

**SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE BELO HORIZONTE**  
**Programa de Pos-Graduação e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte**

**Diabetes Tipo 2: Modulação da Produção de Espécies Reativas  
de Oxigênio (ROS) em Granulócitos por Plasma Autólogo**

**Leonardo Oliveira Medina**

**Belo Horizonte**  
**2006**

Leonardo Oliveira Medina

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## **Diabetes Tipo 2: Modulação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em Granulócitos por Plasma Autólogo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr José Augusto Nogueira Machado

Belo Horizonte  
2006

**FICHA DE AVALIAÇÃO**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho às minhas mulheres: Sebastiana, Vanessa e Raquel pela paciência, incentivo, e pela referência de luta e garra. E a todos os meus amigos do velho Estadual Central e Pedro Aleixo pelo exemplo de solidariedade e humildade.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, José Augusto Nogueira Machado, pela sua calma e visão 3D (terceira dimensão) na resolução dos problemas mais caóticos do trabalho e, também, pela liberdade para questionar e propor novas idéias.

À Prof. Dra. Miriam Martins Chaves que acreditou e me apoiou na realização não só desse trabalho, e também na minha formação universitária.

Ao Prof. Dr. Francisco das Chagas, um exemplo de entusiasmo e incentivo na realização dos trabalhos e no convívio do dia-dia.

Aos professores e colegas da Pós-graduação da Santa Casa que, no dia-a-dia, formam uma grande família.

Aos meus amigos Shirley, Tito, Zélia e Marcos pelos momentos filosóficos e prazerosos durante todo este período de convívio e amadurecimento.

Aos colegas de Laboratório Clara, Patricia, Nívea, Denniece, Rafael, Camila, Érica, Raquel e Josiane pela paciência e pelos ótimos momentos.

À Dra. Maria Regina Calsolarie e Dra. Adriana Bosco, minhas endocrinologistas preferidas, as únicas que eu escuto.

À Dona Maria, Luzia, Kely, Claudinha, Maria Célia, Joelma e Janine pelos cafezinhos, doces e bons momentos de ajuda certa.

À Dra. Telcia Vasconcelos, Rose e Cláudia do CEPCEM pela paciência, cuidado com os pacientes durante a coleta do sangue.

## **RESUMO**

O presente trabalho objetivou avaliar comparativamente a modulação da produção de ROS por granulócitos de diabéticos tipo 2 e não diabéticos pelo plasma autólogo. Utilizou-se o ensaio de quimioluminescência dependente de luminol na determinação da produção de ROS por granulócitos (poder oxidante) e a redução do MTT para quantificação da capacidade antioxidante do plasma (poder antioxidante).

Os resultados demonstraram que o plasma autólogo foi capaz de modular a produção de ROS por granulócitos e que esta produção foi maior em diabéticos tipo 2 quando comparado com não diabéticos. Também, observou-se que o plasma pode reduzir, de forma química ou enzimática, o sal tetrazolium (MTT) em ausência de células. Este resultado, além de permitir sugerir a redução do MTT como uma técnica simples para avaliação do poder antioxidante, mostrou que a capacidade antioxidante do plasma de diabéticos é menor que a de não diabéticos.

Com base nos dados pode-se concluir que a maior produção de ROS em diabéticos e o menor poder antioxidante do seu plasma sugere a presença de um estado de estresse oxidativo. Possivelmente, esta condição pode estar associada ao desenvolvimento da injúria endotelial nestes pacientes.

## **LISTA DE ESQUEMAS**

**Esquema 1:** Efeito da hiperglicemia na via dos polióis.

**Esquema 2:** Vias metabólicas alteradas pela hiperglicemia no diabetes.

**Esquema 3:** Produção de ROS através da cadeia de transporte de elétrons

**Esquema 4:** Ativação da NADPH-Oxidase.

**Esquema 5:** Técnica para obtenção de plasma e granulócitos.

**Esquema 6:** Efeito da hiperglicemia no diabetes.

## **LISTA DE FIGURAS**



**Figura 1:** Modulação da produção de ROS em granulócitos de diabéticos e não diabéticos estimulados por PDB por plasma autólogo.

**Figura 2:** Comparação entre a capacidade antioxidante do plasma de diabéticos e não diabéticos.

**Figura 3:** Comparação entre a redução do MTT por plasma de diabéticos e não diabéticos com e sem plaqueta.

**Figura 4:** Comparação entre a redução do MTT pelo plasma de diabéticos e não diabéticos sob influência da temperatura.

**Figura 5:** Comparação da redução do MTT por plasma de diabéticos e não diabéticos.

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1:** Curva representativa da evolução cinética da produção de ROS por granulócitos de diabéticos e não diabéticos na ausência de estímulo.

**Gráfico 2:** Curva representativa da evolução cinética da produção de ROS por granulócitos de diabéticos e não diabéticos estimulados com PDB.

**Gráfico 3:** Curva cinética representativa da modulação da produção de ROS por granulócitos de não diabéticos por plasma autólogo.

**Gráfico 4:** Curva cinética representativa da modulação da produção de ROS por granulócitos de diabéticos por plasma autólogo.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Dados clínicos e laboratoriais dos doadores diabéticos e não diabéticos.

**Tabela 2:** Critérios estabelecidos pela *American Diabetes Association* (ADA) para o diagnóstico da diabetes

**Tabela 3:** Avaliação da produção de ROS por granulócitos de diabéticos Tipo 2 e não diabéticos.

**Tabela 4:** Produção de ROS por granulócitos de diabéticos e não diabéticos estimulados com PDB.

**Tabela 5:** Resultados obtidos com a modulação da produção de ROS em granulócitos por plasma autólogo.

**Tabela 6:** Efeito do plasma autólogo sobre a produção de ROS por granulócitos de diabéticos e não diabéticos estimulados com PDB.

**Tabela 7:** Avaliação da capacidade antioxidante do plasma de diabéticos e não diabéticos.

**Tabela 8:** Avaliação da redução do MTT pelo plasma de diabéticos e não diabéticos na ausência e na presença de plaquetas.

**Tabela 9:** Redução de MTT por plasma e albumina

**Tabela 10:** Relação entre albumina e Plasma de não diabéticos na redução de MTT

**Tabela 11:** Efeito da temperatura na redução do MTT pelo plasma de diabéticos e não diabéticos na ausência e na presença de incubação.

**Tabela 12:** Avaliação do tempo de redução do MTT pelo plasma de diabéticos e não diabéticos

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA = *American Diabetes Association*

AGEs = produtos avançados de glicolização não enzimáticos.

AR = Aldose Redutase.

BSA = Albumina sérica bovina.

DAG = Diacilglicerol.

DM2 = Diabético tipo 2.

D.O = Densidade óptica.

FAD= Flavina adenina dinucleotídeo.

FADH<sub>2</sub> = Forma reduzida de FAD.

FRAP- *Ferric reducing ability of plasma*.

GSH-P = Glutathiona peroxidase.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Peróxido de hidrogênio.

IDDM = Diabetes *melittus* insulino-dependente.

MTT = Sal tetrazólico.

NAD<sup>+</sup> = Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH = Forma reduzida de NAD<sup>+</sup>

NADP<sup>+</sup> = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH = Forma reduzida de NADP<sup>+</sup>

ND = Não Diabético.

NF-κβ = Fator nuclear KAPPA-B.

NIDDM = Diabetes *mellitus* não-insulino-dependente.

nm = Nanômetros.

NO = Óxido Nítrico.

<sup>-</sup>O<sub>2</sub> = Superóxido.

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> = Oxigênio *singlet*.

OH<sup>0</sup> = Radical hidroxila.

ORAC = *Oxyradical absorbance capacity*

PAI-1 = Plasminogênio Ativador Inibidor 1.  
PBS = Tampão fosfato.  
PDB = 12,13 forbol dibutirato  
PKC = Proteína cinase C.  
PLC = fosfolipase C.  
PMA = *Phorbol 12-myristate 13-acetate*.  
RLU = Unidades relativas de luz.  
ROS = espécies reativas de oxigênio.  
SDH = Sorbitol Desidrogenase.  
SOD = Superóxido desmutase.  
TCA = Ciclo dos ácidos tricarboxílicos.  
TGF = Fator de crescimento Tumoral.  
TRAP = *Total reactive antioxidant potential*.  
VEGF = fator de crescimento vascular endotelial.  
WST-1 = Sal tetrazólico.

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
2.	<b>OBJETIVOS</b>	4
2.1	<b>Objetivo Geral</b>	27

<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	27
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	28
<b>3.1</b>	<b>Local de Estudo</b>	28
<b>3.2</b>	<b>Seleção de pacientes</b>	28
3.2.1	Critérios de inclusão	2
		9
3.2.2	Critérios de exclusão	2
		9
<b>3.3</b>	<b>Controles</b>	2
		9
<b>3.4</b>	<b>Soluções</b>	3
		0
<b>3.5</b>	<b>Equipamentos</b>	3
		1
<b>3.6</b>	<b>Obtenção de granulócitos e plasma</b>	3
		2
<b>3.7</b>	<b>Quimioluminescência</b>	3
		3
<b>3.8</b>	<b>Medida da atividade antioxidante do plasma e da albumina</b>	3
		5
<b>3.9</b>	<b>Avaliação do efeito das plaquetas na capacidade antioxidante do plasma</b>	36
<b>3.10</b>	<b>Avaliação do efeito da temperatura na capacidade antioxidante do plasma</b>	36
<b>3.11</b>	<b>Avaliação da capacidade antioxidante do plasma de diabéticos e não diabéticos</b>	37
<b>3.12</b>	<b>Análise estatística</b>	37
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	38
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	5
		5
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	64
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	65

## 1. INTRODUÇÃO

O diabetes é uma doença multifatorial que, de acordo com os dados apresentados no trabalho "Global Prevalence of diabetes"<sup>1</sup>, acometia, no ano 2000, 171 milhões de pessoas ou 2.8% da população mundial. Segundo projeções para 2030, este número pode subir para 366 milhões de casos, o que representaria 4.4% da população no planeta. No mesmo trabalho, as estimativas para o Brasil apontavam uma população aproximada de 4.6 milhões de diabéticos no ano 2000 e de 11.3 milhões para 2030. Esses dados<sup>1</sup> ilustram a importância do diabetes como causa da morbidade e mortalidade no mundo e no Brasil.

A secreção inadequada de insulina e/ou resistência dos tecidos à mesma faz com que o diabético apresente altas taxas glicêmicas no sangue e alterações no metabolismo da glicose. As mesmas deficiências do diabético em relação a insulina servem também como critério para classificar os pacientes em duas categorias: Tipo 1, também denominado *diabetes mellitus* insulino-dependente (IDDM) - aqueles pacientes que devido a fatores hereditários, doenças autoimunes ou infecções virais sofreram um comprometimento das células beta do pâncreas, principais responsáveis pela secreção de insulina. Essa categoria apresenta maior prevalência em crianças e adolescentes; Tipo 2, também denominada *diabetes mellitus* não-insulino-dependente (NIDDM) - aqueles pacientes que apresentam redução da sensibilidade dos tecidos alvos ao efeito metabólico da insulina, isso em decorrência da diminuição da capacidade do receptor de insulina em se autofosforilar o resíduo de tirosina após o estímulo<sup>2</sup>.

É muito comum o uso do termo "resistência à insulina" para a sensibilidade diminuída da insulina em diabéticos do tipo 2. Nessa categoria, que representa 90% dos casos de diabetes, o paciente pode permanecer muitos anos sem diagnóstico, devido a seus estágios iniciais assintomáticos<sup>3</sup>.

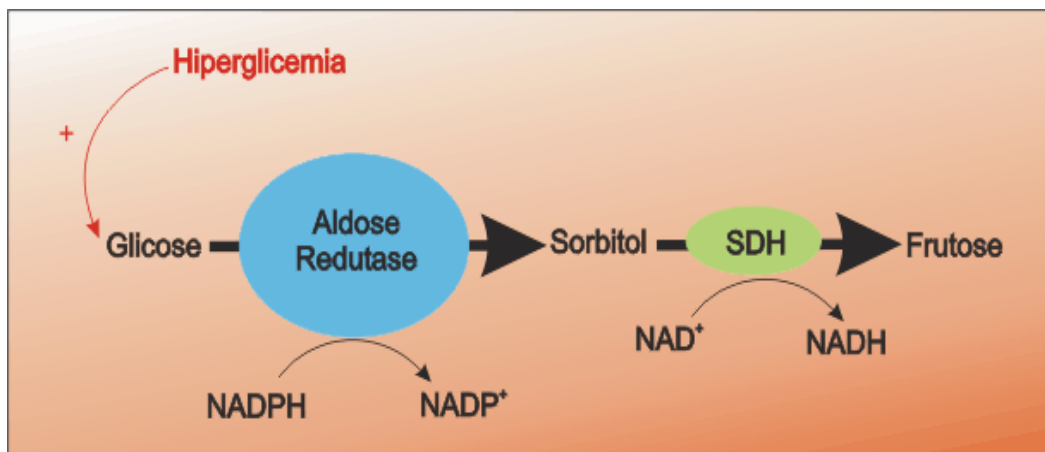
Em consequência disso, os indivíduos do tipo 2 apresentam maior risco para acidente vascular cerebral, doença cardíaca coronariana e doença vascular periférica<sup>4</sup>. Na tentativa de se normalizar as taxas glicêmicas desses pacientes são utilizados, de acordo com a evolução do distúrbio, sensibilizadores da ação da insulina, secretagogos de insulina e a própria insulina.

As altas taxas glicêmicas no sangue são a principal responsável pelas alterações de vias metabólicas nos diabéticos<sup>5,6</sup>. Em consequência, a hiperglicemia é considerada como um importante fator no desenvolvimento de danos aos tecidos, podendo esses efeitos serem reversíveis com controle glicêmico e de acordo com a gravidade das lesões originadas<sup>7</sup>. Brownlee<sup>5</sup> sugere em seus trabalhos, que as principais alterações causadas pela hiperglicemia estão ligadas ao aumento do fluxo na via dos polióis; ativação da proteína cinase C (PKC) e aumento da formação de produtos avançados de glicolização não enzimáticos (AGEs)

Em nosso organismo, a via metabólica dos polióis é responsável pela conversão da glicose em sorbitol e frutose (Esquema 1). Para isso, num primeiro momento, a glicose precisa ser reduzida em sorbitol por meio da aldose redutase, uma enzima citosólica dependente de NADPH. Em seguida, o sorbitol é oxidado em frutose pela sorbitol desidrogenase com consequente redução de NAD a NADH. Brownlee<sup>5,6</sup> em seus trabalhos, sugere que a hiperglicemia no diabetes causa aumento do fluxo da via dos polióis e, com isso, acarretando uma diminuição de NADPH e ao mesmo tempo aumento citoplasmático de sorbitol e NADH. Essas alterações podem originar estresse osmótico nas células microvasculares, devido ao aumento dos níveis de sorbitol intracelular<sup>8</sup>; alterações em outras vias de transdução de sinais em consequência do aumento da produção de metiogloxial e diacilglicerol (DAG) resultado do aumento dos níveis de NADH<sup>9</sup>; um aumento, também, na



produção de ROS devido a ativação enzimática da glutathiona redutase resultante das baixas concentrações de NADPH<sup>10</sup>.

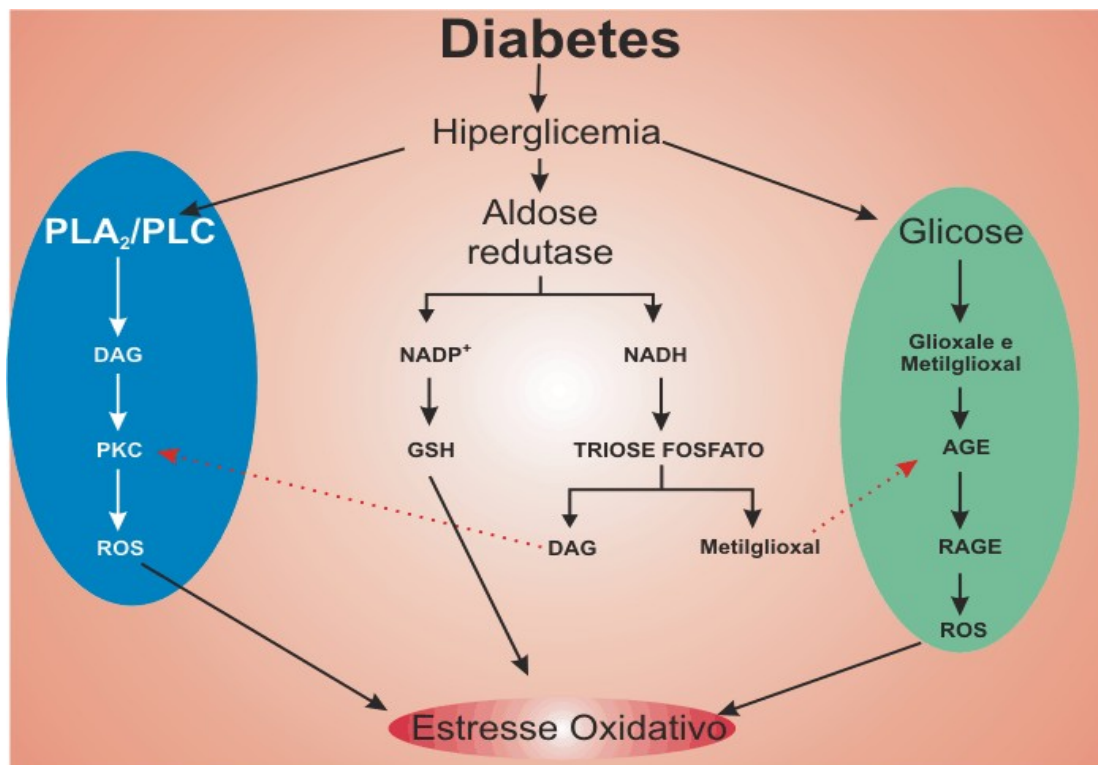


**Esquema 1:** Efeito da hiperglicemia na via do polióis. A Aldose Redutase (AR) reduz a glicose em sorbitol usando o NADPH. A Sorbitol Desidrogenase (SDH) oxida o sorbitol em frutose usando o NAD<sup>+</sup>. A hiperglicemia aumenta a atividade da AR, que acarreta aumento dos níveis intracelulares de sorbitol, NADP<sup>+</sup> e NADH. Esquema baseado em artigo de Bronwee M.<sup>5</sup>.

Produtos avançados de glicolização não enzimáticos (AGEs) são resultados das reações entre proteínas e glicose. Os compostos dicarbonil, derivados de glicose, também podem originar AGEs, a partir da sua reação com grupo amina de aminoácidos. Nas células, os AGEs são responsáveis por uma série de alterações como a perda de função pelas proteínas alteradas<sup>11</sup>, modificação de compostos da matriz extracelular<sup>12</sup>, aumento da produção de ROS ou ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B devido a sua interação com receptores celulares<sup>13</sup>. No diabetes, o aumento da produção de AGEs devido à hiperglicemia pode causar a morte de células endoteliais, perda de tônus e elasticidade dos vasos sanguíneos, além de alterações fisiológicas celulares. Trabalhos, usando inibidores de AGEs com animais, demonstraram uma parcial inibição de manifestações diabéticas como doenças microvasculares na retina, rins e nervos<sup>14</sup>.

As proteínas cinases C (PKC) compreendem uma família de enzimas com dezesseis isoformas, sendo que nove são ativadas pelo segundo mensageiro DAG<sup>5</sup>. Estas cinases são responsáveis pela regulação da atividade de várias moléculas intracelulares, por meio de transferência de energia, ou seja, através da fosforilação das mesmas<sup>15</sup>. A hiperglicemia no diabetes é responsável pelo aumento da atividade da PKC devido ao aumento das concentrações de DAG<sup>7</sup>. Em consequência disso, o diabético pode apresentar anomalias no fluxo sanguíneo devido à inibição da produção de óxido nítrico (NO), oclusão dos capilares em consequência do aumento da expressão de TGF e PAI-1, exarcebamento do processo inflamatório como resultado do aumento da ativação de NF- $\kappa$ B, aumento da produção de ROS e, também, uma neovascularização desnecessária em consequência do aumento da expressão de VEGF<sup>16</sup>.

O ponto em comum a todas essas alterações metabólicas no diabetes é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)<sup>5,6</sup> (Esquema 2). O que, também associado com alterações no balanço redox do organismo, vai acarretar o estresse oxidativo.



**Esquema 2:** Vias metabólicas alteradas pela hiperglicemia no diabetes. Aumento da ativação da PKC via fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Aumento do fluxo da via do poliol, resultando no estímulo da aldose redutase. Formação de produtos avançados de glicolização não enzimáticos (AGEs). Sendo que a principal consequência resultante dessas alterações é o aumento da produção de ROS e o estresse oxidativo. Figura baseada em artigo do Bronwlee M.<sup>5</sup>

Droge<sup>17</sup> definiu o estresse oxidativo observado no diabetes como o resultado de um desequilíbrio no balanço redox, uma vez que a quantidade de espécies reativas de oxigênio produzidas supera a de enzimas e compostos com capacidade antioxidante presentes no organismo. Conseqüentemente, facilitando a reação direta desses radicais livres com proteínas, lipídeos e DNA, o que pode causar danos e, até mesmo, a morte celular nos tecidos. Diferentes estilos de vida, idade, atividade física e doenças como o diabetes são fatores que podem influenciar no aumento da quantidade de ROS sem o correspondente aumento de substâncias antioxidantes, assim, acarretando o estresse oxidativo<sup>1</sup>.

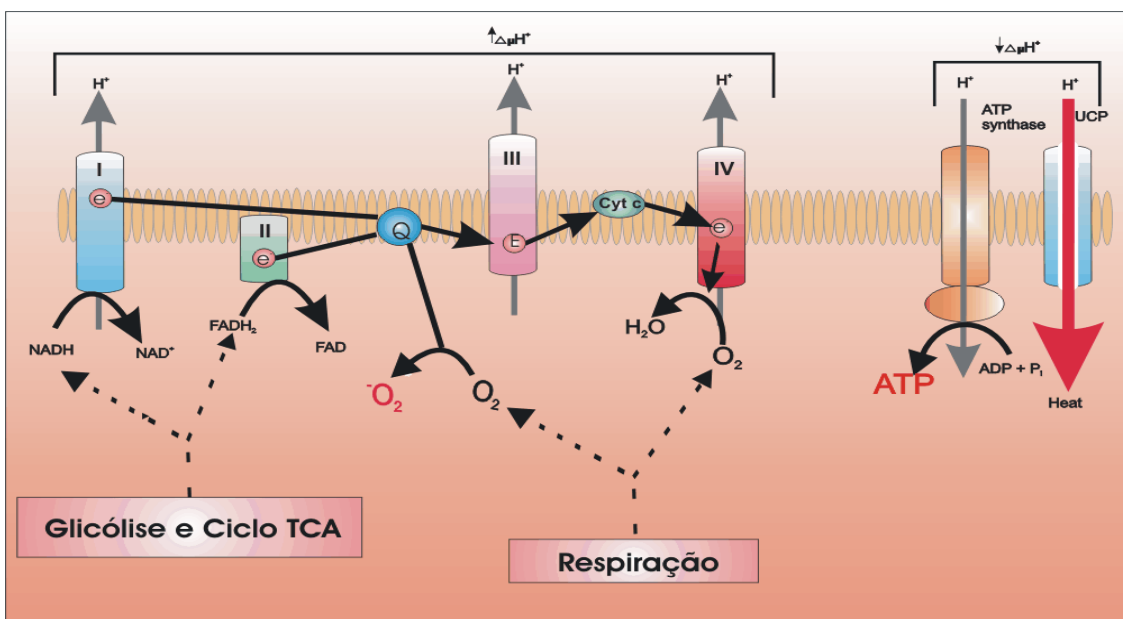
As espécies reativas de oxigênio são moléculas muito instáveis formadas a partir da redução do oxigênio ( $O_2$ ). Em concentrações moderadas, essas moléculas participam de funções importantes em nosso organismo como na mediação de processos de sinalização celular, eliminação de microorganismos invasores e modulação dos processos inflamatórios<sup>17</sup>. Dentre as principais espécies reativas de oxigênio estão: o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), produto da redução da molécula de oxigênio por um elétron; o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), resultante da redução do oxigênio por 2 elétrons; o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ), efeito da redução do oxigênio por 3 elétrons e o oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ), consequência da doação de 4 elétrons para a molécula de oxigênio<sup>18</sup>. A mitocôndria e o complexo enzimático da NADPH-oxidase que são considerados as principais fontes celulares de ROS no organismo e podendo ambas serem estimuladas pela hiperglicemia<sup>5,18</sup>.

Na mitocôndria a produção de ROS está associado com a metabolização da glicose<sup>19</sup>. Nesse processo durante a fosforilação oxidativa, grande parte do oxigênio consumido é reduzido a água. Entretanto, uma fração pequena, porém significativa, de  $O_2$  consumido pode sofrer escape da cadeia transportadora de elétrons e ser transformado em ROS<sup>20</sup>. Estima-se que de dois a cinco por cento do oxigênio utilizado pela mitocôndria são convertidos em radicais livres<sup>21</sup>.

O processo de produção de ROS na mitocôndria, através do metabolismo da glicose, tem início com a glicólise, fase em que ocorre a oxidação da glicose, com consequente geração de NADH e piruvato no citoplasma celular. O NADH pode doar seus elétrons para a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria ou reduzir o piruvato para lactato, o qual serve de substrato para a gluconeogênese hepática. O piruvato pode ser, também, oxidado através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), produzindo

dióxido de carbono, água, NADH e FADH<sub>2</sub>. Essas moléculas fornecem energia para a produção de ATP, através da fosforilação oxidativa na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. Nishikawa *et al*<sup>22</sup>, em seus trabalhos com uso de inibidores, demonstraram que a hiperglicemia induz ao TCA, um aumento na produção de substratos (NADH e FADH<sub>2</sub>), responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio na fosforilação oxidativa.

O fluxo de elétrons através da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria ocorre por intermédio do citocromo c (Cyt<sub>c</sub>), ubiquinona (Q) e 4 complexos enzimáticos associados à membrana (Esquema 2). O NADH derivado da oxidação da glicose e do ciclo TCA doa seus elétrons para complexo I. Esse, por sua vez, transfere os elétrons para a ubiquinona, que também pode ser reduzida por elétrons do complexo II transferidos pelo FADH<sub>2</sub>. A ubiquinona reduzida vai transferir seus elétrons para o complexo III. Estes são conduzidos pelo citocromo C para o complexo IV, quando a molécula de oxigênio é reduzida em água.



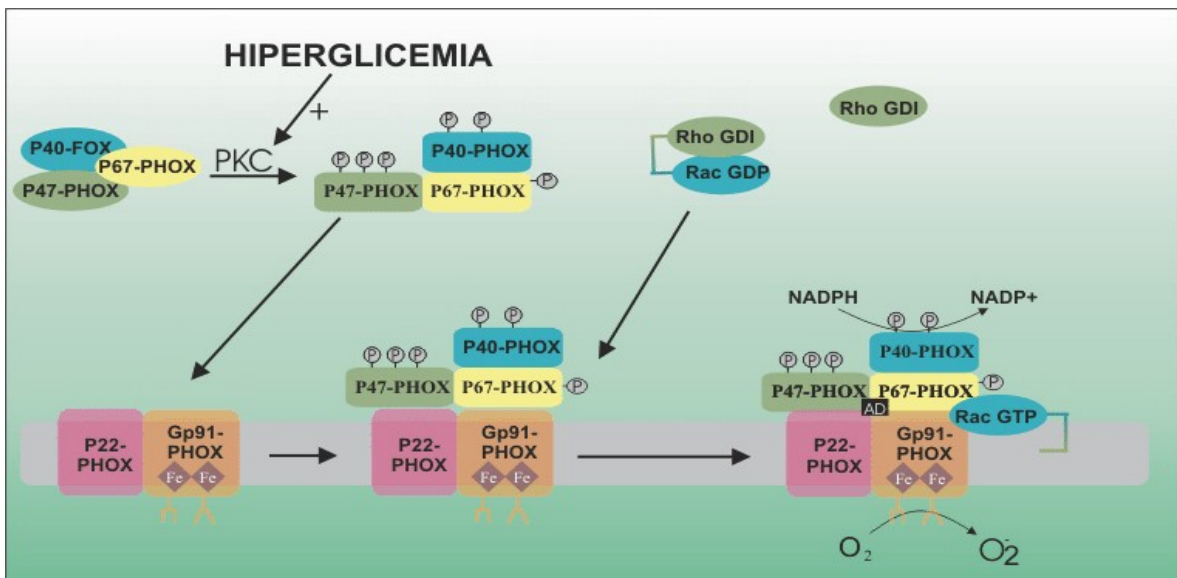
**Esquema 3:** Produção de ânion superóxido através da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. A hiperglicemia aumenta a quantidade de doadores de elétrons originados a partir da glicólise e ciclo TCA, resultando em um aumento do potencial de membrana e conseqüentemente num aumento da produção de ROS. Figura baseada em artigo de Nishikawa T. *et al*<sup>22</sup>.

A transferência de elétrons através dos complexos I, III e IV gera um gradiente de prótons responsável pela síntese de ATP através da ATPase. Trabalhos de Korshunov *et al*<sup>23</sup> demonstraram que a hiperglicemia aumenta a diferença de potencial eletroquímico na membrana da mitocôndria, o que vai contribuir para o aumento da produção de ânion superóxido por intermédio da ubiquinona e complexos I e III<sup>5,24</sup>, podendo levar ao estresse oxidativo.

Outra fonte celular de ROS, e tão importante quanto a mitocôndria, é através do complexo enzimático da NADPH-oxidase. Esse complexo vai desempenhar papel-chave nas células fagocíticas durante o processo de defesa do organismo contra patógenos microbianos<sup>18</sup>. A vital importância da NADPH-oxidase é bem ilustrada em indivíduos com doença granulomatosa crônica. Em decorrência de alterações genéticas nas subunidades desse complexo enzimático, os pacientes apresentam deficiência na defesa do organismo contra infecções geradas por bactérias e fungos<sup>25</sup>.

A NADPH-oxidase é constituída por várias subunidades, estando algumas localizados no citoplasma como a *p47fox*, *p67fox* e a *p40fox* e outras na membrana plasmática como a *gp91fox* e a *p22fox*<sup>26</sup>. Quando a NADPH oxidase é estimulada, as subunidades do citoplasma *p47fox*, *p67fox* e *p40fox* são fosforiladas e migram para a membrana plasmática, onde estão os componentes *gp91fox* e *p22fox*, com os quais se associam (Esquema 3). Ao mesmo tempo a subunidade *rac2* se dissocia de seu inibidor e, também, migra para o complexo na membrana<sup>18</sup>. Uma vez estando a associação de todos os componentes da NADPH oxidase completa, tem início a redução do oxigênio e formação do ânion superóxido.

Vários trabalhos mostraram que a hiperglicemia no diabetes estimula o aumento da produção de ROS pela NADPH-oxidase, por intermédio da proteína cinase C<sup>5,27</sup>. Isso ocorre porque a hiperglicemia eleva os níveis de DAG intracelular e esse segundo mensageiro aumenta a atividade da PKC. Essa cinase por sua vez, de grande importância na sinalização intracelular, é responsável pela fosforilação das subunidades citoplasmáticas da NADPH oxidase e com isso a ativação desse complexo enzimático<sup>28</sup> (Esquema 4) que passa então a produzir ROS. Esse aumento na produção de ROS em pacientes diabéticos pode causar estresse oxidativo nos pacientes diabéticos. Giugliano *et al*<sup>29</sup> mostraram em seus trabalhos a existência de uma associação entre o aumento da produção de ROS, por meio da PKC, com o desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares como arterosclerose, retinopatia e hipertensão no diabetes.



**Esquema 4:** Ativação da NADPH-Oxidase. Em um primeiro momento, os componentes p47-phox, p40-phox e p67-phox são fosforilados e migram para a membrana para se associar com os componentes gp91-phox e p22-phox. Ao mesmo tempo, Rac se dissocia de seu inibidor e também migra para a membrana. Uma vez estando todos os componentes da NADPH oxidase associados, a p67-phox é ativada pelo domínio de ativação (AD), que vai ativar os grupos Heme do citocromo b<sub>558</sub> e assim através do consumo de NADPH e oxigênio produzir ânion superóxido. Sendo que a hiperglicemia aumenta a ativação de PKC e conseqüentemente a fosforilação dos componentes citoplasmáticos, dessa forma estimulado a ativação da NADPH oxidase e na produção de ROS. Essa figura foi baseada no artigo de El-Benna J.<sup>18</sup>.

Em nosso organismo, a principal defesa contra as espécies reativas de oxigênio, produzidas pela mitocôndria e pela NADPH-oxidase, são os compostos e enzimas com capacidade antioxidante<sup>30</sup>. Estas substâncias antioxidantes são capazes de competir com outros substratos pela oxidação sofrida pelos radicais livres e, assim, evitar ou diminuir os danos causados a proteínas, DNA e lipídeos<sup>17</sup>. Esse sistema de defesa pode ser dividido em quatro grupos:

- I- Antioxidantes nutricionais como ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E) e o betacaroteno (vitamina A)<sup>30</sup>;
- II- Antioxidantes enzimáticos como o superóxido dismutase (SOD); as catalases; e a glutaciona peroxidase (GSH-Px)<sup>31</sup>;
- III- Antioxidantes solúveis como glutaciona, ácido úrico, albumina, haptoglobina e hemopexina<sup>32</sup>;
- IV- Seqüestradores de metais de transição como transferrina, lactoferrina, ferritina, albumina e ceruloplasmina<sup>33</sup>.

Dentre todos esses, os antioxidantes solúveis são os de maior concentração no sangue circulante ou nos fluídos intersticiais, podendo agir neutralizando diretamente os radicais livres ou através da participação de sistemas enzimáticos<sup>34</sup>.

Em decorrência da presença de vários compostos antioxidantes na constituição corporal<sup>30</sup>, muitos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de se avaliar a capacidade antioxidante total do plasma e seu papel como defesa antioxidante contra doenças associadas ao estresse oxidativo<sup>35,36</sup>. Dentre os inúmeros antioxidantes, os mais importantes são o ácido ascórbico, o ácido úrico, o alfa-tocoferol e a albumina<sup>30</sup>. Além desses, grupos de proteínas com



radicais sulfidrílicos, também, são considerados importantes antioxidantes do plasma<sup>34</sup>. Já a transferrina e a ceruloplasmina são consideradas substâncias antioxidantes preventivas do plasma, porque seqüestram metais de transição, impedindo sua participação em reações de formação de radicais livres<sup>33</sup>. O plasma, também, apresenta as enzimas superóxido desmutase extracelular e a glutathione dismutase dependente de selênio, as quais apresentam uma alta capacidade antioxidante<sup>28,29</sup>.

Entretanto, Halliwell *et al*<sup>32</sup>, demonstraram existir uma baixa quantidade de enzimas antioxidantes no plasma sanguíneo. Isto os levaram a sugerir que o plasma apresentaria uma baixa capacidade em neutralizar ROS produzidas por neutrófilos durante os processos patológicos, o que poderia resultar em lesões teciduais. Contudo, trabalho recente de Frei *et al*<sup>30</sup> demonstraram a importância de outros compostos não enzimáticos presentes no plasma, como o ácido ascórbico e o ácido úrico, na diminuição da peroxidação lipídica causada por radicais livres produzidos por leucócitos estimulados com éster de forbol (PMA). Sendo assim, eles conseguiram demonstrar a importância da capacidade antioxidante do plasma na prevenção a possíveis lesões em tecidos causadas por ROS.

Outros autores<sup>33,34</sup> têm demonstrado que a albumina desempenha importante papel, no plasma, como defesa antioxidante, uma vez que os grupos sulfidrilas (HS-) e amina (HN-), presentes em sua estrutura, permitem a neutralização de radicais livres. Outro fator importante, que também reforça a idéia da albumina como defesa antioxidante, é que, em termos de quantidade, ela é a principal proteína no plasma humano, com uma concentração normal de aproximadamente quatro a seis gramas por decilitro e uma meia vida de vinte dias. Kouoh *et al*<sup>34</sup>, através de resultados obtidos com a investigação da interação da albumina do soro bovino (BSA) com ROS

produzido por granulócitos, sugerem o uso da albumina como droga complementar no combate ao estresse oxidativo.

Estudo realizado por Santini *et al*<sup>35</sup> com o objetivo de avaliar o poder antioxidante do plasma do diabético no balanço oxi-redutor, demonstraram uma significativa redução na capacidade antioxidante do plasma e, ao mesmo tempo, um aumento significativo nos marcadores de peroxidação lipídica nos pacientes diabéticos quando comparado com os não diabéticos. Marra *et al*<sup>36</sup> demonstraram que a capacidade antioxidante do plasma das mulheres diabéticas é significativamente menor que a o dos homens diabéticos. Outro dado importante desse trabalho é que as taxas de ácido úrico no plasma dos pacientes diabéticos e principalmente nas mulheres diabéticas também foram significativamente menores, possivelmente devido a lesão renal associada. Com isso, os autores sugerem que as baixas concentrações de uréia no plasma, consequência da hiperglicemia e que causa um aumento na sua excreção, seja um dos responsáveis pela redução da capacidade antioxidante do plasma em diabéticos, o que pode servir como explicação para a maior suscetibilidade das mulheres diabéticas a complicações cardiovasculares.

Assim, o estresse oxidativo é uma das principais consequências das alterações metabólicas em decorrência da hiperglicemia no diabetes. Pode-se esperar também estas alterações em células do sistema imuni interferindo com a resposta inata e/ou adaptativa. Assim, ao avaliarmos a função dos granulócitos teremos subsídios sobre a reatividade inflamatória nos pacientes diabéticos, além de obtermos informações sobre a imunidade inata. No presente trabalho, resolvemos medir a produção de ROS nos granulócitos e quantificar a defesa antioxidante dada pelo plasma em pacientes diabéticos tipo 2.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

No presente trabalho avaliar-se-á o estresse oxidativo no diabetes através da quantificação da produção de ROS por granulócitos de pacientes diabéticos tipo 2 em conjunto com o papel do plasma autólogo como modulador desta produção de ROS.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Quantificar a produção de ROS em granulócitos de pacientes diabéticos e não diabéticos, na ausência de estímulo;
- Quantificar a produção de ROS em granulócitos de pacientes diabéticos e não diabéticos na presença de estímulo (éster de forbol) visando mimetizar o efeito da hiperglicemia na produção de DAG (Diacilglicerol);
- Comparar o efeito do plasma de diabéticos e não diabético como agente da modulação da produção de ROS por granulócitos;

- Identificar efetores solúveis do plasma com função neutralizadora do ROS, e
- Sugerir uma técnica simples para quantificação da atividade antioxidante do plasma.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de estudo**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (SCM-BH) e desenvolvido no próprio Hospital da SCM-BH. Os experimentos foram realizados no laboratório do Núcleo de Pós-graduação e Pesquisa, enquanto que a seleção de pacientes foi realizada no Ambulatório de Diabetes entre o período de 2002 a 2005.

#### **3. 2. Seleção de pacientes**

Os pacientes com o diagnóstico de Diabetes mellitus tipo 2 incluídos no estudo foram selecionados pela Doutora Maria Regina Calsolari e pela Doutora Telcia Vasconcelos Barros Magalhães, através de exames clínicos e laboratoriais. Estando parte dos dados referentes a estes exames apresentados na tabela1.

**Tabela 1:** Dados clínicos e laboratoriais dos doadores diabéticos e não diabéticos

	Não diabético	P	Diabético tipo 2
N	15		27
Glicose (mg/dl)	87±2	<0,05	169±20
Hba <sub>1c</sub> (%)	4,9±0,08	<0,05	8,0±0,30
IMC Kg/m <sup>2</sup>	24,9±1,4	>0,05	28,4±1,6
Colesterol (mg/dl)	194,8±27,4	>0,05	189±9
LDL (mg/dl)	125,6±17,3	>0,05	110±5
HDL (mg/dl)	55,6±2,8	>0,05	48,5±2,7
Triglicérides (mg/dl)	198,5±77,1	>0,05	161,1±59,9

Hba<sub>1c</sub> = Glicohemoglobina, IMC = Índice de massa corporal, LDL colesterol, HDL colesterol. Dados relativos a parte dos nossos pacientes.

### 3. 2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo, aqueles pacientes com diagnóstico de *diabetes mellitus* tipo 2, conforme os critérios estabelecidos pela *American Diabetes Association* (ADA) (Tabela 2) e que também se propuseram a assinar o Termo de Consentimento.

**Tabela 2:** Critérios estabelecidos pela *American Diabetes Association* (ADA) para o diagnóstico da diabetes

	mg/dl	
	Glicemia jejum	Glicemia pós dextrosol
Normal	≤99	≤140
Intolerante à glicose	99 até 126	140 até 200
Diabetes	≥126	≥200

### 3. 2.2 Critérios de exclusão

Os pacientes com alcoolismo, histórico de cetoacidose anterior, patologia crônica como câncer e insuficiência renal, grávidas e os que se recusaram a assinar o Termo de Consentimento foram excluídos do estudo.

### 3. 3. Controles

Foram considerados controles aqueles indivíduos sadios, avaliados por meio de históricos clínicos e exames físicos, que não apresentavam diabetes, doenças crônicas ou de caráter inflamatório e, também, não faziam uso contínuo de medicamentos.

### 3. 4. Soluções

- PBS (Tampão fosfato pH 7.4)<sup>37</sup>:
  - 8,12g de NaHPO<sub>4</sub>
  - 1,35g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 8g de NaCl
  - 1 litro de H<sub>2</sub>O destilada.
  
- Luminol:
  - 1,77g de luminol (Sigma) diluído em 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO) para obtenção da concentração de 10<sup>-2</sup>M. Para uso, essa solução era diluída em PBS para concentração 10<sup>-4</sup>M.
  
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difenil-tetrazolium (MTT):
  - O MTT (Sigma) foi diluído em PBS à concentração de 5,0 mg/ml para uso direto.

- 12.13 forbol dibutirato (PDB):
  - 1mg de PDB (Sigma) era diluído em 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO) originando uma concentração de  $2 \times 10^{-3} \text{M}$ . Para uso nos experimentos, sua concentração foi corrigida com PBS para  $10^{-6} \text{M}$ .
- Azul de Trypan
  - O azul de Tripán (Sigma) foi preparado à concentração de 1% em PBS.
- Gradientes de separação de celular
  - Monopaque: Gradiente para separação de células mononucleares, com densidade igual a 1.08%, preparado pela Bion LTDA.
  - Leucopaque: Gradiente utilizado para a separação de leucócitos, com densidade igual a 1.12%, preparado pela Bion Ltda.
- Isopropanol/HCl
  - 29,9ml de álcool isopropílico + 0,1 de HCl

### **3. 5. Equipamentos**

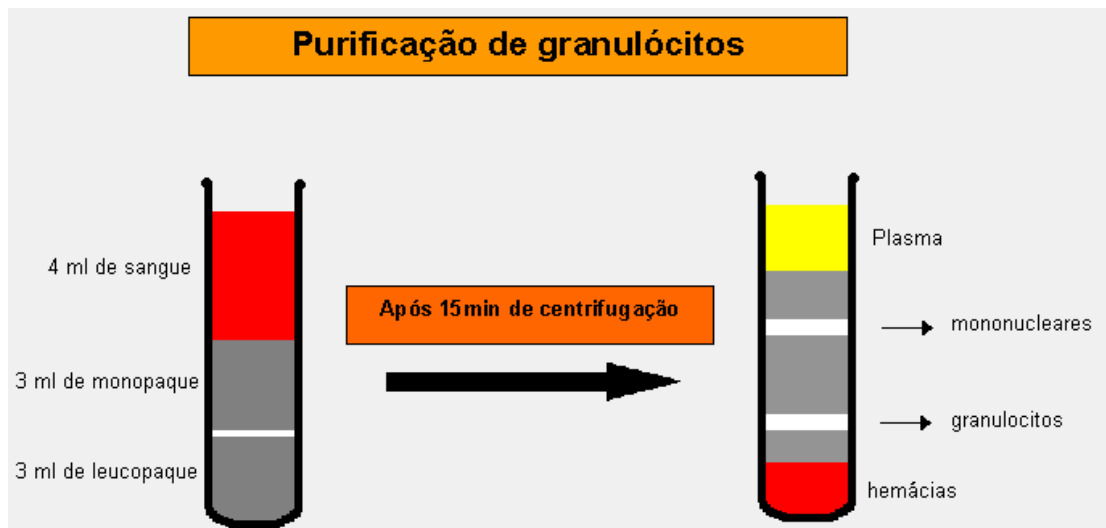
- Luminômetro (Ciba Corning - Magri Lite Analyzer).
- Espectrofotômetro (Bioplus).
- Centrífugas (Excelsar Fanem LTDA)

- Microcentrifuga (Micromax)
  
- Banho Maria (Hemoquímica)
  
- Estufa de CO<sub>2</sub> (Jouan - IG 150)
  
- Microscópios:
  - (Edu VU 1300)
  - (WESCO)
  - (Ken)
  - (A vision TT) acoplado a uma câmera “digital color” SDC-312 (Samsung) e um monitor (Pro view).

### **3. 6 Obtenção de granulócitos e plasma**

A obtenção do plasma e dos granulócitos foi realizada de acordo com Bicalho *et al*<sup>38</sup>, com pequenas alterações. Em um tubo de ensaio siliconizado eram adicionados 4.0ml de sangue periférico heparinizado sobre 6.0ml de gradiente duplo de Ficoll-Hypaque, com densidades 1,08 (3.0ml) e 1,12 (3.0ml). Esses tubos eram centrifugados a 200g por 15 minutos, formando, assim, uma primeira camada, na região superior do tubo, de cor amarelada translúcida que correspondia ao plasma. Logo abaixo, dois anéis esbranquiçados, sendo o primeiro constituído por células mononucleares e o segundo, um pouco mais abaixo, formado por granulócitos (Esquema 5).





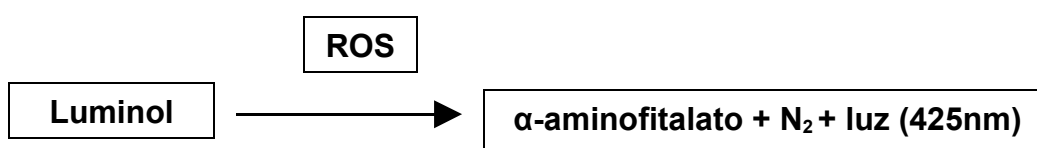
**Esquema 5:** Técnica para obtenção de plasma e granulócitos. Em um tubo de ensaio era adicionado 4.0ml de sangue sobre 6.0ml de gradiente com densidades 1,08 (monopaque) e 1,12 (leucopaque). Após 15 minutos de centrifugação formava no tubo uma primeira camada de plasma e dois anéis de células, um de mononucleares, outro de granulócitos.

A partir daí, o plasma e o anel de granulócitos eram então transferidos para tubos separados. Em seguida o plasma era centrifugado novamente por 15min a 200g, para certificar-se da total ausência de células. Enquanto os granulócitos passavam por um processo de lavagem, que consistiu em uma centrifugação a 50g por 20 minutos com 6.0 ml de PBS, seguida de mais duas a 100g por 10 minutos, também com PBS. Terminado esse processo, as células foram então levadas ao microscópio, numa câmara de Neubauer, para serem contadas e determinada sua viabilidade pelo Teste de Azul de Trypan, que mostrou-se sempre superior a 95%. No microscópio, também era avaliada a total ausência de células no plasma.

### 3. 7 Quimioluminescência

O ensaio de quimioluminescência dependente de luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4 falozinediona), conforme descrito por Gomez *et al.*<sup>39</sup>, foi utilizado para quantificar as espécies reativas de oxigênio produzidas pelos granulócitos

de pacientes diabéticos e não diabéticos e, também, para avaliar o efeito modulador do plasma nessa produção. Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio, ao serem produzidas liberam uma luminosidade natural. Quando esses radicais livres reagem com o luminol, a luminosidade sofre uma amplificação que pode então ser captada pelo luminômetro conforme a reação abaixo:



Para determinação do ROS produzido pelos granulócitos sem estimulação e com estimulação de éster de forbol (PDB), foram adicionados, em uma tubo próprio para luminômetro, 100 $\mu$ l de granulócitos ( $0,1 \times 10^6$ ), 200 $\mu$ l de PBS e 200 $\mu$ l de luminol ( $10^{-4}$  M). Este tubo era, então, levado ao luminômetro durante 15 minutos iniciais. Após este tempo, era adicionado 30 $\mu$ l de PDB a  $10^{-6}$  M e uma segunda corrida era realizada durante 30 minutos adicionais, totalizando 45 minutos de reação. Os resultados eram expressos em RLU/minuto (unidades relativas de luz/minuto).

Na avaliação da modulação da produção de ROS pelo plasma, um tubo recebia 100 $\mu$ l de granulócitos ( $0,1 \times 10^6$ ), 200 $\mu$ l de PBS, 200 $\mu$ l de luminol ( $10^{-4}$  M), 30 $\mu$ l de PDB ( $10^{-6}$  M) e 100 $\mu$ l de plasma. Como controle, um segundo tubo recebia todos os reagentes, exceto o plasma, e, um terceiro tubo recebia apenas os granulócitos, PBS e luminol. Todos os tubos eram lidos separadamente durante 30 minutos no luminômetro e os resultados expressos em RLU/minuto.

### **3. 8 Medida da atividade antioxidante do plasma e da albumina**

O MTT é um sal de tetrazólio, que pode ser reduzido pelas desidrogenases, formando cristais de formazana solúveis em isopropanol. Desta forma, o MTT passa de uma cor amarela (forma oxidada) para uma cor púrpura (forma reduzida).

Para a avaliação do poder antioxidante do plasma, 50µl de MTT com 50,100 e 200µl de plasma foram incubados em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C por um período de 120 minutos. Após a incubação, o volume final nos tubos era ajustado com PBS para 500µl e adicionado mais 1000µl de isopropanol/HCL para solubilizar os cristais de formazan. A leitura da redução do MTT em fase alcoólica era realizada no espectrofotômetro a 570nm e os resultados expressos em D.O<sub>570nm</sub>.

O mesmo protocolo foi utilizado para avaliação da capacidade antioxidante da albumina. Sendo 50µl de MTT incubado com 2, 4 e 8mg/20, 40, 80µl de albumina sérica bovina (BSA) durante 120 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C. Após a incubação, o volume final nos tubos era ajustado com PBS para 500µl e adicionado mais 1000µl de isopropanol/HCL para solubilizar os cristais de formazan. As reações em fase alcoólica eram lidas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm e os resultados expressos em D.O<sub>570nm</sub>.

### **3.9 Avaliação do efeito das plaquetas na capacidade antioxidante do plasma**

Nessa avaliação, as plaquetas presentes no plasma eram separadas através de uma centrifugação de 9.300g durante 20 minutos e, a confirmação da ausência de plaquetas no plasma, era realizada por meio da microscopia.

Para a avaliação do efeito das plaquetas na capacidade antioxidante do plasma, 50µl de MTT eram adicionados a 100µl de plasma com ausência e com presença de plaquetas em tubos distintos. Após uma incubação de 60 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C, o volume final dos tubos era ajustado para 500µl com PBS e adicionado 1000µl de isopropanol/HCL para interromper a reação. As leituras de redução do MTT eram realizadas no espectrofotômetro e os valores expressos em D.O<sub>570nm</sub>.

### **3. 10 Avaliação do efeito da temperatura na capacidade antioxidante do plasma**

Para esta avaliação, 100µl de plasma foi pré-incubado em 37°C e 56°C por 30 minutos. Após esta pré-incubação, os dois plasmas foram novamente incubados com 50µl de MTT em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C por mais 60 minutos. Após a incubação, o volume final dos tubos era ajustado para 500µl com PBS e adicionado 1000µl de isopropanol/HCL para interromper a reação. As leituras da redução do MTT eram realizadas no espectrofotômetro. Sendo os valores expressos em D.O<sub>570nm</sub>.

### **3.11 Avaliação da capacidade antioxidante do plasma de diabéticos e não diabéticos.**

Neste protocolo, 50µl de MTT mais 100µl de plasma foram incubados por 30, 60, 120 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C. Após a incubação, o volume final dos tubos era ajustado para 500µl com PBS e adicionado 1000µl de isopropanol/HCL para interromper a reação. As leituras da redução do MTT eram realizadas no espectrofotômetro. Sendo os valores expressos em D.O<sub>570nm</sub>.

### 3.12 Análise estatística

Para análise estatística dos dados foi utilizado o teste “t” de Student não pareado, sendo considerado estatisticamente significante  $P < 0.05$ .

## 4. Resultados

Os resultados serão apresentados na forma de perguntas e respostas. Aceita-se que a produção de ROS seja ativada “*in vivo*” pela hiperglicemia via produção de diacilglicerol (DAG) e conseqüente ativação da PKC. Com estas informações, formulamos a nossa primeira pergunta.

- **Primeira pergunta:** A produção de ROS por granulócitos de diabéticos Tipo 2 difere da observada em não diabéticos “*in vitro*”?

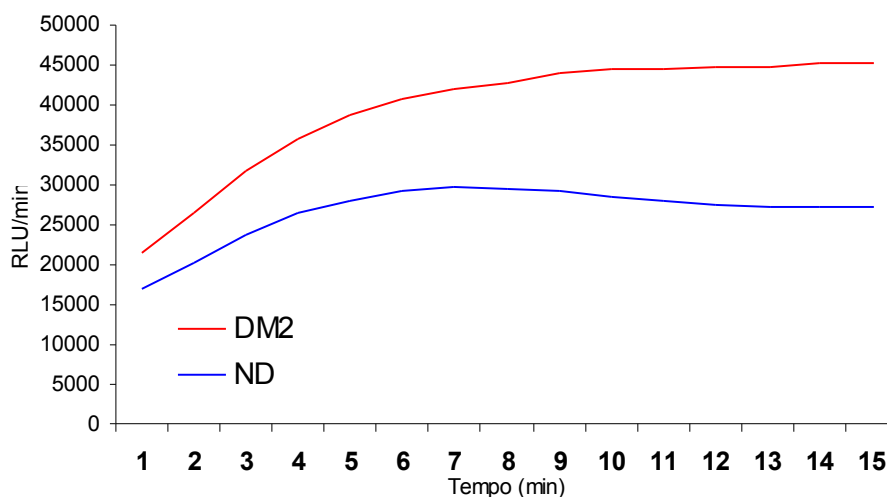
Para responder a esta pergunta, a produção de ROS por granulócitos foi avaliada durante 15 minutos em ensaio de quimiluminescência. Os valores obtidos durante o experimento foram expressos em RLU Total  $\times 10^{-3}$  e pela relação E/C onde E representa o valor de produção de ROS dos diabéticos e C o de não diabéticos.

Os resultados (Tabela 3) demonstraram que mesmo na ausência de estimulação “*in vitro*” existe uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na produção de ROS entre os granulócitos de pacientes diabéticos (DM2) e não diabéticos (ND): DM2 =  $559 \pm 62$ ; ND =  $381 \pm 57$  (valores expressos em RLU Total  $\times 10^{-3}$ ). Em diabéticos a produção de ROS foi 50% maior em comparação com os não diabéticos (Tabela 3). O gráfico 1 mostra uma curva cinética representativa da produção de ROS por granulócitos.

**Tabela 3:** Avaliação da produção de ROS por granulócitos de diabéticos tipo 2 e não diabéticos.

Doadores	RLU Total $\times 10^{-3} \pm EP$	E/C
ND	$381 \pm 57$	
p	$< 0,05$	1,5
DM2	$559 \pm 62$	

ND= Não diabéticos (n=26), DM2= diabético tipo 2 (n=23), RLU/min= unidade relativa de luz, EP = Erro padrão, E/C= Valor em RLU Total de DM2/ Valor em RLU Total de ND e p é considerado significativo quando  $p < 0,05$ . Dos pacientes diabéticos 14 faziam uso de insulina.



**Gráfico 1:** Curva representativa da evolução cinética da produção de ROS por granulócitos de diabéticos e não diabéticos na ausência de estímulo. DM2 = Diabéticos, ND = Não diabéticos, RLU = Unidade relativa de luz.

Comprovado que os granulócitos de diabéticos parecem “*in vitro*” manter a sua ativação em consequência da hiperglicemia “*in vivo*”, buscamos avaliar o efeito de um ativador de PKC no aumento da produção de ROS em diabéticos, objetivando mimetizar “*in vitro*” o efeito da hiperglicemia. O ensaio foi realizado utilizando o PDB, uma substância semelhante ao diacilglicerol, que ativa a PKC.

- **Segunda pergunta:** Em relação à produção de ROS, os granulócitos de diabéticos e de não diabéticos reagem de forma semelhante à estimulação?

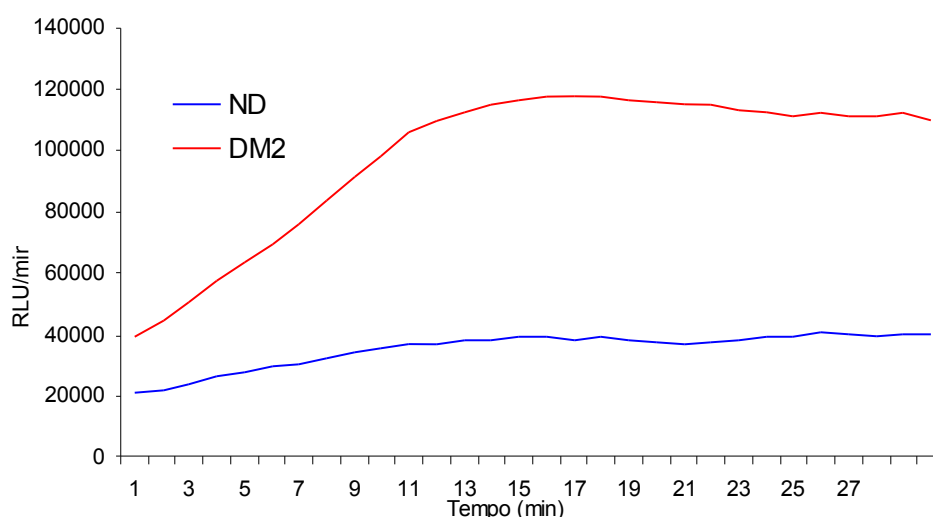
Com o objetivo de responder a essa pergunta, a produção de ROS por granulócitos estimulados com PDB foi avaliada durante 30 minutos em um ensaio de quimiluminescência. Os valores obtidos durante o experimento foram expressos em RLU Total  $\times 10^{-3}$  e pela relação E/C (Produção média de ROS por granulócitos na presença de PDB/ Produção média de ROS por granulócito na ausência de PDB).

Os resultados da Tabela 4 mostraram que os granulócitos de diabéticos Tipo 2 ( $DM2=2162\pm182$ ;  $E/C_{DM2}= 3,5\pm0,3$ ) apresentam uma ativação e produção de ROS significativamente maior ( $p<0,05$ ) em comparação a dos não diabéticos ( $ND=610\pm75$ ;  $E/C_{ND}= 1,6\pm0,2$ ) quando estimulados com PDB. Esta maior sensibilidade dos diabéticos ao estímulo com PDB também pode ser percebida a partir do gráfico 2, que mostra uma curva cinética representativa da produção de ROS por granulócitos.

**Tabela 4:** Produção de ROS por granulócitos de diabéticos e não diabéticos estimulados com PDB.

Doadores	RLU Total $\times 10^{-3} \pm EP$	E/C
ND	$610 \pm 75$	$1,6 \pm 0,2$
p	$<0,05$	$<0,05$
DM2	$2162 \pm 182$	$3,5 \pm 0,3$

ND= Não diabéticos (N=6), DM2= diabético tipo 2 (n=14), RLU = Unidade relativa de luz, EP = Erro padrão, E/C= Valor em RLU total do experimento em presença de PDB/ Valor em RLU total do experimento em ausência PDB. p é considerado significante quando  $p<0,05$ .



**Gráfico 2:** Curva representativa da evolução cinética da produção de ROS por granulócitos de diabéticos e não diabéticos estimulados com PDB. DM2 = Diabéticos, ND = Não diabéticos, RLU = Unidade relativa de luz.



Como vimos na tabela 3 e 4, existe uma maior produção de ROS total por granulócitos de diabéticos em comparação com os não diabéticos. Os mesmos resultados foram também observados quando expressos em rlu/min. Isto caracteriza um dos parâmetros identificados na definição do estresse oxidativo. Contudo, talvez seria possível haver uma neutralização desta resposta dos granulócitos por agentes antioxidantes. Neste contexto, resolveu-se estudar a capacidade do plasma autólogo como um efector antioxidante na modulação da produção de ROS por granulócitos.

- **Terceira pergunta:** A produção de ROS por granulócitos de pacientes diabéticos e não diabéticos estimulados com PDB pode ser modulada por plasma autólogo?

A capacidade do plasma em modular a produção de ROS por granulócitos foi avaliada através do ensaio de quimioluminescência durante 30 minutos. Os valores obtidos durante o experimento foram expressos em RLU total  $\times 10^{-3}$  e pela relação granulócito+PDB/ granulócito e granulócito+PDB+plasma/ granulócito+PDB.

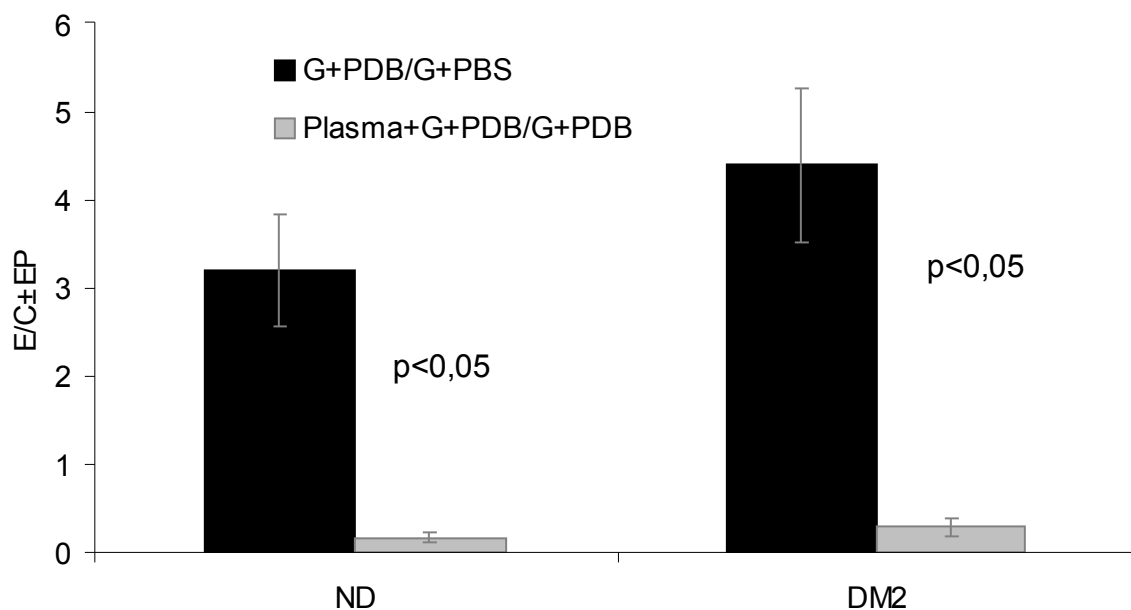
Os resultados obtidos (Tabela 5) e analisados de acordo com a Tabela 6 e Figura 1 demonstraram que o plasma autólogo acarreta uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da produção de ROS por granulócitos estimulados com PDB tanto em pacientes diabéticos ( $G+PDB/G+PBS_{DM2} = 4,4 \pm 0,7$ ;  $G+PDB+Plasma/G+PDB_{DM2} = 0,32 \pm 0,08$ ) como em não diabéticos ( $G+PDB/G+PBS_{ND} = 3,2 \pm 0,6$ ;  $G+Plasma+PDB/G+PDB_{ND} = 0,26 \pm 0,08$ ). Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a modulação da produção de ROS

pelo plasma do não diabético comparado com o plasma de diabético (G+Plasma+PDB/G+PDB<sub>DM2</sub>=0,32±0,08; G+Plasma+PDB/G+PDB<sub>ND</sub>= 0,26±0,08). Estes resultados nos permitem sugerir que o plasma autólogo modula a produção de ROS por granulócitos de diabéticos e não diabéticos estimulados por PDB. De forma semelhante, os gráficos 3 e 4 mostram curvas médias da modulação exercida pelo plasma sobre a produção de ROS por granulócitos.

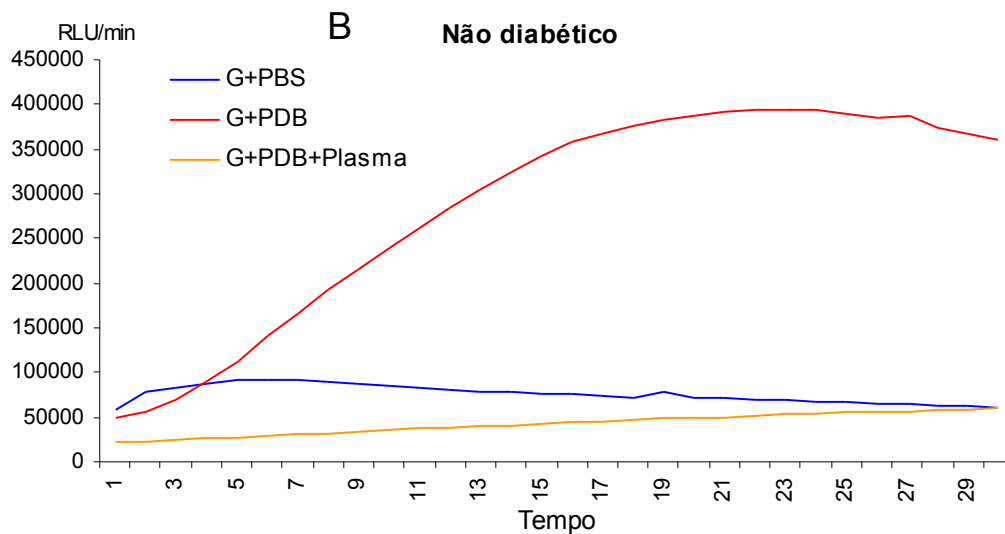
**Tabela 6:** Efeito do plasma autólogo sobre a produção de ROS por granulócitos de diabéticos e não diabéticos estimulados com PDB.  
**Tabela 5:** Resultados obtidos com a modulação da produção de ROS em granulócitos por plasma autólogo.

Doadores	RLU Total $\times 10^3$ E/C $\pm$ EP									
	Não Diabéticos				p	Diabéticos				
	G+PDB/G+PBS		G+PDB+Plasma /G+PDB			G+PDB+Plasma /G+PDB		G+PDB+Plasma /G+PDB		
(1) G+PBS	(2) G+PDB	(3) G+PDB+Plas	(3) G+PDB+Plas	(3) G+PBS	(2) G+PDB	(3) G+PDB+Plas	(3) G+PDB+Plas	(3) G+PDB+Plas	(3) G+PDB+Plas	
1	5387	8364	1,56	2933	0,35	467	1269	2,7	645	0,5
2	3806	6421	1,67	1841	0,28	1051	4910	4,6	1175	0,23
3	264	3343	1,25	1648	0,49	1362	3946	2,83	406	0,10
4	797	4490	5,7	478	0,1	6756	46756	6,81	9061	0,19
5	1291	6483	4,97	433	0,06	1987	16055	7,94	10387	0,64
6	4009	12852	3,12	470	0,03	3283	10687	3,17	1152	0,10
7	2707	14797	5,42	1375	0,09	3101	10449	3,29	5590	0,53
8	420	924	2,2	644	0,69	-	-	-	-	-
$\bar{x}$	2337 $\pm$ 678	7209 $\pm$ 1656	3,2 $\pm$ 0,6	1227 $\pm$ 315	0,26 $\pm$ 0,08	2572 $\pm$ 799	13438 $\pm$ 5864	4,4 $\pm$ 0,7	4059 $\pm$ 1612	0,32 $\pm$ 0,08

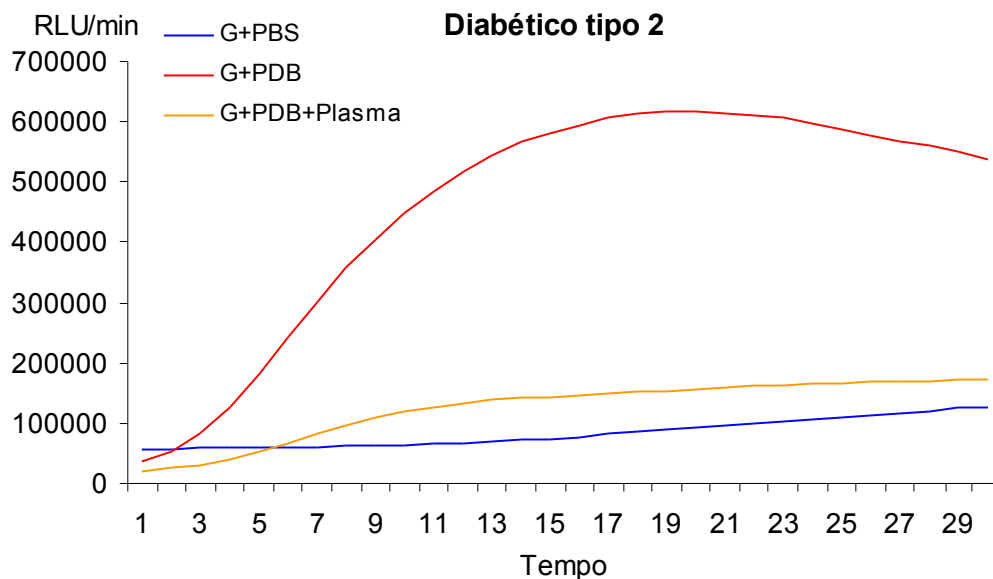
G=Granulócitos, Plas=Plasma, E/C = Experimento/Controle,  $\bar{x}$  = média.



**Figura 1:** Modulação da produção de ROS em granulócitos de diabéticos e não diabéticos estimulados por PDB por plasma autólogo. Diabéticos = DM2 (n=8) e não diabéticos = ND (n=7), E/C= Valor em RLU total do experimento/ Valor em RLU total do controle, p é considerado significativo quando p<0,05 pelo teste "t" de Student.



**Gráfico 3:** Curva cinética representativa da modulação da produção de ROS por granulócitos de não diabéticos por plasma autólogo. N=8 e RLU = Unidade relativa de luz .



**Gráfico 4:** Curva cinética representativa da modulação da produção de ROS por granulócitos de diabéticos por plasma autólogo. N=7, RLU = Unidade relativa de luz .

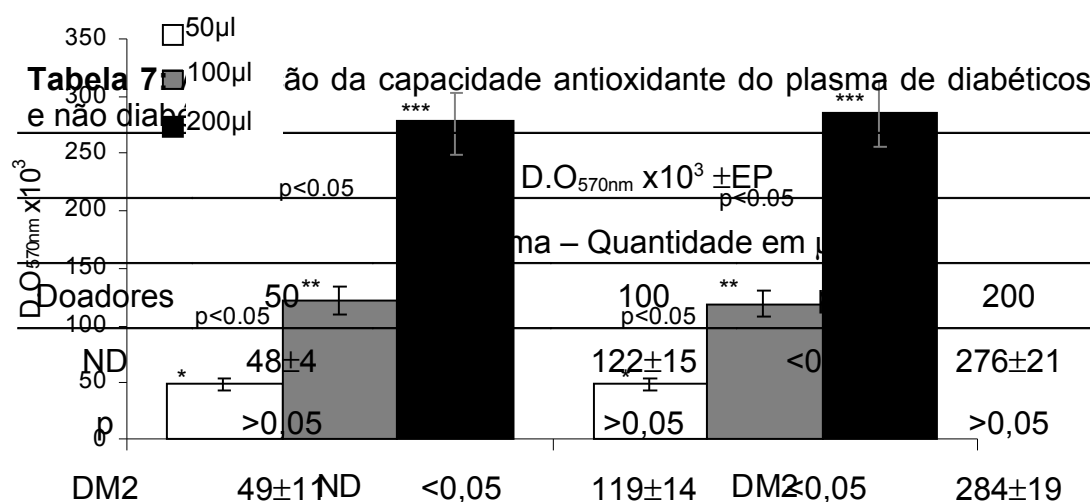
Se o plasma modula a produção de ROS, ele deve apresentar uma forte atividade antioxidante ou redutora, possivelmente mensurável. Com este enfoque, testamos a capacidade do plasma em reduzir diretamente o sal

tetrazolio (MTT). Se correto o nosso raciocínio poderíamos sugerir uma técnica simples para avaliação global da atividade antioxidante do plasma.

- **Quarta pergunta:** É possível quantificar a capacidade antioxidante do plasma?

O nosso objetivo com esta pergunta é padronização e otimização de uma técnica simples usando-se a redução do sal tetrazolium (MTT). Para isto, plasma e MTT foram incubados durante duas horas e os valores obtidos da reação foram expressos em  $D.O_{570nm} \times 10^3$ .

Os nossos resultados (Tabela 7 e Figura 2) demonstraram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) do MTT pelas diferentes quantidades de plasma tanto de diabético ( $DM2_{50\mu l} = 49 \pm 11$ ,  $DM2_{100\mu l} = 119 \pm 14$ ,  $DM2_{200\mu l} = 284 \pm 19$ ) como de não diabéticos ( $ND_{50\mu l} = 48 \pm 4$ ,  $ND_{100\mu l} = 122 \pm 15$ ,  $ND_{200\mu l} = 276 \pm 21$ ). A redução do MTT ocorreu em função da quantidade de plasma. Este dado sugere que o poder antioxidante do plasma pode ser quantificado pela redução do MTT.



ND= Não diabéticos (n=7), DM2= diabético tipo 2 (n=9), D.O<sub>570nm</sub> = densidade óptica em 570 nanômetros, EP = Erro padrão. p é considerado significativo quando  $p < 0,05$  pelo teste "t" de Student.

**Figura 2:** Comparação entre a capacidade antioxidante do plasma de diabéticos e não diabéticos. Diabéticos = DM2 (n=7) e não diabéticos = DM2 (n=9), D.O<sub>570nm</sub> = densidade óptica em 570 nanômetros, P é considerado significativo quando  $P < 0,05$

pelo teste "t" de Student. (-), (--), (---) diferença não significativa ( $p>0,05$ ) entre 50, 100 e 200  $\mu$ l de plasma de diabéticos e não diabéticos.

A partir daí pode-se inferir que o poder antioxidante do plasma é capaz de reduzir o MTT e este teste pode inferir a atividade antioxidante do plasma. Contudo, este efeito poderia ser devido à presença de plaquetas. Isso nos fez levantar a seguinte questão.

- **Quinta pergunta:** O efeito antioxidante do plasma é devido a ação direta de plaquetas?

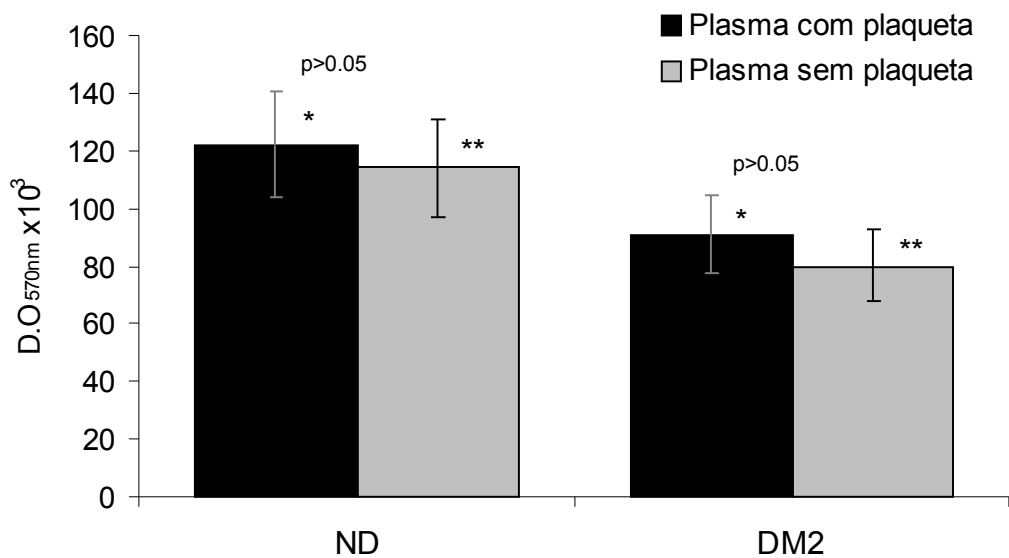
Para esta avaliação, parte do plasma, após um processo para retirada das plaquetas de sua composição, e seu controle foram incubados com MTT por um período de 60 minutos. Os valores da reação de redução do MTT foram expressos em  $D.O_{570nm} \times 10^3$ .

Os resultados obtidos (Tabela 8 e Figura 3) não demonstraram diferença significativa entre o plasma com ou sem plaquetas, tanto em não diabéticos ( $ND_{Plasma \text{ com/plaquetas}} = 122 \pm 13$ ;  $ND_{Plasma \text{ sem/plaqueta}} = 114 \pm 13$ ,  $p>0,05$ ), como em diabéticos ( $DM2_{Plasma \text{ com/plaqueta}} = 91 \pm 15$ ;  $DM2_{Plasma \text{ sem/plaqueta}} = 80 \pm 11$ ,  $p>0,05$ ). Os resultados, também, não permitiram discriminar os não diabéticos dos diabéticos por meio dos valores de redução do MTT, uma vez que a diferença observada nos dois grupos não foi significativa, tanto no plasma total ( $ND_{Plasma \text{ com/plaqueta}} = 122 \pm 13$ ;  $DM2_{Plasma \text{ com/plaqueta}} = 91 \pm 15$ ,  $p>0,05$ ), quanto no plasma isento de plaquetas ( $ND_{Plasma \text{ sem/plaqueta}} = 114 \pm 13$ ;  $DM2_{Plasma \text{ sem/plaqueta}} = 80 \pm 11$ ,  $p>0,05$ ). Os resultados demonstram que a redução do MTT não foi devida à ação de plaquetas, mas sim, possivelmente, a efetores solúveis do plasma.

**Tabela 8:** Avaliação da redução do MTT pelo plasma de diabéticos e não diabéticos na ausência e na presença de plaquetas

D.O <sub>570nm</sub> x10 <sup>3</sup> ±EP			
Doadores	Plasma rico em plaqueta	p	Plasma isento de plaquetas
ND	122±13	>0,05	114±13
DM2	91±15	>0,05	80±11

ND= Não diabéticos (n=6), DM2= diabético tipo 2 (n=5), D.O<sub>570nm</sub> = densidade óptica em 570 nanômetros, EP = Erro padrão. p é considerado significativo quando P<0,05 pelo teste "t" de Student.



**Figura 3:** Comparação entre a redução do MTT por plasma com e sem plaquetas em diabéticos e não diabéticos. ND= Não diabéticos (n=6), DM2= diabético tipo 2 (n=5). D.O<sub>570nm</sub> = densidade óptica em 570 nanômetros, EP = Erro padrão, (\*) diferença não significativa (p>0,05) entre o plasma com plaquetas de diabéticos e não diabéticos, (\*\*) diferença não significativa (p>0,05) entre o plasma sem plaquetas de diabéticos e não diabéticos. P é considerado significativo quando p<0,05 pelo teste "t" de Student.

Excluindo a participação das células na redução do MTT, passou-se a trabalhar com a hipótese de que os efetores antioxidantes do plasma seriam

solúveis. A partir daí resolveu-se testar o papel da albumina neste fenômeno devido a sua grande quantidade no plasma.

- **Sexta pergunta:** Seria a albumina um dos efetores solúveis responsáveis pela capacidade antioxidante do plasma?

Para se estabelecer uma comparação qualitativa e quantitativa, testou-se o poder redutor da albumina através do MTT em quantidades equivalentes às concentrações encontradas no plasma. As leituras das reações de redução do MTT, eram realizadas após 2 horas de incubação e os valores expressos em  $D.O_{570nm} \times 10^3$ .

Os resultados obtidos (Tabela 9) demonstraram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da redução do MTT de forma proporcional a quantidade de albumina:  $BSA_{2mg} = 28 \pm 4$ ,  $BSA_{4mg} = 49 \pm 5$ ,  $BSA_{8mg} = 85 \pm 8$ ,  $p < 0,05$ . Sendo assim, esses resultados reforçam a tese de que a albumina é uma importante defesa antioxidante presente no plasma.

Os dados da tabela 9 nos permite estabelecer uma relação entre as

**Tabela 9:** Redução de MTT por plasma e albumina

	(D.O <sub>570nm</sub> x10 <sup>3</sup> ±EP)									
	BSA					Plasma				
	2mg	p	4mg	p	8mg	50µl	p	100µl	p	200µl
BSA	28±4	<0,05	49±5	<0,05	85±8					
ND	-	-			-	49±3	<0,05	122±15	<0,05	276±21
DM2	-	-			-	49±1	<0,05	119±14	<0,05	284±19

BSA= Albumina Sérica Bovina (n=7), ND= Não diabéticos (n=7), DM2= diabético tipo 2 (n=9), D.O<sub>570nm</sub> = densidade óptica em 570 nanômetros, EP = Erro padrão, P é considerado significativo quando  $P < 0,05$  pelo teste “t” de Student.

densidades ópticas das diferentes quantidades de BSA e de plasma. Estes



resultados (Tabela 10) demonstraram que a albumina contribui com 31 a 57% da redução do MTT pelo plasma: (2mg de BSA/50µl de plasma = 0,57; 4mg de BSA/100µl de plasma = 0,40; 8mg de BSA/200µl de plasma = 0,31). Indicando assim, que outros efetores, também são responsáveis pela capacidade antioxidante total do plasma.

**Tabela 10:** Relação entre albumina e Plasma de não diabéticos na redução de MTT

Relação BSA e plasma	D.O <sub>570nm</sub> x10 <sup>3</sup>	BSA/Plasma
2mg de BSA/50µl de plasma	28/49	0,57
4mg de BSA/100µl de plasma	49/122	0,40
8mg de BSA/200µl de plasma	85/276	0,31

BSA= Albumina sérica bovina (n=7), plasma de não diabéticos (n=7), D.O<sub>570nm</sub> = densidade óptica em 570 nanômetros.

Uma vez comprovada a possibilidade da participação da albumina plasmática na redução do MTT, resolveu-se avaliar se a capacidade antioxidante do plasma pode sofrer alguma alteração por influência da temperatura.

- **Sétima pergunta:** Os efetores antioxidantes do plasma são resistentes a temperatura?

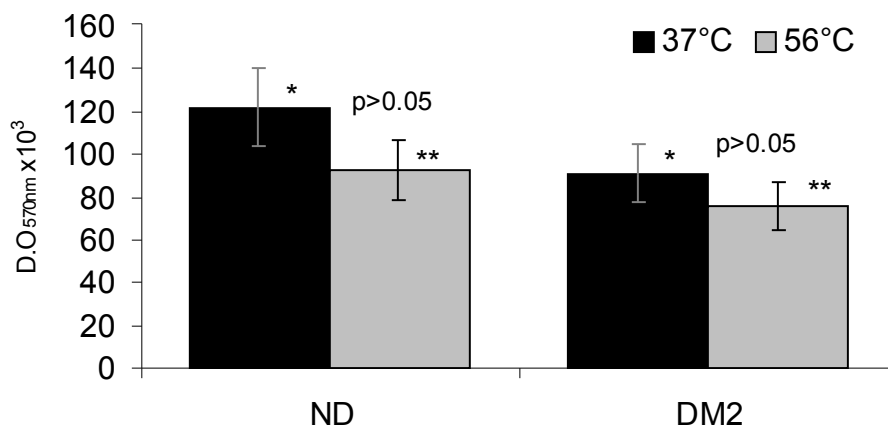
Com o objetivo de responder esta pergunta, parte do mesmo plasma foi pré-incubado em 37°C e 56°C por 30 minutos e novamente incubados na presença de MTT por mais 60 minutos. As leituras das reações foram expressos em D.O<sub>570nm</sub> x10<sup>3</sup>.

Os resultados (tabela 11 e figura 4) não demonstraram diferença significativa entre o plasma incubado na temperatura de 37°C e 56°C, tanto em não diabéticos ( $ND_{37^{\circ}C} = 122 \pm 13$ ;  $ND_{56^{\circ}C} = 93 \pm 13$ ,  $p > 0,05$ ), como em diabéticos ( $DM2_{37^{\circ}C} = 91 \pm 15$ ;  $DM2_{56^{\circ}C} = 76 \pm 9$ ,  $p > 0,05$ ). Os resultados também não permitem discriminar diabéticos e não diabéticos através do plasma a temperatura ambiente ( $ND_{37^{\circ}C} = 122 \pm 13$ ;  $DM2_{37^{\circ}C} = 91 \pm 15$ ,  $p > 0,05$ ) ou com incubação 56°C ( $ND_{56^{\circ}C} = 93 \pm 13$ ;  $DM2_{56^{\circ}C} = 76 \pm 9$ ,  $p > 0,05$ ). Com isso, os resultados obtidos sugerem que a temperatura não influencia na redução do MTT pelo plasma.

**Tabela 11:** Efeito da temperatura na redução do MTT pelo plasma de diabéticos e não diabéticos na ausência e na presença de incubação.

Doadores	D.O <sub>570nm</sub> x 10 <sup>3</sup> ±EP		
	37°C	p	56°C
ND	122±13	p>0,05	93±13
DM2	91±15	p>0,05	76±9

ND= Não diabéticos (n=6), DM2= diabético tipo 2(n=5), D.O<sub>570nm</sub> = densidade óptica em 570 nanômetros, EP = Erro padrão. p é significante quando  $p < 0,05$  pelo teste “t” de Student.



**Figura 4:** Comparação entre a redução do MTT pelo plasma de diabéticos e não diabéticos sob influência da temperatura. ND= Não diabéticos (n=6), DM2= diabético tipo 2 (n=5), D.O<sub>570nm</sub> = densidade óptica em 570 nanômetros. (·) diferença não significativa ( p>0,05) entre o plasma de diabéticos e não diabéticos incubados em 37°C, (·) diferença não significativa (p>0,05) entre o plasma de diabéticos e não diabéticos incubados a 56°C.

Como demonstrado, o MTT pode ser reduzido diretamente pelo plasma em ausência de células. A partir daí, resolveu-se comparar o poder antioxidante do plasma de diabéticos e não diabéticos usando o sal tetrazólio.

- **Oitava pergunta:** Baseado na capacidade antioxidante do plasma seria possível discriminar os diabéticos dos não diabéticos?

Para responder a esta pergunta foi realizada uma cinética com a incubação de 100µl de plasma na presença de MTT em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37 °C por 30, 60 e 120 minutos. As leituras de redução do MTT, nos diferentes tempos de incubação, foram realizadas no espectrofotômetro, onde os valores eram expressos em D.O<sub>570nm</sub> x10<sup>3</sup>. Para análise estatística dos dados foi utilizado o teste “t” de Student.

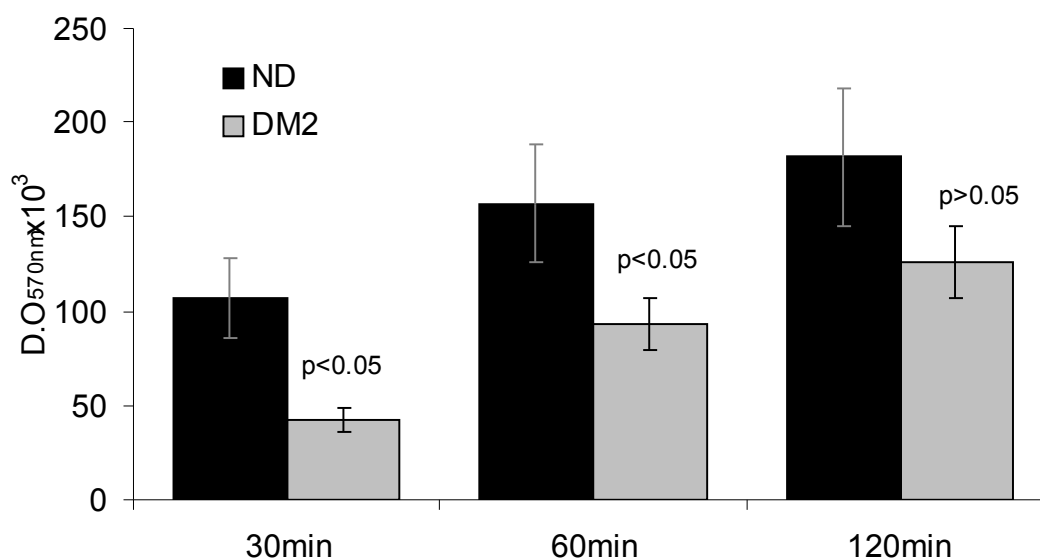
De acordo com os resultados (Tabela 12 e Figura 5), a redução de MTT pelo plasma aumentou significativamente (p<0,05) de forma proporcional ao tempo de incubação em pacientes diabéticos (DM2<sub>30min</sub> = 42±7, DM2<sub>60min</sub> = 93±

9,  $DM2_{120min} = 126 \pm 9$ ,  $p < 0,05$ ) . Já nos indivíduos não diabéticos não existiu diferença significativa entre a incubação de 30 e 60 minutos e nem entre 60 e 120 minutos:  $ND_{30min} = 107 \pm 10$ ,  $ND_{60min} = 157 \pm 27$ ,  $ND_{120min} = 182 \pm 27$  (valores expressos em  $D.O_{570nm} \times 10^3$ ). Quando comparado a redução do plasma do paciente diabético com não diabético, os nossos resultados (figura 5) mostraram que existe uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos tempos de 30 minutos ( $ND_{30min} = 107 \pm 10$ ,  $DM2_{30min} = 42 \pm 7$ ,  $p < 0,05$ ) e 60 minutos ( $ND_{60min} = 157 \pm 27$  e  $DM2_{60min} = 93 \pm 9$ ,  $p < 0,05$ ) avaliados, permitindo discriminar os dois grupos de pacientes. Com base nestes tempos de reação, esta diferença não foi observada no tempo de 2 horas.

**Tabela 12:** Avaliação do tempo de redução do MTT pelo plasma de diabéticos e não diabéticos

Doadores	Tempo de incubação do plasma em $D.O_{570nm} \times 10^3$				
	30min	p	60min	p	120min
ND	$107 \pm 10$	$>0,05$	$157 \pm 27$	$>0,05$	$182 \pm 27$
p	$<0,05$		$<0,05$		$>0,05$
DM2	$42 \pm 7$	$<0,05$	$93 \pm 9$	$<0,05$	$126 \pm 9$

ND= Não diabéticos (n=5), DM2= diabético tipo 2 (n=7),  $D.O_{570nm}$  = densidade óptica em 570 nanômetros, EP = Erro padrão. p é significante quando  $p < 0,05$  pelo teste "T" de Student.



**Figura 5:** Comparação da redução do MTT por plasma de diabéticos e não diabéticos. DM = diabéticos (n=5) e ND = não diabéticos (n=7), D.O.<sub>570nm</sub> = densidade óptica em 570 nanômetros. p é significativo quando p<0,05 pelo teste “T” de Student..

## 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho demonstrou-se que o plasma autólogo é capaz de modular a produção de ROS por granulócitos de pacientes diabéticos tipo 2 e de não diabéticos. Além disso, mostrou-se que o plasma de diabéticos tipo 2 apresenta uma menor atividade redutora ou antioxidante em tempos definidos, e que o principal efector desta função é a albumina.

Segundo vários autores<sup>6,29,36</sup>, o estresse oxidativo é o responsável pelas lesões tissulares no diabetes e pode ser definido como um aumento das espécies oxidantes, ou seus derivados, sem o equivalente aumento da resposta antioxidante.

Os resultados obtidos (Tabela 3, gráfico 1) mostram que a produção de ROS por granulócitos de diabéticos foi significativamente maior do que a observada em células de doadores não diabéticos. Estes dados estão de acordo com os resultados de Mohanty *et al*<sup>40</sup>, que observaram um significativo aumento na produção de ROS por granulócitos e monócitos de doadores não diabéticos que ingeriram doses elevadas de glicose, para simular uma situação de hiperglicemia. Nesta mesma linha, Brownlee<sup>5,6</sup>, em seus trabalhos, aponta a hiperglicemia como responsável por uma série de adaptações metabólicas intracelulares que vão se refletir no aumento da produção mitocondrial de ROS pelas células de diabéticos.

Esta maior produção de ROS, de acordo com Nishikawa *et al*<sup>22</sup>, é um reflexo do aumento dos doadores de elétrons (NADH e FADH<sub>2</sub>) para a cadeia de transporte de elétrons que em consequência altera o potencial da membrana da mitocôndria, resultando em uma maior produção de ROS.

Os dados apresentados na Tabela 3 e Gráfico 1 se referem a produção de ROS por granulócitos em repouso, ou na ausência de estimulação. Se assim considerarmos, podemos sugerir a origem predominantemente mitocondrial desse ROS. Contudo, se considerarmos a hiperglicemia “*in vivo*” como uma “pré-incubação”, pode-se trabalhar com a sugestão de que o ROS produzido pode ser originado através da via NADPH-oxidase, além da mitocondrial. Estas observações podem ser avaliadas pelos dados da tabela 4, gráfico 2.

Estes resultados (Tabela 4, gráfico 2) indicam que a produção de ROS, em granulócitos diabéticos estimulados por PDB, é significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que em não diabéticos. Isto nos permite sugerir que a produção de ROS, via NADPH-oxidase em diabéticos, também é importante no estabelecimento do estresse oxidativo observado nesses pacientes.

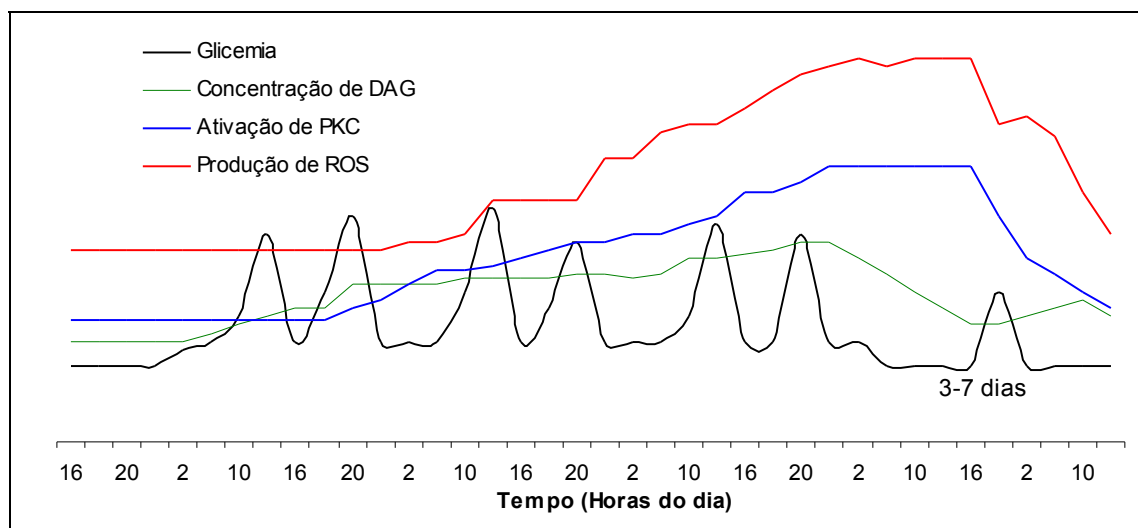
El-Benna *et al*<sup>18</sup>, em seus resultados, demonstraram que as subunidades p47fox, p67fox, p40fox e p22fox da NADPH-oxidase são fosforiladas por vias dependente e independente-PKC em neutrófilos humanos. Com isso, o éster de forbol (ativador de PKC) pode ser utilizado como ativador indireto da NADPH-oxidase em neutrófilos e ocasionando o aumento da produção de ROS.

De acordo com Brownlee<sup>6</sup>, o aumento do ROS mitocondrial pode inibir a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase da via glicolítica e, por consequência, promover o aumento dos níveis de gliceraldeído-3-fosfato, originando uma maior formação de diacilglicerol (DAG) intracelular. Esse é um ativador fisiológico de PKC, o qual ativa a NADPH-Oxidase aumentando a produção de ROS.

Inoguchi *et al*<sup>41</sup> demonstraram, em seus resultados, que a produção de ROS por células expostas a altos níveis de glicose é semelhante ao de células estimuladas com PMA (ativador de PKC). Gallo *et al*<sup>42</sup> demonstraram que a hiperglicemia aguda é capaz de induzir a translocação da PKC para a membrana celular, somente em células que foram previamente expostas a uma hiperglicemia crônica. No presente trabalho, foi possível observar um significativo aumento ( $P < 0,05$ ) da produção de ROS por granulócitos de diabéticos estimulados com PDB (ativador de PKC). Isto pode ser reflexo da hiperglicemia crônica "*in vivo*", responsável por uma maior concentração de DAG intracelular, resultando numa maior translocação da PKC para a membrana e, conferindo, com isso, uma maior sensibilidade à estimulação da PKC nos granulócitos de diabéticos.

A comparação dos resultados presentes na Tabela 3 (granulócitos sem estímulo com PDB) e na Tabela 4 (granulócitos estimulados com PDB) demonstram que a diferença na produção de ROS, entre granulócitos de

diabéticos e não diabéticos, fica maior na presença de PDB. Isto também permite sugerir que o estímulo com PDB atue na amplificação da produção de ROS em diabéticos e não diabéticos em proporções diferentes, em razão das adaptações metabólicas sofridas “*in vivo*” devido a hiperglicemia crônica. Segundo Koya *et al*<sup>7</sup>, o pico hiperglicêmico pode induzir ao aumento do DAG intracelular que se mantém pelo período de 3 a 7 dias. Com este conjunto de informações sobre o processo de sinalização no diabetes, e para melhor visualizar as possíveis interrelações entre a hiperglicemia, DAG, PKC e ROS, elaborou-se o esquema 6:



**Esquema 6:** Efeito da hiperglicemia no diabetes. A hiperglicemia crônica e/ou os picos glicêmicos durante o dia-a-dia do diabético são responsáveis por alterações em vias metabólicas, que resultam no aumento da concentração de diacilglicerol (DAG) intracelular. Isto acarreta uma maior ativação de PKC e conseqüentemente um aumento da sua translocação para a membrana. O que resulta em uma maior sensibilidade a estimulação da PKC e numa maior produção de ROS por pacientes diabéticos. Podendo este efeito demorar de 3 a 7 dias para ser revertido por um bom controle glicêmico.

Este aumento da produção de ROS em diabéticos, observado, tanto nas células sem estímulo, como com estímulo do PDB, demonstram a importância da mitocôndria e do sistema NADPH-oxidase no desenvolvimento do estresse



oxidativo no diabetes. Como o estresse oxidativo é o resultado do balanço entre a resposta oxidante e antioxidante, resolveu-se avaliar o efeito do plasma. Isto poderia refletir melhor o comportamento celular “*in vivo*”. Neste contexto, a nossa primeira abordagem foi avaliar a capacidade neutralizadora ou moduladora da produção de ROS pelo plasma.

Os resultados da tabela 6, figura 1, gráfico 3 e 4 demonstraram que o plasma, tanto de diabéticos, como de não diabéticos, foram capazes de modular a produção de ROS por granulócitos estimulados com PDB. Isto pode sugerir que o plasma possa ser uma importante ferramenta do organismo no combate ao estresse oxidativo. Se esta idéia tiver suporte, será possível identificar, um ou mais, efetores deste efeito plasmático.

Kouoh *et al*<sup>34</sup> sugerem a existência de um baixo nível de enzimas antioxidantes como catalase, glutationala peroxidase e superóxido dismutase no plasma sanguíneo em comparação com o meio intracelular.

De acordo com Halliwell *et al*<sup>22</sup>, das substâncias presentes na fase aquosa do plasma, podem ser consideradas como importantes antioxidantes a ceruloplasmina, albumina, ácido ascórbico, transferrina, haptoglobina e a hemopexina. Sendo que a atividade destas substâncias vai se refletir na neutralização de ROS.

Em seu trabalho, Frei *et al*<sup>30</sup>, demonstraram que o plasma, através do ácido ascórbico e do ácido úrico endógeno, reduzem a oxidação do éster de colesterol, triglicerídeos e fosfolipídeos, causados pelo ROS produzido por granulócitos estimulados com PMA (éster de forbol). A partir disso, eles sugerem uma dieta suplementar de ácido ascórbico para prevenção da peroxidação lipídica.

Sendo assim, os nossos resultados, referentes à modulação exercida pelo plasma na produção de ROS por granulócitos, vai de acordo com outros

trabalhos presentes na literatura<sup>30,32</sup>, podendo esta propriedade do plasma ser um reflexo das várias substâncias com capacidade antioxidante presentes em sua constituição. Conseqüentemente, em relação à produção de ROS em nosso organismo, o plasma de diabético vão apresentar uma dicotomia funcional, uma vez que devido à hiperglicemia ele pode interferir na sinalização intracelular ativando a produção de ROS e, ao mesmo tempo, neutralizando-o no nível extracelular ou modulando vias metabólicas.

Os resultados obtidos na pesquisa, (tabela 6, figura 1, gráfico 3 e 4) mostram claramente que o plasma autólogo tem um efeito modulador na produção de ROS. A partir daí, resolveu-se identificar qual seria o principal efector desta modulação. Assim, testou-se comparativamente, e simultaneamente, o efeito do albumina bovina sérica (BSA) e do plasma na capacidade de reduzir um substrato. Neste caso, usou-se o 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) que, ao ser reduzido, muda de cor, de amarelo para azul-castanho, e com isso facilitando a quantificação da atividade antioxidante do plasma ou da albumina por uma técnica direta usando a espectrofotometria.

Os resultados presentes na Tabela 7 e 9 e figura 2 demonstraram uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) do MTT pelas diferentes quantidades de BSA e de plasma tanto de diabéticos como de não diabéticos.

Vários autores<sup>43,44,45</sup> na literatura descrevem o MTT como uma técnica usada para experimentos de proliferação celular, citotoxicidade, avaliação enzimática e procedimentos histoquímicos. Sua redução pode ocorrer através de enzimas dependentes de nucleotídeos pirimidina (NADH e NADPH), através da succinato desidrogenase e, até mesmo, pela ação da l-cisteína e do ácido ascórbico, que são capazes de reduzir o WST-1, um sal tetrazolium

semelhante ao MTT. Contudo, o efeito sobre o WST-1 ainda não foi descrito para MTT.

Já Kouoh *et al*<sup>34</sup> demonstraram que a albumina é capaz de inibir em até 50% a produção de superóxido por neutrófilos estimulados com PMA (ativador de PKC). Sugerindo que esta propriedade em neutralizar ROS se deve aos grupos amina e sulfidrilas presentes em sua estrutura. Com isso, eles propõem o uso da albumina na proteção de tecidos e biomoléculas em situações de estresse oxidativo.

Sendo assim, nossos resultados demonstram que a técnica colorimétrica do MTT pode ser utilizada para avaliar a capacidade antioxidante tanto do plasma como da albumina. Os resultados da Tabela 9 que comparam a redução do MTT pela albumina pura e do plasma, com concentrações semelhantes de albumina, permite sugerir que a albumina é um importante efector do poder antioxidante do plasma.

Os resultados da tabela 10 demonstram que a albumina representa de 31 a 57% da capacidade antioxidante total do plasma. Isto permite sugerir que outros efetores antioxidantes como o ácido ascórbico e o ácido úrico podem estar participando da redução do MTT pelo plasma. Estes dados estão de acordo com a literatura, que sugere a participação do ácido ascórbico e o ácido úrico na capacidade antioxidante do plasma.

Trabalhou-se com o plasma isento de plaquetas, para excluir ou confirmar sua participação na redução do MTT. Uma vez que, vários trabalhos<sup>46,47,48</sup> na literatura demonstraram a participação de diferentes cinases como PI-3K kinase e PKC e fontes como NADPH-Oxidase, mitocôndria, ciclooxigenase-1 e xantina oxidase na produção de ROS pelas plaquetas.

Os resultados presentes na Tabela 8 e Figura 3 não demonstraram diferença na redução do MTT pelo plasma rico ou isento de plaquetas tanto em

diabéticos como em não diabéticos. Isto indica que, a redução do MTT pelo plasma, é um reflexo da sua capacidade antioxidante devido a seus efetores solúveis, uma vez que as plaquetas não interferem na redução do MTT. E como se pode perceber através dos resultados na Tabela 11 e Figura 4, estes efetores solúveis não foram afetados pela temperatura a 37°C e 56°C, o que sugere serem termoestáveis, nestas condições (56°C).

Confirmando a técnica de redução do MTT como ferramenta para a avaliação da capacidade antioxidante do plasma, resolvemos comparar plasma de diabéticos e não diabéticos.

Os resultados da Tabela 12 e Figura 5 demonstraram uma capacidade antioxidante do plasma de não diabéticos significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nos períodos 30 e 60 minutos de incubação com MTT. Já com 120 minutos de incubação essa diferença não se mostrou significativa ( $p > 0,05$ ).

Stefano *et al*<sup>55</sup> demonstraram que o plasma de diabéticos tipo 1, sobretudo em mulheres diabéticas, apresenta uma menor capacidade antioxidante.

Marra *et al*<sup>56</sup> sugerem que as baixas taxas de ácido úrico em diabéticos tipo 1 e, preferencialmente nas mulheres diabéticas, possivelmente devido a problemas renais associados, são responsáveis pela menor capacidade antioxidante no plasma desses pacientes.

Em seu trabalho, Frei *et al*<sup>60</sup> demonstraram que em situações de estresse oxidativo, o ácido ascórbico é totalmente consumido em menos de 15 minutos e, boa parte do ácido úrico e grupos sulfidrilicos, são consumidos em aproximadamente 30 minutos.

Os nossos resultados (Tabela 12 e figura 5) mostram que existe uma diferença na capacidade antioxidante entre o plasma de diabéticos tipo 2 e não

diabéticos usando a técnica de redução do sal tetrazólio (MTT). Estes dados podem ser um reflexo da diferença quantitativa de antioxidantes no plasma de diabéticos e não diabéticos. Essa diferença é mais evidenciada nos períodos de 30 e 60 minutos de incubação. Podendo isso ser em razão do consumo total ou parcial de alguns efetores antioxidantes, como previamente sugerido por Frei *et al*<sup>30</sup>, ou ainda, pela afinidade dos efetores do sistema antioxidante.

Existem várias técnicas para avaliar o poder antioxidante do plasma. Dentre elas se destacam o ORAC, TRAP e FRAP<sup>35,49</sup> que são complexas e de alto custo. No presente trabalho propõe-se para a medida do poder antioxidante do plasma a redução do MTT. Trata-se de uma técnica simples, rápida e de baixo custo com significativa vantagem sobre os demais. No modelo parece que o poder antioxidante da albumina é responsável por 31 a 57% (Tabela 10) da redução do sal tetrazólio pelo plasma e possivelmente o restante seja devido a outros efetores.

Os resultados mostram, em diabéticos, uma maior produção de ROS por granulócitos e uma menor capacidade antioxidante do plasma. Estes dados permitem sugerir que o estresse oxidativo observado em diabéticos, e tido como responsável direto pelas complicações nesses pacientes, é devido ao desequilíbrio redox no organismo. Os nossos dados em conjunção com a literatura reforçam a idéia da terapia antioxidante e o controle glicêmico como importantes ferramentas para prevenção ou modulação das lesões vasculares no diabetes.

Além disso, pode-se sugerir que a avaliação do perfil oxidativo do paciente diabético deve envolver a avaliação da produção de espécies oxidantes simultaneamente à determinação da capacidade antioxidante intra e extracelular.

## **6. CONCLUSÕES**

No presente trabalho foi possível demonstrar por meio dos nossos resultados que:

- Os granulócitos de diabéticos tipo 2 apresentam uma maior produção de ROS, tanto mitocondrial, como via NADPH-Oxidase, em comparação aos não diabéticos;

- O plasma autólogo é capaz de modular a produção de ROS por granulócitos estimulados com PDB em diabéticos e em não diabéticos.
- A albumina é um importante antioxidante e correspondendo com 30 a 57% da capacidade antioxidante total do plasma;
- O plasma de diabéticos tipo 2 apresenta uma menor capacidade antioxidante em comparação aos não diabéticos;
- Através da redução do MTT, propou-se uma técnica simples para avaliação do poder antioxidante do plasma.

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que: a maior produção de ROS e a menor capacidade antioxidante do plasma em modular estas produção em diabéticos tipo 2 são responsáveis pelo estresse oxidativo observado nesses pacientes. Podendo a capacidade antioxidante do plasma ser avaliada pela redução do sal tetrazólio.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Wild S.; Roglic G.; Green A.; Sicree R.; King H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care** 27:1047-1053, 2004.

2. Carvalheira J.B.C.; Zecchin H.G.; Saad M.J.A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, Aug. 2002, vol.46, no. 4, p.419-425.
3. Epstein M.; Sowers J.R. Diabetes mellitus and hypertension. **Hypertension**. 1992 May;19(5):403-18.
4. Colditz G.A.; Willett W.C.; Rotnitzky A.; Manson J.E. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. **Ann Intern Med**. 1995 Apr 1;122(7):481-6.
5. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.
6. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**. 2005 Jun;54(6):1615-25.
7. Koya D.; King G.L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes**. 1998 Jun;47(6):859-66.
8. Wilson D.K.; Bohren K.M.; Gabbay K.H.; Quioco F.A. An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. **Science**. 1992 Jul 3;257(5066):81-4.
9. Williamson J.R.; Chang K.; Frangos M.; Hasan K.S.; Ido Y.; Kawamura T.; Nyengaard J.R.; Van den Enden M.; Kilo C.; Tilton R.G.; Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. **Diabetes**. 1993 Jun;42(6):801-13.
10. Lee A.Y.; Chung S.S. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. **FASEB J**. 1999 Jan;13(1):23-30.
11. Degenhardt T.P.; Thorpe S.R.; Baynes J.W. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**. 1998 Nov;44(7):1139-45.



12. Tanaka S.; Avigad G.; Brodsky B.; Eikenberry E.F. Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. **J Mol Biol.** 1988 Sep 20;203(2):495-505.
13. Yan S.D.; Schmidt A.M.; Anderson G.M.; Zhang J.; Brett J.; Zou Y.S.; Pinsky D.; Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. **Biol Chem.** 1994 Apr 1;269(13):9889-97.
14. Hammes H.P.; Martin S.; Federlin K.; Geisen K.; Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1991 Dec 15;88(24):11555-8. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 1992 Oct 1;89(19):9364.
15. Frank R.N. Potential new medical therapies for diabetic retinopathy: protein kinase C inhibitors. **Am J Ophthalmol.** 2002 May;133(5):693-8.
16. Koya D.; King G.L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes.** 1998 Jun;47(6):859-66.
17. Drogue W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.** 2002 Jan;82(1):47-95.
18. El-Benna J.; Dang P.M.; Gougerot-Pocidallo M.A.; Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz).** 2005 May-Jun;53(3):199-206.
19. Di Meo S.; Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. **Biol Signals Recept.** 2001 Jan-Apr;10(1-2):125-40.
20. Li Y.; Trush M.A.; Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. **Biochem Biophys Res Commun.** 1998 Dec 18;253(2):295-9.

21. Urso M.L.; Clarkson P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**. 2003 Jul 15;189(1-2):41-54.
22. Nishikawa T.; Edelstein D.; Du X.L.; Yamagishi S.; Matsumura T.; Kaneda Y.; Yorek M.A.; Beebe D.; Oates P.J.; Hammes H.P.; Giardino I.; Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**. 2000 Apr 13;404(6779):787-90.
23. Korshunov S.S.; Skulachev V.P.; Starkov A.A.; High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. **FEBS Lett**. 1997 Oct 13;416(1):15-8.
24. Chen Q.; Vazquez E.J.; Moghaddas S.; Hoppel C.L.; Lesnfsky E.J. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. **J Biol Chem**. 2003 Sep 19;278(38):36027-31. Epub 2003 Jul 2.
25. Roos D.; de Boer M.; Kuribayashi F.; Meischl C.; Weening R.S.; Segal A.W.; Ahlin A.; Nemet K.; Hossle J.P.; Bernatowska-Matuszkiewicz E.; Middleton-Price H. Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. **Blood**. 1996 Mar 1;87(5):1663-81.
26. Leusen J. H. W.; Verhoeven, A. J.; Roos. D. Interactions between the components of the human nadph oxidase: a review about the intrigues in phox famoly. **Frontiers in Bioscience** 1, d72-90 july 1 1996.
27. Schaan B.D. O Papel da Proteína Quinase C no Desenvolvimento das Complicações Vasculares do Diabetes Mellitus. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. 2004 Dec;47(6):654-662.
28. Kitada M.; Koya D.; Sugimoto T.; Isono M.; Araki S.; Kashiwagi A.; Haneda M. Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein

- kinase C-beta activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. **Diabetes**. 2003 Oct;52(10):2603-14.
29. Giugliano D.; Ceriello A.; Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care**. 1996 Mar;19(3):257-67.
  30. Frei B.; Stocker R.; Ames B.N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1988 Dec;85(24):9748-52.
  31. Aruoma O.I.; Halliwell B. Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. **Biochem J**. 1987 Dec 15;248(3):973-6.
  32. Halliwell B.; Gutteridge J.M.; The antioxidants of human extracellular fluids. **Arch Biochem Biophys**. 1990 Jul;280(1):1-8.
  33. Stocker R.; Glazer A.N.; Ames B.N. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1987 Aug;84(16):5918-22.
  34. Kouoh F.; Gressier B.; Luyckx M.; Brunet C.; Dine T.; Cazin M.; Cazin J.C. Antioxidant properties of albumin: effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes. **Farmacol**. 1999 Oct 30;54(10):695-9.
  35. Santini S.A.; Marra G.; Giardina B.; Cotroneo P.; Mordente A.; Martorana G.E.; Manto A.; Ghirlanda G. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. **Diabetes**. 1997 Nov;46(11):1853-8.
  36. Marra G.; Cotroneo P.; Pitocco D.; Manto A.; Di Leo M.A.; Ruotolo V.; Caputo S.; Giardina B.; Ghirlanda G.; Santini S.A. Early increase of oxidative stress and reduced antioxidant defenses in patients with uncomplicated type 1. Diabetes: a case for gender difference. **Diabetes Care**. 2002 Feb;25(2):370-5.

37. Lima, A. O.; Silva, W. D. **Imunologia, Imunopatologia alérgica; Métodos**. 1º edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1970. 673p.
38. Bicalho H.M.; Gontijo C.M.; Nogueira-Machado J.A. A simple technique for simultaneous human leukocytes separation. **J Immunol Methods**. 1981;40(1):115-6.
39. Gomez R.S.; Da Costa J.E.; Lorentz T.M.; Garrocho Ade A.; Nogueira-Machado J.A. Chemoluminescence generation and MTT dye reduction by polymorphonuclear leukocytes from periodontal disease patients. **J Periodontal Res**. 1994 Mar;29(2):109-12.
40. Mohanty P.; Hamouda W.; Garg R.; Aljada A.; Ghanim H.; Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. **J Clin Endocrinol Metab**. 2000 Aug;85(8):2970-3.
41. Inoguchi T.; Li P.; Umeda F.; Yu H.Y.; Kakimoto M.; Imamura M.; Aoki T.; Etoh T.; Hashimoto T.; Naruse M.; Sano H.; Utsumi H.; Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. **Diabetes**. 2000 Nov;49(11):1939-45.
42. Gallo A.; Ceolotto G.; Pinton P.; Iori E.; Murphy E.; Rutter G.A.; Rizzuto R.; Semplicini A.; Avogaro A. Metformin prevents glucose-induced protein kinase C-beta2 activation in human umbilical vein endothelial cells through an antioxidant mechanism. **Diabetes**. 2005 Apr;54(4):1123-31.
43. Stoward P. J.; Pearse A. G. E. **Histochemistry, theoretical and applied**, p. 1-25 (Churchil livingstone, Edinburgh).
44. Berridge M.V.; Tan A.S.; Hilton C.J. Cyclic adenosine monophosphate promotes cell survival and retards apoptosis in a factor-dependent bone marrow-derived cell line. **Exp Hematol**. 1993 Feb;21(2):269-76.

45. Berridge M.V.; Tan A.S.; McCoy K.D.; Wang R. The biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**. N°4 (1996).
46. Wachowicz B.;Olas B.; Zbikowska H.M.; Buczynski A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. **Platelets**. 2002 May;13(3):175-82.
47. Taille C.; El-Benna J.; Lanone S.; Boczkowski J.; Motterlini R. Mitochondrial respiratory chain and NAD(P)H oxidase are targets for the antiproliferative effect of carbon monoxide in human airway smooth muscle. **J Biol Chem**. 2005 Jul 8;280(27):25350-60. Epub 2005 Apr 29.
48. Krotz F.; Sohn H.Y.; Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2004 Nov;24(11):1988-96.
49. Cao G.; Prior R.L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clin Chem**. 1998 Jun;44(6 Pt 1):1309-15.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)