UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA NOS NÍVEIS DE DANO NO DNA E NA EXPRESSÃO DE GENES DE DEFESA AO DANO OXIDATIVO EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2

Danilo Jordão Xavier

Orientadora: Elza Tiemi Sakamoto-Hojo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre, pelo curso de Pós-Graduação em Genética.

Ribeirão Preto
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

XAVIER, Danilo Jordão

Influência da Hiperglicemia nos níveis de dano no DNA e na expressão de genes de defesa ao Dano Oxidativo em Pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2. Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.

60 p.: il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP – Área de concentração: Genética.

Orientadora: Hojo, Elza Tiemi Sakamoto.

1. Diabetes Mellitus ; 2. Estresse oxidativo; 3. Dano no DNA; 4. Hiperglicemia

Apoio e suporte financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc nº 04/15611-6, 06/1947-8);

-Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;

-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior – CAPES;

-Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA – FMRP/USP;

-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP);

-Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP);

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, **Profª Drª Elza Tiemi Sakamoto Hojo,** por ter me recebido tão bem em seu laboratório. Pela sua dedicação, amizade, preocupação e principalmente pela paciência. Só tenho o que agradecer Tiemi. Obrigado!

À **Profª Drª Catarina Satie Takahashi** pela amizade e por toda sabedoria. Aprendi muito ouvindo suas palavras, professora. As festinhas também sempre foram ótimas!

À **Profª Drª Nilce Maria Martinez Rossi**, chefe do Departamento de Genética da FMRP/USP, e ao **Prof. Dr. Moacyr Antonio Mestriner**, ex-chefe do departamento.

Ao **Prof Dr Ademilson Espencer E. Soares,** coordenador do curso de Pós-graduação do departamento de Genética da FMRP-USP, e à **Profª Drª Lucia Regina Martelli**, ex-coordenadora; sempre atentos e preocupados com os pós-graduandos. Muio obrigado pela ajuda, professor Espencer!

Às funcionárias do departamento, **Susie A. Nalon, Maria A. Elias, Cleusa Mazzucatto** (ex-secretária) e **Silvia H. Costa** por toda ajuda e atenção.

Ao **Prof Dr Milton César Foss,** por toda a ajuda, disponibilidade e por permitir a coleta de amostras dos pacientes diabéticos no Ambulatório de Endocrinologia do HC-FMRP/USP; o qual está sob sua responsabilidade.

À **Drª Maria Cristina Foss-Freitas**, por toda a ajuda durante este período, sempre disposta a ajudar. Obrigado por toda a orientação com relação aos pacientes, sem falar na coleta de amostras. Com certeza, foi sempre um exemplo profissional para mim. Muito obrigado, Cris.

À **Roberta Antunes,** por toda ajuda na coleta de amostras dos pacientes internados. Muito obrigado e desculpe pelo trabalho.

À **Silvia**, funcionária do postinho da rua Cuiabá, por toda simpatia e disponibilidade na coleta de amostras.

Aos **professores** membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição com críticas e sugestões.

Aos técnicos deste laboratório, **Luiz Augusto da Costa Junior** e **Sueli Aparecida Neves**, por todos os ensinamentos e ajuda durante todo este tempo, além dos ótimos momentos de diversão.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Mutagênese Ambiental: **Aline, Ana Claudia**, **Ana Paula, Cristiano, Daily, Paulo Godoy**, **Danillo Espósito**, **Giovana, Flávia, Gustavo, Igor, Juliana, os dois Leonardos, Patrícia, Raquel e Vinícius.** Obrigado por todos os bons momentos que passei com vocês.

Aos colegas que passaram pelo Bloco G: **Ana Lúcia, Carla, Cássia, Maria Clara, Marjori, Cleide, Douglas, Gilmara, Gustavo, Luciana, Mônica, Marcelo e Maria Sol.**

Aos amigos do laboratório de bioinformática, também do bloco G: **Breve, Daniel, Gabi, Saulo, Renato e Luciano**.

À **Adriana**, por zelar tão bem pela limpeza do laboratório.

Aos meus pais, **Kleber e Rosa,** por todo esforço e dedicação que sempre tiveram por mim. Passamos por muitas coisas nos últimos anos, mas tenho certeza que só crescemos com isso! Por todo amor incondicional que vocês têm por mim e pela Brunna.

À minha irmã, **Brunna**, por todo amor e preocupação que temos um pelo outrp. Te amo, mana!

À **Carmen**, por toda nossa história, por todo amor que sinto por você, pela felicidade simples e sincera que sinto ao ouvir sua voz e partilhar de sua companhia... por tudo que você sempre significou para mim.

Aos meus grandes amigos da faculdade: **Danillo (Bollor), Paulo (Cop), Douglas (Biscuit), Vítor (Trava), Fernando (Chato), Micheli (Tia), Igor (Primata), Ricardo (Kaba), Ricardo (Baba)** e **Stephano (Meninão).** Tive o imenso prazer de ter convivido com vocês todos esses anos!

Aos meus grandes amigos que me acompanham desde o colegial: **Mateus** (Max), **Nilton** (Bigfoot) e os novos agregados, **Rodrigo** e **Ricardo**. Já disse e repito... Pode na ser fácil fazer amigos, mas amigos de verdade, com certeza não é.... por isso, vocês são muito importantes para mim!

Um agradecimento especial ao **Paulo (cop)** e a **Raquel**. Muito obrigado pela ajuda de vocês nos últimos momentos de conclusão da dissertação. A ajuda de amigos nessas horas realmente faz a diferença. E também a todos que estavam a postos, prontos para ajudar. Obrigado!

A todas as pessoas que não só me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, mas que também contribuíram para minha formação. Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....i
ABSTRACT.....iii
1. INTRODUÇÃO.....1
1.1 Diabetes Mellitus.....1
1.2 Estresse oxidativo e Diabetes.....4
1.3 ROS e sua ação no DNA.....4
1.4 Hiperglicemia e ROS.....6
1.5 Sistemas de defesa celular contra ROS.....8
2. OBJETIVOS.....12
2.1 Objetivos gerais.....12
2.2 Objetivos específicos.....12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....13
3.1 Grupos de Amostras.....13
3.2 Ensaio do Cometa.....14
3.3 Ensaio do Cometa (com a utilização da enzima hOGG1).....18
3.4 Extração de RNA.....19
3.5 Transcrição Reversa para realização da qPCR (RT-PCR).....19
3.6 PCR em tempo real (qPCR).....20
3.7 Forma de análise dos Resultados.....20
3.7.1 Ensaio do Cometa.....20
3.7.2 PCR em tempo real.....21
4. RESULTADOS.....23
4.1 Caracterização geral da amostra de pacientes DM2 e controles estudados.....23
4.2 Avaliação de danos no DNA pelo Ensaio do Cometa.....23
4.3 Expressão gênica por qRT-PCR em tempo real.....28
5. DISCUSSÃO.....33
6. CONCLUSÕES.....47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....48
8. ANEXOS.....53

RESUMO

O Diabetes é uma das maiores causas de mortalidade no mundo, chegando a afetar cerca de 150 milhões de pessoas atualmente, sendo que esse número tende a aumentar, principalmente devido à obesidade, fator intimamente relacionado ao Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Entretanto, o desenvolvimento da doença depende de diversos fatores de risco, tanto genéticos quanto ambientais, que ainda necessitam ser elucidados. Uma característica marcante dos pacientes diabéticos é um alto nível de estresse oxidativo, resultante principalmente da hiperglicemia e diminuição da defesa anti-oxidante.

No presente trabalho, foi proposta a detecção dos níveis de dano no DNA pelo ensaio do cometa, assim como comparar os níveis de expressão de genes relacionados com a defesa, sinalização e reparo do DNA em resposta ao estresse oxidativo (*ATM*, *ATR*, *SOD1*, *OGG1*, *XRCC1*, *APEX1* e *FEN1*) em pacientes DM2 hiperglicêmicos (PAH) e não hiperglicêmicos (PANH). Adicionalmente, o mesmo estudo foi realizado em pacientes DM2, cujas amostras foram coletadas em dois momentos: antes (PI) e após (PPI) um período de internação (sete dias) para compensação da doença e normalização dos níveis glicêmicos, comparativamente ao grupo controle.

Na análise pelo ensaio do Cometa, o grupo PAH apresentou níveis significativamente ($p<0,05$) maiores de danos no DNA em relação ao grupo PANH, sendo que o último apresentou níveis de dano semelhantes ao grupo controle, demonstrando que a hiperglicemia é o principal fator na indução do estresse oxidativo em pacientes DM2. Com relação aos pacientes submetidos à internação por 7 dias, o grupo PPI apresentou níveis significativamente ($p<0,05$) menores de dano em relação ao grupo PI, embora estes tenham se apresentado acima dos observados para o grupo controle.

A análise por qRT-PCR revelou perfis de expressão gênica diferenciados entre os grupos de pacientes estudados, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas. Observou-se uma repressão de genes de reparo e de sinalização (*ATM*, *ATR*, *OGG1*, *XRCC1*, *FEN1* e *APEX1*) nos grupos PAH e PI, que apresentaram altos níveis de danos no DNA. Esse resultado pode apresentar um significado biológico relevante, sendo que na literatura, foram relatados resultados compatíveis com o estado de repressão transcricional de alguns desses genes, como os genes *ATM* e *ATR*.

Os resultados obtidos demonstram a influência da hiperglicemia na indução de dano oxidativo no DNA. Além disso, os dados acerca da expressão gênica sugerem que pacientes DM2 regulam diferencialmente genes envolvidos com os processos de defesa, sinalização e reparo do DNA em resposta ao estresse oxidativo, o que pode estar relacionado com os níveis de dano observados em cada grupo analisado. Os mecanismos envolvidos na regulação desses processos são complexos e ainda necessitam ser elucidados, mas os dados do presente trabalho mostram informações relevantes que podem contribuir na compreensão desses mecanismos.

ABSTRACT

Diabetes is one of major causes of death in worldwide, resulting actually in approximately 150 million death per year, and it is becoming increasingly prevalent mostly due to obesity and overweight , that is associated related to Diabetes Mellitus type 2 (DM2). However, the development of DM2 is related to genetic and environmental risk factors which are not completely clarified. One of the most important aspects observed in DM2 patients is the presence of high oxidative stress in consequence of hyperglycemia and depletion of antioxidant defense.

The present study aimed to evaluate DNA damage by the comet assay, as well as to compare expression levels of genes related to oxidative damage defense, signaling and DNA repair in response to oxidative stress (*ATM*, *ATR*, *SOD1*, *OGG1*, *XRCC1*, *APEX1* and *FEN1*) in three different groups: hyperglycemic DM2 patients (PAH) and non hyperglycemic DM2 patients (PANH); DM2 patients prior (PI) and after (PPI) seven days of admission at the hospital, for the recovering of glycemic levels closely to normal levels.

Analysis of DNA damage by the comet assay revealed significantly ($p<0,05$) higher levels of DNA damage in PAH group compared to PANH group, and the last group of non hyperglycemic patients exhibited damage levels similar to the control group, demonstrating that hyperglycemia is the most important factor that results in oxidative stress in DM2 patients. Considering the group of patients treated for 7 days, the PPI group exhibited lower levels of DNA damage when compared to PI group, although these levels remained higher than those observed for the control group.

Gene expression analysis by the qRT-PCR showed different expression levels between groups of patients and controls, although the differences were not found significant by statistical analysis. Interestingly, DNA repair genes (*ATM*, *ATR*, *OGG1*, *XRCC1*, *FEN1* and *APEX1*) were found repressed in those groups (PAH and PI) that exhibited high levels of DNA damage. These results may represent a relevant biological significance, since in light of literature data, it has been reported a down-regulation of *ATM* and *ATR* expression, either at transcription and protein levels.

The present results demonstrated an influence of hyperglycemia in DNA damage induction in DM2 patients. In addition, the data regarding gene expression levels suggested that DM2 patients differentially regulate genes involved in anti-

oxidant defense, signaling and DNA repair in response to oxidative stress. The mechanisms involved in the regulation of these pathways in DM2 patients are still poorly clarified. The present data constitute relevant information towards the understanding of these mechanisms.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Diabetes Mellitus

O envelhecimento é um processo intrínseco aos seres vivos, caracterizado por um decréscimo em várias funções celulares e fisiológicas, afetando o organismo como um todo (Wick *et al.*, 2003; Suji & Sivakami, 2004). Provavelmente, esse declínio em conseqüência do envelhecimento pode estar relacionado à falta de pressões seletivas durante a evolução, já que a seleção natural pode ter atuado em características vantajosas apenas para os primeiros anos reprodutivos. No entanto, essas características seriam deletérias durante o envelhecimento (Nesse & Williams, 1998).

Como conseqüência, há uma resposta menos eficiente do organismo, principalmente ao estresse gerado por dano oxidativo. Assim, o aumento da longevidade em decorrência dos avanços na ciência e tecnologia, tem levado a uma maior incidência de doenças relacionadas ao envelhecimento, como Diabetes e Alzheimer, entre outras (Beckman & Ames, 1998; Suji *et al.*, 2004).

O Diabetes Mellitus é uma doença que afeta cerca de 150 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo uma das maiores causas de mortalidade. Além disso, calcula-se que nos próximos vinte anos o número de afetados chegará a dobrar, principalmente devido ao aumento no número de indivíduos obesos em todo o mundo, fator diretamente relacionado com o Diabetes Mellitus tipo 2 (Formiguera & Canton, 2004; Gorus *et al.*, 2004).

Uma das características mais marcantes da doença é a hiperglicemia. O aumento dos níveis de glicose no sangue pode ocorrer como conseqüência da secreção deficiente da insulina ou da falha em compensar uma maior demanda do hormônio nos tecidos alvo, muitas vezes decorrente da perda de sensibilidade de seu receptor (White, 1997; Taylor, 1999). A insulina é um hormônio secretado pelas células β do pâncreas, sendo responsável pelo controle das reservas de energia do corpo. Assim, regula a captação de glicose pelas células, promove a formação de reservas de glicogênio no fígado e de gordura nas células adiposas (White, 1997; Taylor, 1999). Se a insulina é secretada em níveis insuficientes ou impossibilitada de exercer sua ação, o corpo acaba por não utilizar a glicose disponível no sangue, também deixando de formar reservas com o nível excedente, caracterizando a hiperglicemia.

O Diabetes ocorre em duas formas mais comuns, o Diabetes do tipo 1 (dependente de insulina) e o Diabetes do tipo 2 (não-dependente ou resistente à insulina). O Diabetes do tipo 1 é basicamente uma doença auto-imune, onde as células β produtoras de insulina, localizadas no pâncreas, são destruídas. A doença apresenta duas fases distintas: primeiramente a *insulitis*, que ocorre quando um grupo de leucócitos invade as ilhotas de Langerhans do pâncreas, muitas vezes causando edema; e o Diabetes propriamente dito, condição na qual praticamente todas as células β já estão destruídas, não havendo mais a produção de insulina (Mathis *et al.*, 2001).

Normalmente, o tratamento dos pacientes consiste na injeção de insulina para compensar a deficiência pela falta do hormônio, mas o tratamento é complicado, principalmente devido à falta de controle da secreção, que é feito pelas células β, ajustando com precisão a quantidade de insulina secretada de acordo com as necessidades do corpo. Como conseqüência, freqüentemente os pacientes apresentam quadros de hipoglicemia e hiperglicemia, ambas com sérias conseqüências para o diabético, pois a primeira pode levar ao coma, enquanto que a segunda pode levar à cegueira, falha renal e doenças vasculares (Taylor, 1999; Kruger *et al.*, 2006).

Ainda não se sabe como o processo auto-imune de destruição das células β do pâncreas é desencadeado; no entanto, sabe-se que é mediado principalmente pelos linfócitos T, que de alguma forma são ativados e atuam contra as células β (Tisch & McDevitt, 1996; Redondo & Eisenbarth, 2002). Uma hipótese é que a morte de células β pode fornecer moléculas para as células apresentadoras de antígenos. Posteriormente, estas células são drenadas para os nódulos linfáticos pancreáticos, onde apresentam estas moléculas como antígenos às células T imaturas. Uma pequena porcentagem de células T pode reconhecer o antígeno e se tornar ativada. Assim, como as células T pós-ativadas têm a capacidade de migrar entre os tecidos, ao passarem pelo pâncreas, podem reconhecer o antígeno presente nas células β, iniciando o processo de *insulitis*, que poderá levar à destruição das células β e ao Diabetes (Mathis *et al.*, 2001).

Já o Diabetes do tipo 2 é a forma mais comum de Diabetes, chegando a afetar mais de 90% dos pacientes. A doença é caracterizada principalmente pela resistência à ação da insulina e também pela deficiência na secreção deste

hormônio, apresentando grande relação com envelhecimento, obesidade e sedentarismo (Golay & Ybarra, 2005).

Não se sabe se durante o desenvolvimento da doença ocorre primeiramente a resistência à insulina ou a sua secreção deficiente; no entanto, a resistência à insulina parece ser um fator determinante, principalmente relacionada com a obesidade, já que 60 a 90% de todos os pacientes com Diabetes do tipo 2 são ou foram obesos (Gerich, 1999; Golay *et al.*, 2005; Stumvoll *et al.*, 2005).

A obesidade provoca uma resposta inflamatória crônica localizada no tecido adiposo e caracterizada por uma produção anormal de citocinas, que inclui na sua maior parte, moléculas de resposta ao estresse (Sethi & Hotamisligil, 1999). Estas células adiposas liberam grandes quantidades de TNF-α (*Tumor Necrosis Factor*), que por sua vez atuam no receptor de insulina, inibindo a sua atividade de tirosina quinase, culminando com a resistência à insulina (Sethi *et al.*, 1999; Kohn *et al.*, 2005). Além disso, o excesso de gordura leva a um aumento no número de moléculas de ácidos graxos livres no sangue. Como conseqüência, ocorre uma utilização preferencial de lipídeos como fonte de energia, principalmente pelos músculos, o que impede a utilização da glicose e a síntese de glicogênio, levando à hiperglicemia. Com a resistência do receptor, há um aumento na secreção de insulina para compensar tal efeito, mas essa condição leva gradualmente ao desenvolvimento do Diabetes, devido ao esgotamento das células β do pâncreas (Lam *et al.*, 2003; Golay *et al.*, 2005).

O tratamento do Diabetes tipo 2 visa principalmente à diminuição da hiperglicemia por meio de dois mecanismos principais: aumento da secreção de insulina por parte do pâncreas ou pela diminuição na produção de glicose pelo fígado. Uma das drogas mais utilizadas no tratamento dessa doença é a metformina, mas são utilizados também antagonistas de PPARγ (*peroxisome proliferator-activated receptor-γ*), que atuam aumentando a sensibilidade do receptor de insulina, além da própria insulina, que suprime a produção de glicose e aumenta a sua utilização. No entanto, o tratamento também é complicado, não só pelos efeitos colaterais de alguns dos medicamentos utilizados, como acidose do sangue, hipoglicemia e distúrbios gastro-intestinais, mas também pela heterogeneidade de respostas ao tratamento apresentada pelos pacientes (Moller, 2001).

1.2- Estresse oxidativo e Diabetes

O estresse oxidativo resulta da falta de equilíbrio entre a geração de radicais livres e a eficácia dos mecanismos de defesa anti-oxidante existentes na célula, que podem atuar diretamente nas espécies reativas de oxigênio (ROS), neutralizando os efeitos de sua alta reatividade, ou pela ação de outros mecanismos (Slupphaug *et al.*, 2003; Saha *et al.*, 2005).

As ROS são instáveis e apresentam um ou mais elétrons desemparelhados, o que confere a elas certo grau de reatividade (Valko *et al.*, 2004), podendo apresentar tanto um papel benéfico quanto prejudicial aos seres vivos. Podem também ser usadas para a defesa do organismo contra agentes infecciosos, os quais proliferam em regiões de anóxia e, em pequenas concentrações, como estímulo mitogênico. No entanto, elevadas concentrações de ROS podem danificar gravemente as estruturas celulares (Poli *et al.*, 2004).

As espécies reativas podem causar danos oxidativos a um grande número de moléculas, tais como: carboidratos, proteínas, lipídeos e o DNA. Em condições de desequilíbrio, uma maior produção de radicais livres, as células podem não responder adequadamente quanto à ativação dos mecanismos de defesa antioxidante que compensem este aumento, ficando assim expostas aos efeitos maléficos dos danos oxidativos (Nuttall *et al.*, 1999). Nesse aspecto, a hiperglicemia contribui como um fator de ligação entre o diabetes e o estresse oxidativo.

Apesar de haver outros processos envolvidos, o excesso de glicose é o principal responsável pela grande produção de radicais livres em pacientes diabéticos, sendo que nesses pacientes, os mecanismos de defesa anti-oxidante não são capazes de compensar ou neutralizar a quantidade de radicais formados. Além disso, alguns estudos demonstraram que pacientes com diabetes tipo 2 podem também apresentar uma defesa anti-oxidante deficiente em relação a indivíduos normais, o que acarreta um aumento, não só na geração de ROS, como também na quantidade de danos causados pelos mesmos (Nishikawa *et al.*, 2000; Blasiak *et al.*, 2004). A relação entre hiperglicemia e a geração de ROS será descrita em um dos itens a seguir.

1.3- ROS e sua ação no DNA

O dano oxidativo no DNA é reconhecido como a maior causa de morte celular e mutações em todos os organismos aeróbicos, sendo que as espécies reativas

derivadas do oxigênio representam a classe de radicais mais importante gerada nos seres vivos. Devido a isto, o dano oxidativo no DNA pode ser relacionado com o desenvolvimento do câncer, de doenças degenerativas e com o próprio envelhecimento (Bjelland & Seeberg, 2003; Valko *et al.*, 2004).

O ânion superóxido ($\cdot 2O_2^-$) produzido pela adição de elétrons ao oxigênio durante a respiração ou por outros processos, é considerado como o ROS primário, podendo posteriormente reagir com outras moléculas, formando ROS secundários. Apesar de apresentar um elétron não pareado, o ânion superóxido não é capaz de reagir diretamente com proteínas, lipídeos ou mesmo com o DNA, sendo que a sua ação ocorre indiretamente (Desideri & Falconi, 2003; Valko *et al.*, 2006). Algumas enzimas atuam para eliminar este radical e seus subprodutos da célula: a superóxido desmutase (SOD) catalisa a reação em que o superóxido sofre adição de elétrons formando peróxido de hidrogênio ($\cdot 2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Além da SOD, existem outras enzimas que atuam sobre o peróxido de hidrogênio, como a catalase e a glutationa redutase (Michiels *et al.*, 1994).

A geração de outros radicais está intimamente ligada à presença de algum metal livre no interior da célula. Normalmente, há um controle sobre a quantidade de metais livres no meio celular, que garante que a grande maioria destes esteja ligada em alguma molécula, muitas vezes essencial para a ação das mesmas. No entanto, em situações de estresse, uma grande quantidade de ânion superóxido é produzida, atuando na redução e liberação dos metais de suas respectivas moléculas, como o ferro, por exemplo (Leonard *et al.*, 2004).

Esses metais livres podem então participar da reação de Fenton, atuando como catalisadores na quebra do peróxido de hidrogênio, levando à formação do radical hidroxil ($Fe(II) + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + \cdot\underline{OH} + OH^-$) (Leonard *et al.*, 2004) (Figura 1). Este radical é altamente reativo, tendo uma meia-vida extremamente curta (menos de 1 nanosegundo) e atuação em regiões próximas daquelas onde foi formado (Valko *et al.*, 2006). A formação do radical hidroxil, assim como de outros tipos de ROS próximos ao DNA, pode levar a uma série de danos que incluem mudanças de bases, quebras simples e duplas, assim como *crosslinks*, o que caracteriza as ROS como potentes agentes genotóxicos (Dizdaroglu *et al.*, 2002).

Durante muito tempo, grande parte dos estudos sobre danos e estresse oxidativo no DNA se basearam na formação e processamento das quebras de cadeia. Com o desenvolvimento de novos métodos de investigação, tornou-se

possível também o estudo dos efeitos ao nível de bases do DNA, que provaram ser tão prejudiciais para a sobrevivência celular quanto as quebras no DNA (Bjelland *et al.*, 2003).

Todas as quatro bases podem ser suscetíveis à oxidação, com várias modificações já documentadas (Bjelland *et al.*, 2003). No entanto, as mais estudadas são a 8-oxo-guanina (8-oxoG) e a timina glicol (TG), por serem encontradas de forma abundante em conseqüência do estresse oxidativo e também por sua estabilidade. As formas oxidadas da timina foram as primeiras a serem identificadas no DNA e entre elas, a TG pode trazer várias conseqüências para a estabilidade da célula se não for corretamente retirada do DNA, devido ao fato de que ela pode causar um forte bloqueio na duplicação do DNA e também na transcrição (Hatahet *et al.*, 1994).

A guanina é a base que apresenta o menor potencial de oxidação; no entanto, é a mais facilmente oxidada, o que é ilustrado pela 8-oxoG, que tem sido a base oxidada mais estudada. Como a 8-oxoG não parece provocar um significativo bloqueio na duplicação, a principal conseqüência da 8-oxoG está nas mutações que pode provocar por meio de transversões. A presença de 8-oxoG pode causar erros no pareamento de bases durante a duplicação do DNA. Assim, ao invés da adição de uma citosina, podem ser adicionadas adeninas ou timinas, que se parearão com a 8-oxoG e causarão mutações, gerando por conseqüência, uma instabilidade genômica (Shibutani *et al.*, 1991; Bjelland *et al.*, 2003).

1.4- Hiperglicemia e ROS

O diabetes é uma doença relacionada com um alto nível de estresse oxidativo, resultante principalmente da hiperglicemia, que atua através da glicação e também da atividade diminuída das enzimas anti-oxidantes, como a SOD, a catalase e a glutationa redutase (Seghrouchni *et al.*, 2002).

A glicação não-enzimática (GNE) é uma mudança pós-traducional, sendo que a interação açúcar-proteína (em que o grupo carbonil do açúcar é adicionado ao grupo amino da proteína) resulta na formação de uma glicosamina, que acaba inutilizando a proteína recém traduzida. Depois desta primeira etapa, a glicosamina sofre alguns rearranjos que levam à formação de produtos Amadori, que são mais estáveis (Suji *et al.*, 2004).

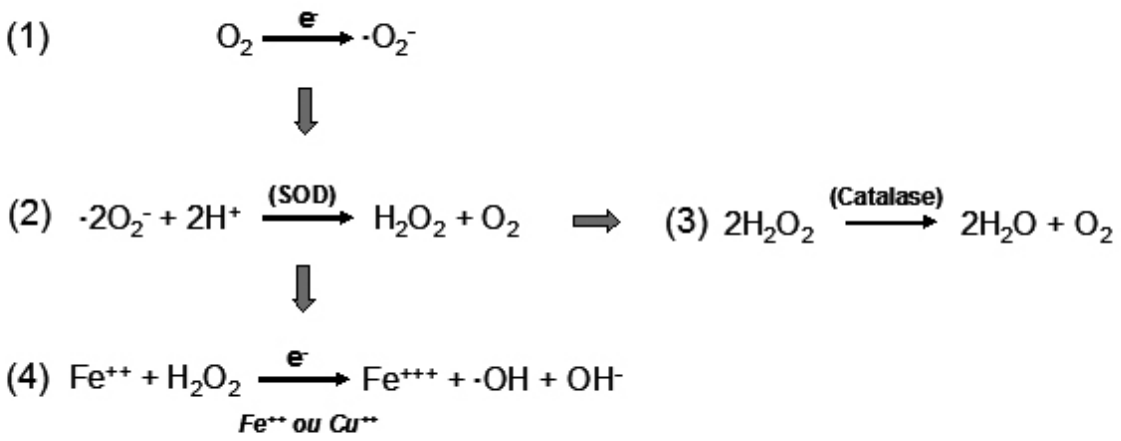

Figura 1: Reações envolvidas na produção de ROS (·OH) através da reação de Fenton. Primeiramente o ânion superóxido é formado pela adição de um elétron em uma molécula de oxigênio (1); a superóxido desmutase irá atuar anulando este radical, com a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é mais estável e menos reativo (2); este peróxido pode sofrer uma outra reação catalisada pela catalase, formando água e oxigênio, anulando a reatividade do peróxido (3); no entanto, na presença de metais livres na célula, pode ocorrer a reação de Fenton, onde o metal doará um elétron ao peróxido, formando o radical hidroxil, altamente reativo (4) (Collins, 1999; Valko *et al.*, 2006).

Os produtos Amadori representam o primeiro estágio da glicação, que ainda pode ser revertido, dependendo da quantidade destes na célula e do tempo que ficam expostos a novas modificações. Se for o caso, tais produtos podem sofrer outras modificações irreversíveis, que incluem a desidratação, oxidação, condensação, etc, as quais resultarão na formação de uma classe heterogênea de compostos chamados de produtos avançados de glicação (AGE: *Advanced Glycation Products*) (Suji *et al.*, 2004). A glicação e a formação de AGEs podem ocorrer até mesmo em níveis normais de glicose e se acumulam com o passar do tempo, pois estas proteínas modificadas podem formar agregados e dificultar a sua eliminação. Assim, os AGEs são considerados como marcadores de

envelhecimento, já que a sua quantidade pode sofrer um aumento de até cinco vezes, desde a infância até a velhice (Squier, 2001).

Muitas das modificações ocorridas durante o processo de formação de AGEs gera uma grande quantidade de radicais livres. Além disso, há evidência de que a glicação forma sítios ativos, sendo que os radicais provenientes das proteínas envolvidas podem desempenhar o papel de catalisadores na formação de ROS, da mesma forma que os metais livres na reação de Fenton (Yim *et al.*, 2001). Ainda, moléculas de monossacarídeos podem também sofrer glico-oxidação, liberando ROS durante o processo (Suji *et al.*, 2004).

Dessa forma, a hiperglicemia característica do diabetes contribui para a formação de uma grande quantidade de ROS, sendo que a ação destes atribuída à influência da hiperglicemia foi comprovada pela presença da 8-oxoG em pacientes com diabetes, em uma freqüência maior do que a de indivíduos normais. A 8-oxoG é uma modificação de base que pode servir como marcador de estresse oxidativo (Collins *et al.*, 1998; Valko *et al.*, 2006).

1.5- Sistemas de defesa celular contra ROS

Conforme já mencionado, ROS pode causar vários danos em praticamente todas as estruturas celulares, como proteínas, lipídeos e DNA. Ainda, esses radicais estão sempre presentes em todos os organismos aeróbicos, já que podem ser produzidos tanto de maneira endógena, durante o metabolismo celular, quanto de maneira exógena, pela ação de inúmeros agentes. Dessa forma, tanto o metabolismo do peroxissomo, como fagócitos, calor, luz ultravioleta, drogas terapêuticas e radiação ionizante podem constituir eficientes fontes de ROS (Bohr, 2002; Valko *et al.*, 2006).

Assim, quando as células são expostas à ação de ROS, deve existir uma série de mecanismos que possam protegê-las de seus efeitos deletérios. De fato, em resposta aos danos oxidativos, a primeira resposta celular é mediada por enzimas anti-oxidantes (SOD, catalase, glutationa e glutationa redutase). Se houver oxidação de alguma base, algumas enzimas que hidrolisam dNTPs oxidados também podem atuar, como a 8-oxoGMP. Ainda assim, se esta última “barreira” for ultrapassada e a base oxidada for incorporada ao DNA, a célula ativará mecanismos responsáveis pelo reparo de DNA, na tentativa de remover os danos no material genético. Esses mecanismos incluem: reparo de excisão de bases (BER, *base excision repair*),

reparo por excisão de nucleotídeos (NER, *nucleotide excision repair*), reparo de bases mal emparelhadas (MMR, *mismatch repair*), além do reparo por recombinação homóloga (HRR) e por união de extremidades não homólogas (NHEJ) (Bjelland *et al.*, 2003; Bassi *et al.*, 2004; Sancar *et al.*, 2004).

O reparo de bases modificadas pelo dano oxidativo ocorre, na maioria das vezes, pelo mecanismo de BER, principal mecanismo na remoção de distorções menores na fita de DNA (Lindahl, 1993). Apesar de ser o responsável pelo reparo da grande maioria de danos sofridos pelo DNA (Krokan *et al.*, 2002), o significado funcional da via BER ainda não está bem estabelecido, pois ainda não foi descrita nenhuma doença relacionada com falhas nesse mecanismo de reparo (Slupphaug *et al.*, 2003).

O processo de reparo pela via BER é iniciado pela perda não enzimática de uma base, ou alternativamente, pela ação de uma DNA glicosilase que irá reconhecer e remover a base modificada, formando um sítio abásico. Este sítio é reconhecido e clivado por uma AP endonuclease (APE1), que introduz uma quebra na região 5' do sítio abásico. Em seguida, a DNA polimerase β catalisa a retirada do açúcar abásico e insere um novo nucleotídeo, com a posterior ação do complexo DNA ligase III-XRCC1 para ligar o novo nucleotídeo inserido na fita de DNA. Essa via também é conhecida como *short-patch* (Bohr, 2002).

Uma via alternativa de BER, também conhecida como *long-patch*, atua principalmente em situações nas quais o açúcar da base modificada é resistente à ação de clivagem da APE1. Esta via envolve a participação do complexo DNA polimerase δ , PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) e FEN-1 (endonuclease flap) que ao se formar na região de quebra pela APE-1, promove a retirada de 2 a 10 nucleotídeos (incluindo a base modificada) a partir da região 3' da quebra, que é reconhecida e clivada pela proteína FEN-1. Posteriormente, ocorre a síntese do mesmo número de nucleotídeos pela polimerase δ ou β, com a ação tanto da DNA ligase I quanto do complexo DNA ligase III-XRCC1, finalizando o reparo (Klungland & Lindahl, 1997; Sukhanova *et al.*, 2005).

Uma vez que o DNA é alvejado por radicais, ~90% das bases oxidadas são reparadas pela via *short-patch*-BER, que é a principal via de reparo por BER para a retirada da 8-oxoG, enquanto que apenas 10% são reparadas pela via *long-patch*-BER (Sancar *et al.*, 2004). Existem pelo menos 12 diferentes DNA glicosilases identificadas, capazes de realizar funções diferentes e com maior afinidade por

diferentes danos de base (Zharkov, 2008). Assim, a DNA glicosilase envolvida de maneira mais específica no reparo da 8-oxoG é a hOGG1, homóloga a MutM em *E.coli*. Além do BER, outras vias de reparo, como NER e MMR, também são responsáveis pelo reparo de dano oxidativo (Slupphaug *et al.*, 2003).

O NER é um sistema de reparo global, que corrige danos ou distorções no DNA, cuja principal função é reparar aductos de bases, como dímeros de pirimidina (Hoeijmakers, 2001). Entretanto, esse sistema também está envolvido no reparo de dano oxidativo, pois indivíduos com a síndrome xeroderma pigmentosum (com sistema defeituoso de reparo por NER) não foram capazes de reparar eficientemente as bases modificadas, em conseqüência do dano oxidativo (Lipinski *et al.*, 1999).

Uma outra via de reparo, MMR, está relacionada ao aumento na fidelidade do DNA durante a duplicação e a recombinação, sendo que algumas evidências apontam que essa via também atua no reparo de bases mal pareadas entre 8-oxoG:A, evitando que uma transversão ocorra no DNA. Nesse caso, ocorre a ação das proteínas hMYH e hMutSα, que atuam na retirada de uma adenina pareada erroneamente, substituindo-a por uma citosina. Posteriormente, pela ação da OGG1 via BER, ocorre a remoção da 8-oxoG do DNA, recuperando a integridade do mesmo (Gu *et al.*, 2002; Mazurek *et al.*, 2002).

Assim, da mesma forma que o dano oxidativo pode atuar de diversas formas, causando variados tipos de dano no DNA, diversas vias de reparo também podem ser ativadas numa ação conjunta para manter a integridade do genoma, caracterizando uma resposta complexa ao estresse oxidativo (Slupphaug *et al.*, 2003).

Conforme já mencionado, o Diabetes é uma doença complexa, relacionada a múltiplos fatores de risco. Apesar de o estilo de vida e da alimentação serem fatores ambientais de muita influência, principalmente no desenvolvimento do DM2, fatores genéticos também parecem estar envolvidos na patogênese da doença. Nesta, havendo um indivíduo com a doença, existe uma chance aumentada (de duas a quatro vezes) de desenvolvimento da doença por outro membro da família (Pierce *et al.*, 1995).

A hiperglicemia pode acarretar a glicação das enzimas antioxidantes, o que causa a inativação destas, diminuindo desta forma a defesa anti-oxidante (Wiernsperger, 2003). Já a resistência à insulina ou a deficiência da secreção desta parece ser relacionada com um sistema de reparo menos eficiente. Merkel *et al.*

(2003) demonstraram que células CHO transfectadas com um plasmídeo contendo o gene humano do receptor de insulina apresentaram um reparo mais eficiente na presença de insulina, principalmente pela modulação da expressão da proteína XPD, participante da via NER. Assim, indivíduos com diabetes, que não produzem ou são insensíveis à insulina, podem apresentar uma instabilidade genômica maior em decorrência de um sistema de reparo menos eficiente.

Provavelmente em decorrência desses fatores, a doença pode estar relacionada ao acúmulo de danos em diferentes tecidos ao longo do tempo, disfunção e falha de diversos órgãos, principalmente olhos, nervos, coração, rins e vasos sanguíneos (Taylor, 1999), sendo que o dano oxidativo tem sido considerado como um dos principais responsáveis pelas complicações apresentadas pelos diabéticos (Wiernsperger, 2003).

Assim, os mecanismos envolvidos na patogênese do Diabetes provavelmente se relacionam ao estresse oxidativo e processos metabólicos, sendo importante investigar os processos implicados na defesa anti-oxidante. São poucos os dados existentes na literatura relacionados aos danos oxidativos no DNA detectados em pacientes DM2 com níveis glicêmicos normais, assim como em pacientes DM2 antes e após o tratamento para a normalização dos níveis glicêmicos. Da mesma forma, não existem muitos relatos da situação do mecanismo de reparo, principalmente o BER em pacientes DM2 hiperglicêmicos e não-hiperglicêmicos, assim como em pacientes DM2 antes e após o tratamento. Conhecer os níveis de expressão de genes importantes nestes pacientes, como são os genes de reparo, pode ter importância no que diz respeito a exposição destes pacientes a uma maior instabilidade genômica, cuja principal conseqüência é a carcinogênese.

2- OBJETIVOS:

2.1- Objetivos gerais:

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a influência do estresse oxidativo nos níveis de danos no DNA e na expressão de genes relacionados à defesa e ao reparo de dano oxidativo, em linfócitos de pacientes com DM2 hiperglicêmicos e não hiperglicêmicos, assim como em pacientes antes e após um período de internação para controle da doença e estabelecimento dos níveis glicêmicos normais, comparados a um grupo controle.

2.2- Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do estresse oxidativo na formação de danos no DNA (pelo ensaio do cometa), com e sem a utilização da enzima hOGG1, capaz de reconhecer dano oxidativo em linfócitos de dois grupos de pacientes DM2: hiperglicêmicos e não hiperglicêmicos, comparativamente ao grupo controle;
- Avaliar o efeito do estresse oxidativo na formação de danos no DNA (pelo ensaio do cometa), com e sem a utilização da enzima hOGG1, capaz de reconhecer dano oxidativo em linfócitos coletados de pacientes DM2 em dois momentos: antes (hiperglicêmicos) e após um período de internação para normalização dos níveis glicêmicos, comparativamente ao grupo controle;
- Comparar os níveis de expressão (pelo método de qRT-PCR em tempo real) de uma série de 7 genes (*ATM*, *ATR*, *SOD1*, *OGG1*, *XRCC1*, *APEX1* e *FEN1*) relacionados com a defesa, percepção e reparo de dano oxidativo, em linfócitos de pacientes DM2 glicêmicos e não hiperglicêmicos, assim como em pacientes DM2 antes e após o período de internação, comparativamente ao grupo controle;
- Correlacionar os diferentes níveis de danos no DNA detectados nos pacientes com DM2 com as possíveis alterações na expressão transcricional de vários genes (analisados por qRT-PCR em tempo real), visando testar a influência da hiperglicemia e do estresse oxidativo na modulação dos níveis transcricionais dos genes analisados.

3- MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1- Grupos de amostras:

No presente estudo, foram coletadas amostras de sangue periférico de 39 pacientes com DM2, diagnosticados de acordo com os critérios da Associação Americana de Diabetes (Bloomgarden, 1997). Os pacientes eram atendidos na enfermaria de Endocrinologia ou no ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP), sendo recrutados com a colaboração do Prof. Dr. Milton César Foss e da Drª Maria Cristina Foss Freitas, ambos do departamento de Clínica Médica (Endocrinologia).

A média de idade destes pacientes foi de 52 anos, sendo 21 indivíduos do sexo feminino e 18 do sexo masculino. As amostras de sangue (20 ml) foram coletadas de pacientes sub-divididos em quatro grupos:

a) PAH (paciente ambulatorial hiperglicêmico), formado por 13 pacientes, coletados no ambulatório de endocrinologia (HC-FMRP/USP), apresentando hiperglicemia (concentração de glicose acima de 140mg/mL de plasma e hemoglobina glicada -Hba1c- acima de 7%). O grupo apresentou média de idade de 53 anos, com 4 indivíduos do sexo masculino e 9 do sexo feminino;

b) PANH (paciente ambulatorial não-hiperglicêmico), composto por 16 pacientes também coletados no ambulatório de Endocrinologia (HC-FMRP/USP), mas com níveis de glicose e hemoglobina glicada semelhantes aos de indivíduos sadios (glicose abaixo de 140mg/mL de plasma e hemoglobina glicada abaixo de 7%), sendo a média de idade de 55 anos, com 10 indivíduos do sexo masculino e 6 do sexo feminino;

c) PI (paciente pré-internação) e PPI (paciente pós-internação): formado por 10 indivíduos, sendo 3 indivíduos do sexo masculino e 7 do sexo feminino, com média de idade de 46 anos. A coleta de amostras destes indivíduos foi realizada em dois momentos: primeiramente quando estes deram entrada na internação, apresentando quadro de hiperglicemia (PI), e após um período de uma semana, para fins de compensação e controle da doença, visando menores níveis glicêmicos (PPI).

Todos os pacientes estavam recebendo tratamento prévio, principalmente com os medicamentos captopril e metformina, além da própria insulina, salvo

algumas exceções. Foram excluídos os pacientes que apresentaram complicações em estado avançado, como retinopatia proliferativa, nefropatia consolidada, assim como insuficiência renal, neuropatia autonômica e doenças cardíacas, as quais poderiam causar um maior estresse oxidativo ao indivíduo, independentemente da presença dos níveis de glicose. Grande parte dos pacientes coletados apresentou hipertensão arterial sistêmica e dislipidemia, comorbidades comuns entre os pacientes DM2. Todos estes indivíduos foram convidados a participar da pesquisa como voluntários, por ocasião da visita periódica ao ambulatório e enfermaria, necessária para o controle da doença.

Como grupo controle, foram coletadas e analisadas amostras de sangue periférico de 16 voluntários sadios, que não apresentaram histórico de exposição às radiações, infecções ou medicamentos, assim como histórico de diabetes na família. O grupo apresentou média de idade de 53 anos, sendo representado por 7 indivíduos do sexo masculino e 9 do sexo feminino. Também foram realizados testes de níveis glicêmicos e de hemoglobina glicada na maioria das amostras de sangue dos indivíduos controles, com a finalidade de assegurar que nenhum deles apresentasse níveis maiores que os normais. Todos os dados referentes à idade, sexo, níveis glicêmicoss, % de hemoglobina glicada, assim como co-morbidades dos indivíduos estudados, estão nas Tabelas 1, 2 e 3.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (processo: HCRP nº 7066/2006) e a participação, tanto de pacientes quanto de controles, ocorreu mediante o consentimento dos mesmos, com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A). As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos Vacutainer (Beckton & Dickinson, EUA) contendo EDTA. Os leucócitos foram separados por centrifugação com Histopaque 1077 (Sigma Chemical Co, USA), sendo que uma parte destes foi submetida à extração de RNA e a outra restante foi utilizada para o Ensaio do cometa.

3.2- Ensaio do Cometa:

Foi adotado o protocolo descrito previamente por Singh *et al.* (1988). Foram adicionados 25 μL de sangue total a um volume de 200 μL de agarose de baixo ponto de fusão a 37°C (0,5%). Essa suspensão celular foi distribuída em uma lâmina previamente preparada com uma camada de agarose de ponto de fusão normal

(1,5%) e coberta com uma lamínula (24 x 60mm), sendo em seguida, incubada a 4ºC por 5 minutos. A lamínula foi retirada e a lâmina então mergulhada em uma solução de lise a 4ºC (NaCl 2,5 M, Na_2EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH=10,0) por pelo menos duas horas.

Após essa etapa, as lâminas foram incubadas com um tampão de corrida com pH alcalino (NaOH 0,3 M e Na_2EDTA 1 mM, pH > 13) a 4º C durante 20 minutos, sendo posteriormente transferidas para uma cuba de eletroforese horizontal contendo o mesmo tampão a 4º C , tendo início uma eletroforese realizada a 25 V (1 V/cm, 300 mA) por mais 20 minutos.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas com tampão de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH=7,5) por 15 minutos, secas à temperatura ambiente e, posteriormente, fixadas em etanol absoluto por 5 minutos. Todas as lâminas foram confeccionadas em duplicata e armazenadas em geladeira até o momento da análise.

Tabela 1: Caracterização geral do grupo controle quanto a idade, sexo, níveis glicêmicos, % de hemoglobina glicada e comorbidades

Indivíduo	idade (anos)	sexo	glicemia (mg/dl)	Hb. Glicosilada (%)	HAS	DLP	retinopatia leve	nefropatia leve
CoDM-1	51	F	NI	NI	-	-	-	-
CoDM-2	53	M	NI	NI	-	-	-	-
CoDM-3	52	M	NI	NI	-	-	-	-
CoDM-4	65	M	NI	NI	-	-	-	-
CoDM-5	52	F	100	5.4	-	-	-	-
CoDM-6	58	M	98	5.5	-	-	-	-
CoDM-7	36	F	106	5.5	-	-	-	-
CoDM-8	62	F	92	5.4	-	-	-	-
CoDM-9	49	F	87	5	-	-	-	-
CoDM-10	58	F	88	5.7	X	-	-	-
CoDM-11	47	F	89	5.6	-	-	-	-
CoDM-12	53	M	88	5.7	-	-	-	-
CoDM-13	51	F	94	5.7	-	-	-	-
CoDM-14	56	M	100	5.4	-	-	-	-
CoDM-15	55	M	95	5.3	-	-	-	-
CoDM-16	48	F	84	5.4	-	-	-	-

* HAS: hipertensão arterial sistêmica; DLP: dislipidemia

Tabela 2: Caracterização geral do grupo de pacientes DM2 internados quanto a idade, sexo, comorbidades, além dos níveis glicêmicos e de % de hemoglobina glicosilada antes (PI) e após (PPI) internação.

Paciente	idade (anos)	sexo	glicemia (mg/dl)	Hb. Glicosilada (%)	HAS	DLP	retinopatia leve	nefropatia leve
PI-1 PPI-1	30	M	161 103	8.6 8.4	X	X	-	-
PI-2 PPI-2	38	M	145 87	8 7.6	-	-	X	-
PI-3 PPI-3	44	F	221 195	6.9 6.9	-	-	-	-
PI-4 PPI-4	45	F	220 77	9.8 8.3	-	X	-	-
PI-5 PPI-5	37	F	350 209	13.2 12.8	X	-	-	-
PI-6 PPI-6	61	M	240 123	10.6 9.3	X	X	-	X
PI-7 PPI-7	33	F	89 79	11.8 10.3	-	-	-	-
PI-8 PPI-8	64	F	183 83	12 12.8	-	X	X	-
PI-9 PPI-9	51	F	162 94	9.7 7.5	X	X	-	-
PI-10 PPI-10	61	F	258 93	8.5 8	-	X	-	-

* HAS: hipertensão arterial sistêmica; DLP: dislipidemia

Tabela 3: Caracterização geral dos grupos de pacientes DM2 hiperglicêmicos (PAH) e não-hiperglicêmicos (PANH) quanto à idade, sexo, níveis glicêmicos, % de hemoglobina glicada e co-morbidades.

Paciente	idade (anos)	sexo	glicemia (mg/dl)	Hb. Glicosilada (%)	HAS	DLP	retinopatia leve	nefropatia leve
PANH-1	60	M	88	5.9	-	-	X	-
PANH-2	58	M	80	6.3	X	X	X	X
PANH-3	47	F	87	5.4	X	-	-	-
PANH-4	69	M	90	6	X	-	-	-
PANH-5	55	F	98	6.9	X	X	-	-
PANH-6	60	M	111	6.6	X	X	-	X
PANH-7	50	F	117	7.1	X	X	-	-
PANH-8	58	M	92	7.1	X	X	X	-
PANH-9	60	M	130	6	X	X	-	-
PANH-10	47	F	87	5.4	X	-	-	-
PANH-11	49	M	120	7.5	X	X		
PANH-12	42	M	63	5.1	X	X	X	X
PANH-13	64	M	118	7	X	X	-	-
PANH-14	47	F	126	7.1	X	X	-	X
PANH-15	53	M	100	6.6	-	-	-	-
PANH-16	61	F	84	7.8	X	X	-	-
PAH-1	54	F	198	11.2	X	X	-	-
PAH-2	42	F	149	10.2	X	X	-	-
PAH-3	40	F	173	10.7	-	-	-	X
PAH-4	66	M	264	11.3	-	-	-	-
PAH-5	51	F	171	10.2	-		-	-
PAH-6	56	F	210	12.3	-	X	X	-
PAH-7	61	F	165	10.2	X	X	-	-
PAH-8	56	M	182	12.4	X	X	-	-
PAH-9	52	F	214	15	-	X	-	-
PAH-10	48	M	162	8.7	X	X	-	-
PAH-11	60	F	319	12	X	X	-	-
PAH-12	50	F	177	8.2	X	X	-	-
PAH-13	56	M	230	12.4	X	X	-	X

* HAS: hipertensão arterial sistêmica; DLP: dislipidemia

3.3- Ensaio do Cometa (com a utilização da enzima hOGG1):

O ensaio do Cometa detecta primordialmente quebras no DNA. No entanto, com a modificação de algumas etapas de seu procedimento, existe a possibilidade de se detectar outros tipos de lesões no DNA, como modificações de bases, principal modificação provocada pelas ROS. Com esta finalidade, as lâminas foram incubadas com uma endonuclease de reparo que permite a expressão de danos específicos de base na forma de quebras de fita simples. Assim, foi utilizada a enzima hOGG1 (8-oxoguanine DNA-glycosylase 1), indicada por sua maior específicidade na detecção do dano oxidativo (Smith *et al.*, 2006). A hOGG1 é uma das glicosilases que compõem o sistema de reparo por excisão de bases (BER), sendo específica para o reparo da base oxidada 8-oxoG (Klungland & Bjelland, 2007). Tendo início o reparo, a hOGG1 remove a base danificada, resultando em um sítio apurínico ou apirimidínico o qual é posteriormente clivado pela própria enzima, que possui a função de AP liase (Zharkov *et al.*, 2000), formando assim uma quebra no DNA que pode finalmente ser detectada pelo ensaio do Cometa.

Posteriormente à etapa de lise, descrita no item anterior, as lâminas foram imersas por 2 vezes em tampão F [(HEPES 40 mM; KCl 0,1 M; EDTA 0,5 mM e 0,2 mg/mL (pH= 8.0)] durante 5 minutos cada, à temperatura ambiente. A enzima hOGG1 (New England Biolabs) foi então adicionada ao gel em 50L de tampão F, em diluições de 0,08 unidades por gel (Smith et al., 2006). Em seguida, os géis foram cobertos por lamínula e incubados em uma câmara úmida (Hybrite, Vysis) por 20 minutos a 37°C. Após o tratamento com a enzima, as lamínulas foram retiradas e procedeu-se a etapa de eletroforese, neutralização e fixação, conforme descrito no item anterior. A análise de todas as lâminas do ensaio do Cometa foi realizada após coloração com 50µL de iodeto de propídeo (20 µg/mL), em microscópio de epi-fluorescência Zeiss (Germany), utilizando filtro 516-560 nm e objetiva com aumento de 40X. As imagens foram capturadas usando-se uma câmera Axiocan (Zeiss)e o programa AxioVision 3.1 (Zeiss).

3.4- Extração de RNA

Para a extração de RNA total, após a separação dos leucócitos utilizando Histopaque (Sigma), as células foram lisadas com trizol (Invitrogen), sendo o RNA precipitado com isopropanol a -20(C e posteriormente diluído em água livre de RNAse. A quantidade e qualidade do RNA foram avaliadas através da utilização de um espectrofotômetro Genequant (Amersham, EUA), sendo que duas razões foram determinadas: 260/230 e 260/280, com a finalidade de evitar a utilização de um RNA contaminado por proteínas, DNA, ou outras moléculas. Os valores ideais para cada razão, visando um RNA de boa qualidade variam de 1,8 a 2,2 (260/230) e de 1,8 a 2,0 (260/280). Para verificar a integridade do RNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose com formaldeído.

3.5- Transcrição Reversa para realização da qPCR (RT-PCR)

Para a preparação do cDNA a ser utilizado nas reações de PCR quantitativa em tempo real, foi necessário primeiramente remover todas as moléculas de DNA das amostras de RNA. Para tento, foi utilizado o *kit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* (Invitrogen).

Na reação de RT-PCR propriamente dita, foi utilizado o *kit Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen); adicionando 1µL de *oligo DT primer* (250ng/µL) aos RNAs provenientes das amostras da reação com a DNAse e incubados a 70º C por 10 minutos e, ao final, foram colocadas as amostras no gelo. Adicionou-se então aos tubos um mix contendo 4µL de *First-strand buffer* 5X, 2µL de DTT 0,1M, 1µL de dNTP 10mM e 1µL de *Superscript III RT* 200U/µL (Invitrogen), incubando-se as amostras primeiramente por 50 minutos a 50º C e finalmente a 70º C por 15 minutos. Ao final da reação, foi realizada uma reação de PCR convencional para um gene constitutivo, o GAPDH, a fim de testar a integridade das amostras de cDNAs, que posteriormente foram estocadas a -20℃ até sua utilização nos ensaios de PCR em tempo real.

3.6- PCR em tempo real (qPCR)

As reações foram realizadas em volumes de 15 µL. Para esse volume, o mix foi preparado de acordo com a seguinte proporção: 7,5µL do *PCR Master Mix* (*SYBR Green – Applied Biosystems, Foster City*), 0,75 µL do primer *forward* (sol. estoque de 10 µM), 0,75 µL do primer *reverse* (sol. estoque de 10 µM), 5,4 µL de água livre de RNAse e 0,6 µL do cDNA obtido na reação de transcrição reversa. Para a preparação das reações, foram utilizadas placas de polipropileno com 96 poços (*Applied Biosystems, Foster City*), adequadas ao aparelho utilizado. O mix foi distribuído na placa e as amostras de cDNA foram adicionadas aos poços corretos; em seguida, as placas foram seladas. As reações foram incubadas e processadas utilizando-se o seguinte programa: 50ºC por 2 min, 95ºC por 10 min, 40 ciclos a 95ºC por 15 seg e 60ºC por 1 min, e então a 4ºC.

Com a finalidade de normalizar os dados de expressão gênica de cada indivíduo utilizou-se um gene constitutivo. Todos os iniciadores (Tabela 4) foram desenhados com o programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html).

3.7- Forma de análise dos Resultados:

3.7.1- Ensaio do Cometa

Foram analisadas 50 células/indivíduo, sendo contadas as células que apresentaram um contorno circular (núcleos sem danos de DNA) ou em forma de "cometa" (núcleos com danos no DNA), no qual a extensão da cauda reflete a distância de migração da fita de DNA danificada. As células foram analisadas utilizando o programa Cometscore™ versão 1.5 (TriTrek Corp./USA), sendo utilizados a % de DNA na cauda e o *Tail moment* (% de DNA na cauda multiplicado pelo comprimento da mesma) como parâmetros de análise, sendo ambos disponibilizados pelo *software*. Os resultados gerados pelo programa foram então transportados para uma planilha e, em seguida, estes foram utilizados na análise estatística.

Os dados foram submetidos ao teste estatístico *Two way ANOVA*, seguido pelo método *Student-Newman-Keuls Test* de múltiplas comparações, visando comparar a diferença de dano no DNA, assim como a influência da utilização da enzima hOGG1, entre os grupos PAH, PANH e controle; PI, PPI e controle; e PAH,

PANH, PI e PPI. Para analisar a eficiência do período de internação na diminuição do nível de danos entre os grupos PI e PPI, foi utilizado o Teste-t pareado.

3.7.2- PCR em tempo real

A comparação da expressão gênica entre os diferentes pacientes, assim como a escolha do melhor gene constitutivo para normalização dos dados, foi possível com a obtenção dos valores de C_T, fornecidos pelo *software Gene Amp 7500 Sequence detection system*. Os dados provenientes do *software* foram exportados para uma planilha, onde foi realizada a análise.

Os três genes constitutivos testados foram: *18S* (RNA ribossômico), *GAPDH* (Gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenase) e *B2M* (Beta-2-microglobulina), indicados como sendo os mais estáveis para leucócitos (Vandesompele *et al.*, 2002; Bas *et al.*, 2004). O gene que apresentou a menor variação na sua expressão (pela comparação dos valores de C_T) entre todos os indivíduos testados, foi o escolhido para a normalização dos outros genes analisados pela PCR em tempo real.

Após o cálculo dos valores de ΔC_T (C_T do gene – C_T do gene constitutivo) para cada gene e para cada indivíduo, a análise estatística foi realizada utilizando os próprios valores de ΔC_T (Yuan *et al.*, 2006) no teste *One Way ANOVA,* sendo também aplicado o Teste-t pareado (PI versus PPI). Adicionalmente, foi transformado cada valor de ΔC_T em valores lineares pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001), sendo posteriormente utilizado o teste *One Way ANOVA* na comparação entre os grupos e Teste-t pareado (PI versus PPI).

Tabela 4: Lista de iniciadores utilizados nas reações de qPCR em tempo real. O iniciador do gene *GAPDH* também foi utilizado na PCR convencional para a confirmação da integridade do cDNA produzido por RT-PCR.

Primer	Sequência	Posição	Amplicon
GAPDH-forward *GAPDH*-reverse	5'-CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC-3' 5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'	30 141	112
B2M-forward *B2M*-reverse	5'-AGGCTATCCAGCGTACTCCA-3' 5'-TTCAATGTCGGATGGATGAA-3'	116 228	113
18S-forward *18S*-reverse	5'-CCTGCGGCTTAATTTGACTC-3' 5'-AACTAAGAACGGCCATGCAC-3'	1230 1347	118
ATM-forward *ATM*-reverse	5'-CTGTGGTGGAGGGAAGATGT-3' 5'-GTTGATGAGGGGATTGCTGT-3'	6445 6561	117
ATR-forward *ATR*-reverse	5'-CTCGCTGAACTGTACGTGGA-3' 5'-GTGGGGTTTCATTTTCAGGA-3'	5976 6093	118
SOD1-forward *SOD1*-reverse	5'-GGGCCTCAGACTACATCCAA-3' 5'-GGCAAAGGTGGAAATGAAGA-3'	530 641	112
OGG1-forward *OGG1*-reverse	5'-AAGAAATTCCCCAAGCACCT-3' 5'-CCTGGCCTTTGAGGTAGTCA-3'	2322 2428	107
XRCC1-forward *XRCC1*-reverse	5'-TCCTCTGTGTCCCCAGAATC-3' 5'-CCCTGAAGAGACCAAAGCAG-3'	1479 1589	111
FEN1-forward *FEN1*-reverse	5'-CCAGCTCTTCTTGGAACCTG-3' 5'-CGCTCCTCAGAGAACTGCTT-3'	1212 1331	120
APEX1-forward *APEX1*-reverse	5'-ATATTGCTTCGGTGGGTGAC-3' 5'-GCTCTGTCCTGAGCTCATCC-3'	279 393	115

4- RESULTADOS:

4.1- Caracterização das amostras de pacientes DM2 e controles estudados:

Foram realizadas comparações entre todos os grupos de pacientes (PAH, PANH, PI e PPI) e controles, com relação à idade, sexo, níveis glicêmicos e porcentagem de hemoglobina glicosilada.

Entre todos os grupos estudados, não houve diferenças significativas ($p>0,05$) com relação à idade. Da mesma forma, não houve diferenças quanto ao sexo entre os grupos. Com relação aos parâmetros restantes, tanto o grupo PI quanto PAH apresentaram níveis de glicose (Média de 203 mg/dL e 201 mg/dL, respectivamente) e de hemoglobina glicosilada (Média de 9,9% e 11,1%, respectivamente) estatisticamente maiores ($p<0,05$) do que os grupos PANH e controle (glicemia – média de 99 mg/dL e 93 mg/dL, respectivamente e hemoglobina glicosilada – média de 6,5% e 5,5%, respectivamente), o que caracteriza o quadro hiperglicêmico destes grupos. Já o grupo PPI, representado pelos pacientes após internação, apresentou níveis glicêmicos semelhantes ao grupo controle (114 mg/dL), mas hemoglobina glicosilada significativamente maior (9,1%) em relação ao grupo controle. Tabelas 1, 2 e 3.

4.2- Avaliação de danos no DNA pelo Ensaio do Cometa:

O ensaio do cometa foi utilizado para avaliar os níveis de danos no DNA em pacientes DM2 apresentando quadro hiperglicêmico (PAH: n = 13) e não-hiperglicêmico (PANH: n = 16), além de pacientes DM2 submetidos a um período de internação (sete dias) para compensação dos níveis de glicose, para os quais o ensaio do cometa foi realizado antes (P: n = 10) e após o período de internação (PPI: n = 10), assim como para um grupo controle (n = 16).

Sendo o estresse oxidativo um importante fator relacionado à DM2, foi utilizada a enzima hOGG1 (responsável por detectar a base oxidada 8-oxoguanina) para a determinação dos níveis de danos oxidativos nos linfócitos de pacientes e controles.

Conforme já mencionado, os parâmetros utilizados para a análise foram o *Tail moment* (TM) e a % de DNA na cauda. Entretanto, o TM apresentou uma grande variação entre os dados de um mesmo grupo, gerando desvios elevados em torno da média. Assim, por ser um parâmetro mais estável, a % de DNA tem sido a mais

indicada para a análise dos dados obtidos pelo ensaio do cometa (Kumaravel & Jha, 2006; Collins *et al.*, 2008), sendo o parâmetro utilizado para a análise estatística dos resultados do presente trabalho.

A análise dos dados pelo teste *Two Way ANOVA*, comparando os grupos Controle, PAH e PANH, sem a utilização da enzima hOGG1, demonstraram diferenças significativas ($p<0,05$) entre os três grupos, sendo que a análise por múltiplas comparações revelou que o grupo PAH apresentou níveis significativamente ($p<0,05$) maiores de dano no DNA (6,46±3,91%), quando comparado aos dois outros grupos. No entanto, não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos Controle (2,57±1,37%) e PANH (2,57±1,49%) (Tabela 5 e Figura 3).

Resultados semelhantes foram obtidos pelo método em que se empregou a enzima hOGG1, sendo observados maiores níveis de danos, estatisticamente significativos ($p<0,05$), no grupo PAH (8,35±4,69%) em relação aos grupos controle (4,33±1,91%) e PANH (4,62±1,88%); entretanto, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os dois últimos grupos (Tabela 5 e Figura 3). Os resultados demonstraram que o grupo PANH, composto por pacientes DM2 não hiperglicêmicos, apresentaram níveis semelhantes de danos no DNA quando comparados ao grupo controle.

Na comparação entre os grupos de pacientes internados (PI e PPI), os grupos PI e PPI apresentaram valores (6,69±3,68 e 4,38±3, respectivamente) significativamente maiores ($p<0,05$) em relação ao grupo controle (2,57±1,37%). Da mesma forma, quando comparados os grupos PI e PPI, o grupo PI também apresentou valores significantemente maiores em relação ao grupo PPI ($p<0,05$). Com a utilização da enzima hOGG1, tanto o grupo PI quanto PPI apresentaram valores (8,51±3,17 e 6,06±1,69, respectivamente) significativamente maiores ($p<0,05$) em relação ao grupo controle. No entanto, na comparação entre os grupos PI e PPI, não houve diferenças significativas ($p<0,05$) (Tabela 6 e Figura 4). Assim, após o período de internação, os pacientes apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de dano no DNA; no entanto, estes níveis ainda são maiores quando comparados aos indivíduos controles.

Esses resultados demonstram que o período de tratamento ao qual foram submetidos os pacientes acarretou uma redução nos níveis de dano no DNA, mas as taxas de dano oxidativo se mantiveram relativamente elevadas, ou seja, não

houve uma recuperação significativa dos danos apesar da diminuição nos índices de glicemia. Isto ficou evidente com a realização do teste-t pareado entre os grupos PI e PPI, que revelou diferenças significativas sem a utilização da enzima ($p<0,05$). No entanto, com o tratamento com a enzima, não houve diferenças significativas ($p>0,05$) quanto aos níveis de dano oxidativo entre os dois grupos.

Da mesma forma, na comparação dos grupos com níveis glicêmicos controlados, o grupo PPI apresentou níveis de dano maiores que o PANH ($p<0,05$), demonstrando que um controle glicêmico recente e ainda não bem consolidado não é suficiente para causar uma diminuição de danos no DNA a níveis próximos aos normais.

De uma maneira geral, a utilização da enzima hOGG1 foi responsável pela detecção de níveis significantemente maiores ($p<0,05$) de danos em todos os grupos, provavelmente pelo reconhecimento de bases oxidadas. Apesar disso, o método com o emprego da enzima não se mostrou essencial na detecção das diferenças entre os três grupos.

.

Tabela 5: Valores das médias ± desvio padrão das porcentagens de DNA na cauda nos grupos de indivíduos: Controle, pacientes hiperglicêmicos (PAH) e pacientes não hiperglicêmicos (PANH), assim como as comparações realizadas entre os grupos.

Parâmetro	Controle (n=16)		PAH (n=13)		PANH (n=16)	
	-hOGG1	+hOGG1	-hOGG1	+hOGG1	-hOGG1	+hOGG1
% de DNA na cauda	2,57±1,37	4,33±1,91	6,46±3,91	8,35±4,69	2,57±1,49	4,62±1,88
Comparação	**CO x PAH**		**CO x PANH**		**PNH x PANH**	
	-hOGG1	**+hOGG1**	**-hOGG1**	**+hOGG1**	**-hOGG1**	**+hOGG1**
	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05

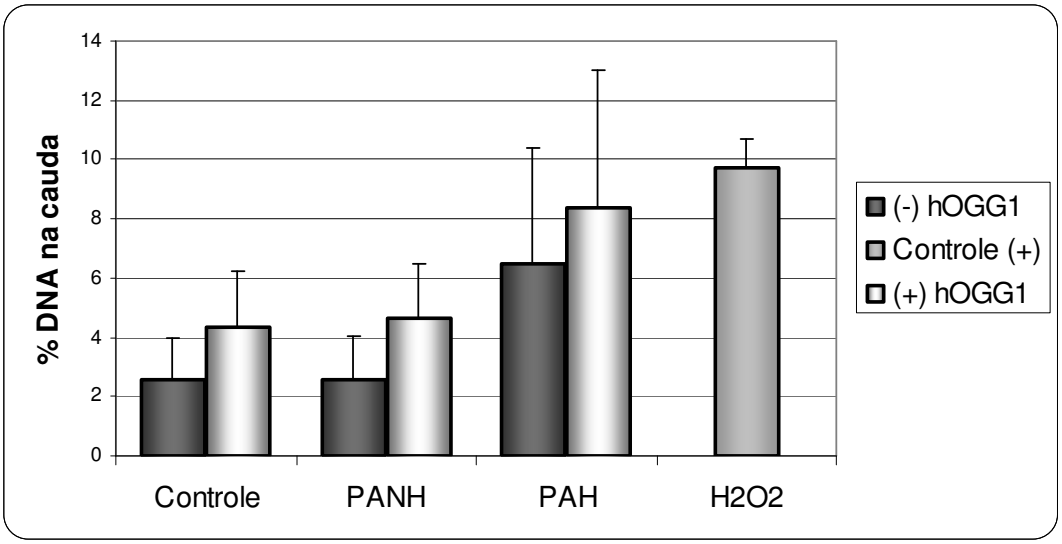

Figura 3: Porcentagem de DNA na cauda do cometa nos grupos controle, pacientes não hiperglicêmicos (PANH) e pacientes hiperglicêmicos (PAH), tratados com a enzima hOGG1 (+hOGG1) ou não tratados (-hOGG1). A H2O2 foi utilizada como controle positivo do ensaio do cometa.

Tabela 6: Valores das médias ± desvio padrão das porcentagens de DNA na cauda nos grupos de indivíduos: Controle, e pacientes antes (PI) e após (PPI) internação, assim como as comparações realizadas entre os grupos

Parâmetro	Controle (n=16)		PI (N=10)		PPI (n=10)	
	-hOGG1	+hOGG1	-hOGG1	+hOGG1	-hOGG1	+hOGG1
% de DNA na cauda	2,57±1,37	4,33±1,91	6,69±3,68	8,51±3,17	4,38±3	6,06±1,69
Comparação	CO x PI		CO x PPI		PI x PPI	
	-hOGG1	+hOGG1	-hOGG1	+hOGG1	-hOGG1	+hOGG1
	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05

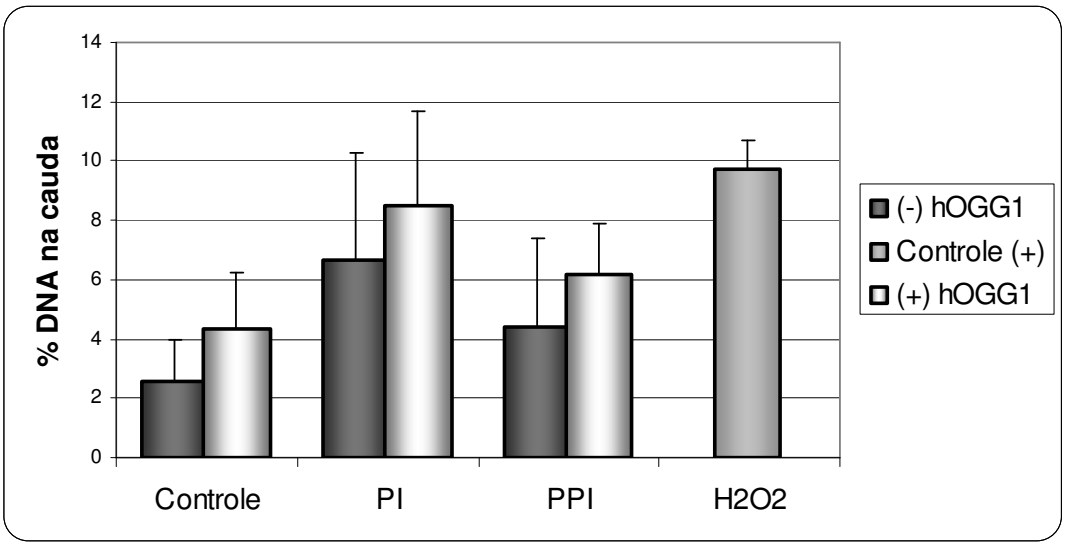

Figura 4: Porcentagem de DNA na cauda do cometa nos grupos controle, pacientes pré-internação (PI) e pacientes pós-internação (PPI), tratados com a enzima hOGG1 (+hOGG1) ou não (-hOGG1). A H2O2 foi utilizada como controle positivo do ensaio do cometa.

4.3-Expressão gênica por qRT-PCR em tempo real:

As amostras de RNA total obtidas dos linfócitos dos indivíduos controles e dos pacientes DM2 foram submetidas à eletroforese em gel de agarose desnaturante (1,5%) para a avaliação de sua integridade (Figura 5). Foi também avaliada a qualidade e a integridade dos cDNAs obtidos nas reações de RT-PCR, utilizando um par de *primers* para o gene constitutivo *GAPDH* (Figura 6), que se mostrou mais adequado.

Para o ensaio de qRT-PCR foram utilizados os RNAs de 9 indivíduos do grupo controle, 10 do grupo PAH, 10 do grupo PANH e 6 indivíduos cujas amostras de RNA apresentaram boa qualidade tanto antes (PI) quanto após o período de internação (PPI).

Na escolha do gene constitutivo mais apropriado para a normalização dos dados de PCR em tempo real, foram testados os genes *RPS18*, *GAPDH* e *B2M*. Os três genes foram amplificados por qPCR em tempo real para todos os indivíduos. Assim, o menor e o maior valor de C_T entre todos os indivíduos para cada um dos três genes foram: *RPS18* (10,1 e 14,4), GAPDH (16,3 e 27,5) e B2M (12,1 e 23,5). Como resultado, o gene *RPS18* foi escolhido como controle endógeno, pois apresentou a menor variação de expressão entre todos os indivíduos, o que garante que diferentes níveis de glicemia não interferiram na expressão do gene escolhido.

No total, 8 genes (*RPS18, ATM, ATR, SOD1, OGG1, XRCC1, APEX1* e *FEN1*) (Tabela 7) foram avaliados quanto à expressão gênica transcricional em amostras de grupos PAH, PANH, PI e PPI de pacientes DM2 e grupo controle. Os genes selecionados desempenham funções ligadas ao mecanismo de defesa anti-oxidante, assim como na sinalização e reparo do dano oxidativo no DNA.

Para a análise da expressão gênica, foram realizadas as seguintes comparações entre os grupos: controle, PAH e PANH; controle, PI e PPI, além da comparação entre os grupos PI e PPI. Com a utilização diretamente dos valores de ΔC_T (C_T do gene - C_T constitutivo), não houve diferenças significativas ($p>0,05$) nos níveis de expressão gênica avaliados segundo as comparações citadas. Resultado semelhante ocorreu quando os valores de CT foram transformados em valores lineares, não havendo diferença significativa ($p>0,05$).

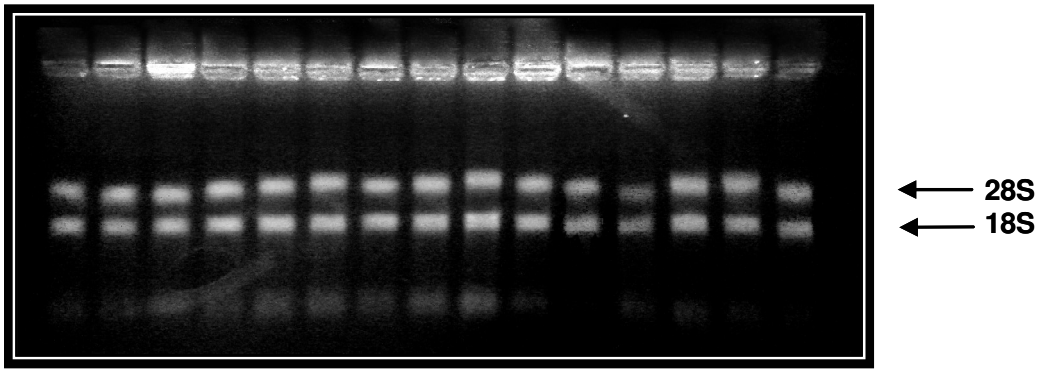

Figura 5: Avaliação da integridade das amostras de RNA total. Eletroforese em gel de agarose 1,5%, evidenciando o fracionamento do RNA total de uma fração das amostras utilizadas.

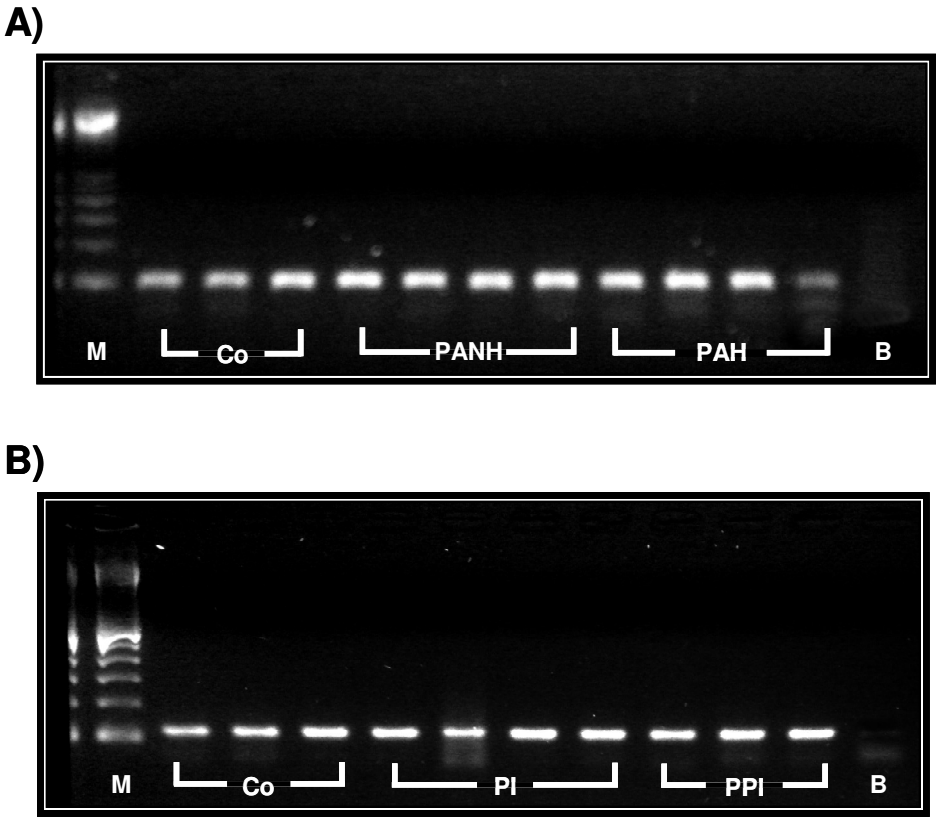

Figura 6: Avaliação da qualidade de reação da RT-PCR. Eletroforese em gel de agarose 1,5%, evidenciando a amplificação do gene *GAPDH* (gene constitutivo) nos grupos: Pacientes não hiperglicêmicos (PANH), Pacientes hiperglicêmicos (PAH) **(A)**, Pacientes pré-internação (PI) e Pacientes pós-internação (PPI) **(B).** Em ambas as figuras, Co: Controle, B: branco e M: marcador.

Houve uma grande variação intra-grupo nos níveis de expressão gênica apresentados por cada um dos grupos estudados (PAH, PANH, PI, PPI e controle), o que provavelmente influenciou os resultados da análise estatística, embora sejam notadas diferenças diferenças nos níveis de expressão entre os grupos; para demonstrar tais diferenças, foi utilizado o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ proposto por Livak & Schmittgen (2001), no qual o cálculo dos desvios de cada grupo foi efetuado segundo Karlen et al. (2007). Os valores de *Fold change* (FC) foram calculados (Tabela 8).

Nos grupos de pacientes hiperglicêmicos (PAH) e não hiperglicêmicos (PANH) é possível notar que todos os genes do grupo PAH se mostraram reprimidos em relação ao controle, tais como os genes de sinalização de danos no DNA, *ATM* (FC = -1,08) e *ATR* (FC = -1,07), bem como o gene *SOD1* (FC = -0,27) com papel na defesa contra o estresse oxidativo e genes relacionados ao reparo de DNA, como *XRCC1* (FC = -0,65), *APEX1* (FC = -1,09), *FEN1* (FC = -0,51) e a glicosilase *OGG1* (FC = -0,37).

Quanto ao grupo PANH, apesar deste também apresentar a repressão de alguns genes, como *ATM* (FC = -0,25), *ATR* (FC = -0,27) e *APEX1* (FC = -0,34), os demais genes estudados, *XRCC1* (FC = 0,16), *SOD1* (FC = 0,29), *FEN1* (FC = 0,24) e *OGG1* (FC = 0,22), se mostraram induzidos transcricionalmente (Figura 7-A).

No caso dos pacientes em que as amostras foram coletadas antes (PI) e após (PPI) o período de internação, o grupo PI apresentou uma leve repressão do gene *APEX1* (FC= -0,06) e praticamente nenhuma modulação do gene *OGG1* (FC= -0,01). Entretanto, os genes *ATM* (FC= 0,85), *ATR* (FC= 0,50), *SOD1* (FC= 0,67), *FEN1* (FC= 0,19) e *XRCC1* (FC= 0,08) foram transcricionalmente induzidos. Já o grupo PPI apresentou repressão de praticamente todos os genes: *ATM* (FC= -1,37), *ATR* (FC= -0,67), *OGG1* (FC= -0,51), *XRCC1* (FC= -1,57), *FEN1* (FC= -1,85) e *APEX1* (FC= -2,14), com exceção do gene SOD1, que se mostrou induzido (FC= 0,29) (Figura 7-B).

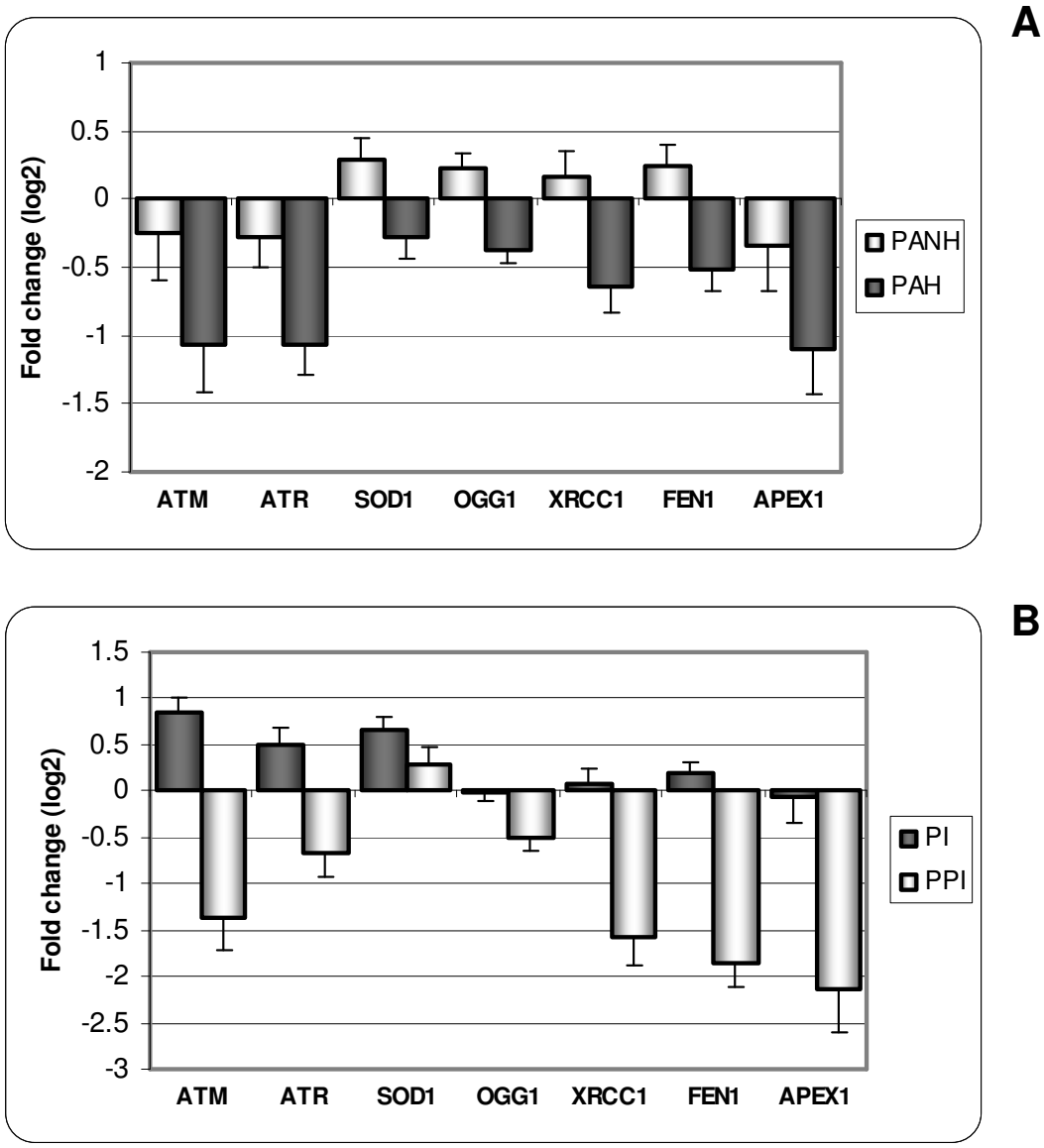

Figura 7: Perfis de expressão gênica transcricional obtidos (valores relativos em *fold-change*) por qRT-PCR em tempo real para a comparação dos grupos PAH (paciente hiperglicêmico) e PANH (paciente não hiperglicêmico) em relação ao grupo controle **(A)**; e dos grupos PI (paciente pré-internação) e PPI (paciente pós-internação) em ralação ao grupo controle **(B).**

Tabela 7: Genes estudados para avaliação de expressão transcricional por qRT-PCR em tempo real. Os três primeiros genes foram testados para a escolha do gene constitutivo mais adequado para realizar a normalização dos dados.

Símbolo	Nome
RPS18	Ribosomal protein S18
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
B2M	Beta-2-microglobulin
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
SOD1	Superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult))
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase
XRCC1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
FEN1	Flap structure-specific endonuclease 1
APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1

Tabela 8: *Fold change* (log2) de cada um dos genes analisados por qRT-PCR em tempo real para cada um dos grupos. PAH: paciente hiperglicêmico; PANH: paciente não hiperglicêmico; PI: paciente pré-internação e PPI: paciente pós-internação.

Gene	PAH	PANH	PI	PPI
ATM	-1.08	-0.25	0.85	-1.37
ATR	-1.07	-0.27	0.5	-0.67
SOD1	-0.27	0.29	0.67	0.29
OGG1	-0.37	0.22	-0.01	-0.51
XRCC1	-0.65	0.16	0.08	-1.57
FEN1	-0.51	0.24	0.19	-1.85
APEX1	-1.09	-0.34	-0.06	-2.14

5- DISCUSSÃO:

A DM2 é uma das doenças metabólicas mais comuns, afetando aproximadamente 3% de toda a população mundial. Clinicamente, é uma doença heterogênea caracterizada por desordens metabólicas, descontrole dos níveis de glicemia no sangue, assim como outras complicações (retinopatia, nefropatia, neuropatia e doenças cardiovasculares). A hiperglicemia, característica comum dos pacientes com diabetes, é a causa da auto-oxidação da glicose, da glicosilação de proteínas, entre outras mudanças metabólicas que aceleram e aumentam a formação de ROS, conforme demonstrado por vários autores (Baynes, 1991; Lodovici *et al.*, 2007).

Durante os últimos anos, tem sido pesquisado como elevadas quantidades de ROS são produzidas em pacientes com diabetes, na tentativa também de elucidar como o estresse oxidativo está relacionado às complicações da doença; ou seja, tem sido testada a hipótese de causa e conseqüência de tais complicações (Maxwell *et al.*, 1997; Hannon-Fletcher *et al.*, 2000; VanderJagt *et al.*, 2001; Cakatay, 2005).

No presente trabalho, o grupo de pacientes DM2 hiperglicêmicos (PAH) apresentou um maior nível de danos no DNA em relação ao grupo controle e o grupo de pacientes DM2 não hiperglicêmicos (PANH). Esses últimos, por sua vez, não apresentaram diferenças significativas com relação às taxas de danos no DNA comparativamente ao grupo controle. Os dados apresentados quanto aos pacientes hiperglicêmicos estão de acordo com a literatura, sendo relatado que pacientes com hiperglicemia também apresentaram maior nível de dano no DNA quando comparados aos indivíduos normais (Hannon-Fletcher *et al.*, 2000; Blasiak *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2007).

Em pacientes DM2 não hiperglicêmicos, ou seja, com a doença controlada, não existem muitos dados na literatura quanto aos níveis de dano no DNA. Os resultados do presente trabalho demonstraram que os pacientes DM2 apresentam níveis de quebras e de dano oxidativo no DNA semelhantes ao grupo controle e significativamente menores em relação aos pacientes DM2 hiperglicêmicos. Os poucos estudos sob essa abordagem ainda são controversos, como o realizado por Hannon-Fletcher *et al.* (2000), que também detectaram maiores níveis de danos no DNA em pacientes DM2 com níveis glicêmicos próximos a níveis normais. No entanto, há evidência de que o nível de estresse oxidativo apresenta uma correlação

significativa com o grau da hiperglicemia apresentada pelos pacientes DM2 (Choi et al., 2005). Assim, os níveis de controle da hiperglicemia nos pacientes do grupo PANH parece ter sido suficiente para restabelecer os níveis normais de danos no DNA, praticamente semelhantes aos indivíduos não diabéticos.

Da mesma forma, foram analisadas amostras de pacientes DM2 hiperglicêmicos, sendo que o ensaio do cometa foi realizado em dois momentos: antes (PI) e após (PPI) um período de internação de sete dias, para controle da doença e normalização dos níveis glicêmicos. Conforme esperado, o grupo PI apresentou níveis de dano no DNA semelhantes ao grupo de pacientes DM2 hiperglicêmicos (PAH). Após o período de internação, houve uma diminuição nos níveis de danos apresentados pelo grupo PPI, embora tais níveis tenham sido ainda mais elevados relativamente aos indivíduos não diabéticos. Esses dados são inéditos, não havendo na literatura dados obtidos em condições semelhantes.

O período de 7 dias de internação tem sido utilizado na prática clínica visando o controle dos níveis glicêmicos e controle da dieta alimentar. Os resultados obtidos mostraram que esse período foi suficiente para reduzir significativamente os níveis de danos no DNA, embora em nível ainda acima do normal. O estresse oxidativo está intimamente relacionado a uma exposição crônica à hiperglicemia (Sliwinska *et al.*, 2008), sendo plausível que seja requerido um tempo maior para o organismo restabelecer a condição normal. Além disso, deve ser também considerada a variação dos níveis glicêmicos entre os pacientes internados, já que muitos deles demonstraram melhora no quadro glicêmico somente após alguns dias do início da internação. Essa variabilidade entre indivíduos é esperada, como em outros casos de respostas a tratamento com medicamentos, por exemplo.

Para analisar e quantificar os danos oxidativos no DNA utilizou-se a enzima hOGG1 para a detecção de bases oxidadas. Outras duas enzimas também têm sido utilizadas, a FPG (formamido pirimidina glicosilase) e a ENDO III (endonuclease III), as quais reconhecem diferentes tipos de bases oxidadas (Speit *et al.*, 2004). A ENDO III reconhece pirimidinas oxidadas, incluindo timina glicol e uracil glicol (Dizdaroglu, 2005). A FPG e a hOGG1 são glicosilases que participam dos primeiros passos do reparo de DNA pela BER (Bohr, 2002); enquanto a primeira tem uma especificidade maior por purinas oxidadas, incluindo a 8-oxoG, a 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopyrimidina e a 4,6-diamino-5-formamidopyrimidina (Karakaya *et*

al., 1997), a segunda é a enzima primária no reparo da base oxidada 8-oxoG gerada em conseqüência da hiperglicemia (Rosenquist *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 1998).

Smith et al. (2006) realizaram uma comparação entre as três enzimas com a finalidade de determinar aquela que seria mais eficiente na detecção do dano oxidativo. A ENDO III e a FPG se mostraram menos específicas, podendo reconhecer danos no DNA que não seriam necessariamente resultantes de dano oxidativo, ao contrário da hOGG1. De fato, a utilização da enzima no presente trabalho foi responsável por níveis significativamente maiores de dano detectados pelo ensaio do cometa, provavelmente em conseqüência do estresse oxidativo. No entanto, a enzima não se mostrou essencial na detecção de níveis aumentados de danos no DNA nos pacientes hiperglicêmicos, já que esta diferença foi detectada com e sem a utilização de enzima.

O estresse oxidativo pode atuar tanto na modificação de bases quanto induzindo quebras simples e duplas na cadeia do DNA (Slupphaug *et al.*, 2003). Assim, nos indivíduos analisados, mesmo sob a influência da hiperglicemia, tanto quebras quanto bases oxidadas (8-oxoG) podem ter ocorrido.

Usualmente, o estresse oxidativo relatado em pacientes com diabetes é comprovado pela grande produção de radicais livres, peroxidação lipídica e uma menor capacidade antioxidante. Sob condições de estresse oxidativo, mecanismos endógenos envolvendo enzimas e moléculas antioxidantes atuam no sentido de anular as ROS e diminuir o efeito de agentes oxidantes. Em condições normais, esses mecanismos são suficientes para contrabalançar a geração de radicais livres, mas em condições patológicas (no diabetes, por exemplo), tais mecanismos podem ter a sua capacidade comprometida devido à maior produção de radicais livres (Seghrouchni *et al.*, 2002).

Lodovici *et al.* (2007) também realizaram um estudo comparativo entre pacientes DM2 hiperglicêmicos e não hiperglicêmicos, mas a comparação realizada pelos autores foi quanto à defesa antioxidante. Como resultado, os autores observaram que os pacientes com níveis elevados de glicose apresentaram uma condição antioxidante significativamente menor comparativamente aos pacientes compensados. O maior nível de dano detectado em pacientes hiperglicêmicos pode, portanto, ser conseqüência de um comprometimento no mecanismo de defesa antioxidante.

Entretanto, a situação da defesa antioxidante em pacientes diabéticos ainda apresenta resultados inconsistentes. Estudos sobre a capacidade antioxidante total do plasma como marcador de estresse oxidativo demonstraram uma menor capacidade em pacientes diabéticos (Opara *et al.*, 1999), mas nenhuma diferença foi observada por outros autores (Nuttall *et al.*, 1999). Resultados conflitantes também ocorreram quanto à avaliação da atividade de diferentes moléculas antioxidantes, especialmente no caso de vitaminas. Em alguns trabalhos, níveis plasmáticos de vitamina E não mostraram diferenças, enquanto que em outros, foram observados níveis abaixo dos normais (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1995). Estudos adicionais de níveis plasmáticos de vitamina C detectaram níveis abaixo dos normais (Maxwell *et al.*, 1997), assim como nenhuma diferença na comparação de pacientes com DM1 e DM2 em relação a indivíduos não diabéticos (Schorah *et al.*, 1988). Por sua vez, Choi *et al.* (2005) relataram níveis aumentados de danos no DNA em pacientes DM2 descompensados com menores níveis de vitamina C, demonstrando que, se este for o caso, a deficiência na defesa antioxidante pode ter como conseqüência um maior estresse oxidativo.

Provavelmente, os resultados contraditórios envolvendo os mecanismos de defesa antioxidante se devem a variações entre os indivíduos diabéticos utilizados nos diferentes estudos, que podem ser relativas às complicações de saúde dos pacientes, bem como ao tempo em que estes permanecem em estado hiperglicêmico, além de hábitos alimentares e estilo de vida; em alguns trabalhos, os pacientes apresentaram níveis glicêmicos e de hemoglobina glicada semelhantes aos níveis normais, como resultado do controle da doença. Assim, da mesma forma que os diferentes níveis glicêmicos de pacientes descompensados e compensados parecem ter influenciado os níveis de dano no DNA observados no presente trabalho, tais diferenças também podem ter influenciado nos resultados conflitantes com relação à defesa antioxidante descritos na literatura.

Um outro parâmetro muito utilizado para avaliar o estresse oxidativo nos pacientes diabéticos é a peroxidação lipídica, fator relacionado ao desenvolvimento de arterosclerose, uma das piores complicações da doença (Giugliano *et al.*, 1995). No entanto, nos últimos anos, uma maior atenção tem sido dada à oxidação de proteínas, já que pacientes com diabetes apresentam níveis elevados de proteínas oxidadas. Esse fato é importante a ser considerado, pois envolve o acúmulo de proteínas modificadas, entre elas os AGEs, os quais provavelmente estão

relacionados ao desenvolvimento de complicações nos pacientes diabéticos (Stadtman & Levine, 2000). Além disso, a oxidação de proteínas poderia ser responsável por parte da perda da capacidade antioxidante do paciente, já que diferentes enzimas, assim como outras proteínas, como a albumina, um importante antioxidante extracelular, seriam oxidadas, perdendo a sua função e assim, contribuiriam para o desenvolvimento das complicações da doença (Bourdon *et al.*, 1999; Cakatay, 2005).

Cakatay (2005) confirmou a importância da oxidação de proteínas ao realizar um estudo com diferentes marcadores para oxidação protéica em pacientes DM2 compensados e descompensados, sem complicações. Apesar de não ter utilizado um grupo controle, impossibilitando a comparação com indivíduos normais, o autor encontrou maiores níveis de oxidação protéica em pacientes DM2 descompensados. Como os pacientes não apresentavam complicações, a elevada oxidação protéica nesses pacientes evidencia que o estresse oxidativo pode não ser conseqüência das complicações da doença, mas provavelmente pode contribuir para o seu desenvolvimento.

Portanto, as informações obtidas até o presente sugerem que o estresse oxidativo decorrente da hiperglicemia é o principal fator envolvido no declínio da defesa antioxidante, bem como no desenvolvimento das complicações da doença, sendo de suma importância o controle dos níveis glicêmicos e da produção de radicais livres, visto a ação destes em diferentes macromoléculas, isto é, lipídeos, proteínas e o próprio DNA.

O tratamento de indivíduos diabéticos também pode ter alguma relação com o aumento do estresse oxidativo e conseqüentemente na geração de danos no DNA. Muitas das drogas utilizadas não possuem estudos aprofundados sobre seu potencial genotóxico. A metformina pode ser um exemplo, pois apesar de ser muito utilizada no tratamento do diabetes, seu mecanismo de ação não é ainda conhecido (Musi *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2004).

Um fato que aponta um possível potencial genotóxico da metformina foi o resultado apresentado por Zou *et al.* (2004), no qual os autores discutem sobre uma possível atuação da droga na liberação de radicais $ONOO^-$ pela mitocôndria, promovendo a ativação do gene *SRC*, que através de uma cascata protéica, ativa a AMP quinase, contribuindo para os efeitos benéficos da droga. Esta maior liberação de $ONOO^-$ poderia ser relacionada a um aumento do estresse oxidativo.

No entanto, tal afirmação foi questionada por Ouslimani *et al.* (2005), que obtiveram resultados contrários mostrando que a droga diminui a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio, em concentrações de 10^{-1}µM a 10^{-2} µM durante 1 a 3 horas de tratamento, as quais são próximas às usadas no tratamento dos diabéticos. Tais pesquisadores sugeriram que essas discrepâncias podem ser decorrentes da concentração de metformina utilizada e do tempo de exposição à droga. No trabalho de Zou *et al*. (2004), as células foram tratadas com a droga por 24 h, em concentrações de até 1000 µM.

Sabendo que a hiperglicemia está intimamente relacionada ao estresse oxidativo e que este tem efeitos prejudiciais sobre as macromoléculas (como o DNA, lipídeos e proteínas), assim como a participação no desenvolvimento de complicações do diabetes, a manutenção de níveis normais de glicose se torna essencial para prevenir um elevado nível de estresse oxidativo e o avanço da doença. Mesmo em pacientes DM2 compensados apresentando níveis de dano no DNA semelhantes aos indivíduos normais, o controle glicêmico não parece ser tão eficiente, já que estes não possuem o ajuste fisiológico da quantidade de insulina que deve ser secretada (Kruger *et al.*, 2006). Assim, o paciente com DM2 pode sofrer períodos de hiperglicemia, gerando, como conseqüência, um maior nível de estresse oxidativo. Mesmo que este não seja suficiente para causar danos consideráveis no DNA nuclear, ainda existe a possibilidade de geração de danos no DNA mitocondrial (DNAmt).

Em 1988, Richter *et al.* levantaram a hipótese de que o DNAmt sofreria um maior nível de dano oxidativo do que o DNA nuclear. De fato, havia uma série de evidências que sustentavam tal hipótese: o DNAmt encontra-se próximo a sítios de geração de radicais livres, a cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, além de não ser protegido pelas histonas, que poderiam atuar como barreiras contra o estresse oxidativo.

Adicionalmente, alguns estudos sugeriam que o dano no DNA seria reparado com menor eficiência na mitocôndria do que no núcleo (Arnheim & Cortopassi, 1992; Lim *et al.*, 2005). Santos *et al.* (2003) verificaram que as linhagens de fibroblastos transformados com o gene da telomerase, sob exposição ao peróxido de hidrogênio, apresentaram diferenças quanto à eficiência de reparo do DNA nuclear DNAmt. Em determinadas concentrações do agente, o DNA nuclear foi capaz de se recuperar totalmente após determinado tempo, enquanto que o DNAmt não foi capaz de

reparar níveis significativos de danos, levando à hipótese de que existe um certo limiar de danos os quais a mitocôndria seria capaz de reparar, acima do qual poderia desencadear mecanismos como a apoptose.

Como consequência, apesar de a mitocôndria apresentar uma extensa rede de moléculas antioxidantes (Lin & Beal, 2006), esta organela parece estar em um limiar tênue entre a homeostase e o estresse oxidativo. Assim, pelos fatores descritos acima, qualquer aumento na produção de ROS, seja por meio exógeno quanto endógeno, pode acarretar sérias conseqüências para a mitocôndria, inclusive para o DNAmt.

Assim, embora os pacientes DM2 compensados apresentem níveis normais de danos no DNA, não está excluída a possibilidade de os mesmos apresentarem danos ao nível mitocondrial, o que possivelmente poderia estar associado ao desenvolvimento de complicações da doença. Entretanto, essa questão permanece a ser investigada mais profundamente.

Outro fator relacionado ao alto estresse oxidativo em pacientes DM2, além de um mecanismo de defesa antioxidante deficiente, é a possibilidade de os pacientes apresentarem uma menor capacidade de reparo do DNA. Blasiak *et al.* (2004) realizaram um estudo no qual comparam a eficiência de reparo, mensurada pela análise dos danos no DNA pelo ensaio do Cometa em um grupo de pacientes DM2 descompensados em relação a um grupo de indivíduos normais, em resposta ao dano causado pelo peróxido de hidrogênio e pela doxorrubicina. Além de apresentarem um nível de dano basal maior do que indivíduos normais, quando expostos aos agentes mutagênicos, os pacientes DM2 apresentaram também uma eficiência de reparo menor, apesar de ambos os grupos terem sido capazes de reparar o dano.

Dessa forma, o ensaio de qRT-PCR em tempo real foi utilizado para avaliar a expressão transcricional de genes envolvidos na defesa antioxidante (*SOD1*), na sinalização de danos (*ATM* e *ATR*) e no mecanismo de reparo por excisão de bases (*OGG1*, *XRCC1*, *FEN1* e *APEX1*), via BER. Embora tenha havido diferenças na expressão dos genes sob as comparações efetuadas, estas não foram estatisticamente significativas, possivelmente devido a uma variação considerável entre indivíduos do mesmo grupo. As diferenças observadas entre os grupos foram representadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo estas discutidas a seguir.

Um dos genes testados foi a superóxido desmutase 1 (*SOD1*), que codifica a primeira e mais importante barreira de defesa antioxidante, sendo responsável pela eliminação do ânion superóxido, formando, no processo, duas moléculas menos reativas, o peróxido de hidrogênio e oxigênio (Slupphaug *et al.*, 2003). As atividades da SOD estão presentes tanto na mitocôndria, como no citoplasma e no meio extracelular. Como a enzima não é capaz de se difundir pelas membranas celulares, existem três diferentes formas da enzima: SOD1 (citoplasmática), SOD2 (mitocondrial) e SOD3 (extracelular) (Zelko *et al.*, 2002; Slupphaug *et al.*, 2003). Mutações no gene *SOD1* estão associadas com a esclerose lateral amiotrófica familial, doença degenerativa responsável pela perda progressiva da função dos neurônios motores, enquanto que mutações no gene *SOD2* causam o desenvolvimento de cardiopatia fatal em camundongos, ressaltando a importância desta enzima em vertebrados (Zelko *et al.*, 2002; Chio *et al.*, 2008).

Menores níveis de SOD já foram detectados em pacientes DM2 (Song *et al.*, 2007). Além disso, a expressão desta enzima também apresenta uma correlação negativa com os valores de hemoglobina glicada (Zelko *et al.*, 2002). Embora não tenha sido realizado um estudo dos níveis da enzima, no presente trabalho, a análise da expressão transcricional do gene *SOD1* mostrou uma repressão (FC = -0,27) desse gene pelo grupo PAH, comparativamente ao grupo controle, enquanto que o grupo PANH apresentou uma indução (FC = 0,29).

A variação na expressão dos dois grupos de pacientes (hiperglicêmicos e compensados) em relação ao controle não foi muito acentuada, mas a repressão do grupo PAH é interessante, visto que por apresentar um maior nível de danos no DNA, seria esperado que os linfócitos respondessem no sentido de diminuir esses danos, mas isto não ocorreu. Mesmo apresentando níveis de dano semelhantes em relação ao grupo controle, a indução do gene *SOD1* no grupo PANH pode significar, não somente uma maior produção de ROS nesses pacientes, como também uma diminuição no número de moléculas da enzima, sendo que em ambos os casos, poderiam resultar em um aumento na expressão do gene *SOD1*.

Quanto aos pacientes que sofreram um período de internação por 7 dias, foi observada uma leve indução do gene *SOD1* em relação ao controle: PI (FC= 0,67) e PPI (FC= 0,29). Também nesse caso, a expressão levemente aumentada do gene verificada para ambos os grupos, embora não estatisticamente significativa

comparada ao controle, pode ter resultado do estresse oxidativo, mas um estudo com maior número de amostras deve ser necessário para obter dados conclusivos.

A expressão transcricional dos genes *ATM* (*Ataxia telangiectasia mutated*) e *ATR* (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) também foi avaliada. Esses dois genes codificam proteínas quinases, funcionando como sensoras de danos induzidos na molécula de DNA, sendo as primeiras a serem ativadas em resposta a alguma injúria sofrida pelo DNA, pela transativação de uma série de outras proteínas envolvidas no bloqueio do ciclo celular, apoptose, reparo do DNA e duplicação do centrômero (Shiloh, 2003). A ATM é ativada principalmente em resposta a danos causados pelas radiações ionizantes e outros agentes que induzam quebras no DNA (Okazaki *et al.*, 2008). Por outro lado, ATR parece responder a lesões no DNA provocadas por agentes que bloqueiam a forquilha de duplicação, sendo particularmente importante na manutenção da integridade do complexo de replicação do DNA (Zhou & Elledge, 2000).

A síndrome Ataxia telangiectasia (AT) é uma doença autossômica recessiva causada pela falta ou inativação da proteína ATM. A doença foi primeiramente descrita em crianças e é caracterizada pela degeneração cerebelar, predisposição ao câncer, envelhecimento prematuro, retardo no crescimento, imunodeficiência, além de uma elevada sensibilidade aos efeitos da radiações ionizantes (Shiloh & Kastan, 2001).

No entanto, um dado interessante é que pacientes AT apresentam uma incidência aumentada de DM2, exibindo tanto resistência à insulina quanto intolerância a glicose, duas características marcantes da doença (Blevins & Gebhart, 1996; Schalck et al., 1970; Robinson & Kessling, 1992). Em conseqüência da relação entre as duas doenças, a participação da proteína ATM na sinalização da insulina e na resistência insulínica passou a ser estudada nos últimos anos (Miles *et al.*, 2007; Halaby *et al.*, 2008), mas ainda pouco tem sido esclarecido.

A ATM media a completa ativação do complexo AKT/PKB, onde AKT é um dos principais componentes da via de transdução de sinal PI3-quinase (Viniegra *et al.*, 2005). Em resposta à insulina, além de controlar a tradução de uma série de outros fatores, a AKT também controla a captação da glicose pela célula, pela regulação da GLUT4, molécula que media o transporte da glicose para o interior da célula (Bryant *et al.*, 2002). Assim, a ATM parece desempenhar um papel importante, atuando indiretamente na interiorização da glicose pela célula.

Assim, em pacientes AT, há relatos de que a falta da proteína ATM parece contribuir para o desenvolvimento de resistência insulínica, por não ativar as moléculas responsáveis pela interiorização da glicose (Miles *et al.*, 2007; Halaby *et al.*, 2008). O desenvolvimento da resistência insulínica também pode influenciar negativamente a expressão da proteína ATM. Halaby et al. (2008), ao estudarem camundongos induzidos a desenvolverem resistência insulínica, também detectaram uma menor expressão protéica de ATM, provavelmente pela repressão da transcrição desse gene. No entanto, os mecanismos envolvidos ainda são desconhecidos.

Mutações no gene *ATR* foram descritas na síndrome de Seckel (Griffith *et al.*, 2008), uma desordem recessiva autossômica que apresenta um retardo no desenvolvimento intrauterino, microencefalia e baixa estatura (Majewski & Goecke, 1982). A proteína MCPH1, codificada por um gene cuja mutação causa microencefalia, participa da via de sinalização de ATR (Alderton *et al.*, 2006), demonstrando que mutações em genes que integram a via ATR também podem causar esta síndrome. Além disso, o gene parece ser de grande importância no desenvolvimento, pois a deficiência do gene ATR teve como conseqüência a morte embrionária em camundongos (Brown & Baltimore, 2000).

Na comparação da expressão dos genes *ATM* e *ATR*, o grupo PAH apresentou uma repressão considerável dos genes *ATM* (FC = -1,08) e *ATR* (FC = -1,07). Se a resistência à insulina realmente diminui a expressão do gene *ATM* (Halaby et al., 2008), isso poderia explicar os resultados obtidos, pois mesmo com altos níveis de danos, ambos os genes sensores se mostraram reprimidos; provavelmente, o gene *ATR* pode também apresentar a sua expressão controlada por mecanismos semelhantes ao gene *ATM*, mas isso deverá ser investigado.

Além disso, a repressão desses genes pode estar colaborando com as taxas aumentadas de danos no DNA, conforme demonstrado pelo ensaio do cometa, indicando certa deficiência ou impossibilidade de os linfócitos responderem ao estresse oxidativo. O grupo PANH também apresentou repressão dos genes *ATM* (FC= -0,25) e *ATR* (FC= -0,27). A repressão foi menos acentuada, mas também pode demonstrar a influência da resistência à insulina na expressão do gene *ATM*.

Nos pacientes submetidos ao período de internação, foi observada indução dos genes *ATM* (FC= 0,85) e *ATR* (FC= 0,50) no grupo PI, mas ao contrário, uma repressão dos mesmos genes, *ATM* (FC= -1,37) e *ATR* (FC= -0,67), no grupo PPI. A

indução no grupo PI pode significar uma tentativa de as células se defenderem contra os níveis elevados de estresse oxidativo, superando até a influência da resistência à insulina na expressão de *ATM,* o que também pode ser verificado para a *SOD1*. Já a repressão apresentada pelo grupo PPI pode representar uma influência maior da resistência à insulina, tanto na expressão de *ATM* quanto *ATR*, pois o estresse oxidativo foi reduzido, visto os menores níveis de danos apresentados pelo grupo PPI em relação ao PI.

Por último, foi também avaliada a expressão gênica de genes relacionados ao mecanismo de reparo por excisão de base (BER): *OGG1* (*8-oxoguanine glycosylase*), *APEX1* (*APEX nuclease (multifuncional repair enzime) 1*), *XRCC1* (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1*) e *FEN1* (*Flap-structure specific endonuclease 1*).

Já foram descritas pelo menos 12 diferentes glicosilases no homem, com afinidades a diferentes tipos de dano, sendo que a OGG1 é uma delas (Dizdaroglu, 2005). Essa glicosilase tem uma alta afinidade pela base oxidada 8-oxoG, principalmente quando esta se encontra pareada com uma citosina (Bjelland & Seeberg, 2003). Sua importância na manutenção da estabilidade genômica tem sido comprovada por sua associação no desenvolvimento de certas doenças humanas, como o câncer (Boiteux & Radicella, 2000). A APEX1 é uma proteína de múltiplas funções, sendo uma das principais a sua participação no BER, onde realiza a retirada de sítios AP, realizando uma incisão na região 5' do açúcar abásico, resultante da retirada de uma base danificada no DNA (Evans *et al.*, 2000).

A XRCC1 é uma proteína que se liga a regiões de quebra, após a retirada de um sítio AP pela APEX1. Esta proteína forma um complexo com a polimerase β e a ligase III, sendo importante na ativação da última (Nash *et al.*, 1997; Zharkov, 2008). A FEN1 é uma proteína que participa apenas da via *long-patch* do BER, retirando a seqüência de 2-10 nucleotídeos que contém a base danificada, para que essa seqüência possa ser novamente sintetizada (Sancar *et al.*, 2004; Zharkov, 2008).

Com a análise da expressão destes genes, o objetivo foi principalmente obter um panorama geral da condição do sistema de reparo por excisão de bases. Assim, na comparação da expressão entre os grupos, o grupo PAH apresentou uma repressão transcricional acentuada dos quatro genes: *OGG1* (FC= -0,37), *APEX1* (FC= -1,09), *XRCC1* (FC= -0,65) e *FEN1* (FC= -0,51), o que também foi observado na expressão dos genes *SOD1*, *ATM* e *ATR* neste grupo. Para o grupo PANH, com

exceção do gene APEX1, que se mostrou reprimido (FC= -0,34), os outros três genes apresentaram uma indução: *OGG1* (FC= 0,22), *XRCC1* (FC= 0,16) e *FEN1* (FC= 0,24). Neste caso, parece que a via BER foi ativada em resposta aos danos no DNA. A OGG1 é uma glicosilase com função liase, ou seja, também é capaz de realizar uma incisão na região 5' do açúcar abásico (Matsumoto & Kim, 1995; Boiteux *et al.*, 2000). Dessa forma, o reparo pela via BER pode prosseguir mesmo com a repressão de *APEX1*, atuando preferencialmente pela via *short-patch*.

Com relação aos pacientes internados, o grupo PI apresentou uma diferença pequena, em termos de *Fold change*, dos genes analisados em relação ao grupo controle: APEX1 (FC= -0,06), *OGG1* (FC= -0,01), *XRCC1* (FC= 0,08) e *FEN1* (FC= 0,19). A sinalização de danos no DNA pela indução de *ATM* e *ATR* leva também à ativação de vários sistemas de reparo, para danos de base ou para a restauração de quebras no DNA. O grupo PPI também apresentou uma repressão acentuada dos quatro genes avaliados: APEX1 (FC= -2,14), *OGG1* (FC= -0,51), *XRCC1* (FC= -1,57) e *FEN1* (FC= -1,85).

É interessante notar que tanto o grupo PAH quanto PPI, apesar de apresentarem maiores níveis dano no DNA quando comparados ao grupo controle, também apresentaram uma repressão acentuada quanto aos genes *ATM*, *ATR*, *OGG1*, *XRCC1*, *APEX1* e *FEN1*. Apesar das ROS estarem predominantemente relacionadas com o dano nas estruturas celulares, estas moléculas apresentam uma importante função fisiológica, já que participam de cascatas de sinalização e regulação celular (Droge, 2002). Dessa forma, um maior estresse oxidativo apresentado por esses pacientes pode causar um descontrole de vias acionadas e reguladas por ROS, sendo que algumas podem estar, por conseqüência, reprimindo a expressão dos genes analisados, prejudicando o sistema de reparo, o qual já foi demonstrado como menos eficiente em pacientes diabéticos (Blasiak *et al.*, 2004).

É importante ressaltar novamente que, embora as diferenças observadas não tenham sido estatisticamente significativas para os resultados de expressão gênica, comparação entre grupos, os dados aqui discutidos representam tendências de indução ou repressão dos genes estudados, o que pode representar um significado biológico importante. Dessa forma, um maior número amostral se faz necessário para a confirmação desses achados.

Como já mencionado, não somente a via BER participa do reparo de dano oxidativo, mas outros sistemas de reparo, como o NER e o reparo tipo *mismatch*

também participam (Slupphaug *et al.*, 2003). Além da influência já citada da resistência à insulina na regulação da expressão da *ATM*, existem fortes evidências de que a insulina regula a síntese da proteína XPD, a qual é de grande importância para o NER. Dessa forma, pacientes que não produzem ou que apresentam resistência à insulina, podem apresentar um NER menos eficiente. Além disso, uma longa exposição a altas taxas de glicose pode levar à inibição da regulação da síntese de XPD pela insulina, influenciando também na eficiência de reparo (Merkel *et al.*, 2003; Blasiak *et al.*, 2004).

Entretanto, a ação da defesa antioxidante também não pode ser descartada. Segundo Blasiak *et al.* (2004), se pacientes diabéticos realmente apresentam uma menor defesa antioxidante, sendo que o DNA supostamente sofre uma maior quantidade de danos, já que muitos desses não são eliminados. Assim, uma quantidade maior de danos remanescentes também levará maior tempo para serem reparados. Por esse motivo, a hipótese de que pacientes DM2 apresentam um reparo menos eficiente deve ser estudada mais detalhadamente.

Existem crescentes evidências relacionando o diabetes ao câncer, como por exemplo, o câncer colo-retal, que está relacionado com o descontrole nos níveis de glicose e insulina (Saydah *et al.*, 2003; Blasiak *et al.*, 2004). O mecanismo de reparo do DNA tem um papel fundamental na transformação neoplásica, sendo que um reparo menos eficiente pode levar a uma maior suscetibilidade a agentes mutagênicos, gerando uma instabilidade genômica que pode ser o primeiro passo para o desenvolvimento do câncer (Bignold, 2003). Assim, em conjunto, um sistema de reparo menos eficiente, associado a um nível maior de danos no DNA são fatores de grande importância para o desenvolvimento neoplásico, fatores que podem levar este risco aos pacientes com diabetes.

Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os pacientes DM2 são mais suscetíveis a acumularem danos no DNA, mas somente se apresentarem níveis glicêmicos elevados na corrente sanguínea. Além disso, os dados acerca da expressão gênica sugerem que pacientes DM2 regulam diferencialmente genes envolvidos com os processos de defesa, sinalização e reparo do DNA em resposta ao estresse oxidativo, o que pode estar relacionado aos níveis de dano observados em cada grupo analisado. Os mecanismos envolvidos na regulação desses processos são muito complexos e ainda pouco elucidados. Estudos que relacionem diferentes aspectos da doença com a expressão de genes,

como no presente trabalho, podem contribuir com informações relevantes sobre as causas e conseqüências da doença.

6- CONCLUSÕES:

Na tentativa de manter a integridade das estruturas celulares contra a ação do estresse oxidativo, a célula possui uma série de mecanismos de defesa, com o objetivo de manter a homeostase redox da célula. A hiperglicemia em pacientes com DM2 parece ser responsável pela alta produção de espécies reativas de oxigênio nesses pacientes, danificando proteínas, lipídeos e também a molécula de DNA. Assim, foi verificada a influência da hiperglicemia na indução de danos no DNA, bem como na resposta transcricional de genes relacionados à defesa, sinalização e reparo do dano oxidativo. Os resultados descritos permitem as seguintes conclusões:

1) O grupo de pacientes DM2 hiperglicêmicos (PAH) apresentou maiores níveis de dano em relação ao grupo de pacientes DM2 não hiperglicêmicos (PANH), demonstrando que a hiperglicemia atua como principal causa do estresse oxidativo.

2) Após o período de internação, o grupo PPI apresentou níveis de dano menores em comparação ao grupo PI, porém, maiores que os indivíduos controles, demonstrando que o controle glicêmico adquirido durante sete dias foi suficiente para a diminuição dos níveis de danos no DNA, embora ainda acima dos valores apresentados pelos indivíduos não diabéticos.

3) A utilização da enzima hOGG1 permitiu a detecção de níveis maiores de dano pelo ensaio do Cometa em todos os grupos analisados, mas não foi imprescindível na detecção de diferenças entre os grupos.

4) Não houve diferenças significativas na expressão transcricional dos genes (*ATM*, *ATR*, *SOD1*, *OGG1*, *XRCC1*, *APEX1* e *FEN1*) estudados, conforme análise comparativa entre os grupos analisados.

5) Apesar disso, não pode ser excluída a possibilidade de um significado biológico importante ligado à repressão dos genes de sinalização e de reparo do DNA, inclusive em grupos de pacientes com elevados níveis glicêmicos e de danos no DNA. Tais dados podem sugerir que os danos aumentados apresentados por esees grupos também podem ter sido conseqüência de um sistema de defesa menos eficiente.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Alderton GK, Galbiati L, Griffith E, Surinya KH, Neitzel H, Jackson AP, Jeggo PA and O'Driscoll M. 2006. Regulation of mitotic entry by microcephalin and its overlap with ATR signalling. Nat Cell Biol 87: 725-733.

Arnheim N and Cortopassi G. 1992. Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues. Mutat Res 2753-6: 157-167.

Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S and Hammarstrom ML. 2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. Scand J Immunol 596: 566-573.

Bassi CL, Mello SS, Fachin AL and Sakamoto Hojo ET. 2004. Genomic Instability in response to DNA lesions induced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells. Biocience Journal: 59-78.

Baynes JW. 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes 404: 405-412.

Beckman KB and Ames BN. 1998. The free radical theory of aging matures. Physiol Rev 782: 547-581.

Bignold LP. 2003. Initiation of genetic instability and tumour formation: a review and hypothesis of a nongenotoxic mechanism. Cell Mol Life Sci 606: 1107-1117.

Bjelland S and Seeberg E. 2003. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. Mutat Res 5311-2: 37-80.

Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Zadrozny M, Kasznicki J, Zurawska M and Drzewoski J. 2004. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. Mutat Res 5541-2: 297-304.

Bohr VA. 2002. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. Free Radic Biol Med 329: 804-812.

Boiteux S and Radicella JP. 2000. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. Arch Biochem Biophys 3771: 1-8.

Bourdon E, Loreau N and Blache D. 1999. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. Faseb J 132: 233-244.

Brown EJ and Baltimore D. 2000. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. Genes Dev 144: 397-402.

Bryant NJ, Govers R and James DE. 2002. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. Nat Rev Mol Cell Biol 34: 267-277.

Cakatay U. 2005. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. Diabetes Metab 316: 551-557.

Chio A, Traynor BJ, Lombardo F, Fimognari M, Calvo A, Ghiglione P, Mutani R and Restagno G. 2008. Prevalence of SOD1 mutations in the Italian ALS population. Neurology 707: 533-537.

Choi SW, Benzie IF, Lam CS, Chat SW, Lam J, Yiu CH, Kwan JJ, Tang YH, Yeung GS, Yeung VT, Woo GC, Hannigan BM and Strain JJ. 2005. Inter-relationships between DNA damage, ascorbic acid and glycaemic control in Type 2 diabetes mellitus. Diabet Med 2210: 1347-1353.

Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC and Stetina R. 2008. The comet assay: topical issues. Mutagenesis 233: 143-151.

Collins AR, Raslova K, Somorovska M, Petrovska H, Ondrusova A, Vohnout B, Fabry R and Dusinska M. 1998. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. Free Radic Biol Med 253: 373-377.

Collins AR. 1999. Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. Bioessays 213: 238-246.

Desideri A and Falconi M. 2003. Prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. Biochem Soc Trans 31Pt 6: 1322-1325.

Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M and Rodriguez H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. Free Radic Biol Med 3211: 1102-1115.

Dizdaroglu M. 2005. Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. Mutat Res 5911-2: 45-59.

Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 821: 47-95.

Evans AR, Limp-Foster M and Kelley MR. 2000. Going APE over ref-1. Mutat Res 4612: 83-108.

Formiguera X and Canton A. 2004. Obesity: epidemiology and clinical aspects. Best Pract Res Clin Gastroenterol 186: 1125-1146.

Gerich JE. 1999. Is insulin resistance the principal cause of type 2 diabetes? Diabetes Obes Metab 15: 257-263.

Giugliano D, Ceriello A and Paolisso G. 1995. Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? Metabolism 443: 363-368.

Golay A and Ybarra J. 2005. Link between obesity and type 2 diabetes. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 194: 649-663.
Gorus FK, Weets I, Couck P and Pipeleers DG. 2004. Epidemiology of type 1 and type 2 diabetes. The added value of diabetes registries for conducting clinical studies: the Belgian paradigm. Acta Clin Belg 591: 1-13.
Griffith E, Walker S, Martin CA, Vagnarelli P, Stiff T, Vernay B, Al Sanna N, Saggar A, Hamel B, Earnshaw WC, Jeggo PA, Jackson AP and O'Driscoll M. 2008. Mutations in pericentrin cause Seckel syndrome with defective ATR-dependent DNA damage signaling. Nat Genet 402: 232-236.
Gu Y, Parker A, Wilson TM, Bai H, Chang DY and Lu AL. 2002. Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. - J Biol Chem 27713: 11135-11142.
Halaby MJ, Hibma JC, He J and Yang DQ. 2008. ATM protein kinase mediates full activation of Akt and regulates glucose transporter 4 translocation by insulin in muscle cells. Cell Signal 208: 1555-1563.
Hannon-Fletcher MP, O'Kane MJ, Moles KW, Weatherup C, Barnett CR and Barnett YA. 2000. Levels of peripheral blood cell DNA damage in insulin dependent diabetes mellitus human subjects. Mutat Res 4601: 53-60.
Hatahet Z, Purmal AA and Wallace SS. 1994. Oxidative DNA lesions as blocks to in vitro transcription by phage T7 RNA polymerase. Ann N Y Acad Sci 726: 346-348.
Hoeijmakers JH. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 4116835: 366-374.
Karakaya A, Jaruga P, Bohr VA, Grollman AP and Dizdaroglu M. 1997. Kinetics of excision of purine lesions from DNA by Escherichia coli Fpg protein. Nucleic Acids Res 253: 474-479.
Karlen Y, McNair A, Perseguers S, Mazza C and Mermod N. 2007. Statistical significance of quantitative PCR. BMC Bioinformatics 8: 131.
Klungland A and Bjelland S. 2007. Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1. DNA Repair (Amst) 64: 481-488.
Klungland A and Lindahl T. 1997. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). Embo J 1611: 3341-3348.
Kohn LD, Wallace B, Schwartz F and McCall K. 2005. Is type 2 diabetes an autoimmune-inflammatory disorder of the innate immune system? Endocrinology 14610: 4189-4191.
Krokan HE, Drablos F and Slupphaug G. 2002. Uracil in DNA--occurrence, consequences and repair. Oncogene 2158: 8935-8948.
Kruger DF, Martin CL and Sadler CE. 2006. New insights into glucose regulation. Diabetes Educ 322: 221-228.
Kumaravel TS and Jha AN. 2006. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. Mutat Res 6051-2: 7-16.
Lam TK, Carpentier A, Lewis GF, van de Werve G, Fantus IG and Giacca A. 2003. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. Am J Physiol Endocrinol Metab 2845: E863-873.
Leonard SS, Harris GK and Shi X. 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. Free Radic Biol Med 3712: 1921-1942.
Lim KS, Jeyaseelan K, Whiteman M, Jenner A and Halliwell B. 2005. Oxidative damage in mitochondrial DNA is not extensive. Ann N Y Acad Sci 1042: 210-220.
Lin MT and Beal MF. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature 4437113: 787-795.
Lindahl T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 3626422: 709-715.
Lipinski LJ, Hoehr N, Mazur SJ, Dianov GL, Senturker S, Dizdaroglu M and Bohr VA. 1999. Repair of oxidative DNA base lesions induced by fluorescent light is defective in xeroderma pigmentosum group A cells. Nucleic Acids Res 2715: 3153-3158.
Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 254: 402-408.
Lodovici M, Giovannelli L, Pitozzi V, Bigagli E, Bardini G and Rotella CM. 2007. Oxidative DNA damage and plasma antioxidant capacity in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. Mutat Res.
Majewski F and Goecke T. 1982. Studies of microcephalic primordial dwarfism I: approach to a delineation of the Seckel syndrome. Am J Med Genet 121: 7-21.

Mathis D, Vence L and Benoist C. 2001. beta-Cell death during progression to diabetes. Nature 4146865: 792-798.
Matsumoto Y and Kim K. 1995. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. Science 2695224: 699-702.
Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, Leguen C, Baxter MA, Thorpe GH, Jones AF and Barnett AH. 1997. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. Eur J Clin Invest 276: 484-490.
Mazurek A, Berardini M and Fishel R. 2002. Activation of human MutS homologs by 8 oxo guanine DNA damage. - J Biol Chem 27710: 8260-8266.
Merkel P, Khoury N, Bertolotto C and Perfetti R. 2003. Insulin and glucose regulate the expression of the DNA repair enzyme XPD. Mol Cell Endocrinol 2011-2: 75-85.
Michiels C, Raes M, Toussaint O and Remacle J. 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. Free Radic Biol Med 173: 235-248.
Miles PD, Treuner K, Latronica M, Olefsky JM and Barlow C. 2007. Impaired insulin secretion in a mouse model of ataxia telangiectasia. Am J Physiol Endocrinol Metab 2931: E70-74.
Moller DE. 2001. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. Nature 4146865: 821-827.
Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, Zhou G, Williamson JM, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A and Goodyear LJ. 2002. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. Diabetes 517: 2074-2081.
Nash RA, Caldecott KW, Barnes DE and Lindahl T. 1997. XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. Biochemistry 3617: 5207-5211.
Nesse RM and Williams GC. 1998. Evolution and the origins of disease. Sci Am 2795: 86-93.
Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I and Brownlee M. 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature 4046779: 787-790.
Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, McCarthy S, Betteridge DJ and Wolff SP. 1995. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. Diabetes 449: 1054-1058.
Nuttall SL, Dunne F, Kendall MJ and Martin U. 1999. Age-independent oxidative stress in elderly patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Qjm 921: 33-38.
Okazaki T, Jiao L, Chang P, Evans DB, Abbruzzese JL and Li D. 2008. Single-nucleotide polymorphisms of DNA damage response genes are associated with overall survival in patients with pancreatic cancer. Clin Cancer Res 147: 2042-2048.
Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S, Lowe JE and Abdel-Aleem S. 1999. Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. Metabolism 4811: 1414-1417.
Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Legrand A and Beaudeux JL. 2005. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. Metabolism 546: 829-834.
Pierce M, Keen H and Bradley C. 1995. Risk of diabetes in offspring of parents with non-insulin-dependent diabetes. Diabet Med 121: 6-13.
Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F and Chiarpotto E. 2004. Oxidative stress and cell signalling. Curr Med Chem 119: 1163-1182.
Redondo MJ and Eisenbarth GS. 2002. Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders. Diabetologia 455: 605-622.
Richter C, Park JW and Ames BN. 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. Proc Natl Acad Sci U S A 8517: 6465-6467.
Robinson S and Kessling A. 1992. Diabetes secondary to genetic disorders. Baillieres Clin Endocrinol Metab 64: 867-898.
Rosenquist TA, Zharkov DO and Grollman AP. 1997. Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. Proc Natl Acad Sci U S A 9414: 7429-7434.
Saha A, Adak S, Chowdhury S and Bhattacharyya M. 2005. Enhanced oxygen releasing capacity and oxidative stress in diabetes mellitus and diabetes mellitus-associated cardiovascular disease: a comparative study. Clin Chim Acta 3611-2: 141-149.
Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K and Linn S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annu Rev Biochem 73: 39-85.
Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K and Linn S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annu Rev Biochem 73: 39-85.

Santos JH, Hunakova L, Chen Y, Bortner C and Van Houten B. 2003. Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. J Biol Chem 2783: 1728-1734.
Saydah SH, Platz EA, Rifai N, Pollak MN, Brancati FL and Helzlsouer KJ. 2003. Association of markers of insulin and glucose control with subsequent colorectal cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 125: 412-418.
Schorah CJ, Bishop N, Wales JK, Hansbro PM and Habibzadeh N. 1988. Blood vitamin C concentrations in patients with diabetes mellitus. Int J Vitam Nutr Res 583: 312-318.
Seghrouchni I, Drai J, Bannier E, Riviere J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J and Revol A. 2002. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. Clin Chim Acta 3211-2: 89-96.
Seghrouchni I, Drai J, Bannier E, Riviere J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J and Revol A. 2002. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. Clin Chim Acta 3211-2: 89-96.
Sethi JK and Hotamisligil GS. 1999. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. Semin Cell Dev Biol 101: 19-29.
Shibutani S, Takeshita M and Grollman AP. 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. Nature 3496308: 431-434.
Shiloh Y and Kastan MB. 2001. ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. Adv Cancer Res 83: 209-254.
Shiloh Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. Nat Rev Cancer 33: 155-168.
Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 1751: 184-191.
Sliwinska A, Blasiak J, Kasznicki J and Drzewoski J. 2008. In vitro effect of gliclazide on DNA damage and repair in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). Chem Biol Interact 1733: 159-165.
Slupphaug G, Kavli B and Krokan HE. 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. Mutat Res 5311-2: 231-251.
Slupphaug G, Kavli B and Krokan HE. 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. Mutat Res 5311-2: 231-251.
Smith CC, O'Donovan M R and Martin EA. 2006. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. Mutagenesis.
Song F, Jia W, Yao Y, Hu Y, Lei L, Lin J, Sun X and Liu L. 2007. Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes. Clin Sci (Lond) 11212: 599-606.
Speit G, Schutz P, Bonzheim I, Trenz K and Hoffmann H. 2004. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. Toxicol Lett 1462: 151-158.
Squier TC. 2001. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. Exp Gerontol 369: 1539-1550.
Stadtman ER and Levine RL. 2000. Protein oxidation. Ann N Y Acad Sci 899: 191-208.
Stumvoll M, Goldstein BJ and van Haeften TW. 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. Lancet 3659467: 1333-1346.
Suji G and Sivakami S. 2004. Glucose, glycation and aging. Biogerontology 56: 365-373.
Sukhanova MV, Khodyreva SN, Lebedeva NA, Prasad R, Wilson SH and Lavrik OI. 2005. Human base excision repair enzymes apurinic/apyrimidinic endonuclease1 (APE1), DNA polymerase beta and poly(ADP-ribose) polymerase 1: interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity. Nucleic Acids Res 334: 1222-1229.
Taylor SI. 1999. Deconstructing type 2 diabetes. Cell 971: 9-12.
Tisch R and McDevitt H. 1996. Insulin-dependent diabetes mellitus. Cell 853: 291-297.
Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ and Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Mol Cell Biochem 2661-2: 37-56.
Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M and Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact 1601: 1-40.
VanderJagt DJ, Harrison JM, Ratliff DM, Hunsaker LA and Vander Jagt DL. 2001. Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. Clin Biochem 344: 265-270.
Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 37: RESEARCH0034.

Viniegra JG, Martinez N, Modirassari P, Losa JH, Parada Cobo C, Lobo VJ, Luquero CI, Alvarez-Vallina L, Ramon y Cajal S, Rojas JM and Sanchez-Prieto R. 2005. Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM. J Biol Chem 2806: 4029-4036.
White MF. 1997. The insulin signalling system and the IRS proteins. Diabetologia 40 Suppl 2: S2-17.
Wick G, Berger P, Jansen-Durr P and Grubeck-Loebenstein B. 2003. A Darwinian-evolutionary concept of age-related diseases. Exp Gerontol 381-2: 13-25.
Wiernsperger NF. 2003. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. Diabetes Metab 296: 579-585.
Yim MB, Yim HS, Lee C, Kang SO and Chock PB. 2001. Protein glycation: creation of catalytic sites for free radical generation. Ann N Y Acad Sci 928: 48-53.
Yuan JS, Reed A, Chen F and Stewart CN, Jr. 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics 7: 85.
Zelko IN, Mariani TJ and Folz RJ. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radic Biol Med 333: 337-349.
Zharkov DO, Rosenquist TA, Gerchman SE and Grollman AP. 2000. Substrate specificity and reaction mechanism of murine 8-oxoguanine-DNA glycosylase. J Biol Chem 27537: 28607-28617.
Zharkov DO. 2008. Base excision DNA repair. Cell Mol Life Sci 6510: 1544-1565.
Zhou BB and Elledge SJ. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature 4086811: 433-439.
Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WGt, Schlattner U, Neumann D, Brownlee M, Freeman MB and Goldman MH. 2004. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. J Biol Chem 27942: 43940-43951.

8- Anexos:

Anexo A

FFCLRP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - FFCLRP-USP
Departamento de Biologia
Avenida Bandeirantes, 3900
14040-901 – Ribeirão Preto – SP
Telefone/Fax: (0xx16) 6023666 – 6023874

Ribeirão Preto, 03 de agosto de 2006

Ilmº Sr
Prof Dr Carlos Henrique de Brito Cruz
DD Diretor Científico-FAPESP
Rua Pio XI 1500
05468-901 Alto da Lapa
SÃO PAULO, SP

Ref.: Proc. nº 06/1985-76

Prezado Prof. Brito Cruz,

Venho solicitar **a inclusão do documento (em anexo) relativo à aprovação** do projeto de mestrado do aluno Danilo Jordão Xavier, pelo **Comitê de Ética em Pesquisa** – HC-FMRP-USP, processo nº 7066/2006, recentemente aprovado pelo CEP.

Título do projeto: "INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA SOBRE OS PADRÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2, ANTES E APÓS O TRATAMENTO".

Pós-graduando: **Danilo Jordão Xavier**

Aproveito a oportunidade para agradecer a atenção e suporte constante da Fundação.

Cordialmente, subscrevo-me.

Profª Drª Elza T. Sakamoto Hojo
Depto Biologia-FFCLRP, USP
e-mail: etshojo@usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
www.hcrp.fmrp.usp.br
USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

Ribeirão Preto, 20 de julho de 2006

Ofício nº 2004/2006
CEP/SPC

Prezado Senhor:

O trabalho intitulado **"INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA SOBRE OS PADRÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2, ANTES E APÓS O TRATAMENTO",** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 229ª Reunião Ordinária realizada em 17/07/2006, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,** de acordo com o Processo HCRP nº 7066/2006.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROF.DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
DANILO JORDÃO XAVIER
PROFª DRª ELZA TIEMI SAKAMOTO HOJO (Orientadora)
Depto. de Genética – FMRP-USP
Em mãos

HC - Campus Universitário
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP
(016)3602-2228
cep@hcrp.fmrp.usp.br

Anexo B:

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 633-1000 - Fax: 633-1144
CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTES

NOME DA PESQUISA: INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA SOBRE OS PADRÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2, ANTES E APÓS O TRATAMENTO.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Danilo Jordão Xavier

ENDEREÇO PARA CONTATO : Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14049-900
Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Bloco G
Depeartamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).
Telefone : (16) 3602-3082

Prezado (a) doador (a),

A Diabetes Mellitus é uma doença que afeta um grande número de pessoas, tanto no Brasil quanto no restante do mundo, sendo que uma das principais características da doença é a hiperglicemia, ou seja, uma quantidade aumentada de açúcar (glicose) no sangue, acima dos níveis normais. Neste trabalho, queremos investigar quais são os genes que possam ser responsáveis pelo desenvolvimento da diabetes ou das complicações e problemas que resultam das taxas elevadas de açúcar no sangue. Com essa finalidade, necessitamos coletar uma amostra de 20 mL de sangue antes do tratamento (quando o exame apresentar um alto nível de açúcar no sangue) e depois do tratamento em regime de internação (quando a taxa de glicose ficar normal).

Este tipo de estudo nos ajudará a compreender melhor esta doença (Diabetes) tão complicada e, no futuro, junto com informações de outras pesquisas, poderá contribuir para melhorar o tratamento, ou mesmo para prevenir a doença.

Caso concorde em participar da pesquisa, serão coletados 20ml do seu sangue. Portanto, você sofrerá o incômodo de uma picada de agulha, mas não haverá risco à sua saúde. A coleta será feita por um profissional capacitado, no dia em que você vier ao ambulatório para fazer a consulta. Você não terá que realizar nenhum gasto para fazer a coleta de sangue e também não será remunerado (a) pela sua contribuição.

Se aceitar participar da pesquisa, você poderá pedir esclarecimentos sobre como o material está sendo utilizado sempre que achar necessário. Nós asseguramos que a sua identificação será

considerada confidencial, ou seja, você não será identificado (a) em nenhum trabalho científico.Você não é, de modo algum, obrigado a colaborar com esta pesquisa e, mesmo que concordar agora, poderá retirar o seu consentimento a qualquer momento que desejar. Colaborando ou não com a pesquisa, você continuará recebendo a mesma atenção e tratamento; este não será prejudicado sob hipótese alguma, mesmo que por algum motivo você deixe de participar da pesquisa. Gostaríamos ainda de esclarecer que, caso seja de nosso interesse realizar outro tipo de estudo com o seu sangue, você será informado (a) sobre esse novo trabalho e seu material só será utilizado com o seu consentimento.

_____

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Eu,_____, RG nº_____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima e ciente dos meus direitos, abaixo relacionados, concordo em participar da pesquisa.

Serão preservados os direitos do doador, conforme seguem:

1) A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa e com o tratamento no hospital;
2) A liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo em relação ao tratamento;
3) A segurança de não ser identificado e que a participação terá o caráter confidencial;
4) Receber informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade de continuar participando;
5) Não serão substituídas ou modificadas quaisquer medicações por conta deste estudo, não havendo prejuízos quanto ao tratamento clínico instituído neste ambulatório;
6) Pelo fato desta pesquisa não impor risco à saúde dos pacientes, não haverá a necessidade de conceder remuneração ou ressarcimento aos participantes, mas em casos excepcionais, caso o paciente se sinta lesado com o procedimento da coleta de sangue, este poderá requerer os seus direitos de acordo com as leis vigentes no país.
7) Caso haja algum gasto adicional, este ocorrerá por conta do pesquisador.

Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

Ribeirão Preto,____de_____de_____.

_____

Assinatura do doador

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 633-1000 - Fax: 633-1144
CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLES

NOME DA PESQUISA: INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA SOBRE OS PADRÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2, ANTES E APÓS O TRATAMENTO.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Danilo Jordão Xavier

ENDEREÇO PARA CONTATO : Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14049-900
Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Bloco G
Depeartamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).
Telefone : (16) 3602-3082

Prezado (a) doador (a),

A Diabetes Mellitus é uma doença que afeta um grande número de pessoas, tanto no Brasil quanto no restante do mundo, sendo que uma das principais características da doença é a hiperglicemia, ou seja, uma quantidade aumentada de açúcar (glicose) no sangue, acima dos níveis normais. Neste trabalho, queremos investigar quais são os genes que possam ser responsáveis pela Diabetes ou pelas complicações e problemas que resultam das taxas elevadas de açúcar no sangue. Para isso, é preciso avaliar pacientes diabéticos antes do tratamento (com altos níveis de açúcar no sangue) e depois do tratamento (com níveis de açúcar normais).

Este tipo de estudo nos ajuda a compreender melhor esta doença tão complicada e, no futuro, junto com informações de outras pesquisas, poderá contribuir para melhora do tratamento e/ou da prevenção da doença. Para a realização desta pesquisa, é necessária a participação de pessoas que não apresentem a doença, além dos pacientes diabéticos, para podermos comparar os resultados entre diabéticos e não diabéticos.

Caso concorde em participar da pesquisa, cerca de 20 mL de seu sangue será retirado do volume de sangue doado ao hemocentro, ou seja, você não precisará doar uma quantidade maior de sangue, não havendo risco ou outra "picada" de agulha. Você não terá que realizar nenhum gasto para fazer a doação e também não será remunerado (a) pela sua contribuição. A coleta será feita pelo enfermeiro responsável pelo procedimento de coleta no Hemocentro, de modo que você receberá assistência adequada durante a coleta.

Você poderá pedir esclarecimentos sobre como o material está sendo utilizado sempre que achar necessário. Você não será identificado (a) em nenhum trabalho científico ou nas apresentações deste, sendo mesmo tendo concordado a participar, tem o direito a retirar o seu consentimento a

qualquer momento. Colaborando ou não com a pesquisa, você continuará recebendo a mesma atenção, não sendo prejudicado sob hipótese alguma por causa da sua participação ou não neste trabalho. Gostaríamos ainda de esclarecer que, caso seja de nosso interesse realizar outro tipo de estudo com o material doado, você será informado (a) sobre esse novo trabalho e seu material só será utilizado com o seu consentimento.

_____

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Eu,_____, RG nº_____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima e ciente dos meus direitos, abaixo relacionados, concordo em participar da pesquisa.

Serão preservados os direitos do doador, conforme seguem:

1) A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa;
2) A liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga algum prejuízo ou constrangimento;
3) A segurança de não ser identificado e que a participação terá o caráter confidencial;
4) Receber informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade de continuar participando;
5) Não haverá a necessidade de conceder remuneração ou ressarcimento aos participantes, mas em casos excepcionais, caso o paciente se sinta lesado com o procedimento da coleta de sangue, este poderá requerer os seus direitos de acordo com as leis vigentes no país.
6) Caso haja algum gasto adicional, este ocorrerá por conta do pesquisador.

Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

Ribeirão Preto,____de_____de_____.

_____

Assinatura do doador

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