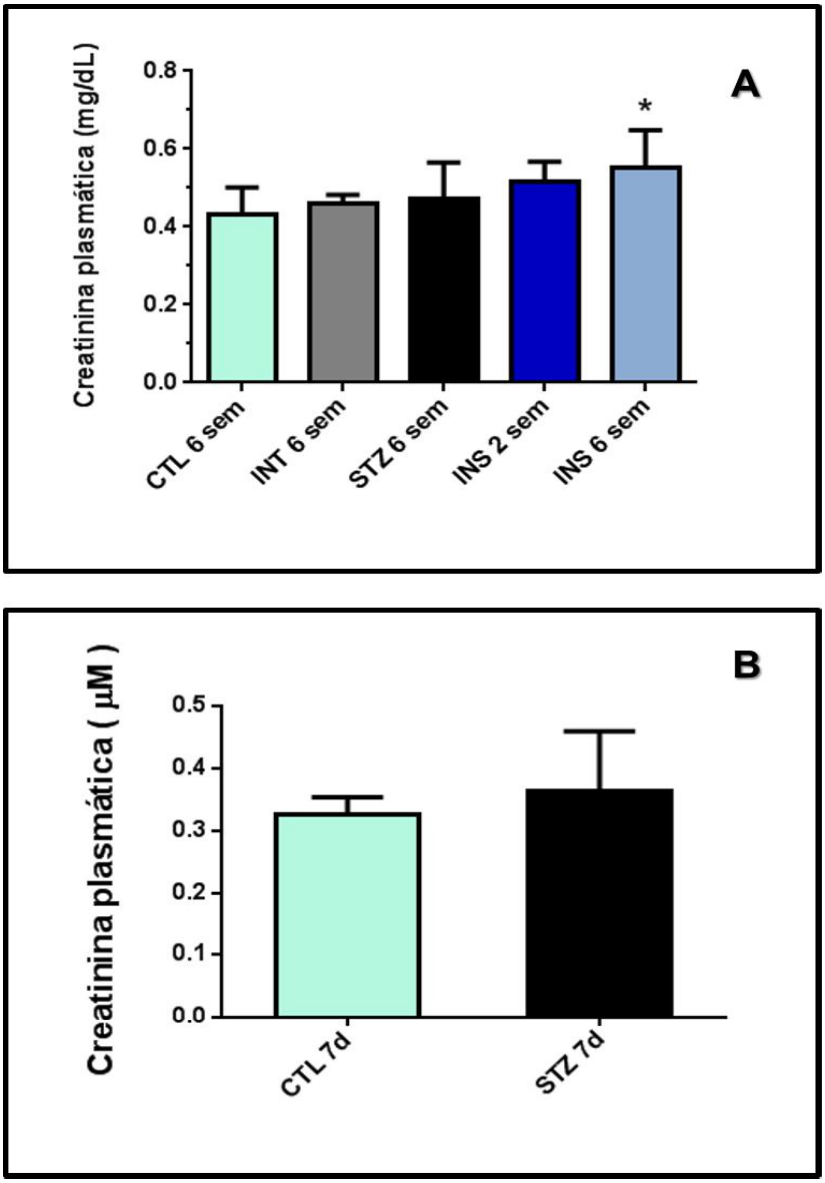


Figura 41. Níveis de creatinina em plasma dos ratos dos diferentes grupos experimentais (A) Grupos do período experimental de 6 semanas. CTL (6 sem): controle, N = 8; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 8; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 10; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 13; INT 6 sem = glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle, de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. (B) Grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

Em geral, os exames laboratoriais que avaliam a função renal tentam estimar a taxa de filtração glomerular (TFG), definida como o volume plasmático de uma substância que pode ser completamente filtrada pelos rins em uma determinada unidade de tempo. A TFG é uma das mais importantes ferramentas na análise da função renal, sendo também um indicador do número de néfrons funcionais (SODRÉ, COSTA, LIMA, 2007).

Embora o estudo da função renal tenha despertado o interesse de muitos pesquisadores, principalmente no campo do desenvolvimento de testes que auxiliem os médicos a estabelecer um diagnóstico precoce e assim monitorar a terapêutica medicamentosa, nenhum marcador atualmente disponível é completamente eficaz em analisar a função e/ou a lesão renal de forma precisa. Dessa forma, torna-se imprescindível o conhecimento de todos eles para uma precisa avaliação na rotina laboratorial (SODRÉ, COSTA, LIMA, 2007) o que nem sempre é possível de ser realizado em estudos com animais, devido à pequena quantidade de material biológico disponível e sobretudo ao alto custo das análises.

Sabendo-se que a concentração sérica de creatinina é um teste de triagem comumente utilizado para indicar alteração da função renal (SODRÉ, COSTA, LIMA, 2007) e considerando os valores de referência do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP) (SANTOS, 2008), que abrange o intervalo de 0,3 a 0,6 mg/dL de creatinina plasmática, todos os animais apresentaram resultados dentro da normalidade. Entretanto, as amostras de plasma dos animais diabéticos tratados com insulina por 6 semanas (INS 6 sem) apresentaram um nível significativamente maior de creatinina em comparação com os animais controle (CTL 6 sem) ($p < 0,05$) (**figura 41 A**). Não houve

diferença significativa entre os animais do período experimental de 7 dias (**figura 41 B**).

Sabendo-se ainda que a insulina circulante proveniente da administração subcutânea pode atingir concentrações de 2 a 5 vezes mais em relação aos níveis endógenos (OTHMAN et al., 2013) e que os animais do grupo “INS 6 sem” apresentaram aumento significativo de níveis de creatinina plasmática em relação ao grupo controle, pode-se pensar que a hiperinsulinemia foi responsável por esse quadro.

Buscando compreender como a hiperinsulinemia provoca lesão renal, Othman e colaboradores investigaram em estudo recente a relação entre danos ao DNA induzidos pela insulina em células renais *in vitro* e *in vivo*. É conhecido que as EROs são importantes mediadores para a sinalização celular da insulina. Então sob condição de hiperinsulinemia os eventos de sinalização podem apresentar superativação, com geração de EROs em concentrações maiores do que o sistema de defesa possa inativar ou diminuir, o que pode explicar o fato de a exposição a concentrações menores que 5 nM de insulina ser suficiente para que as células renais produzam radical superóxido e seja apresentado efeito genotóxico na cultura celular. Um dos mecanismos de sinalização sugeridas para a insulina é a ativação da geração de hidroperóxidos dependente de NADPH (OTHMAN et al., 2013).

4.4 Avaliação de nitrito sérico

O experimento foi realizado como descrito no item **3.5** de Material e Métodos. Os níveis de nitrito no soro apresentados pelos grupos do período experimental de 6 semanas e de 7 dias estão apresentados na **figura 42.**

Apresentaram concentração significativamente maior de nitrito sérico em comparação com os animais controle (CTL 6 sem): os animais diabéticos sem tratamento por 6 semanas (STZ 6 sem), com $p < 0,01$; os animais diabéticos tratados com insulina por 2 semanas (INS 2 sem), com $p < 0,01$; e os animais diabéticos tratados por 6 semanas (INS 6 sem), com $p < 0,05$ (**figura 42 A**).

Nos grupos do período experimental de 7 dias, a mesma situação foi observada: as amostras dos animais diabéticos sem tratamento (STZ 7d) apresentaram um nível significativamente maior de nitrito sérico em relação ao grupo controle (CTL 7d), com $p < 0,05$ (**figura 42 B**). Essa observação indica que o aumento da concentração de nitrito no soro ocorre rapidamente após a indução de diabetes.

Nota-se que mesmo o tratamento precoce com insulina desde a indução do diabetes (INS 6 sem) elevou os níveis de nitrito sérico, apesar do controle glicêmico. Dessa forma, os níveis aumentados de nitrito podem estar relacionados ao processo inflamatório desencadeado pelo diabetes, com aumento da produção de $^{\bullet}NO$ (JOBGEN *et al.*, 2007). A insulina liga-se à subunidade α do receptor pertencente à família dos receptores de membrana que possuem capacidade tirosina-quinase, provoca uma mudança conformacional na subunidade β, que leva à sua autofosforilação em tirosina, e

ativa sua capacidade tirosina-quinase. Uma vez ativado, o receptor de insulina (IR) é capaz de fosforilar diversos substratos intracelulares, entre eles os substratos dos receptores de insulina (IRS-1-4), que quando fosforilados recrutam e ativam diversos efetores intracelulares, com funções celulares diferentes. A ativação da fosfatidil inositol (PI) 3-quinase pelo IRS-1 está envolvida preferencialmente nas ações metabólicas da insulina. Em situações normais, a insulina ativa a produção de •NO em células endoteliais por um mecanismo dependente da fosfatidil inositol (PI) 3-quinase, levando ao aumento da produção de •NO. Assim, a redução da ativação da via fosfatidil inositol (PI) 3-quinase/Akt em situação de hiperinsulinemia, está sendo considerada como evento fundamental para o desenvolvimento de lesão tecidual (GHOULEH *et al*., 2011; RABELO *et al*., 2010)

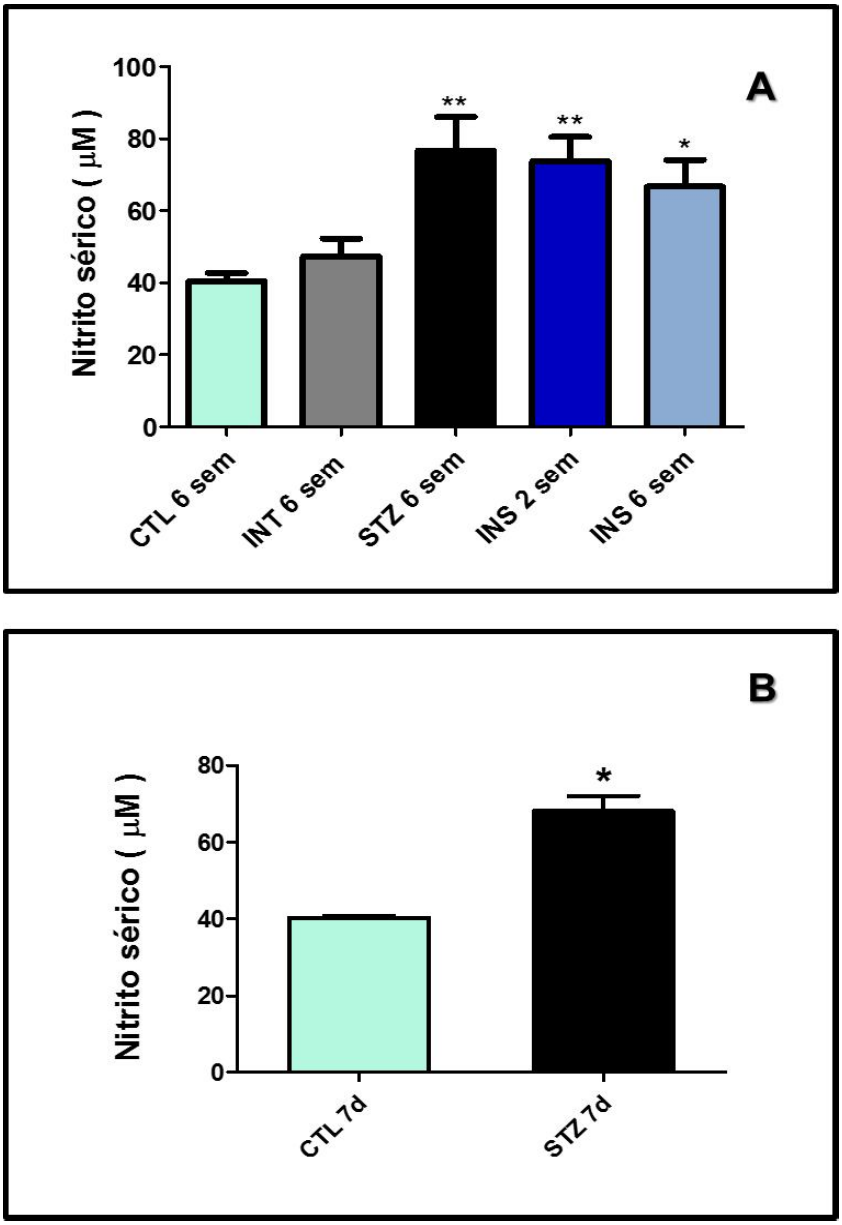


Figura 42. Níveis de nitrito sérico dos ratos dos diferentes grupos experimentais. (A) Grupos do período experimental de 6 semanas. CTL 6 sem: controle, N = 10; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 8; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 10; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 10; INT 6 sem:Glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle, de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. (B) Grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

4.5 Determinação de malonaldeído em plasma

As amostras foram preparadas e analisadas conforme descrito no item **3.7** de Material e Métodos. As concentrações de malonaldeído (MDA) nas amostras de plasma dos grupos do período experimental de 6 semanas e de 7 dias estão apresentadas na **figura 43**.

Contrariamente ao observado na análise da concentração de nitrito sérico, a concentração plasmática de MDA no grupo **"INS 6 sem"** não se mostrou alterada em relação ao controle. Tal observação nos indica que a elevação de nitrito sérico nesse grupo seja provavelmente devida ao aumento da geração de •NO pela eNOS, via sinalização da insulina, e não por indução de estresse oxidativo. Já os animais na situação de diabetes não tratado (STZ 6 sem) e na situação de diabetes tratado com insulina por 2 semanas após 4 semanas da indução de DM (INS 2 sem) apresentaram maiores níveis de MDA no plasma em relação ao grupo controle (CTL 6 sem), grupo tratado com insulina por 6 semanas (INS 6 sem) e grupo de glicemia intermediária (INT 6 sem). Com esses dados pode-se dizer que a hiperglicemia no intervalo de 450 a 600 mg/dL pelo período de 4 semanas induz um quadro de estresse oxidativo, com indução de peroxidação lipídica, que persiste mesmo após 2 semanas de tratamento com insulina e normalização da glicemia. No grupo **"INS 6 sem"** o controle glicêmico teve início 3 dias após a indução do diabetes, e esse controle foi eficiente para proteção contra a indução de peroxidação lipídica nos animais diabéticos. Adicionalmente, o grupo de glicemia intermediária (INT 6 sem) não apresentou elevação da concentração de MDA no plasma.

Nos grupos do período experimental de 7 dias observa-se tendência de aumento da concentração plasmática de MDA nos animais diabéticos (STZ 7d) em relação ao grupo controle (CTL 7d), porém sem diferença estatística significativa. A tendência de aumento da concentração plasmática de MDA logo após a primeira semana de diabetes (**Figura 43C**) juntamente com a observação de aumento da concentração de nitrito sérico nesse período de diabetes (**Figura 42B**) indicam que o estresse oxidativo é rapidamente induzido após o estabelecimento do diabetes.

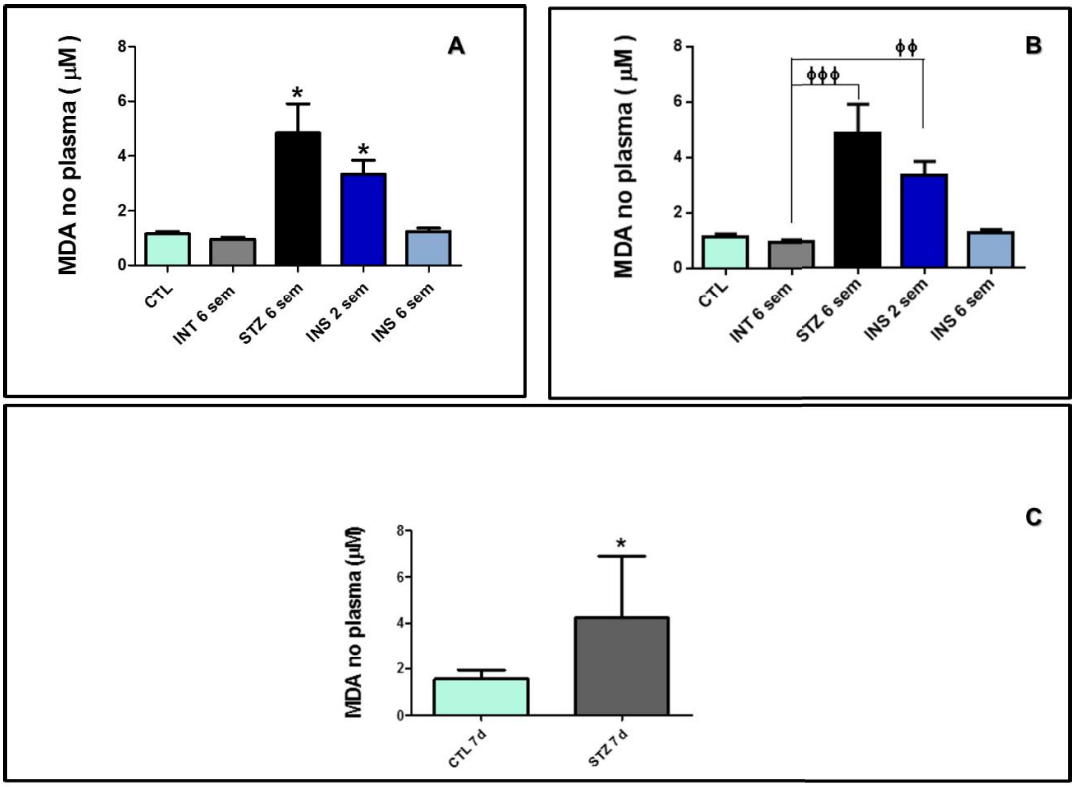


Figura 43. Concentrações plasmáticas de malonaldeído nos ratos dos diferentes grupos experimentais (A) Grupos do período experimental de 6 semanas. CTL (6 sem): controle, N = 9; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 6; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 10; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 10; INT 6 sem = glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle e (B) com o grupo de glicemia intermediária; de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn. (C) Grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

4.6 Determinação de malonaldeído em fígado e rim

As amostras foram preparadas e analisadas conforme descrito no item **3.8** de Material e Métodos. Os níveis de MDA em amostras de fígado e rim dos grupos do período experimental de 6 semanas e de 7 dias estão apresentados nas **figuras 44** e **45**.

Observa-se na **figura 44** que as concentrações de MDA em fígado e rim dos animais do período experimental de 6 semanas acompanham o perfil da concentração plasmática de MDA. Os animais na situação de diabetes não tratado (STZ 6 sem) e na situação de diabetes tratado com insulina por 2 semanas após 4 semanas da indução de DM (INS 2 sem) apresentaram maiores níveis de MDA em fígado ($p < 0,001$) e rim ($p < 0,05$) em relação ao grupo de animais controle (CTL 6 sem), ao grupo tratado com insulina por 6 semanas (INS 6 sem) e ao grupo de glicemia intermediária (INT 6 sem). Assim, a condição de hiperglicemia no intervalo de 450 a 600 mg/dL leva ao estresse oxidativo em tecidos como fígado e rim, persistindo por pelo menos 2 semanas após o início do tratamento com insulina e normalização da glicemia. Como o grupo **"INS 6 sem"** não apresentou níveis elevados de MDA ao término do período experimental, pode-se dizer que o estresse oxidativo persistente após a normalização da glicemia depende de um período mínimo anterior de diabetes não controlado, que neste estudo é superior a 3 dias e pode estar no intervalo de 1 a 4 semanas, uma vez que a hiperglicemia do DM induzido por STZ é estabelecida até 72h após a sua administração e o tratamento tardio com insulina foi iniciado após 4 semanas.

Sabe-se que diferentes vias ativadas pela condição de hiperglicemia contribuem para a indução de estresse oxidativo no diabetes. Tais vias compreendem: a geração de radical superóxido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial; a atividade aumentada da aldose redutase consumindo NADPH e indiretamente depletando GSH; o acúmulo de gliceraldeído-3-fosfato devido à diminuição de atividade da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase na via glicolítica e consequente geração de produtos de glicação avançada (AGEs) e ativação da proteína quinase C (PKC) e NADPH oxidase (BROWNLEE, 2001; BONNEFONT-ROUSSELOT, 2002).

Pode-se esperar, portanto, que as alterações metabólicas desencadeadas pela condição de hiperglicemia persistente não sejam prontamente revertidas após o controle da glicemia. Alterações na sinalização celular, no controle da expressão gênica, na estrutura e função mitocondrial, na atividade de enzimas, na estrutura de proteínas e mutações ocorridas durante o período de hiperglicemia podem contribuir para a propagação do dano tecidual mesmo na nova condição de glicemia controlada. Dessa forma, além do controle glicêmico, é importante que se desenvolvam estratégias de intervenção nas vias bioquímicas alteradas pela condição de hiperglicemia, a fim de reduzir os riscos das complicações micro e macrovasculares do diabetes (BONNEFONT-ROUSSELOT, 2002; OBROSOVA *et al.*, 2005; DREL *et al.*, 2006; HOTTA *et al.*, 2006; SHEN *et al.*, 2006; TAKEUCHI, TAKINO, YAMAGISHI, 2010; HOTTA *et al.*, 2012; BUSIK, GRANT, 2014).

Nos grupos do período experimental de 7 dias (**Figura 45**) observa-se, tanto em fígado quanto em rim, aumento dos níveis de MDA nos animais do grupo diabético (STZ 7d) em comparação com o controle ($p < 0,05$), indicando

que o estresse oxidativo nos tecidos é rapidamente induzido após o estabelecimento do diabetes.

Observa-se, adicionalmente, que em plasma, rim e fígado as concentrações de MDA (**Figuras 41** a **43**) seguem o perfil de concentração de hemoglobina glicada (HbA1c) (**Figura 44**), indicando que os eventos de glicação e estresse oxidativo ocorrem paralelamente ou podem estar relacionados. A hemoglobina glicada é um produto de Amadori estável, o qual representa um dos passos iniciais das reações de glicação não enzimática. Reações adicionais nas quais ROS estão frequentemente envolvidas resultam na formação de AGEs. Em contrapartida, AGEs estão envolvidos na indução de estresse oxidativo via sinalização intracelular desencadeada por sua ligação a receptores de AGE (RAGE) (VISTOLI *et al.*, 2013).

Uma vez tendo sido caracterizado o quadro de estresse oxidativo e de indução de glicação na vigência de diabetes utilizando-se MDA e HbA1c como biomarcadores e sua modulação pelos protocolos de tratamento seguidos, passou-se para a avaliação dos níveis urinários de adutos de DNA indicadores de estresse oxidativo (8-oxodG, 1,N^6-εdAdo e 1,N^2-εdGuo) e glicação avançada (CEdG), como apresentado a seguir.

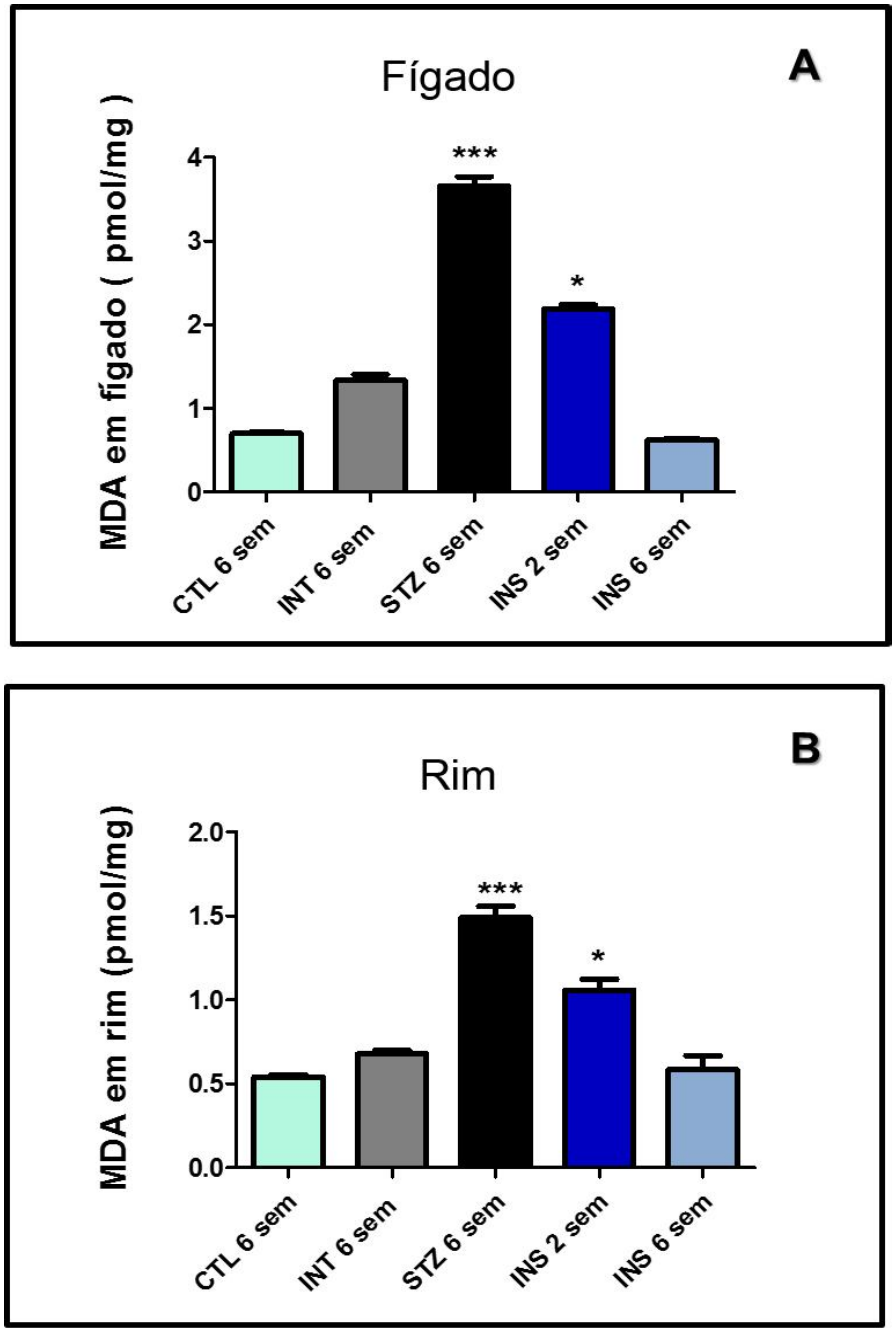


Figura 44. Níveis de malonaldeído em (A) fígado e (B) rim dos ratos dos diferentes grupos experimentais (A) Grupos do período experimental de 6 semanas. CTL (6 sem): controle, N = 9; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 6; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 10; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 10; INT 6 sem = glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn.

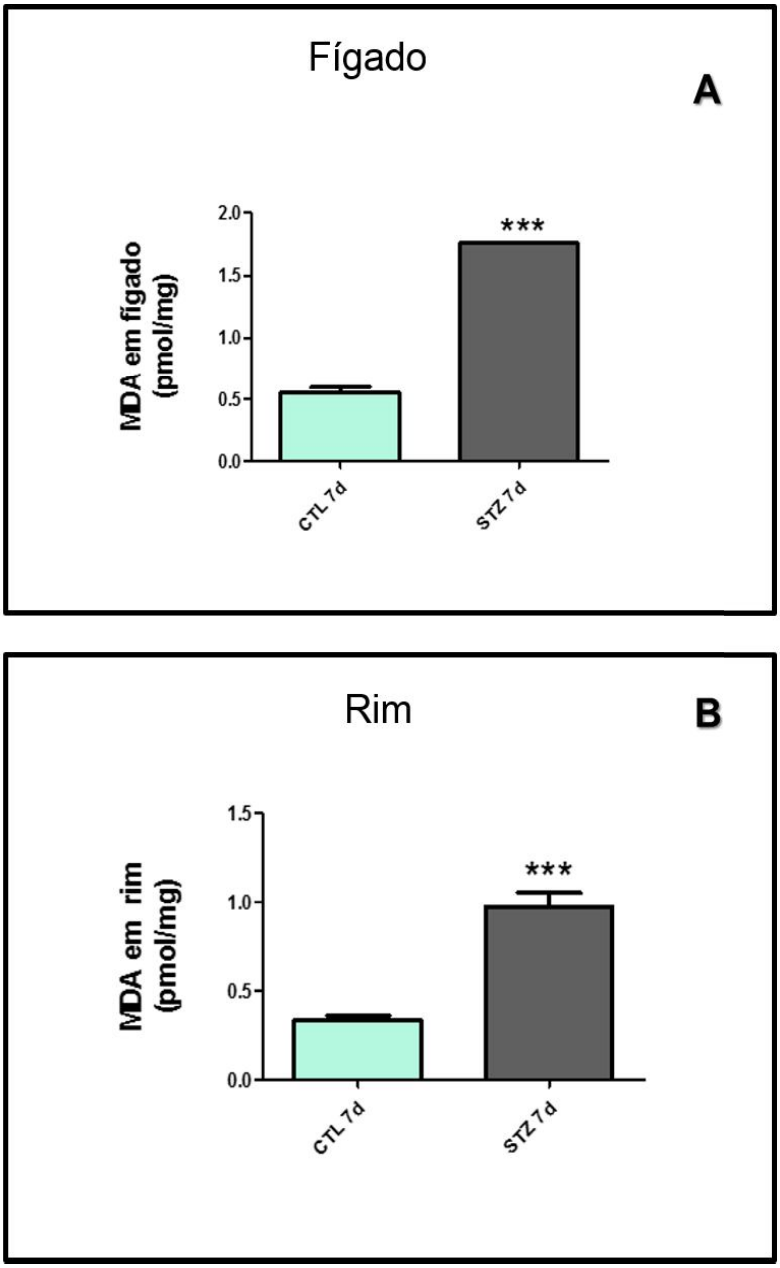


Figura 45. Níveis de malonaldeído em (A) fígado e (B) rim dos ratos dos grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

4.7 Quantificação das Lesões 8-OxodG, CEdG, 1,N^2-εdGuo e 1,N^6-εdAdo em urina

As amostras foram preparadas e analisadas conforme descrito no item **3.14** de Material e Métodos. Os níveis urinários dos adutos de DNA nos grupos do período experimental de 6 semanas e de 7 dias estão apresentados nas **figuras 46-51**.

Para a coleta de urina, os animais permaneceram em gaiolas metabólicas pelo período de 10 h. Dessa forma, os resultados estão expressos em níveis totais excretados no período de 10 h (pg/10 h) e concentração (pg/mL/10 h) para cada uma das lesões. Não foi possível detectar o aduto 1,N^2-εdGuo nas amostras de urina.

Ao se considerar os níveis totais de adutos excretados na urina dos animais pelo período de 10 h (pg/10h), verifica-se que os animais diabéticos apresentaram excreção aumentada de 8-oxodG, CEdG e 1,N^6-εdA em relação ao controle tanto nos grupos do período experimental de 6 semanas como nos de 7 dias (**Figuras 46 a 51, letra A**).

No caso de 8-oxodG, os níveis se mantiveram elevados mesmo com os tratamentos com insulina por 2 semanas e 6 semanas, indicando indução de dano oxidativo no organismo, apesar do controle glicêmico. É importante notar que o mesmo perfil foi observado para os níveis de nitrito no soro (**Figura 42**).

Ao contrário do observado para 8-oxodG, os níveis urinários de CEdG e 1,N^6-εdA foram reduzidos após os tratamentos com insulina por 2 semanas e 6 semanas. O perfil dos níveis de CEdG e 1,N^6-εdA na urina acompanha o perfil dos níveis de hemoglobina glicada (**Figura 44**) e MDA (**Figura 43)** nos mesmos

animais, indicando que o controle glicêmico possui efeito benéfico contra a geração dessas lesões.

Entretanto, os animais com glicemia intermediária (INT 6 sem), com níveis normais de nitrito no soro, hemoglobina glicada e MDA no plasma, rim e fígado, apresentaram níveis elevados de 8-oxodG, CEdG e 1,N^6-εdA na urina coletada ao longo de 10 h. Assim, pode-se considerar que a quantificação de adutos de DNA na urina é uma ferramenta de grande sensibilidade que pode servir para avaliação de dano sistêmico decorrente de condições de hiperglicemia menos severas.

Verifica-se, adicionalmente, a necessidade de monitorar diferentes lesões na urina, uma vez que informações complementares podem ser obtidas. No caso das três lesões aqui monitoradas, excetuando-se o grupo "INT 6 sem" mencionado acima, os níveis de CEdG e 1,N^6-εdA são modulados nos diferentes grupos de acordo com os níveis de HbA1c e MDA, enquanto que os níveis de 8-oxodG são modulados de acordo com os níveis de nitrito no soro. As três lesões são geradas por vias distintas: glicação avançada, peroxidação lipídica e ROS.

Ao se considerar as concentrações dos adutos na urina dos animais coletada ao longo de 10 h (total de adutos/volume), verifica-se que apenas a lesão 1,N^6-εdA se mantem elevada nos animais diabéticos (**Figuras 46B, 47B e 48B**). Uma vez que o volume urinário dos animais diabéticos é cerca de 8 vezes maior que do grupo controle, ao se fazer a divisão pelo volume urinário para o cálculo da concentração, perdem-se as diferenças (valores de volume urinário apresentados na **tabela 6**).

Não foi possível calcular a concentração dos adutos na urina considerando os níveis de creatinina urinária, uma vez que as concentrações de creatinina

variaram muito entre animais do mesmo grupo experimental (por exemplo, de 4,5 a 150 mg/dL), inviabilizando os cálculos.

Dessa forma, os dados apresentados mostram que a determinação do nível total de adutos na urina coletada ao longo de 10 h fornece informações complementares sobre a indução de danos em biomoléculas em indivíduos diabéticos. De especial interesse é a verificação de que mesmo com o controle glicêmico e normalização dos níveis de hemoglobina glicada, níveis urinários de 8-oxodG se mantêm elevados.

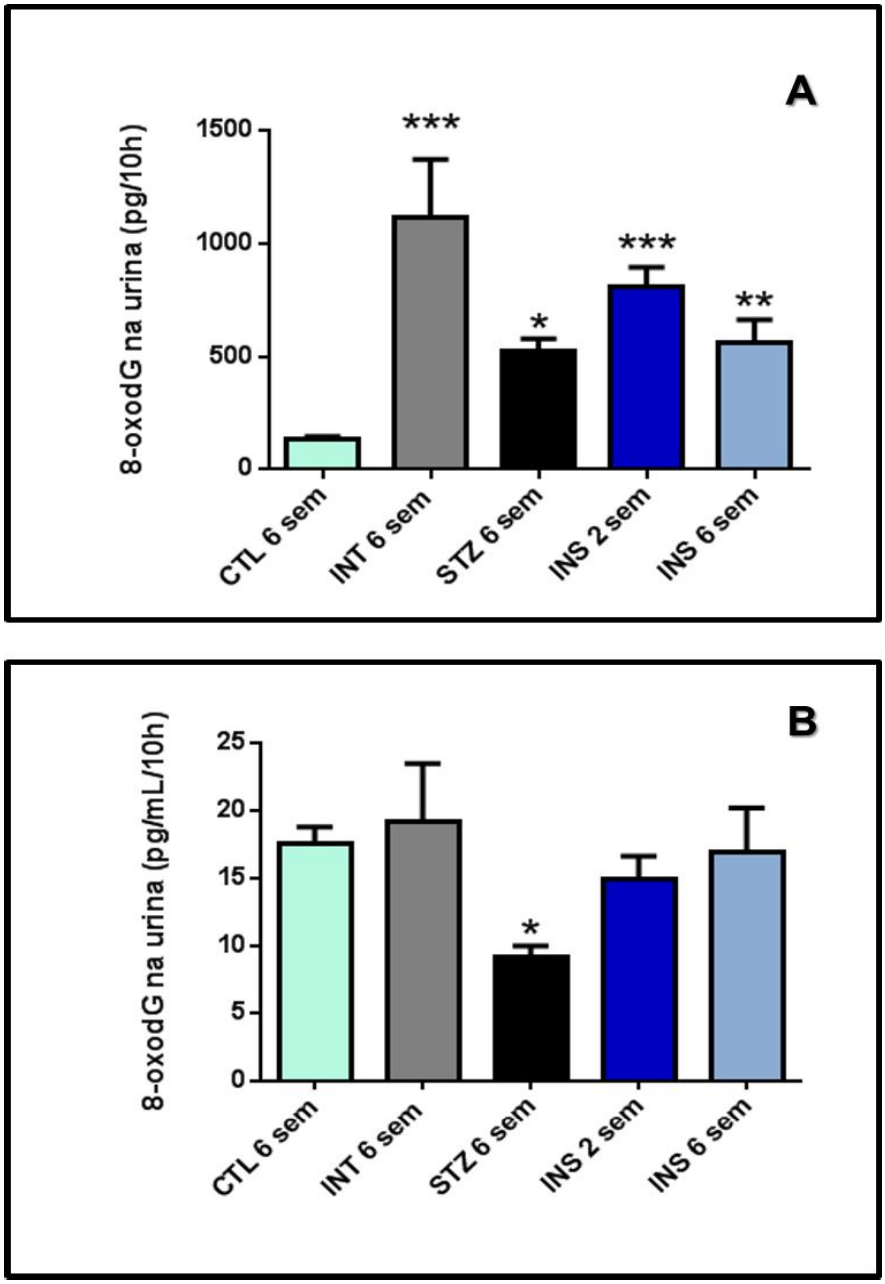


Figura 46. Níveis de 8-oxodG em urina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas. CTL: controle, N = 10; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 8; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 13; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 12; Glicemia intermediária, N = 5. **A)** Níveis totais excretados em 10 h. **B)** Concentração na urina de 10 h. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle, de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn.

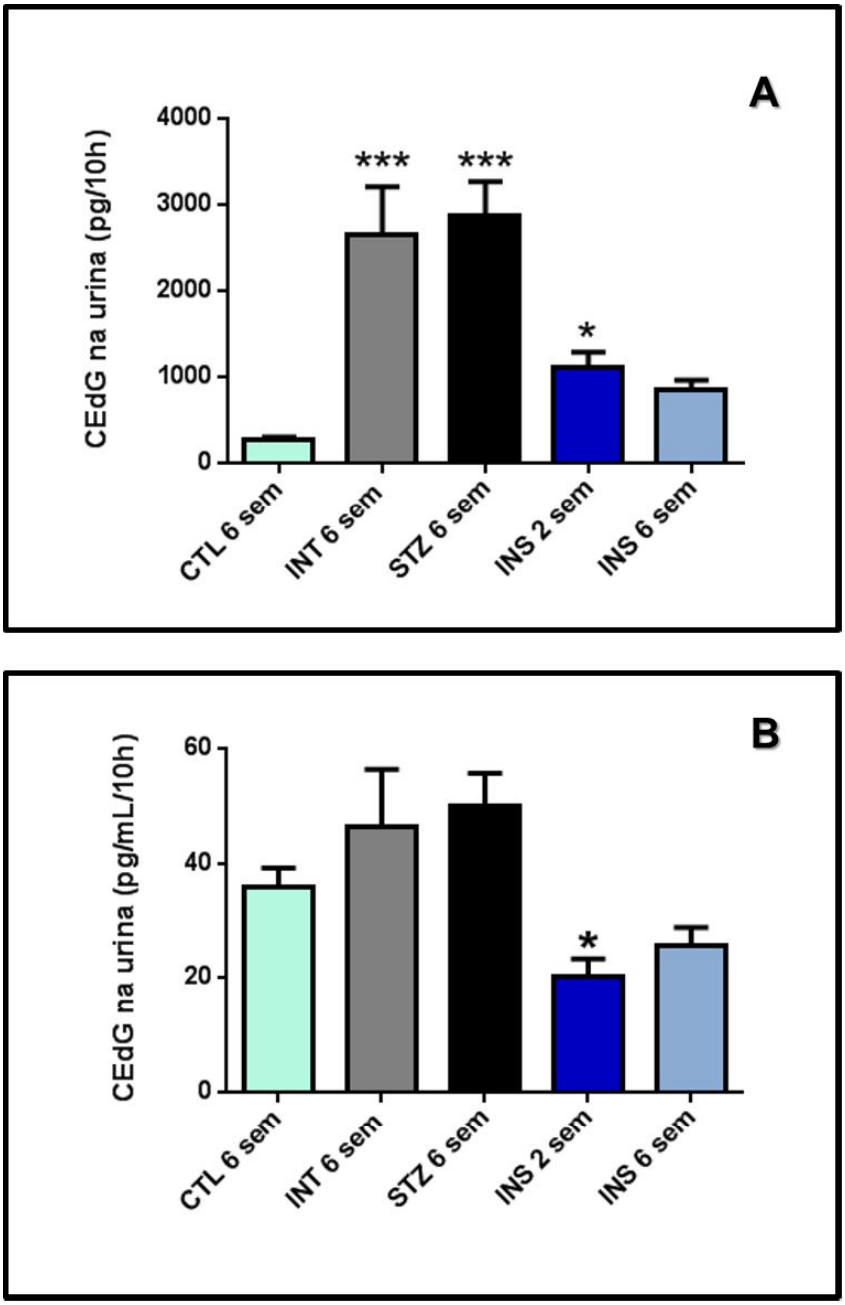


Figura 47. Níveis de CEdG em urina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas. CTL: controle, N = 10; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 8; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 12; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 11; Glicemia intermediária, N = 5. **A)** Níveis totais excretados em 10 h. **B)** Concentração na urina de 10 h. *P < 0,05 ** P < 0,01*** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle, de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn.

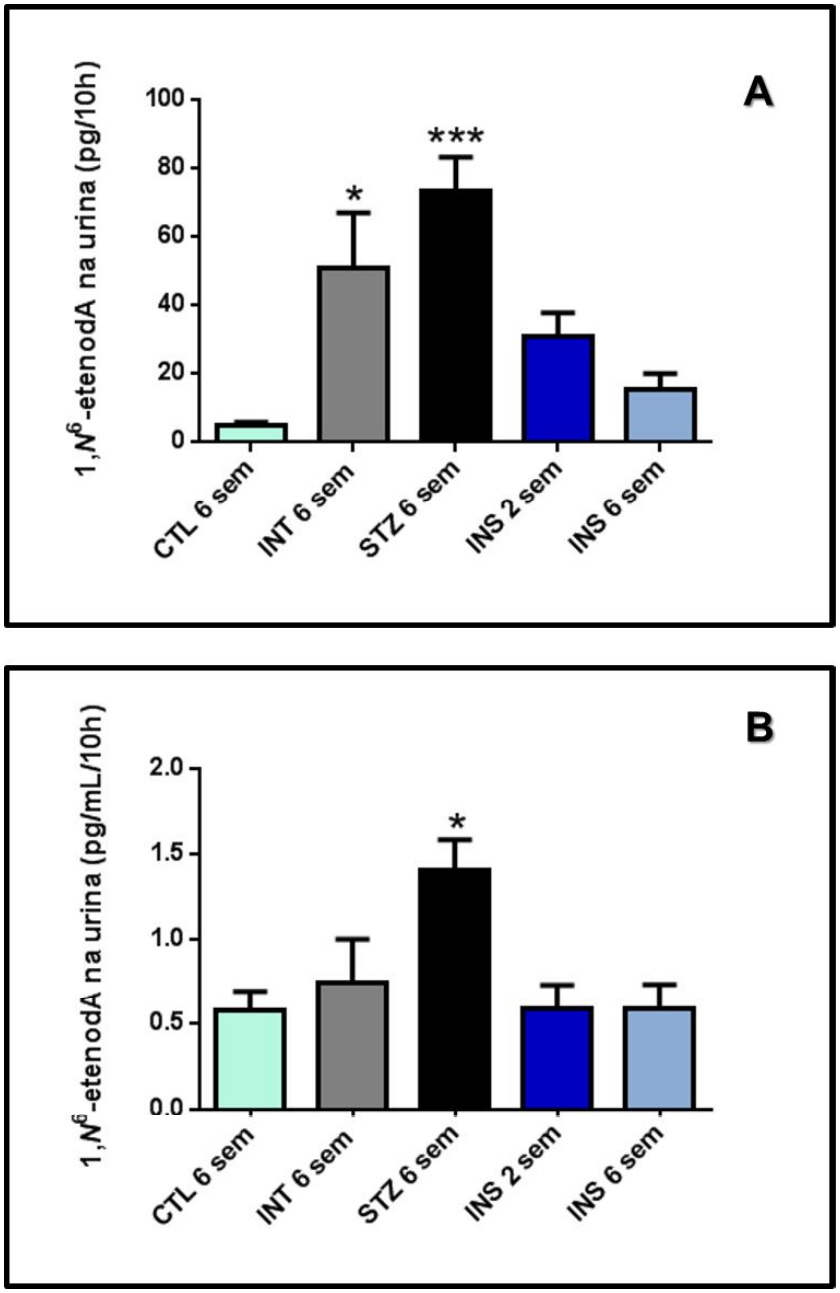


Figura 48. Níveis de 1,N^6-etenodA em urina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas. CTL: controle, N = 9; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 7; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 11; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 10; Glicemia intermediária, N = 5. **A)** Níveis totais excretados em 10 h. **B)** Concentração na urina de 10 h. *P < 0,05 **P < 0,01 ***P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle, de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn.

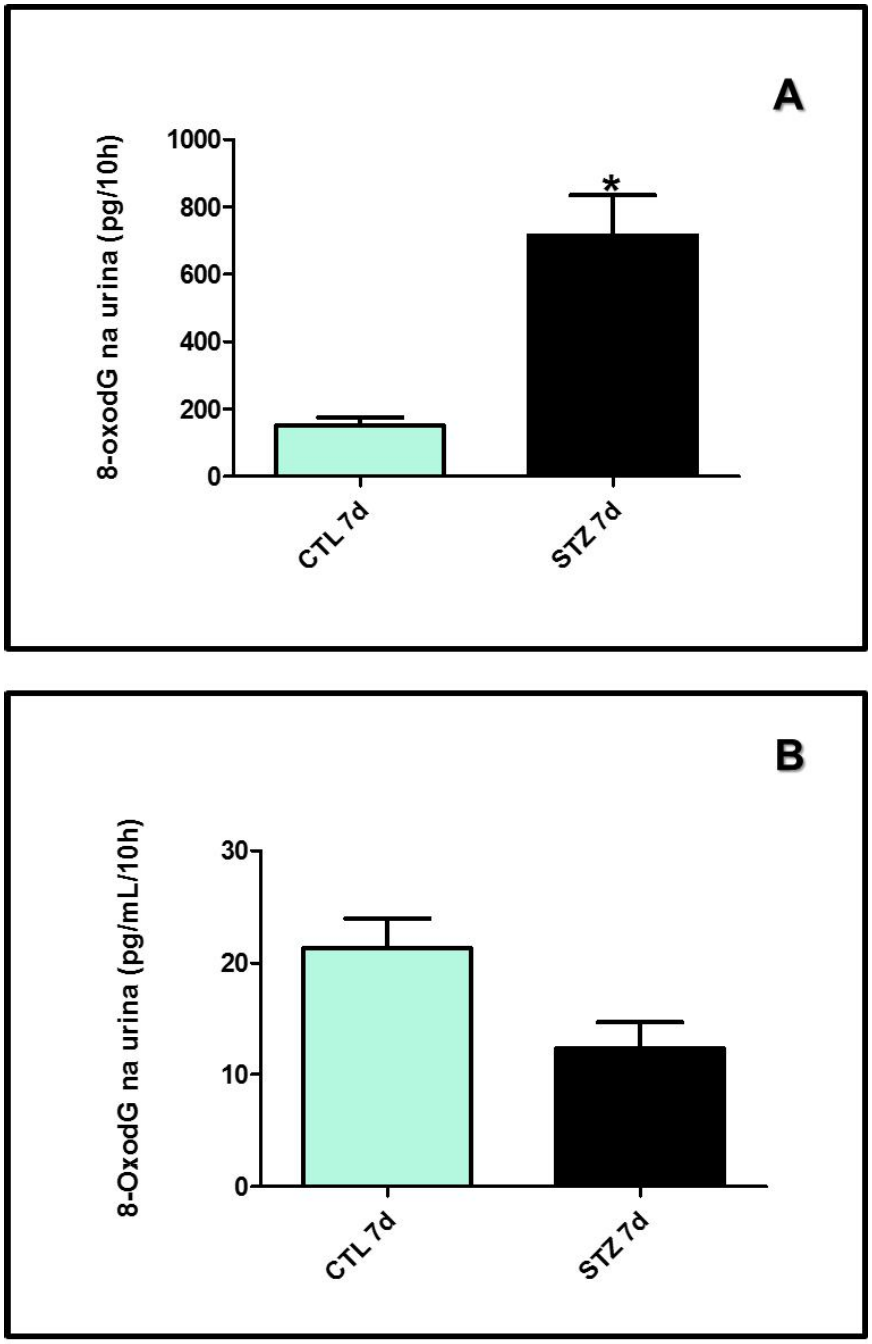


Figura 49. Níveis de 8-oxodG em urina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. **A)** Níveis totais excretados em 10 h. **B)** Concentração na urina de 10 h. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

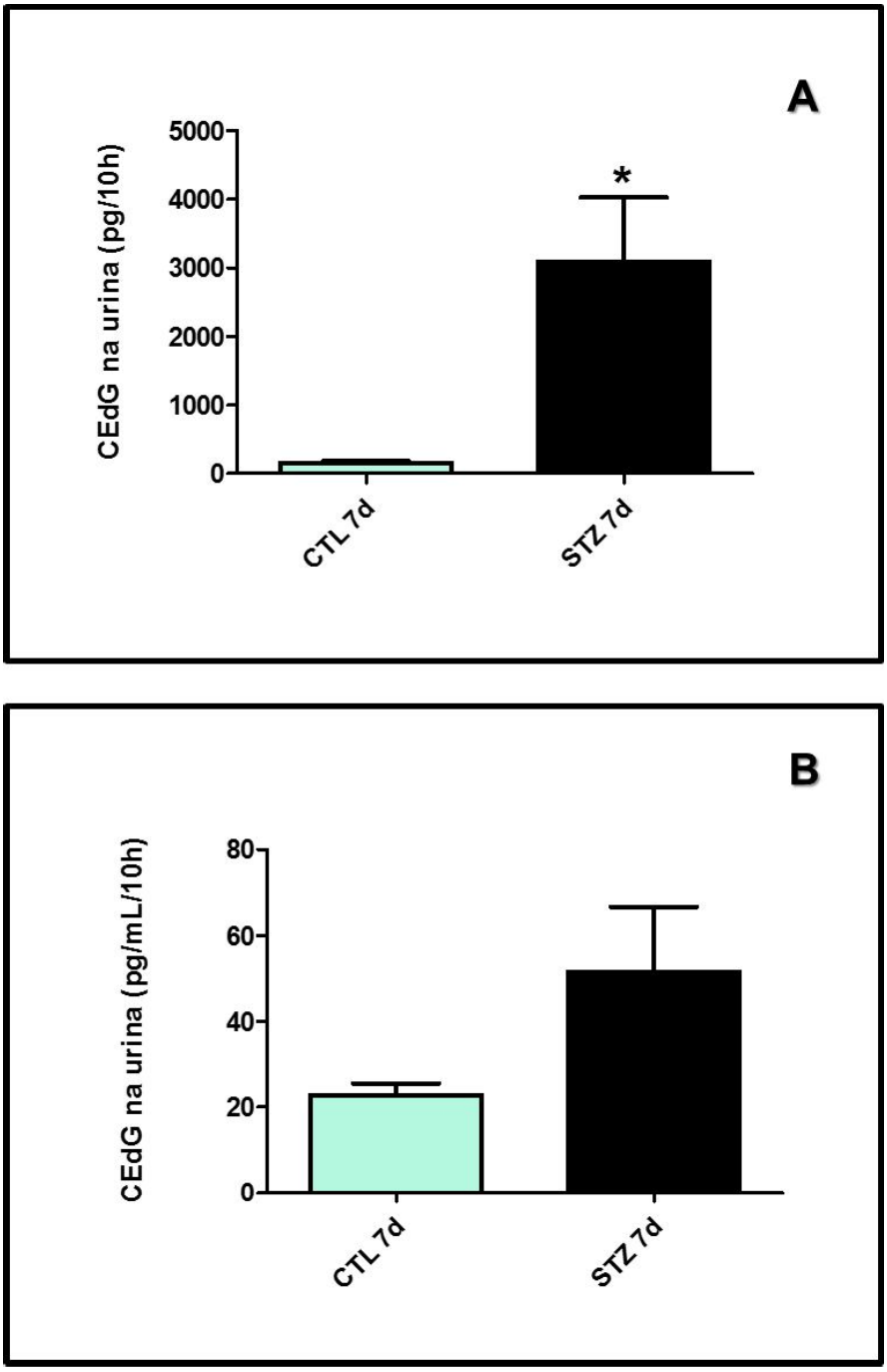


Figura 50. Níveis de CEdG em urina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. **A)** Níveis totais excretados em 10 h. **B)** Concentração na urina de 10 h. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

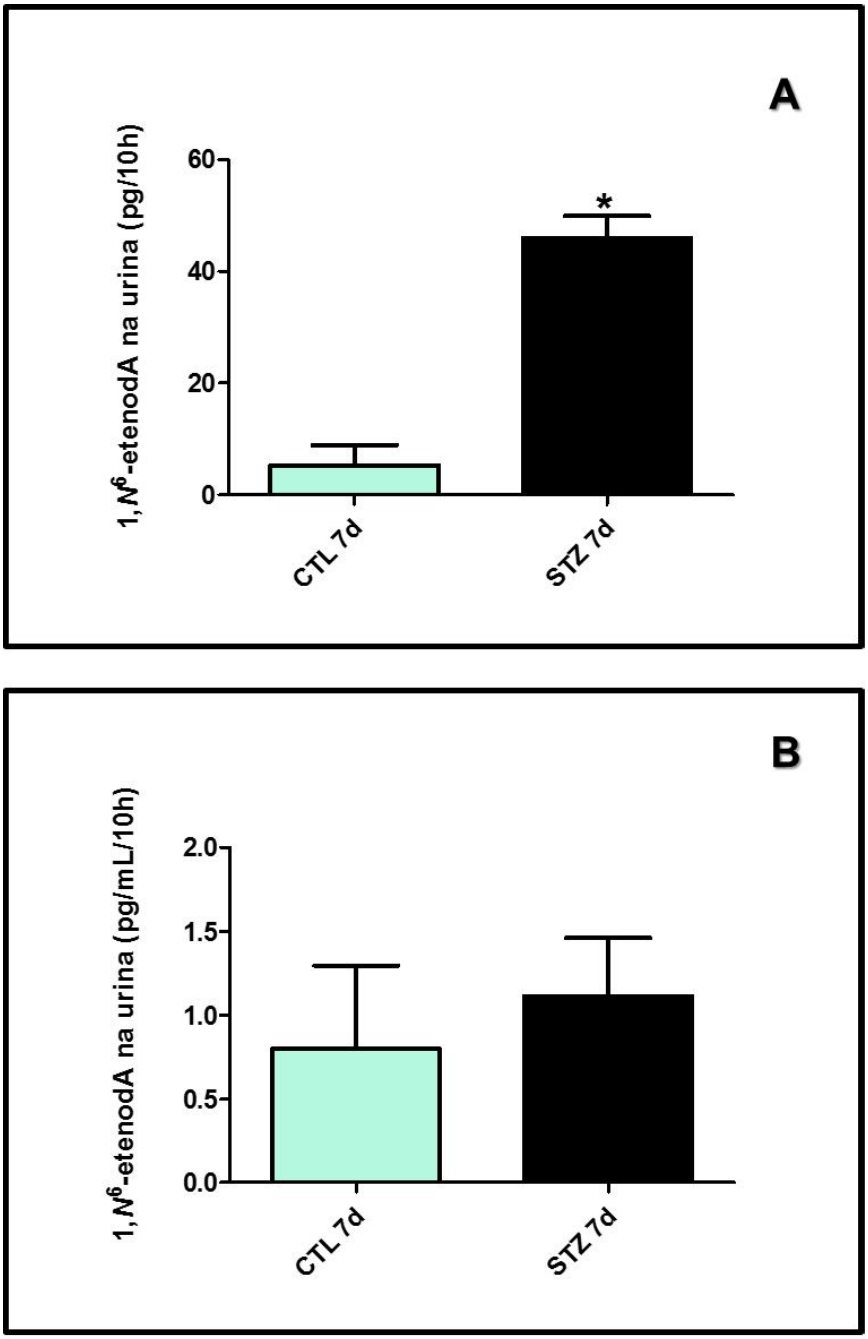


Figura 51. Níveis 3de 1,*N*^{6}-etenodA em urina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. **A)** Níveis totais excretados em 10 h. **B)** Concentração na urina de 10 h. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

Por se tratar de uma análise que utiliza uma matriz de fácil coleta por ser não invasiva, além de apresentar como vantagens a estabilidade a longo prazo da matriz, não requerer tratamentos especiais para estoque, e não haver produção artefatual de lesões por requerer simples método de preparo da amostra, a análise em urina tem sido cada vez mais visada para quantificação de lesões ao DNA (BARREGARD *et al*., 2013). Embora o produto de oxidação 8-OxodG seja a lesão ao DNA mais amplamente estudada e realizada em diversos compartimentos do organismo, não existem trabalhos publicados que tenham utilizado a urina como matriz biológica para estudos que correlacionem a insulinoterapia e o Diabetes mellitus. A lesão tem sido frequentemente quantificada em urina como marcador de estresse oxidativo (BROEDBACK *et al*., 2011). Leinonem et al., por exemplo, dividiram pacientes em três grupos de acordo com os níveis de HbA1c: Os indivíduos diabéticos que demonstraram baixo controle glicêmico (HbA1c maior que 9,6%) apresentaram excreção urinária de 8-OxodG 56% maior que o grupo com melhor controle glicêmico. Em relação à glicação avançada, a análise do produto de glicação do DNA, CEdG, é o único produto DNA-AGE já detectado *in vivo* até hoje (BIDMON, FRISCHMAN, PISCHETSRIEDER, 2006), e não existem trabalhos publicados que quantifiquem as lesões 1,N^6-εdA e 1,N^2-εdG durante a vigência do Diabetes mellitus.

4.8 Quantificação das Lesões 8-OxodG, CEdG, 1,N^2-εdGuo e 1,N^6-εdAdo em DNA de fígado, rim e cerebelo

As amostras foram preparadas e analisadas conforme descrito no item **3.13** de Material e Métodos. Os níveis das lesões em DNA nos grupos dos períodos experimentais de 6 semanas e de 7 dias estão apresentados nas **figuras 52-59**. É importante ressaltar que apesar de terem sido coletadas e armazenadas as principais estruturas do Sistema Nervoso Central (córtex pré-frontal; estriado; hipocampo; e cerebelo) dos diversos grupos experimentais, obteve-se êxito no processo de extração de DNA apenas com a maior estrutura, referente ao cerebelo, conforme descrito no item **3.10** de Material e Métodos.

Observa-se nos grupos do período experimental de 6 semanas que os níveis da lesão 8-oxodG em fígado aumentaram significativamente nos ratos diabéticos tratados com insulina durante 6 semanas (INS 6 sem) em relação aos animais do grupo controle (CTL), com $p<0,05$ (Figura 47 A); em cerebelo houve aumento significativo nos ratos diabéticos tratados com insulina durante 6 semanas (INS 6 sem) e durante 2 semanas (INS 2 sem) em relação aos animais controle (CTL), com $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente (Figura 47 C); no tecido renal não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 47B). Dessa forma, como verificado com os níveis de 8-oxodG na urina dos animais, o tratamento com insulina induziu a formação dessa lesão no DNA de fígado e cerebelo. Hiperinsulinemia tem sido associada ao desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, incluindo câncer hepático, renal e de mama (OTHMAN *et al.*, 2013) sendo sugerida a indução de estresse oxidativo como uma das vias

envolvidas (OTHMAN *et al.*, 2013). Contrariamente, no entanto, a condição de hiperglicemia, mesmo induzindo estresse oxidativo, não levou ao aumento dos níveis dessa lesão no DNA dos tecidos analisados. Uma vez que os níveis estão elevados na urina, pode-se considerar que os tecidos avaliados apresentam, sob condição de hiperglicemia, proteção contra o acúmulo de lesões no DNA, sendo uma possível via de proteção a ativação do sistema de reparo do DNA, que levaria ao aumento da excreção urinária das lesões.

Nas análises de CEdG pode-se observar que em cerebelo os níveis foram aumentados significativamente nos ratos diabéticos tratados com insulina durante 2 semanas (INS 2 sem) em relação aos animais controle (CTL), com $p < 0,05$ (Figura 48 C); não houve diferença significativa entre grupos no fígado e rim (Figura 48 A e B). Novamente aqui, a condição de hiperglicemia não levou ao acúmulo dessa lesão no DNA dos tecidos avaliados. O acúmulo de CEdG em DNA pode resultar em diminuição da expressão gênica, da atividade de proteínas (BREYER *et al.*, 2008) e no aumento de mutações (CAO, JIANG, WNAG,, 2007; TAMAE *et al.*, 2011), efeitos que são prejudiciais ao organismo e cujos riscos podem ser reduzidos pela ativação de sistemas de reparo (TAMAE *et al.*, 2011).

Quanto às lesões 1,N^2-εdGuo e 1,N^6-εdAdo, não houve diferença significativa nos tecidos analisados (**Figuras 54** e **55**).

Nos grupos do período experimental de 7 dias, os animais diabéticos (STZ 7d) apresentaram níveis elevados de 8-oxodG em rim e CEdG em fígado e cerebelo, $p < 0,05$ (Figuras 51, 52 e 53). Não foram encontradas diferenças entre os grupos nas análises de 1,N^2-εdGuo e 1,N^6-εdAdo (**Figuras 58** e **59**).

Observou-se, portanto, aumento dos níveis de lesões (8-oxodG e CEdG) em DNA de rim, fígado e cerebelo após a primeira semana de hiperglicemia. Assim, a não observação desse aumento após as 6 semanas de hiperglicemia pode resultar da adaptação do sistema de reparo das células à condição de hiperglicemia.

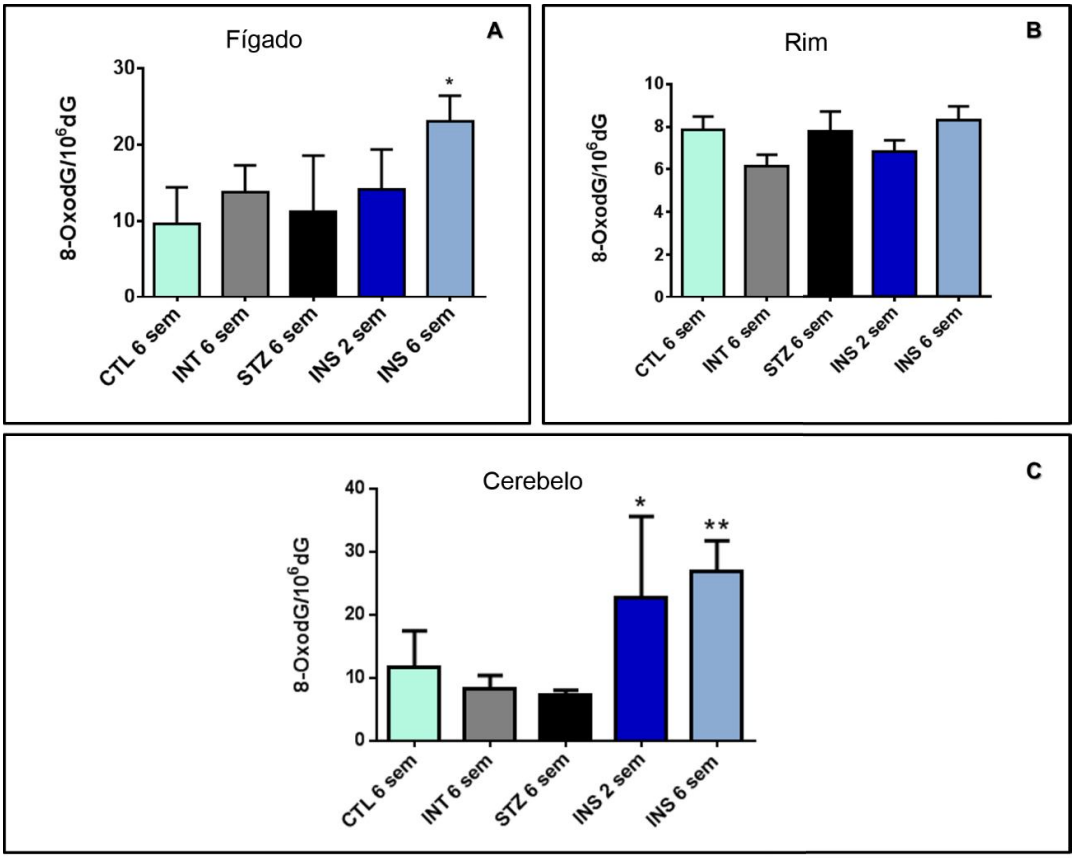


Figura 52. Níveis de 8-oxodG em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas. CTL: controle, N = 7; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 6; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 13; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 10. Glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle, de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn.

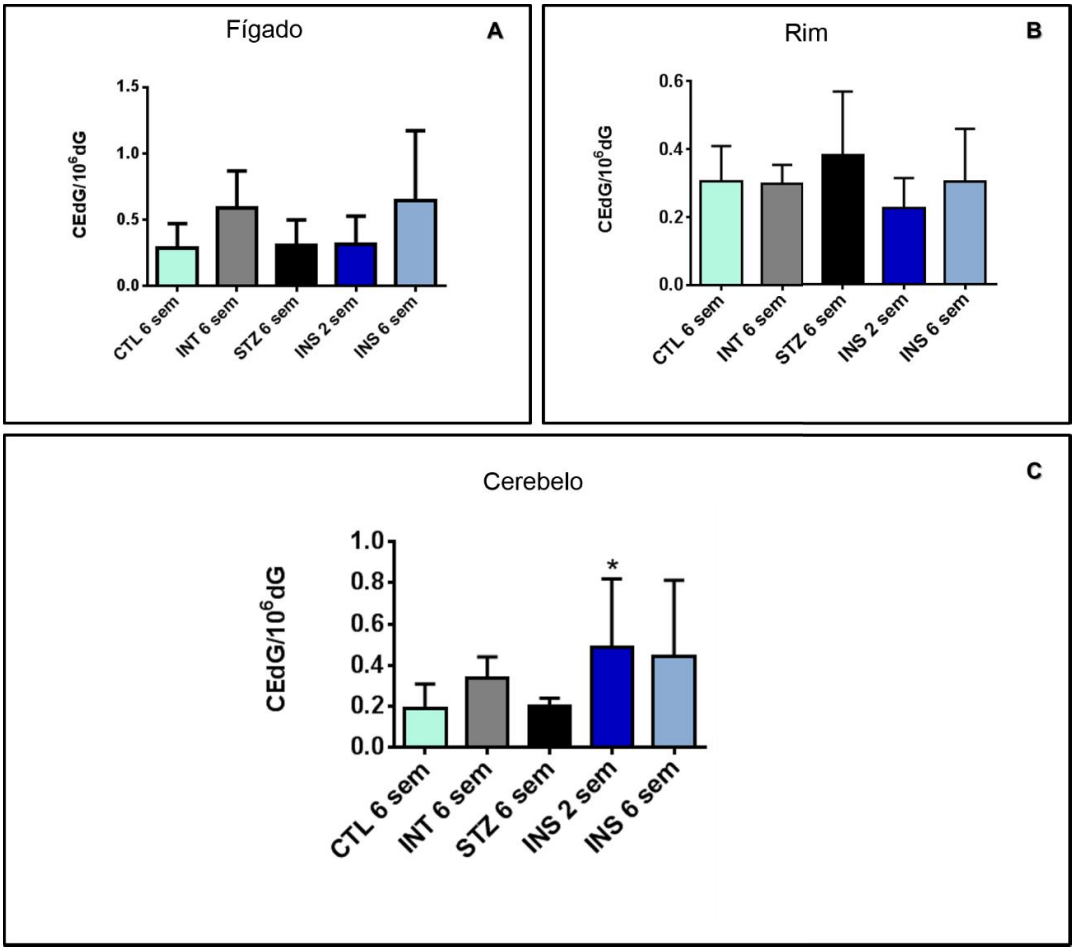


Figura 53. Níveis de CEdG em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas. CTL: controle, N = 10; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 7; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 11; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 10; Glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle, de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn.

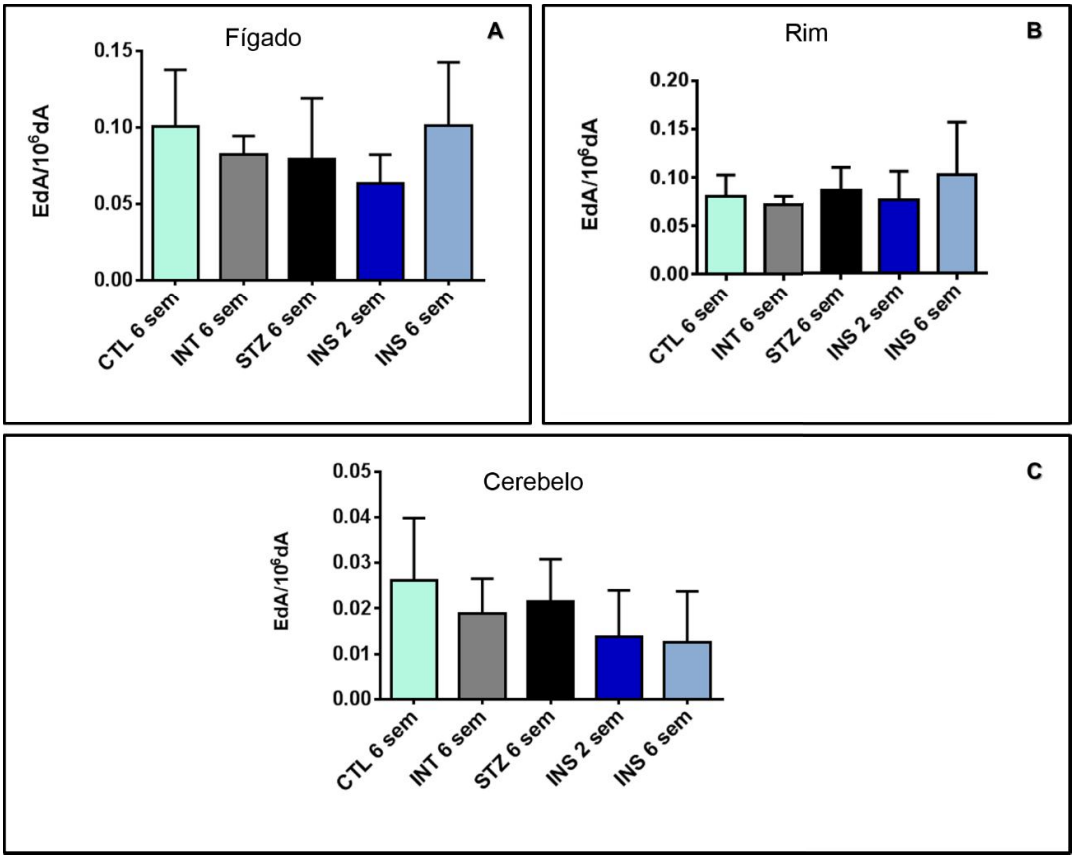


Figura 54. Níveis de 1,N^6-etenodA em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas. CTL: controle, N = 7; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 7; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 11; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 11; Glicemia intermediária, N = 5. Não existem diferenças significativas comparando-se os diferentes grupos de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn.

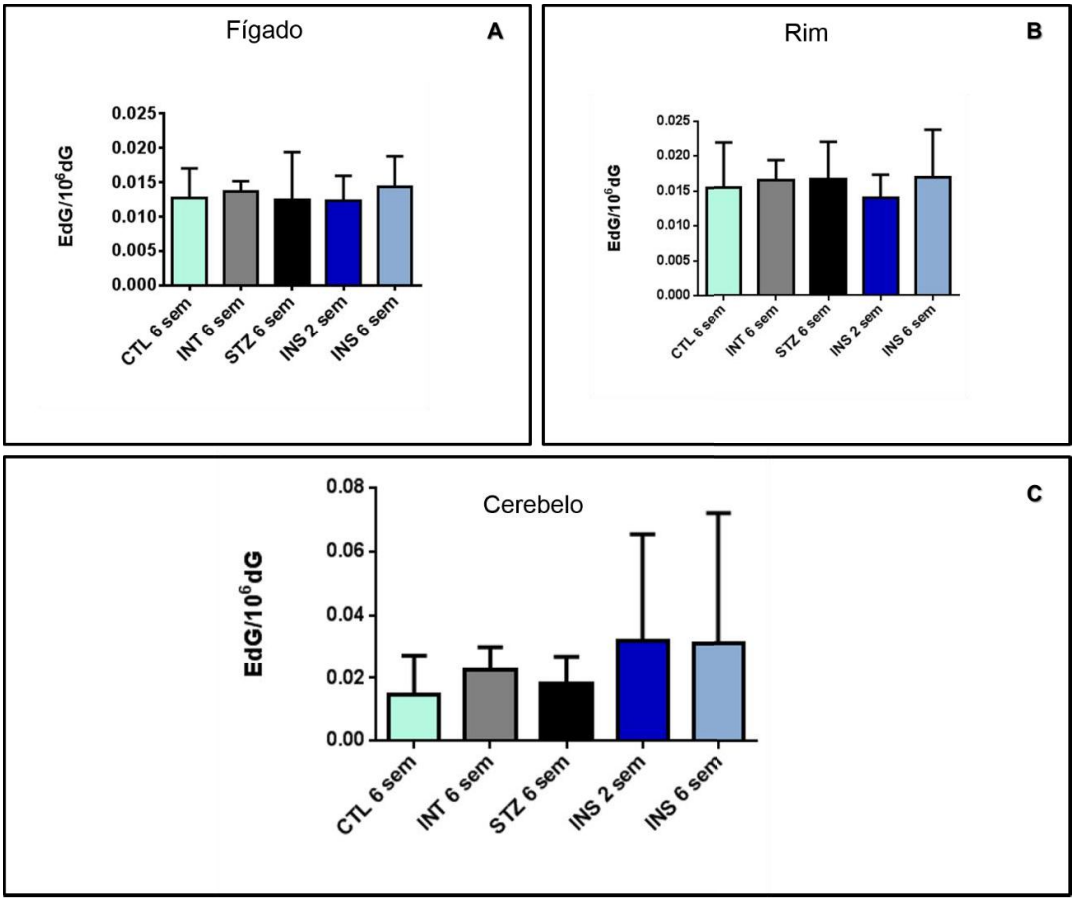


Figura 55. Níveis de 1,N^2-etenodG em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas. CTL: controle, N = 7; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 7; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 11; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 11; Glicemia intermediária, N = 5. Não existem diferenças significativas comparando-se os diferentes grupos de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn.

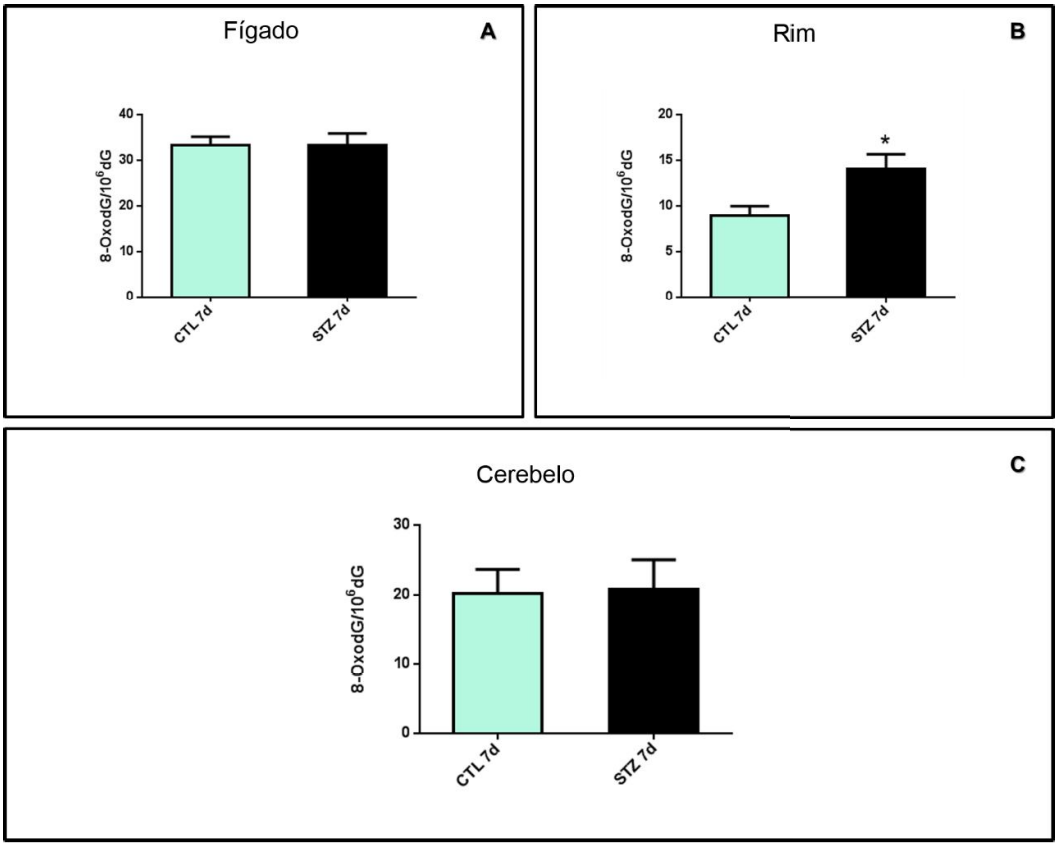


Figura 56. Níveis de 8-oxodG dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

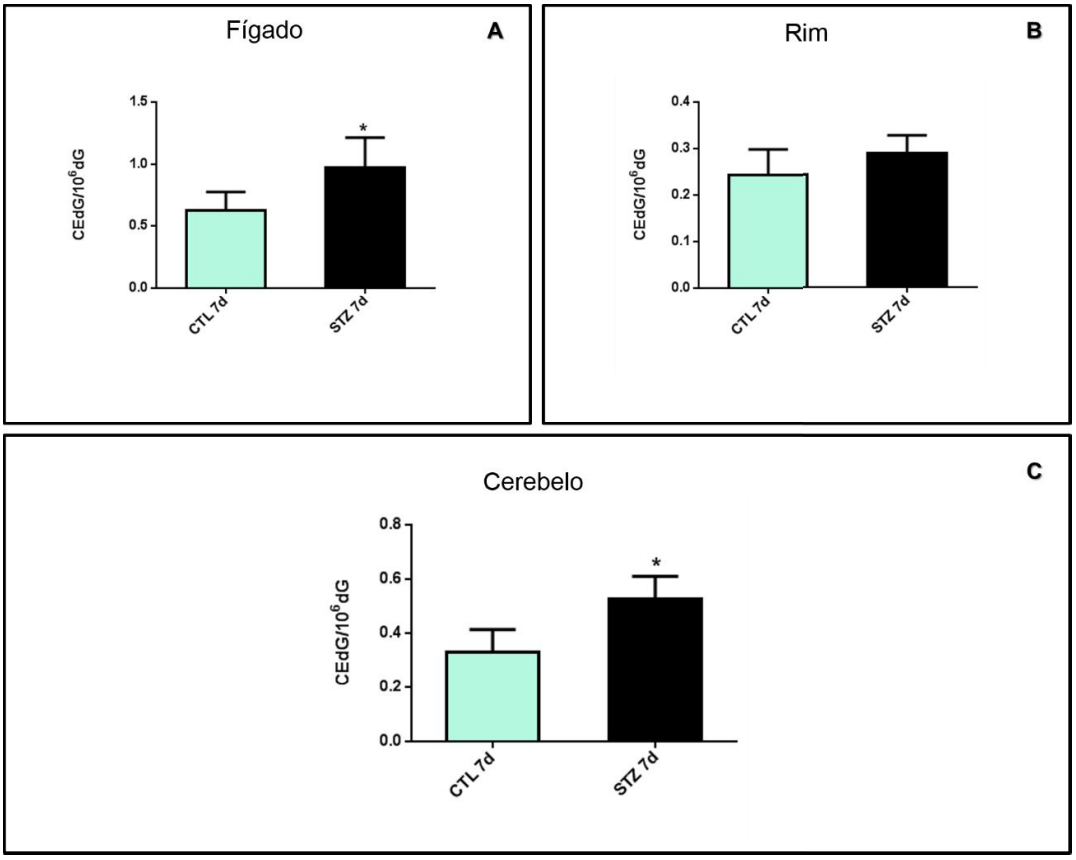


Figura 57. Níveis de CEdG dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

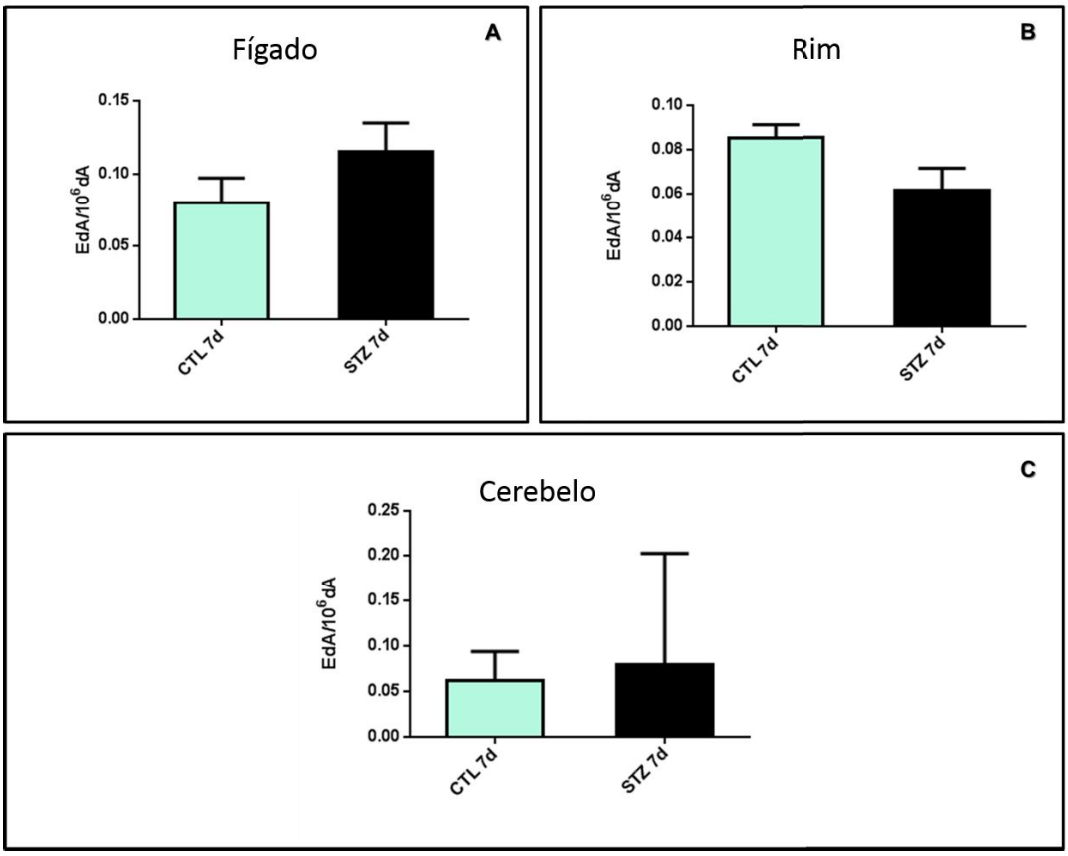


Figura 58. Níveis de 1,N^6-etenodA dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

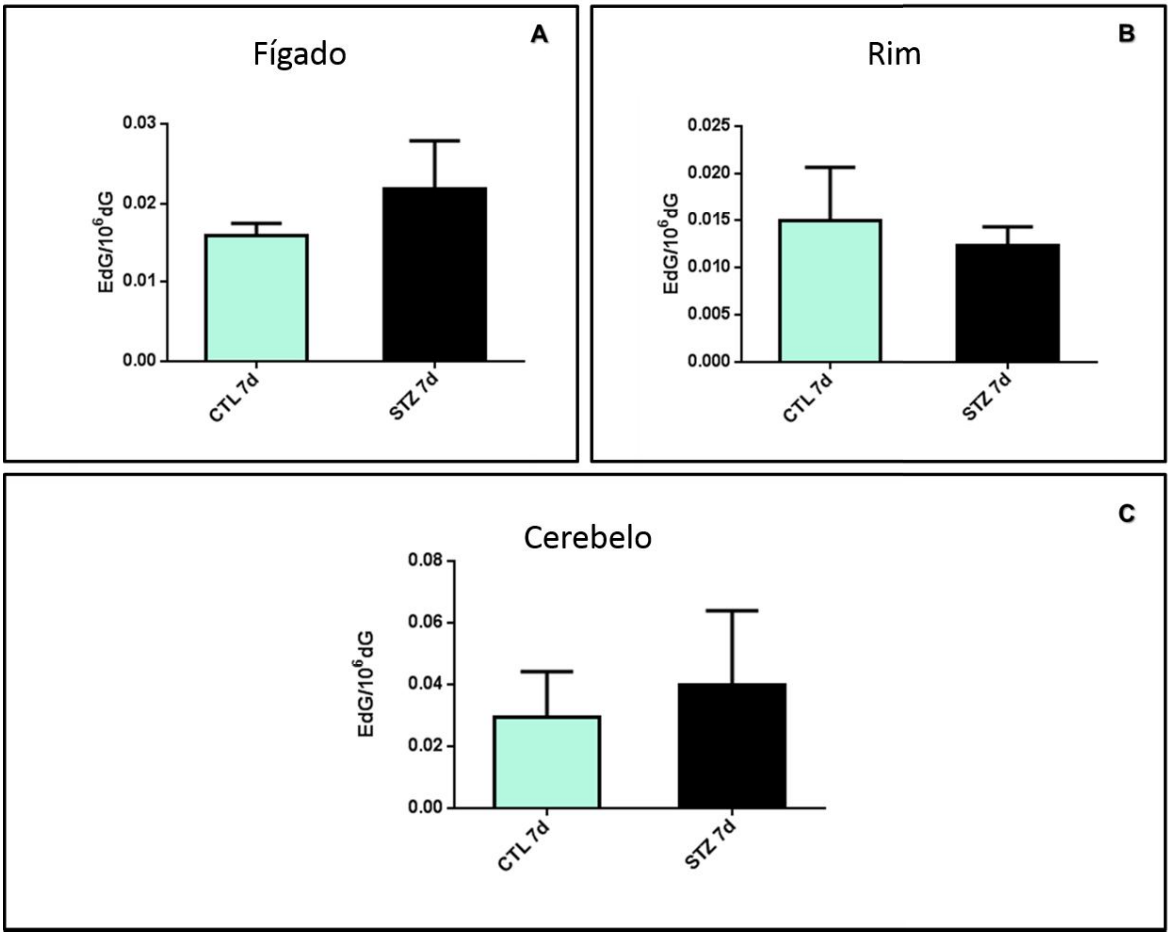


Figura 59. Níveis de 1,N^2-εdGuo dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

4.9 Análise da metilação global em DNA de fígado, rim e cerebelo

Alterações epigenéticas podem contribuir para a expressão diferencial de genes, levando a diversas consequências, tais como alterações no sistema de reparo, no ciclo celular e em vias metabólicas. Atualmente acredita-se que os mecanismos epigenéticos envolvidos na regulação da expressão de genes que incluem as modificações pós translacionais de histonas (PTHMs), metilação do DNA e regulação de microRNA (miRNA), exercem papel crucial no desenvolvimento do Diabetes mellitus e suas complicações (WEGNER *et al*., 2014).

Uma importante modificação epigenética em genoma de mamíferos é a metilação do DNA, cujo padrão é mantido no genoma ao longo das gerações celulares. O mecanismo de metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil à posição C-5 da citosina de um dinucleotídeo CpG, através das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). Tais enzimas estão mais ativas quando ocorrem danos no DNA e ligam-se com maior afinidade a muitas lesões. Para que a adição do grupo metil possa ser realizada, é necessário que exista um doador desse grupo, correspondente nesse caso ao cofator S-adenosilmetionina (SAM) (JAMES *et al.*, 2003). Há a hipótese de que DNMT1 seja de fato uma enzima de reparo do DNA conservada ao longo da evolução (Roberts, 1995). Com o aumento dos níveis de lesões em DNA, o aumento da atividade de DNMTs leva também à hipermetilação ao longo do tempo (YAUK *et al.*, 2008). Em geral, metilação densa de região promotora é associada a silenciamento gênico e a distribuição de 5-metil-dC no genoma define regiões com atividades transcripcionais variáveis. A hipermetilação do DNA pode ser associada a alterações estruturais

na cromatina, diminuição da expressão gênica e diminuição da frequência de movimento de transposons. Alterações nos padrões de metilação do DNA estão presentes em doenças autoimunes, condições neurológicas e psiquiátricas, e câncer (ROBERTSON, 2005; SLOTKIN, MARTIENSSEN, 2007; JIRTLE, SKINNER, 2007).

Estudos mostraram que a metilação do DNA: (1) ocorre de forma persistente e tecido específica na vigência do Diabetes mellitus, porém existe a predominância de hipometilação global do DNA no DM1 e hipermetilação no DM2; (2) provoca o silenciamento do gene PPARGC1A em células pancreáticas, acarretando o comprometimento da secreção de insulina; e (3) está associada a 39 genes relacionados com o comprometimento renal, sendo 19 deles encontrados em ilhas CpG diretamente correlacionadas com o tempo de desenvolvimento da nefropatia (WILLIAMS, SCHALINSKE, 2012; WEGNER *et al*., 2014).

Tendo sido evidenciada a indução de estresse oxidativo nesse trabalho, é possível que a indução de alterações metabólicas e a ocorrência de danos em biomoléculas propiciem alterações do padrão de metilação do DNA, com consequente alteração da expressão gênica. Assim, investigou-se, adicionalmente, os níveis de 5-metil-2'-desoxicitidina no DNA dos diferentes tecidos.

As amostras foram preparadas e analisadas conforme descrito no item **3.12** de Material e Métodos. Os níveis de 5-metil-2'-desoxicitidina em fígado, rim e cerebelo nos grupos dos períodos experimentais de 6 semanas e 7 dias estão apresentados nas **figuras 60** e **61**.

Observa-se que os níveis de 5-metildC em fígado e rim são mais elevados em animais diabéticos sem tratamento (STZ 6 sem), animais com glicemia intermediária (INT 6 sem) e animais tratados com insulina por 2 semanas após 4 semanas da indução do diabetes (INS 2 sem), em relação aos animais do grupo controle (CTL 6 sem). Em cerebelo houve aumento significativo do nível de 5-metildC apenas nos animais com glicemia intermediária (INT 6 sem). Já os animais diabéticos do período experimental de 7 dias (STZ 7d) apresentaram maiores níveis de metilação global nos três órgãos analisados, sendo $p < 0,05$ para fígado e rins, e $p < 0,01$ para cerebelo. Pode-se observar, portanto, que ocorreram alterações epigenéticas na vigência do Diabetes mellitus ao longo do período experimental estabelecido, havendo a predominância de hipermetilação global do DNA nos animais dos grupos que apresentaram níveis mais elevados de glicemia. Esses resultados chamam a atenção para a importância da metilação do DNA na vigência do Diabetes mellitus, ressaltando a necessidade de mais estudos relacionados à análise gene específica para a compreensão das complicações crônicas da doença.

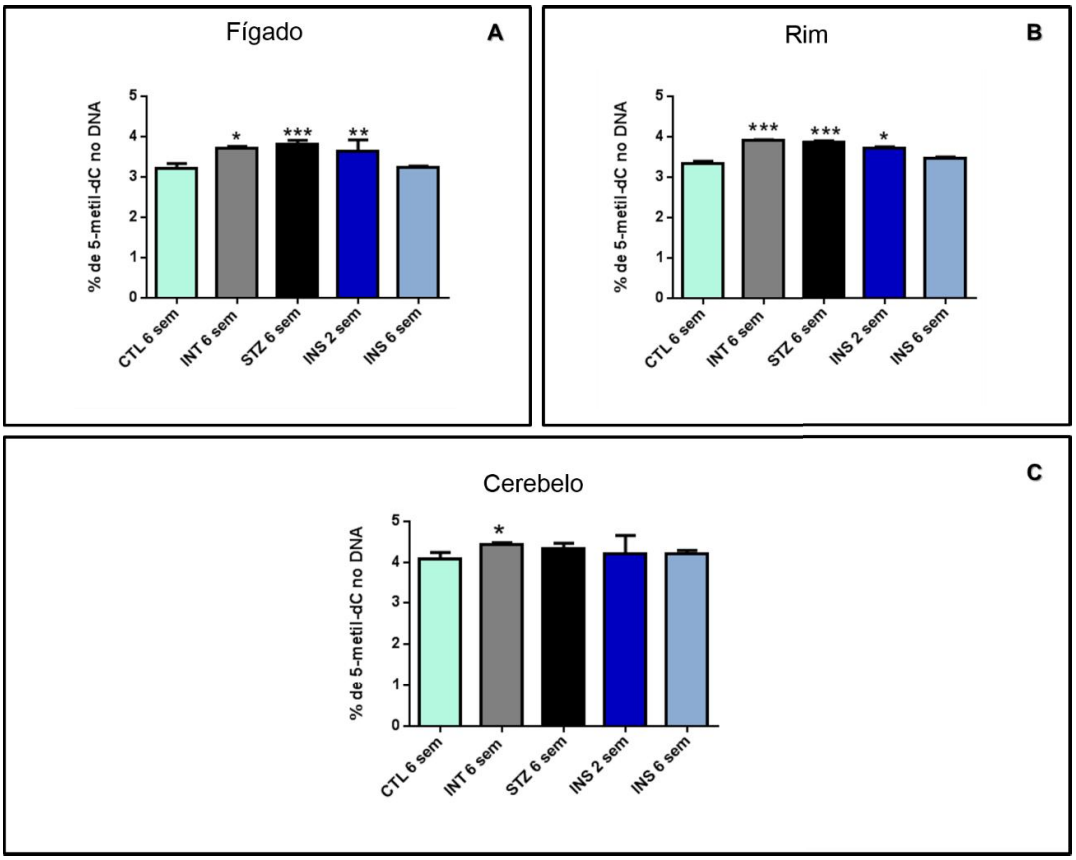


Figura 60. Níveis de 5-metil-2'-desoxicitidina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 6 semanas em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo. CTL (6 sem): controle, N = 10; STZ 6 sem: diabéticos por 6 semanas, N = 8; INS 2 sem: diabéticos por 4 semanas e tratados com insulina por 2 semanas, N = 13; INS 6 sem: diabéticos por 72 h e tratados com insulina por 6 semanas, N = 14; INT 6 sem = glicemia intermediária, N = 5. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se os diferentes grupos com o controle e (B) com o grupo de glicemia intermediária; de acordo com ANOVA não paramétrico com pós teste de Dunn.

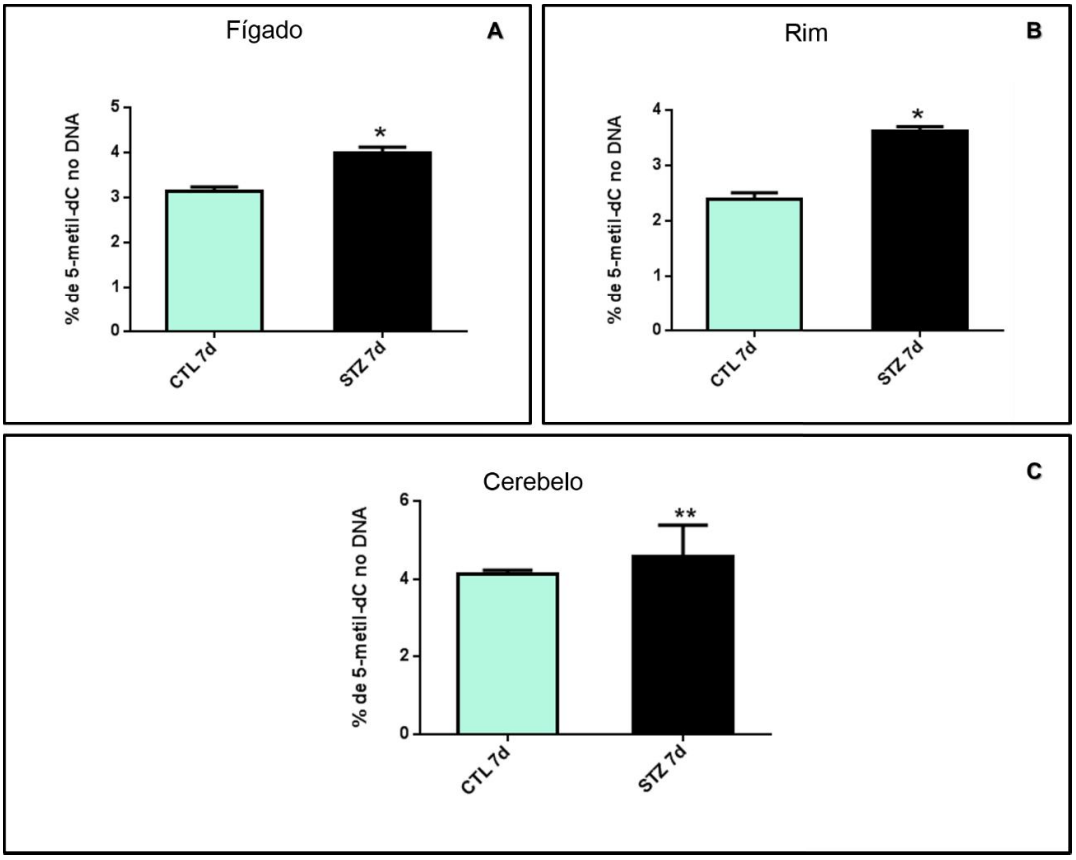


Figura 61. Níveis de 5-metil-2'-desoxicitidina dos ratos dos diferentes grupos do período experimental de 7 dias em (A) Fígado, (B) Rim e (C) Cerebelo. CTL 7d: controle, N = 4; STZ 7d: diabéticos por 7 dias, N = 4. *P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 comparando-se o grupo STZ 7d com o controle, de acordo com teste t não paramétrico de Mann-Whitney.

Conclusão

5. CONCLUSÃO

- ✓ O modelo experimental se mostrou eficiente e eficaz para o estudo dos danos causados pela hiperglicemia na vigência do Diabetes mellitus: os animais diabéticos apresentaram hiperglicemia, altos valores de HbA1c, baixo ganho de peso e alta diurese osmótica; e os animais diabéticos tratados com insulina NPH, por sua vez, alcançaram valores glicêmicos semelhantes aos do grupo controle a partir da primeira semana de tratamento, redução dos valores de HbA1c, maior ganho de peso e diminuição na diurese osmótica.

- ✓ Comprovou-se que o DM induz rapidamente as reações de glicação não enzimática e o estresse oxidativo na condição de hiperglicemia.

- ✓ Pode-se observar a persistência do estresse oxidativo no DM, embora os níveis glicêmicos se mostrem controlados pelo tratamento com insulina.

- ✓ Observa-se ainda que a insulina exógena é responsável por exacerbar o quadro de estresse oxidativo, uma vez que os níveis da lesão 8oxodG se encontram elevados em fígado e cerebelo dos grupos tratados com insulina e os níveis da lesão se mantêm elevados na urina mesmo com os tratamentos por 2 e 6 semanas. O mesmo perfil foi observado para os níveis de nitrito no soro.

- ✓ O controle glicêmico dos dois grupos tratados apresentou efeito benéfico contra a excreção das lesões CEdG e 1,N^6-εdAdo em urina. O mesmo perfil frente à indução de peroxidação lipídica foi demonstrado pela análise de malonaldeído no plasma.

- ✓ A análise das lesões 1,N^6-εdAdo, 8-oxodG e CEdG em urina por HPLCESI-MS/MS foi de grande importância e os dados apontam que pode servir para o monitoramento de estresse oxidativo e de glicação *in vivo*.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEELEH, A. M. *et al.*, Induction of diabetes mellitus in rats using intraperitoneal streptozotocin: a comparison between 2 strains of rats. **European Journal of Scientific Research**, 32 (3), 398-402, 2009.

AGBAJE, I. M. *et al*, Increased concentrations of the oxidative DNA adduct 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine in the germ-line of men with type 1 diabetes. **Reprodutive biomedicine online**, 16, 401-409, 2008.

ALMEIDA, E. A. *et al*., DNA damage levels in the digestive gland and mantle tissue of the mussel Perna perna. **Comparative Biochemistry and Physiology C** 135, 295-303, 2003.

ARYA, A.; YADAV, H. N.; SHARMA, P. L., Involvement of vascular endothelial nitric oxide synthase in development of experimental diabetic nephropathy in rats. **Mol. Cell Biochem**, 354, 57-66, 2011.

ASAHI, T. *et al.*, Chemical and Immunochemical Detection of 8-Halogenated Deoxyguanosines at Early Stage Inflammation. **Journal of Biological Chemistry***,* 285, 9282-9291, 2010.

ASPLUND K. *et al*., Partial protection against streptozotocin-induced hyperglycaemia by superoxide dismutase linked to polyethylene glycol. **Acta Endocrinol**., 107, 390-394, 1984.

BADOUARD C. *et al.,* Detection of chlorinated DNA and RNA nucleosides by HPLC coupled to tandem mass sprectrometry as potential biomarkers of inflammation. **Journal of Chromatography** *B*, 827, 26-31, 2005.

BANKS, W.A.; OWEN, J.B.; ERICKSON, M.A., Insulin in the brain: There and back again. **Pharmacology & Therapeutics**, 136, 82-93, 2012.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T., O papel dos produtos finais da Glicação Avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**., 52 (6), 940-950, 2008.

BARNETT, D.M., KRALL L.P., A história do diabetes. In KAHN, C.R. et al. ***Joslin: Diabetes Melito***. 14a. ed., Porto Alegre: Artmed, 2009. cap. 1, p. 15-31.

BARREGARD, L. *et al*.,Human and methodological sources of Variability in the measurement of urinary 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. **Antioxidants & Redox Signaling**, 18 (18), 2377-2391, 2013.

BAZZOTE, R.B. ***Paciente diabético: Cuidados Farmacêuticos***. Rio de Janeiro: MedBook, 2010.

BEDOYA, F. J.; SOLANO F.; LUCAS, M., N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. **Experientia**, 52, 344-347, 1996.

BEM, A. F.; KUNDE, J., A importância da determinação da hemoglobin glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes mellitus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 42 (3), 185-191, 2006.

BENNETT, P.H.; KNOWLER, W.C., Definição, diagnóstico e classificação do diabetes melito e da homeostasia da glicose. In KAHN, C.R. et al. ***Joslin: Diabetes Melito***. 14a. ed., Porto Alegre: Artmed, 2009. cap. 19, p. 345-353.

BIDMON, C.; FRISCHMANN, M.; PISCHETSRIEDER, M., Analysis of DNA-bound advanced glycation end-products by LC and mass spectrometry. **Journal of Chromatography** *B*, 855, 51-58, 2007.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D., Glucose and reactive oxygen species. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, 5, 561-568, 2002.

BOYANOVA, M.; HUPPERTZ, B., Cytotoxic effect of advanced glycation end products. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 23, 1072-1078, 2009.

BRADFORD, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Anal. Biochem**., 72, 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). ***Portaria nº 2.583 de 10 de Outubro de 2007***. Regulamenta a Lei Federal nº 11.347, que define critérios para a distribuição gratuita de medicamentos e materiais necessários para o controle e monitorização do diabetes mellitus aos pacientes inscritos em programas d educação para diabéticos em todo o páis. Disponível em: < http://dtr2001.saude.gov.br/portarias/>. Acesso em 10 Jun. 2014.

BRENNER, A. S., ***Indução de diabetes por estreptozotocina e reversão da hiperglicemia após transplante intraportal de ilhas pancreáticas, estudo experimental em ratos***. Dissertação de mestrado, Paraná, 1997.

BREYER, V. B. *et al.,* Analysis and biological relevance of advanced glycation end-products of DNA in eukaryotic cells. **FEBS Journal**, 275, 914-925, 2008.

BROEDBAEK, K. et al. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a biomarker in type 2 diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**, 51, 1473-1479, 2011.

BURNS, N.; GOLD, B., The effect of 3-Methyladenine DNA Glycosylase-Mediated DNA Repair on the Induction of Toxicity and Diabetes by the β-Cell Toxicant Streptozotocin. **Toxicological Sciences**, 95, 391-400, 2007.

BUSIK, J. V.; GRANT, M. B. Aldose reductase meets histone acetylation: a new role for na old player. **Diabetes**, 63, 402-404, 2014.

BYUN, J. *et al.,* 8-Nitro-2'-deoxyguanosine, a Specific Marker of Oxidation by Reactive Nitrogen Species, Is Generated by the Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide- Nitrite System of Activated Human Phagocytes. **Biochemistry**, 38, 2590-2600, 1999.

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 9-21, 2010.

CAO, H.; JIANG, Y; WNAG, Y., Stereospecific synthesis and characterization of oligodeoxyribonucleotides containing an N^2-(1-Carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine. **J. Am. Chem. Soc.,** 129, 12123-12130, 2007.

CHAMPE, P. C., HARVEY, R.A., FERRIER, D.R, ***Bioquímica Ilustrada***, 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

CHEN, H. J. C. *et al*., 8-Nitroxanthine, an adduct Derived from 2'-Deoxyguanosine or DNA Reaction with Nitryl Chloride. **Chemical Research in Toxicology,** 14, 536-546, 2001.

COSTA, A. A.; ALMEIDA N. J.S. ***Manual de diabetes: alimentação, medicamentos, exercícios***. 3 ed. São Paulo, Ed. Sarvier, 1998.

DE OLIVEIRA, T. F. ***Citotoxicidade do corante dinitrofenilazo Cl DB291: biotransformação, estresse oxidativo e alteração epigenética em células HepG2***. Tese de Doutorado, São Paulo, 2012.

DELFINO, V. D. A. *et al*. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 24 (1), 31-36, 2002.

DREL, V. R. *et al*., Aldose reductase inhibition counteracts nitrosative stress and poly (ADP-ribose) polymerase activation in diabetic rat kidney and high-glucose-exposed human mesangial cells. **Free Radical Biology & Medicine**, 40, 1454-1465, 2006.

FANG, D. *et al*., Early intensive insulin therapy attenuates the p38 pathway in the renal córtex and índices of nephropathy in diabetic rats. **Endocrine Journal**, 59 (1), 81-90, 2012.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S., Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, 43 61-68, 1997.

FUCHS, D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C., ***Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional***, 3ª. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

GARCIA, C.C.; FREITAS, F.P.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H., Ultrasensitive simultaneous quantification of 1,N2-etheno-2'-deoxyguanosine and 1,N2-propano-2'-deoxyguanosine in DNA by na online liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay. **Chemical Research in toxicology,** 23, 1245-1255, 2010.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M., Oxidative stress and diabetic complications. **Circ. Res**., 107, 1058-1070, 2010.

GHOULEH, I. A. *et al*., Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, 51, 1271-1288, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C., ***Free radicals in Biology and Medicine***, 4. ed. New York: Oxford, 2007.

HATA, I. *et al.,* Urinary oxidative stress markers in young patients with type 1 diabetes. **Pediatrics International**, 48, 58-61, 2006.

HAUGHTON, C.L.; DILLEHAY, D.L.; PHILLIPS, L.S., Insulin replacement therapy for the rat model of streptozotocin induced diabetes. **Lab. Anim. Sci**., 49, 639-644, 1999.

HOTTA, N. *et al*., Long-term clinical effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on progression of diabetic neuropathy and other microvascular complications:

mutivariate epidemiological analysis based on patient background factors and severity of diabetic neuropathy. **Diabetic Medicine**, 29, 1529-1533, 2012.

HU, C. W. *et al.,* Correlation between concentrations of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in urine, plasma and saliva measured by on-line solid-phase extraction LC-MS/MS. **Clinica Chimica Acta**, 411, 1218-1222, 2010.

HUANG, X.; WANG, F.; CHEN, W.; CHEN, Y.; WANG, N.; MALTZAN, K. Possible link between the cognitive disfunction associated with diabetes mellitus and the neurotoxicity of methylglyoxal. **Brain Research**, 1469, 82-91, 2012.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. ***IDF Diabetes Atlas****, 5th edn.* Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2011. Disponível em:<http://www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em 16 Nov. 2012.

JEPPSON, J.O. *et al*. Approved IFCC Reference Method for the Measurement of HbA1c in Human Blood. **Clin. Chem. Lab. Med**., 40 (1), 78-89, 2002.

JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K., Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews Genetics**, 8 (4), 253-262, 2007.

JOBGEN, W. S. *et al*. Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatgraphy** *B*, 851, 71-82, 2007.

JUNOD A. *et al*. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (32401). **Proc. Soc. Exp. Biol. Med**., 126, 201-205, 1967.

KARGES, B. *et al.,* Injection of acidic or Neutral Insulin and Pain: A Single-Center, Prospective, Controlled, Noninterventional Study in Pediatric Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. **Clinical Therapeutics***,* 28, 2094-2101, 2006.

KINDT, T.; GOLDSBY, R.; OSBORNE, B., ***Imunologia de Kuby***, 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2008

KLAUNIG, J. E. *et al.,* Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology** (2011), doi: 10.1016/j.taap.2009.11.028.

KOWLURU, R.A.; ABBAS, S.N.; ODENBACH, S., Reversal of hyperglicemia and diabetic nephropathy effect of reinstitution of good metabolic control on oxidative stress in the kidney of diabetic rats. **Journal of Diabetes and its Complications**, 18, 282-288, 2004.

LENZEN, S., The mechanisms of alloxan and streptozotocin - induced diabetes. **Diabetologia,** 51, 216-226, 2008.

LONKAR, P.; DEDON, P. C.; Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. **International Journal of Cancer**, 128, 1999-2009, 2011.

LOUREIRO, A. P. M. *et al*., Development of an on-line liquid chromatography-electronspray tandem mass sprectrometry assay to quantitatively determine 1,N^2-etheno-2'-deoxyguanosine in DNA. **Chemical Research in Toxicology***.* 15, 1302-1308, 2002.

LOUREIRO, A.P.M.; MASCIO, P.D.; MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Quim. Nova**, 25 (5), 777-793, 2002.

MARQUES, S.A. et al. Induction of 1,N^2-etheno-2'-deoxyguanosine in DNA exposed to beta-carotene oxidation products. **FEBS Lett***.* 560, 125-130, 2004.

MASUDA, M. *et al.,* Chlorination of Guanosine and Other Nucleosides by Hypochlorous Acid and myeloperoxidase of Activated Human Neutrophils. **The Journal of Biological Chemistry***,* 276, 40486-40496, 2001.

MATHEUS, C.E.; LEITER, E.H., Modelos de roedores para o estudo do Diabetes. In KAHN, C.R. et al. ***Joslin: Diabetes Melito***. 14a. ed., Porto Alegre: Artmed, 2009. cap. 18, p. 305-342.

MEDEIROS M. H., Exocyclic DNA adducts as biomarker of lipid oxidation and predictors of disease. Challenges in developing sensitive and specific methods for clinical studies. **Chemical Research in Toxicology**, 22, 419-425, 2009.

MELLO, A.S.; QUINCOZES-SANTOS, A.; FUNCHAL, C. Correlação entre hiperglicemia e células do SNC, com enfoque na atividade glial. **Rev. Neurocienc.**, 20 (2), 294-301, 2012.

NAGISA, Y. *et al.,* Changes in glycated haemoglobin levels in diabetic rats measured with an automatic affinity HPLC. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 30, 752-758, 2003.

NAIR, U.; BARTSCH, H.; NAIR, J., Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. **Free Radical Biology & Medicine**, 43, 1109-1120, 2007.

NATHAN, D.M., Relação entre o controle metabólico e as complicações a longo prazo do diabetes. In KAHN, C.R. et al. ***Joslin: Diabetes Melito***. 14a. ed., Porto Alegre: Artmed, 2009. cap. 48, p. 821-833.

NELSON, D. L.; COX, M. M**.**, ***Lehninger: Princípios de Bioquímica****.* 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

NETTO, A.P. *et al*., Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1c) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, 45 (1), 31-48, 2009.

NEVES, S. M.P. *et al*., Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo, Brasil: ***Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP***, 2013. Disponível em:<http://www.usp.br/bioterio>. Acesso em 15 Fev. 2014.

OBROSOVA, I. G. *et al*., Aldose reductase inhibition counteracts Oxidative-nitrosative stress and poly (ADP-ribose) polymerase activation in tissue sites for diabetes complications**. Diabetes**, 54, 234-242, 2005.

OTHMAN, E. M; *et al*., Insulin-mediated Oxidative stress and DNA damage in LLC-PK1 pig kidney cell line, female rat primary kidney cell line, female rat primary kidney cells, and male ZDF rat kidneys in vivo. **Endocrinology**, 154 (4), 1434-1443, 2013.

PAN, H.; FU, X.; HUANG, W., Molecular Mechanisms of Liver Cancer. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, 11, 493-499, 2011.

PANG, B. *et al*., Lipid peroxidation dominates the chemistry of DNA adduct formation in a mouse model of inflammation. **Carcinogenesis**, 28, 1807-1813, 2007.

PIRES, A.C.; CHACRA, A.R., A evolução da insulinoterapia no diabetes melito tipo 1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**., 52 (2), 268-278, 2008.

RABÊLO, L. A. *et al*., Desbalanço redox: NADPH oxidase como um alvo terapêutico no manejo cardiovascular. **Arq. Bras. Cardiol.**, 94 (5), 684-693, 2010.

RAJASEKARAN, S. *et al*., Modulatory effects of *Aloe vera* leaf gel extract on oxidative stress in rats treated with streptozotocin. **JPP**, 57: 241-246, 2005.

RAVANAT, J. *et al*., Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. **Carcinogenesis**, 23 (11), 1911-1918, 2002.

REUTER, S. *et al.,* Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked?. **Free Radical Biology & Medicine**, 49, 1603-1616, 2010.

RIBEIRO, S. M. R. *et al.,* A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, 21 (3), 133-149, 2005.

ROCHA, F. D. *et al.*, Diabetes mellitus e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. **Rev. Bras. Farm.**, 87 (2), 49-54, 2006.

ROOS, M.; SIQUEIRA, R.; CLAUDIO, I., ***Abordagem Farmacológica no Diabetes***. São Paulo: Ed. Rubio, 2009.

SANTOS, E. C. B. *et al*. Políticas públicas e deireitos dos usuários ao Sistema Único de Saúde com diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Enfermagem**, 64 (5), 952-957, 2011.

SASSA, A. *et al*., Miscoding properties of 8-chloro-2´-deoxyguanosine, a hypochlorous acid-induced DNA adduct, catalysed by human DNA polymerases. **Mutagenesis**, 28 (1), 81-88, 2013.

SCHNEDL W. J. *et al*., STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expresseng cells. **Diabetes**, 43, 1326-1333, 1994.

SHEN, X. *et al*., Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. **Diabetes**, 55, 798-805, 2006.

SILVA, A. M. O. *et al.*, Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis L*.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. **Revista de Nutrição**, 24 (1), 121-130, 2011.

SKUDELSKI, T., The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B Cells of the rat pancreas. **Physiology Research**, 50, 536-546, 2001.

SLOTKIN, R.; MARTIENSSEN, R., Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. **Nature Reviews Genetics**, 8 (4), 272-285, 2007.

SODRÉ, F. L.; COSTA J. C. B.; LIMA J. C. C., Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 43 (5), 329-337, 2007.

STITT, A. W.; JENKINS, A. J.; COOPER, M. E., Advanced glycation end products and diabetic complications. **Expert Opinion on Investigational Drugs***,* 11, 1205-1223, 2002.

SYNOLD, T. *et al*., Advanced Glycation End Products of DNA: Quantification of N^2-(1-Carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine in Biological Samples by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Chemical Research in Toxicology***,* 21, 2148-2155, 2008.

TAKEUCHI, M.; TAKINO, J; YAMAGISHI, S., Involvement of the toxic AGEs (TAGE)-RAGE system in the pathogenesis of diabetic vascular complications: a novel therapeutic strategy. **Current Drug Targets**, 11, 1468-1482, 2010.

TAMAE, D. *et al.,* Mutagenesis and Repair induced by the DNA Advanced Glycation End Product N^2-(1-Carboxyethyl)-2'- deoxyguanosine in Human Cells. **Biochemistry**, 50, 2321-2329, 2011.

THORNALLEY, P.J., Dicarbonyl Intermediates in the Maillard reaction. **New York Academy of Sciences**, 1043, 111-117, 2005.

VALENTE, T.; GELLA, A.; SOLÉ, M.; DURANY, N.; UNZETA, M., Immunohistochemical study of semicarbazide-sensitive amine oxidase/vascular adhesion protein-1 in the hippocampal vasculature: pathological synergy of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. **Journal of Neuroscience Research**, 90, 1989-1996, 2012.

VIDOTTI, D. B. *et al.,* Diabetes on renal sodium and water transporters in rats. **Am. J. Nephrol**., 28, 107-114, 2008.

VISTOLI, G. *et al*., Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, 47 (1), 3-27, 2013.

VOULGARIDOU, G. P. *et al.,* DNA damage induced by endogenous aldehydes: Current state of knowledge. **Mutation Research**, 711, 13-27, 2011.

WAJCHENBERG, B. L., β-Cell Failure in Diabetes and Preservation by Clinical treatment. **Endocrine Reviews**, 28, 187-218, 2007.

WEGNER, M. *et al*., Role of epigenetic mechanisms in the development of chronic complications of diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 105, 164-175, 2014.

WIŒNIEWSKI, K. *et al.*, Influence of NMDA, a potente agonist of glutamate receptors, on behavioral activity in 4-week streptozotocin-induced diabetic rats. **Polish Journal of Pharmacology**, 55, 345-351, 2003.

WILLIAMS, K. T.; SCHALINSKE, K. L., Tissue-specific alterations of methyl group metabolism with DNA hypermethylation in the Zucker (type 2) diabetic fatty rat. **Diabetes/ Metabolism Research and Reviews**, 28, 123-131, 2012.

YANG, Y.D., Simultaneous determination of creatinine, uric acid, creatinine and hippuric acid in urine by high performance liquid chromatography. **Biomed. Chromatogr**., 12, 47-49, 1998.

YAUK, C. L. *et al*., Tandem repeat mutation, global DNA methylation, and regulation of DNA methyltransferases in cultured mouse embryonic fibroblast cells chronically exposed to chemicals with different modes of action. **Enviromental and Molecular Mutagenesis**, 49, (1), 26-35, 2008.

Anexos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/06/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "**Produtos avançados de glicação e adutos de DNA relacionados a estresse oxidativo e inflamação em modelo de ratos diabéticos.**" (Protocolo CEUA/FCF/347), de responsabilidade da **Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 06 de fevereiro de 2012.

São Paulo, 07 de fevereiro de 2012.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

Fabiana Almeida dos Santos

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/3574920898047714
Última atualização do currículo em 05/08/2014

Farmacêutica formada pelas Faculdades Oswaldo Cruz (2011). Atualmente é mestranda do Laboratório de Marcadores Moleculares da Exposição a Xenobióticos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP) sob orientação da Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro. Seu projeto visa quantificar lesões em DNA por HPLC-ESI-MS/MS para avaliar o dano oxidativo e resultante de glicação avançada em rim, fígado, cerebelo, sangue e urina de animais diabéticos, assim como a modulação do dano por diferentes períodos de tratamento com insulina, a fim de verificar se o controle da glicemia nos animais diabéticos protege contra a indução dos danos em biomoléculas. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Fabiana Almeida dos Santos
Nome em citações bibliográficas	SANTOS, F. A.;Fabiana Almeida dos Santos;DOS SANTOS, FABIANA ALMEIDA;DOS SANTOS, FABIANA

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Avenida Professor Lineu Prestes, 580. Bloco 13B Butantã 05508000 - Sao Paulo, SP - Brasil - Caixa-postal: 01227200 Telefone: (11) 30911192 Ramal: 1192 URL da Homepage: www.fcf.usp.br

Formação acadêmica/titulação

2012	Mestrado em andamento em Toxicologia e Análises Toxicológicas (Conceito CAPES 4). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Produtos avançados de glicação e adutos de DNA relacionados a estresse oxidativo e inflamação em modelo de ratos diabéticos, Orientador: Ana Paula de Melo Loureiro. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: Inflamação; Diabetes; Biomarcadores; Estresse oxidativo; Adutos de DNA; Produtos avançados de glicação.
2006 - 2011	Graduação em Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas. Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, Brasil. Título: Principais métodos analíticos empregados na determinação de fármacos inibidores da enzima conversora de angiotensina em plasma humano. Orientador: Profa. Dra. Thaís Vitória da Silva Reis.

Formação Complementar

2010 - 2010	XXI Curso de Toxicologia Clínica. (Carga horária: 24h). Instituto da Criança HCFM/USP.
2010 - 2010	Sistema de prevenção e segurança do trabalho. (Carga horária: 8h). Sindusfarma.
2009 - 2009	Nutrigenômica. (Carga horária: 4h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2009 - 2009	Farmacovigilância. (Carga horária: 8h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - Atual	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno de Pós-Graduação, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional

2010 - 2011	Vínculo: Aluna, Enquadramento Funcional: Aluna de Iniciação Científica, Carga horária: 30
Outras informações	Participação nos projetos: "Avaliação do Estresse Oxidativo na População Exposta à Queima Pré-Colheita da Cana de Açúcar" sob a orientação da Profa. Dra. Tânia Marcourakis e Exposição a contaminantes ambientais e declínio cognitivo em idosos saudáveis: influência sobre o estresse psicológico e estresse oxidativo , sob responsabilidade da pesquisadora Deborah Suchecki do Departamento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, Brasil.

Vínculo institucional

2007 - 2007	Vínculo: Aluna, Enquadramento Funcional: Aluna de Iniciação Científica, Carga horária: 30, Regime: Dedicação exclusiva.
Outras informações	Participação no Projeto Farmácia Verde coordenado pelas professoras Caroly Cardoso e Celi de Paula, nas Faculdades Oswaldo Cruz com a elaboração de uma Cartilha Direcionada aos Profissionais da Área da Saúde, Contendo Informações sobre Interações Medicamentosas envolvendo Fitoterápicos e Alopáticos, tendo publicação subsequente na Revista Fitos.

Projetos de pesquisa

2012 - Atual

Produtos avançados de glicação e adutos de DNA relacionados a estresse oxidativo e inflamação em modelo de ratos diabéticos

Descrição: O diabetes mellitus tem sido considerado um dos problemas de saúde globalmente mais desafiadores do século 21, sendo as complicações crônicas da doença as responsáveis por esse quadro. Sabe-se que o diabetes promove estresse oxidativo, inflamação e a formação de produtos avançados de glicação não enzimática (AGEs), resultando em danos em diversas biomoléculas. Existe um contínuo interesse no desenvolvimento de métodos mais sensíveis para a quantificação de AGEs, de lesões devidas a estresse oxidativo e inflamação na vigência do diabetes, buscando novos biomarcadores para melhor compreensão dos riscos relacionados ao diabetes e monitoramento de estratégias terapêuticas. Para melhor compreensão do perfil de lesões em DNA que podem ocorrer em indivíduos diabéticos, neste trabalho analisaremos a formação de adutos de DNA em situação patológica de diabetes. Para tanto, serão quantificados em tecidos de ratos diabéticos, ratos diabéticos tratados com insulina e ratos não diabéticos, para comparação, os adutos N2-carboxietil-2 -desoxiguanosina (CEdG); 1,N2-eteno-2 -desoxiguanosina (1,N2-

εdGuo); 1,N6-eteno-2 -desoxiadenosina (1,N6-εdAdo); 8-oxo-2 -desoxiguanosina (8-oxodG); 8-nitro-2 -desoxiguanosina (8-NO2-dG); e 8-cloro-2 -desoxiguanosina (8-Cl-dG), relacionados aos processos de estresse oxidativo, inflamação e AGEs. O estudo permitirá a visualização mais ampla de lesões relacionadas ao diabetes no organismo, comparando-se à situação não patológica ou à de diabetes tratado, possibilitando também estratégias para o teste de drogas anti-AGE..
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Fabiana Almeida dos Santos - Coordenador / Ana Paula de Melo Loureiro - Integrante.

2009 - 2011

Dano oxidativo e alterações epigenéticas em indivíduos expostos a produtos da queima da cana-de-açúcar

Descrição: A queima pré-colheita de cana-de-açúcar é prática constante nos canaviais brasileiros e libera grande quantidade de poluentes, como material particulado de diâmetro menor que 10 e 2,5 m (PM10 e PM2,5, respectivamente), monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxidos de enxofre, óxidos de nitrogênio, amônia, ácidos orgânicos, ozônio, hidrocarbonetos voláteis e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Esses poluentes causam desequilíbrio no meio ambiente e, além disso, agravam a saúde da população residente e próxima aos canaviais. Alguns compostos gerados pela queima são indutores de inflamação, estresse oxidativo e, portanto, são potencialmente indutores de lesões em DNA, tais como 8-oxo-7,8-dihidro-2´-desoxiguanosina (8-oxodGuo), gerada por ataque de radical hidroxila (HO) ou oxigênio singlete (1O2) à base guanina no DNA, etenoadutos resultantes da reação de aldeídos com bases do DNA, e adutos devidos à reação de nitrosaminas geradas endogenamente com bases do DNA. Este projeto tem como objetivo avaliar os efeitos da queima pré-colheita da cana sobre os níveis de algumas lesões de DNA em leucócitos de trabalhadores de canaviais. Uma vez que a cultura da cana tem um importante papel na economia do país, torna-se importante quantificar impactos sobre a saúde da população exposta aos poluentes gerados no processo de queima pré-colheita. A base de dados gerada poderá direcionar a criação de políticas públicas para a proteção da saúde da população que reside e trabalha em áreas de cultivo de cana. Esses dados serão úteis para o cálculo de custos dos novos combustíveis (ex., etanol), considerando sustentabilidade e riscos para a saúde e meio ambiente. .
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Fabiana Almeida dos Santos - Coordenador.
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro / Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Bolsa.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Análise Toxicológica.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Alemão Compreende Pouco, Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco.

Espanhol Compreende Pouco, Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos

2012 Primeiro lugar: categoria de estudante de pós-graduação com o trabalho "OXIDATIVE DAMAGE AND EPIGENETIC CHANGES IN INDIVIDUALS EXPOSED TO SUGAR-CANE BURNING (TOXMAM-519) apresentado na forma de Painel,

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. BARBOSA, CRISTIANE MARIA GALVÃO ; TERRA-FILHO, MÁRIO ; DE ALBUQUERQUE, ANDRÉ LUIS PEREIRA ; DI GIORGI, DANTE ; GRUPI, CESAR ; NEGRÃO, CARLOS EDUARDO ; RONDON, MARIA URBANA PINTO BRANDÃO ; MARTINEZ, DANIEL GODOY ; MARCOURAKIS, TÂNIA ; **DOS SANTOS, FABIANA ALMEIDA** ; BRAGA, ALFÉSIO LUÍS FERREIRA ; ZANETTA, DIRCE MARIA TREVISAN ; SANTOS, UBIRATAN DE PAULA . Burnt Sugarcane Harvesting Cardiovascular Effects on a Group of Healthy Workers, Brazil. Plos One JCR, v. 7, p. 1-10, 2012.

Citações: WEB OF SCIENCE 2 | SCOPUS 2

2. REIS GONÇALVES, CINTIA ; REIS GONÇALVES, CARLOS ; DE ALMEIDA, FRANCINE ; DOS SANTOS LOPES, FERNANDA ; DOS SANTOS DURÃO, ANA ; **DOS SANTOS, FABIANA** ; DA SILVA, LUIZ ; MARCOURAKIS, TANIA ; CASTRO-FARIA-NETO, HUGO C ; VIEIRA, RODOLFO ; DOLHNIKOFF, MARISA . Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice. Critical Care (London. Print) JCR, v. 16, p. R199, 2012.

Citações: SCOPUS 2

3. CARDOSO, C. M. Z. ; SILVA, C. P. ; YAMAGAMI, K. ; LOPES, R. P. ; **SANTOS, F. A.** ; BONASSI, I. ; JESUINO, I. ; MARTORIE JR., T. ; GRACA, M. ; KANEKO, B. ; PAVANI, E. ; INOWE, C. . Elaboração de uma Cartilha Direcionada aos Profissionais da Área da Saúde, Contendo Informações sobre Interações Medicamentosas envolvendo Fitoterápicos e Alopáticos. Revista Fitos (ALANAC), v. 4, p. 56-69, 2009.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **SANTOS, F. A.** ; OLIVEIRA, A. A. F. ; RIBEIRO, A. L. T. ; DURAO, A. C. S. ; SILVA, A. M. O. ; MARCOURAKIS, T. ; OLIVEIRA, T. F. ; LOUREIRO, A. P. M. . OXIDATIVE STRESS, INFLAMMATION AND ADVANCED GLYCATION AS DAMAGE PATHWAYS IN A MODEL OF EXPERIMENTAL DIABETES. In: VIII Meeting of the Society for Free Radicals, 2013, Buenos Aires. VIII International Congress. Society for Free Radical Biology and Medicine. October 14-17, 2013., 2013.

2. **SANTOS, F. A.** ; DURAO, A. C. S. ; MARCOURAKIS, T. ; SILVA, A. M. O. ; OLIVEIRA, A. A. F. ; OLIVEIRA, T. F. ; RIBEIRO, A. L. T. ; LOUREIRO, A. P. M. . OXIDATIVE AND ADVANCED GLYCATION DAMAGE IN A MODEL OF DIABETIC RATS. In: XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2013, Porto Alegre. XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2013.

3. OLIVEIRA, A. A. F. ; **SANTOS, F. A.** ; OLIVEIRA, T. F. ; LOUREIRO, A. P. M. . Validation of an analytical method for simultaneous quantitation of DNA lesions related to oxidative stress and advanced glycation. In: XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2013, Porto Alegre. XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2013.

4. **DOS SANTOS, FABIANA** ; DURAO, A. C. S. ; SILVA, A. M. O. ; RIBEIRO, A. L. T. ; OLIVEIRA, A. A. F. ; OLIVEIRA, T. F. ; LOUREIRO, A. P. M. . EVALUATION OF MALONALDEHYDE IN PLASMA AND DNA LESIONS OF DIABETIC RATS. In: XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2013. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. v. 49. p. 55-55.

5. **SANTOS, F. A.** ; LOIOLA, F. J. ; OLIVEIRA, A. A. F. ; DURAO, A. C. S. ; MARCOURAKIS, T. ; SILVA, A. M. O. ; OLIVEIRA, T. F. ; RIBEIRO, A. L. T. ; LOUREIRO, A. P. M. . EVALUATION OF OXIDATIVE AND GLYCATION DAMAGE IN A MODEL OF DIABETIC RATS. In: Antioxidants and Redox Process in Health, 2013, São Paulo. Antioxidants and redox process in health. Bilateral Meeting: Brazil- Japan. Program and Abstracts, 2013.

6.

SANTOS, F. A. ; GUSMAN, A. P. P. ; OLIVEIRA, T. F. ; RODRIGUES, C. D. ; DURAO, A. C. S. ; TORRES, L. H. L. ; SANTOS, U. P. ; Tânia Marcourakis ; LOUREIRO, A. P. M. . OXIDATIVE DAMAGE AND EPIGENETIC CHANGES IN INDIVIDUALS EXPOSED TO SUGAR-CANE BURNING.. In: XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia - XII ECOTOX, 2012, Porto de Galinhas (PE). Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, 2012.

Apresentações de Trabalho

1. DOS SANTOS, FABIANA ALMEIDA . Diabetes: Uma visão geral. 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia. OXIDATIVE AND ADVANCED GLYCATION DAMAGE IN A MODEL OF DIABETIC RATS. 2013. (Congresso).

2. Antioxidants and Redox Process in Health. EVALUATION OF OXIDATIVE AND GLYCATION DAMAGE IN A MODEL OF DIABETIC RATS. 2013. (Encontro).

3. VIII Meeting of the Society for Free Radicals. OXIDATIVE STRESS, INFLAMMATION AND ADVANCED GLYCATION AS DAMAGE PATHWAYS IN A MODEL OF EXPERIMENTAL DIABETES. 2013. (Encontro).

4. II Escola de Inverno em Toxicologia - II EITox. Espécies Reativas e Interações com Biomoléculas. 2013. (Outra).

5. XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. EVALUATION OF MALONALDEHYDE IN PLASMA AND DNA LESIONS OF DIABETIC RATS. 2013. (Outra).

6. XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia - XII ECOTOX. OXIDATIVE DAMAGE AND EPIGENETIC CHANGES IN INDIVIDUALS EXPOSED TO SUGAR-CANE BURNING.. 2012. (Congresso).

7. O futuro do Diabetes no Brasil: uma visão multidisciplinar. 2012. (Seminário).

8. XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia. Dano oxidativo e alterações epigenéticas em indivíduos expostos a produtos da queima da cana-de-açúcar . 2011. (Congresso).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 08/08/2014 às 1:16:07

Imprimir currículo