

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Etiane Tatsch**

**DANO AO DNA NO DIABETES TIPO 2 E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO, DISFUNÇÃO ENDOTELIAL,  
RESISTÊNCIA À INSULINA E À OCORRÊNCIA DE COMPLICAÇÕES  
CRÔNICAS MICROVASCULARES**

Santa Maria, RS

2016

**Etiane Tatsch**

**DANO AO DNA NO DIABETES TIPO 2 E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO, DISFUNÇÃO ENDOTELIAL,  
RESISTÊNCIA À INSULINA E À OCORRÊNCIA DE COMPLICAÇÕES CRÔNICAS  
MICROVASCULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco  
Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher

Santa Maria, RS  
2016

**Etiane Tatsch**

**DANO AO DNA NO DIABETES TIPO 2 E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO, DISFUNÇÃO ENDOTELIAL,  
RESISTÊNCIA À INSULINA E À OCORRÊNCIA DE COMPLICAÇÕES CRÔNICAS  
MICROVASCULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 15 de março de 2016:**

---

**Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Rodrigo de Almeida Vaucher, Dr. (UNIFRA)**  
(Co-orientador)

---

**Solange Cristina Garcia, Dra. (UFRGS)**

---

**Flavia Valladão Thiesen, Dra. (PUCRS)**

---

**Maristela de Oliveira Beck, Dra. (UFSM)**

---

**Liliane de Freitas Bauermann, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2016

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos meus pais que foram meu alicerce e nortearam a minha educação, permitindo eu chegar até aqui. Essa vitória é de vocês.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a Deus e os guias espirituais por sempre estarem presente e guiarem a minha vida.*

*Aos meus pais, João Carlos e Rose pelo incentivo profissional, sempre apoiando as minhas escolhas e me amparando quando necessário. Amo vocês!*

*A minha irmã Francine que sempre me apoiou e acreditou em mim. Obrigada também por ter me dado a minha afilhada Ana Laura, que com seu sorriso cativante me ajuda a seguir em frente. Amo vocês.*

*Ao meu namorado Diego pela cumplicidade, paciência e ajuda. Obrigada por estar sempre presente em todos os momentos.*

*Ao meu orientador Professor Dr. Rafael, pela oportunidade, confiança, carinho, dedicação, paciência e ensinamentos em todos os momentos nestes últimos seis anos. O conhecimento que adquiri contigo, com certeza será eternamente lembrado. É um exemplo de ser humano, amigo, professor, pesquisador e orientador. Serei eternamente grata.*

*A todos os meus colegas de laboratório e com certeza grandes amigos Bruna, Guilherme, José, Lara, Luiz Carlos, Luiz, Naiara, Natieli, Manuela, Vanessa e Yãnaí que sempre estiveram presentes em todas as etapas desta minha jornada acadêmica. Obrigada pelas trocas e enriquecimento de ideias, e acima de tudo pela amizade de vocês.*

*Ao meu co-orientador Professor Dr. Rodrigo pelo conhecimento passado e constante disposição em ajudar.*

*A Dra. Sílvia Londero por ter aberto as portas do seu consultório médico para a realização deste projeto, além dos ensinamentos passados.*

*A Professora Dra. Marta e Professora Dra. Ivana pelo apoio de sempre no decorrer do trabalho. Obrigada de coração!*

*A Professora Dra. Melissa e ao Professor Dr. Fábio por sempre estarem dispostos a ajudar. Muito obrigada mesmo!*

*As professoras Dra. Solange, Dra. Flavia, Dra. Maristela, Dra. Liliane, por disporem do seu tempo para compor a banca examinadora desta tese.*

*A UFSM e o PPGCF pela oportunidade de realizar este trabalho.*

*A CAPES e FAPERGS pela bolsa cedida ao longo do doutorado.*

*A todos aqueles que de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.*

*Aos demais familiares e amigos pela ajuda e “energias positivas”, mesmo que de longe, sempre me ajudaram a ir em frente e não desistir.*

*A todos que fazem parte da minha vida, por estarem comemorando comigo mais esta vitória.*

*Se o desejo de alcançar a meta estiver vigorosamente vivo dentro de nós, não nos faltarão forças para encontrar os meios de alcançá-la e traduzi-la em atos.*

*Albert Einstein*

## RESUMO

### DANO AO DNA NO DIABETES TIPO 2 E SUA ASSOCIAÇÃO COM INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO, DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, RESISTÊNCIA À INSULINA E À OCORRÊNCIA DE COMPLICAÇÕES CRÔNICAS MICROVASCULARES

AUTORA: Etiane Tatsch

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher

Diversos mecanismos fisiopatológicos estão associados ao Diabetes *Mellitus* (DM) tipo 2, como glicotoxicidade, resistência à insulina, inflamação, estresse oxidativo e disfunção endotelial, podendo resultar em quebras nos filamentos de DNA e modificações nas bases nitrogenadas. Desta maneira, biomarcadores de dano ao DNA podem ser úteis na elucidação da fisiopatologia do DM, bem como uma alternativa para a melhor avaliação de suas complicações crônicas. No entanto, muitos destes mecanismos fisiopatológicos relacionados ao aumento do dano ao DNA no diabetes precisam ser esclarecidos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o dano ao DNA no DM tipo 2 e sua associação com inflamação, oxidação proteica, disfunção endotelial, resistência à insulina e à ocorrência de complicações crônicas microvasculares. O dano ao DNA foi avaliado através do ensaio cometa e dos níveis de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) urinário, o processo inflamatório através dos níveis séricos das interleucinas (IL) 1, 6 e 10 e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a oxidação proteica através dos níveis plasmáticos dos produtos proteicos de oxidação avançada (AOPPs), a disfunção endotelial através dos níveis séricos de NOx (nitrito/nitrato) e albumina urinária e a resistência insulínica através do índice HOMA-IR. O presente estudo foi conduzido em duas fases. Na primeira fase 32 pacientes com DM tipo 2 e 30 controles saudáveis foram investigados. Na segunda fase 54 pacientes com DM tipo 2 e 22 indivíduos controle foram recrutados no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). Neste estudo, foi verificado que os pacientes com DM tipo 2 apresentaram aumento na fragmentação do DNA, avaliado pelo ensaio cometa, e um maior dano oxidativo ao DNA, avaliado pelos níveis urinários de 8-OHdG, comparados com indivíduos controles saudáveis. Também foi verificado no grupo DM tipo 2 com controle glicêmico inadequado um maior dano ao DNA. Quando foram analisadas as áreas sob a curva ROC obtidas, verificamos que o 8-OHdG urinário apresentou uma maior capacidade diagnóstica em identificar as complicações crônicas microvasculares, quando comparada com a albumina urinária no grupo DM tipo 2. Além disso, foi demonstrado que os pacientes diabéticos tipo 2 com complicações microvasculares apresentaram maiores níveis de dano oxidativo ao DNA, comparado aos pacientes que não apresentavam estas complicações. Interessantemente, foi observado que os pacientes DM tipo 2 com maior dano ao DNA apresentaram maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , além de um decréscimo nos níveis de IL-10, considerada um citocina anti-inflamatória. Também foi verificada uma associação entre o aumento do dano ao DNA no DM tipo 2 e o índice HOMA-IR, os níveis de AOPPs e os níveis de NOx e albumina urinária. Desta forma, nós especulamos que os pacientes com DM tipo 2 apresentaram uma cascata de eventos como, resistência à insulina, processo inflamatório, disfunção endotelial e aumento da geração de espécies reativas, fatores que podem contribuir diretamente para o aumento do dano ao DNA.

**Palavras-chave:** Diabetes tipo 2. Dano ao DNA. Inflamação. Oxidação Proteica. Disfunção Endotelial. Resistência Insulínica. Complicações Microvasculares.

## ABSTRACT

### **DNA DAMAGE IN TYPE 2 DIABETES AND ITS ASSOCIATION WITH INFLAMMATION, OXIDATIVE STRESS, ENDOTHELIAL DYSFUNCTION, INSULIN RESISTANCE AND THE OCCURRENCE OF MICROVASCULAR CHRONIC COMPLICATIONS**

AUTHOR: Etiane Tatsch

ADVISOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

CO-ADVISOR: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher

Several pathophysiological mechanisms are associated with type 2 diabetes mellitus (type 2 DM), such as glucotoxicity, insulin resistance, inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction, which can result in DNA strand breakage and changes in the nitrogenous bases. In this manner, DNA damage biomarkers may be useful in elucidating the pathophysiology of diabetes, as well as serving as an alternative to better evaluate its chronic complications. However, a great number of pathophysiological mechanisms related to increased DNA damage in diabetes need to be clarified. Thus, the objective of this study was to evaluate DNA damage in type 2 diabetes and its association with inflammation, oxidative stress, endothelial dysfunction, resistance towards insulin and the occurrence of chronic microvascular complications. The DNA damage was evaluated through the comet assay and the levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) urinary, the inflammatory process through the serum levels of interleukin (IL) 1, 6 and 10 and the alpha tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), protein oxidation through plasma levels of advanced oxidation protein products (AOPPs), endothelial dysfunction by serum levels of NOx (nitrite/nitrate) and urinary albumin and insulin resistance through the index HOMA-IR. The present study was carried out in two phases. In the first phase, 32 patients with type 2 DM and 30 healthy individuals (control) were investigated. In the second phase, 54 patients with type 2 DM and 22 healthy individuals (control) were recruited from the University Hospital of Santa Maria (HUSM). This study found that patients with type 2 diabetes showed increased DNA fragmentation, assessed by comet assay, and increased oxidative DNA damage, assessed by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) urinary levels, compared to healthy control subjects. Additionally, increased DNA damage was observed in the type 2 DM group with inadequate glycemic control. When the areas obtained under the ROC curve were analyzed, 8-OHdG urinary presented higher diagnostic ability in identifying microvascular chronic complications compared with urinary albumin in the type 2 DM group. Furthermore, it was demonstrated that type 2 diabetic patients with microvascular complications had higher levels of oxidative DNA damage compared to patients without such complications. Interestingly enough, it was observed that type 2 diabetic patients with increased DNA damage had higher levels of proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ , and a decrease in IL-10 levels, which is considered an anti-inflammatory cytokine. An association between increased DNA damage in type 2 diabetes and the index HOMA-IR, AOPPs levels and NOx levels and urinary albumin was also verified. Patients with type 2 diabetes exhibited factors that can directly contribute to the increase of DNA damage, such as insulin resistance, inflammation, endothelial dysfunction and increased generation of reactive species.

**Keywords:** Type 2 Diabetes. DNA Damage. Inflammation. Protein Oxidation. Endothelial Dysfunction. Insulin Resistance. Microvascular Complications.

## **LISTAS DE TABELAS**

### **ARTIGO CIENTÍFICO I**

Table 1 – Baselines characteristics of the study patients .....	75
Table 2 – Pearson correlation coefficients between DNA damage and biological parameters in type 2 diabetes .....	76
Table 3 – Multivariate analysis of DNA damage levels considering biologic and cardiometabolic risk factors .....	76

### **ARTIGO CIENTÍFICO II**

Table 1 – Baseline characteristics and biochemical parameters of the study population .....	95
Table 2 – Inflammatory, biological biomarkers and insulin resistance index according to the median of urinary 8-OHdG in T2DM patients .....	96
Table 3 – Multiple linear regression of oxidative DNA damage as a dependent variable adjusting for BMI, hypertension and HDL cholesterol .....	96

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

Figura 1 – Mecanismos envolvidos no desenvolvimento das complicações crônicas do diabetes com as respectivas alterações clínicas.....	21
Figura 2 – Processos envolvidos na fisiopatologia do diabetes tipo 2 .....	26
Figura 3 – Mecanismos propostos para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia e o estresse oxidativo como via final comum às quatro vias metabólicas ativadas .....	28
Figura 4 – Relação entre a formação de AOPPs e o diabetes tipo 2 .....	31
Figura 5 – Fatores envolvidos na associação entre hiperglicemia e disfunção endotelial no diabetes tipo 2 .....	34
Figura 6 – Fatores envolvidos no processo inflamatório e sua relação com o diabetes tipo 2.	39
Figura 7 – Estrutura do DNA dupla-hélice .....	46
Figura 8 – Esquema demonstrando os alvos das espécies reativas de oxigênio: as proteínas, lipídeos e o DNA .....	47
Figura 9 – Esquema de classificação visual do ensaio cometa .....	51
Figura 10 – Esquema da formação do 8-hidroxi-2’deoxiguanosina .....	53
Figura 11 – Mecanismos responsáveis pelo dano ao DNA no diabetes tipo 2 .....	56
Figura 12 – Mecanismos propostos para o aumento do dano ao DNA no diabetes tipo 2 ....	103

### ARTIGO CIENTÍFICO I

Figure 1 – DNA tail damage (%) comparison between control and diabetics subjects. (A) Comet image of blood cells showing nucleus without damage, and the nucleus with different damage levels. (B) DNA tail damage level(%); (C) DNA tail damage level 2 (%); (D) DNA tail damage level 3 (%); (E) DNA tail damage level 4 (%). Student’s t test analysis showed that diabetics presented significant higher DNA tail damage in all levels than control subjects.....	77
Figure 2 – Percentil distribution of frequency of DNA tail damage of control and diabetic subjects. The 50 percentile in control group was 12% whereas in the diabetic group was 72% of DNA tail damage .....	78

### ARTIGO CIENTÍFICO II

Figure 1 – ROC curves of urinary 8-OHdG and urinary albumin in the assessment of microvascular complications. Areas under the curve for urinary 8-OHdG and urinary albumin were 0.836 (95% CI, 0.711 to 0.933, P < 0.001) and 0.786 (95% CI, 0.608 to 0.864, P = 0.002), respectively. The difference between areas was 0.050 (Z statistic = 0.631, P = 0.528) .....	97
Figure 2 – Urinary 8-OHdG levels in T2DM patients with microvascular complications and T2DM patients without complications. Data are presented as mean ± standard deviation. *P = 0.001 .....	98

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA: *American Diabetes Association* (Associação Americana de Diabetes)  
AGEs: *Advanced Glycation End-Products* (Produtos Finais de Glicação Avançada)  
AOPPs: *Advanced Oxidation Protein Products* (Produtos Proteicos de Oxidação Avançada)  
BH4: Tetrahidrobiopterina  
CAT: Catalase  
CG-MS: Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas  
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
DM: Diabetes *Mellitus*  
DM tipo 1: Diabetes *Mellitus* tipo 1  
DM tipo 2: Diabetes *Mellitus* tipo 2  
DAC: Doença Arterial Coronariana  
DAG: Diacilglicerol  
DCV: Doença Cardiovascular  
DNA: Ácido Desoxirribonucléico  
DRC: Doença Renal Crônica  
DRD: Doença Renal do Diabetes  
dsDNA: DNA dupla-fita  
ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbant Assay*  
eNOS: Óxido Nítrico Sintase Endotelial  
ERNs: Espécies Reativas de Nitrogênio  
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio  
GPx: Glutaciona Peroxidase  
GSH: Glutaciona Reduzida  
HbA<sub>1c</sub>: Hemoglobina Glicada  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrogênio  
HNO<sub>2</sub>: Ácido Nitroso  
HOCl: Ácido Hipocloroso  
ICAM-1: Molécula de Adesão Intercelular-1  
IKK: Ikapa B quinase  
IL-1: Interleucina-1  
IL-6: Interleucina-6  
IL-10: Interleucina-10  
IMC: Índice de Massa Corpórea  
iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzida ou Inflamatória  
IRS-1: Receptor de Insulina 1  
JNK: Proteína Quinase *c-JUN N-Terminal*  
MAPK: Proteína Quinase Ativada por Mitógenos  
MPO: Mieloperoxidase  
nNOS: Óxido Nítrico Sintase Neuronal  
NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato  
ND: Nefropatia Diabética  
NF-κB: Fator de Transcrição Nuclear Kapa B  
NO: Óxido Nítrico  
NOS: Óxido Nítrico Sintase  
NOx: nitrito/nitrato  
N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Óxido Nitroso  
NRD: Neuropatia Diabética  
8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Ânion Superóxido  
OH<sup>•</sup>: Radical Hidroxila  
OONO<sup>-</sup>: Peroxinitrito  
PARP: Poli-(ADP-ribose) Polimerase  
PCR: Proteína C Reativa  
PCR: Cadeia Polimerase  
PI3K/Akt: Fosfatidilinositol-3-quinase/serina-teronina Quinase  
PKC: Proteína Quinase C  
RAGE: Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada  
RD: Retinopatia Diabética  
RNA: Ácido Ribonucleico  
ROC: *Receiver Operating Characteristic Curve*  
RO<sup>•</sup>: Radical Alcoxila  
ROO<sup>•</sup>: Radical Peroxila  
SOD: Superóxido Dismutase  
sTNFR: TNF- $\alpha$  Solúvel  
TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral Alfa  
TBARS: Ácido Tiobarbitúrico  
TNFR1: Receptor 1 do TNF- $\alpha$   
TNFR2: Receptor 2 do TNF- $\alpha$   
TUNEL: *Terminal Deoxyribonucleotidyltransferase Mediated Deoxyuridine Triphosphate Nick end Labeling Assay*  
UKPDS: *United Kingdom Prospective Diabetes Study*  
VCAM-1: Molécula de Adesão Celular Vascular 1

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
2.1 DIABETES MELLITUS .....	19
2.2 COMPLICAÇÕES CRÔNICAS DO DIABETES MELLITUS .....	21
2.3 COMPLICAÇÕES MICROVASCULARES .....	22
2.3.1 Retinopatia Diabética .....	22
2.3.2 Neuropatia Diabética.....	23
2.3.3 Doença Renal do Diabetes.....	23
2.4 COMPLICAÇÕES MACROVASCULARES.....	24
2.4.1 Doenças Cardiovasculares.....	24
2.5 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS ASSOCIADOS AO DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 2 E SUAS COMPLICAÇÕES CRÔNICAS.....	25
2.6 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO.....	44
2.7 DANO AO DNA E SUAS CARACTERÍSTICAS .....	46
2.8 PRINCIPAIS TIPOS DE DANO AO DNA .....	48
2.8.1 Sítios abásicos, depurinação e depirimidinação .....	48
2.8.2 Deaminação .....	49
2.8.3 Quebras nas cadeias de DNA .....	49
2.9 FORMAS DE AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA .....	49
2.9.1 Ensaio Cometa.....	49
2.9.2 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina .....	52
2.9.3 Outros ensaios .....	54
2.10 DANO AO DNA E DIABETES TIPO 2 .....	56
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	61
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	61
<b>4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS.....</b>	<b>62</b>
4.1 ARTIGO CIENTÍFICO I.....	62
4.2 ARTIGO CIENTÍFICO II.....	79

<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>104</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>105</b>

## 1 APRESENTAÇÃO

As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se nos **ARTIGOS CIENTÍFICOS I e II** e representam a íntegra deste estudo. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos neste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** desta tese, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração dos artigos estão mencionadas nos mesmos.

## 2 INTRODUÇÃO

Segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2014-2015), uma epidemia de diabetes está em curso. Em 1985 estimava-se que existissem 30 milhões de adultos com diabetes *mellitus* (DM) no mundo; esse número cresceu para 135 milhões em 2002, com projeção de chegar a 471 milhões no ano de 2035. Atualmente, estima-se que a população mundial com diabetes é da ordem de 382 milhões de pessoas. Destes, 175 milhões não têm conhecimento da sua condição e mais de 80% vivem em países de baixa e média renda. A cada seis segundos, uma pessoa vem a óbito por diabetes no mundo (IDF, 2015). Segundo a Federação Internacional de Diabetes, na América do Sul e Central em 2015, 247.500 adultos morreram em função do DM (122.100 homens e 125.400 mulheres). Mais de 42,7% desses óbitos ocorreram em pessoas com idade inferior a 60 anos. Mais da metade dos óbitos desta região (130.700) ocorreram no Brasil.

Cerca de 90% a 95% dos pacientes com diabetes têm diabetes *mellitus* tipo 2 (DM tipo 2), assim este tipo de diabetes responde pela maior parte do aumento da prevalência desta patologia (IDF, 2015). O Brasil é o quarto país, dentre os dez principais países com adultos diabéticos (14,3 milhões) (IDF, 2015). No nosso país, segundo dados oficiais fornecidos pelo Ministério da Saúde, foram registrados 57.876 óbitos por DM no ano de 2011 (Ministério da Saúde, 2011). Além disso, o Rio Grande do Sul (RS) é o oitavo estado com maior taxa de mortalidade específica por DM (33,0 óbitos por 100.000 habitantes) dentre as unidades federativas do Brasil.

As complicações crônicas do DM incluem alterações micro e macrovasculares, que acarretam alterações patológicas, principalmente nos rins, olhos, membros periféricos, coração e vasos sanguíneos (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014-2015). Estas complicações representam a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com DM a longo prazo, ocasionando custo aos sistemas de saúde (IDF, 2015). O exato mecanismo pelo qual o DM leva ao desenvolvimento destas complicações é complexo e não está ainda totalmente elucidado, mas envolve os efeitos tóxicos diretamente desencadeados pela hiperglicemia, juntamente com o aumento da pressão arterial, anormalidades lipídicas, estresse oxidativo, doença inflamatória crônica, hipóxia e isquemia (PU et al., 2006; LEBECHE et al., 2008; AKASH et al., 2013). A hiperglicemia induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (RAINS e JAIN, 2011), e o estresse oxidativo tem sido considerado um fator de risco no DM tipo 2 e em suas complicações (BANSAL et al., 2013; SANTILLI et al., 2015). Além disso, o processo

inflamatório, bem como a disfunção endotelial também estão associados ao desenvolvimento e progressão do diabetes e de suas complicações crônicas (DONATH e SHOELSON, 2011; AKASH et al., 2013; ZHAO et al., 2015).

Os processos fisiopatológicos no DM tipo 2 podem ativar diversos mecanismos que resultam no aumento do dano ao DNA, bem como no desenvolvimento das complicações crônicas do DM e/ou a uma evolução mais grave das mesmas (AL-AUBAIDY e JELINEK, 2010; SHIMIZU et al., 2014). Sabe-se que a hiperglicemia induz a formação de radicais livres através da ativação da via do poli-ol, glicação de proteínas e auto-oxidação da glicose, podendo ocasionar danos em diversas macromoléculas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Como resultado, o DNA é frequentemente danificado, causando quebras nos seus filamentos e modificações nas bases nitrogenadas (ARIF et al., 2010; YANG et al., 2011; IL'YASOVA et al., 2012). Assim, biomarcadores de dano ao DNA podem ser úteis na elucidação da fisiopatologia no diabetes, bem como uma alternativa para a melhor avaliação das suas complicações e comorbidades (BROEDBAEK et al., 2013). Estudos demonstram que pacientes com DM tipo 2 apresentam aumento de dano do DNA (SLIWINSKA et al., 2008; IBARRA-COSTILLA et al., 2010; BROEDBAEK et al., 2013), e que este dano também é mais acentuado em pacientes com controle glicêmico inadequado (XU et al., 2004; LODOVICI et al., 2008). No entanto, não está totalmente esclarecido se o aumento do dano ao DNA no diabetes está relacionado com o processo inflamatório, resistência insulínica e disfunção endotelial. Assim, é de suma importância a elucidação de mecanismos que possam estar envolvidos no dano ao DNA nesta doença.

Devido ao fato do DM tipo 2 ser uma patologia caracterizada pela oxidação proteica, processo inflamatório, disfunção endotelial e resultante dano ao DNA, a investigação de biomarcadores que atentem para tais estados torna-se importante. Para tanto, é de fundamental relevância o estudo de marcadores que possam auxiliar na avaliação da evolução do DM tipo 2 e suas complicações. Considerando que o DM tipo 2 é uma patologia degenerativa e crônica, comprometendo a qualidade de vida, produtividade e sobrevivência dos indivíduos, e que muitos dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das complicações crônicas desta doença ainda não foram totalmente elucidados, este estudo visa avaliar o dano ao DNA e sua associação com processos metabólicos, oxidativos, inflamatórios e endoteliais e ocorrência de complicações crônicas microvasculares.

## 2.1 DIABETES *MELLITUS*

O DM é um grupo de distúrbios metabólicos, de etiologia múltipla, associado ao metabolismo dos carboidratos no qual a glicose é subutilizada, produzindo hiperglicemia (BURTIS et al., 2008). O principal defeito desta patologia é a falta relativa de insulina, o que resulta na insuficiência da captação e armazenamento de glicose e utilização desta para finalidades energéticas (PASUPATHI et al., 2009). A deficiência relativa ou absoluta de insulina afeta o metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios (ADA, 2004; ADA, 2016). A hiperglicemia característica do DM pode ocorrer devido à produção deficiente de insulina pelo pâncreas ou devido a uma ação ineficiente do hormônio nos tecidos periféricos, caracterizando um quadro de resistência à insulina. Esta resistência pode apresentar-se em decorrência de uma menor atividade dos receptores de insulina, por uma diminuição no número destes, por alterações estruturais que levam a uma deficiência da ligação insulina-receptor, ou ainda por uma diminuição da proteína transportadora de glicose (GLUT-4), responsável pelo transporte de glicose para o interior das células (SALTIEL e KAHN, 2001; BURTIS et al., 2008).

Vários processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento do DM, sendo que estes vão desde a destruição auto-imune das células  $\beta$  do pâncreas (com consequente deficiência de insulina) até anormalidades que resultam em resistência à ação da insulina. As células  $\beta$ -pancreáticas desempenham um papel importante na manutenção da homeostase da glicose, secretando insulina, um hormônio chave para a regulação do metabolismo da glicose. Disfunções das células  $\beta$  e/ou uma diminuição da massa de células  $\beta$  são associadas estreitamente com a patogênese e fisiopatologia do DM (ADA, 2004).

Os sintomas de hiperglicemia acentuada incluem poliúria, polidipsia, perda de peso e algumas situações com polifagia e visão turva. O comprometimento do crescimento e susceptibilidade a certas infecções também podem acompanhar a hiperglicemia crônica. Na hiperglicemia aguda, uma das consequências fatais do DM não controlado é a cetoacidose ou a síndrome hiperosmolar não cetótica (ADA, 2004; ADA, 2016). Fatores genéticos e ambientais têm sido descritos como tendo grande importância para o desenvolvimento do DM (ALBERTI et al., 2007). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, os principais fatores ambientais associados são obesidade, adiposidade abdominal, grande ingestão calórica, sedentarismo, tabagismo e idade (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014-2015).

Há duas formas principais de apresentação desta síndrome: diabetes *mellitus* tipo 1 (DM tipo 1), que é caracterizado pela deficiência de secreção insulínica; e o DM tipo 2, causada por alterações na secreção insulínica e na sensibilidade dos tecidos alvos (BURTIS et al., 2008). Tanto a resistência à insulina como a falha progressiva nas células- $\beta$  pancreáticas são a chave do mecanismo natural do DM tipo 2 (FONSECA, 2006). Este tipo de diabetes caracteriza-se pela resistência à insulina, seguida por uma diminuição progressiva da função da células- $\beta$ , resultando em uma deficiência relativa de insulina. No início do processo do DM tipo 2, as células- $\beta$  pancreáticas hipersecretam insulina para compensar a resistência insulínica nos tecidos periféricos. Eventualmente, ocorre o esgotamento das células- $\beta$ , causando uma insuficiente secreção de insulina para manter o controle glicêmico (FONSECA, 2006).

Atualmente são três os critérios aceitos e recomendados pela Sociedade Brasileira de Diabetes para o diagnóstico laboratorial de DM:

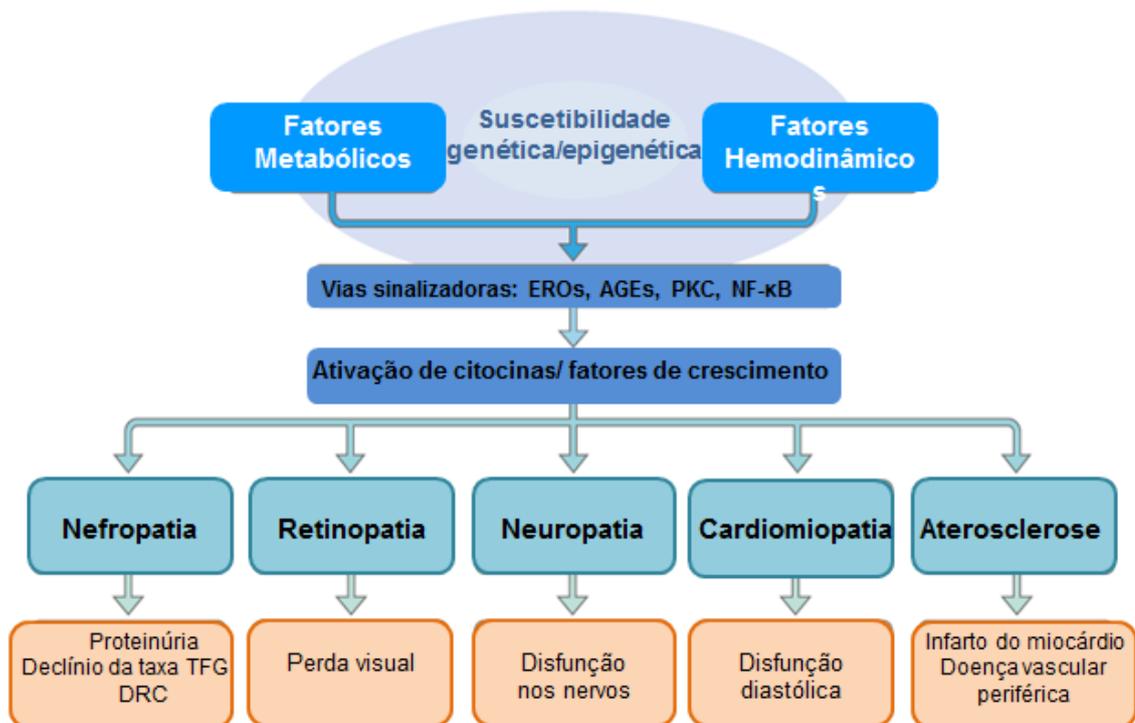
- Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescidos de glicemia casual acima de 200mg/dL (11,1 mmol/L). Compreende-se por glicemia casual aquela realizada a qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições (ADA, 2004; ADA, 2016);
- Glicemia de jejum  $\geq$  126mg/dL (7,0 mmol/L). Em caso de pequenas elevações da glicemia, o diagnóstico deve ser confirmado pela repetição do teste em outro dia (ADA, 2004; ADA, 2016);
- Glicemia de 2 horas pós sobrecarga de 75g de glicose acima de 200mg/dL (11,1 mmol/L) (ADA, 2004; ADA, 2016).

Em 2010, a *American Diabetes Association* (ADA) endossou o uso da hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) no diagnóstico do diabetes em pacientes com valores de HbA<sub>1c</sub>  $\geq$  6,5%, com algumas vantagens frente à glicemia de jejum e a glicemia pós-prandial, tais como maior conveniência aos pacientes (não requer jejum), grande estabilidade pré-analítica e menor alteração dia a dia causadas por estresse ou doença. No entanto, a Sociedade Brasileira de Diabetes e de Endocrinologia não possuem um posicionamento claro sobre este marcador para fins diagnósticos (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014-2015).

## 2.2 COMPLICAÇÕES CRÔNICAS DO DIABETES *MELLITUS*

As complicações crônicas do DM são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade dentre os pacientes diabéticos (IDF, 2015). Indivíduos com diabetes estão em maior risco de desenvolver uma série de problemas de saúde fatais e incapacitantes do que os indivíduos sem o diabetes (IDF, 2015). Pacientes com DM tipo 2 possuem maior risco de ocorrência de várias complicações crônicas, incluindo doença cardiovascular, retinopatia, doença renal e neuropatia (AUNE e URSIN, 2009). Entre os fatores envolvidos na etiologia das complicações crônicas do DM do tipo 2, destacam-se a hiperglicemia, a hipertensão arterial sistêmica, a dislipidemia e o tabagismo. Além destes, outros fatores de risco não convencionais têm sido descritos: disfunção endotelial, estado pré-trombótico e inflamação (SCHEFFEL et al., 2004). As vias envolvidas no desenvolvimento das complicações crônicas do DM podem ser ativadas por agravos metabólicos, resultando em ativação de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, assim, ocasionando as características patológicas e as anormalidades clínicas (Figura 1) (RUSSELL e COOPER, 2015).

Figura 1– Mecanismos envolvidos no desenvolvimento das complicações crônicas do diabetes com as respectivas alterações clínicas



Fonte: Adaptado de Russell e Cooper, 2015. EROs, espécies reativas de oxigênio; AGEs, produtos finais de glicação avançada; PKC, proteína quinase C; NF-κB, fator de transcrição nuclear kapa B; TFG, taxa de filtração glomerular; DRD, doença renal crônica.

As complicações do DM são divididas em microvasculares e macrovasculares. As microvasculares afetam pequenos vasos da retina, rins e nervos, com complicações resultantes a partir do comprometimento da auto-regulação do fluxo sanguíneo, alteração da permeabilidade vascular, inflamação, acúmulo da matriz extracelular, hipóxia, perda de células, neovascularização e fibrose. Já as complicações macrovasculares resultam a partir de uma disfunção e inflamação do endotélio e dos músculos lisos, originando a aterosclerose, com doenças coronarianas isquêmicas, patologias cerebrovasculares e doenças vasculares periféricas (RUSSEL e COOPER, 2015). O desenvolvimento e a progressão das complicações microvasculares correlacionam-se com a duração do DM e o controle glicêmico. Embora todas as células de um paciente diabético encontram-se expostas a níveis elevados de glicose, o dano hiperglicêmico é limitado a alguns tipos celulares, como cristalino, retina, glomérulos e nervos, cujo transporte de glicose não é mediado pela insulina e, assim, apresentam hiperglicemia intracelular (BURTIS et al., 2008). Como consequência das complicações microvasculares, o diabetes é uma das principais causas de cegueira, doença renal crônica terminal e diversas neuropatias debilitantes (BROWNLEE, 2001).

## 2.3 COMPLICAÇÕES MICROVASCULARES

### 2.3.1 Retinopatia Diabética

A Organização Mundial da Saúde refere à retinopatia diabética (RD) como resultado do dano cumulativo nos pequenos vasos, sendo uma das importantes causas de cegueira. Após 15 anos de diabetes, cerca de 10% dos indivíduos desenvolvem importante prejuízo visual e aproximadamente 2% tornam-se cegos (WHO, 2006). A maioria dos casos de cegueira (90%) está relacionada à RD e pode ser evitada através de medidas adequadas, que incluem, além do controle da glicemia e da pressão arterial, a realização do diagnóstico em uma fase inicial e passível de intervenção (GROSS e NEHME et al., 1999). As anormalidades retinianas no DM têm como ponto de partida a toxicidade que a hiperglicemia exerce sobre as células endoteliais interferindo na integridade da barreira hemato-retiniana, o que provoca o acúmulo de células inflamatórias e o aumento da expressão de fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias (AGROIYA et al., 2013). Em pacientes com DM tipo 2, o estudo *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) demonstrou a importância do controle intensivo da pressão arterial. Após nove anos de acompanhamento e controle pressórico, reduziu-se o risco de progressão da retinopatia em 47%. A análise do UKPDS evidenciou que,

para cada decréscimo de 10 mmHg da pressão arterial sistólica, havia uma redução de 13% do risco de evolução para qualquer complicação microvascular (UKPDS, 1998).

### **2.3.2 Neuropatia Diabética**

A neuropatia diabética (NRD), uma das principais complicações que aparece com o tempo de evolução crônica do DM (PARTANEN et al., 1995), é caracterizada por uma lesão neurológica envolvendo amplamente todo o sistema nervoso periférico nos seus componentes sensorio-motor e autonômico (cardiovascular, respiratório, digestivo e geniturinário) (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014-2015). Esta complicação afeta até cerca de 50% dos indivíduos com diabetes, sendo seus principais sintomas, dormência, dor ou fraqueza nos pés ou mãos. Combinado com problemas circulatórios, a NRD aumenta o risco de ulcerações nos pés, podendo levar à necessidade de amputação, em casos mais complicados (WHO, 2006).

A etiologia da NRD é complexa; no entanto, estudos demonstram que um fluxo sanguíneo alterado, hiperglicemia, um desequilíbrio oxidativo, bem como uma resposta pró-inflamatória estão envolvidos (DOWNS e FAULKNER, 2015). Além disso, uma redução do fluxo sanguíneo resulta em hipóxia neuronal, fato este suficiente em comprometer a função nervosa e iniciar uma neurodegeneração. Este efeito também foi descrito em gânglios autônomos, gânglio da raiz dorsal e no hipocampo (CAMERON e COTTER, 2001; DOWNS e FAULKNER, 2015).

### **2.3.3 Doença Renal do Diabetes**

A doença renal do diabetes (DRD), tradicionalmente denominada de nefropatia diabética (ND), é uma complicação crônica do DM que acomete cerca de 20-40% dos pacientes (ADA, 2016). A DRD é a principal doença renal crônica em pacientes diabéticos e é considerada a segunda complicação de maior custo. É classicamente identificada pela presença de proteinúria superior a 0,5 g/24h (GROSS et al., 2005). Esta complicação é caracterizada por lesões glomerulares, tubulares, intersticiais e vasculares (BURTIS et al., 2008). Há várias formas de se classificar a DRD, baseando-se, por exemplo, na filtração glomerular, levando-se em consideração os níveis de creatinina plasmática. No entanto, para a DRD, utiliza-se comumente a classificação com base nos valores de excreção urinária de albumina, sendo que a presença de pequenas quantidades deste marcador na urina representa o estágio inicial da DRD, também chamado de microalbuminúria ou nefropatia incipiente; já

o estágio mais avançado da DRD denomina-se macroalbuminúria, proteinúria ou nefropatia instalada (GROSS et al., 2005).

A taxa de complicações crônicas relacionadas ao DM diminuiu drasticamente nas últimas duas décadas, tendo ocorrido uma redução aproximada de 28% na DRD, em sua fase mais avançada (doença renal terminal). Entretanto, ainda é muito grande o número de pacientes afetados pela DRD, pois a incidência de DM continua aumentando (GREGG et al., 2014). Por este motivo, a DRD continua sendo a principal causa de doença renal crônica (DRC) em pacientes que ingressam em programas de diálise (ADA, 2016), inclusive no Brasil (LUGON, 2009). A DRC é uma comorbidade comum em pacientes com DM tipo 2, sendo que sua gravidade pode influenciar significativamente o prognóstico da doença (THOMAS et al., 2015). O desenvolvimento da DRD é multifatorial, sendo que um conjunto de mecanismos leva ao desenvolvimento da lesão renal e à consequente perda de proteína na urina, bem como à redução gradual da função renal. A lesão renal se caracteriza tanto na DRD, como em outras doenças renais, por estar presente em diferentes sítios do néfron, principalmente no glomérulo e nos túbulos renais (MATHESON et al., 2010; MORESCO et al., 2013). A adoção de intervenções múltiplas, tendo como prioridade o tratamento da hipertensão arterial e incluindo a utilização de agentes com efeito renoprotetor específico, pode reduzir a progressão da doença renal (SBD 2014-2015).

## 2.4 COMPLICAÇÕES MACROVASCULARES

### 2.4.1 Doenças Cardiovasculares

A doença cardiovascular (DCV) é a complicação que demanda maior custo nos sistemas de saúde, sendo a principal responsável pela redução da sobrevida dos pacientes e a causa mais frequente de mortalidade. Em todos os pacientes com diabetes, os fatores de risco cardiovascular devem ser avaliados sistematicamente, pelo menos anualmente. Estes fatores de risco incluem a dislipidemia, a hipertensão, tabagismo, história familiar de doença coronária prematura, bem como a presença de albuminúria (ADA, 2016). No entanto, é a presença ou ausência de albuminúria e DRD que prediz mortalidade no DM tipo 1 e tipo 2 (PU et al., 2006; GERSTEIN et al., 2012). A doença cardíaca em pacientes diabéticos é usualmente atribuída à isquemia miocárdica decorrente de um processo aterosclerótico coronário acelerado e mais extenso. Pacientes diabéticos são mais predispostos a desenvolverem insuficiência cardíaca congestiva, independentemente da presença de

hipertensão arterial ou de doença coronariana (GROSS et al., 2007). A resistência à insulina e a hiperinsulinemia são considerados fatores de risco para DCV, independente da glicemia (GERSTEIN et al., 2012).

Homens e mulheres com DM tipo 1 e 2, com idades respectivamente superiores a 40 e 50 anos geralmente apresentam risco de eventos coronarianos maior que 2% ao ano (BAX et al., 2007). O risco de evento cardiovascular ou morte será extremamente elevado quando houver diagnóstico clínico de DCV, ou seja, já ter ocorrido infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral ou ataque isquêmico transitório, angina do peito, dispneia de origem isquêmica, claudicação intermitente ou doença da aorta (SBD 2014-2015). Neste contexto, o estudo de *Framingham* desenvolveu um algoritmo para predição de eventos cardiovasculares em indivíduos assintomáticos que pode ser aplicado para pacientes diabéticos (D'AGOSTINO et al., 2008). Este escore de risco global é importante, pois aumenta o poder preditivo para outras doenças graves, além da doença arterial coronariana (DAC), que frequentemente afeta indivíduos com diabetes. Outra ferramenta para se avaliar o risco de DAC em diabéticos tipo 2 é o UKPDS, que considera não somente idade, lipídeos, tabagismo e pressão arterial, como também utiliza a duração do diabetes e seu controle por meio da HbA<sub>1c</sub> e presença ou não de proteinúria (STEVENS et al., 2001).

## 2.5 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS ASSOCIADOS AO DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 E SUAS COMPLICAÇÕES CRÔNICAS

Existe diversas propostas e hipóteses descritas sobre a fisiopatologia do DM tipo 2 e suas complicações, como obesidade, envelhecimento, sedentarismo, acumulação lipídica tecidual, disfunção da célula  $\beta$  pancreática, processo inflamatório, estresse do retículo endoplasmático e estresse oxidativo (Figura 2) (AKASH et al., 2013). Dentre estes fatores, o estresse oxidativo na patogênese do DM tipo 2 tem recebido destaque, pois não causa somente danos em proteínas e lipídios, mas também afeta significativamente o DNA (DINÇER et al., 2002; PALM et al., 2003; BROEDBAEK et al., 2011).

Figura 2 – Processos envolvidos na fisiopatologia do diabetes tipo 2



Fonte: Adaptado de Akash et al., 2013.

As EROs e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são produtos do metabolismo celular normal e podem produzir efeitos benéficos ou nocivos. Os efeitos benéficos destas espécies ocorrem em baixas concentrações e envolvem papéis fisiológicos no mecanismo de defesa e em alguns sistemas de sinalização celular. Os efeitos nocivos destas espécies são os resultados do desequilíbrio do estado pró-oxidante contra o antioxidante (FATEHI-HASSANABAD et al., 2010). Os radicais livres gerados pelos tecidos dos organismos vivos têm sido associados a danos no DNA, proteínas e lipídeos (CAI e HARRISON, 2000). As principais EROs distribuem-se em dois grupos, as radicalares: hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ ); e as não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ). Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) e peroxinitrito ( $\text{OONO}^-$ ) (ROBERTS e SINDHU, 2009). Os radicais livres também podem ser provenientes de outras fontes, principalmente dos múltiplos sistemas enzimáticos, incluindo ciclooxigenase, lipoxigenase,

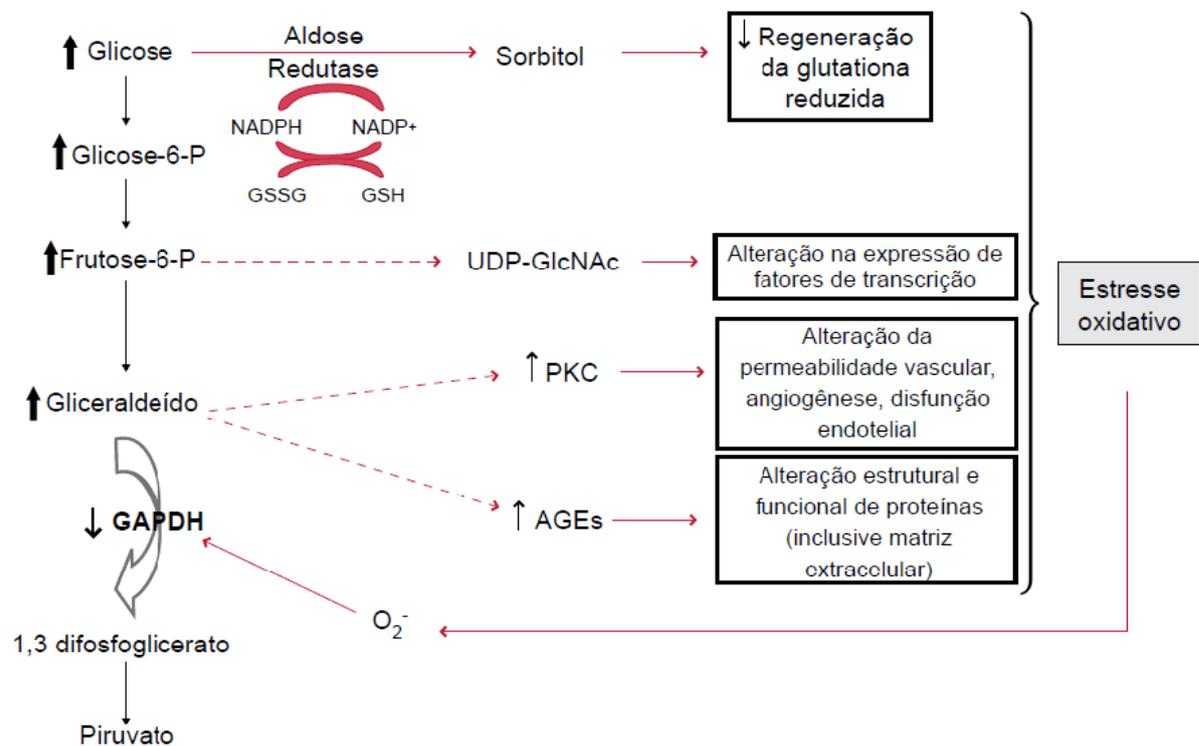
xantina oxidase, mieloperoxidase (MPO), óxido nítrico sintase (NOS) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (GEISZT e LETO, 2004). Na tentativa de impedir a ação tóxica das EROs e ERNs, as células dispõem de sistemas antioxidantes que as inibem e protegem os sistemas biológicos contra os efeitos lesivos da oxidação excessiva (HALLIWELL, 2006). As defesas antioxidantes inerentes a uma célula incluem defesas enzimáticas e não-enzimáticas. As principais defesas enzimáticas de que uma célula dispõe incluem a glutathiona peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (HALLIWELL e GUTTERRIDGE, 2000). Já as defesas não-enzimáticas são constituídas pelas vitaminas C e E,  $\beta$ -caroteno e antioxidantes tiólicos como a glutathiona reduzida (GSH) (VALKO et al., 2007). A presença de espécies reativas pode ocasionar uma inadequada oxidação de biomoléculas levando a um dano celular durante o estresse oxidativo, tendo como consequências: adaptação das células através de uma maior regulação, lesão celular ou morte celular por apoptose ou necrose (BEHL e MOOSMANN, 2002; HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

A hiperglicemia induz a formação de EROs (PALM et al., 2003; RAINS e JAIN, 2011), e o estresse oxidativo tem sido considerado um fator associado ao DM e as suas complicações (BATHIA et al., 2003; DONNE et al., 2006). Estas espécies são produzidas em diversos tecidos em condições hiperglicêmicas e estão envolvidas na progressão e disfunção das células  $\beta$  pancreáticas e na resistência insulínica encontrada no DM tipo 2 (BROEDBAEK et al., 2011). Existem quatro vias metabólicas que explicam como a hiperglicemia resulta nestas complicações. São elas: aumento no fluxo da via dos polióis, aumento na formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), ativação das isoformas da proteína quinase C (PKC) e aumento da atividade da via da hexosamina (BAYNES e THORPE, 1999; BROWNLEE, 2001). A hiperglicemia permite a conversão de glicose em sorbitol pela via dos polióis, juntamente com a diminuição de NADPH e GSH. Posteriormente, o sorbitol é metabolizado à frutose pela sorbitol desidrogenase e, dessa forma, aumenta a razão NADH/NAD<sup>+</sup>, o que aumentaria a síntese de diacilglicerol (DAG), principal ativador biológico da PKC. A família das PKC compreende várias isoformas que, quando ativadas, resultam no aumento da produção de NO, vasodilatação reduzida e baixa liberação de endotelina (agente vasoconstritor) (DARLEY-USMAR et al., 1995; AVOGARO et al., 2006).

Os AGEs são importantes na etiopatogenia do DM tipo 2 pois modificam proteínas intracelulares de matriz celular e proteínas circulantes (BROWNLEE et al., 2005). Os AGEs se formam intracelularmente e extracelularmente e são os principais responsáveis pela RD,

NRD e DRD (AHMED, 2005). Os efeitos destas substâncias químicas podem ser classificados como dependentes ou independentes de receptores, podendo atuar de maneira intracelular ou através de ligação com superfície celular por intermédio de receptores, como os receptores para produtos finais de glicação avançada (RAGE) (GOH e COOPER, 2008). Ao interagir com seu receptor, os AGEs ativam a via secundária de transdução de sinais, como a PKC. Além disso, esta glicação também pode induzir a produção de EROs, ativando o fator de transcrição nuclear kapa B (NF- $\kappa$ B), aumentando a expressão de citocinas e fatores de crescimento (GOLDIN et al., 2006). Já a via da hexosamina converte a frutose-6-fosfato, que é transformada em N-acetilglicosamina-6-fosfato, sendo considerada uma via adicional do metabolismo da glicose, podendo mediar alguns efeitos tóxicos desta. Posteriormente, a N-acetilglicosamina-6-fosfato é convertida em UDP-N-acetilglicosamina, que modula a expressão de proteínas, as quais funcionam como fatores de transcrição, estimulando a via da aldose redutase, ocorrendo a potencialização do consumo de NADPH e diminuição da regeneração de GSH (BROWNLEE, 2001; NEGRE-SALVAYRE et al., 2009) (Figura 3).

Figura 3 – Mecanismos propostos para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia e o estresse oxidativo como via final comum às quatro vias metabólicas ativadas



Fonte: Reproduzido por Correa-Giannella e Vieira, 2007.

Como descrito anteriormente, alterações relacionadas ao estresse oxidativo têm sido observadas no DM (PIWOWAR et al., 2007, RAINS e JAIN, 2011), e o estudo de biomarcadores associados a este processo pode apresentar potencialidade para o monitoramento e diminuição das complicações provocadas pela doença. Dentre esses marcadores, os produtos proteicos de oxidação avançada (AOPPs) e o NOx (nitrito/nitrato) podem constituir importantes ferramentas para a investigação do DM. O estresse oxidativo pode ser mensurado através da quantificação de várias moléculas, algumas das quais podem servir como biomarcadores. Os biomarcadores são indicadores de processos fisiológicos ou patológicos. É considerado um marcador ideal o que possui um aumento específico, facilmente mensurável e que oriente o clínico para um diagnóstico ou prognóstico, bem como a terapia farmacológica. Com estes marcadores é possível identificar moléculas relacionadas à geração de radicais livres, bem como moléculas modificadas através da interação com essas espécies (SANTILLI et al., 2015).

As proteínas são consideradas o principal alvo para o dano oxidativo, uma vez que estas são os maiores componentes dos sistemas biológicos e podem neutralizar 50-75% dos radicais livres. As modificações oxidativas de proteínas são resultantes de alterações covalentes que podem ser induzidas diretamente pelas EROs ou de maneira indireta através de reações com produtos secundários do estresse oxidativo (DALLE-DONE et al., 2006). Muitos fatores determinam o grau de oxidação proteica, incluindo a localização da proteína, a estrutura proteica, bem como a concentração de oxidantes e antioxidantes (HÖHN et al., 2014). O dano oxidativo proteico *in vivo* pode prejudicar o funcionamento de receptores, transportadores e enzimas, afetando processos celulares essenciais. Além disso, proteínas oxidadas podem ser identificadas como moléculas estranhas, podendo ser identificadas como antígenos e estimular a formação de anticorpos (PENG et al., 1997).

Os AOPPs são uma família heterogênea de compostos proteicos modificados estruturalmente, provenientes do estresse oxidativo, principalmente a partir da ação do HOCl sintetizado pela MPO, uma enzima amplamente expressa em células do sistema imunológico. Em algumas situações clínicas nas quais há um quadro inflamatório envolvido, esta enzima pode estar constantemente ativa, levando a um aumento da produção de HOCl e ao acúmulo de AOPPs na circulação. Posteriormente, foi demonstrado que, além de ser um marcador resultante do estresse oxidativo, os AOPPs também desempenham um importante papel no processo inflamatório, visto que este marcador é capaz de ativar células inflamatórias, como monócitos e neutrófilos, induzindo e amplificando o estado pró-inflamatório (WITKO-SARSAT et al., 2003). Por esta razão, os AOPPs diferenciam-se dos demais marcadores

usualmente mensurados com a finalidade de refletir o estado de estresse oxidativo, uma vez que, além de ser um novo biomarcador de estresse oxidativo, há evidências de que os AOPPs participam como mediadores em diferentes processos fisiopatológicos (WITKO-SARSAT et al., 2003). Os AOPPs são compostos de proteínas oxidadas de baixo peso molecular, representado pela albumina oxidada, e alto peso molecular, representado por agregados de albumina formados através de ligações dissulfeto e/ou ligações cruzadas contendo ditirosina (CAPEILLÈRE-BLANDIN et al., 2004). Sua concentração está diretamente relacionada à oxidação da albumina, mas também de fibrinogênio e lipoproteínas (CAPEILLÈRE-BLANDIN et al., 2004). Além disso, recentemente foi relatado que os AOPPs também podem ser formados a partir do fibrinogênio e do colágeno (TORBITZ et al., 2015; BOCHI et al., 2016).

O acúmulo de AOPPs foi primeiramente descrito em pacientes com insuficiência renal crônica submetidos à hemodiálise (WITKO-SARSAT et al., 1996). Atualmente, sabe-se que outras condições clínicas relacionadas com o estresse oxidativo também estão associadas com o aumento dos níveis de AOPPs, tais como o DM. A Figura 4 apresenta a associação do aumento dos níveis de AOPPs no DM tipo 2 com o desequilíbrio oxidativo, bem como sua relação com as complicações crônicas do DM (PIWOWAR et al., 2007; PANDEY et al., 2010; BANSAL et al., 2013).

Figura 4 – Relação entre a formação de AOPPs e o diabetes tipo 2



Fonte: Adaptado de Pandey et al., 2010.

Piowar et al. (2007) reportaram que os níveis plasmáticos de AOPPs apresentaram-se elevados em pacientes com DM tipo 2 quando comparados com indivíduos saudáveis. Além disso, também verificaram que os pacientes diabéticos com macroangiopatias e os pacientes diabéticos obesos (com o índice de massa corpórea maior que 30) eram os que apresentaram os maiores níveis de AOPPs. Pandey et al. (2010) também investigaram os níveis de AOPPs em pacientes com DM tipo 2 e demonstraram que, além destes pacientes apresentarem níveis elevados deste marcador de oxidação proteica, também obtiveram níveis plasmáticos reduzidos de grupos tióis (-SH). Além disso, foi observada uma forte correlação negativa entre os níveis séricos de albumina e de HbA<sub>1c</sub> e uma correlação positiva entre os níveis séricos de AOPPs e a concentração de HbA<sub>1c</sub> nestes pacientes. Estes achados demonstram que há uma íntima relação entre a oxidação proteica e a glicação nestes pacientes diabéticos (CAKATAY, 2005). Estes resultados confirmam a ideia de que o DM é uma desordem

metabólica complexa com distúrbios entre a formação de EROs e as defesas antioxidantes, e que a obesidade também é uma condição que está relacionada com o estresse oxidativo, bem como com a oxidação de proteínas (CAKATAY, 2005; PIWOWAR et al., 2007; PANDEY et al., 2010).

Os níveis de AOPPs também se encontram aumentados em pacientes com DRD comparados com aqueles pacientes diabéticos tipo 2 sem esta complicação (PAN et al., 2010). Piwowar et al. (2008) demonstraram que os níveis de AOPPs aumentaram progressivamente de acordo com o aumento da albumina urinária em pacientes com DM tipo 2, ou seja, pacientes macroalbuminúricos apresentaram maiores níveis plasmáticos de AOPPs quando comparados com os microalbuminúricos e normoalbuminúricos. Estes achados corroboram com estudos anteriores que demonstram que estes compostos podem acumular-se nos rins de pacientes diabéticos tipo 2 com DRD (LEHMANN e SCHLEICHNER, 2000; VAN DIJK e BERL, 2004). Shi et al. (2008) relataram que os AOPPs podem promover uma inflamação renal em pacientes diabéticos através da ação da enzima NADPH oxidase. Sabe-se que os AOPPs são estruturalmente análogos aos AGEs e também apresentam atividades biológicas similares, como indução de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão (WITKO-SARSAT et al., 1996). Neste sentido, Bansal et al. (2013) demonstraram uma correlação significativamente positiva entre os AGEs e os níveis de AOPPs. Este achado explica o possível envolvimento do aumento da formação de AGEs na geração do estresse oxidativo (BANSAL et al., 2013). Outro estudo recente demonstrou em pacientes com DM tipo 2 uma correlação significativa entre os AOPPs e o índice de resistência insulínica (HOMA-IR), LDL oxidado e NOx. Este resultado demonstra que os AOPPs em combinação com LDL oxidado e NOx poderiam ser biomarcadores importantes para avaliar a associação entre o DM e distúrbios ateroscleróticos (GRADINARU et al., 2013).

O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas, possuindo um importante papel em quase todos os sistemas biológicos (ASL et al., 2008). É um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, e sua molécula possui um elétron não pareado, reagindo facilmente com o oxigênio, radical superóxido, ou metais de transição como ferro, cobalto, manganês ou cobre (KIECHLE e MARLINSKI, 1993). A biossíntese do NO no organismo ocorre via oxidação da L-arginina, sendo catalisada pela enzima NOS, com a participação da forma reduzida de NADPH como um doador de elétrons. Esta biossíntese é dividida em duas etapas, sendo que na primeira fase ocorre a hidroxilação da L-arginina, formando N<sup>G</sup>-hidroxil-L-arginina através da utilização de uma molécula de oxigênio e duas de NADPH. Posteriormente, com um elétron proveniente do NADPH e outro da molécula de oxigênio,

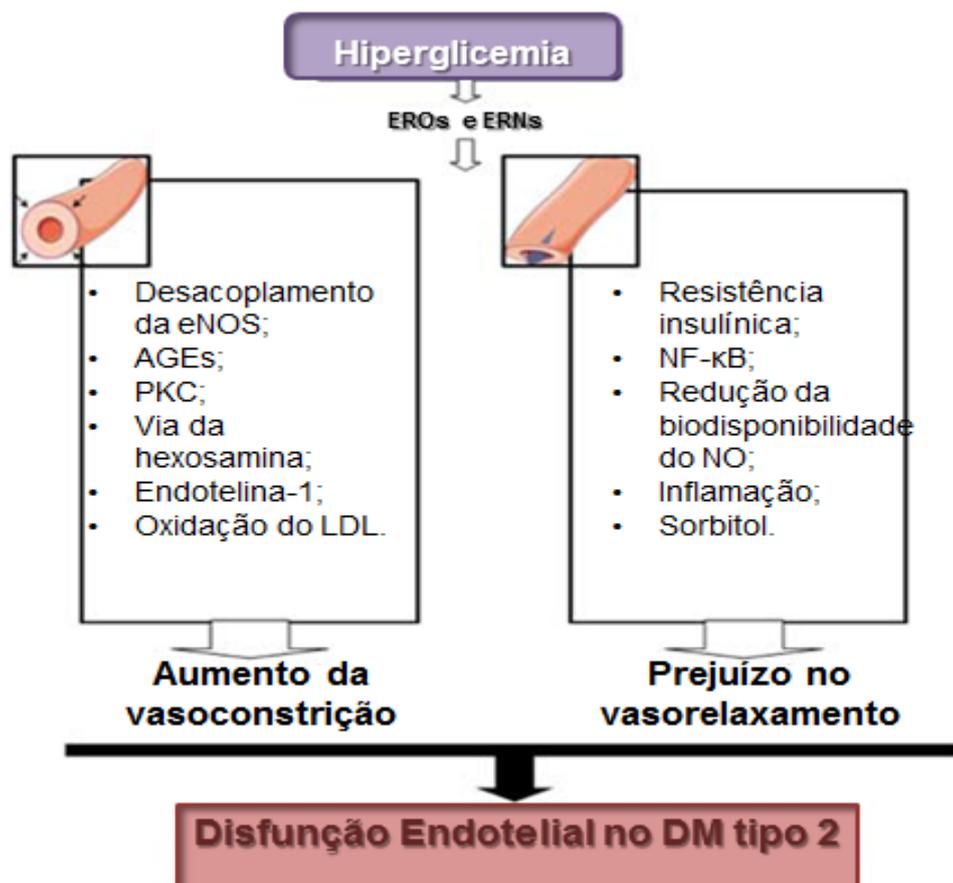
$\text{N}^{\text{G}}$ -hidroxi-L-arginina é convertido a L-citrulina e NO (GANZ e VITA, 2003; GIULIVI, 2003). As três isoformas humanas da NOS, a NOS neuronal (nNOS ou NOS-1), a NOS induzida ou inflamatória (iNOS ou NOS-2) e a NOS endotelial (eNOS ou NOS-3) são encontradas nos cromossomos humanos 7, 12 e 17, respectivamente, e assim foram nomeadas com base nos tecidos nos quais foram primeiramente clonadas e caracterizadas (FÖRSTERMANN e SESSA, 2012). Sabe-se que o NO proveniente da eNOS é um potente vasodilatador, sendo fundamental para a proteção dos vasos sanguíneos, uma vez que ele mantém o tônus vascular, regula a pressão sanguínea, previne a agregação plaquetária, inibe adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular e tem efeito antiproliferativo das células da camada vascular (PACHER et al., 2007; ZHAO et al., 2015).

O NO é uma importante molécula de sinalização presente em diversos tecidos, e está envolvido em muitos processos fisiológicos, tais como neurotransmissão, resposta imune, atuando na defesa inespecífica do hospedeiro e até mesmo na regulação da pressão sanguínea, promovendo a homeostasia vascular (BRYAN e GRISHAM, 2007; PACHER et al., 2007; ZHAO et al., 2015). Um aspecto marcante desta molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica, conforme a sua concentração ou depuração tecidual (YAMAGUCHI et al., 2006). Sendo uma espécie radicalar, o NO é capaz de reagir rapidamente com outros radicais importantes do ponto de vista biológico, tais como oxigênio molecular e o  $\text{O}_2^-$ . O significado químico e biológico da oxidação do NO pela molécula de oxigênio é objeto de numerosas investigações, e é certo que tais reações são importantes para a sua toxicologia e fisiologia. Uma das mais significantes reações do NO é com o  $\text{O}_2^-$ , sendo o  $\text{OONO}^-$ , o produto desta reação (TUTEJA et al., 2004; TODA et al., 2010). Defeitos na via do NO podem levar ao desenvolvimento de muitas patologias, como hipertensão arterial, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, desordem no sistema nervoso central, aterosclerose, hipercolesterolemia, DM, entre outras (TAHA, 2003).

A complexidade das manifestações vasculares associadas ao DM é resultado da disfunção de múltiplos componentes da fisiologia vascular, principalmente o endotélio, células musculares lisas e plaquetas (CAPELLINI et al., 2010; SANTILLI et al., 2015). A hiperglicemia provoca disfunção endotelial em diferentes células da parede vascular. Os mecanismos que ocasionam este dano são diversos e incluem: aumento do fluxo de glicose e outros açúcares, através da via do polioliol; aumento da formação intracelular de AGEs e expressão de seus receptores; ativação da PKC; e ativação da via da hexosamina (BROWLEE, 2005). Os efeitos nocivos destes mecanismos são o aumento do estresse oxidativo, apoptose e permeabilidade vascular (ROBERTS e PORTER, 2013). O principal

mecanismo pelo qual o estresse oxidativo leva à disfunção endotelial é a redução da biodisponibilidade do NO endotelial (NISHIKAWA et al., 2000; BECKMAN et al., 2001; ZHANG, 2008; ZHAO et al., 2015). O principal evento celular que reduz a biodisponibilidade do NO é o aumento do  $O_2^-$  pela mitocôndria, cuja atividade está aumentada na hiperglicemia. Este ânion inativa o NO para formar  $OONO^-$ , que é um potente oxidante. Além disso,  $OONO^-$  pode oxidar o tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ), levando a um fenômeno conhecido como “desacoplamento da enzima NOS”, resultando na síntese de  $O_2^-$ , em vez da produção de NO pela NOS. No DM, a exposição prolongada à hiperglicemia pode resultar em um desequilíbrio na homeostase vascular devido ao aumento da vasoconstrição e prejuízo no vasorelaxamento que, por sua vez, pode promover a disfunção endotelial no DM tipo 2 (Figura 5) (CAPELLINI et al., 2010;).

Figura 5 – Fatores envolvidos na associação entre hiperglicemia e disfunção endotelial no diabetes tipo 2



Fonte: Adaptado de Sena et al., 2013. EROs, espécies reativas de oxigênio; ERNs, espécies reativas de nitrogênio; eNOS, óxido-nítrico-sintase endotelial; AGEs, produtos finais de glicação avançada; PKC, proteína quinase C; NF-κB, fator de transcrição nuclear kapa B; NO, óxido nítrico.

Além disso, a resistência insulínica que ocorre no diabetes está associada à disfunção endotelial, ocorrendo uma perda da biossíntese e atividade biológica do NO (TESSARI et al., 2010). A disfunção endotelial causada pela resistência insulínica também pode ser devido à ativação da via de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), via esta responsável pela sinalização da insulina (SENA et al., 2013). A resistência à insulina também reduz a atividade da eNOS, bem como da prostaciclina arterial sintase através do aumento da oxidação de ácidos graxos endoteliais (SANTILLI et al., 2015). A produção mitocondrial de  $O_2^-$  também aumenta a produção intracelular dos AGEs (SENA et al., 2013). Estas proteínas glicadas acumulam-se nas paredes dos vasos expostos à hiperglicemia, alteram a integridade estrutural da parede vascular e neutralizam o NO, afetando substancialmente a função endotelial (AHMED, 2005; CHILTON et al., 2011; SENA et al., 2013). Outra maneira que leva a diminuição da biodisponibilidade do NO é o LDL colesterol, que pode reagir com o NO presente no endotélio, antes que ele atinja as células vasculares e, portanto, reduzir a vasodilatação mediada pelo NO (SENA et al., 2013). A produção de AGEs também é responsável pela diminuição da expressão da eNOS, bem como pela inflamação mediada por macrófagos nas paredes dos vasos (SANTILLI et al., 2015). Os AGEs também aumentam a expressão da endotelina-1 em células endoteliais. Assim, há uma alteração no equilíbrio entre os níveis de NO e endotelina-1, favorecendo a vasoconstrição e disfunção endotelial (ROBERTS e PORTER, 2013; SENA et al., 2013).

Outra hipótese responsável pela alteração vascular no diabetes é a via da PKC (TESSARI et al., 2010). A ativação da PKC pela hiperglicemia promove a inibição da eNOS, vasodilatação reduzida e baixa liberação da endotelina-1 (AVOGARO et al., 2006). Além disso, a insulina também é responsável em modular a atividade da eNOS no interior da célula endotelial. Este hormônio exerce sua atividade vasodilatadora através da via fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt) (SENA et al., 2013). Assim, é demonstrado que indivíduos que apresentam uma diminuição na expressão da eNOS, estão mais propensos a desenvolver resistência insulínica (DUPLAIN et al., 2001; CAPELLINI et al., 2010). Aparentemente, a modulação da fosforilação da eNOS em camundongos é suficiente para afetar a sensibilidade da insulina sistêmica, indicando que fosforilação nesta enzima pode ser um novo alvo terapêutico para o tratamento da resistência insulínica (KASHIWAGI et al., 2013). Além disso, foi demonstrado no diabetes que o aumento da expressão de caveolina-1 no endotélio ocasiona uma diminuição da atividade da eNOS (BUCCI et al., 2004).

Em relação às complicações do diabetes, o desenvolvimento de microalbuminúria no DM caracteriza-se por um progressivo grau de comprometimento endotelial, ocasionado por

uma redução da atividade do NO (TESSARI et al., 2010; OTT et al., 2011). Além disso, a DRD está associada a uma redução da produção de NO renal (PRABHAKAR et al., 2007). Em pacientes com DM tipo 2, o aumento dos níveis plasmáticos de glicose *per se* podem inibir a atividade da eNOS nos glomérulos, através do mecanismo da PKC (CHU e BOHLEN, 2004). Em um estudo recente, Bo et al. (2015) demonstraram em um modelo experimental utilizando células endoteliais da veia umbilical humana, que elevadas concentrações de HbA<sub>1c</sub> inibiram a produção de NO e aumentaram a produção de EROs. Desta maneira, a incubação com crescentes concentrações de HbA<sub>1c</sub> demonstrou regular negativamente a expressão do mRNA da eNOS, além de diminuir a expressão desta enzima. Estes resultados fornecem evidências diretas de que a HbA<sub>1c</sub> está envolvida no desenvolvimento e progressão das complicações cardiovasculares do diabetes. Já Sharma et al. (2015) evidenciaram que a diminuição de NO pode ser, em parte, responsável pelo desenvolvimento das complicações renais, cardíacas e hipertensivas do DM tipo 2. Além do NO, a albumina urinária também é considerada um marcador de disfunção endotelial (AKSUN et al., 2003), e está associada a um aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular em pacientes diabéticos (FU et al., 2009). Aliado a isso, a disfunção endotelial é um possível mecanismo para explicar a associação entre a aterosclerose e doença renal (PARK et al., 2014). Harmer et al. (2014) demonstraram que a albuminúria está associada com a função do músculo liso arterial comprometida em pacientes com DM tipo 2.

Outro fator responsável pelo o início, progressão e complicações do DM tipo 2 é o processo inflamatório (DONATH e SHOELSON, 2011; AKASH et al., 2013). Inflamação é definida como uma cascata de fenômenos induzida em resposta a diferentes estímulos patológicos e lesão tecidual (ZOZULINSKA e WIERUSZ-WYSOCKA, 2006). A resposta inflamatória consiste basicamente de dois componentes principais: uma reação vascular e uma reação celular/tecidual. A reação vascular caracteriza-se pelo aumento do suprimento sanguíneo para as áreas afetadas, além do aumento da permeabilidade capilar que permite que moléculas de grande peso molecular, tais como anticorpos, possam atravessar o endotélio (LAWRENCE e GILROY, 2007). O evento celular caracteriza-se pela migração de diferentes tipos celulares. As células circulantes incluem os neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas, além das células do tecido conjuntivo, incluindo mastócitos, fibroblastos e macrófagos locais (GRUYS et al., 2005).

As características fisiológicas do processo inflamatório são iniciadas e reguladas por substâncias denominadas mediadores inflamatórios. Na maioria das vezes, os mediadores inflamatórios agem localmente no sentido de restringir a extensão do dano tecidual. Neste

caso, o processo inflamatório tem apenas repercussões locais. No entanto, quando esta capacidade homeostática local é superada, seja pela magnitude do estímulo agressor ou pela insuficiência dos mecanismos reguladores, a resposta inflamatória pode se manifestar de modo sistêmico em todo o organismo, gerando graves consequências (KARIN et al., 2006). Os mediadores inflamatórios incluem proteases, constituintes do sistema complemento, sistema fibrinolítico e sistema de coagulação, mediadores liberados por fosfolipídios, e outros mediadores como, histamina, serotonina, fatores de transcrição, NO, proteína C reativa (PCR) e MPO, além das citocinas (EISERICH et al., 2002; LAWRENCE e GILROY, 2007).

Citocina é um termo funcionalmente genérico que é aplicado a mediadores proteicos ou polipeptídicos sintetizados e liberados por células do sistema imunológico durante a inflamação, sendo extremamente importantes para a coordenação geral da resposta inflamatória. As citocinas atuam localmente por mecanismos autócrinos ou parácrinos, e apresentam um peso molecular que varia de 8 a 40.000 kDa. Sua síntese é acentuadamente suprarregulada durante episódios de inflamação e elas geralmente exercem suas ações em concentrações muito baixas (STANLEY e LACY et al., 2010; RANG e DALE, 2011). Na célula-alvo, as citocinas ligam-se e ativam receptores específicos de alta afinidade que, na maioria dos casos, também são suprarregulados durante a inflamação (RANG e DALE, 2011). Além de suas próprias ações diretas sobre as células, algumas citocinas amplificam a inflamação por indução da formação de outros mediadores inflamatórios. Mais de cem citocinas foram identificadas e divididas em quatro grupos principais, denominados interleucinas, quimiocinas, interferons e fatores estimuladores de colônias (RANG e DALE, 2011).

Os mediadores da inflamação estão associados com a história natural do DM tipo 2, sendo que pacientes com esta patologia recém diagnosticados apresentam elevados valores de proteínas de fase aguda e citocinas pró-inflamatórias comparados com pacientes não-diabéticos (ZOZULINSKA e WIERUSZ-WYSOCKA, 2006; DONATH e SHOELSON, 2011; AKASH et al., 2013). Além disso, o estresse oxidativo, a glicolipototoxicidade, a resistência insulínica, além das anormalidades metabólicas, podem provocar uma inflamação tecidual específica, fato este que apresenta um papel crucial na patogênese do DM tipo 2 (AKASH et al., 2013). No DM tipo 2, a inflamação pode contribuir para o “*burst* respiratório”, com subsequente produção de dano ao DNA (COOKE et al., 2006; SHIMIZU et al., 2014). O processo inflamatório, e mais especificamente as citocinas pró-inflamatórias, desempenham uma função importante no desenvolvimento das complicações crônicas do diabetes (NAVARRO e MORA, 2005). É importante compreender que a inflamação

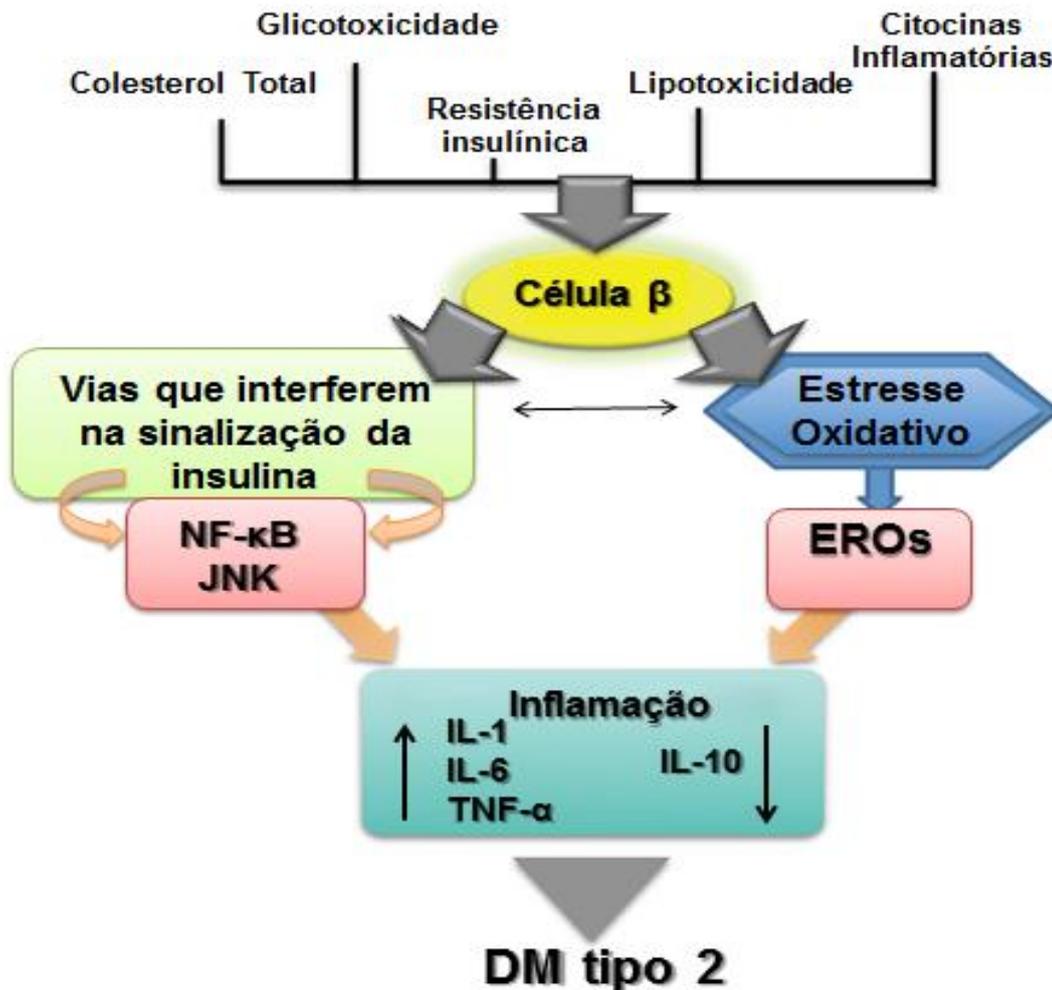
subclínica e crônica não pode ser considerada como a única ou principal causa do DM tipo 2, na ausência de outros fatores de risco. No entanto, este processo inflamatório representa um importante mecanismo que serve como um elo entre as principais causas desta patologia e suas manifestações (HERDER et al., 2013). Além disso, os marcadores inflamatórios permitem a diferenciação entre as fases pré-clínica e clínica precoces do DM tipo 2, das suas complicações, além da sua progressão (GROSSMANN et al., 2015).

Estudos relatam que o DM tipo 2 está associado com aumento das concentrações sanguíneas de proteínas de fase aguda, como a PCR. As proteínas de fase aguda são sintetizadas no fígado e estimuladas pelas citocinas, como a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (CHOI et al., 2004; DONATH et al., 2010). A PCR é produzida por células do fígado, sendo considerado um marcador muito sensível de inflamação (FU et al., 2009). A PCR ultra-sensível é considerada um marcador de risco cardiovascular e também está correlacionada com a resistência insulínica. Os níveis deste marcador estão aumentados em indivíduos obesos que também são resistentes à insulina, e estes níveis diminuem com a perda de peso e a melhora da sensibilidade à insulina (SHOELSON et al., 2007). Este marcador também é considerado um preditor de mortalidade em indivíduos com DM tipo 2 ao longo de um período de 5 a 7 anos (JAGER et al., 1999).

Interleucinas são um grupo de citocinas (proteínas secretadas/ moléculas de sinalização) expressas pelos leucócitos, sendo responsáveis pela mediação da resposta imune, apresentando um papel crucial na patogênese do DM tipo 2 (MUSA et al., 2010; SAXENA et al., 2013). Desta maneira, é bem definido que citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-6 e o TNF- $\alpha$  possuem diversas atividades metabólicas, sendo responsáveis pela progressão do diabetes, enquanto que as citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10) concedem proteção ao organismo (SAXENA et al., 2013). Diversos estudos clínicos e experimentais têm estabelecido que o tecido adiposo, fígado, músculos e pâncreas são sítios de inflamação na presença de diabetes. Sendo assim, uma infiltração de macrófagos nestes tecidos é observada em modelos animais de obesidade e diabetes, bem como em indivíduos com síndrome metabólica ou DM tipo 2 (SHOELSON et al., 2006; CHAWLA et al., 2011; ESSER et al., 2014). Assim, estas células são cruciais para a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 (CHAWLA et al., 2011). No DM tipo 2, diversos estressores como o colesterol total, glicotoxicidade, lipotoxicidade, resistência insulínica e citocinas inflamatórias podem induzir um estresse celular nas células  $\beta$  pancreáticas através do estresse oxidativo e também devido a ativação de vias que possam interferir na sinalização

da insulina. Todos estes processos podem ativar várias cascatas inflamatórias que contribuem para o agravamento do processo inflamatório (Figura 6) (MONTANE et al., 2014).

Figura 6 – Fatores envolvidos no processo inflamatório e sua relação com o diabetes tipo 2



Fonte: Adaptado de Montane et al., 2014. NF- $\kappa$ B, fator de transcrição  $\kappa$ B; JNK, proteína quinase *c-JUN N-terminal*; EROs, espécies reativas de oxigênio; IL-1, interleucina-1; IL-6, interleucina-6; IL-10, interleucina-10; TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral alfa.

As interleucinas atuam por mecanismos autócrinos e parácrinos para promover a resistência insulínica, interferindo na sinalização da insulina nos tecidos periféricos através da ativação das vias quinase *c-JUN N-terminal* (JNK) e NF- $\kappa$ B. Estas vias possuem um papel central no processo inflamatório tecidual (ESSER et al., 2014). Neste sentido, a Ikapa B quinase (IKK) catalisa a fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  levando à degradação do complexo proteico citoplasmático e a liberação do NF- $\kappa$ B, que se transloca do citoplasma para o núcleo onde ativa a transcrição de vários genes relacionados à inflamação, como as citocinas pró-

inflamatórias (SHOELSON et al., 2007). Muitos estímulos podem ativar as vias JNK e IKK/NF- $\kappa$ B como as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que podem ativar essas vias através de mecanismos mediados pela interação com seus receptores clássicos e retroalimentam a produção de novos marcadores inflamatórios (MCNELIS e OLEFSKY, 2014). Receptores de reconhecimento padrão como o receptor tipo *Toll-like* e RAGE também podem ativar as vias JNK e IKK/NF- $\kappa$ B (GAO et al., 2002). Estudos demonstram que a via JNK apresenta um papel crucial na apoptose mediada por citocinas nas células  $\beta$ , como sugerido através da prevenção da apoptose devido a inibição desta via (AMMENDRUP et al., 2000; BONNY et al., 2001).

A IL-6 é a principal citocina pró-inflamatória que induz resposta de fase aguda, e também é a principal citocina pró-coagulante que estimula a produção de fibrinogênio no fígado (ASO et al., 2003). Esta citocina estimula o fígado a aumentar a produção de proteínas de fase aguda, como a PCR (LIBBY, 2000; ROCHA e FOLCO, 2011). Além disso, a IL-6 também promove eventos inflamatórios através da expansão e ativação das células T e a diferenciação de células B (EL-KADRE e TINOCO, 2013). Desta maneira, tem a sua síntese a partir de linfócitos T e macrófagos, podendo também ser produzida a partir do tecido adiposo. Também pode ser produzida a partir de células endoteliais vasculares e fibroblastos (MOHAMED-ALI et al., 1997).

As concentrações plasmáticas da IL-6 encontram-se elevadas em pacientes com DM tipo 2, especialmente aqueles com características de síndrome da resistência insulínica (ASO et al., 2003; DONATH e SHOELSON, 2011; SAXENA et al., 2013). O papel da IL-6 no DM tipo 2 é considerado complexo e controverso. No entanto, vários estudos experimentais têm confirmado que esta citocina induz resistência insulínica em tecidos periféricos (FÈVE e BASTARD, 2009; AKASH et al., 2013), apoptose em ilhotas pancreáticas juntamente com a participação de outras citocinas inflamatórias (PRADHAN et al., 2001; AKASH et al., 2013), além de estimular a inibição de proteínas sinalizadoras de citocinas (PRADHAN et al., 2001). Assim, através destes efeitos deletérios, a IL-6 é considerado um fator de risco independente, além de agir como um preditor e marcador patogênico para a resistência insulínica e progressão do DM tipo 2 (TILG e MOSCHEN, 2008). Esta citocina também desempenha uma função importante no processo de ruptura ou erosão da placa de aterosclerose e tem seus valores séricos aumentados nestes eventos (ONG et al., 2015). No contexto da DRD, foi demonstrado que a IL-6 afeta a dinâmica da matriz extracelular em podócitos e células mesangiais. Também estimula a proliferação de células mesangiais, aumenta a expressão de fibronectina e também aumenta a permeabilidade endotelial (DALLA VESTRA et al., 2005).

É estimado que aproximadamente um terço dos níveis circulatórios totais da IL-6 seja produzido pelo tecido adiposo (FRIED et al., 1998). Desta forma, é possível que o aumento da secreção da IL-6 em certas condições de obesidade contribua para o desenvolvimento de disfunção metabólica, como ocorre no diabetes (OUCHI et al., 2011).

O TNF- $\alpha$  é considerada uma citocina inflamatória pleiotrópica, produzida principalmente pelos monócitos, macrófagos e células T (TILG e MOSCHEN, 2008). O TNF- $\alpha$  exerce os seus efeitos biológicos sobre os tecidos através de sua ligação a dois receptores de superfície celular denominados receptor 1 do TNF- $\alpha$  (TNFR1) e receptor 2 do TNF- $\alpha$  (TNFR2). Esta citocina e ambos seus receptores podem ser clivados proteolicamente para que ocorra a liberação de sua forma solúvel (sTNFR). Esta forma solúvel pode estar envolvida na neutralização e excreção do TNF- $\alpha$ , podendo assim modular temporariamente a sua atividade (GATANAGA et al., 1990). O TNF- $\alpha$  exerce funções na regulação da diferenciação, proliferação e morte celular, bem como na resposta imune inata e adaptativa (QIDWAI e KHAN, 2011). Esta citocina regula negativamente a atividade da tirosina quinase nos receptores de insulina, podendo levar ao aumento da resistência à insulina no diabetes (MISHIMA et al., 2001; TILG e MOSCHEN, 2008). Deste modo, uma produção acentuada de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo leva à resistência insulínica nos tecidos periféricos, através da indução do processo inflamatório e morte das células- $\beta$  nas ilhotas pancreáticas (HOTAMISLIGIL, 2006). No tecido adiposo, o TNF- $\alpha$  aciona vias de sinalização pró-inflamatórias levando à ativação de NF- $\kappa$ B e da cascata da MAPK, sendo estas vias consideradas as principais no desequilíbrio metabólico ocorrido no diabetes (CAWTHORN e SETHI, 2008).

No contexto da DRD, foi demonstrado por Gupta e colaboradores (2013), que os níveis elevados de TNF- $\alpha$  são citotóxicos para as células renais, podendo levar ao desenvolvimento desta complicação do diabetes. Além disso, foi demonstrado que as concentrações de TNF- $\alpha$  estão aumentadas em células tubulares glomerulares e proximais de ratos diabéticos. Deste modo, fica evidenciado o papel desta citocina no desenvolvimento da hipertrofia e hiperfunção renal, duas principais alterações no estágio inicial da DRD (NAVARRO e MORA, 2005). Também foi observado que concentrações aumentadas de TNF- $\alpha$  e PCR podem ser considerados fatores de risco para a DRC no DM tipo 2 (YEO et al., 2010). Satoh e colaboradores (2003) demonstraram que a produção de TNF- $\alpha$  encontra-se aumentada em tecidos neurais e microvasculares, podendo assim sofrer um aumento da permeabilidade microvascular, hipercoagulabilidade e danos nos nervos. Estes eventos podem desencadear o desenvolvimento de lesões características da NDR.

A IL-1 compreende uma família de três citocinas composta de dois agonistas (pró-inflamatórios), IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e, também, um antagonista endógeno do receptor da IL-1, IL-1ra (anti-inflamatória) (RANG e DALE, 2011). Os efeitos sistêmicos da IL-1 compreendem regulação dos níveis de glicose sanguínea, da pressão sanguínea e do metabolismo do ferro, além de atuar na remodelação óssea (DINARELLO, 1996; BANERJEE e SAXENA, 2012). Além disso, esta citocina apresenta um papel de conexão entre os sistemas imune e neuroendócrino, através de funções-chaves em processos como regulação termostática, percepção da dor e apetite. A IL-1 promove adesão de neutrófilos e outras células através do aumento de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1) e L-selectina (DINARELLO, 1996; BANERJEE e SAXENA, 2012). A IL-1 é liberada por diversos tipos celulares, devido à indução de vários estímulos inflamatórios, como produtos bacterianos, citocinas e lipídios bioativos (BANERJEE e SAXENA, 2012).

A IL-1 $\beta$ , uma das principais citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos macrófagos, tem sido demonstrado ser um dos principais contribuintes para a patogênese do DM tipo 2 (ESSER et al., 2014). A sinalização de IL-1 $\beta$  ocorre através do receptor IL-1ra, induzindo a ativação da via NF- $\kappa$ B e a geração de outros mediadores inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , iniciando assim uma rede de citocinas auto-amplificadoras (DINARELLO, 2009). O controle da produção de IL-1 $\beta$  é rigidamente controlado e depende de dois sinais. A expressão e a liberação de IL-1 $\beta$  estão aumentados nas ilhotas pancreáticas de indivíduos com DM tipo 2. Estudos relatam que esta citocina possui um efeito principal na regulação do processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas no DM tipo 2, através do aumento da expressão local de outras citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (MAEDLER et al., 2002; DINARELLO, 2009). Este fato leva ao recrutamento de células imunes nestas ilhotas, sendo que esta inflamação local pode vir a reduzir a secreção de insulina, além de desencadear apoptose das células- $\beta$ , levando a diminuição da massa das ilhotas, sendo estes eventos críticos na progressão do diabetes (DONATH et al., 2010; BANERJEE e SAXENA, 2012; ESSER et al., 2014).

Além disso, a estimulação de células- $\beta$  para produzir IL-1 $\beta$  também aumenta a produção de NO, levando a redução da concentração de ATP, podendo ocasionar a disfunção nas células  $\beta$  pancreáticas e redução na secreção de insulina (YANG et al., 2010; AKASH et al., 2013). Sabe-se que a hiperglicemia e a produção acentuada de IL-1 $\beta$  nas células  $\beta$  pancreáticas ativam a via NF- $\kappa$ B. Entretanto, o bloqueio da ativação da via NF- $\kappa$ B pelo IL-1ra protege as células- $\beta$  de vários efeitos deletérios, através do bloqueio da atividade desta via e

da JNK, assim, diminuindo o processo inflamatório (AKASH et al., 2013). Deste modo, um equilíbrio entre IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pode melhorar a função das células  $\beta$ , bem como o controle glicêmico em pacientes com DM tipo 2 (LARSEN et al., 2009). No contexto da DRD, foi demonstrado que a IL-1 aumenta a permeabilidade vascular e endotelial, estando também envolvida na proliferação de células mesangiais e na síntese da matriz, bem como no desenvolvimento das anormalidades microcirculatórias intraglomerulares (NAVARRO e MORA, 2005).

Outro fator responsável pelo processo inflamatório no DM tipo 2 é a falha no mecanismo anti-inflamatório (DONATH e SHOELSON, 2011). Neste sentido, citocinas pró-inflamatórias podem causar resistência insulínica, e citocinas anti-inflamatórias podem conter estes efeitos negativos, sugerindo que um desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias *versus* anti-inflamatórias pode apresentar um papel chave na patogênese do DM tipo 2 (SCARPELLI et al., 2006). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que desempenha uma função crucial na regulação do sistema imune inato. Esta citocina é liberada por células T, células B, monócitos e macrófagos, agindo sobre a maioria dos tipos de células hematopoiéticas (VAN EXEL et al., 2002; MO e FLAVELL, 2008; HERDER et al., 2013). Apresenta propriedades de desativação sobre a resposta inflamatória, além de inibição de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e TNF- $\alpha$  (VAN EXEL et al., 2002). Neste contexto, níveis elevados de IL-10 ocasionam uma acentuada regulação da atividade da tirosina quinase dos receptores de insulina, diminuindo os efeitos da IL-6 e TNF- $\alpha$  (VAN EXEL et al., 2002).

Hong e colaboradores (2009) demonstraram que a expressão acentuada de IL-10 em músculos esqueléticos de ratos submetidos a uma dieta pobre em gordura, reduziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias, bem como o aumento da sensibilidade à insulina em comparação com ratos submetidos a uma dieta rica em gordura. Este fato indica que a IL-10 pode apresentar um importante papel na proteção ao diabetes. Em outro estudo *in vivo*, realizado em humanos, foi demonstrado que a diminuição nas concentrações de IL-10 estavam associados com maiores níveis de HbA<sub>1c</sub>, glicose plasmática e dislipidemia, bem como maior prevalência de DM tipo 2 (VAN EXEL et al., 2002). Também foi demonstrado por Bluher e colaboradores (2005), que a concentração de IL-10 foi inversamente correlacionada com o índice de massa corpórea (IMC) e a gordura corporal. Seus níveis também se encontravam diminuídos em pacientes DM tipo 2, comparados com indivíduos saudáveis. Segundo Nishida e colaboradores (2007), a IL-10 também apresenta um efeito protetor contra a aterogênese. Foi demonstrado na literatura que a adiponectina, uma importante adipocina anti-inflamatória, induz a expressão de IL-10 em macrófagos humanos.

Aparentemente, parte dos efeitos anti-aterogênicos da adiponectina são mediados pela IL-10 (CHOI et al., 2007; NISHIDA et al., 2007).

O DM tipo 2 é uma patologia associada com a obesidade, que geralmente está relacionada com os níveis de adipocitocinas, como a adiponectina, resistina e leptina (CHAKRABORTI, 2015). A adiponectina é um hormônio proteico que modula vários processos metabólicos, incluindo a regulação da glicemia e o catabolismo de ácidos graxos (DÍEZ e IGLESIAS, 2003). Também apresenta como funções a melhora da sensibilidade à insulina nos principais tecidos alvo da insulina, bem como modulação da resposta inflamatória (WAN et al., 2014; RUAN e DONG, 2016). Neste contexto, a redução dos seus níveis está associada à resistência insulínica no DM tipo 2 e a progressão das complicações crônicas do diabetes, incluindo vasculares e cardíacas (CHAKRABORTI, 2015; RODRÍGUEZ et al., 2016; RUAN e DONG, 2016). A resistina, considerada uma citocina pró-inflamatória, é produzida pelos monócitos, macrófagos, além dos adipócitos (STEPPAN et al., 2001; KUSMINSKI et al., 2005). Ao contrário da adiponectina, este polipeptídeo apresenta um baixo nível circulatório, onde seus níveis encontram-se aumentados em pacientes com DM tipo 2 resistentes à insulina (STEPPAN et al., 2001; CHAKRABORTI, 2015). A leptina é um hormônio peptídico produzido principalmente pelos adipócitos e sua concentração varia de acordo com a quantidade de tecido adiposo (PAZ-FILHO et al., 2012). Na obesidade e no DM tipo 2 os níveis de leptina estão aumentados (HAVEL, 2004; GOLDSTEIN et al., 2009), bem como no desenvolvimento das complicações microvasculares do DM (RODRÍGUEZ et al., 2016). Este hormônio apresenta como funções o controle do apetite e controle da massa corporal, bem como inflamação vascular, aumento do estresse oxidativo e disfunção endotelial (PAZ-FILHO et al., 2012; RODRÍGUEZ et al., 2016).

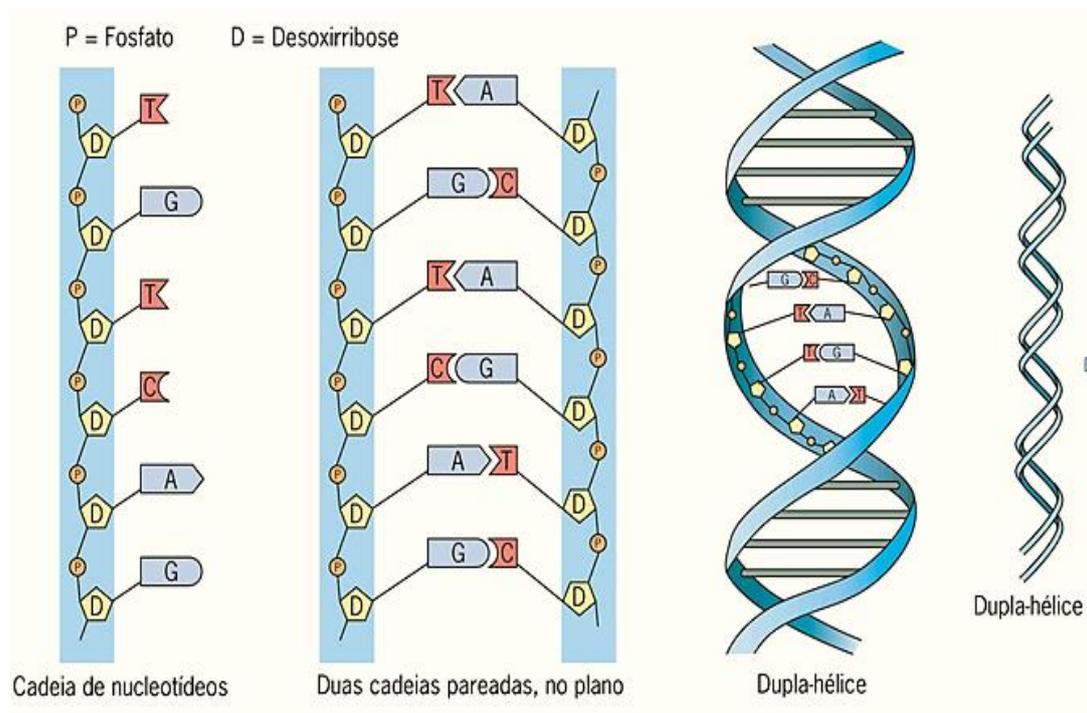
## 2.6 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é um polímero de nucleotídeos ou bases que carrega toda a informação genética, sendo transmitida aos seus descendentes, portanto, de extrema importância à manutenção de sua integridade. Essa informação genética é reproduzida de células-mães para células-filhas durante a divisão celular pelo processo de replicação de DNA. Quando os genes são expressos, a sequência de DNA é transcrita em ácido ribonucleico (RNA) (BURTIS, 2008). A molécula de DNA é constituída por uma sequência de nucleotídeos, formados por três diferentes tipos de moléculas: um açúcar pentose; um grupo fosfato e uma base nitrogenada. As bases nitrogenadas são derivadas de

compostos heterocíclicos que são as purinas, representadas pela adenina e guanina (A e G) e as pirimidinas, representadas pela citosina e timina (C e T) (ZAHA et al., 2014). A orientação das ligações entre as três moléculas constituintes dos nucleotídeos é essencial para se determinar o sentido da dupla fita de DNA. Esta consiste de duas cadeias helicoidais, enroladas ao longo de um mesmo eixo, o que forma uma dupla hélice, com sentido rotacional à direita, estando as duas fitas de DNA em direções opostas, ou seja, são antiparalelas. Baseado nestas estruturas demonstrou-se que todos os genes apresentam a mesma forma tridimensional e que as diferenças entre dois genes encontram-se na ordem e no número de seus quatro nucleotídeos construtores ao longo das fitas complementares (WATSON et al., 2006).

O modelo de dupla hélice do DNA foi proposto inicialmente por Watson e Crick em 1953, considerando três conceitos: o DNA possuía a forma de uma hélice regular, apresentando uma volta completa a cada 34 Å e com diâmetro de aproximadamente 20 Å. A densidade do DNA sugere que a hélice pode ser explicada se as bases em cadeia estiverem voltadas para o interior e restrinjam-se de tal forma que uma purina esteja sempre em oposição a uma pirimidina, evitando dessa maneira o pareamento de purina-purina e pirimidina-pirimidina. Independente das quantidades absolutas de cada base, a proporção de G é sempre igual à de C, enquanto a de A é sempre igual à de T (LEWIN, 2009). Assim, as duas fitas de DNA que atendem a esses requerimentos são chamados de complementares. Devido ao pareamento de bases e à conformação dupla-hélice, o DNA dupla-fita (dsDNA) é uma molécula excepcionalmente estável (BURTIS, 2008). Essas propriedades também garantem a propriedade de replicação de cadeias longas de DNA e a transmissão de informação genética às proteínas, via transcrição (Figura 7) (ZAHA et al., 2014).

Figura 7 – Estrutura do DNA dupla-hélice



Fonte: Da Silva et al., 2011.

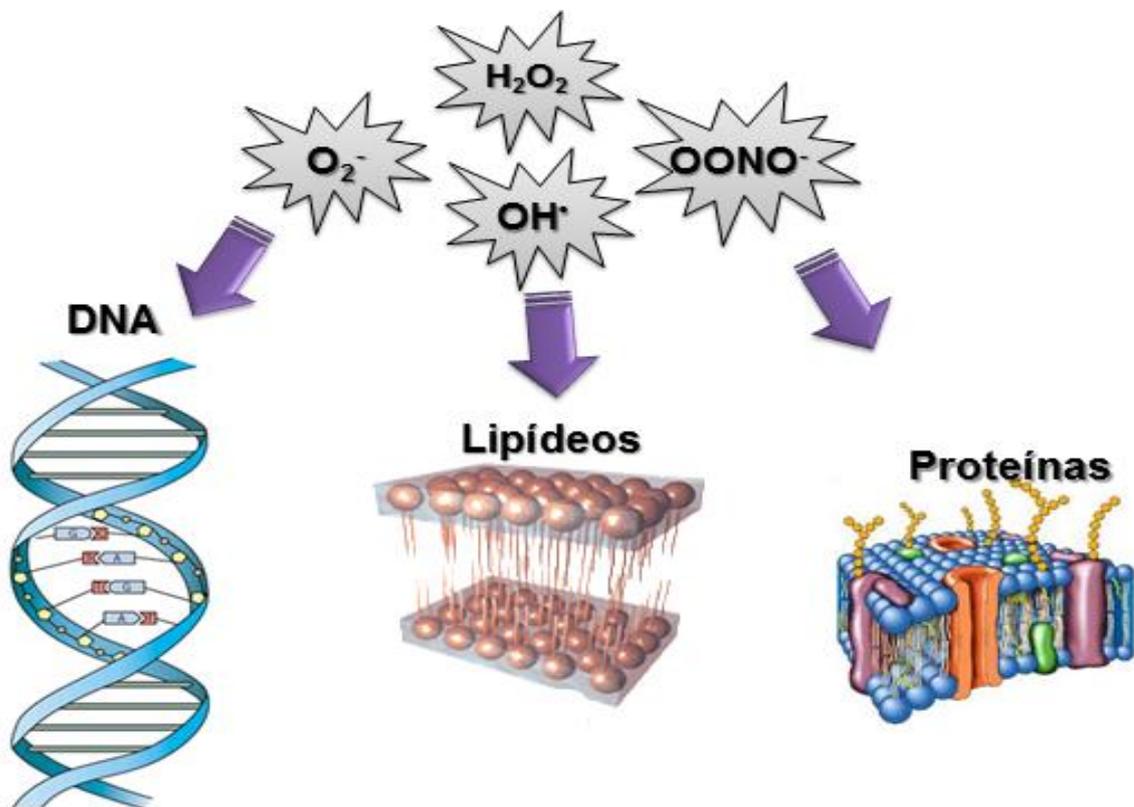
## 2.7 DANO AO DNA E SUAS CARACTERÍSTICAS

Estima-se que cada uma das  $10^{13}$  células do corpo humano sofrem milhares de lesões no DNA por dia (LINDAHL e BARNES, 2000). Estas lesões podem bloquear a transcrição e replicação do genoma, e se não reparadas ou reparadas incorretamente, pode haver mutações ou aberrações do genoma humano em larga escala, ameaçando a viabilidade da célula ou do organismo (JACKSON e BARTEK, 2009; DELANEY et al., 2012). Assim, se a lesão bloqueia parcial ou completamente a replicação, esta lesão é denominada tóxica. Já se a replicação ocorre, mas a base incorporada está incorreta, esta lesão é chamada de mutagênica (DELANEY et al., 2012). Em outras palavras, as mutações alteram o conteúdo informacional de uma molécula de DNA, enquanto que os danos modificam a estrutura da molécula de DNA (FREITAS e MAGALHÃES, 2011). Para combater as ameaças representadas por danos no DNA, as células desenvolveram coletivamente mecanismos para este dano, denominados resposta ao dano no DNA, a fim de detectar lesões de DNA, sinalizar a sua presença e promover o seu reparo (HARPER e ELLEDGE, 2007). Células defeituosas nesses mecanismos de reparo geralmente exibem sensibilidade para com os agentes que danificam o DNA, podendo levar a diversas doenças (JACKSON e BARTEK, 2009). Como existe uma

diversidade de tipos de dano ao DNA, há também uma variedade de mecanismos de reparo (JACKSON e BARTEK, 2009), como recombinação homóloga, recombinação não-homóloga, reparo de excisão de bases e reparo de excisão de nucleotídeos (LOMBARD et al., 2005).

Durante o metabolismo normal da molécula de DNA podem ocorrer alterações espontâneas, comprometendo o seu bom funcionamento, como por exemplo desemparelhamento de bases, perda do grupo amino, perda das bases gerando sítios abásicos. E durante a replicação pode ocorrer inserção incorreta de nucleotídeo, quebra da fita de DNA, entre outros (FRIEDBERG, 2003). O dano ao DNA pode ser causado por diversos estressores endógenos e exógenos, incluindo estresse oxidativo, encurtamento dos telômeros, mutações oncogênicas, estresse genotóxico e metabólico (LÓPEZ-OTIN et al., 2013; SHIMIZU et al., 2014). Neste contexto, a nível de estresse oxidativo, um desequilíbrio entre a produção de EROs e a defesa antioxidante pode levar a danos oxidativos em lipídios, proteínas e DNA (Figura 8) (SLIWINSKA et al., 2008).

Figura 8 – Esquema demonstrando os alvos das espécies reativas de oxigênio: as proteínas, lipídeos e o DNA.



Fonte: Adaptado de Torres et al., 2003

O estresse oxidativo não causa somente danos em proteínas, mas também afeta significativamente o DNA (DINÇER et al., 2002). O dano ao DNA é reconhecido como a maior causa de morte celular e mutações em todos os organismos aeróbicos, sendo que as EROs representam a classe de radicais mais importante gerada nos seres vivos. Desta forma, o dano ao DNA pode ser relacionado com o desenvolvimento do câncer, doenças degenerativas, envelhecimento (BJELLAND e SEEBERG, 2003; VALKO et al., 2004), bem como o DM (SHIMIZU et al., 2014). A formação de  $\text{OH}^{\bullet}$ , assim como outras EROs próximas ao DNA, pode levar a uma série de danos que incluem modificações de bases, quebras simples e duplas, assim como *crosslinks* de proteínas, caracterizando estas espécies como potentes agentes genotóxicos (DIZDAROGLU et al., 2012). Embora as quebras duplas de DNA não ocorram com tanta frequência como as outras lesões listadas anteriormente, elas são difíceis de reparar, além de serem extremamente tóxicas (KHANNA e JACKSON, 2001). Além disso, o DNA danificado pode levar a aneuploidia e/ou instabilidade cromossômica, que se acredita ser um importante contribuinte para a progressão de tumores (EROL, 2010).

## 2.8 PRINCIPAIS TIPOS DE DANO AO DNA

### 2.8.1 Sítios abásicos, depurinação e depirimidinação

As bases podem ser perdidas pelo DNA pela clivagem da ligação glicosídica conduzindo ao aparecimento de sítios abásicos (FRIEDBERG, 2003). Sítios abásicos são potencialmente mutagênicos e podem ser produzidos por depurinação espontânea e por reações de depirimidinação. A depurinação envolve a perda de bases purínicas a partir do DNA. Em reações que a depurinação ocorre espontaneamente, a ligação N-glicosil a deoxiribose é quebrada por hidrólise, deixando a cadeia açúcar-fosfato do DNA intacta, produzindo um sítio abásico. A depirimidinação envolve a perda de bases pirimídicas a partir do DNA. É muito menos comum que a depurinação, uma vez que a ligação N-glicosil entre a base pirimídica e a deoxiribose é mais estável do que a ligação correspondente para bases de purina (LINDAHL, 1993). Os sítios abásicos também podem ser produzidos pelas EROs (NAKAMURA e SWENBERG, 1999), bem como produzidos pela via de reparo por excisão de bases (FREITAS e MAGALHÃES, 2011).

### 2.8.2 Deaminação

O processo de deaminação envolve a perda de grupos amino a partir de bases de DNA. Quase todas as bases de DNA sofrem deaminação em reações espontâneas, com exceção da timina, que não possui grupo amino. A maioria dos tipos de deaminação produz uma base que não ocorre naturalmente no DNA (a única exceção é a deaminação da 5-metilcitosina), e isto facilita a identificação e excisão da base desaminada pela enzima DNA glicosilase. O tipo mais comum de deaminação em células é a deaminação da citosina em uracil. Este evento ocorre a uma taxa de cerca de 100-500 bases por célula e por dia em mamíferos (FRIEDBERG, 2003; FREITAS e MAGALHÃES, 2011).

### 2.8.3 Quebras nas cadeias de DNA

Algumas rupturas nas cadeias são produzidas em etapas intermediárias de reações naturais. No entanto, algumas quebras dos filamentos são formas graves de dano ao DNA, inibindo a replicação desta molécula, levando a ativação de mecanismos de reparo do DNA (ENGELS et al., 2007). Quebras nas cadeias de DNA podem ser causadas pelo dano oxidativo ao DNA ou por radiação ionizante (FRIEDBERG, 2003). Quebras de cadeia dupla podem também resultar do bloqueio ou pausa da replicação do DNA (ENGELS et al., 2007; FREITAS e MAGALHÃES, 2011).

## 2.9 FORMAS DE AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA

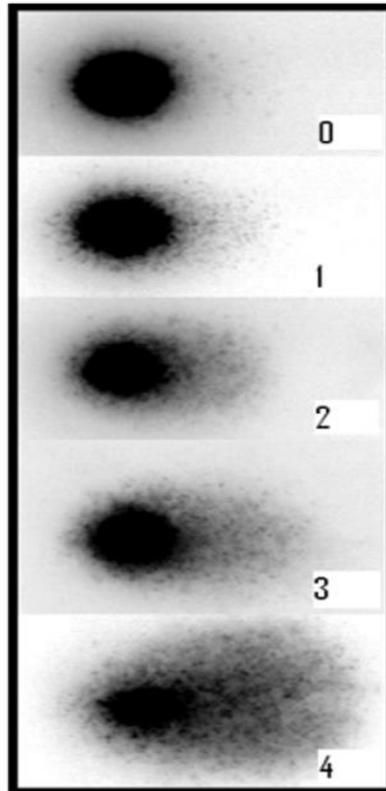
### 2.9.1 Ensaio Cometa

O ensaio cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única ou eletroforese em microgel, foi introduzido por Östling e Johanson como uma forma simples de detectar quebras de DNA. Desde o seu desenvolvimento, várias modificações na técnica foram propostas (HARTMANN et al., 2003; ARALDI et al., 2015). No entanto, o método alcalino, desenvolvido por Singh et al. (1995), que permite a desnaturação do DNA, bem como a detecção de sítios álcali-labeis, tornou-se o mais utilizado e recomendado, devido a sua vasta gama de detecção de danos no DNA. É um dos mais importantes e bem aplicados métodos *in vitro* em estudos de genotoxicologia e danos ao DNA. É considerado um método rápido, simples e sensível para medir diretamente os efeitos genotóxicos de agentes físicos e químicos, bem como a cinética de reparo de DNA em células individuais. As lesões detectadas são passíveis de correção (COLLINS et al., 1995; CHOI et al., 2005;

VANDGHANOONI e ESKANDANI, 2011). Enquanto no passado pensava-se que esses “cometas” representavam células mortas (apoptose/necrose), hoje em dia sabe-se que eles simplesmente representam células com altos níveis de dano (mas ainda potencialmente reparáveis, e com viabilidade) (LORENZO et al., 2013). O ensaio cometa apresenta diversas aplicações, como em testes de genotoxicidade, biomonitorização humana, ecogenotoxicologia, bem como pesquisa sobre o dano e reparo do DNA (COLLINS, 2014). Além disso, uma modificação simples no ensaio cometa, incorporando uma fase de digestão do DNA com uma endonuclease, faz com que seja possível mensurar o dano no DNA a nível de bases (COLLINS, 2014).

É um método *in situ* de células que são incorporadas na base de agarose, sendo lisadas e submetidas à eletroforese em condições alcalinas (DUSINSKA e COLLINS, 2008). Através desta técnica, o dano de DNA é visualizado individualmente na célula sob a forma de um aumento na migração de material genético a partir do núcleo (“cauda” do cometa). O mecanismo da técnica relaciona-se com a organização super-helicoidal do DNA, a qual se torna relaxada em função de processos de quebras, podendo formar estruturas alongadas a partir da eletroforese (LIAO et al., 2009). Após a eletroforese, o material é neutralizado, fixado e corado. As lâminas são analisadas em microscopia de fluorescência ou microscopia óptica (AZQUETA e COLLINS, 2013). A imagem visual obtida com esta técnica parece um “cometa” com uma cabeça distinta que consiste em DNA intacto (nucleoide), e uma cauda, incluindo partes danificadas ou quebradas de DNA (DUSINSKA e COLLINS, 2008). Os nucleoides podem ser analisados por meio de métodos automáticos ou por contagem visual e classificação. Os métodos automáticos são baseados nos parâmetros de densitometria. Eles identificam a intensidade de fluorescência emitida e aspectos geométricos dos nucleoides, tais como, comprimento da cauda, diâmetro da cabeça e área de cometa. O método visual consiste em analisar 100 nucleoides por lâmina, que são classificados de 0-4, onde nucleoides sem danos ao DNA são classificados em 0 e, aqueles com dano máximo em 4 (Figura 9) (AZQUETA e COLLINS, 2013; GODSCHALK et al., 2013).

Figura 9 – Esquema de classificação visual do ensaio cometa



Fonte: Reproduzido de García et al., 2004. Classificação de 0-4, onde nucleoides sem danos ao DNA são classificados em 0 e, aqueles com dano máximo em 4.

O método visual apresenta vantagens em comparação com o automatizado, pois muitas vezes os nucleoides podem estar sobrepostos nas lâminas, e o método automatizado classifica como um único cometa. Outro problema associado ao sistema automatizado é o reconhecimento de cometas *hedgehog* (“ouriço”, ou seja, cometas com uma grande cauda em forma de leque e pequenas cabeças). Neste tipo de células, os programas computadorizados podem classificar erroneamente este tipo de cometa como classe 0 (AZQUETA e COLLINS, 2013). Já Böcker et al. (1999) demonstraram que as medidas dos cometas realizadas visualmente são imprecisas devido à subjetividade do observador. Em consequência, têm menor uniformidade e baixa reprodutibilidade em diferentes laboratórios. A variabilidade relativamente alta dessas medidas impede a detecção de pequenos efeitos genotóxicos. Para evitar esta limitação, há necessidade de amostras celulares mais numerosas (AZQUETA e COLLINS, 2013). Com base nestes dados, o método visual é o mais utilizado pela maioria dos laboratórios (COLLINS et al., 2008; ARALDI et al., 2015).

Em comparação com outros testes de genotoxicidade, as vantagens mais importantes do ensaio cometa são: capacidade do ensaio para identificar danos no DNA ao nível de uma única célula; sensibilidade para a detecção de baixos níveis de danos no DNA; exigência de um número pequeno de células; facilidade de aplicação; baixo custo; flexibilidade, uma vez que pode ser utilizado para avaliar vários tipos de danos no DNA (quebras de fita simples e duplas, lesões de sítios alcalinos lábeis, locais de reparos incompletos e *crosslinks*); adaptação a uma variedade de condições experimentais; e curto período de tempo para a realização do ensaio (LIAO et al., 2009; VANDGHANOONI e ESKANDANI, 2011). As quebras de fita simples e duplas são associadas com aberrações cromossômicas e instabilidade genômica, sendo esta última diretamente associada à malignidade (PFEIFFER et al., 2000; ARALDI et al., 2015). Embora o ensaio cometa tenha sido utilizado para prever a apoptose (CHOUCROUN et al., 2001; ARALDI et al., 2015), a presença de cometas “ouriço”, não é considerado um indicador de apoptose de acordo com alguns autores (HARTMANN et al., 2003; COLLINS et al., 2008; AZQUETA e COLLINS, 2013).

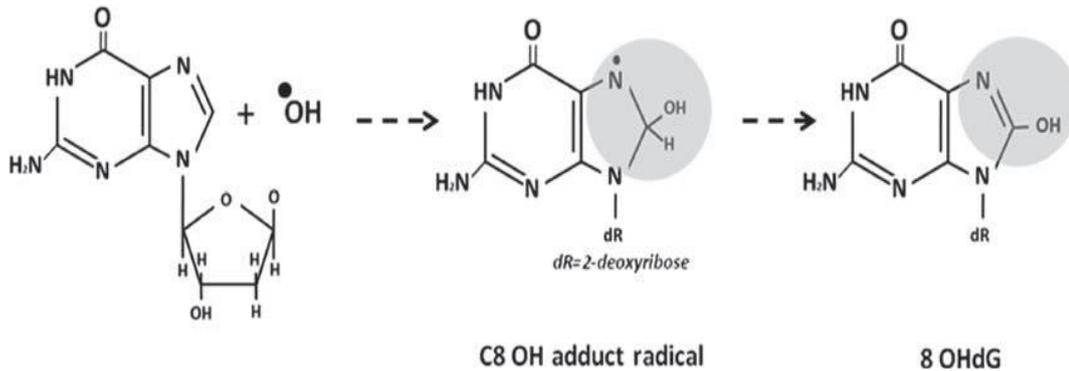
Células do sangue periférico são frequentemente utilizados para o ensaio cometa, enquanto amostras de urina e soro são utilizados para a quantificação dos níveis de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) (IL'YASOVA et al., 2012; GUNASEKARANA et al., 2015). Para saber se os resultados das amostras de células de sangue periférico refletem os níveis de danos no DNA em outros tecidos do corpo, Kushwaha et al. (2011) compararam os níveis da quebra de cadeia do DNA em linfócitos, células do pulmão, fígado, coração, aorta, rins e pâncreas de ratos diabéticos e de controles saudáveis. Com este estudo, eles descobriram que a quebra de cadeia de DNA de ratos diabéticos estava aumentado em todos os tecidos testados. Com isso, sugere-se que a quebra de cadeia de DNA em linfócitos pode ser um marcador adequado para indicar dano no DNA em órgãos internos.

### **2.9.2 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina**

Bjelland e colaboradores (2003) demonstraram que o dano oxidativo ao DNA não ocorre somente nas quebras de cadeia do DNA, mas também a nível de bases. Todas as quatro bases podem ser suscetíveis à oxidação, com várias modificações já documentadas (BJELLAND et al., 2003). Entre todas as bases purínicas e pirimídicas, a guanina é a mais propensa à oxidação e apresenta o menor potencial de redução. Após a oxidação, ocorre à incorporação de um OH<sup>•</sup> no carbono oito da molécula, formando o 8-OHdG (DIZDAROGLU e JARUGA, 2012; IL'YASOVA et al., 2012). Durante o processo de duplicação do DNA, a molécula de guanina normal parecia-se com a citosina (G-C). Contudo, caso ocorra a formação

de 8-OHdG, por um fenômeno conhecido como transversão de bases, a guanina oxidada paraia-se, de forma errônea, com a molécula de timina (G-C → G-T) (Figura 10) (RIBEIRO et al., 2008). Desta forma, quando o DNA danificado é reparado, este biomarcador produzido é excretado na urina, sem a ocorrência de metabolismo adicional (XU et al., 2004).

Figura 10 – Esquema da formação do 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina



Fonte: Reproduzido de Serdar et al., 2012.

O DNA nuclear e mitocondrial de tecidos e linfócitos é, geralmente, o local preferencial do dano oxidativo (WU et al., 2004). Embora o 8-OHdG seja identificado em tecidos biológicos, geralmente é mensurado na urina devido à facilidade da coleta da amostra (XU et al., 2004). Assim, o 8-OHdG urinário é amplamente utilizado como um biomarcador sensível do dano oxidativo ao DNA e do estresse oxidativo sistêmico total *in vivo* (XU et al., 2004). No geral, é descrito que as lesões oxidativas ao DNA são fracamente mutagênicas, por exemplo, o 8-OHdG apresenta frequência de mutação entre 2,5 a 4,8% em células de mamíferos. No entanto, a formação, persistência e acumulação desta lesão *in vivo* pode dar a este valor maior significância (COOKE et al., 2006). Assim, a hidroxilação oxidativa da guanina na posição oito é a mais frequente e mutagênica lesão no DNA nuclear (WU et al., 2004). É bem estabelecido que a presença de 8-OHdG na urina pode afetar os processos de replicação e transcrição (COOKE et al., 2006). Por este motivo, estudos demonstram a importância clínica da avaliação do dano ao DNA oxidativo em diversas patologias como, câncer, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas e o DM. Neste sentido, o 8-OHdG é um dos mais utilizados marcadores de dano oxidativo ao DNA (WU et al., 2004; XU et al., 2004; IL'YASOVA et al., 2012).

Existem vários métodos analíticos para a dosagem dos níveis de 8-OHdG no soro e urina, demonstrando a importância da investigação do dano oxidativo ao DNA nas diversas

patologias existentes (COOKE et al., 2006). As técnicas utilizadas empregam metodologias complexas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS). Apesar de serem técnicas altamente sensíveis, estes métodos possuem alguns inconvenientes como, custos elevados, ensaios demorados, necessidade de vários reagentes para a realização das técnicas, bem como preparo das amostras antes de seus procedimentos (DIZDAROGLU, 1994; SHIGENAGA et al., 1994). Outro método para mensurar as concentrações de 8-OHdG são os imunoenaios, como o *Enzyme-linked Immunosorbant Assay* (ELISA). Esta é uma técnica mais rápida e de melhor custo-benefício comparada com os métodos citados anteriormente (YIN et al., 1995). Além disso, os resultados com ELISA têm mostrado uma boa correlação com as técnicas cromatográficas (COOKE et al., 2006). Embora os níveis de 8-OHdG podem ser dosados em diversas amostras biológicas, ele é geralmente mensurado na urina, pois os níveis de 8-OHdG urinário têm sido muito utilizado como um biomarcador sensível de lesões oxidativas do DNA, além de indicar o estresse oxidativo sistêmico total (XU et al., 2004; SERDAR et al., 2012). Também é considerado um marcador que reflete o equilíbrio entre o dano oxidativo e a taxa de reparo (WU et al., 2004; WEIMANN et al., 2012).

### 2.9.3 Outros ensaios

Existem diversas metodologias que mensuram o dano ao DNA, sendo as mais utilizadas o ensaio cometa e o 8-OHdG. As outras metodologias já referenciadas para a detecção de dano ao DNA em diversos organismos são: reação em cadeia da polimerase (PCR), ensaio de apoptose por método fluorimétrico (TUNEL), ensaio de micronúcleo, ensaios fluorescentes, entre outros (KUMARI et al., 2008). Além disso, tem se destacado a aplicação de métodos de proteômica para o estudo de dano ao DNA (DU PUCH et al., 2013).

O ensaio de micronúcleo é um importante biomarcador *in vivo* e *in vitro*, o qual é utilizado na epidemiologia e para a avaliação do dano citogenético em populações expostas a agentes genotóxicos. O termo micronúcleo foi introduzido em 1951, associando os fragmentos acêntricos expulsos do núcleo principal nas fases tardias da anáfase. Os micronúcleos podem ser formados por meio de dois mecanismos: quebra cromossômica ou rompimento do aparelho mitótico (KRISHNA e HAYASHI, 2000; SAMANTA e DEY, 2012). São considerados corpúsculos contendo DNA sem qualquer conexão estrutural com o núcleo principal. Os micronúcleos são facilmente detectados em células interfásicas como corpúsculos intracitoplasmáticos livres. Estes corpúsculos são pequenos, arredondados a ovais, encontrados no citoplasma, normalmente ao lado do núcleo principal (FENECH et al.,

1999). Em humanos, a análise pode ser feita em linfócitos do sangue periférico, fibroblastos e células epiteliais esfoliadas (FENECH et al., 1999; NORPPA e FALCK, 2003).

O ensaio de micronúcleo é rápido e simples, e possui algumas vantagens sobre o ensaio cometa, como: o ensaio de micronúcleo apresenta um maior poder estatístico, uma vez que analisa mais de 1000 células, sendo que o ensaio cometa analisa somente 100 células; o ensaio de micronúcleo considera somente dano genético em células mitóticas, enquanto o ensaio cometa detecta dano ao DNA em células mitóticas e interfase (MILLER e POTTER-LOCHER, 1998). A associação destes dois ensaios pode ser considerada como padrão-ouro entre os testes mutagênicos, porque ambos apresentam alta sensibilidade, poder estatístico, sendo simples, versáteis, de baixo custo e rápidos (ARALDI et al., 2015). No entanto, o teste de micronúcleo também apresenta desvantagens como: a formação do micronúcleo requer, pelo menos, uma divisão celular; nem todos os fragmentos acêntricos formam micronúcleo na primeira divisão celular (NORPPA e FALCK, 2003).

Um dos testes utilizados para a avaliação de danos na cromatina é o *Terminal deoxyribonucleotidyltransferase Mediated Deoxyuridine Triphosphate Nick end Labeling assay* (TUNEL). Este ensaio se baseia na incorporação de nucleotídeos marcados com isotiocianato de fluoresceína nas regiões 3'OH livres da quebra de fita simples ou duplas de DNA. Essa reação é catalisada pela enzima nucleotidil transferase que polimeriza os nucleotídeos modificados nas regiões de quebra do DNA. A incorporação dos nucleotídeos marcados amplificados pode ser detectada por microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo (PULKKANEN et al., 2000; KUMARI et al., 2008). Este ensaio também é utilizado para a verificação de apoptose (BRUGGEMAN et al., 1997). Apresenta limitações quanto à sensibilidade e especificidade. Na célula apoptótica, a condensação de DNA e o ambiente proteico de DNA podem interferir na progressão deste ensaio (GOLD et al., 1994).

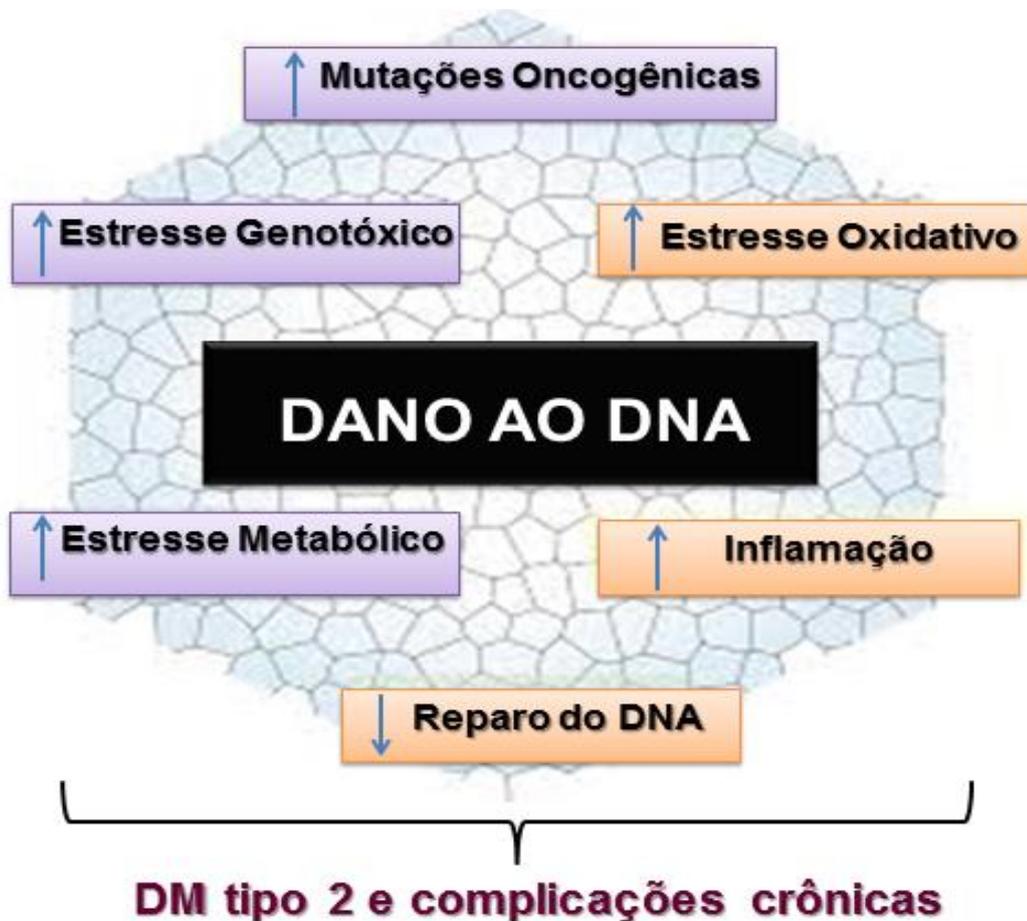
Georgiou et al. (2009) desenvolveram um protocolo em que a análise da quantidade de DNA é medida por fluorimetria. Nesta metodologia, corantes ultrasensíveis como o DNA PicoGreen<sup>®</sup> ligam-se apenas ao DNA que está em dupla fita. Portanto, se o DNA apresentar algum tipo de fragmentação por fatores endógenos ou exógenos a fluorescência emitida vai diminuir e, assim, pode ser avaliado efeito genotóxico. Este método apresenta como vantagem a sensibilidade, pois detecta dsDNA em uma quantidade mínima de 25 pg/mL. Neste contexto, é sugerido a utilização do ensaio de quantificação do DNA utilizando o PicoGreen<sup>®</sup> em complementação com o ensaio cometa. A PCR é uma das mais utilizadas e confiáveis técnicas para a detecção de danos no DNA. Embora ensaios baseados em PCR sejam altamente sensíveis e fáceis de avaliar o dano ao DNA específico do gene, com esse método

não é possível o reconhecimento do tipo de dano (KUMARI et al., 2008). Além destes métodos, sensores eletroquímicos também têm sido aplicados para a verificação de dano ao DNA. Estas técnicas apresentam uma alta seletividade e sensibilidade (PALECEK e BARTOSIK, 2012).

## 2.10 DANO AO DNA E DIABETES TIPO 2

Existem evidências que danos cumulativos ao DNA contribuam para o aparecimento do DM, bem como para a progressão das suas complicações crônicas (XU et al., 2004; LODOVICI et al., 2008). No DM tipo 2, o aumento do dano ao DNA pode ser causado por diversos estresses endógenos e exógenos como o estresse oxidativo, genotóxico, metabólico, mutações oncogênicas, processo inflamatório e redução da taxa de reparo do DNA (Figura 11) (SHIMIZU et al., 2014).

Figura 11 – Mecanismos responsáveis pelo dano ao DNA no diabetes tipo 2



Fonte: Adaptado de Shimizu et al., 2014.

Estudos revelam que indivíduos com DM tipo 2 possuem maior dano no DNA, verificado pelo ensaio cometa (SLIWINSKA et al., 2008; IBARRA-COSTILLA et al., 2010), contribuindo para o aparecimento e/ou agravamento das complicações diabéticas (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2005). Arif et al. (2010) observaram através do ensaio cometa que o grupo controle apresentavam o DNA compacto, mantido a forma circular de um núcleo normal, ou seja, sem evidências de formação de “cometa”. Em contrapartida, as células do grupo com DM tipo 2 apresentaram uma aparência distorcida, indicando danos substanciais no DNA. Este aumento do dano no DNA pode ser devido ao estresse oxidativo, pois foi positivamente correlacionado com os níveis do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteínas carbonil, além de estar inversamente correlacionado com a atividade da SOD e os níveis de tióis. Além disso, uma correlação negativa entre o dano no DNA avaliado pelo ensaio cometa e os níveis da GSH em pacientes com DM tipo 2 foram avaliados por Dinçer et al. (2002). Já Choi et al. (2005) encontraram uma correlação inversa entre dano no DNA e os níveis de ácido ascórbico. Estes estudos demonstraram que uma diminuição do sistema antioxidante das células pode ser um fator contribuinte para o aumento do dano no DNA no diabetes (COLLINS et al., 2014).

Lodovici e colaboradores (2008) demonstraram que pacientes diabéticos com um controle glicêmico inadequado apresentam maior dano no DNA quando comparados com diabéticos com nível de HbA<sub>1c</sub> considerados normais. Por outro lado, Blasiak et al. (2004) demonstraram, além do aumento do dano no DNA avaliado pelo ensaio cometa no DM tipo 2, uma diminuição da eficiência de reparação destes danos induzidos por agentes oxidantes, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estes resultados sugerem que o DM pode estar associado não apenas com o maior dano no DNA, mas também com o aumento da suscetibilidade aos agentes oxidantes mutagênicos, bem como uma diminuição da eficiência do reparo do DNA (BLASIAK et al., 2004).

Estudos sugerem que os marcadores urinários de oxidação do DNA podem ser úteis como biomarcadores no DM tipo 2 e pré-diabetes, bem como na investigação da progressão das complicações do diabetes (AL-AUBAIDY e JELINEK, 2010; BROEDBAEK et al., 2013). Assim, a investigação de novos marcadores nesta doença pode auxiliar no controle da terapia e estratificação de risco, como alternativas para os marcadores usuais, como por exemplo, a HbA<sub>1c</sub> e albumina urinária (BROEDBAEK et al., 2011). No DM, os biomarcadores atualmente disponíveis são de origem extracelular e são, acima de tudo, "subprodutos" da doença, ou seja, não fornecem informações sobre o meio ambiente intracelular nas condições diabéticas. A identificação de novos biomarcadores que refletem os

processos patológicos intracelulares poderia melhorar a gestão de cuidados com o diabetes (BROEDBAEK et al., 2011).

Evidências demonstram que a excreção urinária de 8-OHdG foi maior em pacientes com DM tipo 2, quando comparado com indivíduos controles saudáveis (LEINONEN et al., 1997; KANAUCHI, et al., 2002; XU et al., 2004), e os níveis urinários deste marcador foi correlacionado positivamente com os níveis de HbA<sub>1c</sub> (XU et al., 2004). Nishikawa e colaboradores (2003) investigaram a relação entre a gravidade da DRD e os níveis urinários de 8-OHdG e observaram que os níveis deste biomarcador foram 1,9 vezes maiores nos pacientes com albuminúria do que naqueles sem DRD. Além disso, neste estudo também foi demonstrado que o 8-OHdG urinário é um marcador útil nas complicações macrovasculares, pois foi correlacionado positivamente com a espessura da camada íntima-média da parede da carótida. Também foi relatado o aumento dos níveis urinários de 8-OHdG em pacientes diabéticos com macroalbuminúria, comparado com os diabéticos normoalbuminúricos. Neste contexto, Kanauchi et al. (2002) tem reportado que o estresse oxidativo pode contribuir para a progressão do dano tubulointersticial em pacientes com DRD.

Dong et al. (2010) investigaram a relação entre as concentrações urinárias do 8-OHdG e a severidade das lesões da retina em pacientes com RD. Entre os pacientes com DM, aqueles com RD proliferativa apresentaram níveis de 8-OHdG significativamente mais elevados do que aqueles com RD não proliferativa ou sem RD. Então, neste estudo foi proposto que este marcador pode auxiliar no diagnóstico precoce e no tratamento de pacientes com RD. Assim, é especulado que o aumento dos metabólitos oxidativos pode contribuir para o dano nos vasos da retina e para uma pronunciada atividade proliferativa na RD (WU et al., 2004). Além disso, o dano no DNA pode estar ligado com o processo de envelhecimento, bem como com doenças relacionadas com a idade, como o DM (SHIMIZU et al., 2014). A acumulação de lesões pode, em parte, ser explicada pela descoberta de que a atividade de reparo do DNA parece diminuir com a idade, permitindo a persistência de danos e assim um aumento de erros de replicação (OSTEROD et al., 2001). Neste contexto, a progressão destas complicações do diabetes também pode ser explicada através de um possível mecanismo, onde é relatado que a senescência prejudicada pelo dano no DNA pode contribuir para o estresse metabólico, induzindo uma disfunção nos telômeros (ERUSALIMSKY, 2009; SHIMIZU et al., 2014).

Indiretamente, o dano no DNA no diabetes também pode ocorrer através de vias de sinalização celular. Simone et al. (2008) demonstraram em um modelo experimental de hiperglicemia uma associação entre a ativação e fosforilação da Akt, fosforilação da tuberina

e aumento dos níveis de 8-OHdG. Assim, estes resultados indicaram que estas cascatas de sinalização podem ter um efeito significativo no dano oxidativo do DNA, em uma condição hiperglicêmica. Sabe-se que a via Akt está ativada no diabetes, e existem evidências de que esta ativação é redox dependente (GORIN et al., 2001). Tanto a Akt como a tuberina possuem importância na regulação da expressão de genes e no crescimento celular em resposta a inúmeros estímulos (LEE e CHAN, 2015).

O dano no DNA pode promover disfunção metabólica através de dois mecanismos, o de células autônomas e os de células não autônomas. Neste contexto, a regeneração de tecidos é prejudicada pelo dano no DNA induzido pela senescência e/ou apoptose de células tronco e somáticas, que conduzem a disfunção metabólica, como por exemplo, a perda das células  $\beta$ -pancreáticas. O dano nesta macromolécula também pode levar ao processo inflamatório em células não autônomas, através da indução de citocinas e quimiocinas, resultando em uma interferência na sinalização da insulina. Além disso, também pode ocorrer uma alteração na homeostase metabólica sistêmica, através de influências no metabolismo celular e no sistema endócrino. Assim, a ativação da resposta ao dano no DNA em determinados tecidos, poderia influenciar na função de órgãos metabólicos, o que contribui para o desenvolvimento da resistência insulínica (SHIMIZU et al., 2014). Tomados em conjunto, o dano no DNA provocado pelo DM tipo 2 pode ser esclarecido através da ativação das vias inflamatórias, contribuindo para o aumento da geração de EROs (KALOUSOVÁ et al., 2002). A resposta inflamatória pode levar ao recrutamento de leucócitos ativados, que podem, por sua vez, contribuir para o "*burst* respiratório", com subsequente produção de dano no DNA (COOKE et al., 2006). Além disso, o dano no DNA oxidativo está correlacionado com a ativação de vias de sinalização intracelular, como por exemplo, MAPK, poli-(ADP-ribose) polimerase (PARP) e NF- $\kappa$ B (ADAIKALAKOTESWARI et al., 2007).

Também foi demonstrado que a resposta celular ao dano no DNA está envolvida em processos que levam a insuficiência do metabolismo da glicose (SHIMIZU et al., 2014). Um estudo recente demonstrou que a elevação do metabolismo da glicose pelas células  $\beta$ -pancreáticas causa quebras em fitas duplas de DNA e ativação da p53, uma proteína citoplasmática responsável pela codificação de uma proteína nuclear fosforilada com propriedades de ligação ao DNA. Como resultado tem-se uma liberação insuficiente de glicose pelas células  $\beta$  em ratos com DM tipo 2 (TORNOVSKI-BABEAY et al., 2014). É reconhecido também que a p53 provoca a apoptose em resposta a danos no DNA (WANG et al., 2015). Além disso, a hiperglicemia, os AGEs e os ácidos graxos livres são fatores patofisiológicos do diabetes que podem contribuir para o aumento do dano no DNA (LEE e

CHAN, 2015). Esses fatores do diabetes têm sido demonstrados em causar dano no DNA *in vitro*, podendo ser estes os fatores que podem explicar porque pacientes diabéticos possuem aumentos nos níveis de dano no DNA *in vivo* (LEE e CHAN, 2015). A p53 afeta o metabolismo da glicose através da regulação negativa da Akt, levando à redução da síntese da glicólise dos ácidos graxos, bem como o aumento da oxidação de lipídios (SCRABLE et al., 2009). Pacientes com DM tipo 2 também apresentam menor capacidade antioxidante, como a redução da síntese da glutathiona, outro fator que pode acarretar o dano no DNA (COLLINS et al., 2014). Um estado de hiperglicemia pode reduzir o conteúdo celular de glutathiona e a absorção de cistina, limitando a manutenção dos níveis de glutathiona (TACHI et al., 1998).

Embora haja evidências sobre o dano ao DNA e o DM tipo 2, ainda não se conhece exatamente os mecanismos fisiopatológicos que estão envolvidos no aumento do dano ao DNA nesta patologia.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o dano ao DNA em pacientes com DM tipo 2 e sua associação com inflamação, oxidação proteica, disfunção endotelial, resistência à insulina e à ocorrência de complicações crônicas microvasculares, a fim de propiciar a melhor compreensão do envolvimento destes processos na fisiopatologia do DM tipo 2.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o potencial diagnóstico do 8-OHdG urinário para a detecção das complicações crônicas microvasculares nos pacientes com DM tipo 2;
- Investigar o perfil de biomarcadores oxidativo-inflamatórios e de disfunção endotelial (AOPP, NOx, IL-1, IL-6, IL-10 e TNF $\alpha$ ) nos pacientes do estudo;
- Avaliar o dano ao DNA, através do ensaio cometa e do marcador 8-OHdG urinário, nos pacientes do estudo;
- Verificar a associação do dano ao DNA com as complicações crônicas microvasculares nos pacientes com DM tipo 2;
- Investigar a associação do dano ao DNA com o processo inflamatório, através da mensuração dos níveis de IL-1, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  nos pacientes do estudo;
- Determinar a associação do dano ao DNA com a disfunção endotelial, através da dosagem dos níveis de NOx e albumina urinária nos pacientes do estudo;
- Verificar a associação do dano ao DNA com a oxidação proteica, através da mensuração dos níveis de AOPPs nos pacientes do estudo;
- Investigar a associação do dano ao DNA com a resistência insulínica, através do índice HOMA-IR;
- Avaliar a associação do dano ao DNA com biomarcadores de alterações metabólicas nos pacientes do estudo.

## 4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

### 4.1 ARTIGO CIENTÍFICO I

#### **Association between DNA strand breakage and oxidative, inflammatory and endothelial biomarkers in type 2 diabetes**

Etiane Tatsch, Guilherme V. Bochi, Silvia J. Piva, José A. M. De Carvalho, Helena Kober, Vanessa D. Torbitz, Thiago Duarte, Cristiane Signor, Adriane C. Coelho, Marta M. M. F. Duarte, Greice F. F. S. Montagner, Ivana B. M. Da Cruz, Rafael N. Moresco

Publicado no Periódico: **Mutation Research**

Mutat Res. 2012 Apr 1;732(1-2):16-20. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2012.01.004.

## **Association between DNA strand breakage and oxidative, inflammatory and endothelial biomarkers in type 2 diabetes**

Etiane Tatsch<sup>a,b</sup>, Guilherme Vargas Bochi<sup>a,c</sup>, Sílvia Juliane Piva<sup>b</sup>, José Antonio Mainardi de Carvalho<sup>a,b</sup>, Helena Kober<sup>a,c</sup>, Vanessa Dorneles Torbitz<sup>a</sup>, Thiago Duarte<sup>a</sup>, Cristiane Signor<sup>d</sup>, Adriane Carvalho Coelho<sup>e</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>f</sup>, Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner<sup>d</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>c,d</sup>, Rafael Noal Moresco<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>d</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>e</sup> Associação dos Diabéticos e Hipertensos, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>f</sup> Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, RS, Brazil

\*Corresponding author: Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1216, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

E-mail: rnmoresco@yahoo.com.br

**Declaration of Interest:** There are no conflicts of interest to declare.

**Abbreviated title:** DNA strand breakage in type 2 diabetes.

**Keywords:** Type 2 diabetes, DNA damage, comet assay.

**Abstract**

Evidence has been presented recently that type 2 diabetes patients have an increased level of DNA damage. This DNA damage could be associated with oxidative, inflammatory, and endothelial biomarkers and could represent a possible indication of injury in the endothelium and induction of inflammation in type 2 diabetes. To confirm this possible association, DNA strand breakage was evaluated by use of the comet assay and its association with oxidative, inflammatory, and endothelial biomarkers in type 2 diabetes patients. A case-control study (30 healthy controls and 32 subjects with type 2 diabetes) was performed to evaluate the association between DNA damage and NO<sub>x</sub> (nitrate/nitrite), interleukin-6 (IL-6), urinary albumin, fasting glucose, and glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) levels. Type 2 diabetes patients presented higher DNA damage than control subjects, higher levels of IL-6 and urinary albumin, and lower NO<sub>x</sub>. Significant correlations between DNA damage and NO<sub>x</sub> ( $r = -0.303$ ,  $p = 0.016$ ), IL-6 ( $r = 0.845$ ,  $p < 0.001$ ), urinary albumin ( $r = 0.496$ ,  $p < 0.001$ ), fasting glucose ( $r = 0.449$ ,  $p < 0.001$ ), and HbA<sub>1c</sub> ( $r = 0.575$ ,  $p < 0.001$ ) were reported. Our findings showed an increase of DNA damage in type 2 diabetes especially in those patients with poor glycemic control and associations among NO<sub>x</sub>, IL-6 and urinary albumin levels with DNA damage.

**Abbreviations:** ROS, reactive oxygen species; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase; AGEs, advanced glycation end products; NO, nitric oxide; IL-6, interleukin-6; BMI, body mass index; HbA<sub>1c</sub>, glycated hemoglobin; NO<sub>x</sub>, nitrate/nitrite; PBS, phosphate buffered saline.

## Introduction

Diabetes mellitus affects approximately 100 million people worldwide [1] and its prevalence has been increasing [2]. Type 2 diabetes, characterized by the development of insulin resistance, is the most common form of diabetes estimated to account for 80-90% of the diabetes. The chronic hyperglycemia of diabetes is associated with long-term damage, dysfunction, and chronic failure of different organs, especially eyes, kidneys, nerves, heart, and blood vessels [3]. The mechanism by which diabetes leads to these complications is complex, and not yet fully understood; however, it involves the direct toxic effects of high glucose levels along with the impact of elevated blood pressure, abnormal lipid levels, oxidative stress, chronic inflammatory condition, hypoxia, and ischemia [4,5,6].

Investigations suggest that oxidative stress plays a pivotal role in the pathogenesis, progression, and complications of type 2 diabetes [7,8]. Oxidative stress has a systemic effect which causes lipoperoxidation as well as important protein and DNA alterations leading to cell dysfunctions. Moreover, it is strongly related to the increase of reactive oxygen species (ROS) produced in various tissues under diabetic conditions. Several mechanisms, such as non-enzymatic glycosylation reactions, electron transport chain in mitochondria, and membrane-bound nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase are involved in diabetes ROS production [7].

Therefore, a crucial consequence of oxidative stress related to metabolic abnormalities of diabetes is the mitochondrial superoxide overproduction in endothelial cells of both large and small vessels as well as in the myocardium. This increased superoxide production causes the activation of pathways involved in the pathogenesis of complications, such as polyol pathway flux, increased formation of advanced glycation end products (AGEs), increased expression of the receptor for AGEs and their activating ligands, activation of protein kinase C isoforms, over activity of the hexosamine pathway, lesions in DNA including oxidized bases, DNA strand breaks, and DNA-protein crosslink formation [9,10]. However, the role of genotoxicity associated to the diabetic state needs to be investigated in more details. Although previous studies described an association between DNA strand breaks using the DNA comet assay test and type 2 diabetes [10-14], there is a need for studies investigating the association between DNA strand breaks and oxidative, inflammatory and endothelial biomarkers in type 2 diabetes.

In addition, hyperglycemia has been shown to induce free radical release and reduce free anti-oxidant defenses, both of which associated with endothelial dysfunction [15]. The nitric oxide (NO) plays a central role in the pathogenesis of endothelial cell dysfunction when

imbalanced [16]. Many of the metabolic derangements are known to occur in diabetes, including hyperglycemia and insulin resistance, as well as to mediate abnormalities in endothelial cell function by affecting the synthesis or degradation of NO [1]. The oxidative stress is also responsible for the increase of the expression of proinflammatory cytokines, chemokines and cell adhesion molecules [17], evidencing an inflammatory state. Interleukin-6 (IL-6) is a key regulator of the inflammatory response which stimulates the synthesis of proteins of acute phase, such as C-reactive protein and fibrinogen [18]. Besides NO, the urinary albumin is also a marker of endothelial dysfunction [19], and it is associated with an increased cardiovascular morbidity and mortality in diabetic subjects [20]. Therefore, the association between DNA damage and type 2 diabetes considering the influence of NO, IL-6, urinary albumin, and other glycemic, lipid and biological biomarkers were investigated here.

## **Materials and methods**

### *Study population*

This case-control study included 62 volunteers enrolled in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The subjects were divided into two groups: type 2 diabetic patients (n=32) and healthy controls (n=30). Type 2 diabetes was diagnosed according to WHO criteria (FPG  $\geq$  7.0mmol/L) [21]. Exclusion criteria to avoid unpredictable confounding were history of malignancy, acute illness, fever, and infectious or liver diseases. This study protocol was approved by the Local Research Ethics Committee (23081-018849/2007-67).

### *Clinical measurements*

Anthropometric measurements with emphasis to clinical markers of adiposity were obtained. Body mass index (BMI) was calculated by dividing the weight (kg) with height (m<sup>2</sup>). Waist circumference (cm) was measured in average distance between the last rib and iliac crest, around the navel. All patients answered to a clinical and epidemiological assessment evaluating the practice of physical exercises, smoking, hypertension, and treatment with statins and/or other drugs.

### *Laboratory assays*

Blood samples were collected from all subjects after an overnight fast by venous puncture technique into Vacutainer<sup>®</sup> (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with sodium fluoride plus EDTA, EDTA or no anticoagulants. Specimens were routinely centrifuged at 2500 x g for 15 min at 4°C. Blood collected with sodium fluoride plus EDTA was used for

measurement of fasting glucose. Plasma EDTA was used to assess DNA damage in comet assay and glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), while the serum was used to assess the levels of total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, creatinine, uric acid, IL-6, and nitrate/nitrite (NO<sub>x</sub>). All subjects also collected an early morning urine sample for the assessment of creatinine and urinary albumin. The results of urinary albumin were expressed as milligrams of albumin per gram of creatinine as a tool to match the levels of albumin in accordance with the concentration of urine [22]. Fasting glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, uric acid, creatinine, and urinary albumin were performed by use of standard methods on Cobas MIRA<sup>®</sup> automated analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). LDL cholesterol was estimated with the Friedewald equation [23]. Glomerular filtration rate (GFR) was estimated by the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) equation [24]. For the analysis of HbA<sub>1c</sub> the whole blood was used and its levels were measured by immunoturbidimetric method on Cobas Integra 400 Plus<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). IL-6 was measured by capture ELISA according to the manufacturer instructions (eBIOSCIENCE, San Diego, USA). Serum NO<sub>x</sub> was measured on Cobas MIRA<sup>®</sup> by a method previously described and validated by Tatsch et al [25].

The comet assay has been developed as a means of detecting cellular DNA damage, and it is generally used in a variety of fields, such as biological monitoring and genetic toxicology [26]. The distance migrated by cellular DNA during electrophoresis directly reflects the extent of DNA damage present. Therefore, we used this method to measure DNA damage in lymphocytes isolated from control and type 2 diabetes patients. The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al [27] in accordance with the general guidelines for use of the comet assay [28,29]. Lymphocytes were suspended in 0.7% low-melting-point agarose and phosphate buffered saline (PBS) at 37°C and placed on microscopic slides with a layer of 1% agarose. The slides were immersed in lysis solution at 4°C for 1h, and followed by electrophoresis at 25V, 300mA, for 40 min at steady temperature. The slides were then silver-stained, as described by Nadin et al [30]. All steps, from sample collection to electrophoresis, were conducted under yellow light to minimize the possibility of cellular DNA damage. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The comet parameters analyzed were percentage of DNA in the comet tail and tail moment. The slides were analyzed under blind conditions by at least two different individuals.

### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using the SPSS statistical package, version 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). The continuous data were summarized as mean and standard deviation (SD), and comparisons between groups were performed with Student's *t* test. The categorical data were summarized as percentages, and comparisons between groups were performed with Chi-square test. Pearson correlation was assessed to evaluate the correlations between the variables. Multivariate analysis was performed to investigate whether some factors interfere in DNA tail damage by use of logistic regression analysis (*Backward wald*). Statistical power calculation was performed for a significance level (alpha) of 0.05 (two-tailed) and a statistical power >90% was observed. Statistical analyses were performed where all *p* values were two-tailed, and *p* <0.05 was considered statistically significant.

### **Results**

Baseline characteristics of study participants are described in Table 1. The mean duration of diabetes in study patients was  $10.7 \pm 6.6$  years. Among diabetic patients, 9.4% take insulin, 71.9% oral hypoglycemic agents, and 18.7% insulin plus oral hypoglycemic agents. As expected, type 2 diabetes had significantly higher levels of fasting glucose and HbA<sub>1c</sub> than control subjects. No significant differences were observed for total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, uric acid, and creatinine in the studied population. BMI, waist circumference, LDL cholesterol, urinary albumin, and IL-6 were significantly higher in subjects with type 2 diabetes, while NOx levels were significantly lower in this group.

As can be seen in Figure 1, type 2 diabetes group presented significantly higher DNA damage than the control group. The percentile distribution of DNA damage was compared between the two groups studied here (Figure 2). The 50 percentile of DNA tail damage in type 2 diabetes group was 72%, where 15 (46.9%) subjects had <70% of DNA tail damage and 17 (53.1%) had  $\geq 70\%$  DNA tail damage. However, no control subjects presented this percentage of DNA tail damage. To evaluate which variables could be associated with higher DNA damage in type 2 diabetes group, we performed an additional analysis considering two categories, DNA tail damage <60% (n=08) and  $\geq 60\%$  (n=24). The 60% represents the 25 percentile of diabetic subjects were compared the potential association with glycemic, anthropometric, lipid, oxidative, inflammatory, and endothelial biomarkers between the two groups.

The higher DNA tail damage presented a significant association with higher fasting glucose levels (<60% =  $6.3 \pm 1.9$ ;  $\geq 60\%$  =  $8.9 \pm 4.2$  mmol/L,  $p=0.02$ ) and total cholesterol (<60% =  $4.7 \pm 0.9$ ;  $\geq 60\%$  =  $5.6 \pm 1.4$  mmol/L),  $p=0.05$ ). Gender, smoking habit, insulin, and statin treatment had no association with the higher DNA tail damage. In addition, significant correlations were observed between DNA damage and fasting glucose, HbA<sub>1c</sub>, NO<sub>x</sub>, IL-6 and urinary albumin in the studied population (Table 2). Multivariate analysis showed that the association between DNA damage and type 2 diabetes was independent of gender, age and smoking habit. However, this association was significantly influenced by other cardiometabolic risk variables as obesity and dyslipidemia (Table 3).

**Table 1**

**Table 2**

**Table 3**

**Figure 1**

**Figure 2**

## **Discussion**

The results of the present study indicated that DNA damage increased in patients with type 2 diabetes, as shown previously [10,11,13]. However, this is the first report demonstrating the association between DNA strand breakage in the comet assay with oxidative, inflammatory, and endothelial biomarkers in patients with type 2 diabetes. The comet assay possesses a number of advantages when compared to other DNA damage assays; it is a relatively fast, simple and sensitive assay. In addition to the capability of this assay to identify DNA damage at the single cell level, other significant advantages include its sensitivity for detecting low levels of DNA damage, the requirement for only small numbers of cells per sample, its ease of application and low cost, and the short time needed to perform it. In addition, this assay is considered flexible since it can be used to evaluate various types of DNA damage, and it is readily modifiable for adaptation to a variety of experimental requirements [31].

Diabetes is characterized by chronic hyperglycemia; this condition is now recognized as a major factor in the pathogenesis of diabetes complications [32]. An overproduction of oxidants and/or a decrease in the defenses in type 2 diabetes are considered to cause oxidative damage to lipids, proteins, and DNA. Chronic hyperglycemia is thought to induce generation of free radicals by several mechanisms, such as glucose autoxidation, non-enzymatic

glycation of proteins, activation of protein kinase C, increased polyol pathway, and hexosamine pathway [33]. Oxidative stress not only damages cellular proteins, but also significantly affects DNA and generates various base modifications [13]. Our results indicated an association between type 2 diabetes and DNA damage, as previously reported [10]. The comet analysis showed that the control group had the most compact DNA and maintained the circular form of a normal nucleus, with no evidence of comet formation. In contrast, cells from type 2 diabetes patients exhibited a distorted appearance, indicating substantial DNA damage that may have been due to oxidative stress, according to our oxidative stress data and those of another study [11], which revealed that patients with type 2 diabetes had higher oxidative DNA damage than did control subjects.

Evidence has been presented that type 2 diabetes patients have an increased level of oxidative DNA damage [33]; this fact was confirmed in our study, since the individuals with type 2 diabetes had higher DNA damage than control subjects. According to our study, fasting glucose is associated with DNA damage in patients with type 2 diabetes, as previous studies [11,13], showing that lymphocyte DNA damage was significantly higher in type 2 diabetic patients with poor glycemic. On the other hand, the variables gender, age, smoking habit, insulin, and statin treatment are not associated with DNA damage in individuals with type 2 diabetes. We found significant positive correlations between DNA damage, fasting glucose and HbA<sub>1c</sub>. Indeed, our data confirm the hypothesis that DNA damage may be among the most important factors for the onset and/or further aggravation of diabetic complications in poorly controlled diabetes [34].

Hyperglycemia promotes an increased oxidative stress and an imbalanced superoxide which can also activate intracellular production of AGE precursors, leading to inflammation and endothelial dysfunction [35]. In addition, endothelial dysfunction and accumulation of modified LDL cholesterol promote an inflammatory vascular response may contribute directly to DNA damage and, subsequently, the development of atherosclerosis [36]. In this study, we observed higher levels of IL-6 and LDL cholesterol in type 2 diabetes patients, which can reflect an atherosclerotic process. Moreover, we have shown a positive correlation between DNA damage and IL-6. A higher quantity of circulating IL-6 induces insulin resistance [37] and inflammatory mediators such IL-6 influence ROS production by NADPH oxidase system. This system could be one of the mechanistic pathways linking inflammation and impaired NO production, resulting in endothelial dysfunction [38]. Higher levels of urinary albumin were found in type 2 diabetes patients. This finding may be due to the fact that the acute deterioration of endothelial function, by reducing NO activity, causes an

increase in urinary albumin [39], which is the possible cause of the DNA damage. We also observed lower levels of NOx in type 2 diabetes patients and a significant negative correlation between NOx and DNA damage. Therefore, it may be suggested that the lower bioavailability of NO may contribute to an increase in DNA damage. During the oxidative stress, a large amount of superoxide is produced in the vascular wall and it may inhibit NO-mediated endothelial function by reacting with NO and producing peroxynitrite, a cytotoxic substance [16].

In summary, we have shown an increase of DNA damage in type 2 diabetes, especially in those patients with poor glycemic control. We also have demonstrated an association of NOx, IL-6 and urinary albumin levels with DNA damage, suggesting that type 2 diabetes promotes the raise of oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction leading to increased DNA damage in these individuals. However, further studies are required to investigate this association in a larger population.

### **Acknowledgments**

We thank Thaís Doeler Algarve and Renata da Silva Pereira for their help in the comet assay and biochemical analysis.

### **References**

- [1] M.A. Creager, T.F. Lüscher, Diabetes and vascular disease: Pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I, *Circulation* 108 (2003) 1527-1532.
- [2] V.K. Capellini, A.C. Celotto, C.F. Baldo, V.C. Olivon, F. Viaro, A.J. Rodrigues, P.R.B. Evora, Diabetes and vascular disease: Basic concepts of nitric oxide physiology, endothelial dysfunction, oxidative stress and therapeutic possibilities, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 8 (2010) 526-544.
- [3] American Diabetes Association, Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care* 33 (2010) S62-69.
- [4] D. Lebeche, A.J. Davidoff, R.J. Hajjar, Interplay between impaired calcium regulation and insulin signaling abnormalities in diabetic cardiomyopathy, *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 5 (2008) 715-724.
- [5] L.J. Pu, L. Lu, X.W. Xu, R.Y. Zhang, Q. Zhang, J.S. Zhang, J. Hu, Z.K. Yang, F.H. Ding, Q.J. Chen, S. Lou, J. Shen, D.H. Fang, W.F. Shen, Value of serum glycated albumin and high-sensitivity C-reactive protein levels in the prediction of presence of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes, *Cardiovasc. Diabetol.* 20 (2006) 5-27.

- [6] R. Marfella, M. D'Amico, C. Di Filippo, E. Piegari, F. Nappo, K. Esposito, L. Berrino, F. Rossi, D. Giugliano, Myocardial infarction in diabetic rats: role of hyperglycemia on infarct size and early expression of hypoxia-inducible factor 1, *Diabetologia* 45 (2002) 1172-1181.
- [7] J.L. Evans, I.D. Goldfine, B.A. Maddux, G.M. Grodsky, Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes, *Endocr. Rev.* 23 (2001) 599-622.
- [8] F. Giacco, M. Brownlee, Oxidative stress and diabetic complications, *Circ. Res.* 10 (2010) 1058-1070.
- [9] M.K. Shigenaga, B.N. Ames, Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage, *Free Radic. Biol. Med.* 10 (1991) 211-216.
- [10] M. Arif, M.R. Islam, T.M.Z. Waise, F. Hassan, S.I. Mondal, Y. Kabir, DNA damage and plasma antioxidant indices in Bangladeshi type 2 diabetic patients, *Diabetes Metab.* 36 (2010) 51-57.
- [11] M. Lodovici, L. Giovannelli, V. Pitozzi, E. Bigagli, G. Bardini, C.M. Rotella, Oxidative DNA damage and plasma antioxidant capacity in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control, *Mutat. Res.* 638 (2008) 98-102.
- [12] J. Blasiak, M. Arabski, R. Krupa, K. Wozniak, M. Zadrozny, J. Kasznicki, M. Zurawska, J. Drzewoski, DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus, *Mutat. Res.* 554 (2004) 297-304.
- [13] Y. Dinçer, T. Akçay, Z. Alademir, H. Ilkova, Assessment of DNA base oxidation and glutathione level in patients with type 2 diabetes, *Mutat. Res.* 505 (2002) 75-81.
- [14] D. Anderson, T.W. Yu, J. Wright, C. Ioannides, An examination of DNA strand breakage in the comet assay and antioxidant capacity in diabetic patients, *Mutat. Res.* 398 (1998) 151-161.
- [15] B. Vanizor, A. Örem, S.C. Karahan, E. Kiram, C. Erem, R. Aliyazicioglu, H.A. Uydu, Decreased nitric oxide end-products and its relationship with high density lipoprotein and oxidative stress in people with type 2 diabetes without complications, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 54 (2001) 33-39.
- [16] M.H. Zou, R. Cohen, V. Ullrich V, Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus, *Endothelium* 11 (2004) 89-97.
- [17] Q. Li, I.M. Verma, NF-kappaB regulation in the immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 725-734.

- [18] R.B. Goldberg, Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (2009) 3171-3182.
- [19] S.A. Aksun, B. Özmen, D. Özmen, Z. Parildar, B. Senol, S. Habif, I. Mutaf, N. Turgan, O. Bayindir, Serum and urinary nitric oxide in type 2 diabetes with or without microalbuminuria. Relation to glomerular hyperfiltration, *J. Diabetes Complications* 17 (2003) 343-348.
- [20] C. Fu, D. Wu, J. Wang, W. Yang, C. Tseng, Association of C-reactive protein and hyperuricemia with diabetic nephropathy in Chinese type 2 diabetic patients, *Acta Diabetol.* 46 (2009) 126-134.
- [21] World Health Organization, Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation, Geneva, World Health Org, 2006.
- [22] D.J. Newman, M.J. Pugia, J.A. Lott, J.F. Wallace, A. Hiar, Urinary protein and albumin excretion corrected by creatinine and specific gravity, *Clin. Chim. Acta* 294 (2000) 139-155.
- [23] W.T. Friedewald, R.I. Levy, D.S. Fredrickson, Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge, *Clin Chem*, 18 (1972) 499-502.
- [24] A.S. Levey, J.P. Bosch, J.B. Lewis, T. Greene, N. Rogers, D. Roth, A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group, *Ann. Intern. Med.* 130 (1999) 461-470.
- [25] E. Tatsch, G.V. Bochi, R. S. Pereira, H. Kober, V.A. Agertt, M.M. de Campos, P. Gomes, M.M. Duarte, R.N. Moresco , A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 348-50.
- [26] V.J. McKelvey-Martin, M.H. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Méo, A. Collins, The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review, *Mutat. Res.* 288 (1993) 47-63.
- [27] N. Singh, M. McCoy, R. Tice, E. Schneider E, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells, *Exp. Cell. Res.* 175 (1995) 184-191.
- [28] R.R. Tice, D. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206-221.

- [29] A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, G. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice, Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay, *Mutagenesis* 18 (2003) 45-51.
- [30] S. Nadin, L. Vargas-Roig, D. Ciocca, A silver staining method for single-cell gel assay, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 1183-1186.
- [31] W. Liao, M.A. McNutt, W. Zhu, The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells, *Methods* 48 (2009) 46-53.
- [32] A.P. Rolo, C.M. Palmeira, Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212 (2006) 167-178.
- [33] A. Sliwinska, J. Blasiak, J. Kasznicki, J. Drzewoski, *In vitro* effect of gliclazide on DNA damage and repair in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM), *Chem. Biol. Interact.* 173 (2008) 159-165.
- [34] K. Komosinska-Vassev, K. Olczyk, P. Olczyk, K. Winsz-Szczotka, Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 68 (2005) 207-216.
- [35] M. Brownlee, The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism, *Diabetes* 54 (2005) 1615-1625.
- [36] M.G. Andreassi, N. Botto, DNA damage as a new emerging risk factor in atherosclerosis, *Trends Cardiovasc. Med.* 13 (2003) 270-275.
- [37] J.C. Pickup, M.B. Mattock, G.D. Chusney, D. Burt, NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X, *Diabetologia* 40 (1997) 1286-1292.
- [38] J.L. Mehta, N. Rasouli, A.K. Sinha, B. Molavi, Oxidative stress in diabetes: a mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 (2006) 794-803.
- [39] C. Ott, M.P. Schneider, C. Delles, M.P. Schlaich, R.E. Schmieder, Reduction in basal nitric oxide activity causes albuminuria, *Diabetes* 60 (2011) 572-576.

**Table 1.** Characteristics baselines of the study patients

<b>Parameters</b>	<b>Control</b>	<b>Type 2 diabetes</b>	<b><i>p</i> value</b>
n	30	32	-
Age (years)	54.1±6.5	56.7±6.2	0.104
Male (%)	53.3	43.7	0.450
Hypertension (%)	0	65.6	<0.001
Smokers (%)	10.0	6.2	0.587
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	25.8±2.3	30.9±5.4	<0.001
Waist circumference (cm)	88.4±9.9	105.7±11.9	<0.001
Fasting glucose (mmol/L)	4.6±0.5	8.2±3.9	0.001
HbA <sub>1c</sub> (%)	5.2±0.7	7.7±1.7	<0.001
Total cholesterol (mmol/L)	4.9±0.7	5.4±1.3	0.070
LDL cholesterol (mmol/L)	3.0±0.7	3.6±1.1	0.014
HDL cholesterol (mmol/L)	1.2±0.4	1.0±0.3	0.080
Triglycerides (mmol/L)	1.4±0.5	1.5±0.5	0.517
Creatinine (µmol/L)	88.9±37.8	80.6±33.5	0.918
GFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	103.1±29.1	98.2±26.1	0.493
Uric acid (mmol/L)	0.24±0.08	0.26±0.01	0.253
Urinary albumin (mg/g creat)	7.1±18.6	41.9±32.0	<0.001
IL-6 (pg/mL)	13.2±5.1	77.7±19.4	<0.001
NOx (µmol/L)	118.9±51.3	80.9±39.4	0.002

Data are expressed as mean and SD or percentages. BMI, body mass index.

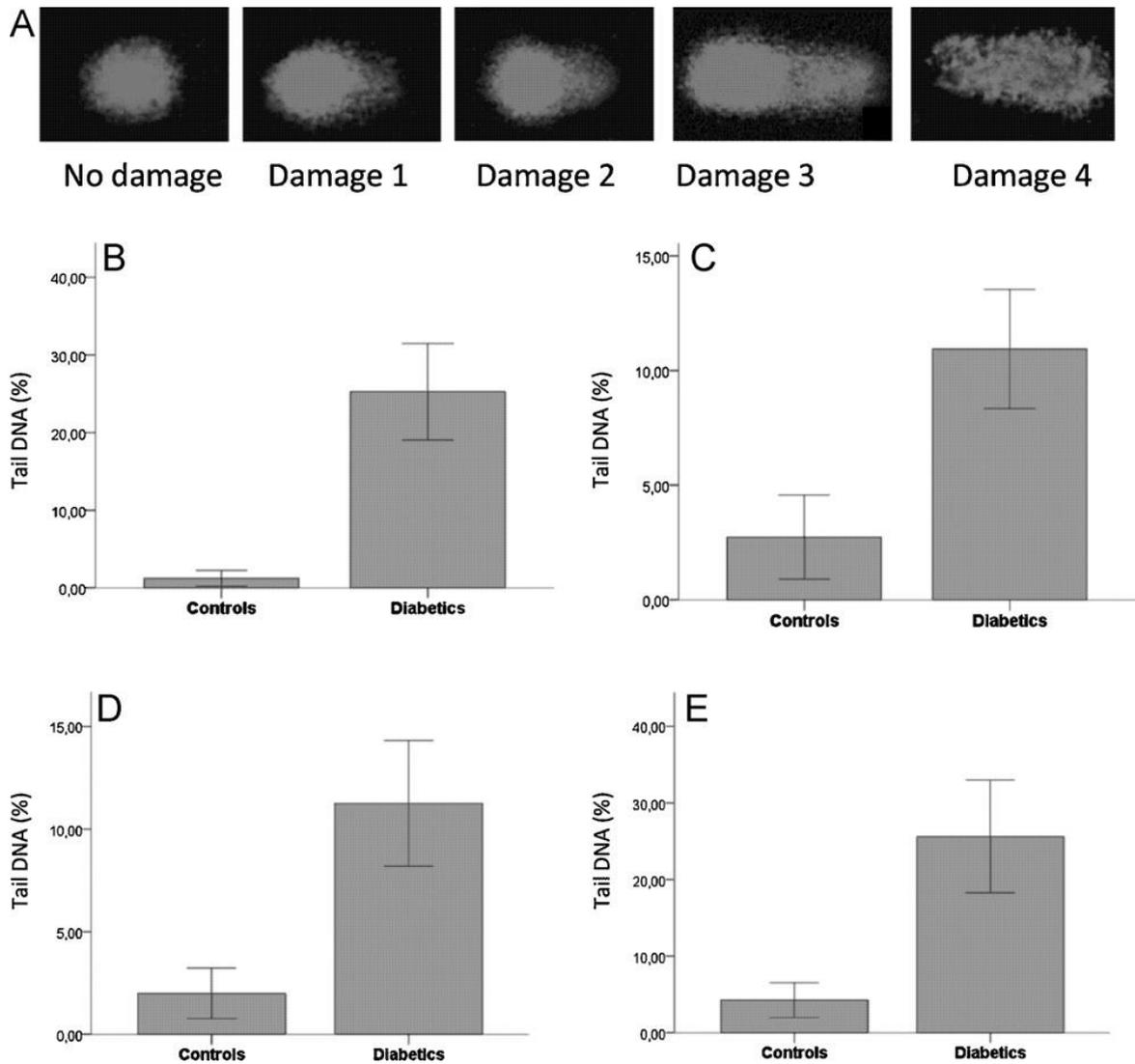
**Table 2.** Pearson correlation coefficients between DNA damage and biological parameters in type 2 diabetes

<b>Parameters</b>	<b>r</b>	<b><i>p</i> value</b>
Fasting glucose	0.449	<0.001
HbA <sub>1c</sub>	0.575	<0.001
Urinary Albumin	0.496	<0.001
NO <sub>x</sub>	-0.303	0.016
IL-6	0.845	<0.001

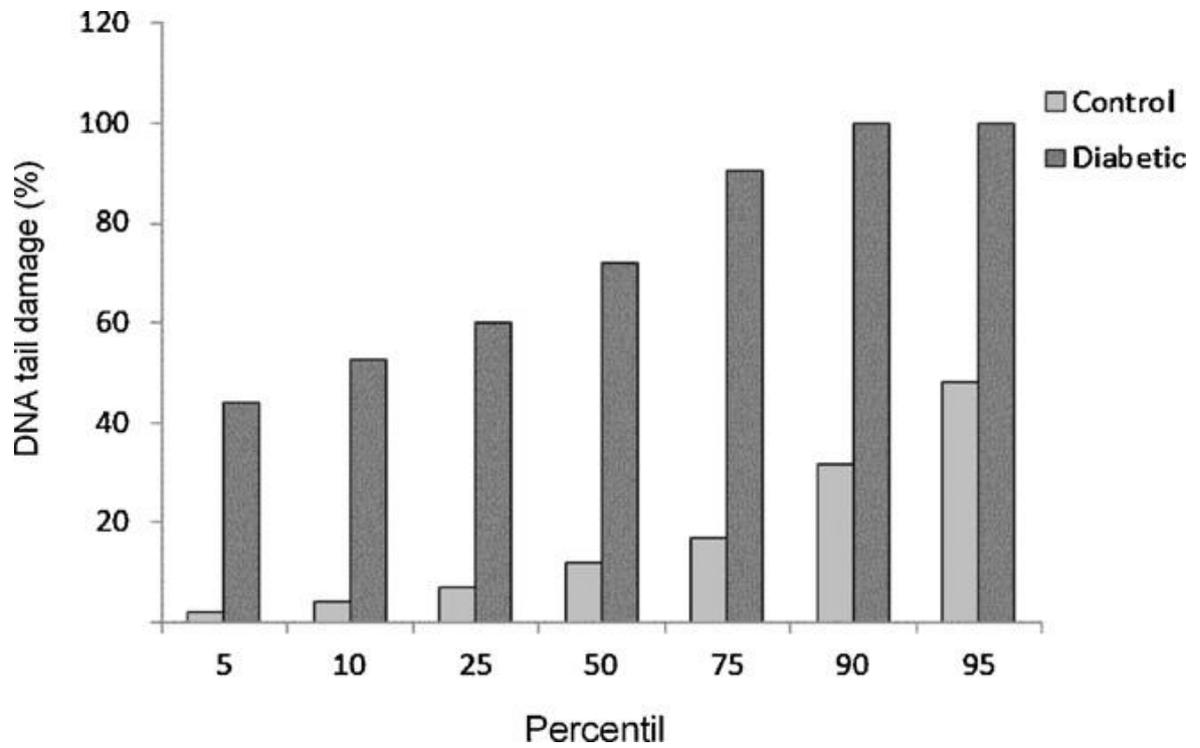
**Table 3.** Multivariate analysis of DNA damage levels considering biologic and cardiometabolic risk factors

<b>Variables</b>	<b>Wald</b>	<b><i>p</i> value</b>
Analysis 1		
DNA damage	4.434	0.035
Gender	0.155	0.694
Age	0.173	0.678
Smoking habit	0.000	0.983
Analysis 2		
DNA damage	0.000	0.997
Hypertension	0.000	0.986
Obesity	3.118	0.070
Dyslipidemia	4.552	0.033

Analysis 1 included sex, age and smoking habit; Analysis 2 included hypertension, obesity and dyslipidemia that are considered as metabolic syndrome parameters.



**Figure 1.** DNA tail damage (%) comparison between control and diabetics subjects. (A) Comet image of blood cells showing nucleus without damage, and the nucleus with different damage levels. (B) DNA tail damage level(1%); (C) DNA tail damage level 2 (2%); (D) DNA tail damage level 3 (3%); (E) DNA tail damage level 4 (4%). Student's *t* test analysis showed that diabetics presented significant higher DNA tail damage in all levels than control subjects.



**Figure 2.** Percentil distribution of frequency of DNA tail damage of control and diabetic subjects. The 50 percentil in control group was 12% whereas in the diabetic group was 72% of DNA tail damage.

## 4.2 ARTIGO CIENTÍFICO II

### **Oxidative DNA damage is associated with inflammatory response, insulin resistance and microvascular complications in type 2 diabetes**

Etiane Tatsch, José A. M. De Carvalho, Bruna S. Hausen, Yãnaí S. Bollick, Vanessa D. Torbitz, Thiago Duarte, Rogério Scolari, Marta M. M. F. Duarte, Sílvia W. K. Londero, Rodrigo A. Vaucher, Melissa O. Premaor, Fabio V. Comim, Rafael N. Moresco

Publicado no Periódico: **Mutation Research**

Mutat Res. 2015 Dec; 782:17-22. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2015.10.003.

**Oxidative DNA damage is associated with inflammatory response, insulin resistance and microvascular complications in type 2 diabetes**

Etiane Tatsch<sup>a</sup>, José A. M. De Carvalho<sup>a,b</sup>, Bruna S. Hausen<sup>a</sup>, Yãnaí S. Bollick<sup>a</sup>, Vanessa D. Torbitz<sup>a</sup>, Thiago Duarte<sup>c</sup>, Rogério Scolari<sup>d</sup>, Marta M. M. F. Duarte<sup>d,e</sup>, Sílvia W. K. Londero<sup>b</sup>, Rodrigo A. Vaucher<sup>f</sup>, Melissa O. Premaor<sup>g</sup>, Fabio V. Comim<sup>g</sup>, Rafael N. Moresco<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup>University Hospital, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup>Laboratory of Biogenomic, Center of Health Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>d</sup>Labimed Clinical Chemistry and Medicine Laboratory, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>e</sup>Department of Health Sciences, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>f</sup>Laboratory of Microbiology, Franciscan University Center, UNIFRA, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>g</sup>Department of Clinical Medicine, Center of Health Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

**\*Corresponding author:** Prof. Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

E-mail: rnmoresco@ufsm.br

**Abbreviated title:** DNA damage and type 2 diabetes complications

**Abstract**

Urinary markers of nucleic acid oxidation may be useful biomarkers in diabetes. It has been demonstrated that T2DM patients have an increased level of oxidative DNA damage; however, it is unclear whether increased DNA damage may be related to a greater degree of inflammation and insulin resistance. Thus, the aim of this present study was to investigate the relation of the impact of oxidative DNA damage, assessed by urinary 8-OHdG, on the levels of inflammatory cytokines, as well as insulin resistance. In addition, we also investigated the diagnostic ability of urinary 8-OHdG in the identification of microvascular complications in T2DM. A case-control study, enrolling 22 healthy controls and 54 subjects with T2DM, was performed to evaluate the relation between oxidative DNA damage and interleukin-6 (IL-6), IL-1, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-10, and Homeostasis Model Assessment (HOMA-IR) index. T2DM patients presented higher urinary 8-OHdG, IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  levels and HOMA-IR, and lower IL-10 levels than control subjects. Moreover, urinary 8-OHdG levels were significantly higher in the group T2DM with microvascular complications when compared to the without complications. The areas under the curve for urinary 8-OHdG and urinary albumin were, respectively, 0.836 ( $P < 0.001$ ) and 0.786 ( $P = 0.002$ ). Thus, urinary 8-OHdG has a slightly higher ability to discriminate microvascular complications in T2DM compared with urinary albumin. It was also demonstrated that T2DM patients with higher median of urinary 8-OHdG had significantly elevated levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and HOMA-IR, and decreased IL-10 levels. Our findings showed that T2DM patients with higher urinary 8-OHdG levels showed a greater inflammatory degree and higher insulin resistance. It is possible to speculate that T2DM patients present a cascade of events as increasing metabolic abnormalities such as insulin resistance and inflammatory activation, as well as increased ROS generation factors that may contribute directly to greater oxidative DNA damage.

**Keywords:** Type 2 diabetes, DNA damage, inflammation, insulin resistance.

## 1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a prevalent metabolic disease, which often brings with it a substantial impact on morbidity, mortality, and health care costs [1]. Hyperglycemia, a well-recognized pathogenic factor of complications in diabetes *mellitus* (DM) [2], not only gives rise to reactive oxygen species (ROS), but also induces an inflammatory process, with immune dysregulation including altered levels of cytokines [3]. Therefore, oxidative stress and tissue inflammation have been considered to be a common pathogenic factor for the development of diabetic complications [4]. Excessive production of ROS may damage lipids, proteins and nucleic acid, leading to apoptosis and cell mutations. As a result, the DNA is frequently damaged and oxidatively modified [5]. In this context, ROS may cause strand breaks in DNA and base modifications. This may include the oxidation of guanine residues to 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), present in mitochondrial and nuclear DNA, which is the most often measured DNA lesion [6]. Additionally, urinary 8-OHdG has been commonly utilized as a sensitive biomarker of oxidative DNA damage and it indicates the total oxidative stress *in vivo* [7]. Previous studies have suggested that urinary markers of DNA oxidation may be useful biomarkers in T2DM and prediabetes, as well as for the investigation of progression of diabetes complications [8,9]. Furthermore, urinary albumin is also associated with the pathogenesis of diabetes and its complications, has been used to detect kidney and vascular damage [10,11]. However, limitations in the utilization of urinary albumin as a biomarker to detect complications of DM should be taken into consideration [11]. Thus, structural alterations in the glomerular basement membrane can appear before the detection of albumin urinary [12]. In addition, it is known that the accumulation of 8-OHdG can lead to a dysregulation of the immune system, due to the excessive generation of free radicals [5]. Indeed, the relation between diabetes and DNA damage is evident, especially in those patients with poor glycemic control, as reported previously by our team [13]. However, the influence of genotoxicity on the inflammatory state in diabetes must be assessed in more detail, since it is unclear whether increased DNA damage may be related to a greater degree of inflammation and insulin resistance. Thus, it is important to investigate the relation between oxidative DNA damage with key mechanisms enrolled in T2DM, such as immune dysregulation and insulin resistance.

There are several studies indicating that diabetic subjects show an increase in ROS generation and oxidative stress biomarkers, as well as a decrease in antioxidant defenses [2,3,14]. It is known that proteins are likely to be the main targets of ROS, possibly as a consequence of their high overall abundance in biological systems, and their rapid rates of

reaction with many oxidants [15]. In this context, advanced oxidation protein products (AOPP) are defined as dityrosine-containing cross-linked protein products and are considered as reliable markers for the measurement of protein damage [16]. AOPP also play an important role in the pathophysiological process, since this biomarker may activate inflammatory cells [17]. It is important to note that the ROS generation could be a possible consequence of the production and release of interleukins, which have been known for their contribution in inducing  $\beta$ -cell dysfunction causing to insulin resistance and dysregulation of the immune system assigned in T2DM [14]. It is recognized that pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) have numerous metabolic activities and contribute for the development of diabetes complications, whereas the anti-inflammatory cytokines such as interleukin-10 (IL-10) provide protection against such pro-inflammatory events [18].

Considering that T2DM patients present DNA damage and an accentuated inflammatory process, the aim of this present study was to investigate the association between the oxidative DNA damage assessed by urinary 8-OHdG and the levels of pro and anti-inflammatory cytokines, as well as insulin resistance. In addition, we also investigate the diagnostic ability of urinary 8-OHdG in the identification of microvascular complications in T2DM.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Study population*

This case-control study included 76 volunteers enrolled in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The subjects were divided into two groups: T2DM (n = 54) and healthy controls (n = 22). T2DM was diagnosed according to ADA criteria (FPG  $\geq$ 7.0 mmol/L) [10]. Among the T2DM group, thirty had microvascular complications. Exclusion criteria to avoid unpredictable confounding were a history of malignancy, acute illness, fever, and infectious or liver diseases. This study protocol was approved by the Local Research Ethics Committee (12303113.0.0000.5346).

### *2.2. Clinical measurements*

Anthropometric measurements with emphasis on clinical markers of adiposity were obtained. Body mass index (BMI) was calculated by dividing the weight (kg) by height (m<sup>2</sup>). The clinical diagnosis of diabetic kidney disease (DKD) was based on the detection of urinary albumin in a random urine sample of urinary albumin excretion of more than 30 mg/g of

creatinine in two out of three random urine samples collected in within a six month period [10]. Diabetic retinopathy (DR) was diagnosed through fundoscopic examination using an ophthalmoscope [10]. Diabetic polyneuropathy (DPN) was assessed on light touch/pressure perception using a 10 g monofilament and afterwards applied to the plantar surface of the hallux and centrally at the heel of both feet. The filament was positioned perpendicular to the skin and pressure was applied up to the point where the filament buckles with a contact time of 2 sec. Patients were questioned with “yes or no” in order to identify if the monofilament stimulus was perceived. The capacity to correctly detect the monofilament in six trials on both locations was defined as normal, whereas the lack of perceiving the monofilament correctly in one or more trials was defined as disturbed [10,19]. All patients answered to a clinical and epidemiological assessment evaluating the practice of physical exercises, smoking, hypertension, and treatment with statins and/or other drugs.

### 2.3. Laboratory assays

Blood samples were collected from all subjects after an overnight fast by venous puncture technique into Vacutainer<sup>®</sup> (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with sodium fluoride plus EDTA, EDTA or no anticoagulants. Each patient also provided an early morning urine sample for biochemical analysis. Blood samples were routinely centrifuged at  $2500 \times g$  for 15 minutes at 4°C. Blood collected with sodium fluoride plus EDTA was used for measurement of fasting glucose. Plasma EDTA was used to assess AOPP levels, the total blood was used to determine the concentrations glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), while the serum was used to evaluate the levels of insulin, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, urea, creatinine, albumin, uric acid, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, and IL-10. Urine samples were used for the assessment of creatinine, urinary albumin and 8-OHdG. Fasting glucose, insulin, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, uric acid, albumin, urea, creatinine, and urinary albumin were performed by use of standard methods on Cobas MIRA<sup>®</sup> automated analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Urinary 8-OHdG was measured using ELISA kit (Trevigen<sup>®</sup>, Helgerman, Gaithersburg, USA). Inflammatory cytokines quantification was assessed by ELISA using commercial kits for human TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 and IL-10 (R&D Systems Inc<sup>®</sup>, Minneapolis, Minnesota, USA). All assays were conducted according to the manufacturer’s instructions. HbA<sub>1c</sub> was measured using chromatographic methods in D10<sup>®</sup> automated analyzer (BioRad, California, USA). Insulin was determined using a Cobas 6000<sup>®</sup> automated analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). AOPP levels were measured on Cobas MIRA<sup>®</sup> by a method

previously described by Hanasand et al. [20]. The results of urinary albumin were expressed as milligrams of albumin per gram of creatinine as a tool to match the levels of albumin in accordance with the concentration of urine [21]. The glomerular filtration rate (GFR) was estimated by the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation [22]. To verify the insulin resistance, the Homeostasis Model Assessment (HOMA-IR) index was calculated using the following formula: [fasting glucose (mmol/L)/fasting insulin (mIU/L)/22.5] [23].

#### 2.4. Statistical analysis

Distribution of variables was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) for parametric variables and median and interquartile range (IQR) for nonparametric variables. Categorical data are summarized as percentages, and comparisons between groups were performed with the chi-square test. Statistical differences between groups were evaluated by the Mann-Whitney test or Student's t-test. The T2DM group was stratified according to the median urinary 8-OHdG in order to assess the relationship of the DNA damage with other biomarkers. The receiver operating characteristics (ROC) curve was performed to quantify the overall ability of urinary 8-OHdG to discriminate between those T2DM patients with microvascular complications and those without microvascular complications. The Z statistic was performed to compare the areas under the ROC curve obtained for urinary albumin and urinary 8-OHdG. Multiple linear regression was performed to investigate whether some factors interfere with oxidative DNA damage. Statistical significance was assumed at  $P < 0.05$ . Data were analyzed using GraphPad Prism<sup>®</sup> version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA), Statistical Package for Social Sciences<sup>®</sup>, version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and MedCalc<sup>®</sup> version 13.0.6.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

### 3. Results

The baseline characteristics and biochemical variables of study subjects are summarized in **Table 1**. The mean duration of diabetes of study patients was  $14.7 \pm 1.4$  years. Among diabetic patients, 38.8% took insulin, 88.8% oral hypoglycemic agents, and 29.6% insulin plus oral hypoglycemic agents. Overall, thirty T2DM patients had microvascular complications, 12.9% presented DKD, 24.0% had DPN, and 22.2% showed DR. Fasting glucose, fasting insulin, HbA<sub>1c</sub>, HOMA-IR, HDL cholesterol, urinary albumin, urinary 8-OHdG, AOPP, TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6 were significantly higher in T2DM patients

when compared to no diabetic subjects. The IL-10 and GFR were significantly lower in T2DM patients compared with healthy controls. In addition, no statistically significant differences for total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, albumin, uric acid, or creatinine were observed among the groups. No differences in BMI, age, gender, or proportion of smokers were detected between the groups, except for the proportion of hypertensive in T2DM compared to healthy controls.

In addition, areas under the curve for urinary 8-OHdG and urinary albumin were, respectively, 0.836 (95% CI, 0.711 to 0.933,  $P < 0.001$ ) and 0.786 (95% CI, 0.608 to 0.864,  $P = 0.002$ ). Thus, both urinary 8-OHdG and urinary albumin have the ability to discriminate microvascular complications in T2DM. However, urinary 8-OHdG has a slightly higher ability to discriminate microvascular complications in T2DM compared with urinary albumin, as shown in **Figure 1**, although there is no difference between areas under the curve ( $Z$  statistic = 0.631,  $P = 0.528$ ). At a cut-off value of 20 ng/mL, urinary 8-OHdG demonstrated a sensitivity of 90.0% and a specificity of 71.4% for the evaluation of microvascular complications. At a cut-off value of 8.46 mg/g creatinine, urinary albumin demonstrated a sensitivity of 70.0% and a specificity of 86.2%.

Moreover, the urinary 8-OHdG concentrations were significantly higher in the T2DM group with microvascular complications when compared to the group without complications, respectively ( $30.1 \pm 1.8$  vs.  $20.7 \pm 2.0$  ng/mL;  $P = 0.001$ , **Figure 2**). Interestingly, when we stratified the T2DM group according to the median of urinary 8-OHdG, diabetic patients with higher median of this biomarker ( $>23.0$  ng/mL) had significantly elevated levels of fasting glucose, HbA<sub>1c</sub>, urinary albumin, HOMA-IR, AOPP, and inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-6, while IL-10 levels were significantly lower in this group. However, although the serum levels of IL-1 having given a tendency to increase in the group with higher median urinary 8-OHdG, no significant difference was verified when compared with the group with lowest median of urinary 8-OHdG ( $\leq 23.0$  ng/mL) (**Table 2**). Multiple linear regression showed that the association between oxidative DNA damage and T2DM was independent of BMI, hypertension and HDL cholesterol (**Table 3**).

#### 4. Discussion

The results of the present study indicated that oxidative DNA damage is increased in T2DM, as shown previously [5-7,24]. However, the link between DNA damage, oxidative stress and inflammation in the diabetes is still not totally clear [25]. Thus, to our knowledge, there are no studies associating oxidative DNA damage, through the urinary 8-OHdG levels,

with inflammatory biomarkers and insulin resistance in T2DM. In this context, studies are important to confirm and clarify the relation of the role of genotoxicity and inflammatory cytokines in diabetes. The importance of this study is to provide a better understanding of the metabolic abnormalities of this pathology and relate to DNA damage and inflammation. In this study, we demonstrated a strong relationship between the inflammatory system and oxidative DNA damage in T2DM. Thus, we speculated that an inflammatory imbalance in the organism can lead to an increase of this damage. Therefore, we hypothesized that modulation of the inflammatory process may be a potential tool to counteract the DNA damage in diabetes. In addition, the inflammatory process, increased ROS generation and, oxidative DNA damage may be intrinsically linked with the incidence and the progression of diabetes, and also provides an important role for diagnosing and monitoring diabetes. In this context, we demonstrated that higher urinary 8-OHdG concentrations are associated with microvascular events in T2DM, and that urinary 8-OHdG presented a satisfactory performance in the ROC curve.

Hyperglycemia, often found in diabetic subjects, causes increased flux of glucose and other sugars through the activation of polyol pathway, glycation of proteins and the autoxidation of glucose. These processes accelerate the formation of free radicals and can damage nucleic acids, as DNA [26]. ROS elevation enables the formation of purine and pyrimidine-derived lesions in DNA [27]. In addition, some evidence demonstrated that urinary markers of DNA oxidation could be potential biomarkers in T2DM [8]. Urinary excretion of markers of oxidative stress, such 8-OHdG, has also been linked to T2DM and associated with complications; however, the sensitivity and specificity of this biomarker needs to be compared with urinary albumin [11]. It was observed in this study that both urinary 8-OHdG and urinary albumin have the ability to discriminate microvascular complications, but urinary 8-OHdG demonstrated a slightly higher ability to distinguish microvascular complications in T2DM compared with urinary albumin, although there is no difference between areas under the curve. Thus, we are suggesting that the measurement of urinary 8-OHdG, combined with urinary albumin, may contribute to the investigation of microvascular complications in T2DM.

Our results indicated a relation between T2DM and oxidative DNA damage, as previously reported [7,25,28]. Here, we showed that T2DM patients with microvascular complications have increased urinary 8-OHdG levels compared with those without complications. These data suggest that this biomarker is a useful marker of microvascular complications in T2DM patients and that increased oxidative stress may indicate an important

role in the progression of diabetic complications [25]. In this context, Serdar et al. evaluated the urinary 8-OHdG levels in T2DM patients with and without DKD. No significant difference was demonstrated in urinary 8-OHdG levels between these study groups. Thus, urinary 8-OHdG is not an advantageous clinical marker, compared with urinary albumin, to predict the development of DKD [29]. However, our study is in agreement with several other studies, which demonstrate that 8-OHdG presents a diagnostic ability to discriminate DKD, thereby, it is considered a sensitive and useful clinical biomarker [6,7]. Additionally, the relationship between urinary 8-OHdG concentrations and the severity of the retinal lesions in patients with DR was previously investigated. Among the patients with DM, those with proliferative DR had significantly higher urinary 8-OHdG levels than those with nonproliferative DR. Thus, it was proposed that this marker can help in the early diagnosis and treatment of patients with DR [30]. On the other hand, Nishikawa et al. demonstrated that 8-OHdG is an advantageous biomarker of not only microvascular but also macrovascular complications in T2DM patients [28]. The progression of these diabetic complications can be explained through a possible mechanism, which lies in the fact that DNA damage-induced senescence cells may contribute to metabolic stress, inducing to the telomere dysfunction [31-33]. Furthermore, 8-OHdG present in the mitochondrial and nuclear DNA is released into the blood and urine following its removal from DNA by the repair enzyme [6].

Diabetic patients, especially the ones with poor glycemic control, present increasing amounts of ROS, which may cause oxidative DNA damage [5,34]. Recently, our team showed that individuals with T2DM had higher DNA damage than control subjects, using the comet assay [13]. Also, that fasting glucose levels and HbA<sub>1c</sub> was positively associated with DNA damage. In the present study we showed that the fasting glucose and HbA<sub>1c</sub> are related to oxidative DNA damage in patients with T2DM, as in previous studies [7,35], that showed oxidative DNA damage was significantly higher in T2DM patients with poor glycemic control. Indeed, our data confirm the hypothesis that DNA damage may be among the most relevant causes of the progression of diabetic complications in uncontrolled diabetes [36]. On the other hand, the variables gender, age, smoking habit, hypertension, statin treatment, and BMI are not associated with oxidative DNA damage in individuals with T2DM.

Several hypotheses have established T2DM as an inflammatory disease [37]. T2DM is associated with chronic activation of the innate immune system. In addition, inflammatory and immune markers can distinguish the stages of diabetes (early preclinical and clinical stages), as well as the complications and progression of this pathology [38]. It has been proposed that besides inflammatory process, T2DM is also characterized by insulin resistance

in pancreatic islets [39]. In the present study, we observed higher levels of HOMA-IR index and pro-inflammatory cytokines such IL-6, IL-1, and TNF- $\alpha$  in T2DM patients, as well as lower levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Thus, our results corroborate previous studies that showed that metabolic abnormalities and insulin resistance provoke tissue specific inflammation in T2DM patients [18,40-43]. Under these circumstances, pro-inflammatory cytokines may lead to insulin resistance in  $\beta$ -cell, while anti-inflammatory cytokines may neutralize these deleterious effects. This suggests that an imbalance between these two classes of cytokines may have an important function in T2DM [44].

Inflammatory events play an important role in the physiopathogenesis of T2DM. The events initiating this inflammatory process remain unclear and could possibly include different mechanisms that influence the activation of nuclear factor-kB (NF-kB) and N-terminal kinase (JNK) pathways, cytokines release, and recruitment of immune system cells [37], factors that may contribute directly to oxidative DNA damage. Interestingly, our study showed that oxidative DNA damage has a relationship with the inflammatory process and insulin resistance in T2DM. Thus, our results demonstrated that diabetic patients with a higher median of urinary 8-OHdG have elevated levels of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 and also HOMA-IR index, while IL-10 levels were lower in this group. We speculated that the increased urinary 8-OHdG in T2DM might have resulted not only from the increased systemic oxidative stress, but also from the inflammatory process. In this context, it was verified that TNF- $\alpha$  decreased the tyrosine kinase activity of the insulin receptor, thereby increasing insulin resistance [45]. Associated to that, a higher quantity of circulating IL-6 induces insulin resistance [40], cellular death in  $\beta$ -cell together with other inflammatory cytokines, such as IL-1 [14,43,46], which may be the cause of the DNA damage. Inversely, the IL-10 plays a central anti-inflammatory activity by inhibiting the production of inflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$  and IL-6. Thus, decreased levels of IL-10 have been linked to an inflammatory response in T2DM patients along with a reduced tyrosine kinase activity of insulin receptors, processes which may be linked to higher oxidative DNA damage [42,47]. Taken together, the DNA damage provoked in T2DM may be clarified by the overactivation of the inflammatory pathways, contributing to increase of ROS generation [48]. In addition, this study also demonstrated that diabetic patients with higher median of urinary 8-OHdG have elevated levels of AOPP. AOPP are formed during oxidative stress by the action of chlorinated oxidants, mainly hypochlorous acid (HOCl) and chloramines produced by myeloperoxidase in activated neutrophils [17]. In particular, AOPP are also considered as pro-inflammatory mediators [49]. Thus, in T2DM patients, myeloperoxidase

can be continuously activated, leading to an increase of HOCl and the accumulation of plasmatic AOPP [15,50,51], and may contribute directly to oxidative DNA damage. Accordingly, the HOCl can damage all four nucleotides *in vivo* and provokes several of molecular modifications [52].

In summary, we have shown that the urinary 8-OHdG is considered a reliable biomarker for evaluating oxidative DNA damage in T2DM and can be utilized in the diagnosis of microvascular complications in T2DM. We demonstrated that T2DM patients with higher urinary 8-OHdG concentrations showed a greater degree of inflammation and higher insulin resistance. It is possible to speculate that T2DM patients present a cascade of events that include increasing metabolic abnormalities such insulin resistance and inflammatory activation, as well as an increased ROS generation factors that may contribute directly to greater oxidative DNA damage. However, further studies are required to investigate this relationship in a larger population.

#### **Conflict of interest statement**

There are no conflicts of interest to declare.

#### **Acknowledgments**

This study was supported by scholarships from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) and Capes Foundation (Brazil). The authors thank Bioclin/Quibasa (Belo Horizonte, Brazil) and Laborsys (Porto Alegre, Brazil) for providing biochemical reagents. We also thank the team of the Clinical Analysis Laboratory (LAC) of the University Hospital of Santa Maria for the support provided.

#### **References**

- [1] S. Wild, G. Roglic, A. Green, R. Sicree, H. King, Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030, *Diabetes Care* 27 (2004) 1047-1053.
- [2] J.L. Rains, S.K. Jain, Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes, *Free Radic Biol Med* 50 (2011) 567-575.
- [3] M.Y. Donath, S.E. Shoelson, Type 2 diabetes as an inflammatory disease, *Nat Rev Immunol* 11 (2011) 98-107.
- [4] J.L. Leahy, Pathogenesis of type 2 diabetes, *Arch Med Res* 36 (2005) 197-209.

- [5] L.L. Wu, C. Chiou, P. Chang, J.T. Wu, Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics, *Clin Chim Acta* 339 (2004) 1-9.
- [6] H. Pan, L. Zhang, M. Guo, H. Sui, H. Li, W. Wu, N. Qu, M. Liang, D. Chang, The oxidative stress status in diabetes mellitus and diabetic nephropathy, *Acta Diabetol* 47 (2010) S71-S76.
- [7] G.W. Xu, Q.H. Yao, Q.F. Weng, B.L. Su, X. Zhang, J.H. Xiong, Study of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in diabetic nephropathy patients, *J Pharm Biomed Anal* 36 (2004) 101-104.
- [8] K. Broedbaek, V. Siersma, T. Henriksen, A. Weimann, M. Petersen, J.T. Andersen, E. Jimenez-Solem, L.J. Hansen, J.E. Henriksen, S.J. Bonnema, N. Olivarius, H.E. Poulsen, Association between urinary markers of nucleic acid oxidation and mortality in type 2 diabetes, *Diabetes Care* 36 (2013) 669-676.
- [9] H.A. Al-Aubaidy, H.F. Jelinek, 8-Hydroxy-2-deoxy-guanosine identifies oxidative DNA damage in a rural prediabetes cohort, *Redox Rep* 15 (2010) 155-160.
- [10] Association American Diabetes, Standards of medical care in diabetes, *Diabetes Care* 37 (2014) S14-S80.
- [11] A. Matheson, M.D.P. Willcox, J. Flanagan, B.J. Walsh, Urinary biomarkers involved in type 2 diabetes: a review, *Diabetes Metab Res Rev* 26 (2010) 150-171.
- [12] J. Barratt, P. Tophan, Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease. *Can Med Assoc J* 177 (2007) 361-368.
- [13] E. Tatsch, G.V. Bochi, S.J. Piva, J.A.M. De Carvalho, H. Kober, V.D. Torbitz, T. Duarte, C. Signor, A.C. Coelho, M.M.M.F. Duarte, G.F.F.S. Montagner, I.B.M. Da Cruz, R.N. Moresco, Association between DNA strand breakage and oxidative, inflammatory and endothelial biomarkers in type 2 diabetes, *Mutat Res* 732 (2012) 16-20.
- [14] M.S.H. Akash, K. Rehman, S. Chen, Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, *J Cell Biochem* 114 (2013) 525-531.
- [15] K.B. Pandey, N. Mishra, S.I. Rizvi, Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients, *Clin Biochem* 43 (2010) 508-511.
- [16] C. Alderman, S. Shah, J.C. Foreman, B.M. Chain, D.R. Katz, The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function, *Free Radic Biol Med* 32 (2002) 377-385.
- [17] V. Witko-Sarsat, V. Gausson, A.T. Nguyen, M. Touam, T. Drüeke, F. Santangelo, B. Descamps-Latscha, AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative

metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients, *Kidney Int* 64 (2003) 82-91.

[18] M. Saxena, N. Srivastava, M. Banerjee, Association of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus, *Mol Biol Rep* 40 (2013) 6271-6279.

[19] J.E. Mayfield, J.R. Sugarman, The use of semmens-Weinstein monofilament and other threshold tests for preventing foot ulceration and amputation in people with diabetes, *J Fam Pract* 49 (2000) S17-S29.

[20] M. Hanasand, R. Omdal, K.B. Norheim, L.G. Goransson, C. Brede, G. Jonsson, Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma, *Clin Chim Acta* 413 (2012) 901-906.

[21] D.J. Newman, M.J. Pugia, J.A. Lott, J.F. Wallace, A. Hiar, Urinary protein and albumin excretion corrected by creatinine and specific gravity, *Clin Chim Acta* 294 (2000) 139-155.

[22] A.S. Levey, L.A. Stevens, C.H. Schmid, Y.L. Zhang, A.F. Castro, H.I. Feldman, J.W. Kusek, P. Eggers, F. Van Lente, T. Greene, J. Coresh, A new equation to estimate glomerular filtration rate, *Ann Intern Med* 150 (2009) 604-612.

[23] D.R. Matthews, J.P. Hosker, A.S. Rudenski, B.A. Naylor, D.F. Treacher, R.C. Turner, Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man, *Diabetologia* 28 (1985) 412-419.

[24] C.S. Shin, B.S. Moon, K.S. Park, S.Y. Kim, S.J. Park, M.H. Chung, H.K. Lee, Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients, *Diabetes Care* 24 (2001) 733-737.

[25] K. Broedbaek, A. Weimann, E.S. Stovgaard, H. E. Poulsen, Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a biomarker in type 2 diabetes, *Free Radic Biol* 51 (2011) 1473-1479.

[26] H. Yang, X. Jin, C.W. Kei Lam, S.K. Yan, Oxidative stress and diabetes mellitus, *Clin Chem Lab Med* 49 (2011) 1773-1782.

[27] D. Il'yasova, P. Scarbrough, I. Spasojevic, Urinary biomarkers of oxidative status, *Clin Chim Acta* 413 (2012) 1446-1453.

[28] T. Nishikawa, T. Sasahara, S. Kiritoshi, K. Sonoda, T. Senokuchi, T. Matsuo, D. Kukidome, N. Wake, T. Matsumura, N. Miyamura, M. Sakakida, H. Kishikawa, E. Araki, Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a novel biomarker of macrovascular complications in type 2 diabetes, *Diabetes Care* 26 (2003) 1507-1512.

[29] M. Serdar, E. Sertoglu, M. Uyanik, S. Tapan, K. Akin, C. Bilgi, I. Kurt, Comparison of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels using mass spectrometer and urine albumin creatinine ratio as a predictor of development of diabetic nephropathy, *Free Radic Res* 46 (2012) 1291-1295.

- [30] Q.Y. Dong, Y. Cui, L. Chen, J. Song, L. Sun, Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels in diabetic retinopathy patients, *Eur J Ophthalmol* 18 (2008) 94-98.
- [31] S.V. Brodsky, O. Gealekman, J. Chen, F. Zhang, N. Togashi, M. Crabtree, S.S. Gross, A. Nasjletti, M.S. Goligorsky, Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen, *Circ Res* 94 (2004) 377-384.
- [32] I. Shimizu, Y. Yoshida, M. Suda, T. Minamino, DNA damage response and metabolic disease, *Cell Metabolism* 20 (2014) 967-977.
- [33] J.D. Erusalimsky, Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology, *J Appl Physiol* 106 (2009) 326-332.
- [34] A. Sliwinska, J. Blasiak, J. Kasznicki, J. Drzewoski, In vitro effect of gliclazide on DNA damage and repair in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM), *Chem Biol Interact* 173 (2008) 159–165.
- [35] H.A. Al-Aubaidy, H.F. Jelinek, Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus, *Eur J Endocrinol* 164 (2011) 899-904.
- [36] K. Komosinska-Vassev, K. Olczyk, P. Olczyk, K. Winsz-Szczotka, Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients, *Diabetes Res Clin Pract* 68 (2005) 207–216.
- [37] N. Esser, S. Legrand-Poels, J. Piette, A.J. Scheen, N. Paquot, Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes, *Diabetes Res Clin Pract* 105 (2014) 141-150.
- [38] V. Grossmann, V.H. Schmitt, T. Zeller, M. Panova-Noeva, A. Schulz, D. Laubert-Reh, C. Juenger, R.B. Schnabel, T.G.J. Abt, R. Laskowski, J. Wiltink, E. Schulz, S. Blankenberg, K.J. Lackner, T. Münzel, P.S. Wils, Profile of the immune and inflammatory response in individuals with prediabetes and type 2 diabetes, *Diabetes Care* 38 (2015) 1356-1364.
- [39] M.Y. Donath, M. Böni-Schnetzler, H. Ellingsgaard, P.A. Halban, J.A. Ehses, Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function, *Trends Endocrinol Metab* 21 (2010) 261-267.
- [40] Y. Michima, A. Kuyama, A. Tada, K. Takahashi, T. Ishioka, M. Kibata, Relationship between sérum tumor necrosis fator- $\alpha$  and insulin resistance in obese men with type 2 diabetes mellitus, *Diabetes Res Clin Pract* 52 (2001) 119-123.
- [41] E.V. Van Exel, J. Gussekloo, A.J.M. Craen, M. Frolich, A.B. Wiel, R.G.J. Westendorp, Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes, *Diabetes* 51 (2002) 1088-1092.

- [42] M. Banerjee, M. Saxena, Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes, *Clin Chim Acta* 413 (2012) 1163–1170.
- [43] J. Li, S. Wu, M. Wang, T. Wang, J. Zhu, Association of the interleukin-10 – 592A/C, – 1082G/A and – 819T/C gene polymorphisms with type 2 diabetes: a meta-analysis, *Gene* 521 (2013) 211-216.
- [44] H. Tilg, A.R. Moschen, Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance, *Mol Med* 14 (2008) 222–231.
- [45] A.D. Pradhan, J.E. Manson, N. Rifai, J.E. Buring, P.M. Ridker, C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus, *JAMA* 286 (2001) 327-334.
- [46] C. Herder, M. Carstensen, D.M. Ouwens, Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes, *Diabetes Obes Metab* 13 (2013) 39-50.
- [47] M.S. Cooke, R. Olinski, M.D. Evans, Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta* 365 (2006) 30-49.
- [48] M. Kalousová, J. Skrha, T. Zima, Advanced Glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus, *Physiol Res* 51 (2002) 597-604.
- [49] A. Piwowar, M. Knapik-Kordecka, M. Warwas, AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus, *Diabetes Res Clin Pract* 77 (2007) 188-192.
- [50] S. Bansal, D. Chawla, M. Siddarth, B.D. Banerjee, S.V. Madhu, A.K. Tripathi, A study on serum advanced glycation end products and its association with oxidative stress and paraoxonase activity in type 2 diabetic patients with vascular complications, *Clin Biochem* 46 (2013) 109-114.
- [51] W.A. Prütz, Interactions of hypochlorous acid with pyrimidine nucleotides, and secondary reactions of chlorinated pyrimidines with GSH, NADH, and other substrates, *Arch Biochem Biophys* 349 (1998) 183-191.
- [52] T. Asahi, H. Kondo, M. Masuda, H. Nishino, Y. Aratani, Y. Naito, T. Yoshikawa, S. Hisaka, Y. Kato, T. Osawa, Chemical and immunochemical detection of 8-halogenated deoxyguanosines at early stage inflammation, *J Biol Chem* 285 (2010) 9282-9291.

**Table 1.** Baseline characteristics and biochemical parameters of the study population.

	<b>Control</b>	<b>T2DM</b>	<b>P-value</b>
Age (years)	61.5 ± 2.3	59.9 ± 1.8	0.628
Male (%)	36.3	33.3	0.796
Microvascular complications (%)	0	55.5	<0.001
Hypertension (%)	72.2	18.1	<0.001
Smokers (%)	4.5	14.8	0.271
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	28.0 ± 1.1	32.9 ± 1.2	0.014
Fasting glucose (mmol/L)	4.7 ± 0.1	8.5 ± 0.5	<0.001
Fasting insulin (pmol/L)	43.4 (16.9-75.6)	81.6 (22.8-147.8)	0.034
HbA <sub>1c</sub> (%)	5.7 (4.6-5.9)	7.7 (6.2-9.1)	<0.001
HbA <sub>1c</sub> (mmol/mol)	35.0 (26.2-37.2)	56.8 (40.4-72.6)	<0.001
HOMA-IR	1.6 (1.0-2.2)	3.8 (2.2-9.1)	<0.001
Total cholesterol (mmol/L)	4.6 ± 0.2	4.5 ± 0.1	0.881
LDL cholesterol (mmol/L)	2.5 ± 0.2	2.5 ± 0.09	0.985
HDL cholesterol (mmol/L)	1.8 ± 0.2	1.3 ± 0.05	<0.001
Triglycerides (mmol/L)	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1	0.773
Albumin (g/L)	37.8 ± 8.8	37.9 ± 2.8	0.915
Uric acid (mmol/L)	0.3 (0.2-0.4)	0.3 (0.1-0.4)	0.197
Creatinine (µmol/L)	75.5 (54.8-92.3)	79.5 (53.0-101.7)	0.106
GFR (mL/min/1,73 m <sup>2</sup> )	93.6 ± 4.8	78.8 ± 3.1	0.025
Urinary albumin (mg/g creat)	3.9 (0.4-8.7)	7.8 (2.3-17.5)	0.026
Urinary 8-OHdG (ng/mL)	13.0 ± 0.6	25.9 ± 1.4	<0.001
AOPP (µmol/L)	52.8 ± 6.9	73.5 ± 4.8	0.020
IL-10 (pg/mL)	81.5 ± 6.0	63.6 ± 4.2	0.018
TNF-α (pg/mL)	83.5 (70.0-212.0)	182.5(151.8-216.3)	0.019
IL-1 (pg/mL)	117.0 (52.0-185.0)	160.0(147.0-222.0)	0.026
IL-6 (pg/mL)	152.9 ± 19.2	200.8 ± 13.0	0.049

Data are expressed as percentages, mean and SD or median and interquartile ranges.

**Table 2.** Inflammatory, biological biomarkers and insulin resistance index according to the median of urinary 8-OHdG in T2DM patients

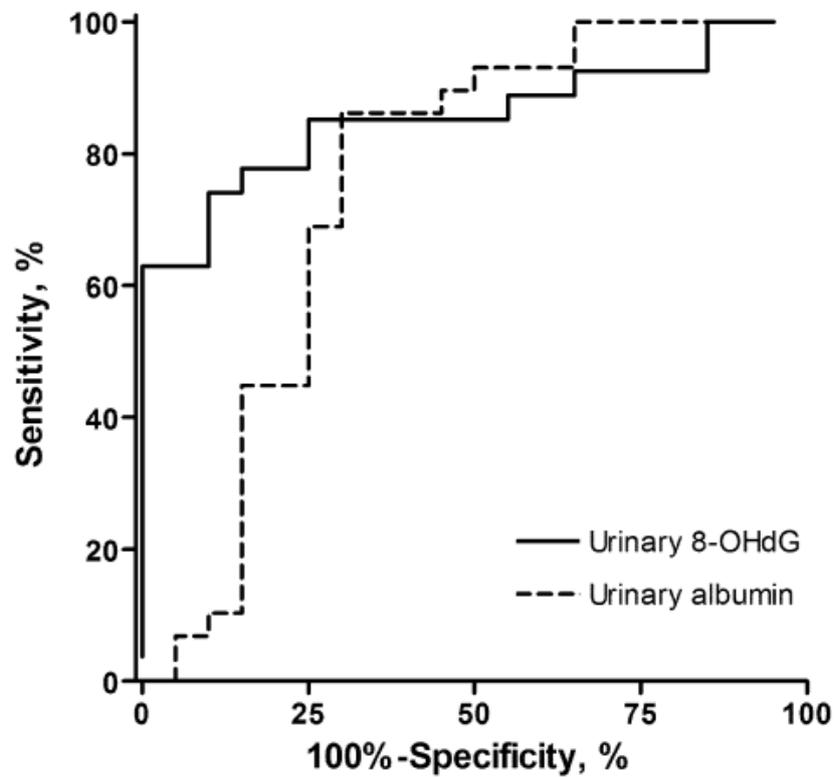
	<b>8-OHdG</b> <b>(≤ 23.0 ng/mL)</b>	<b>8-OHdG</b> <b>(&gt; 23.0 ng/mL)</b>	<b>P-value</b>
n	28	26	
Fasting glucose (mmol/L)	6.7 (6.2-8.3)	8.2 (6.8-11.1)	0.035
HbA <sub>1c</sub> (%)	7.4 ± 0.3	8.4 ± 0.4	0.046
Urinary albumin (mg/g creat)	6.1 (4.7-7.8)	12.2 (6.5-21.1)	0.012
HOMA-IR	2.5 (1.6-6.2)	4.4 (3.6-14.3)	0.025
AOPP (μmol/L)	61.5 ± 1.9	88.8 ± 10.2	<0.001
IL-1 (pg/mL)	150.2 ± 13.6	179.0 ± 14.3	0.151
IL-6 (pg/mL)	158.9 ± 13.8	203.5 ± 16.2	0.042
IL-10 (pg/mL)	95.1 ± 11.1	66.4 ± 7.0	0.036
TNF-α (pg/mL)	158.8 ± 11.5	198.2 ± 15.5	0.047

Data are expressed as mean and SD or median and interquartile ranges.

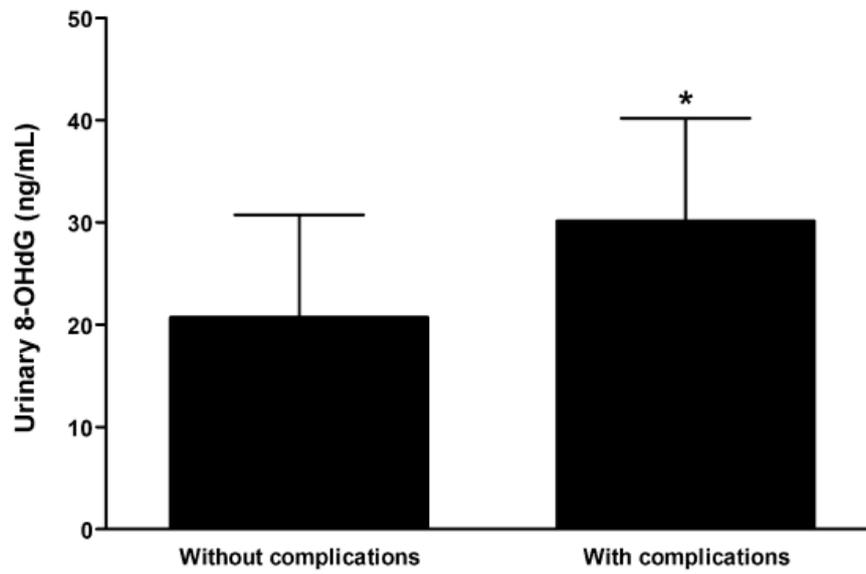
**Table 3.** Multiple linear regression of oxidative DNA damage as a dependent variable adjusting for BMI, hypertension and HDL cholesterol.

	<b><i>b</i></b>	<b>SE<sub><i>b</i></sub></b>	<b><i>t</i></b>	<b>P-value</b>
T2DM (no/yes)	11.953	3.180	3.759	<0.001
<b>Characteristics of the patients</b>				
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	0.018	0.155	0.116	0.908
Hypertension (no/yes)	-0.701	2.886	-0.243	0.809
<b>Lipids</b>				
HDL cholesterol (mmol/L)	-1.398	1.776	-0.787	0.434

Regression coefficients (*b*), standard error of *b* (SE<sub>*b*</sub>), and *t* statistic with corresponding P-value.



**Figure 1.** ROC curves of urinary 8-OHdG and urinary albumin in the assessment of microvascular complications. Areas under the curve for urinary 8-OHdG and urinary albumin were 0.836 (95% CI, 0.711 to 0.933,  $P < 0.001$ ) and 0.786 (95% CI, 0.608 to 0.864,  $P = 0.002$ ), respectively. The difference between areas was 0.050 (Z statistic = 0.631,  $P = 0.528$ ).



**Figure 2.** Urinary 8-OHdG levels in T2DM patients with microvascular complications and T2DM patients without complications. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. \*P = 0.001.

## 5 DISCUSSÃO

O DM tipo 2 é um distúrbio metabólico prevalente presente em cerca de 90% a 95% dos pacientes com DM (ADA, 2016). Representa um dos mais importantes problemas de saúde pública, uma vez que sua prevalência tem atingido proporções epidêmicas e as projeções são preocupantes (IDF, 2015). Diversos mecanismos fisiopatológicos estão associados ao DM tipo 2, como glicotoxicidade, lipotoxicidade, estresse do retículo endoplasmático, disfunção endotelial, estresse oxidativo e processo inflamatório, podendo resultar em danos em diversas macromoléculas, sendo o DNA o principal alvo (AKASH et al., 2013). Estes mecanismos também estão relacionados com o aparecimento e/ou evolução das complicações crônicas desta patologia (BANSAL et al., 2013; SANTILLI et al., 2015). No entanto, muitos destes mecanismos fisiopatológicos relacionados com o aumento do DNA danificado no diabetes precisam ser elucidados. Por este motivo, primeiramente investigamos a associação entre as quebras nos filamentos de DNA, através do ensaio cometa, com biomarcadores oxidativos, inflamatórios e endoteliais em pacientes com DM tipo 2. Para o nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo que avaliou nesta doença a associação da ruptura dos filamentos do DNA com o desequilíbrio oxidativo e inflamatório, bem como com a disfunção endotelial.

No Artigo I, foi demonstrado que pacientes diabéticos tipo 2 apresentaram maior dano ao DNA, detectado através do ensaio cometa, quando comparados com indivíduos controle presumidamente saudáveis. Este ensaio apresenta vantagens em comparação com outros testes que avaliam o dano ao DNA, como rapidez, simplicidade e sensibilidade, além de ser considerado o padrão-ouro em estudos de toxicogenética (LIMA et al., 2008; LIAO et al., 2009). Também foi verificado nestes pacientes diabéticos uma correlação positiva entre o dano no DNA e os níveis de HbA<sub>1c</sub>, corroborando com estudos anteriores que reportaram que no DM tipo 2 descompensado há um aumento no dano ao DNA (LODOVICI et al., 2008; SLIWINSKA et al., 2008; IBARRA-COSTILLA et al., 2010). Este aumento na fragmentação de DNA pode ser devido à hiperglicemia, que expõe o organismo aos efeitos deletérios pró-oxidativos (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2005; SLIWINSKA et al., 2008; IBARRA-COSTILLA et al., 2010), através da ativação de vias principais e alternativas, como auto-oxidação da glicose, produção de AGEs e via do polioliol (YANG et al., 2011). Estes processos aceleram a formação de EROs e, conseqüentemente, podem danificar o DNA (SLIWINSKA et al., 2008).

Também foi demonstrado neste estudo uma associação entre o dano ao DNA com biomarcadores como NOx, IL-6 e albumina urinária em pacientes diabéticos tipo 2. Esta associação pode ser decorrente do aumento do estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial verificada no DM (BHATIA et al., 2003; DONNE et al., 2006; SAXENA et al., 2013; SENA et al., 2013). Neste contexto, o estresse oxidativo pode ser o responsável pela disfunção endotelial, através da redução da biodisponibilidade do NO endotelial (ZHANG, 2008; ZHAO et al., 2015), além da ativação de vários mediadores inflamatórios, como a IL-6 (DONATH e SHOELSON, 2011). Além disso, a hiperglicemia promove um aumento do estresse oxidativo e um desequilíbrio no sistema antioxidante, além de uma ativação na produção de AGEs, levando a um processo inflamatório e à disfunção endotelial, estando estas vias envolvidas de forma importante na fragmentação do DNA (BROWNLEE, 2005). Neste estudo, observamos que os níveis de IL-6, albumina urinária e LDL colesterol foram significativamente maiores nos diabéticos tipo 2, enquanto que os níveis de NOx foram significativamente menores neste grupo. Assim, podemos afirmar que a disfunção endotelial, juntamente com moléculas de LDL colesterol, podem desencadear uma resposta vascular inflamatória, podendo contribuir para o aumento da fragmentação do DNA no DM através da via NF-kB (ZOZULINSKA e WIERUSZ-WYSOCKA, 2006). Consequentemente, estes fatores desempenham um importante papel no desenvolvimento da aterosclerose (ANDREASSI e BOTTO, 2003; PARK et al., 2014). Além disso, a disfunção endotelial devido principalmente a redução da atividade do NO pode estar associada com o aumento da albumina urinária (OTT et al., 2011; PARK et al., 2014), podendo contribuir para o aumento do dano ao DNA no DM. Ainda em relação à disfunção endotelial, o  $O_2^-$  produzido nas paredes vasculares pode inibir a função do NO que reage com o primeiro, formando  $OONO^-$  (ZOU et al., 2004). Esta substância citotóxica produzida pode ser a responsável pelo aumento da fragmentação do DNA no diabetes. De acordo com os nossos resultados do Artigo I, o DM tipo 2 é uma desordem caracterizada por um aumento no processo inflamatório, estresse oxidativo, bem como uma disfunção endotelial, podendo ser estes os possíveis fatores responsáveis pelo aumento na fragmentação do DNA.

No segundo estudo foi avaliada a associação entre o dano oxidativo ao DNA, através dos níveis urinários de 8-OHdG, com os níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória, bem como com a resistência insulínica. Além disso, este estudo também se propôs a investigar a capacidade diagnóstica do 8-OHdG urinário na identificação de complicações crônicas microvasculares. Crescentes evidências demonstram que marcadores da oxidação de ácidos nucleicos podem ser biomarcadores úteis no DM, assim como na

investigação e progressão de suas complicações (BROEDBAEK et al., 2011; BROEDBAEK et al., 2013). No entanto, este biomarcador não havia sido totalmente avaliado em relação às suas características diagnósticas (MATHESON et al., 2010). Sendo assim, a análise da *Receiver Operating Characteristic Curve* (curva ROC) foi utilizada para determinar a capacidade diagnóstica do 8-OHdG urinário em identificar as complicações crônicas microvasculares em pacientes com DM tipo 2, comparado com a albumina urinária. O 8-OHdG apresentou uma maior capacidade diagnóstica em identificar as complicações microvasculares do que a albumina urinária, apesar de não ter demonstrado diferença estatisticamente significativa entre as áreas sob a curva. Estas observações comprovam o potencial deste biomarcador na investigação das complicações microvasculares no DM tipo 2, em conjunto com a albumina urinária. Além disso, nossos resultados também demonstraram que pacientes diabéticos tipo 2 com complicações microvasculares apresentaram maiores níveis de 8-OHdG urinário, comparado com os diabéticos sem complicações, corroborando com outros estudos (NISHIKAWA et al., 2003; DONG et al., 2008; SERDAR et al., 2012). Este dado evidencia o papel do estresse oxidativo na progressão das complicações crônicas do DM (BROEDBAEK et al., 2011). Neste contexto, a progressão destas complicações pode ser explicada pelo fato de que a senescência prejudicada pelo dano no DNA pode contribuir para o estresse metabólico, induzindo uma disfunção nos telômeros (ERUSALIMSKY, 2009; SHIMIZU et al., 2014).

A formação de  $\text{OH}^{\bullet}$ , assim como outras EROs, pode levar a uma série de danos que incluem, quebras simples e duplas na molécula de DNA, *crosslinks* de proteínas, bem como modificações nas bases nitrogenadas (DIZDAROGLU et al., 2012). Assim, o aumento destas espécies é capaz de formar lesões nas bases purínicas, como a guanina, ocorrendo a oxidação do DNA, formando o 8-OHdG (WU et al., 2004; XU et al., 2004). Para o nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo que investigou a associação entre a oxidação do DNA com marcadores inflamatórios e de resistência insulínica. Portanto, a importância deste estudo foi confirmar e esclarecer a relação dos processos inflamatórios e anormalidades metabólicas no aumento do dano oxidativo ao DNA.

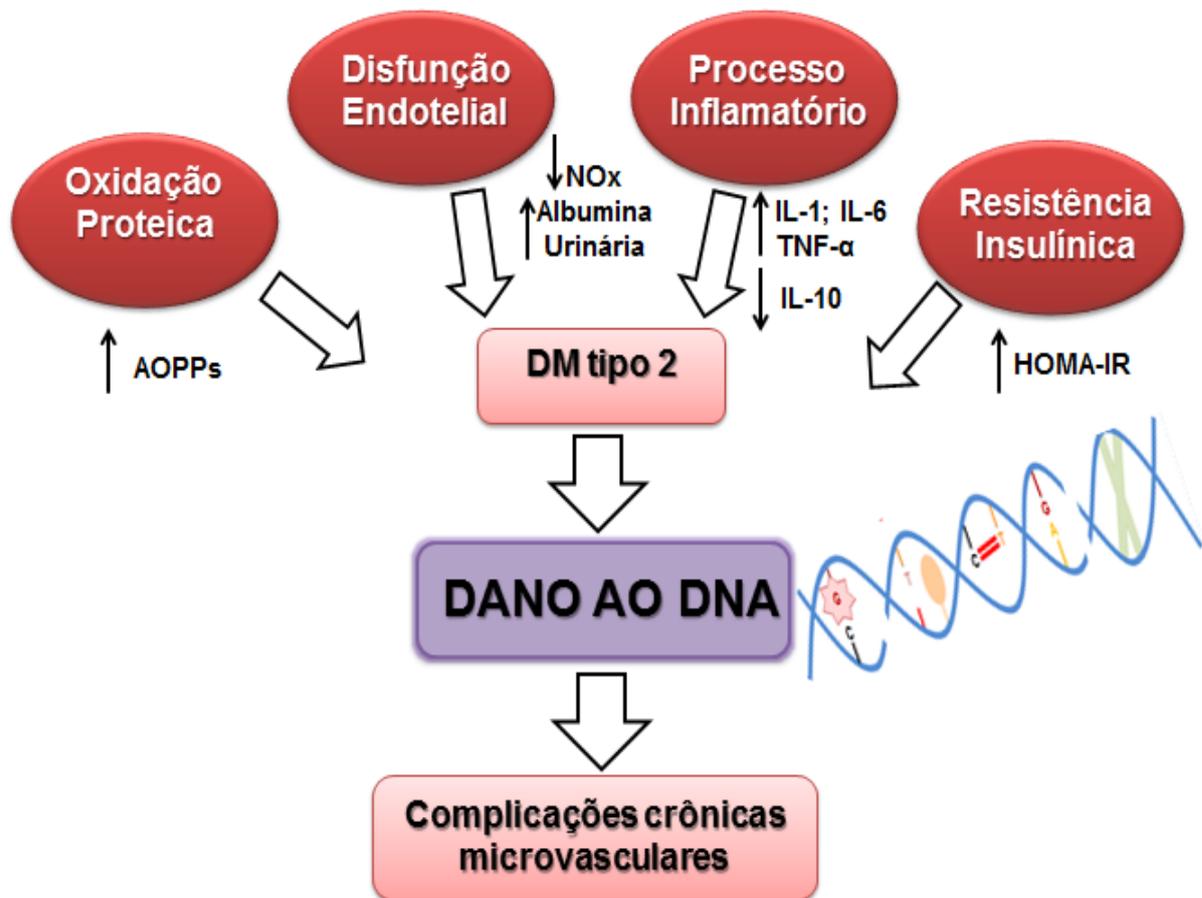
Evidências sugerem que o processo inflamatório apresenta um importante papel no desenvolvimento e progressão do DM tipo 2, bem como na evolução das suas complicações crônicas (DONATH e SHOELSON, 2011; GROSSMANN et al., 2015). Além do desequilíbrio inflamatório, o DM tipo 2 também é caracterizado por uma disfunção nas células  $\beta$  pancreáticas, ocasionando a resistência insulínica (AKASH et al., 2013). Neste estudo, observamos que os pacientes diabéticos tipo 2 apresentaram um aumento significativo

do HOMA-IR, além dos níveis das citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , bem como um decréscimo significativo dos níveis da IL-10, considerada uma citocina anti-inflamatória. No diabetes, as citocinas pró-inflamatórias podem aumentar a síndrome da resistência insulínica, enquanto as citocinas anti-inflamatórias podem conter seus efeitos negativos (ZOZULINSKA e WIERUSZ-WYSOCKA, 2006; LI et al., 2013). De maneira interessante, nós demonstramos que os pacientes diabéticos tipo 2 com maiores níveis de 8-OHdG urinário (avaliado pela mediana) apresentaram níveis aumentados de IL-6, TNF- $\alpha$  e HOMA-IR, bem como níveis diminuídos de IL-10. Assim, nós acreditamos que o processo inflamatório está relacionado ao aumento do dano oxidativo ao DNA. Deste modo, sabe-se que o TNF- $\alpha$  possui a capacidade de inibir a sinalização da insulina, assim como prejudicar a sua secreção, através da diminuição da atividade da tirosina quinase, aumentando o quadro de resistência insulínica (SAXENA et al., 2013). Associado a isso, a elevação das concentrações de IL-6 e IL-1 induzem a resistência insulínica em tecidos periféricos e apoptose nas ilhotas  $\beta$ -pancreáticas (AKASH et al., 2013). Enquanto a IL-10 é considerada um potente mediador anti-inflamatório, pois pode reduzir a atividade da tirosina quinase nos receptores de insulina (BANERJEE e SAXENA, 2012). Neste contexto, estes mecanismos relacionados à inflamação podem estar conectados ao aumento do dano oxidativo ao DNA.

Neste estudo também foi demonstrado que os pacientes diabéticos tipo 2 com maiores níveis de 8-OHdG, apresentaram maiores níveis de AOPPs, que além de ser considerado um marcador de estresse oxidativo (PANDEY et al., 2010), também é um mediador pró-inflamatório (PIWOWAR et al., 2007). Assim, no DM tipo 2 a enzima MPO pode estar continuamente ativada, levando ao aumento de HOCl e, portanto, acúmulo de AOPPs (BANSAL et al., 2013), podendo aumentar o dano oxidativo ao DNA. De acordo com Asahi et al. (2010), o HOCl pode danificar os nucleotídeos *in vivo*, e com isso provocar diversas modificações moleculares. Dessa forma, o artigo II demonstrou que o DM tipo 2 apresenta diversos eventos, como anormalidades metabólicas e desequilíbrio oxidativo e inflamatório, sendo estes os possíveis responsáveis pelo aumento do dano oxidativo ao DNA.

Baseado nos resultados encontrados nesse estudo, é possível apresentar uma proposta de conexão entre diferentes mecanismos que podem estar associados ao aumento do dano ao DNA no DM tipo 2, conforme apresentado na Figura 12.

Figura 12 – Mecanismos propostos para o aumento do dano ao DNA no diabetes tipo 2



## 6 CONCLUSÕES

- Os pacientes DM tipo 2 apresentaram maior dano ao DNA;
- Os pacientes DM tipo 2 apresentaram aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , elevação dos níveis de AOPP, além de uma diminuição dos níveis de citonas anti-inflamatórias, como a IL-10, e do marcador de disfunção endotelial NOx;
- O 8-OHdG urinário apresentou-se elevado em pacientes DM tipo 2 com complicações crônicas microvasculares, em comparação com os pacientes diabéticos sem complicações.
- O 8-OHdG urinário apresentou potencial diagnóstico para as complicações crônicas microvasculares em pacientes com DM tipo 2;
- Houve uma associação entre a fragmentação do DNA e a disfunção endotelial, caracterizada pela diminuição dos níveis de NOx e aumento dos níveis de albumina urinária nos pacientes com DM tipo 2;
- Foi demonstrada uma associação entre a oxidação e fragmentação do DNA e o processo inflamatório, avaliada pelo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e TNF- $\alpha$ , além de um decréscimo dos níveis de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 nos pacientes diabéticos tipo 2;
- Houve uma associação entre a oxidação do DNA e a oxidação proteica, através do aumento dos níveis de AOPPs nos pacientes com DM tipo 2;
- Foi verificada uma associação entre o dano oxidativo ao DNA e alterações metabólicas no DM tipo 2, caracterizada pelo aumento níveis da glicose de jejum e HbA1c;
- Houve uma associação entre a oxidação do DNA e a resistência insulínica, avaliada pelo índice HOMA-IR, nos pacientes diabéticos tipo 2;
- Em suma, os pacientes DM tipo 2 apresentaram uma associação entre o dano ao DNA com alterações relacionadas aos processos metabólicos, oxidativos, inflamatórios e vasculares, bem como a ocorrência das complicações crônicas microvasculares. Desta maneira, este estudo coopera para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia do DM tipo 2, sendo estes envolvidos no aumento do dano ao DNA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA, American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 27, p. S5-S10, 2004.

ADA, American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2016. **Diabetes Care**, v. 39, p. S11-S112, 2016.

ADAIKALAKOTESWARI, A. et al. Oxidative DNA damage and augmentation of poly(ADP-ribose) polymerase/nuclear factor-kappa B signaling in patients with type 2 diabetes and microangiopathy. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 9, p. 1673-1684, 2007.

AGROIYA, P. et al. Association of serum lipids with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. **Indian J Endocrinol Metab**, v. 17, p. 335-337, 2013.

AHMED, N. Advanced glycation and products role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 67, n. 1, p. 3-21, 2005.

AKASH, M. S. H.; REHMAN, K.; CHEN, S. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **J Cell Biochem**, v. 114, p. 525-531, 2013.

AKSUN, S. A. et al. Serum and urinary nitric oxide in type 2 diabetes with or without microalbuminuria. Relation to glomerular hyperfiltration. **J Diabetes Complications**, v. 17, p. 343-348, 2003.

AL-AUBAIDY, H. A.; JELINEK, H. F. 8-hydroxy-2-deoxy-guanosine identifies oxidative DNA damage in a rural prediabetes cohort. **Redox Rep**, v. 15, p. 155-160, 2010.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. International Diabetes Federation: a consensus on type 2 diabetes prevention. **Diabet Med**, v. 24, p. 451-463, 2007.

AMMENDRUP, A. et al. The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic  $\beta$ -cells. **Diabetes**, v. 49, p. 1468-1476, 2000.

ANDREASSI, M. G.; BOTTO, N. DNA damage as a new emerging risk factor in atherosclerosis. **Trends Cardiovasc Med**, v. 13, p. 270-275, 2003.

ARALDI, R. P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. **Biomed Pharmacother**, v. 72, p. 74-82, 2015.

ARIF, M. et al. DNA damage and plasma antioxidant indices in Bangladeshi type 2 diabetic patients. **Diabetes Metab**, v. 36, p. 51-57, 2010.

ASAHI, T. et al. Chemical and immunochemical detection of 8-halogenated deoxyguanosines at early stage inflammation. **J Biol Chem**, v. 285, 9282-9291, 2010.

ASL, A. Z.; GHASEMI, A.; AZIZI, F. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. **Clin Biochem**, v. 41, p. 1342-1347, 2008.

ASO, Y. et al. Plasma interleukin-6 is associated with coagulation in poorly controlled patients with Type 2 diabetes. **Diabet Med**, v. 20, p. 930-934, 2003.

AUNE, D.; URSIN, G. B. Meat consumption and the risk of type diabetes: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Diabetologia**, v. 52, p. 2277-2287, 2009.

AVOGARO, A. et al. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 16, p. S39-S45, 2006.

AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Arch Toxicol**, v. 87, p. 949-968, 2013.

BANERJEE, M.; SAXENA, M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. **Clin Chim Acta**, v. 413, p. 1163-1170, 2012.

BANSAL, S. et al. A study on serum advanced glycation end products and its association with oxidative stress and paraoxonase activity in type 2 diabetic patients with vascular complications. **Clin Biochem**, v. 46, p. 109-114, 2013.

BATHIA, S. et al. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide and products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. **Clin Biochem**, v. 36, p. 557-562, 2003.

BAX, J. J. et al. Screening for coronary artery disease in patients with diabetes. **Diabetes Care**, 30:2729-36, 2007.

BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, v. 48, p. 1-9, 1999.

BECKMAN, J. A. et al. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. **Circulation**, v. 103, p. 1618-1623, 2001.

BEHL, C.; MOOSMANN, B. Antioxidant neuroprotection in Alzheimer`s disease as preventive and therapeutic approach. **Free Radic Biol Med**, v. 33, p. 182-191, 2002.

BJELLAND, S.; SEEBERG, E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. **Mutat Res**, v. 531, p. 37-80, 2003.

BLASIAK, J. et al. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. **Mutat Res**, v. 554, p. 297-304, 2004.

BLUHER, M. et al. Association of interleukin-6, C-reactive protein, interleukin-10 and adiponectin plasma concentrations with measures of obesity, insulin sensitivity and glucose metabolism. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 113, p. 534-537, 2005.

BO, J. et al. Impairment of Endothelial Cell Function Induced by Hemoglobin A1c and the Potential Mechanisms. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 123, n. 9, p. 529-35, 2015.

BOCHI, G. V. et al. In Vitro Oxidation of Collagen Promotes the Formation of Advanced Oxidation Protein Products and the Activation of Human Neutrophils. **Inflammation**, article in press; 2016.

- BÖCKER, W. et al. Automated Comet Assay Analysis. **Cytometry**, v. 35, p. 134-44, 1999.
- BONNY, C. et al. Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of  $\beta$ -cell death. **Diabetes**, v. 50, p. 77-82, 2001.
- BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radic Biol Med**, v. 43, p. 645-657, 2007.
- BROEDBAEK, A. et al. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine as a biomarker in type 2 diabetes. **Free Radic Biol**, v. 51, p. 1473-1479, 2011
- BROEDBAEK, K. et al. Association between urinary markers of nucleic acid oxidation and mortality in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 36, p. 669-676, 2013.
- BROWLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813-820, 2001.
- BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, p. 1615-1625, 2005.
- BRUGGEMAN, L. A. et al. Neuropathy in human immunodeficiency virus- 1 transgenic mice is due to renal transgene expression. **J Clin Invest**, v. 100, p. 84-92, 1997.
- BUCCI, M. et al. Diabetic mouse angiopathy is linked to progressive sympathetic receptor deletion coupled to an enhanced caveolin-1 expression. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, p. 721-726, 2004.
- BURTIS, C.A. et al. **Fundamentos de Química Clínica (Tietz)**. 6 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2008.
- CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res**, v. 87, p. 840-844, 2000.
- CAKATAY, U. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. **Diabetes Metab**, v. 31, p. 551-557, 2005.
- CAMERON, N. E.; COTTER, M. A. Diabetes causes an early reduction in autonomic ganglion blood flow in rats. **J Diabetes Complications**, v. 15, p. 198-202, 2001.
- CAPEILLÈRE-BLANDIN, C. et al. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. **Biochim Biophys Acta**, v. 1689, p. 91-102, 2004.
- CAPELLINI, V. K. et al. Diabetes and vascular disease: basic concepts of nitric oxide physiology, endothelial dysfunction, oxidative stress and therapeutic possibilities. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 8, p. 526-544, 2010.
- CAWTHORN, W. P.; SETHI, J. K. TNF- $\alpha$  and adipocyte biology. **FEBS Letters**, v. 582, p. 117-131, 2008.

- CHAKRABORTI, C. K. Role of adiponectin and some other factors linking type 2 diabetes mellitus and obesity. **World J Diabetes**, v. 6, 1296-1308, 2015.
- CHAWLA, A.; NGUYEN, K. D.; GOH, Y. P. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, p. 738-749, 2011.
- CHILTON, R. et al. Cardiovascular comorbidities of type 2 diabetes mellitus: defining the potential of glucagonlike peptide-1-based therapies. **Am J Med**, v. 124, p. S35-S53, 2011.
- CHOI, K. M, et al. Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 75, n. 2, p. 235-40, 2007.
- CHOI, S. W. et al. Inter-relationships between DNA damage, ascorbic acid and glycaemic control in Type 2 diabetes mellitus, **Diabet Med**, v. 22, p. 1347–1353, 2005.
- CHOUCROUN, P. et al. Comet assay and early apoptosis. **Mutat Res**, v. 478, p. 89-96, 2001.
- CHU, S.; BOHLEN, H. G. High concentration of glucose inhibits glomerular endothelial eNOS through a PKC mechanism. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 287, p. F384-F392, 2004.
- COLLINS, A. R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. **Mutat Res**, v. 336, p. 69-77, 1995.
- COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143-151, 2008.
- COLLINS, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, p. 794-800, 2014.
- COOKE, M. S.; OLINSKI, R.; EVANS, M. D. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? **Clin Chim Acta**, v. 365, p. 30-49, 2006.
- CORREA-GIANNELLA, M. L.; VIEIRA, S. M. A predisposição genética para o desenvolvimento da microangiopatia no DM1. **Arq bras Endocrinol Metab**, v. 52, n. 2, p. 375-386, 2007.
- D'AGOSTINO. et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: The Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 117, p. 743-53, 2008.
- DALLA VESTRA, M. et al. Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. **J Am Soc Nephrol**, v. 16, p. S78–S82, 2005.
- DALLE-DONNE, I. et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin Chem**, v. 52, p. 601-623, 2006.
- DARLEY-USMAR, V.; WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS Letters**, v. 369, p. 131-151, 1995.
- DA SILVA, C.; SASSON, S.; CALDINI, N. **Biologia**. 10 ed. São Paulo. Ed. Saraiva, 2011.

- DELANEY, S. et al. Chemical and biological consequences of oxidatively damaged guanine in DNA. **Free Radic Res**, v. 46, n. 4, p. 420-441, 2012.
- DÍEZ, J. J.; IGLESIAS, P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. **Eur J Endocrinol**, v. 148, p. 293-300, 2003.
- DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, p. 2095-2147, 1996.
- DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 519-550, 2009.
- DINÇER, Y. et al. Assessment of DNA base oxidation and glutathione level in patients with type 2 diabetes. **Mutat Res**, v. 505, p. 75-81, 2002.
- DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus**. Ed. Diagraphic, 2014-2015. 374 p.
- DIZDAROGLU, M. Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry. **Methods Enzymol**, v. 234, p. 3-16, 1994.
- DIZDAROGLU, M. Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. **Mutat Res**, v. 591, p. 45-59, 2005.
- DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. **Free Radic Res**, v. 46, n. 4, p. 382-419, 2012.
- DONATH, M. Y.; BÖNI-SCHNETZLER, M.; ELLINGSGAARD, H. Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, p. 261-267, 2010.
- DONATH, M. Y.; SHOELSON, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, p. 98-107, 2011.
- DONG, Q. Y. et al. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels in diabetic retinopathy patients. **Eur J Ophthalmol**, v. 18, n. 1, p. 94-98, 2008.
- DONNE, I. D. et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin Chem**, v. 52, p. 601-623, 2006.
- DOWNS, C. A. ; FAULKNER, M. S. Toxic stress, inflammation and symptomatology of chronic complications in diabetes. **World J Diabetes**, v. 15, n. 6, p. 554-565, 2015.
- DUPLAIN, H. et al. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 104, p. 342-345, 2001.
- DU PUCH, C. B. M. et al. Tools and strategies for DNA damage interactome analysis. **Mutat Res**, v. 752, p. 72-83, 2013.
- DUSINSKA, M.; COLLINS, A. R. The comet assay in human biomonitoring: gene environment interactions. **Mutagenesis**, v. 23, p. 191-205, 2008.

EISERICH, J. P. et al. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular no oxidase. **Science**, v. 296, p. 2391-2394, 2002.

EL-KADRE, L. J.; TINOCO, A. C. A. Interleukin-6 and obesity: the crosstalk between intestine, pancreas and liver. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 16, p. 564, 568, 2013.

ENGELS, W. R. et al. A third link connecting aging with double strand break repair. **Cell Cycle**, v. 6, p. 131-135, 2007.

EROL, A. Systemic DNA Damage Response and Metabolic Syndrome as a Premalignant State. **Curr Mol Med**, v. 10, p. 321-334, 2010.

ERUSALIMSKY, J. D. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. **J Appl Physiol**, v. 106, p. 326-332, 2009.

ESSER, N. et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes, **Diabetes Res Clin Pract**, v. 105, p. 141-150, 2014.

FATEHI-HASSANABA, Z.; CHAN, C. B. ; FURMAN, B. L. Furman. Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. **Eur J Pharmacol**, v. 636, p. 8-17, 2010.

FENECH, M. et al. The Human MicroNucleus Project -International collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat Res**, v. 428, p. 271-283, 1999.

FÈVE, B.; BASTARD, J. P. The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol**, v. 5, p. 305-311, 2009.

FONSECA, V. The role basal insulin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. **Insulin**, v. 1, n. 2, p. 51-60, 2006.

FÖRSTERMANN U. ; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, v. 33, p. 829-837, 2012.

FREITAS, A. A. ; MAGALHÃES, J. P. A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. **Mutat Res**, v. 728, p. 12-22, 2011.

FRIED, S. K. ; BUNKIN, D. A. ; GREENBER, A. S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 83, p. 847-850, 1998.

FRIEDBERG, E. C. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, n. 6921), p. 436-440, 2003.

FU, C. et al. Association of C-reactive protein and hyperuricemia with diabetic nephropathy in Chinese type 2 diabetic patients. **Acta Diabetol**, v. 46, p. 126-134, 2009.

GANZ, P.; VITA, J. A. Testing vasomotor function. Nitric oxide, a multipotent molecule. **Circulation**, v. 108, p. 2049-2053, 2003.

GAO, Z. et al. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. **J Biol Chem**, v. 277, n. 50, p. 48115-4812, 2002.

GARCÍA, O. et al. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutat Res**, v. 556, p. 25-34, 2004.

GATANAGA, T. et al. Purification and characterization of an inhibitor (soluble tumor necrosis factor receptor) for tumor necrosis factor and lymphotoxin obtained from the serum ultrafiltrates of human cancer patients. **Proc Natl Acad Sci**, v. 87, p. 8781-8784, 1990.

GEISZT, M.; LETO, T. L. The Nox family of NADPH oxidases: host defense and beyond. **J Biol Chem**, v. 279, p. 51715-51718, 2004.

GEORGIU, C. D. ; PAPAPOSTOULOU, I. ; GRINTZALIS, K. Protocol for the quantitative assessment of DNA concentration and damage (fragmentation and nicks). **Nat Protoc**, v. 4, n. 2, p. 125-131, 2009.

GERSTEIN, H. C. et al. Basal insulin and cardiovascular and other outcomes in dysglycemia. **N Engl J Med**, v. 367, p. 319-328, 2012.

GIULIVI, C. Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. **Free Radic Biol Med**, v. 34, p. 397-408, 2003.

GODSCHALK, R. et al. DNA repair measurements by use of the modified comet assay: an inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). **Mutat Res**, v. 757, p. 60-67, 2013.

GOH, S.Y.; COOPER, M. E. Clinical review: The role of advanced glycation and products in progression and complications of diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, p. 1143-1152, 2008.

GOLD, R. et al. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. **Lab Invest**, v. 71, p. 219-225, 1994.

GOLDIN, A. et al. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, p. 597-605, 2006.

GOLDSTEIN, B. J. ; SCALIA, R. G. ; MA, X. L. Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med**, v. 6, p. 27-35, 2009.

GORIN, Y. et al. Angiotensin II activates Akt/protein kinase B by an arachidonic acid/redoxdependent pathway and independent of phosphoinositide 3-kinase. **FASEB J**, v. 15, p. 1909 -1920, 2001.

GRADINARU, D. et al. Advanced oxidative and glycoxidative protein damage markers in the elderly with type 2 diabetes. **J Proteomics**, v. 30, p. 313-322, 2013.

GREGGT, E. W. et al. Changes in diabetes-related complications in the United States, 1990-2010. **N Engl J Med**, v. 17, n. 370, p. 1514-23, 2014.

- GROSS, J. L.; NEHME, M. Detecção e tratamento das complicações crônicas do diabetes melito: Consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes e Conselho Brasileiro de Oftalmologia. **Rev Ass Med Brasil**, v. 45, n. 3, p. 279-284, 1999.
- GROSS, J. L. et al. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. **Diabetes Care**, v. 28, p. 176-88, 2005.
- GROSS, J.L. et al. Nefropatia Diabética e Doença Cardíaca. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51, n. 2, p. 244-256, 2007.
- GROSSMANN, V. et al. Profile of the immune and inflammatory response in individuals with prediabetes and type 2 diabetes, **Diabetes Care**, v. 38, p. 1356-1364, 2015.
- GRUYS, E. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 6, p. 1045-1056, 2005.
- GUNASEKARANA, V. ; RAJ, G. V. ; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. **J Clin Diagn Res**, v. 9, n. 3, p. 1-5, 2015.
- GUPTA, S. et al. Association of biomarkers of inflammation and oxidative stress with the risk of chronic kidney disease in type 2 diabetes mellitus in North Indian population. **J Diabetes Complications**, v. 27, n. 6, p. 548-52, 2013.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. 3° Ed. Oxford, New York, p. 593, 2000.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v. 142, p. 231-255, 2004.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, v. 141, p. 312-322, 2006.
- HARMER, J. A. et al. Cigarette smoking and albuminuria are associated with impaired arterial smooth muscle function in patients with type 2 diabetes mellitus: a FIELD substudy. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 106, n. 2, p. 328-36, 2014.
- HARPER, J. W. ; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: ten years after. **Mol Cell**, v. 28, n. 5, p. 739-45, 2007.
- HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2003.
- HAVEL, P. J. Update on adipocyte hormones: Regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. **Diabetes**, v. 53, p. S143-S151, 2004.
- HERDER, C.; M. CARSTENSEN, M.; OUWENS, D. M. Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes, **Diabetes Obes Metab**, v. 13, p. 39-50, 2013.

HÖHN, A.; JUNG, T.; GRUNE, T. Pathophysiological importance of aggregated damaged proteins. **Free Radic Biol Med**, v. 71, p. 70-89, 2014.

HONG, L. G. et al. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. **Diabetes**, v. 58, p. 2525-2535, 2009.

HOTAMISLIGIL, G. Inflammation and metabolic diseases. **Nature**, v. 444, p. 860-867, 2006.

IBARRA-COSTILLA, E. et al. DNA damage evaluated by comet assay in Mexican patients with type 2 diabetes mellitus. **Acta Diabetol**, v. 47, p. 111-116, 2010.

IL'YASOVA, D.; SCARBROUGH, P.; SPASOJEVIC, I. Urinary biomarkers of oxidative status. **Clin Chim Acta**, v. 413, p. 1446-1453, 2012.

IDF, International Diabetes Federation. **Diabetes Atlas**. 7. Ed., 2015. 162 p.

JAGER, A. et al. von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and nondiabetic subjects: the Hoorn Study. **Arterioscler Throm Vasc Biol**, v. 19, p. 3071-3078, 1999.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 46, p. 1071-1078, 2009.

KALOUSOVÁ, M.; SKRHA, J.; ZIMA, T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. **Physiol Res**, v. 51, p. 597-604, 2002.

KANAUCHI, M.; NISHIOKA, H.; HASHIMOTO, T. Oxidative DNA damage and tubulointerstitial injury in diabetic nephropathy. **Nephron**, v. 91, p. 327-329, 2002.

KARIN, M.; LAWRENCE, T.; NIZET, V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. **Cell**, v. 124, p. 823-835, 2006.

KASHIWAGI, S. et al. eNOS phosphorylation on serine 1176 affects insulin sensitivity and adiposity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 431, p. 284-290, 2013.

KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nature Genet**, v. 27, p. 247-254, 2001.

KIECHLE, F. L.; MARLINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. **Am J Clin Pathol**, v. 100, p. 567-575, 1993.

KOMOSINSKA-VASSEV, K. et al. Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 68, p. 207-216, 2005.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation, **Mutat Res**, v. 455, p. 155-166, 2000.

- KUMARI, S. et al. DNA damage: detection strategies. **EXCLI J**, v. 7, p. 44-62, 2008.
- KUSHWAHA, S. et al. Alkaline, Endo III and FPG modified comet assay as biomarkers for the detection of oxidative DNA damage in rats with experimentally induced diabetes. **Mutat Res**, v. 726, p. 242-50, 2011.
- KUSMINSKI, C. M.; MCTERNAN, P.G.; KUMAR, S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. **Clin Sci**, v. 109, p. 243-256, 2005.
- LARSEN, C. M. et al. Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, p. 1663-1668, 2009.
- LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **Int J Exp Pathol**, v. 88, p. 85-94, 2007.
- LEBECHE, D.; DAVIDOFF, A. J.; HAJJAR, R. J. Interplay between impaired calcium regulation and insulin signaling abnormalities in diabetic cardiomyopathy. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med**, v. 5, p. 715-724, 2008.
- LEE, S. C.; CHAN, J. C. N. Evidence for DNA Damage as a Biological Link Between Diabetes and Cancer. **Chin Med J**, v. 128, p. 1543-1548, 2015.
- LEHMANN, R.; SCHLEICHNER, E. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. **Clin Chim Acta**, v. 297, p. 135-144, 2000.
- LEINONEN, J. et al. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **FEBS Lett**, v. 417, p. 150-2, 1997.
- LEWIN, B. **Genes IX**. Porto Alegre. Artmed, 2009, 892p.
- LI, J. et al. Association of the interleukin-10-592A/C, -1082G/A and -819T/C gene polymorphisms with type 2 diabetes: a meta-analysis. **Gene**, v. 521, p. 211-216, 2013.
- LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells, **Methods**, v. 48, p. 46-53, 2009.
- LIBBY, P. Changing concepts of atherogenesis. **J Intern Med**, v. 247, p. 349-358, 2000.
- LIMA, P.H.O. et al. Levels of DNA damage in blood leukocyte samples from nondiabetic and diabetic female rats and their fetuses exposed to air or cigarette smoke. **Mutat Res**, v. 653, p. 44-49, 2008.
- LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, v. 362, p. 709-715, 1993.
- LINDAHL, T.; BARNES, D. E. Repair of endogenous DNA damage. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 65, p. 127-134, 2000.
- LODOVICI, M. et al. Oxidative DNA damage and plasma antioxidant capacity in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. **Mutat Res**, v. 638, p. 98-102, 2008.

LOMBARD, D. B. et al. DNA repair, genome stability, and aging. **Cell**, v. 120, p. 497-512, 2005.

LÓPEZ-OTIN, C. et al. The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, p. 1194-1217, 2013.

LORENZO, Y. et al. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. **Mutagenesis**, v. 28, p. 427-432, 2013.

LUGON, J. R. End-stage renal disease and chronic kidney disease in Brazil. **Ethn Dis**, v. 19, p. S1-7-9, 2009.

MAEDLER, K. et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1 beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **J Clin Invest**, v. 110, p. 851-860, 2002.

MATHESON, A. et al. Urinary biomarkers involved in type 2 diabetes: a review. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 26, n. 26, p. 150-71, 2010.

MCNELIS, J. C.; OLEFSKY, J. M. Macrophages, immunity, and metabolic disease. **Immunity**, v. 41, p. 36-48, 2014.

MILLER, B.; POTTER-LOCHER, F. Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the in vitro micronucleus test. **Mutat Res**, v. 410, p. 81-116, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Indicadores e Dados Básicos - IDB 2011**. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0201>>. Acesso em: 12 nov. 2015.

MISHIMA, Y. et al. Relationship between serum tumor necrosis factor-alpha and insulin resistance in obese men with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 52, n. 2, p. 119-123, 2001.

MO, L. I.; FLAVELL, R. A. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor- $\beta$  and interleukin-10. **Immunity**, v. 28, p. 468-476, 2008.

MOHAMED-ALI, V. et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. **J Clin Endocrinol Metabolism**, v. 82, p. 4196-4200, 1997.

MONTANE, J.; CADAVEZ, L.; NOVIALS, A. Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 7, p. 25-34, 2014.

MORESCO, R. N. et al. Diabetic nephropathy: traditional to proteomic markers. **Clin Chim Acta**, v. 5, n. 421, p. 17-30, 2013.

MUSA, B. O. P. et al. Cell-mediated immunity in type 2 diabetes mellitus patients in diabetic ketoacidosis, patients with controlled type 2 diabetes mellitus and health control subjects. **J Med Sci**, v. 1, p. 290-295, 2010.

NAKAMURA, J.; SWENBERG, J. A. Endogenous apurinic/aprimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. **Cancer Res**, v. 59, p. 2522-2526, 1999.

NAVARRO, J. F.; MORA, C. Role of inflammation in diabetic complications. **Nephrol Dial Transplant**, v. 5, p. 2601-2604, 2005.

NEGRE-SALVAYERE, A. et al. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, p. 3071-3109, 2009.

NISHIDA, M. et al. Interleukin-10 associates with adiponectin predominantly in subjects with metabolic syndrome. **Circ J**, v. 71, v. 8, p. 1234-1238, 2007.

NISHIKAWA, T. et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, p. 787-790, 2000.

NISHIKAWA T. et al. Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxy-guanosine as a novel biomarker of macrovascular complications in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, p. 1507-1512, 2003.

NORPPA, H.; FALCK, G. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, v. 18, p. 221-233, 2003.

ONG, K. L. et al. Relationship of pericardial fat with biomarkers of inflammation and hemostasis, and cardiovascular disease: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 239, p. 386-392, 2015.

OSTEROD, M. et al. Age-related and tissue specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 1459-1463, 2001.

OTT, C. et al. Reduction in basal nitric oxide activity causes albuminuria. **Diabetes**, v. 60, p. 572-576, 2011.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, p. 85-97, 2011.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, v. 87, p. 315-324, 2007.

PALECEK, E.; BARTOSIK, M. Electrochemistry of nucleic acids. **Chem Rev**, v. 112, p. 3427-3481, 2012.

PALM, F. et al. Reactive oxygen species cause diabetes-induced decrease in renal oxygen tension. **Diabetologia**, v. 46, p. 53-60, 2003.

PAN, H. et al. The oxidative stress status in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. **Acta Diabetol**, v. 47, p. S71-S76, 2010.

PANDEY, K. B.; MISHRA, N.; RIZVI, S. I. Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. **Clin Biochem**, v. 43, p. 508-511, 2010.

- PARK, M. et al. Role of soluble endothelial cell-selective adhesion molecule biomarker in albuminuria and kidney function changes in patients with coronary artery disease: the Heart and Soul Study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 34, n. 1, p. 231-6, 2014.
- PARTANEN, J. et al. Natural history of peripheral neuropathy in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **N Eng J Med**, v. 333, p. 89-94, 1995.
- PASUPATHI, P.; CHANDRASEKAR, V.; KUMAR, U. S. Evaluation of oxidative stress, enzymatic and non-enzymatic antioxidants and metabolic thyroid hormone status in patients with diabetes mellitus. **Diabetes Metab Syndr**, v. 3, p. 160-165, 2009.
- PAZ-FILHO, G. et al. Leptin: Molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 56, p. 597-607, 2012.
- PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, v. 15, p. 289-302, 2000.
- PENG, S. L.; FATENEJAD, S.; CRAFT, J. Scleroderma: a disease related to damaged proteins? **Nat Med**, v. 3, p. 276-278, 1997.
- PIWOWAR, A.; KNAPIK-KORDECKA, M.; WARWAS, M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 77, p. 188-192, 2007.
- PIWOWAR, A. et al. Plasma glycooxidation protein products in type 2 diabetic patients with nephropathy. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 24, p. 549-553, 2008.
- PRABHAKAR, S. et al. Diabetic nephropathy is associated with oxidative stress and decreased renal nitric oxide production. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, p. 2945-2952, 2007.
- PRADHAN, A. D. et al. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus, **JAMA**, v. 286, p. 327-334, 2001.
- PU, L. J. et al. Value of serum glycated albumin and high-sensitivity C reactive protein levels in the prediction of presence of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes. **Cardiovasc Diabetol**, v. 5, p. 27-30, 2006.
- PULKKANEN, K. J. et al. False-positive apoptosis signal in mouse kidney and liver detected with TUNEL assay. **Apoptosis**, v. 5, p. 329--333, 2000.
- QIDWAI, T.; KHAN, F. Tumor necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. **Scand J Immunol**, v. 76, p. 522-547, 2011.
- RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radic Biol Med**, v. 50, p. 567-575, 2011.
- RANG, H. P. et al. RANG e DALE : **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2011.
- RIBEIRO, M. L. et al. Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. **Clin Colorectal Cancer**, v. 7, p. 267-272, 2008.

ROBERTS, A. C.; PORTER, K. E. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. **Diab Vasc Dis Res**, v.10, p. 472-482, 2013.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sci**, v. 84, p. 705-712, 2009.

ROCHA, V. Z.; FOLCO, E. J. Inflammatory concepts of obesity. **Int J Inflamm**, v. 2011, p. 529061, 2011.

RODRIGUEZ, A. J. et al. Association between circulating adipocytokine concentrations and microvascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of controlled cross-sectional studies. **J Diabetes Complications**, v. 30, p. 357-367, 2016.

RUAN, H. ; DONG, L. Q. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. **J Mol Cell Biol**, article in press; 2016.

RUSSELL, N. D. F. ; COOPER, M. E. 50 years forward: mechanisms of hyperglycaemia-driven diabetic complications. **Diabetologia**, v. 58, p. 1708–1714, 2015.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799-806, 2001.

SAMANTA, S. ; DEY, P. Micronucleus and its applications. **Diagn Cytopathol**, v. 40, p. 84-90, 2012.

SANTILLI, F. ; D'ARDES, D. ; DAVI, G. Oxidative stress in chronic vascular disease: From prediction to prevention. **Vascul Pharmacol**, v. 74, p. 23-37, 2015.

SATOH, J. ; YAGIHASHI, S. ; TOYOTA, T. The possible role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in diabetic polyneuropathy. **Exp Diabetes Res**, v. 4, p. 65-71, 2003

SAXENA, M.; SRIVASTAVA, N.; BANERJEE, M. Association of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. **Mol Biol Rep**, v. 40, p. 6271-6279, 2013.

SCARPELLI, D. et al. Variants of the interleukin-10 promoter gene are associated with obesity and insulin resistance but not type 2 diabetes in caucasian italian subjects. **Diabetes**, v. 55, p. 1529-1533, 2006.

SCHEFFEL, R.S. et al. Prevalência de complicações micro e macrovasculares em pacientes com Diabetes Melito do Tipo 2 em atendimento ambulatorial. **Rev Assoc Med Bras**, v. 50, n. 3, p. 263-267, 2004.

SCRABLE, H. ; MEDRANO, S. ; UNGEWITTER, E. Running on empty: how p53 controls INS/IGF signaling and affects life span. **Exp Gerontol**, v. 44, p. 93-100, 2009.

SENA, C. M.; PEREIRA, A. M.; SEIÇA, R. Endothelial dysfunction: a major mediator of diabetic vascular disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1832, p. 2216-2231, 2013.

SERDAR, M. et al. Comparison of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels using mass spectrometer and urine albumin creatinine ratio as a predictor of development of diabetic nephropathy. **Free Radic Res**, v. 46, n. 10, p. 1291-1295, 2012.

SHARMA, J. N. ; AL-SHOUMER, K. ; MATAR, K. M. Altered activities of kininase II, an angiotensin converting enzyme, prekallikrein, and nitric oxide in Kuwaiti patients with type 2 diabetes. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 28, n. 2, p. 240-246, 2015.

SHI, X. Y. et al. Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. **Endocrinology**, v. 149, p. 1829-1839, 2008.

SHIGENAGA, M. K. et al. Assays of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxo-2V-deoxyguanosine and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Methods Enzymol**, v. 234, p. 16-33, 1994.

SHIMIZU, I. et al. DNA damage response and metabolic disease. **Cell Metab**, v. 20, p. 967-977, 2014.

SHOELSON, S. E.; LEE, J. ; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, p. 1793-1801, 2006.

SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v. 132, p. 2169-2180, 2007.

SIMONE S. et al. Mechanism of oxidative DNA damage in diabetes: Tuberin inactivation and downregulation of DNA repair enzyme 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine-DNA glycosylase. **Diabetes**, v. 57, p. 2626-2636, 2008.

SINGH, N. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Exp Cell Res**, v. 175, p. 184-191, 1995.

SLIWINSKA, A. et al. In vitro effect of gliclazide on DNA damage and repair in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Chem Biol Interact**, v. 173, p. 159-165, 2008.

STANLEY, A. C. ; LACY, P. Pathways for cytokine secretion. **Physiology**, v. 25, p. 218-229, 2010.

STEPPAN, C. M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, p. 307-312, 2001.

STEVENS, R. J. et al. On behalf of the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. The UKPDS risk engine: A model for the risk of coronary heart disease in type II diabetes (UKPDS 56). **Clin Sci**, v. 101, p. 671-679, 2001.

TACHI, Y. et al. High concentration of glucose causes impairment of the function of the glutathione redox cycle in human vascular smooth muscle cells. **FEBS Lett**, v. 421, p. 19-22, 1998.

- TAHA, Z. H. Nitric oxide measurements in biological samples. **Talanta**, v. 61, p. 3-10, 2003.
- TESSARI, P.; CECCHET, D.; COSMA, A. Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with type 2 diabetes and nephropathy. **Diabetes**, v. 59, n. 9, p. 2152-2159, 2010.
- THOMAS, M. C. ; COOPER, M. E. ; ZIMMET, P. Changing epidemiology of type 2 diabetes mellitus and associated chronic kidney disease. **Nat Rev Nephrol**, 2015. doi: 10.1038/nrneph.2015.173.
- TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. **Mol Med**, v. 14, p. 222-231, 2008.
- TODA, N.; IMAMURA, T.; OKAMURA, T. Alteration of nitric oxide-mediated blood flow regulation in diabetes mellitus. **Pharmacol Ther**, v. 127, p. 189-209, 2010.
- TORBITZ, V. D. et al. In vitro oxidation of fibrinogen promotes functional alterations and formation of advanced oxidation protein products, an inflammation mediator. **Inflammation**, v. 28, p. 1201-1206, 2015.
- TORNOVSKY-BABEAY, S. et al. Type 2 diabetes and congenital hyperinsulinism cause DNA double-strand breaks and p53 activity in  $\beta$  cells. **Cell Metab**, v. 19, p. 109-121, 2014.
- TUTEJA, N. et al. Nitric oxide as a unique bioactive signaling Messenger in physiology and pathophysiology. **J Biomed Biotechnol**, v. 4, p. 227-237, 2004.
- UKPDS, United Kingdom Prospective Diabetes Study Group. Intensive bloodglucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. UKPDS 33. **Lancet**, v. 352, p. 837-53, 1998.
- VANDGHANOONI, S.; ESKANDANI, M. Comet assay: a method to evaluate genotoxicity of nano-drug delivery system. **Bioimpacts**, v. 1, p. 87-97, 2011.
- VALKO, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol Cell Biochem**, v. 2661, p. 37-56, 2004.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, p. 44-84, 2007.
- VAN DIJK, C. ; BERL, T. Pathogenesis of diabetic nephropathy. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 5, p. 237-248, 2004.
- VAN EXEL, E. V. et al. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, p. 1088-1092, 2002.
- WAN, Z. et al. Globular adiponectin induces a pro-inflammatory response in human astrocytic cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 446, p. 37-42, 2014.
- WANG, X. ; SIMPSON, E. R. ; BROWN, K. A. p53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis. **Cancer Res**, v. 75, n. 23, p. 5001-5007, 2015.

WATSON, D. J. et al. *Biologia Molecular do Gene*. 5 ed. Porto Alegre. Artmed, 2006.

WHO, World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. Geneva: **World Health Organization**, 2006.

WEIMANN, A. et al. Assays for urinary biomarkers of oxidatively damaged nucleic acids. **Free Radic Res**, v. 46, n. 4), p. 531-540, 2012.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney Int**, v. 49, p. 1304-1313, 1996.

WITKO-SARSAT, V. et al. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. **Kidney Int**, v. 64, p. 82-91, 2003.

WU, L. L. et al. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. **Clin Chim Acta**, v. 339, p. 1-9, 2004.

XU, G.W. et al. Study of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in diabetic nephropathy patients. **J Pharm Biomed Anal**, v. 36, p. 101-104, 2004.

YAMAGUCHI, Y. et al. Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. **Nitric Oxide**, v. 15, p. 380-386, 2006.

YANG, J. et al. Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. **Nutr Rev**, v. 68, p. 270-279, 2010.

YANG, H. et al. Oxidative stress and diabetes mellitus. **Clin Chem Lab Med**, v. 49, p. 1773-1782, 2011.

YEO, E.S. et al. Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and C-reactive protein (CRP) are positively associated with the risk of chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes. **Yonsei Med J**, v. 51, p. 519-525, 2010.

YIN, B. et al. Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA. **Free Radic Biol Med**, v. 18, p. 1023-1032, 1995.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 5 ed. Porto Alegre. Artmed, 2014.

ZHANG, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic Res Cardiol**, v. 103, n. 5, p. 398-406, 2008.

ZHAO, Y. ; VANHOUTTE, P. M. ; LEUNG, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **J Pharmacol Sci**, v. 129, p. 83-94, 2015.

ZOU, M. H. ; COHEN, R. ; ULLRICH, V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Endothelium**, v. 11, p. 89-97, 2004.

ZOZULINSKA, D.; WIERUSZ-WYSOCKA, B. Type 2 diabetes mellitus as inflammatory disease. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 74, p. 12-16, 2006.