

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA Δ -
AMINOLEVULINATO DESIDRATASE E
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gabriela Bonfanti

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA Δ -AMINOLEVULINATO
DESIDRATASE E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Gabriela Bonfanti

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Beatriz Moretto
Co-Orientadora: Profa. Dra. Thissiane de Lima Gonçalves

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA Δ -AMINOLEVULINATO
DESIDRÁTASE E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**

elaborada por
Gabriela Bonfanti

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Maria Beatriz Moretto, Dra.
(Presidente/Orientador)

Tatiana Emanuelli, Dra. (UFSM)

Paula Rossini Augusti, Dra. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 30 de setembro de 2011.

*Dedico esse trabalho aos meus queridos pais, pelo apoio,
compreensão e amor incondicional que me conduziram até aqui.*

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelas oportunidades e pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho. Pela serenidade e força interior que eu encontrei quando foi necessário.

A minha família, pais, irmã, avós e avôs, tios e tias, primos e afilhados amados, pelo amor, carinho, cuidado e saudades sentidas. Obrigada por estarem ao meu lado, mesmo que de longe, apoiando e incentivando minhas escolhas.

Em especial, a minha irmã Sarah, companheira de todos os dias, pelas alegrias nos dias bons e compreensão quando eles também se tornavam difíceis. Significa muito ter pelo menos um pedaço da família ao meu lado.

Ao meu namorado Herton, agradecimentos infinitos. Pela ausência consentida e pela paciência, convívio, carinho, compreensão e alegrias quando estamos juntos. Isso tudo além das tabelas de excel e assistência à informática 24 horas.

As minhas amigas de Ibirubá Angélica, Cristiane e Franciele, pelos momentos de descontração, jantinhas, festas, conversas, por todos esses anos de convivência e amizade. Em especial à Franciele por ter se tornado minha prof de inglês, tendo papel fundamental nesse trabalho.

As minhas amigas e colegas farmacêuticas Débora, Simone, Sílvia, Liz e Ana Paula. Pelos encontros de descontração que tornam minha semana mais leve ou simplesmente pelas ótimas lembranças nos corredores do CCS. Também as colegas Sabrina, Luciana e Simone Benovit que continuaram a estar ao meu lado nas aulas do curso de Mestrado.

As colegas do LAB 1207, Paula, Lariane e Priscila por terem me adotado e me proporcionarem momentos agradáveis durante o período de trabalho. Em especial à Ronise e a Leidiane que diretamente me ajudaram a construir esse trabalho, se tornando grandes amigas, além de ICs.

A minha amiga especial Karine de Bona. Nosso encontro parece cada vez mais predestinado, obrigada pelo apoio, companheirismo, pelo carinho, preocupação, ajuda, pelas conversas e conselhos. Te adoro muito!

Aos funcionários do DACT pela amizade, paciência e dedicação, por estarem sempre dispostos a ajudar e colaborar com a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós- Graduação em Farmacologia que de alguma maneira contribuíram para a construção do meu conhecimento científico. Em especial ao professor Carlos Mello, que não mediu esforços para o meu progresso, fazendo muito além de seu papel de coordenador.

As professoras, Tatiana Emanuelli e Paula Augusti que, além de participarem da minha graduação, agora aceitam o convite para compor a banca examinadora dessa dissertação. Também ao professor Ricardo Brandão, por ter aceito o convite.

A UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

A CAPES, pela bolsa concedida!

Aos funcionários do HUSM que foram de extrema importância na realização deste trabalho, pela disponibilidade e boa vontade.

A professora Thissiane, pelos 6 anos de convívio e aprendizado, que hoje se justificam por uma grande amizade. Obrigada pelas oportunidades e pelo apoio nas minhas escolhas. Por toda ajuda e orientação na elaboração desse trabalho.

A professora Maria Beatriz por ter acreditado em mim, oportunizando-me esse aprendizado, pela dedicação, paciência e orientação desse trabalho. Também pelo exemplo de determinação e integridade, sempre me incentivando e mostrando caminhos, dando apoio e tornando-se uma grande amiga.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA δ -AMINOLEVULINATO DESIDRATASE E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2

AUTORA: Gabriela Bonfanti

ORIENTADORA: Maria Beatriz Moretto

CO-ORIENTADORA: Thissiane de Lima Gonçalves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de setembro de 2011.

O Diabetes mellitus (DM) é uma desordem do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas caracterizado pela hiperglicemia, que no tipo 2 da doença (DM2) envolve a deficiência da produção e/ou ação da insulina. Indivíduos diabéticos exibem alto nível de estresse oxidativo devido à hiperglicemia crônica e persistente, que prejudica a atividade do sistema de defesa antioxidante e promove a geração de radicais livres. Esse nível de estresse oxidativo pode acarretar complicações renais, neurológicas, oculares e cardiovasculares, como a hipertensão arterial sistêmica (HAS). A enzima δ -Aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) é uma enzima sulfidrílica, que participa da síntese de compostos pirrólicos e vem sendo relacionada a diversas patologias, inclusive o DM. O objetivo deste estudo foi avaliar o status oxidativo de pacientes portadores de DM2 e sua relação com a atividade da enzima δ -ALA-D, perfil lipídico, distribuição de gordura corporal assim como o papel da HAS nos parâmetros analisados. Os resultados demonstraram uma diminuição da atividade da enzima δ -ALA-D assim como um aumento de seu índice de reativação nos pacientes (n=63) em relação aos controles (n=63). Observou-se também, no grupo DM2, um aumentado índice de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e uma menor quantidade de antioxidantes como vitamina C plasmática, grupamentos tióis protéicos (P-SH) em plasma e não protéicos (NP-SH) em eritrócitos, assim como uma redução na atividade da enzima catalase em eritrócitos. Os pacientes que além de DM2 apresentavam HAS (n=30) demonstraram uma diminuição mais pronunciada na atividade da δ -ALA-D do que os pacientes somente com DM2 (n=23) em relação a indivíduos saudáveis (n=30), juntamente com um aumentado índice de reativação. Também, os pacientes DM2/HAS apresentaram uma maior depleção de NP-SH. Correlações entre atividade da δ -ALA-D e seu índice de reativação com marcadores de estresse oxidativo, como NP-SH e grupamentos carbonílicos, bem como com o perfil lipídico dos pacientes também foram observadas. Ainda foram encontradas correlações entre o nível de TBARS e triglicérides, bem como entre vitamina C, glicose plasmática e HbA1c além de P-SH e índice de massa corporal. Portanto, os pacientes com DM2 apresentam alterações no perfil lipídico e na distribuição de gordura corporal, além de uma situação de estresse oxidativo que pode levar a alterações de moléculas importantes como a enzima δ -ALA-D. Tal enzima se mostrou efetiva em refletir o nível de estresse oxidativo dos pacientes podendo ser considerada um interessante biomarcador para avaliação de danos em processos metabólicos crônicos como o DM. Ainda a HAS parece ser um fator sinérgico à condição metabólica do paciente com DM2 podendo contribuir para o desenvolvimento de suas complicações.

Palavras-chave: Diabetes mellitus tipo 2. Hipertensão Arterial Sistêmica. δ -Aminolevulinato desidratase. Peroxidação lipídica. Perfil lipídico.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Professional Graduation Program in Pharmacology
Universidade Federal de Santa Maria

EVALUATION OF THE ACTIVITY OF ENZYME δ -AMINOLEVULINATE DEHYDRATASE AND PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

AUTHOR: Gabriela Bonfanti

ADVISER: Maria Beatriz Moretto

CO-ADVISER: Thissiane de Lima Gonçalves

Defense Place and Date: Santa Maria, September 30th, 2011.

Diabetes mellitus (DM) is a disorder of the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins characterized by hyperglycemia, which in type 2 diabetes (T2DM) involves the production deficiency and / or insulin action. Diabetic subjects exhibit high levels of oxidative stress due to chronic and persistent hyperglycemia, which impairs the activity of the antioxidant defense system and promotes the generation of free radicals. This level of oxidative stress can cause renal, neurological, ocular and cardiovascular complications, such as systemic arterial hypertension (HAS). The enzyme δ -aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D) is a sulfhydryl enzyme, which participates in the synthesis of pyrrole compounds and has been linked to several diseases, including DM. The aim of this study was to evaluate the oxidative status of patients with DM2 and its relationship with the activity of the enzyme δ -ALA-D, lipid profile, body fat distribution besides the role of hypertension in the parameters analyzed. The results showed a decreased activity of the enzyme δ -ALA-D as well as an increase in its reactivation index in patients (n = 63) compared to controls (n = 63). It was also observed, in the T2DM group, an increased level of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and a smaller amount of antioxidants as vitamin C plasma protein thiol groups (P-SH) in plasma and non-protein (NP-SH) in erythrocytes, as well as a reduction in activity of the enzyme catalase in erythrocytes. Patients who had DM2 plus hypertension (n = 30) showed a more pronounced decrease in the activity of δ -ALA-D than patients with type 2 diabetes only (n = 23) compared to healthy subjects (n = 30), along with an increased rate of reactivation. Also, patients DM2/HAS showed a greater depletion of NP-SH. Correlations among activity of δ -ALA-D and its reactivation index with oxidative stress markers, such as NP-SH and carbonyl groups, as well as lipid profile of patients were also observed. Further, correlations were found between the level of TBARS and triglycerides, as well as between vitamin C, plasma glucose and HbA1c as well as P-SH and body mass index. Therefore, patients with DM2 have changes in lipid profile and body fat distribution, and a situation of oxidative stress that can lead to changes in key molecules as the enzyme δ -ALA-D. This enzyme was effective in reflecting the level of oxidative stress of patients can be considered an interesting biomarker for assessment of damage in chronic metabolic processes such as DM. Furthermore, hypertension appears to be a synergistic factor to the metabolic condition of patients with type 2 diabetes, contributing to the development of its complications.

Key-words: Diabetes mellitus type 2. Systemic Arterial Hypertension. δ -aminolevulinatase dehydratase. Lipid peroxidation. Lipid profile.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Fatores de risco para o diabetes mellitus	19
Tabela 2 – Espécies Reativas de Oxigênio	27
Tabela 3 – Resumo das principais defesas antioxidantes.....	30

ARTIGO

Table 1 – Blood δ -ALA-D activity.....	44
Table 2 – Biochemical parameters correlations among DM2 patients.....	44

MANUSCRITO

Table 1 – Clinical characteristics of groups	61
Table 2 – Markers of oxidative stress in patients and healthy subjects	61
Table 3 – Associations between δ -ALA-D and biochemical parameters among patients.....	62

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Mecanismo de resistência à insulina.....	22
Figura 2 – Formação de radicais livres a partir do oxigênio molecular	28
Figura 3 – Etapas do processo de peroxidação lipídica	29
Figura 4 – Mecanismos enzimáticos antioxidantes	32
Figura 5 – Estrutura molecular da glutathiona.....	33
Figura 6 – Mecanismo de oxidação do ascorbato	34
Figura 7 – Síntese de porfobilinogênio catalisada pela δ -ALA-D	36
Figura 8 – D Estresse oxidativo induzido por hiperglicemia	39

MANUSCRITO

Figura 1 – Level of TBARS in plasma obtained from T2DM/HT patients, T2DM patients and control subjects	63
Figura 2 – A. Plasma NP-SH and erythrocyte P-SH of T2DM/HT and T2DM patients and control subjects.	
B. CAT activity of T2DM/HT and T2DM patients and control subjects ...	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Associação Americana de Diabetes
δ – ALA-D	Delta- Aminolevulinato Desidratase
δ – ALA	Ácido Aminolevulínico
AsC ⁻	Radical Semidesidroascorbato ou Ascorbila
AsCH ⁻	Ascorbato
AsCH ₂	Ácido Ascórbico
CAT	Catalase
CuZnSOD	Superóxido Dismutase Cobre-Zinco
DCCT	Diabetes Control and Complicaitons Trial
DCV	Doença Cardiovascular
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DTNB	5´5´-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitól
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutaciona Reduzida
GSH-Px	Glutaciona Peroxidase
GSH-Rd	Glutaciona Redutase
GSSG	Glutaciona Oxidada
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HOCl	Ácido Hipocloroso
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
IO ₂	Oxigênio Singlete
\dot{L}	Radical de Lipídeo
LOO [•]	Radical Peroxila de Lipídeo
LOOH	Hidroperóxido de Lipídeo
MnSOD	Superóxido Dismutase Manganês
IO ₂	Oxigênio Singlete
O ₂	Oxigênio Molecular
O ₂ ^{•-}	Ânion Radical Superóxido
OH [•]	Radical Hidroxila
PBG	Porfobilinogênio Monopirrólico
PBG-sintase	Porfobilinogênio Sintase
PSSG	Glutaciona ligada a proteínas
RL	Radical Livre
RO [•]	Radical Alcoxila
ROO [•]	Radical Peroxila
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
-SH	Grupamento Tiol
SOD	Superóxido Dismutase

TBARS
UKPDS

Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
United Kingdom Prospective Diabetes Study

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo à revista Journal of Diabetes and it´s Complications	83
ANEXO B – Produção bibliográfica	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Diabetes mellitus	18
3.1.1 Conceito	18
3.1.2 Epidemiologia e impacto na saúde pública	18
3.1.3 Classificação	19
3.1.4 Características gerais do DM2	20
3.2 Hipertensão	24
3.3 Estresse Oxidativo	26
3.3.1 Espécies Reativas de Oxigênio	27
3.3.2 Antioxidantes	30
3.3.2.1 Enzimáticos	31
3.3.2.2 Não – Enzimáticos	32
3.4 A enzima δ-aminolevulinato desidratase	35
3.5 Estresse oxidativo, Diabetes mellitus e Hipertensão	38
4 MÉTODOS E RESULTADOS	40
4.1 Artigo	41
4.2 Manuscrito	47
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	83

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação foi escrita sob a forma de artigo publicado e manuscrito submetido para publicação. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigo e manuscrito e representam na íntegra este estudo.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÃO, dispostos após o manuscrito contêm interpretações e comentários gerais referentes ao presente estudo e relacionados tanto ao artigo quanto ao manuscrito presentes nesse trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS são relacionadas às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO dessa dissertação.

O artigo e o manuscrito estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas na qual foram aceito e submetido para publicação, respectivamente.

Artigo publicado: Clinical Biochemistry

Artigo enviado para publicação: Journal of diabetes and it's complications

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Melitus (DM) é uma doença endócrina caracterizada por um grupo de desordens metabólicas, incluindo hiperglicemia e/ou elevação das concentrações de glicose sanguínea pós-prandial, devido a uma menor sensibilidade insulínica em seus tecidos alvos, caracterizando o DM tipo 2 (DM2), e/ou por reduzida secreção de insulina, caracterizando o DM tipo 1 (DM1) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005).

O DM2 caracteriza-se por defeitos na ação e secreção da insulina. Em geral ambos os efeitos estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, porém pode haver o predomínio de um deles (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). Pessoas adultas com mais de 40 anos são mais acometidas por esse tipo de diabetes, que pode vir acompanhado de obesidade, hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia e disfunção endotelial. Sintomas como sede e diurese excessiva, dores nas pernas, alterações visuais e obesidade são característicos de portadores de DM2 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005).

Atualmente, cerca de 220 milhões de pessoas são portadoras de DM e esse número continua em expansão, caracterizando uma epidemia de proporções mundiais (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010). No Brasil esse número já supera 7,6 milhões de pessoas (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2009).

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante endógena (TANIYAMA; GRIENGLING, 2003). Seu papel como determinante principal do início e progressão das complicações cardiovasculares associadas ao DM tem sido alvo de grande interesse, já que há indícios de que a capacidade antioxidante endógena esteja prejudicada nos indivíduos diabéticos, dificultando a remoção dos radicais livres (SANTINI et al., 1997).

A enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) contém grupamentos sulfidrilicos e está envolvida na formação do porfobilinogênio, um precursor do grupamento heme (JAFFE et al., 1995). Sua atividade é altamente sensível a situações associadas ao estresse oxidativo, como algumas patologias, podendo, portanto, ser considerada um marcador indireto de situações oxidantes. (BARBOSA

et al., 1998; FERNANDEZ-CUARTERO et al., 1999; FONTANELAS et al., 2002; GONÇALVES et al., 2005). Sabe-se que pacientes diabéticos apresentam diminuição na atividade da δ -ALA-D, porém, até o momento, não há na literatura dados sobre seu índice de reativação e o impacto da hipertensão na atividade enzimática em pacientes com DM2.

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o status oxidativo de pacientes portadores de DM2 e sua relação com a atividade da enzima δ -ALA-D, perfil lipídico, distribuição de gordura corporal assim como o papel da HAS nos parâmetros analisados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o status oxidativo dos pacientes portadores de DM2 e examinar a influência da HAS nos parâmetros analisados.

2.2 Objetivos específicos

Em amostras de pacientes com DM2 e pacientes com DM2 e HAS, avaliar:

- a atividade da enzima sulfidrílica δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), assim como seu índice de reativação, em sangue total;
- a peroxidação lipídica, através da quantificação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma;
- as atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos;
- os níveis de vitamina C no plasma e de grupamentos tióis protéicos no plasma e não-protéicos em eritrócitos;
- a formação de grupamentos carbonílicos no soro;
- parâmetros bioquímicos rotineiros (glicose, hemoglobina glicada, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicerídeos) e antropométricos (índice de massa corporal e circunferência abdominal);
- possíveis correlações entre as variáveis, a partir dos resultados obtidos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Diabetes mellitus

3.1.1 Conceito

O DM é uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia, que pode ser decorrente de defeitos da secreção e/ou ação da insulina endógena envolvendo processos específicos, por exemplo, destruição das células beta do pâncreas (produtoras de insulina), resistência à ação da insulina, distúrbios da secreção da insulina, entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Essa patologia freqüentemente está associada a complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos e, portanto, à reduzida expectativa de vida, significativa morbidade e diminuição da qualidade de vida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Ainda, a resistência à insulina e a hiperinsulinemia compensatória presentes no DM são fatores de predisposição a doenças cardiovasculares e outras complicações (LUNKES et al., 2006).

3.1.2 Epidemiologia e impacto na saúde pública

O número de pessoas com DM está aumentando devido ao crescimento e envelhecimento populacional, ao processo de urbanização e ao aumento da prevalência de obesidade e sedentarismo. Em 1985, estimava-se haver 30 milhões de adultos com DM no mundo; esse número cresceu para 135 milhões em 1995, atingindo 173 milhões em 2002, com projeção de chegar a 300 milhões em 2030. O Brasil, já no ano 2000, estava entre os 10 países com maior quantidade de pessoas portadoras de diabetes, com 4,6 milhões de pessoas, e esse número deve chegar a

11,3 milhões de pessoas no ano de 2030 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Mundialmente, os custos diretos para o atendimento ao DM variam de 2,5% a 15% dos gastos nacionais em saúde, dependendo da prevalência local de diabetes e da complexidade do tratamento disponível. Além disso, representa uma carga adicional à sociedade em decorrência da perda de produtividade no trabalho, aposentadoria precoce e mortalidade prematura (BARCELÓ et al, 2003).

Tabela 1 – Fatores de risco para o diabetes mellitus

Idade acima de 45 anos;
Obesidade (índice de massa corporal $>25\text{kg/m}^2$);
História familiar de diabetes em parentes de 1º grau;
Diabetes gestacional ou macrossomia prévia;
Hipertensão arterial sistêmica;
Colesterol HDL $<35\text{mg/dl}$ e/ou triglicerídeos $>250\text{mg/dl}$;
Alterações prévias da regulação da glicose.

Fonte: Gross et al, 2002

3.1.3 Classificação

A classificação do DM baseia-se na sua etiologia e inclui quatro classes clínicas segundo a Organização Mundial da Saúde e a Sociedade Brasileira de Diabetes:

DM tipo 1 (DM1) que atinge cerca de 10% casos e é resultado da destruição das células beta-pancreáticas com conseqüente deficiência de insulina. Na maioria dos casos, essa destruição de células beta é mediada por autoimunidade e seu desenvolvimento pode ocorrer de forma rapidamente progressiva, principalmente, em crianças e adolescentes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

DM tipo 2 (DM2) que acomete pelo menos 90% dos pacientes diabéticos e caracteriza-se por defeitos na ação e/ou secreção de insulina. Pode ocorrer em qualquer idade, mas é mais comum em pessoas com mais de 40 anos que

apresentam sobrepeso ou obesidade. Os pacientes não dependem de insulina exógena para viver, no entanto podem necessitar de tratamento com insulina para obter controle metabólico adequado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

DM gestacional que é caracterizado por qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). Ocorre em 1% a 14% de todas as gestações e relaciona-se com aumento de morbidade e mortalidade perinatais (LAWRENCE et al., 2008).

Já outros tipos específicos de diabetes menos freqüentes podem resultar de defeitos genéticos da função das células beta, defeitos genéticos da ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, efeito colateral de medicamentos, infecções e outras síndromes genéticas associadas ao diabetes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

3.1.4 Características gerais do DM2

O DM2 é um grupo heterogêneo de manifestações metabólicas de etiologias não completamente estabelecidas, que facilitam a instalação da resistência à insulina e hiperglicemia, e são influenciadas por fatores genéticos e adquiridos (SAAD; ZECCHIN, 2008).

O principal sinal regulador para liberação de insulina é a concentração plasmática de glicose, ou seja, quando existe muita glicose circulante ocorre uma sinalização para as células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas, que produzem e liberam insulina na circulação. Essa secreção de insulina pancreática suprime fisiologicamente a produção de glicose hepática, enquanto a glicose é utilizada nos tecidos periféricos como músculo e tecido adiposo. O fenômeno de insulino-resistência (Figura 1) refere-se a uma disfunção na resposta fisiológica à secreção de insulina, sendo que a sensibilidade celular é determinada tanto pelo número e afinidade dos receptores de insulina, quanto pelo estado funcional das vias de sinalização intracelulares (MIGUEL JR., 2007). Apesar de níveis normais ou aumentados de insulina, a produção de glicose hepática (glicogenólise e gliconeogênese) não é adequadamente suprimida, ou há uma redução da utilização

de glicose pelos tecidos periféricos, causando um aumento das concentrações plasmáticas de glicose. Em resposta a essa hiperglicemia crescente, ocorre um aumento da secreção de insulina pancreática, tornando o paciente ainda, hiperinsulinêmico. A hiperinsulinemia compensatória ajuda a manter a glicemia normal - às vezes, por décadas - antes do desenvolvimento do DM2 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998). A partir do momento em que as células beta do pâncreas não conseguem compensar a resistência à insulina através do aumento de secreção desse hormônio, a glicemia se eleva e o diagnóstico de diabetes pode ser feito. A funcionalidade das células beta estão reduzidas a cerca de 50% no momento do diagnóstico de DM2 (SHORR, 2000).

As causas específicas da disfunção das células beta em pacientes com DM2 podem incluir: 1) uma diminuição da massa celular; 2) aumento da apoptose/diminuição da regeneração; 3) resistência prolongada à insulina, levando à exaustão da célula beta; 4) dessensibilização da célula beta induzida por glicotoxicidade ou lipotoxicidade (KAHN, 2001).

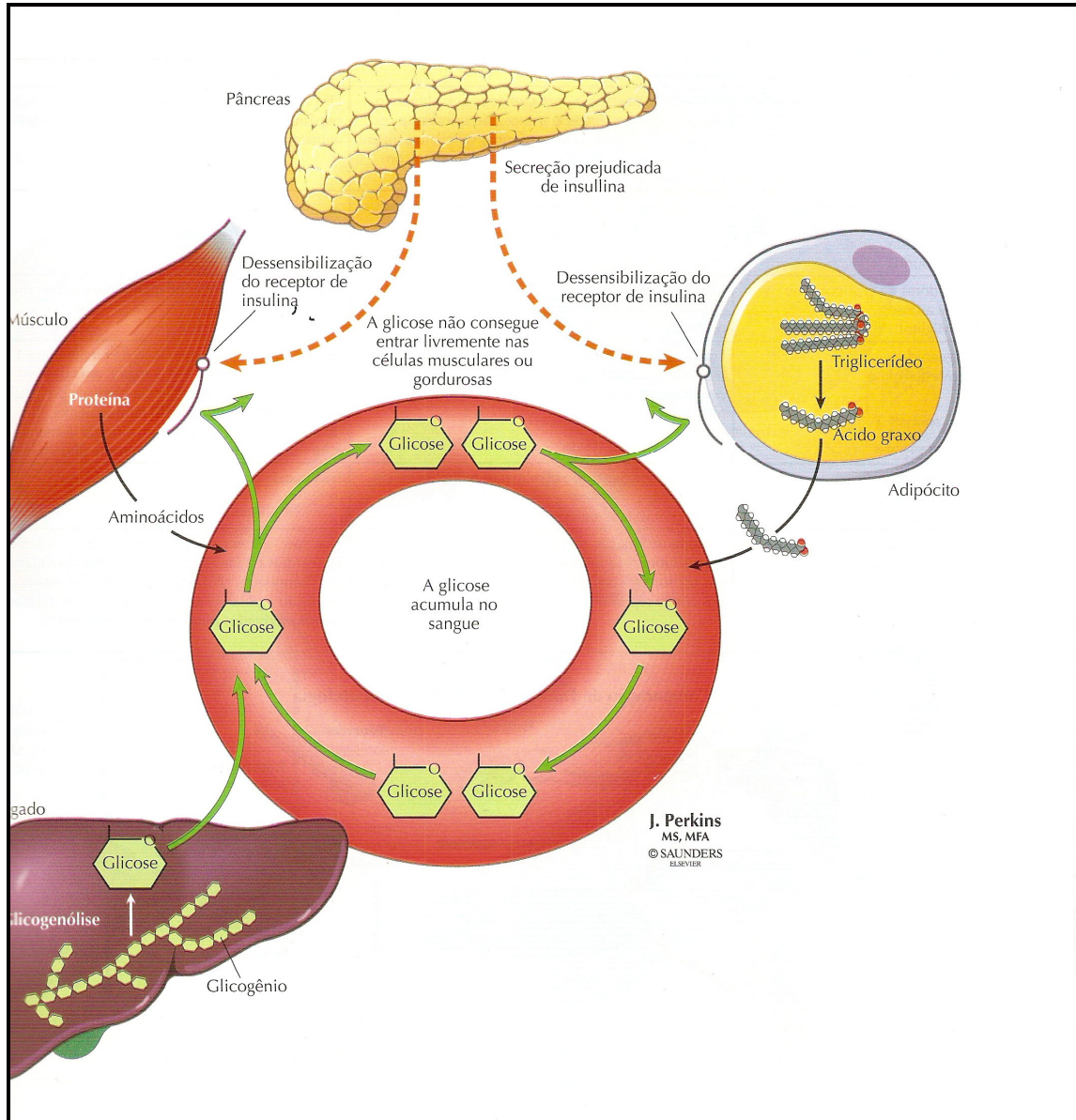


Figura 1 – Mecanismo de resistência à insulina.

Fonte: RAFFA; RAWLS; BEYZAROV, 2006.

Os pacientes permanecem hiperinsulinêmicos até atingirem estágios avançados da doença. Níveis plasmáticos reduzidos de insulina, decorrentes da disfunção das células beta pancreáticas, são encontrados em casos avançados, em pacientes com glicemia de jejum acima de 180 a 198 mg/dL (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998). Portanto, além da resistência à insulina é necessário um déficit de células beta pancreáticas, responsável pelo mecanismo compensatório, para o desenvolvimento do DM2 (KAHN, 2000; PORTE Jr, 1991). Assim, ambos os

fatores estão inter-relacionados e envolvidos na fisiopatologia da doença (GERICH, 2003).

O aumento da lipólise no tecido adiposo, característico da insulinoresistência, provoca um aumento da produção de ácidos graxos livres que pode levar à hiperlipidemia (HOWARD, 1999). A hiperinsulinemia pode, também, causar hipertensão nos pacientes com DM2 por diferentes mecanismos como: estímulo do sistema nervoso simpático causando vasoconstrição e um aumento no débito cardíaco; retenção de sódio/água nos túbulos renais distais, contribuindo para expansão de volume; e estímulo da proliferação da musculatura lisa da parede arterial (SUPLICY, 2000).

Os critérios diagnósticos laboratoriais do DM atualmente recomendados pela Associação Americana de Diabetes (ADA) e a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) são: (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1997; ENGELGAU et al., 1997; THE INTERNATIONAL EXPERT COMMITTEE, 2009)

Na presença dos sintomas de DM,

- glicemia casual acima de 200 mg/dL;
- glicemia de jejum igual ou superior a 126 mg/dL, confirmados por nova glicemia de jejum em dias diferentes;
- glicemia após Teste Oral de Tolerância à Glicose acima de 200 mg/dL;
- hemoglobina glicada (HbA1c) maior que 6,5% (atualmente recomendado pela SBD).

Depois de estabelecido o diagnóstico de diabetes, os pacientes iniciam diversas modalidades de tratamento para corrigir a hiperglicemia, procurando atingir o melhor controle metabólico possível, isto é, níveis de glicose em jejum <110mg/dl ou pós-prandial <140mg/dl ou HbA1c <6,5%.

A medida da HbA1c é o parâmetro de escolha para o controle glicêmico a longo prazo e reflete o grau de controle glicêmico dos 2 a 3 meses prévios. Com base em alguns estudos DCCT estabeleceu-se que os níveis de HbA1c acima de 7% estão associados a um risco maior de complicações crônicas (DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL (DCCT) RESEARCH GROUP, 1993; UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS), 1998).

A orientação nutricional e o estabelecimento de dietas em associação a mudanças no estilo de vida, incluindo atividade física, são consideradas terapias de primeira escolha para os pacientes com DM2 (FRANZ et al., 2003; KLEIN et al.,

2004; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008). Estudos prévios comprovaram que essa associação provoca melhora na sensibilidade à insulina, diminui os níveis plasmáticos de glicose além da circunferência abdominal e gordura visceral, melhorando o perfil metabólico com redução nos níveis de colesterol LDL e triglicerídeos e aumento dos níveis de colesterol HDL (KLEIN et al., 2004; SARTORELLI et al., 2004). Quando o paciente com DM2 não respondeu às medidas não medicamentosas, ou deixa de fazê-lo adequadamente, o uso de agentes antidiabéticos orais tem o objetivo de controlar a glicemia e promover a queda da HbA1c (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003).

3.2 Hipertensão

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizado por níveis elevados e sustentados de pressão arterial sistólica acima de 135mmHg e diastólica acima de 85mmHg. Associa-se freqüentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais, como por exemplo, insuficiência cardíaca, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, aneurisma de aorta, além de insuficiência renal crônica e retinopatia hipertensiva. Quando associada a outros fatores de risco como DM, obesidade, sedentarismo e tabagismo, os níveis pressóricos podem ser ainda mais elevados e as conseqüentes lesões de órgãos-alvo ainda mais graves (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

Os determinantes da pressão arterial são o débito cardíaco e a resistência periférica e qualquer alteração em um ou outro, ou em ambos, interfere na manutenção dos níveis pressóricos normais. Os mecanismos pressores e depressores interagem e se equilibram, regulando o calibre e a reatividade vascular, a distribuição de fluido dentro e fora dos vasos e o débito cardíaco. Quando o equilíbrio se rompe com predominância dos fatores pressores, ocorre a hipertensão primária (FOLKOW, 1982). Essa ruptura pode ser provocada e/ou acelerada pelos fatores ambientais, como excesso de sal na dieta e estímulos psicoemocionais,

entre outros. O aumento da resistência periférica é o fator mais importante na hipertensão. Os mecanismos que promovem a redução do calibre das arteríolas atuam basicamente na contração da musculatura que regula a luz do vaso ou na espessura da musculatura, ocupando maior ou menor parte do lúmen, ou em ambos. Admite-se, também, que a redução da luz ocorra não só pela hipertrofia da parede como também por um remodelamento, onde há redução dos diâmetros interno e externo, sem modificação da massa. Fatores funcionais, como a atividade simpática, são os determinantes da variação do tônus vascular. Além disso, diferentes hormônios pressores (angiotensina II, norepinefrina, vasopressina, insulina) contribuem para o estímulo ao crescimento da parede vascular, enquanto as substâncias vasodilatadoras têm efeito oposto, inibindo a proliferação celular.

Assim, a hipertensão é uma doença multifatorial e também pode ser considerada uma verdadeira síndrome naqueles casos em que vem acompanhada de obesidade, alteração no metabolismo lipídico e glicídico e resistência à insulina, quando geralmente existe hipertonia simpática produzindo elevações da frequência e do débito cardíaco (KRIEGER; IRIGOYEN, KRIEGER, 1999).

A prevalência mundial estimada é da ordem de 1 bilhão de indivíduos hipertensos, sendo que aproximadamente 7,1 milhões de óbitos por ano podem ser atribuídos à HAS (CHOBANIAN et al., 2003). Inquéritos populacionais em cidades brasileiras nos últimos 20 anos apontaram uma prevalência de HAS acima de 30%, sendo que no Rio Grande do Sul apenas 50,8% dos hipertensos são conscientes de sua condição; 40,5% deles estão sendo tratados e apenas 10,4% estão controlados (CESARINO et al., 2008; SERRANO et al., 2008; ROSÁRIO et al., 2009). A probabilidade de qualquer indivíduo apresentar hipertensão arterial ao longo de sua vida é de aproximadamente 90% (VASAN et al., 2002).

A mortalidade por doença cardiovascular (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2006). Em 2007 as doenças do aparelho circulatório foram responsáveis por 308.466 óbitos em nosso país além de ainda serem responsáveis por uma alta frequência de internações, ocasionando custos médicos e socioeconômicos elevados (BANCO MUNDIAL, 2005; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2006; MALTA et al., 2009).

Na maioria das vezes, a hipertensão arterial é diagnosticada ao se constatar valor pressórico elevado em uma consulta médica casual. O diagnóstico deve ser baseado, no mínimo, em duas medidas adequadas em pelo menos dois dias distintos (CORREA et al., 2005).

Tanto o DM quanto a HAS são fatores de risco independentes para DCVs, sendo que quando coexistem há um aumento de 2 a 8 vezes na morbidade por tais patologias e a mortalidade devido à tais eventos é duplicada. Sabe-se ainda, que a HAS é duas a três vezes mais freqüente em pacientes diabéticos e que a incidência em pacientes com DM2 chega a 30-50% (KAPLAN, 1994; MARKS; RASKIN, 1998; BEEVERS; Mac GREGOR, 2000). Nesses pacientes, o aumento da pressão arterial freqüentemente é parte da síndrome metabólica característica e pode aparecer antes ou estar relacionada às suas complicações, além de estar presente em 40-50% dos pacientes antes mesmo do diagnóstico de DM (CONTRERAS et al., 2000; MILAGRES, 2001; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2003).

A HAS aumenta o risco de complicações diabéticas macro e microvasculares, incluindo derrame, doença arterial coronariana, doença vascular periférica, retinopatia, nefropatia e possivelmente neuropatia (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2003).

3.3 Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo é um termo que denota um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e os respectivos sistemas de defesa de um organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Os agentes oxidantes englobam Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) e vários outros e podem ser gerados a partir de processos como, por exemplo, radiação ionizante, reações químicas ou enzimáticas (ABUJA; ALBERTINI, 2001). Tanto as EROs quanto as ERNs desempenham papéis fisiológicos importantes, tais como controle da pressão sanguínea, sinalização celular, apoptose entre outros (VASCONCELOS et al., 2007).

Entretanto, vários processos patológicos como doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, câncer, DM, HAS, obesidade, assim como o processo de envelhecimento rompem esse balanço entre a formação e neutralização de pró-

oxidantes ao aumentar a proporção de espécies reativas em relação às defesas antioxidantes disponíveis (GIULIANO; CERIELLO; PAOLISSO, 1996; PICONI; QUAGLIARO; CERIELLO, 2003; DALLE-DONNE et al., 2006).

3.3.1 Espécies reativas de oxigênio

As Espécies reativas de oxigênio (EROs) são compostos altamente reativos e que apresentam um tempo de vida incrivelmente reduzido. Apesar da breve existência, possuem certo instante de vida livre, no qual podem reagir com a matéria circundante e assim adquirir estabilidade (SIGNORINI; SIGNORINI, 1995).

As principais EROs distribuem-se em dois grupos, as radicalares: superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH^{\bullet}) peroxila (ROO^{\bullet}) e alcóxila (RO^{\bullet}); e as não-radicalares: oxigênio singlete (IO_2), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HOCl$) e são demonstradas na tabela 2 (GILLHAM; PAPACHRISTODOULOU; THOMAS, 1997; SIES, 1997). As espécies radicalares, conhecidas como Radicais Livres (RL) são moléculas ou fragmentos de moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados (SLATER, 1984) que, juntamente com as espécies não-radicalares, são altamente reativas à outras biomoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (POLI et al., 2004).

Tabela 2 – Espécies reativas de oxigênio

Radicalares		Não-radicalares	
Hidroxila	$\bullet OH$	Peroxinitrito	$ONOO^-$
Alcoxila	$L(R)O^{\bullet}$	Hipoclorito	$- OCl$
Hidroperoxila	HOO^{\bullet}	Hidroperóxido	$L(R)OOH$
Peroxila	$L(R)OO^{\bullet}$	Oxigênio singlete	$^1\Delta O_2$
Óxido Nítrico	NO^{\bullet}	Peróxido de Hidrogênio	H_2O_2
Superóxido	$O_2^{\bullet-}$		

Fonte: ABUJA; ALBERTINI, 2001

Essas espécies podem ser geradas de vários modos, sendo uma das mais importantes a formação de RL pela redução incompleta do oxigênio na cadeia respiratória mitocondrial (ABUJA; LABERTINI, 2001) (Figura 2).

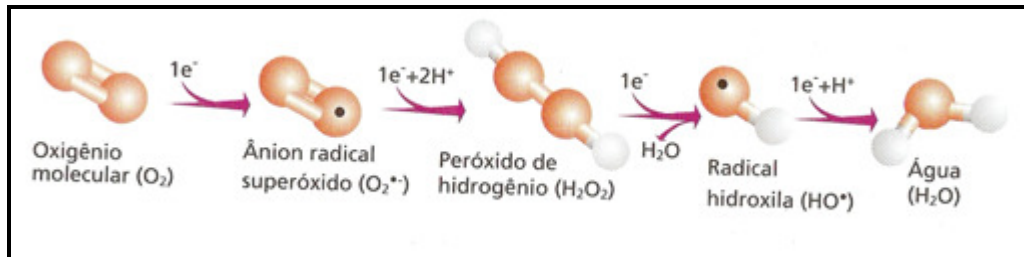


Figura 2 – Formação de radicais livres a partir do oxigênio molecular.

Fonte: AUGUSTO, 2006

Há uma variedade de biomarcadores que podem ser usados para indicar danos causados pelo estresse oxidativo às macromoléculas, como por exemplo, medidas da oxidação de lipídeos (lipoperoxidação) e de proteínas (carbonilação de proteínas) (HWAN; KIMB, 2007).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia iniciada por EROs, que inicia-se quando um radical reativo remove hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado produzindo um radical de lipídeo ($\bullet\text{L}$). Esse reage com oxigênio molecular, formando radical peroxila ($\text{LOO}\bullet$), o qual abstrai hidrogênio de outro lipídeo, formando então um hidroperóxido de lipídeo (LOOH) e um novo $\bullet\text{L}$ que dará seqüência à reação em cadeia, o que caracteriza a etapa de propagação. Finalizando, ocorre a neutralização dos radicais formados por ação de antioxidantes lipossolúveis (α -tocoferol, β -caroteno) ou pela reação de dois radicais lipídicos formando produtos não radicalares. O LOOH pode sofrer outras reações, a maioria degradativas, que produzem aldeídos e alcanos de diferentes pesos moleculares os quais são utilizados para monitorar os processos de peroxidação lipídica em condições fisiológicas (Figura 3) (AUGUSTO, 2006; VASCONCELOS, 2007).

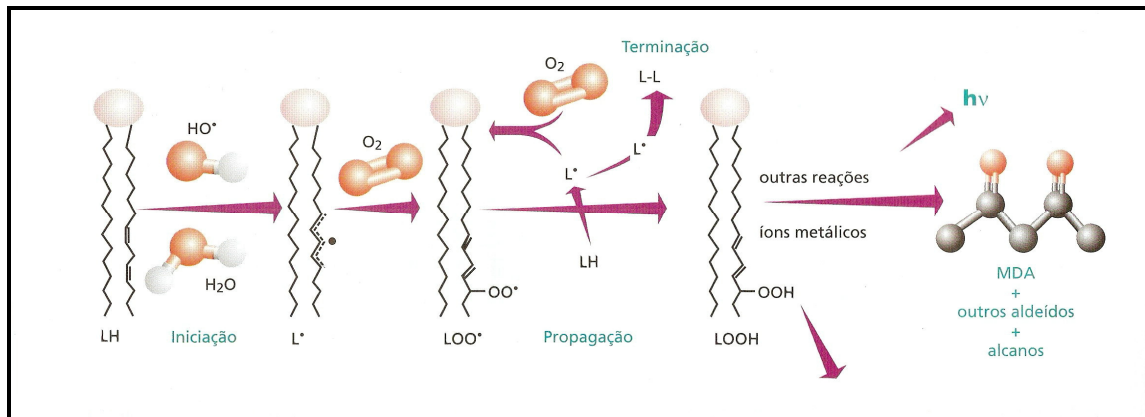


Figura 3 – Etapas do processo de peroxidação lipídica.

Fonte :AUGUSTO, 2006

Apesar de todos os componentes celulares serem suscetíveis à ação das EROs, a membrana celular, constituída principalmente de fosfolípeos, é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica (MELLO FILHO; HOFFMAN; MENEGHINI, 1984). A interação dos ácidos graxos insaturados das membranas biológicas com RLs pode levar a modificações e, conseqüentemente, perda nas características das membranas biológicas, tornando-as menos flexíveis, criando fendas iônicas que alteram sua permeabilidade e favorecem o trânsito indiscriminado de metabólitos e detritos celulares, provocando sua ruptura e lise (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000).

As proteínas também são alvos biológicos de modificações oxidativas e danos causados pelas EROs. A exposição das proteínas ao ataque dos RLs resulta em múltiplas alterações que incluem oxidação dos grupos de cadeias laterais de aminoácidos, fragmentação, modificação na hidrofobicidade e na conformação além da formação de novos grupos reativos, como os grupos carbonil, que podem levar à perda de estrutura ou atividade enzimática das proteínas (DEAN et al., 1997; HAWKINS; DAVIES, 2001). O processo de carbonilação envolve uma modificação protéica irreversível e não enzimática que parece ser comum durante a oxidação e, portanto, pode ser usado para medir a extensão do dano oxidativo (STADTMAN; BERLETT, 1991; STADTMAN; LEVINE, 2003; DALLE-DONNE et al., 2003).

3.3.2 Antioxidantes

De acordo com a definição clássica, antioxidantes são moléculas que, quando presente em baixas concentrações comparadas a de um substrato oxidável, retardam ou inibem significativamente a oxidação desse substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O corpo humano possui um complexo sistema de defesa antioxidante que inclui antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, resumidos na tabela 3. Alguns, como a glutathiona reduzida (GSH), a vitamina E as enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) atuam como detoxificadores do agente oxidante antes que ele cause lesão. Outros têm a função de reparar a lesão ocorrida, tais como ácido ascórbico, glutathiona redutase (GSH-Rd) e GSH-Px (HEBBEL, 1986; ROSS; MOLDEUS, 1991). Dessa forma, esses compostos protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (JORDÃO et al., 1998).

Tabela 3 – Resumo das principais defesas antioxidantes nos sistemas biológicos

SISTEMA	FUNÇÃO
Não Enzimáticos	
α-Tocoferol	Intercepta reações de lipoperoxidação
β-Caroteno	Quencher de O_2^-
Licopeno	Quencher de O_2^-
Ubiquinol 10	Sequestrador de radicais
Ácido Ascórbico	Inúmeras funções antioxidantes
Enzimáticos	
Superóxido dismutase	Reações de dismutação de O_2^-
Catalase	Catalisa a reação sobre H_2O_2
Glutathiona Peroxidase	Catalisa a reação sobre peróxidos
Enzimáticos Auxiliares	
Glutathiona-S-Tranferase	Conjugação e excreção de xenobióticos
Glutathiona Redutase	Colabora no ciclo da GSH

Fonte: SIES, 1993.

3.3.2.1 Enzimáticos

O sistema antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: SOD (E.C. 1.15.1.1), CAT (E.C. 1.11.1.6) e GSH-Px (E.C. 1.11.1.9), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização das EROs. (Figura 4)

A SOD é uma metaloenzima, abundante nas células aeróbias e uma das defesas antioxidantes mais efetivas (VALKO et al., 2006). As principais formas encontradas em humanos são a SOD-cobre-zinco (Cu/ZnSOD) e a SOD-manganês (MnSOD), ambas capazes de eliminar eficientemente o ânion radical superóxido, mas localizadas em diferentes compartimentos celulares. A forma Cu/ZnSOD está presente principalmente no citosol (dimérica), além de lisossomas, núcleo e espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria (tetramérica), enquanto que a MnSOD está localizada primariamente na mitocôndria (AUGUSTO, 2006; VASCONCELOS, 2007). Cabe à SOD catalisar a reação de dismutação do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2), conforme a reação (McCORD; FRIDOVICH, 1969):



O H_2O_2 é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como CAT ou GSH-Px (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

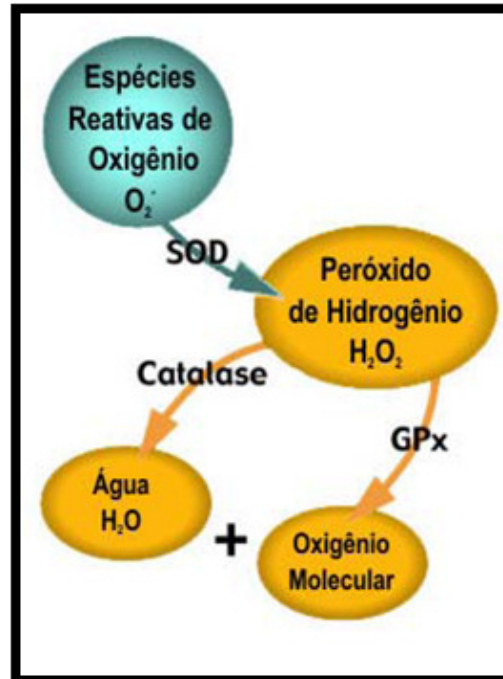


Figura 4 – Mecanismo enzimático antioxidantes.

Fonte: NORDBERG & ARNER, 2001.

A CAT é uma hemoproteína peroxossomal que catalisa a redução do H_2O_2 a água (H_2O), conforme a reação:



Está presente em maiores quantidades no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado além do interior nos peroxissomas, principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa que são fontes de peróxidos orgânicos (MAYES, 1990; VASCONCELOS, 2007).

3.3.2.2 Não-Enzimáticos

Os antioxidantes não-enzimáticos podem ser divididos em compostos produzidos *in vivo*, como a GSH, a ubiquinona e o ácido úrico, e em compostos

obtidos diretamente da dieta, como as vitaminas E, C, β -caroteno, dentre outros (VASCONCELOS, 2007).

Dentre os antioxidantes de baixo peso molecular, o principal é a GSH ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$, 307 g/mol) (Figura 5) além de ser o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (GALLEANO; PUNTARULO, 1995). No sangue, 99,5% da GSH se encontra no interior dos eritrócitos e, embora se apresente também nas formas oxidada (GSSG) e ligada às proteínas (PSSG), a forma reduzida (GSH) é a mais abundante (MILLS; LANG, 1996; NOZAL et al., 1997). Geralmente a capacidade antioxidante dos compostos tiólicos deve-se ao átomo de enxofre que pode facilmente acomodar a perda de elétron (KAROUI et al., 1996). De fato, a capacidade antioxidante da GSH é devida ao grupo sulfidríla do aminoácido cisteína presente em sua estrutura que se oxida facilmente e, portanto, atua como redutor celular (AUGUSTO, 2006).

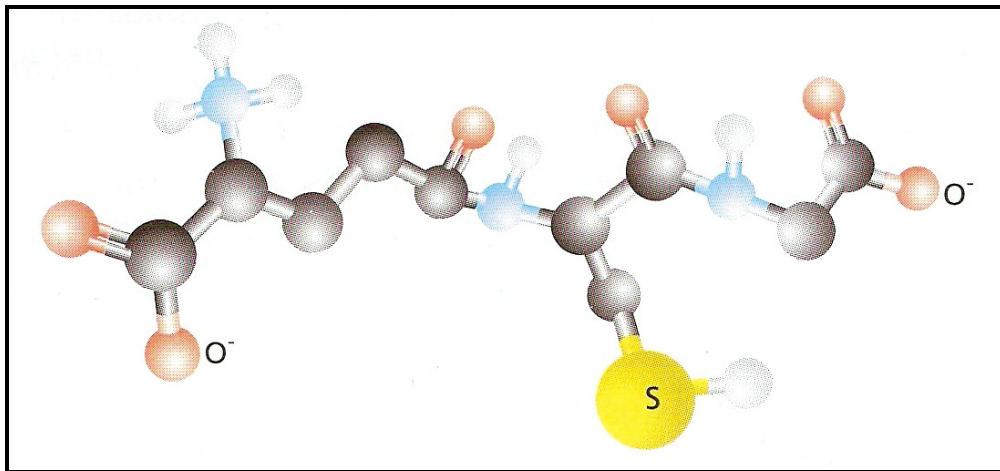


Figura 5 – Estrutura molecular da glutatona

Fonte: adaptado de AUGUSTO, 2006.

Sua atividade antioxidante se dá de duas formas: pela reação direta e não enzimática com radicais como o ânion radical superóxido, óxido nítrico ou radical hidroxila; ou como co-fator da enzima GSH-Px (SAEZ; BANNISTER; BANNISTER, 1990; VASCONCELOS, 2007). Assim, a GSH é rapidamente oxidada em condições nas quais ocorra um aumento na produção celular de radicais livres como, por exemplo, durante o metabolismo de drogas ou uma infecção (AUGUSTO, 2006).

A quantificação de grupamentos -SH através da sua reação com 5',5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) pode refletir a quantidade de GSH em sangue humano. Quando dosada no plasma, a quantidade de tióis protéicos pode indicar o status sulfidrílico e o estado geral das proteínas que contém -SH. Já a quantificação de grupos tióis não protéicos é mais específica e pode representar 90% do conteúdo de GSH no sangue (BOYNE; ELLMAN, 1972; LeBOEUF; HOESKSTRA, 1983; JACQUES-SILVA et al. 2001).

Dentre as vitaminas, a vitamina C (ácido ascórbico- AsCH_2) é um nutriente hidrossolúvel encontrado em frutas e vegetais e o principal antioxidante do plasma humano (MAYNE, 2003). É comumente encontrado em nosso organismo na forma de ascorbato (AsCH^-). Por ser um bom agente redutor, o AsCH^- pode ser oxidado pela maioria das EROs ao radical semidesidroascorbato ou ascorbila ($\text{AsC}^{\cdot-}$) que é pouco reativo e pode terminar as reações radicalares em cadeia, caracterizando sua atividade antioxidante (Figura 6). É efetivo contra o ânion radical superóxido, o peróxido de hidrogênio, o hipoclorito e os radicais hidroxila e peroxila (VASCONCELOS, 2007).

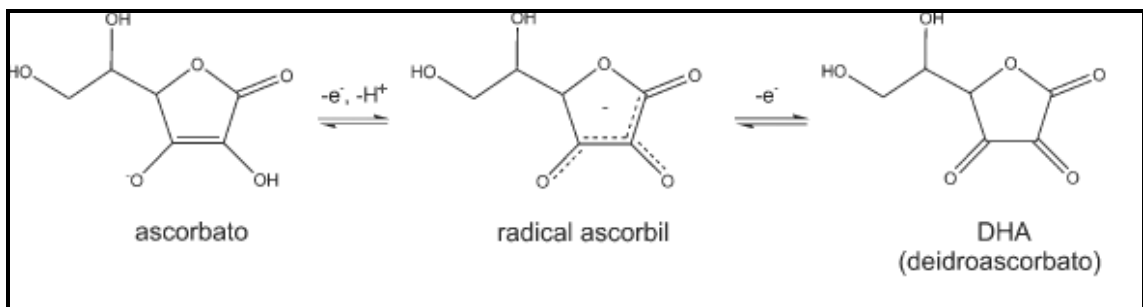


Figura 6 – Mecanismo oxidação do ascorbato.

Fonte: BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2006.

Por ser hidrossolúvel, o AsCH^- interage com as EROs na fase aquosa do plasma antes que eles possam agir oxidativamente sobre lipídios e lipoproteínas (NORDBERG; ARNER, 2001). Além disso, está envolvida na regeneração de vitamina E, que é lipossolúvel e tem a capacidade de impedir a propagação das reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas

(CHAN, 1993; TRABER, 1997). Assim, o efeito cooperativo entre as vitaminas C e E é efetivo na inibição da peroxidação lipídica e na proteção do DNA (GEY, 1998).

Portanto, em relação às defesas antioxidantes não-enzimáticas, intracelularmente, no meio aquoso, a vitamina C e a GSH agem em conjunto para proteger a célula do dano oxidativo, sendo que a medida desses e outros antioxidantes circulantes tem sido usada para avaliar a geração do estresse oxidativo em humanos (NORDBERG; ARNER, 2001; POLIDORI et al., 2001).

3.4 A enzima δ aminolevulinato desidratase

A enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) (E.C. 4.2.1.24), também conhecida como porfobilinogênio sintase (PBG-sintase) ou 5-aminolevulinato hidrolase foi isolada na década de 50 e é uma metaloenzima citoplasmática participante da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos (DRESEL; FALK, 1953; JAFFE et al., 1995).

δ -ALA-D tem sido isolada de várias fontes e suas propriedades extensamente caracterizadas. Todas realizam catálise covalente formando uma base de Schiff e a maioria, se não todas elas, requerem um metal bivalente para sua atividade (SHOOLINGIN-JORDAN, 2002).

Até o momento foram identificadas três isoenzimas diferentes em humanos, designadas δ -ALA-D 1-1, δ -ALA-D 1-2 e δ -ALA-D 2-2 (BATTISTUZZI et al., 1981; PETRUCCI; LEONARDI; BATTISTUZZI, 1982). A enzima altamente purificada de eritrócitos humanos é um homo-octâmero com peso molecular de 252 kDa (ANDERSON; DESNICK, 1979). Seu sítio catalítico parece ser composto por dois átomos de zinco, um resíduo de histidina, um resíduo de lisina, resíduos de aminoácido hidrofóbicos além de resíduos de cisteína, que são altamente reativos e devem estar reduzidos para que a enzima apresente atividade (CHEN & NEILANDS, 1976; TSUKAMOTO et al., 1979).

Sua função é catalisar a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido δ -aminolevulinico (δ -ALA) formando o porfobilinogênio monopirrólico (PBG). Nessa reação, pelo menos oito ligações são feitas ou quebradas, conforme a figura 7.

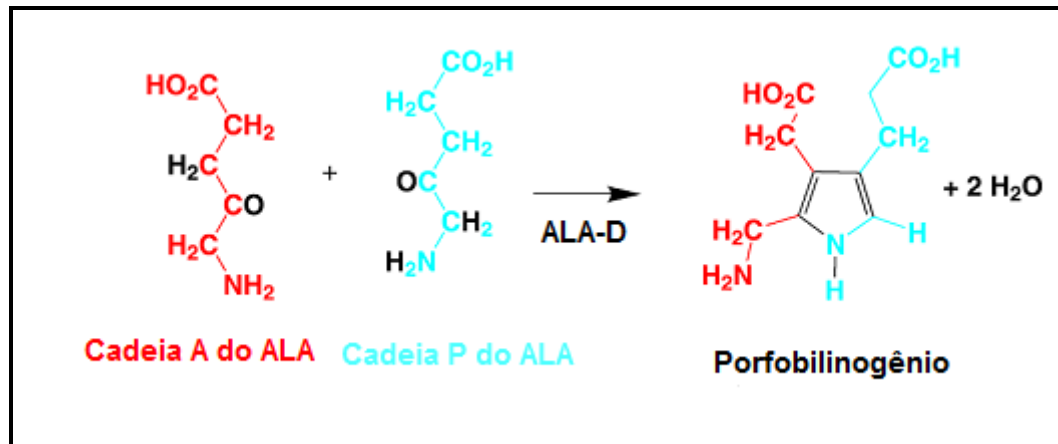


Figura 7 – Síntese de porfobilinôgênio catalisada pela δ -ALA – D.

Fonte: Adaptado de JAFFE, 2004.

Primeiramente, a cadeia lateral P (em azul), proveniente da primeira molécula de substrato ALA, forma a metade do PBG que contém a porção propionil e o nitrogênio pirrólico. Já a cadeia lateral A (em vermelho), originária da segunda molécula de ALA, forma a porção do PBG que contém o grupamento acetil, sendo que o nitrogênio do grupo amino dessa porção permanece livre (JAFFE, 2004).

O PBG é o precursor pirrólico utilizado por todos os sistemas vivos para a biossíntese de compostos tetrapirrólicos, incluindo os pigmentos clorofilas e corrinas, além do grupamento heme (JORDAN, 1991). Esse último faz parte da estrutura de proteínas que participam do transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), transporte de elétrons (citocromos a, b e c), biotransformação de xenobióticos (citocromo P450) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalases e peroxidases) (JAFFE, 1995).

A inibição da δ -ALA-D pode prejudicar a rota biossintética do heme, diminuindo sua produção e causando consequências patológicas (SASSA; FUJITA; KAPPAS, 1989; GOERING, 1993). Além disso, pode resultar no acúmulo do substrato δ -ALA no sangue que, em pH entre 7-8, sofre uma reação de enolização que por fim promove a formação de radicais superóxido e hidroxil (NEAL et al., 1997). Assim, tem sido mostrado que o δ -ALA tem a propensão de aumentar as EROs e a peroxidação de lipídeos podendo provocar consequências patológicas inespecíficas, uma vez que a produção exagerada de EROs pode atuar nos mais diferentes órgãos e compartimentos celulares (MONTEIRO et al., 1989; SASSA et

al., 1989; HERMES-LIMA et al., 1991). Um exemplo são os indivíduos portadores de porfirias ou intoxicados por chumbo, onde o acúmulo de δ -ALA e a geração *in situ* de EROs está sendo reconhecida como indutores das anormalidades típicas dessas patologias (HINDMARSH, 1986; MONTEIRO et al., 1989).

O índice de reativação enzimático é empregado como forma de reverter a atividade da enzima cujo decréscimo tenha sido consequência da oxidação da mesma (EMANUELLI et al., 1996). A atividade catalítica máxima pode ser obtida com a adição de ativadores tiólicos como ditioneitol (DTT). O DTT é um ditiol que possui a habilidade de proteger a δ -ALA-D de agentes oxidantes, mantendo os grupamentos sulfidrílicos da enzima no seu estado reduzido (BOLZAN et al., 2002). Assim, o índice de reativação dessa enzima tem sido usado em estudos humanos para avaliar o envolvimento dos grupos tiólicos na inibição da sua atividade e tem se mostrado uma ferramenta interessante para avaliação de estresse oxidativo (GONÇALVES et al., 2005; VALENTINI et al., 2007; GROTO, 2010).

Devido à presença de grupamentos sulfidrílica na sua constituição, sua atividade é altamente sensível a presença de elementos pró-oxidantes (BOLZAN et al., 2002). Tais elementos podem ser agentes bloqueadores de grupos tiólicos, como netilmaleimida, iodoacetato, paracloromercurobenzoato, monoiodoacetamida e DTNB (BATLLE et al., 1967; TIGIER; BATLLE; LOCASCIO, 1970; BARNARD et al., 1977) ou metais pesados que possuem afinidade por grupamentos sulfidrílicos, tais como chumbo, cobre e mercúrio (GIBSON et al., 1955; ROCHA et al., 1993; EMANUELLI et al., 1996). A oxidação desses resíduos sulfidrílicos leva à inativação da enzima com concomitante perda do zinco (TSUKAMOTO et al., 1979).

Por ser uma das enzimas mais sensíveis da rota biossintética do heme, vários estudos têm demonstrado que a inibição da δ -ALA-D pode estar associada com situações de estresse oxidativo agudo e crônico envolvido em condições patológicas como intoxicação por metais, hemodiálise, câncer, hipotireoidismo, diabetes, falha renal crônica, considerando, então, essa enzima um novo marcador de estresse oxidativo (SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2007; GONÇALVES et al., 2009; VALENTINI et al., 2007; MORO et al., 2010).

3.5 Estresse oxidativo, Diabetes Mellitus e Hipertensão

O aumento do estresse oxidativo é largamente aceito como participante no desenvolvimento e progressão do DM e suas complicações. O paciente com DM geralmente apresenta um aumento na produção de RLs e um decréscimo nas defesas antioxidantes sendo que a principal fonte de EROs é a hiperglicemia (BAYNES, 1991; CHANG et al. 1993; SAXENA et al., 1993; YOUNG et al. 1995; CERIELLO, 2000).

A hiperglicemia crônica ativa diversas vias metabólicas não usuais no organismo, como a via do sorbitol (ou da aldose redutase), a glicação não enzimática de proteínas, a autooxidação da glicose, a modificação da atividade da proteína quinase C, o metabolismo alterado de lipoproteínas e alterações associadas à citocinas. Todas elas geram EROs e, conseqüentemente estresse oxidativo (AHMAD et al. 2009) (Figura 8).

Vários estudos já observaram um aumento no nível de lipoperoxidação e carbonilação protéica em pacientes diabéticos, assim como uma diminuição nos níveis de antioxidantes como a vitamina C e a GSH. No entanto, resultados contraditórios são encontrados na literatura em relação às enzimas antioxidantes SOD e CAT (MAXWELL et al., 1997; TURK, 2002; PASAOGLU; SANCAK; BUKAN, 2004; SOLIMAN, 2008). Ainda, as complicações micro e macrovasculares, principais causas de mortalidade e morbidade entre os pacientes diabéticos, resultam de mecanismos similares muitas vezes ligados ao estresse oxidativo (AHMAD; ZHIHENG; KING, 2005).

Evidências indicam que uma disfunção endotelial também pode ser induzida pelo estresse oxidativo decorrente da hiperglicemia, levando à HAS (CERIELLO et al., 2002). De fato, marcadores de estresse oxidativo já foram encontrados elevados em pacientes hipertensos, apesar de os mecanismos responsáveis por esse aumento de EROs não estarem completamente esclarecidos (REDON et al., 2003). Tal fato demonstra, também, o importante papel patofisiológico do estresse oxidativo no desenvolvimento da hipertensão (TOUYZ, 2004).

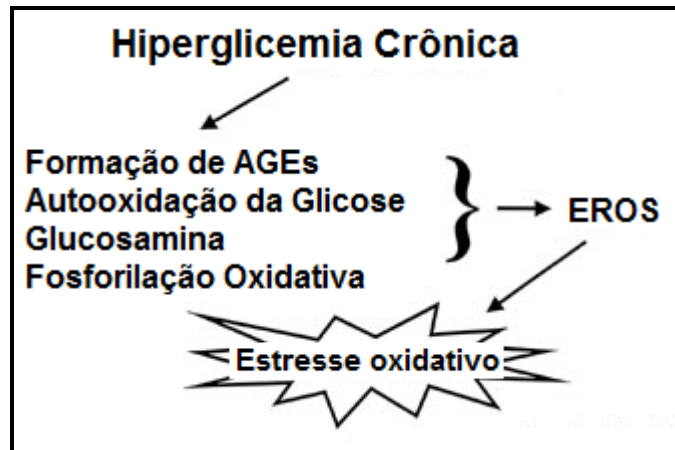


Figura 8 – Estresse oxidativo induzido por hiperglicemia.

Fonte: adaptado de ROBERTSON, et al.2003.

A inibição da atividade da δ -ALA-D já foi relatada em DM humano e experimental, no entanto o mecanismo subjacente ao comprometimento da atividade enzimática no diabetes não está completamente esclarecido. Estudos sugerem que a inibição pode ser causada tanto pela glicação do sítio ativo do resíduo de lisina envolvido na formação da base de Schiff com a primeira molécula do δ -ALA ou pela oxidação dos resíduos sulfidrílicos reduzidos essenciais da enzima, em decorrência do estresse oxidativo característico da doença (CABALLERO et al., 1998; FERNANDES-CUARTUERO et al., 1999).

4 MÉTODOS E RESULTADOS

Os métodos e resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um artigo e um manuscrito, os quais se encontram aqui organizados. O artigo encontra-se publicado na revista *Clinical Biochemistry* enquanto o manuscrito foi submetido para avaliação na revista *Journal of diabetes and it's complications*. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigo e manuscrito.

4.1 Artigo

δ -Aminolevulinate dehydratase activity in type 2 diabetic patients and its association with lipid profile and oxidative stress

artigo publicado na revista Clinical Biochemistry

Gabriela Bonfanti, Ronise B. Ceolin, Tiago Valcorte, Karine S. De Bona, Leidiane de Lucca, Thissiane L. Gonçalves , Maria Beatriz Moretto



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinbiochem

δ -Aminolevulinatase dehydratase activity in type 2 diabetic patients and its association with lipid profile and oxidative stress

Gabriela Bonfanti, Ronise B. Ceolin, Tiago Valcorte, Karine S. De Bona, Leidiane de Lucca, Thissiane L. Gonçalves*, Maria Beatriz Moretto

Postgraduate Program in Pharmacology, Department of Clinical and Toxicology Analysis, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 May 2011

Received in revised form 17 June 2011

Accepted 18 June 2011

Available online 6 July 2011

Keywords:

Type 2 diabetes mellitus

 δ -Aminolevulinatase dehydratase activity

Oxidative stress

Lipid profile

Body mass index

ABSTRACT

Objectives: To investigate the activity of δ -Aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D) and its possible relationship with oxidative status, lipid profile, body mass index (BMI) in type 2 diabetics (DM2) patients.

Design and methods: δ -ALA-D activity and reactivation index, as well as markers of oxidative stress and biochemical and anthropometrics parameters were determined in DM2 patients (n=63) and controls (n=63).

Results: There was a decreased δ -ALA-D activity and a higher reactivation index ($p<0.05$) in DM2 patients besides an elevated level of oxidative stress. Disturbances on lipid profile were related to the enzymatic activity and BMI also was correlated with oxidative level in DM2 patients ($p<0.05$).

Conclusion: There is an association between oxidative stress, abnormalities on lipid profile, distribution of body fat and δ -ALA-D activity inhibition as well as the enzyme is more oxidized in the DM2 suggesting that it would be a good biomarker for assessing prejudice in chronic metabolic processes.

© 2011 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Life style changes associated with modern civilization may contribute to the prevalence of type 2 diabetes mellitus (DM2) [1]. DM2 is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia and insufficiency in secretion and/or action of endogenous insulin [2] and disturbances of carbohydrate, lipid and protein metabolism. The number of people with DM2 and obesity (a major risk factor for the development of DM2) has reached epidemic proportions worldwide. Eighty percent of people with DM2 will die from complications of cardiovascular atherosclerosis resulting in an increased risk of death equivalent to 15 years of aging [3].

Oxidative stress induced by Reactive Oxygen Species (ROS), which is generated by hyperglycemia, is one of the major focuses of recent research related to diabetes mellitus [4]. There are many studies reporting increased levels of plasma TBARS and serum protein carbonyl content [5], platelets TBARS [6], decrease of GSH erythrocytic [7], reduction of plasma SH groups [8] and plasma vitamin C level [9] and decreased activities of SOD and catalase in red blood cells [10] in

DM2 patients. In these patients, chronic hyperglycemia produces multiple biochemical sequels and the oxidative stress could play a role in the onset and progression of the disease [11].

δ -Aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D) is a sulfhydryl-containing enzyme that is extremely sensitive to oxidizing agents [12] and plays a fundamental role in most live aerobic organisms by participating in heme biosynthesis. This enzyme catalyzes the asymmetric condensation of two molecules of 5-aminolevulinic acid (δ -ALA) to form the monopyrrole porphobilinogen (PBG). In subsequent steps, PBG is assembled into tetrapyrrole molecules, which constitute the prosthetic groups of physiologically significant proteins such as hemoglobin, cytochromes and enzymes such as catalase [13–15].

The decreased activity of δ -ALA-D already was related in some pathologies like cancer [16], chronic renal failure [17] and experimental and human diabetes [18]. Recent studies indicate that the molecular mechanism of δ -ALA-D impairment in diabetes may be caused either by glycation of the active site lysine residue involved in Schiff's base formation with the first δ -ALA-D molecule or oxidation of essential reduced cysteinyl residues of the enzyme [19–21]. Moreover, it is already known that DM is related with oxidative stress conditions, dyslipidemia [22], abdominal obesity and waist circumference – a surrogate measure of abdominal obesity – that has been found to be a strong predictor of mortality [23].

Therefore, the aim of this study was to investigate the involvement of δ -ALA-D inhibition and its possible relationship with enzymatic activity, oxidative status, lipid profile, body mass index (BMI) and waist circumference (WC) in DM2 patients.

* Corresponding author at: Thissiane de Lima Gonçalves, Av. Roraima, n° 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria-RS-Brasil, CEP: 97105-900, Prédio 26, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Fax: + 55 55 3220 8018.

E-mail addresses: gabriela_bonfanti@yahoo.com.br (G. Bonfanti), roniceolin@yahoo.com.br (R.B. Ceolin), tvalcorte@yahoo.com.br (T. Valcorte), ksbona@yahoo.com.br (K.S. De Bona), leidi_lucca@hotmail.com (L. de Lucca), thissianegoncalves@yahoo.com.br (T.L. Gonçalves), beatriz.moretto@yahoo.com.br (M.B. Moretto).

Materials and methods

Materials

5'-aminolevulinic acid (ALA), 2-thiobarbituric acid (TBA), dithiothreitol (DTT), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

Study population

Blood samples of 63 DM2 patients (26 males and 37 females; age 58.71 ± 9.35 years; HbA1c $7.21 \pm 1.60\%$ or 55 ± 12.22 mmol/mol, DM duration 7.42 ± 6.94 years, age at the onset DM 51.74 ± 10.64 years) attended in the University Hospital of Santa Maria (HUSM) were collected and 63 blood samples of healthy people (31 males and 32 females, age 55.98 ± 9.57) were collected as control. Exclusion criteria included alcoholism, smoking, pregnancy, insulin treatment, vitamin supplementation and cancer.

The present study was approved by the Human Ethical Committee of the Federal University of Santa Maria, protocol number 0199.0.243.000-09, and was in accordance with the Declaration of Helsinki (2000) of the World Medical Association. Informed, written consent was obtained from all study participants prior to their inclusion in the study.

Sample collection

Blood samples were collected during routine examinations by venous arm puncture in two evacuated tubes, one to obtain serum and another one containing anticoagulant heparin (4 mL) to obtain total blood, plasma and erythrocytes. The plasma and the serum were separated by centrifugation at 3000 rpm for 10 min. After removed the buffy coat, erythrocytes were washed three times with NaCl 0.9%. Samples were obtained from March to October 2010.

Biochemical and clinical parameters estimations

The diabetes duration was defined as the time from the first diagnosis of DM2 to the blood sampling. BMI was calculated by dividing weight by height squared (kg/m^2). WC was measured with a paper tape horizontally at the umbilicus in the standing position after normal expiration.

The biochemical parameters fasting blood glucose (FBG), total cholesterol (TC); HDL-cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG), and serum protein were measured in serum by standard methods with commercial kits (Katal – Minas Gerais/BR). LDL-cholesterol (LDL-C) was estimated indirectly using the Friedewald's formula [24]. Hemoglobin A1c (HbA1c) of patients was measured using a immunoturbidimetric automated assay (Dimension® RxL Max® Integrated Chemistry System – Siemens/USA) in HUSM. These data were compared with the current recommended targets by the Standards of Medical Care in Diabetes – 2011 of American Diabetes Association (ADA) [25]: FBG < 5.5 mmol/L, HbA1c < 7% (53 mmol/mol) and the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) [26]: TC < 5.2 mmol/L, HDL-C > 1.0 mmol/L, LDL-C < 2.6 mmol/L and TG < 1.7 mmol/L.

δ -ALA-D activity

δ -ALA-D activity was assayed in whole blood by the method of Berlin and Schaller [27]. The enzyme reaction was started after 10 min of blood's pre-incubation. The reaction was started by adding δ -aminolevulinic acid (δ -ALA) to a final concentration of 4 mM in a phosphate buffered solution, the incubation was carried out for 1 h at 37 °C and the reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of $6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for the Ehrlich-porphobilinogen salt. The results were expressed in nmol PBC/mL blood/h.

In order to determine whether δ -ALA-D activity alterations could be related to enzyme oxidation by free radicals, a set of tubes was assayed using a similar incubation medium, except that 2 mM of dithiothreitol (DTT), a reducing agent, was added to obtain the reactivation index. The reactivation index was estimated using: $A - B/A * 100$ where A = absorbance of assay with DTT and B = absorbance of assay without DTT.

Thiobarbituric acid reactive substances

Lipid peroxidation was estimated in plasma by measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to the method of Lapenna et al. [28], using 1% phosphoric acid and 0.6% thiobarbituric acid (TBA). The reaction product was measured spectrophotometrically at 532 nm and the results were expressed in nmol TBARS/mL plasma.

Protein thiol groups

Protein thiol groups (P-SH) were assayed in plasma by the method of Boyne and Ellman [29] modified by Jacques-Silva et al. [30], which consist of the reduction of 5,5'-dithio(bis-nitrobenzoic) acid (DTNB) in pH 7.0, measured at 412 nm. The results were expressed in nmol P-SH/mL plasma.

Non protein thiol groups

Erythrocyte non protein thiol groups (NP-SH) were determined as described by Boyne and Ellman [29] modified by Jacques-Silva et al. [30]. The colorimetric assay was carried out in 1 M phosphate buffer, pH 7.4. The NP-SH level was measured at 412 nm and expressed in nmol NP-SH/mL erythrocytes.

Vitamin C

Plasma vitamin C (VIT C) was estimated as described by Galley et al. [31] with some modifications by Jacques-Silva et al. [30]. In this technique, dehydroascorbic acid is mixed with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and, when treated with sulfuric acid, forms an orange red compound measured at 520 nm and expressed in $\mu\text{g vit C}/\text{mL plasma}$.

Catalase enzyme activity

Catalase (CAT) enzyme activity in erythrocytes was measured by the method of Aebi [32] by monitoring the initial rate of disappearance of hydrogen peroxide at 240 nm in a spectrophotometer. CAT activity was expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mL erythrocytes}/\text{min}$.

Superoxide dismutase enzyme activity

Superoxide dismutase (SOD) activity in erythrocytes was performed according to the method of Misra and Fridovich [33], by recording the increase in absorbance at 480 nm following the auto oxidation of adrenaline inhibited by SOD. The enzyme amount required to produce 50% inhibition at 25 °C was defined as one unit of enzyme activity. The SOD activity was expressed in U/mL erythrocytes.

Serum protein carbonyl

The carbonylation of serum proteins was determined using the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) method, according the procedure of Levine et al. [34]. Carbonyl content was calculated by using molar extinction coefficient ($21 \times 10^3 \text{ l}/\text{mol cm}$) and results were expressed in nmol/mg protein.

Statistical analysis

Since data had no variance homogeneity, a non-parametrical Mann–Whitney *U*-test was performed to check significant differences between the groups and the results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Correlation test were realized in the patient's group by the Spearman correlation. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant for all analyses.

Results

General characteristics of the study population

We did not observe difference in mean age between controls and diabetics. As expected, FBG was higher in diabetic patients than control group (8.71 ± 3.28 vs. 4.98 ± 0.82 mmol/L), even as BMI (29.45 ± 5.63 vs. 26.98 ± 5.68 kg/m²) and WC (106.0 ± 14.49 vs. 90.81 ± 17.21 cm). Besides, TG level of patients was increased (1.89 ± 0.82 vs. 1.57 ± 1.06 mmol/L) while TC, LDL-C, HDL-C and serum protein level there weren't any significant difference from the values in healthy subjects.

δ-Aminolevulinatase dehydratase

The results about the δ-ALA-D activity and reactivation index are depicted in Table 1.

Oxidative status

Plasma TBARS levels in DM2 patients (6.98 ± 2.27 nmol/mL) were significantly higher than those found in the control group (6.03 ± 1.75 nmol/mL). We didn't observe significant difference between the groups in serum protein carbonyl.

The concentrations of P-SH (254.6 ± 75.99 nmol/mL plasma) and NP-SH (646.0 ± 125.8 nmol/ml erythrocyte) were reduced significantly in DM2 patients when compared with controls (322.6 ± 113.3 nmol/mL plasma and 731.0 ± 212.4 nmol/ml erythrocyte) as well as plasma VIT C (16.59 ± 8.43 vs. 20.03 ± 1.49). However, the antioxidant enzyme CAT was lower in diabetic patients (22.61 ± 3.08 vs. 26.86 ± 3.79 μmol H₂O₂/mL erythrocyte/min) while SOD activity wasn't different between the groups studied.

Biochemical and oxidative parameters correlations

We observed a positive correlation between δ-ALA-D s/dtt and erythrocyte NP-SH ($p = 0.0098$); δ-ALA-D c/dtt and age at onset of DM ($p = 0.0052$) in addition to TBARS and TG ($p = 0.0049$). Likewise, a negative correlation was found between δ-ALA-D s/dtt and TG ($p = 0.024$) and also TC ($p = 0.012$); δ-ALA-D c/dtt and TC ($p = 0.007$); VIT C and FBG ($p = 0.0304$) and also HbA1c ($p = 0.013$) in addition to plasma P-SH and BMI ($p = 0.021$) (Table 2).

Discussion

The FBG and TG besides WC and BMI were higher in DM2 than control subjects. These results are in agreement with serum lipid and lipoprotein abnormalities and accumulating visceral fat presents in DM [35,36].

Corroborating with our results, Fernandez-Cuartero et al. [18] also reported that δ-ALA-D activity is inhibited in DM (Table 2). The δ-ALA-D activity inhibition can result in aminolevulinic acid (ALA) accumulation that, under physiological relevant conditions, can have pro-oxidant effects [37]. In line with this, the reduction of δ-ALA-D activity was related to glycemic levels and to concentration of glycated hemoglobin

Table 1
Blood δ-ALA-D activity.

	CONT n = 63	DM2 n = 63
δ-ALA-D	4.15 ± 2.38	2.88 ± 1.42
δ-ALA-D + DTT	5.82 ± 2.62	4.64 ± 2.08
Reactivation index (%)	29.83 ± 16.74	38.31 ± 18.13

Data are expressed as mean ± SD.
Units – δ-ALA-D: nmol PBG/mL blood/h.

Table 2
Biochemical parameters correlations among DM2 patients.

	FBG	HbA1c	BMI	TC	TG	LDL-C	HDL-C	NP-SH	Age at onset of DM
FBG	-	r = 0.7556 p < 0.0001	ns	r = 0.2809 p = 0.0378	ns	ns	ns	ns	ns
TC	ns	ns	ns	-	r = 0.4145 p = 0.0015	ns	ns	ns	ns
TG	ns	ns	ns	ns	-	r = -0.3238 p = 0.0149	ns	ns	ns
LDL-C	ns	ns	ns	ns	ns	-	r = -0.3336 p = 0.0098	ns	ns
δ-Ala s/DTT	ns	ns	ns	r = -0.3355 p = 0.012	r = -0.3030 p = 0.024	ns	ns	r = 0.3336 p = 0.0098	ns
δ-Ala c/DTT	ns	ns	ns	r = -0.3563 p = 0.007	ns	ns	ns	r = 0.3590 p = 0.0052	ns
TBARS	ns	ns	ns	ns	r = 0.3706 p = 0.0049	ns	r = -0.2735 p = 0.041	ns	ns
VIT C	r = -0.2775 p = 0.0304	r = -0.3295 p = 0.013	ns	ns	ns	ns	r = 0.4308 p = 0.0009	ns	ns
P-SH	ns	ns	r = -0.3595 p = 0.021	ns	ns	ns	ns	ns	ns

FBG: fasting blood glucose; BMI: body mass index; TC: total cholesterol; LDL-C: LDL-cholesterol; HDL-C: HDL-cholesterol; NP-SH: erythrocyte non protein thiol groups; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; VIT C: vitamin C; P-SH: plasma protein thiol groups; ns: not significant.

in diabetics [18]. Concerning, Souza et al. [38] showed that inhibition of δ -ALA-D in non-compensated DM may be a consequence of glycation in the lysine residue from the active site of δ -ALA-D. Although, *in vitro* studies showed that a necessary non-physiological concentration of glucose inhibits δ -ALA-D [39], suggesting that the inhibition of enzyme activity could be secondary to glucose-induced oxidative stress in DM2.

The most important result of this study was the increase of reactivation index, indicating that the enzyme is more oxidized in the DM2 group. In line with this, other authors demonstrated that the reactivation index of δ -ALA-D activity is a good tool to evaluate oxidative stress in a chronic exposure process [40–42]. This finding is an interesting feature, since hyperglycemic conditions affect the oxidative status in DM [43]. In this context, we observed a depletion of GSH level in patients, represented by plasma P-SH and erythrocyte NP-SH levels, and it could be related to the reduction of δ -ALA-D activity since the oxidation of essential enzyme -SH groups seems to play a significant role in δ -ALA-D inhibition. In fact, erythrocyte NP-SH was negatively correlated with δ -ALA-D activity in DM2 patients.

Beside it's increasing, TBARS was positively correlated with TG and negatively correlated with HDL-C among DM2 patients. Previous studies have reported a positive correlation between TG and TBARS and, also, associated lipid abnormalities with lipid peroxidation in these patients [22,44–46]. Also, we found a negative correlation between plasma P-SH and BMI indicating that obese subjects could have increased levels of oxidative stress [47]. Certainly, the abdominal obesity has been seen to be a strong predictor of mortality [48].

Long-time oxidative stress caused by chronic hyperglycemia can consume antioxidant enzymes, like CAT, as was already observed in this study and others with similar sample [10,49]. Further, another reason for decreased blood CAT activity might be the acatalasemia mutations and the damaging effect of hydrogen peroxide on catalase protein [50]. Also, since δ -ALA-D is involved in the synthesis of tetrapyrrole molecules, which constitute the prosthetic groups of CAT [13], its reduced activity, may reduce the synthesis of this antioxidant enzyme.

Interestingly, to the best of our knowledge, for the first time we observed that δ -ALA-D activity showed to be correlated with lipid profile indicating that disturbances in lipoproteins metabolism may affect the enzymatic activity. Beyond that, δ -ALA-D activity was associated with age at the onset of DM suggesting that age may influence the enzymatic activity. However, more studies are needed to clarify this point.

Conclusion

In conclusion, the results of the present investigation showed a significantly relationship among oxidative stress parameters, body fat distribution, lipid disturbances and δ -ALA-D activity inhibition. In particular, we observed a significant effect of DM on the extent of δ -ALA-D activity reactivation. These findings reveal that this enzyme can be a good biomarker for assessing oxidative stress and evidences impairs in chronic metabolic processes.

Acknowledgments

The authors thank Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Katal – Minas Gerais/BR, Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) and the Federal University of Santa Maria (UFSM), RS, Brazil, for support in this study. Also, we thank all the volunteers who participated in this study.

References

- [1] Kedziora-Kornatowska K, Szewczyk-Golec K, Kozakiewicz M, Pawluk H, Czuczajko J, Kornatowski T, et al. Melatonin improves oxidative stress parameters measured in the blood of elderly type 2 diabetic patients. *J Pineal Res* 2009;46:333–7.
- [2] Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:24–38.
- [3] Booth GL, Kapral MK, Fung K, Tu JV. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study. *Lancet* 2006;368:29–36.
- [4] Pfaffly JR. Review on diabetic complications. *Free Radic Biol Med* 2001;77:222.
- [5] Narasimhan S, Gokulakrishnan K, Sampathkumar R, Farooq S, Ravikumar R, Mohan V, et al. Oxidative stress is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in subjects with and without type 2 diabetes. *Clin Biochem* 2010;43:815–21.
- [6] de Bona KS, Bellé LP, Sari MH, Thomé G, Schetinger MR, Morsch VM, et al. Syzygium cumini extract decrease adenosine deaminase, 5' nucleotidase activities and oxidative damage in platelets of diabetic patients. *Cell Physiol Biochem* 2010;26:729–38.
- [7] Srivatsan R, Das S, Gadde R, Manoj-Kumar K, Taduri S, Rao N, et al. Antioxidants and lipid peroxidation status in diabetic patients with and without complications. *Arch Iran Med* 2009;12:121–7.
- [8] Pandey KB, Mishra N, Rizvi SI. Protein Biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. *Clin Biochem* 2010;43:508–11.
- [9] Skalska A, Gasowski J, Grodzicki T. Antioxidants modify the relationship between endothelin-1 level and glucose metabolism – associated parameters. *Metabolism* 2009;58:1229–33.
- [10] Ramakrishna V, Jaikhan R. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetol* 2008;45:41–6.
- [11] Giugliano D, Cerriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19:257–67.
- [12] Farina M, Brandão R, Lara FS, Soares FA, Souza DO, Rocha JBT. Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of δ -aminolevulinic dehydratase from mouse liver, kidney and brain. *Toxicol Lett* 2003;139:55–66.
- [13] Jaffe EK, Ali S, Mitchell LW, Taylor KM, Volin M, Markham GD. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of Escherichia coli porphobilinogen synthase. *Biochemistry* 1995;34:244–51.
- [14] Sassa S, Fujita H, Kappas A. Genetic and chemical influences on the heme biosynthesis. In: Kotyk A, editor. *Highlights of modern biochemistry*. V.S.P. Intl. Science; 1989. p. 329–38.
- [15] Sassa S. ALA-D porphyria. *Semin Liver Dis* 1998;18:95–101.
- [16] Gonçalves TL, Erthal F, Corte CLD, Muller LG, Piovezan CM, Nogueira CW, et al. Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. *Clin Biochem* 2005;38:1071–5.
- [17] Fontanelas A, Navarro S, Morán-Jiménez MJ, Sánchez-Fruutooso AI, Vegh I, Barrientos A, et al. Erythrocyte aminolevulinic dehydratase activity as a lead marker in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 2002;40:43–50.
- [18] Fernandez-Cuartero B, Rebollar JL, Batle A, Enriquez de Salamanca R. Delta aminolevulinic dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:479–88.
- [19] Folmer V, Soares JC, Rocha JBT. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:1279–85.
- [20] Folmer V, Soares JCM, Gabriel D, Rocha JBT. A high-fat diet inhibits δ -aminolevulinic dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). *J Nutr* 2003;133:2165–70.
- [21] Caballero FA, Gerez EN, Polo CF, Vazquez ES, Batle AM. Reducing sugars trigger δ -aminolevulinic dehydratase inactivation: evidence of *in vitro* aspirin prevention. *Gen Pharmacol* 1998;31:441–5.
- [22] Kaviarasan K, Arjunan MM, Pugalendi KV. Lipid Profile, oxidant-antioxidant status and glycoprotein components in hyperlipidemic patients with/without diabetes. *Clin Chim Acta* 2005;362:49–56.
- [23] Biggaard J, Tjonneland A, Thomsen BL, Overvad K, Heitmann BL, Sorensen TI. Waist circumference, BMI, smoking and mortality in middle-aged men and women. *Obes Res* 2003;11:895–903.
- [24] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of concentration of low-density lipoprotein in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
- [25] [Ada-http://care.diabetesjournals.org/content/34/Supplement_1/S11.full#sec-64April 27, 2011](http://care.diabetesjournals.org/content/34/Supplement_1/S11.full#sec-64April 27, 2011) [accessed].
- [26] Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults – final report/NHLI publication; 2002. p. 5215.
- [27] Berlin K, Schaller H. European standardized method for the determination of δ -aminolevulinic dehydratase activity in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1974;12:389–90.
- [28] Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Giambardino MA, Cucurullo F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radic Biol Med* 2001;31:331–5.
- [29] Boyne AF, Ellman GL. A methodology for analysis of tissue sulphydryl components. *Anal Biochem* 1972;46:639–53.
- [30] Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EMM, Rocha JBT. Diphenyl diselenides and ascorbic acid changes deposition of selenium and brain of mice. *Pharmacol Toxicol* 2001;88:119–25.
- [31] Galley R, Davies MJ, Webster NR. Ascorbil radical formation in patients with sepsis: effects of ascorbate loading. *Free Radic Biol Med* 1996;20:139–43.
- [32] Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 1984;105:121–6.
- [33] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170–5.
- [34] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464–78.
- [35] Kannel WB, Castelli WP, Gordon T. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study. *Ann Intern Med* 1979;90:85–91.

- [36] Friedl KE. Waist circumference threshold values for type 2 diabetes risk. *J Diabetes Sci Technol* 2009;3:761–9.
- [37] Pereira B, Curi R, Kokobun E, Bechara EJ. 5-aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 1992;72:226–30.
- [38] Souza JB, Rocha JBT, Nogueira CW, Borges VC, Kaizer RR, Dressler VL, et al. Delta aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. *Clin Biochem* 2007;40:321–5.
- [39] Soares JCM, Gabriel D, Folmer V, Augusti GR, Rocha JBT. High concentrations of glucose can activate or inhibit human erythrocyte aminolevulinic acid dehydratase *in vitro* depending on exposure time. *Am J Biochem Biotechnol* 2006;2:180–5.
- [40] Grotto D, Valentini J, Filion M, Passos CJ, Garcia SC, Mergler D, et al. Barbosa, Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. *Sci Total Environ* 2010;408:806–11.
- [41] Folmer V, Santos FW, Savengnago L, Britto VB, Nogueira CW, Rocha JBT. High sucrose consumption potentiates the sub-acute cadmium effect on Na⁺/K⁺-ATPase but not on delta-aminolevulinic acid dehydratase in mice. *Toxicol Lett* 2004;153:333–41.
- [42] Valentini J, Grotto D, Paniz C, Rohers M, Burg G, Garcia SC. The influence of the hemodialysis time treatment under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. *Biomed Pharmacother* 2008;62:378–82.
- [43] Pavlatou MG, Papastamataki M, Apostolou F, Papassotiropoulos I, Tentolouris N. FORT and FORD: two simple and rapid assays in the evaluation of oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2009;58:1657–62.
- [44] Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Toma C, Knoebel P, et al. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 1995;98:469–75.
- [45] McKenney JM. Pharmacotherapy of dyslipidemia. *Cardiovasc Drugs Ther* 2001;15:413–22.
- [46] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233–41.
- [47] Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752–61.
- [48] Poullet MC, Després JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C, Tremblay A, et al. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol* 1994;73:460–8.
- [49] Tarnai I, Csordás M, Sükei E, Shemirani AH, Káplár M, Góth L. Effect of C111T polymorphism in exon 9 of the catalase gene on blood catalase activity in different types of diabetes mellitus. *Free Radic Res* 2007;41:806–11.
- [50] Góth L, Eaton JW. Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet* 2000;355:1820–1.

4.2 Manuscrito

Hypertension strengthens δ -ALA-D activity inhibition and increases it reactivation index in type 2 diabetic patients

Manuscrito submetido para publicação na revista Journal of diabetes and it's complications

Gabriela Bonfanti, Ronise B. Ceolin, Karine S. De Bona, Leidiane de Lucca, Maria Beatriz Moretto, Thissiane L. Gonçalves*

Hypertension strengthens δ -ALA-D activity inhibition and increases its reactivation index in type 2 diabetic patients

Gabriela Bonfanti, Ronise B. Ceolin, Karine S. De Bona, Leidiane de Lucca, Maria Beatriz Moretto, Thissiane L. Gonçalves*

Postgraduate Program in Pharmacology
Department of Clinical and Toxicology Analysis
Center of Healthy Sciences
Federal University of Santa Maria (UFSM)
97105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

***Corresponding author:**

Thissiane de Lima Gonçalves

thissianegoncalves@yahoo.com.br

Av. Roraima, nº 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria-RS-Brasil.

CEP: 97105-900

Prédio 26 – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Fax: +55 55 3220 8018.

Abstract

Aims: To assess the effect of hypertension on δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) activity of type 2 diabetic patients (T2DM).

Methods: δ -ALA-D activity and reactivation index, as well as markers of oxidative stress, biochemical and anthropometrics parameters were determined in T2DM (n=23), type 2 diabetic patients with hypertension (T2DM/HT) (n=30) and controls (n=30).

Results: T2DM/HT presented a greater inhibition of δ -ALA-D activity, a higher reactivation index ($p < 0.05$) and a greater depletion of plasma protein thiol groups (P-SH) when compared to T2DM.

Conclusions: These results point out that there is a possible interference of hypertension on the mechanism of the δ -ALA-D activity suggesting that this condition aggravated the oxidative stress of diabetes mellitus.

Key words: type 2 diabetes mellitus, hypertension, δ -Aminolevulinate dehydratase activity and reactivation index, oxidative stress.

1. Introduction

Diabetes has followed the spread of modern lifestyle and it can be linked to an increase overweight and sedentary population (Vats, Kumar, Kothari, Mital & Ramachandran, 2003). According to the International Diabetes Federation (2008), the disease now affects 246 million people worldwide and is expected to reach about 380 million by 2025. The prevalence of obesity and hypertension increase the risk for cardiovascular disease (CVD), the main cause of morbidity and mortality in type 2 diabetes mellitus (Masuo, 2010; Reddy & Bhatia, 2011). Hypertension (HT) can affect specific organs, leading to target organ damage, including eyes, blood vessels, brain, kidneys and heart (Milan, Caserta, Avenatti, Abram & Veglio, 2010).

Epidemiological evidence demonstrates that 60% of patients with diabetes are hypertensive, and up to 20% of subjects with hypertension are diabetics (Contreras, Rivera, Vasquez, De la Parte & Velasco, 2000). Also, the prevalence rates of obesity continue to increase and the associated complications of diabetes will come to pose a greater strain on patients, society, and national health care systems (Palmer, 2011). In addition, various biochemical disorders associated with vascular complications, such as oxidative stress, frequently co-exist with diabetes mellitus (Kannel & McGee, 1979).

In fact, the assessment of antioxidant activities and products of lipid peroxidation in hypertensive subjects indicates an excessive amount of oxygen reactive species (ROS) and a reduction of antioxidant mechanism activity in blood and in several other cellular systems (McIntyre, Bohr & Dominiczak, 1999). Another consequence of the production of ROS is the instability of critical macromolecules, which may have important consequences on cellular functions. Among this, the enzyme δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) catalyzes the synthesis of tetrapyrrolic compounds such as bilins and hemes, being essential for aerobic organisms (Shemi, 1976; Tsukamoto, Yoshinaga & Sano, 1979). A decreased activity of δ -ALA-D had been related in pathologies like cancer (Gonçalves et al. 2009), chronic renal failure (Fontanellas et al., 2002), and diabetes mellitus (Fernandez-Cuartero, Rebollar, Batle & Salamanca, 1999), showing that this enzyme is extremely sensitive to situations associated with oxidative stress. Furthermore, enzyme inhibition can lead to 5-aminolevulinic acid (ALA) accumulation in blood,

which in turn can intensify the oxidative stress by generating reactive species (Rocha et al., 2003).

There is no consensus on either the cause of oxidative stress in diabetes or the role played by oxidative stress in diabetic complications (Opara et al., 1999), like hypertension. Therefore, the aim of this study was to estimate probable alterations on δ -ALA-D activity and reactivation index in T2DM and T2DM/HT along with their clinical features.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

5'-aminolevulinic acid (δ -ALA), 2-thiobarbituric acid (TBA), dithiothreitol (DTT), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.2 Study population

The study population consisted of patients attended in University Hospital of Santa Maria (HUSM) as well as healthy volunteers. Exclusion criteria included alcoholism, smoking, pregnancy, insulin treatment, vitamin supplementation and cancer. The sample was divided into three groups. The control group consisted of 30 healthy individuals, 13 male and 17 female, aged 56.13 ± 1.74 years. The T2DM group consisted of 23 patients with diagnosed type 2 diabetes mellitus, 10 male and 13 female, aged 56.41 ± 1.96 years while the T2DM/HT group was formed by 30 patients, 13 male and 17 female, aged 60.80 ± 1.55 years, with type 2 diabetes mellitus plus hypertension. The characteristics of patients and control subjects are summarized in Table 1.

All subjects gave written informed consent to participate of this study. The protocol was approved by the Human Ethical Committee of the Federal University of Santa Maria (0199.0.243.000-09) and was in accordance with the Declaration of Helsinki (2000) of the World Medical Association.

2.3 Sample collection

Blood samples were collected during routine examinations by venous arm puncture in two evacuated tubes, one to obtain serum and another one containing anticoagulant heparin (4mL) to obtain total blood, plasma and erythrocytes.

2.4 Biochemical analysis

The diabetes duration was defined as the time from the first diagnosis of T2DM to the blood sampling. Body mass index (BMI) was calculated by dividing weight by height squared (kg/m^2). WC (cm) was measured with a paper tape horizontally at the umbilicus in the standing position after normal expiration.

The biochemical parameters fasting blood glucose (FBG), total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG), and serum protein were measured in serum by standard methods with commercial kits (Gold Analisa– Minas Gerais/BR). LDL-cholesterol (LDL-C) was estimated indirectly using the Friedewald's formula (Friedewald, Levy & Fredrickson, 1972). Hemoglobin A1c (HbA1c) of patients was measured using a standard automated assay in HUSM. These data were compared with the current recommended targets by the Standards of Medical Care in Diabetes - 2011 of American Diabetes Association (ADA): $\text{FBG} < 99 \text{ mg/dL}$, $\text{HbA1c} < 7\%$ and the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP), 2002: $\text{TC} < 200 \text{ mg/dL}$, $\text{HDL-C} > 40 \text{ mg/dL}$, $\text{LDL-C} < 129 \text{ mg/dL}$ and $\text{TG} < 150 \text{ mg/dL}$.

δ -ALA-D activity was assayed in whole blood by the method of Berlin and Schaller (1974) by measuring the rate of porphobilinogen formation in 1h at 37° . The enzyme reaction was started after 10 min of pre-incubation of blood by adding δ -ALA to a final concentration of 4mM in a phosphate buffered solution. The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of $6,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for the Ehrlich-porphobilinogen salt. In order to determine whether δ -ALA-D activity alterations caused on T2DM and T2DM/HT patients could be related to enzyme oxidation by free radicals, a set of tubes was assayed using a similar incubation medium, except that 2 mM of dithiothreitol (DTT), a reducing agent, was added to obtain the reactivation index. The Reactivation Index

was estimated using: $A-B/A \times 100$, where A=absorbance of assay with DTT and B=absorbance of assay without DTT.

Lipid peroxidation was estimated in plasma by measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to the method of Lappena, Ciofani, Pierdomenico, Giamberardino & Cuccurullo (2001) using 1% phosphoric acid and 0.6% thiobarbituric acid (TBA). Also in plasma, vitamin C (VIT C) was estimated by its reaction with 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) as described by Galley, Davies, & Webster (1996) with some modifications by Jacques-Silva, Nogueira, Broch, Flores & Rocha (2001).

In erythrocytes, catalase (CAT) enzyme activity was determined by the method of Aebi (1984) with measure the rate of H_2O_2 decomposition.

The content of serum protein carbonyl (PC) was determined according to the procedure of Levine et al. (1990) by the reaction of serum PC with 2,4-dinitrophenylhydrazine.

Further, plasma protein thiol groups (P-SH) and erythrocyte non protein thiol groups (NP-SH) were determined as described by Boyne & Ellman (1972) modified by Jacques-Silva, Nogueira, Broch, Flores & Rocha (2001), which consist in the reduction of 5,5'-dithio(bis-nitrobenzoic) acid (DTNB) in 0.3 M phosphate buffer pH 7.0, measured by 412 nm.

2.5 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test or Student's t-test when appropriate. The results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Correlation test were realized in the patient's group by the Pearson correlation. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant for all analyses.

3. Results

3.1 General characteristics of the study population

The clinical characteristics of patients and control subjects are described in Table 1. Considering all diabetic patients involved in this study, 43,39% had HT. As

expected, FBG was higher in T2DM and T2DM/HT than control group. While BMI of T2DM presented increased, WC was higher in T2DM/HT when compared with control group. Moreover, TG level of both patients group was increased.

3.2 Markers of oxidative stress

Blood δ -ALA-D activity, in the absence or presence of DTT, was significantly lower in T2DM and T2DM/HT than control group. In addition, the reactivation index was higher in diabetic/hypertensive group than in diabetic patients and healthy subjects, suggesting a significant additional effect of HT on the extent of δ -ALA-D reactivation (Table 2).

Moreover, δ -ALA-D was correlated with some biochemical parameters as are depicted in Table 3. The most interesting features are that the reactivation index of ALA-D activity was negatively associated with -SH groups while was positively correlated with PC on both patients groups.

Plasma TBARS levels in T2DM and T2DM/HT were significantly higher than those found in the control group (Figure 1). The concentrations of P-SH (plasma) were reduced significantly in T2DM and T2DM/HT whereas the level of NP-SH (erythrocytes) only was reduced in T2DM/HT when compared to controls (Figure 2A). Beyond that, the antioxidant enzyme CAT was lower even in T2DM than T2DM/HT (Figure 2B).

Furthermore, we found that VIT C was positively correlated with HDL ($r = 0.4788$, $p=0.0099$) and negatively correlated with LDL ($r = -0.4075$, $p=0.0314$) among T2DM/HT. Also, FBG presented negatively associated with TBARS levels ($r = 0.4661$, $p=0.0288$) while P-SH was correlated negatively with PC ($r = -0.5805$, $p=0.0058$) in T2DM group.

4. Discussion

T2DM/HT and T2DM had lower δ -ALA-D activity when compared with controls and this difference was more pronounced in T2DM/HT. A reduced activity of δ -ALA-D already was demonstrated in human and experimental diabetes (Fernandez-Cuartero, Rebollar, Batle & Salamanca, 1999; Souza et al., 2007) and

the reactivation index of δ -ALA-D activity has been considered an interesting tool to estimate oxidative stress in chronic diseases (Gonçalves et al. 2009; Valentini et al. 2008). In fact, reactivation index presented increase only in T2DM/HT when compared with controls (Table 2). This condition may indicate that the enzyme was more oxidized in T2DM/HT suggesting that hypertension is an aggravating factor on oxidative status of diabetic patients. In accordance with this, TBARS was also significantly increased in both patients groups (Figure 1) besides of being positively correlated with FBG. The chronic hyperglycemia presents in T2DM activates several metabolic pathways, such as the sorbitol pathway, nonenzymatic protein glycosylation, glucose autooxidation and lipoprotein-altered metabolism, all of which generate ROS (Mendoza-Nuñez, 2011) and consequently lipid peroxidation.

We also observed an important reduction of antioxidant mechanisms (Figure 2). Erythrocyte NP-SH level only was decreased in T2DM/HT, and since the concentration of glutathione in erythrocyte is so much greater than in plasma (Beutler & Gelbart, 1985; Lash & Jones, 1985) it may be more effective to show a possible additional role of hypertension on oxidative stress in DM. In the same way, PC was negatively associated with plasma P-SH groups and VIT C presented a positive correlation with HDL-C along with a negative correlation with LDL-C. Vitamin C and HDL appear to have a synergistic effect on oxidative reactions, either protecting LDL-C from oxidation or scavenging ROS (Ziouzenkova et al., 2002; Jurek, Turyna, Kubit, Klein, 2006) as well as –SH groups, that play an important role preserving the correct structure of proteins (Piwowski, Knapik-Kordecka & Warwas, 2007).

Moreover, δ -ALA-D activity presented associations with several biochemical and oxidative stress parameters. δ -ALA-D activity and its reactivation index was associated with –SH groups and serum PC showing the efficiency of this enzyme to assess oxidative stress. The activity and reactivation index of this enzyme may be related to an overproduction of free radicals (Gonçalves et al. 2009), whose formation was confirmed by depletion on SH-groups and protein oxidation.

In relation to the HT, its prevalence in T2DM has been reported to be about 50% or roughly twice higher than that of the general adult population (Jarret, 1989; Haffner et al., 1994). It's possible to consider that the disturbances in carbohydrate, lipid and protein metabolism presented in diabetic patients lead to an overload of the cardiovascular system (Tan et al., 2001).

We concluded that hypertension enhance the level of oxidative stress, identifiable by a depletion of P-SH, a greater reduction of δ -ALA-D activity and an increased reactivation index of this enzyme in T2DM/HT. Taking into account all these effects, it's possible to suggest that hypertension might interfere in δ -ALA-D activity and oxidative status of patients, contributing for the diabetic complications and highlighting a need to maximize our efforts in early diabetes prevention.

Acknowledgements

The authors thanks to Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Analisa - Minas Gerais/BR, Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) and the Federal University of Santa Maria (UFSM), RS, Brazil, for support in this study. Also, we thank all the volunteers who participated in this study.

Conflict of interest

The authors of this study declare that there is no conflict of interest.

References

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- American Association of Diabetes (ADA) (2011)-
http://care.diabetesjournals.org/content/34/Supplement_1/S11.full#sec-64 – accessed 6 June 2011.
- Berlin, A. & Schaller, K.H. (1974). European standardized method for the determination of δ -aminolevulinic dehydratase activity in blood. *Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie*, 12, 389-390.
- Beutler, E. & Gelbart, T. (1985) Plasma glutathione in health and in patients with malignant disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 105, 581-584.
- Boyne, A.F. & Ellman, G.L. (1972). A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Analytical Biochemistry*, 46, 639-653.
- Contreras, F., Rivera, M., Vasquez, J., De la Parte, M.A., Velasco, M. (2000). Diabetes and hypertension physiopathology and therapeutics. *Journal of Human Hypertension*, 14, S26–S31.
- Fernández-Cuartero, B., Rebollar, J.L., Batlle, A., Salamanca R.E. (1999). Delta aminolevulinato dehydratase (δ -ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31, 479-488.
- Fontanellas, A., Navarro, S., Morán-Jiménez, M.J., Sánchez-Fructuoso, A.I., Vegh, I., Barrientos, A., Salamanca, R.E. (2002). Erythrocyte aminolevulinic dehydratase activity as a lead marker in patients with chronic renal failure. *American Journal of Kidney Diseases*, 40, 43-50.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S. (1972). Estimation of concentration of low-density lipoprotein in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18, 499-502.
- Galley, H.F., Davies, M.J., Webster, N.R. (1996). Ascorbil radical formation in patients with sepsis: effects of ascorbate loading. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 139-143.
- Gonçalves, T.L., Benvegno, D.M., Bonfanti, G., Frediani, A.V., Pereira, D.V., Rocha, J.B.T. (2009). Oxidative stress and δ -ALA-D activity in different conditioning regimens in allogeneic bone marrow transplantation patients. *Clinical Biochemistry*, 42, 602-610.
- Haffner, S., Villalpando C.G., Hazuda, H.P., Valdez, R., Mykkänen, L., Stern, M. (1994). Prevalence of hypertension in Mexico City and San Antonio, Texas. *Circulation*, 90, 1542-1549.
- International Federation of Diabetes (2008): a global threat. Diabetes Atlas, 3rd ed. IDF, Brussels, pp 1–15.

Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M., Rocha, J.B. (2001). Dyphenyl diselenides and ascorbic acid changes deposition of selenium and brain of mice. *Pharmacology & Toxicology*, 88, 119-125.

Jarrett, R.J. (1989). Hypertension in diabetic patients and differences between insulin-dependent diabetes mellitus and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *American Journal of Kidney Diseases*, 13, 14-16.

Jurek, A., Turyna, B., Kubit, P., Klein, A. (2006). LDL susceptibility to oxidation and HDL antioxidant capacity in patients with renal failure. *Clinical Biochemistry*, 39, 19-27.

Kannel, W.B. & McGee, D.L. (1979). Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation*, 59, 8-13.

Lapenna, D., Ciofani, G., Pierdomenico, S.D., Giamberardino, M.A., Cucurullo, F. (2001). Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 331-335.

Lash, L.H. & Jones, D.P. (1985). Distribution of oxidized and reduced forms of glutathione and cysteine in rat plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 240, 583-592.

Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186, 464-478.

Masuo, K. (2010). Roles of beta2- and beta3-adrenoceptor polymorphisms in hypertension and metabolic syndrome. *International Journal of Hypertension*, 832821.

McIntyre, M., Bohr, D.F., Dominiczak, A.F. (1999). Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension*, 34, 539-545.

Mendoza-Núñez, V.M., Rosado-Pérez, J., Santiago-Osorio, E., Ortiz, R., Sánchez-Rodríguez, M.A., Galván-Duarte, R.E. (2011). Aging Linked to type 2 diabetes increases oxidative stress and chronic inflammation. *Rejuvenation Research*, 14, 25-31.

Milan, A., Caserta, M.A., Avenatti, E., Abram, S., Veglio, F. (2010). Anti-hypertensive drugs and left ventricular hypertrophy: a clinical update. *Internal and Emergency Medicine*, 5, 469-479.

Opara, E.C., Abdel-Rahman, E., Soliman, S., Kamel, W.A., Souka, S., Lowe, J.E., Abdel-Aleem, S. (1999). Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism, clinical and experimental*, 48, 1414-1417.

Palmer, B.F. (2011). Screening tests for renal impairment in patients with type 2 diabetes: the what, when, and how. *Postgraduate Medical*, 123, 7-14.

Piwowar, A., Knapik-Kordecka, M., Warwas, M. (2007). AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 77, 188-192.

Reddy, S.V., Bhatia, E. (2011). Intensive glycaemic control in type 2 diabetes mellitus: does it improve cardiovascular outcomes? *The National Medical Journal of India*, 24, 21-27.

Rocha, M.E., Dutra, F., Bandy, B., Baldini, R.L., Gomes, S.L., Faljoni-Alário, A., Liria, C.W., Miranda, M.T., Bechara, E.J. (2003). Oxidative damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 409, 349-356.

Souza, J.B., Rocha, J.B., Nogueira, C.W., Borges, V.C., Kaizer, R.R., Morsch, V.M., Dressler, V.L., Martins, A.F., Flores, E.M., Schetinger, M.R. (2007). Delta-aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. *Clinical Biochemistry*, 40, 321-325.

Shemi, D. (1976). 5-Aminolevulinic acid dehydratase: structure, function and mechanism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 273, 109-115.

Tan, C.E., Chew, L.S., Chio, L.F., Tai, E.S., Lim, H.S., Lim, S.C., Jayakumar, L., Eng, H.K., Packard, C.J. (2001). Cardiovascular risk-factors and LDL subfraction profile in type 2 diabetes mellitus subjects with good glycemic control. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 51, 107-114.

Tsukamoto, I., Yoshinaga, T., Sano, S. (1979). The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 570, 167-178.

Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of high Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). (2002). *Circulation*, 106, 3143-421.

Vats, R.K., Kumar, V., Kothari, A., Mital, A., Ramachandran, U. (2003). Emerging targets for diabetes. *Current Science*, 88, 241-249.

Valentini, J., Grotto, D., Paniz, C., Roehrs, M., Burg, G., Garcia, S.C. (2008). The influence of the hemodialysis time treatment under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62, 378-382.

Ziouzenkova, O., Asatryan, L., Tetta, C., Wratten, M.L., Hwang, J., Sevanian, A. (2002). Oxidative stress during ex vivo hemodialysis of blood is decreased by a novel hemolipodialysis procedure utilizing antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 248-258.

Tables/Figure legends

Table 1. Data are expressed as mean \pm SEM as determined by ANOVA followed by Tukey multiple comparison test (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.01 compared with control group). ^a as determined by Student's t-test.

Table 2. Data are expressed as mean \pm SEM as determined by ANOVA followed by Tukey multiple comparison test (* p <0.05, ** p <0.01, compared with control group and # p <0.05, compared with T2DM).

Table 3. TC: total cholesterol; LDL-C: LDL-cholesterol; NP-SH: erythrocyte non protein thiol groups; P-SH: plasma protein thiol groups; PC: serum protein carbonil; ns: no significant.

Figure 1. Level of TBARS in plasma obtained from T2DM/HT patients, T2DM patients and control subjects. Data are reported as mean \pm SEM and expressed in nmol/mL plasma. Statistically significant differences, as determined by ANOVA followed by Tukey multiple comparison test (* p <0.05 and ** p <0.01 compared with control group).

Figure 2. 2A: Plasma NP-SH and erythrocyte P-SH of T2DM/HT and T2DM patients and control subjects. Data are reported as mean \pm SEM and expressed in nmol/mL. 2B: CAT activity of T2DM/HT, T2DM patients and control subjects. Data are reported as mean \pm SEM and expressed in μ mol H₂O₂/mL erythrocyte/min. Statistically significant differences, as determined by ANOVA followed by Tukey multiple comparison test (* p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 compared with control group).

Tables:

Table 1. Clinical characteristic of groups

	T2DM/HT N = 30	T2DM N = 23	CONT n = 30
Sex (Male/Female)	13/17	10/13	13/17
Age (years)	60.80 ± 1.55	56.41 ± 1.96	56.13 ± 1.74
Diabetes duration (years) ^a	8.77 ± 1.49	5.38 ± 1.44	-----
Age at onset of diabetes (years) ^a	52.41 ± 2.15	51.57 ± 2.30	-----
HbA1C (%) ^a	6.98 ± 0.23	7.56 ± 0.45	-----
Body mass index (kg/m ²)	29.80 ± 1.03	30.84 ± 1.88*	26.39 ± 0.86
Waist circumference (cm)	107.3 ± 2.71**	105.2 ± 4.34	93.17 ± 3.22
Fasting blood glucose (mg/dL)	152.00 ± 9.44***	152.00 ± 11.58***	91.30 ± 2.00
Total cholesterol (mg/dL)	181.70 ± 8.17	197.60 ± 7.74	202.8 ± 8.13
LDL-cholesterol (mg/dL)	105.20 ± 7.06	118.9 ± 6.58	120.2 ± 4.43
HDL-cholesterol (mg/dL)	46.70 ± 2.53	45.24 ± 2.34	49.09 ± 2.79
Triglycerides (mg/dL)	166.2 ± 13.60*	167.4 ± 17.17*	114.0 ± 9.95
Serum protein (mg/dL)	62.31 ± 0.93	63.52 ± 1.21	62.54 ± 0.84

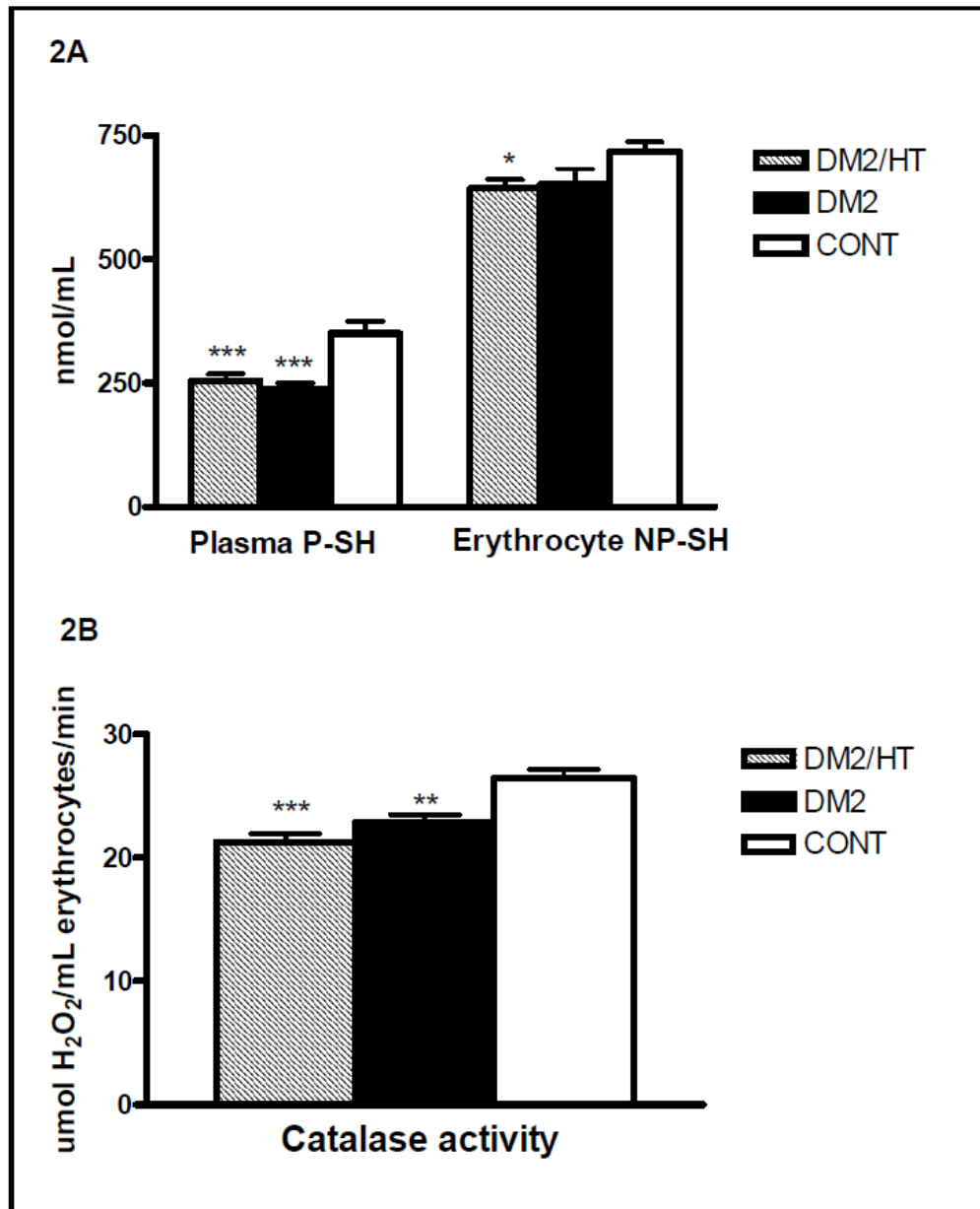
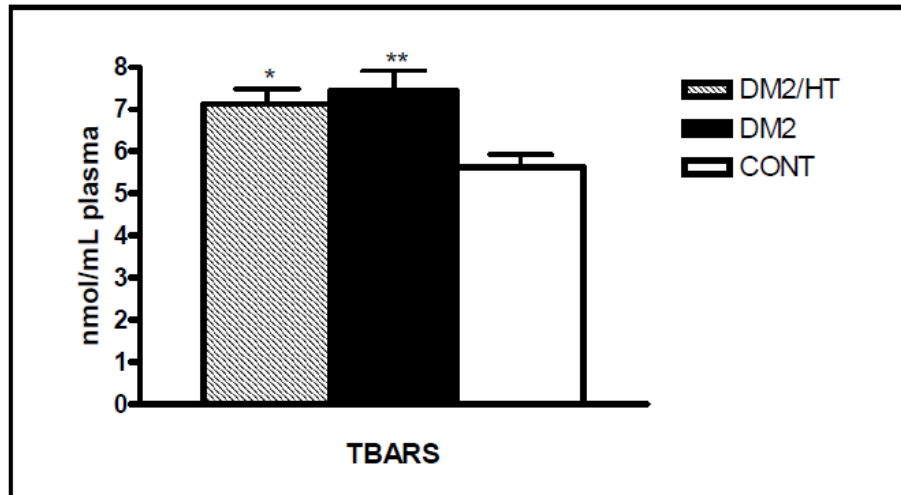
Table 2. Markers of oxidative stress in patients and healthy subjects

	T2DM/HT	T2DM	CONT
̈̈-ALA-D (nmol PBG/ml blood/h)	3.02 ± 0.30 **	3.46 ± 0.53*	4.99 ± 0.47
̈̈-ALA-D + DTT (nmol PBG/ml blood/h)	5.35 ± 0.41**	4.88 ± 0.64**	7.48 ± 0.47
Reactivation index (%)	43.33 ± 3.41 [#]	28,92 ± 3.47	29.99 ± 3.20
Serum PC (nmol/mg protein)	2.40 ± 0.19	2.29 ± 0.16	2.24 ± 0.11
VIT C (̈̈g/mL plasma)	13.29 ± 0.77	16.41 ± 2.34	16.63 ± 0.75

Table 3. Association between δ -ALA-D and biochemical parameters among patients

Enzyme activity	T2DM/HT				T2DM			
	TC	LDL-C	NP-SH	PC	TC	LDL-C	P-SH	PC
δ -ALA-D s/DTT	r = -0.5228 p=0.0043	r = -0.3804 p=0.0459	r = 0,3336 p=0,0098	r = -0.3706 p=0.0478	r = -0.4966 p=0.0220	r = -0.4781 p=0.0284	ns	ns
δ -ALA-D c/DTT	r = -0.4965 p=0.0072	ns	ns	ns	r = -0.4835 p=0.0264	r = -0.5425 p=0.011	ns	ns
Reactivation Index	ns	ns	r = -0.3860 p=0.0387	r = 0.5017 p=0.0056	ns	ns	r = -0.6738 p=0.0004	r = 0.5673 p=0.0073

Figures:



5 DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos o perfil oxidativo de pacientes diagnosticados com DM2, utilizando a enzima δ -ALA-D como um marcador oxidativo. Ainda, demonstramos o impacto da HAS no perfil enzimático da δ -ALA-D e no nível de estresse oxidativo desses pacientes.

A associação de parâmetros bioquímicos rotineiros e marcadores de estresse oxidativo encontradas nesse trabalho reforçam a idéia de que o estresse oxidativo tem papel importante na fisiopatologia e complicações do DM2. A distribuição de tecido adiposo é notavelmente alterada em pessoas com DM2, e o acúmulo de gordura visceral, avaliado aqui pelo aumento do índice de massa corporal e circunferência abdominal, parece ser um fator de risco para os distúrbios metabólicos e complicações associadas ao DM2, como a HAS (POULIOT et al., 1994).

A hiperglicemia é um dos fatores mais importantes responsáveis pelo estresse oxidativo no DM e, de fato, o nível de glicose sanguínea apresentou-se negativamente relacionada com nível de antioxidantes, como a vitamina C, e positivamente relacionada com o nível de peroxidação lipídica dos pacientes. Nesse contexto, observou-se também um aumento no nível de TBARS, assim como a depleção de algumas defesas antioxidantes, como vitamina C, a enzima catalase e grupamentos -SH protéicos e não-protéicos, corroborando com relatos recentes em que indivíduos diabéticos exibem alto nível de estresse oxidativo (PANDEY; MISHRA; RIZVI, 2010; ARYA; POKHARIA; TRIPATHI, 2011; GUPTA et al., 2011; YANG, H. et al., 2011)

Também as anormalidades lipídicas têm papel de destaque nos danos induzidos por estresse oxidativo a biomoléculas e estruturas celulares no curso do diabetes. De fato, o perfil lipídico dos pacientes apresentou-se relacionado de forma positiva com a medida de TBARS e de forma negativa com o nível de vitamina C, confirmando o relato de estudos anteriores (LUSIS, 2000; KAVIARASAN; ARJUNAN; PUGALENDI, 2005; JUREK et al., 2006).

A δ -ALA-D é uma metaloenzima que contém zinco e grupamentos -SH essenciais para sua atividade. Essa enzima é considerada um alvo em potencial

para avaliação de situações pró-oxidantes devido à sensibilidade de seus grupamentos sulfidrílicos ativos (BRITO et al., 2007). Realmente, observou-se uma redução na atividade da δ -ALA-D em pacientes com DM2 assim como um aumento de seu índice de reativação, sendo que tais mudanças foram mais pronunciadas nos pacientes que, além do DM2, apresentavam HAS. Alguns estudos já relataram a inibição da enzima em DM humano e experimental, apesar de haver dúvidas quanto ao mecanismo dessa inibição (CABALLERO et al., 1998; FERNANDES-CUARTUERO et al., 1999; SOUZA et al., 2007). No entanto, pelo nosso conhecimento, a participação da HAS nessas alterações, assim como o índice de reativação da atividade da δ -ALA-D não haviam sido demonstrados até o momento em pacientes com DM2.

Alguns estudos relacionam a inibição da atividade da δ -ALA-D com os níveis glicêmicos e a concentração de HbA1c de pacientes diabéticos e atribui essa redução de atividade à glicação de aminoácidos de seu sítio ativo (FERNANDEZ-CUARTERO et al., 1999; SOUZA et al., 2007). No entanto, parece ser necessária uma concentração não fisiológica de glicose *in vitro* para inibir a δ -ALA-D, sugerindo que a inibição da enzima poderia ser secundária ao estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia (SOARES et al., 2006).

Além da sua inibição, observou-se também que a atividade da δ -ALA-D apresentou-se relacionada aos grupamentos $-SH$ e carbonílicos. Ainda, a enzima demonstrou estar mais oxidada nos pacientes, que apresentaram um aumentado índice de reativação, sugerindo o envolvimento dos grupamentos $-SH$ no mecanismo de inibição. No entanto, a reativação da sua atividade não foi completa com a adição de um composto sulfidrílico, não excluindo, então, a possibilidade do envolvimento de outros mecanismos na inibição da enzima.

Além disso, a inibição da δ -ALA-D pode exacerbar a produção de espécies reativas por aumentar os níveis de ALA, seu substrato, que tem efeitos pró-oxidante e pode contribuir para a depleção das defesas antioxidantes do DM, já que sua reduzida atividade pode prejudicar a síntese de compostos tetrapirrólicos e, conseqüentemente, reduzir a síntese da enzima CAT que tem tais compostos na sua estrutura (JAFFE et al., 1995; NEAL et al., 1997).

Outra constatação é que tanto a atividade quanto o índice de reativação da δ -ALA-D apresentaram-se relacionados ao perfil lipídico dos pacientes demonstrando

que distúrbios no metabolismo das lipoproteínas também podem afetar a atividade enzimática da δ -ALA-D.

A observação de um efeito sinérgico da HAS ao nível de estresse oxidativo dos pacientes com DM2 reflete um papel adicional da hipertensão nas condições bioquímicas do paciente. Levando em conta que a hipertensão acomete mais pacientes diabéticos do que os não diabéticos, esses resultados corroboram a importância do uso de marcadores que possam contribuir para a prevenção das complicações graves do DM.

Nossos resultados demonstram que o DM2 está associado a um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e defesas antioxidantes, além da modificação de moléculas importantes como a enzima δ -ALA-D. Devido à sua alta sensibilidade a situações pró-oxidantes, a quantificação dessa enzima pode então ser útil como um parâmetro complementar na avaliação de danos provocados pelo DM. Assim, pode-se indicar os biomarcadores estudados para o acompanhamento dos pacientes diabéticos, a fim de atenuar a morbidade da doença, proporcionando a essas pessoas melhora na sua qualidade de vida.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nessa dissertação, podemos inferir o seguinte:

1) A enzima δ -ALA-D está inibida em amostras de sangue total de pacientes com DM2;

2) Essa inibição pode ocasionar prejuízos na síntese do grupamento heme além do acúmulo de substrato δ -ALA-D que pode ter efeitos pró-oxidantes;

3) O índice de reativação da δ -ALA-D apresenta-se aumentado em pacientes com DM2, sugerindo que a enzima é mais oxidável nesses pacientes, assim como o papel dos grupamentos sulfidrílicos na sua atividade;

3) As relações da δ -ALA-D com marcadores de estresse oxidativo demonstra a eficiência dessa enzima em refletir o status oxidativo dos pacientes;

4) A hiperglicemia presente nos pacientes estudados é a provável causa do elevado nível de lipoperoxidação observado além da redução da catalase, vitamina C e grupamentos tiólicos;

5) A hipertensão nos pacientes diabéticos pode ter papel sinérgico na atividade da δ -ALA-D.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUJA, P. M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clin. Chim. Acta.**, v. 306, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

AHMAD, F. K.; ZHIHENG, H.; KING, G.L. Molecular targets of diabetic cardiovascular complications. **Curr. Drug Targets**, v. 6, p. 487-94, 2005.

AHMAD, A. et al. Aging and inflammation: etiological culprits of cancer. **Curr. Aging Sci.**, v. 2, p. 174-186, 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Report of Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 26, suppl 1, p. S5-S20, 1997.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Consensus Development Conference on Insulin Resistance. November 5-6, 1997. **Diabetes Care**, v. 21, p. 310-4, 1998.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Treatment of hypertension in adults with diabetes. **Diabetes care**, v. 26, suppl. 1, p. S80-2, 2003.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Diabetes Care.**; v. 28, p. S37-S42, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Nutrition principles and recommendations in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 31, suppl. 1, p. S61-S78, 2008.

ANDERSON, P. M.; DESNICK, R. J. Purification and properties of δ -aminolevulinic acid dehydratase from human erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 6924-30, 1979.

ARYA, A. K.; POKHARIA, D.; TRIPATHI, K. Relationship between oxidative stress and apoptotic markers in lymphocytes of diabetics with chronic non healing wound. **Diabetes Res. Clin. Pract.** [Epub ahead of print], 2011.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006, 114p.

BANCO MUNDIAL. Documento do Banco Mundial. **Enfrentando o desafio das doenças não-transmissíveis no Brasil**, Brasil, n. 32576, 2005.

BARBOSA, N. B. V. et al. Effect of organic forms of selenium on δ -aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 149, n. 2, p. 243-53, 1998.

BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, OHARA. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Quím. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006.

BARCELÓ, A. et al. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. **Bull. World Health Organ**, v. 81, n. 1, p. 19-27, 2003.

BARNARD, G. F. et al. Mechanism of porphobilinogen synthase – Possible role of essential thiol groups. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 8965-74, 1977.

BATLLE, A. M. del C.; FERRAMOLA, A. M.; GRINSTEN, M. Purification and general properties of delta-aminolevulinate dehydratase from cow liver. **Biochem. J.**, v. 104, p. 244- 249, 1967.

BATTISTUZZI, G. et al. Delta-aminolevulinate dehydratase: a new genetic polymorphism in man. **Ann. Hum. Genet.**, v.45, p.223-229, 1981.

BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, p. 405-12, 1991.

BEEVERS, D. G; MAC GREGOR, G. A. A Hipertensão com outras doenças. In: _____. Hipertensão na prática. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap 14, p.167-185.

BOLZAN, C. R. et al. δ -Aminolevulinate Dehydratase Inhibition by Phenyl Selenoacetylene: Effect of Reaction with Hydrogen Peroxide. **Pharmacol. Toxicol.**, v.90, n. 4, p. 214-9, 2002.

BOYNE, A. F.; ELLMAN, G. L. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. **Anal Biochem.**, v. 46, n. 2, p. 639-53, 1972.

BRITO, V. B. et al. Long-term sucrose and glucose consumption decreases the δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in mice. **Nutrition**, v. 23, n.11/12, p. 818-26, 2007.

CABALLERO, F. A. et al. Reducing sugars trigger δ -aminolevulinic acid dehydratase inactivation: evidence of in vitro aspirin prevention. **Gen. Pharmacol.**, v. 31, p. 441-5, 1998.

CERIELLO, A. Oxidative stress and glycemic regulation. **Metabolism**, v. 49, n. 2, suppl. 1, p. 27-9, 2000.

CERIELLO, A. et al. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. **Circulation**, v. 106, p. 1211-18, 2002.

CESARINO, C. B. et al. Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São José do Rio Preto. **Arq. Bras. Card.**, v. 91, n. 1, p. 31–35, 2008.

CHAN, A. C. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. **Can. J. Physiol. and Pharmacol.**, v. 71, n. 9, p. 725-731, 1993.

CHANG, K. C. et al. Possible superoxide radical-induced alterations of vascular reactivity in aortas from streptozotocin-treated rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 266, p. 992-1000, 1993.

CHEN, A; NEILANDS, J.L. The delta-aminolevulinic acid dehydratases: molecular and environmental properties. **Struct. Bond.**, v.29, p.123-169, 1976.

CHOBANIAN, A. V. et al. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1206-52, 2003.

CONTRERAS, F. et al. Diabetes and hypertension physiopathology and therapeutics. **J. Hum. Hypertens.**, v. 14, suppl 1, p. S26–S31, 2000.

CORREA, T. D. et al. Hipertensão arterial sistêmica: atualidades sobre sua epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Arq. Med. ABC**, v. 31, n. 2, p. 91-101, 2005.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin. Chim. Acta.**, v. 329, p. 23-38, 2003.

DALLE-DONNE, I. et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin. Chem.**, v. 52, n. 4, p. 601-23, 2006.

DEAN, R. T. et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochem. J.**, v. 324, p. 1-18, 1997.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL (DCCT) RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulindependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, n. 14, p. 977-86, 1993.

DRESEL, E. I. B.; FALK, J. E. Conversion of delta-aminolevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system. **Nature**, v. 172, n. 4391, p.1185, 1953.

EMANUELLI, T. et al. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinatase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v.79, p.136-143, 1996.

ENGELGAU, M. M. et al. Comparison of fasting and 2-hours glucose and HbA1c levels for diagnosing diabetes. Diagnostic criteria and performance revisited. **Diabetes Care**, v. 20, n. 5, p. 785-91, 1997.

FERNANDEZ-CUARTERO, B. et al. Delta-aminolevulinato dehidratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 31, n. 3-4, p. 479-88, 1999.

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiol. Rev.**, v. 62, p.347-504, 1982.

FONTANELLAS, A. et al. Erythrocyte aminolevulinatase dehidratase activity as a lead marker in patients with chronic renal failure. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 40, n. 1, p. 43-50, 2002.

FRANZ, M. J. et al. Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of DM and related complications. **Diabetes Care**, v. 26, suppl. 1, p. S51-S61, 2003.

GALLEANO, M.; PUNTARULO S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1271, n. 2-3, p. 321-6, 1995.

GERICH, J. E. Contributions of insulin-resistance and insulin-secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Mayo Clin. Proc.**, v. 78, p. 447-56, 2003.

GEY, K. F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. **Biofactors**, v. 7, n.1/ 2, p.113-74, 1998.

GIBSON, K. D.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J. J. The purification and properties of delta aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. J.**, v. 61, p. 618-29, 1955.

GILLHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. K.; THOMAS, J. H. **Wills´: biochemical basis of medicine**. 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd, 1997. p. 196-202.

GIULIANO, D.; CERIELLO, A.; PAOLISSO, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care**, v. 19, n. 3, p. 257-67, 1996.

GOERING, P. L. Lead protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicology**, v. 14, p. 45-60, 1993.

GONÇALVES, T. L. et al. Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. **Clin. Biochem.**, v. 38, n. 12, p. 1071–5, 2005.

GONÇALVES, T. L. et al. δ-ALA-D activity is a reliable marker for oxidative stress in bone marrow transplant patients. **BMC cancer**, v.9, n.8, p. 138, 2009.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

GROTO, D. et al. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the brazilian Amazon. **Sci. Total Environ.**, v. 408, n. 4, p. 806-11, 2010.

GUPTA, S. et al. Vitamin E supplementation may ameliorate oxidative stress in type 1 diabetes mellitus patients. **Clin. Lab.**, v. 57, n. 5-6, 379-86, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. Oxford: Oxford Science Publications, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. Free radicals and antioxidants in the year 2000. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 899, p. 136-147, 2000.

HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Generation and propagation of radical reactions on proteins. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1504, p. 196-219, 2001.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 107, p. 401-4, 1986.

HERMES-LIMA, M. et al. Damage to rat liver mitochondria promoted by delta-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead poisoning. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1056, p. 57-63, 1991.

HINDMARSH, J. T. The porphyrias: recent advances. **Clin. Chem.**, v. 32, p. 1255-63, 1986.

HOWARD, B. V. Insulin resistance and lipid metabolism. **Am. J. Cardiol.**, v. 84, p. 28J-32J, 1999.

HWANG, E. S.; KIMB, G. H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. **Toxicology**, v. 229, p. 1-10, 2007.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes atlas**, 4. ed., 2009.

JACQUES-SILVA, M. C. et al. Diphenyl diselenides and ascorbic acid changes deposition of selenium and brain of mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 88, p. 119-25, 2001.

JAFFE, E. K. et al. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. **Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 244-51, 1995.

JAFFE, E. K. The porphobilinogen synthase catalyzed reaction mechanism. **Bioorg. Chem.**, v. 32, p. 316-325, 2004.

JORDAN, P. M. A. Biosynthesis of tetrapyrroles. In: _____. **New Comprehensive Biochemistry**. V. 19, Amsterdam: Elsevier, 1991.

JORDÃO Jr, A. A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 31, p. 434-449, 1998.

JOSEPHY, P. D. **Molecular Toxicology**. New York: Oxford University Press, 1997.

JUREK, A. et al. LDL susceptibility to oxidation and HDL antioxidant capacity in patients with renal failure. **Clin. Biochem.**, v. 39, p. 19-27, 2006.

KAHN, S. E. The importance of the β -cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Am. J. Med.**, v. 108, suppl 6a, p. 2S-8S, 2000.

KAHN, S. E. Clinical review 135: the importance of β -cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, p. 4047-58, 2001.

KAPLAN, N. Primary Hypertension; Natural History, Special Populations, and Evaluation. In: _____. **Clinical Hypertension**. 6th ed. Williams and Wilkins, 1994, pp 109–143.

KAROUI, H. et al. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite—ESR-SPIN trapping and oxygen uptake studies. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 6000–09, 1996.

KAVIARASAN, K.; ARJUNAN, M. M.; PUGALENDI, K. V. Lipid Profile, oxidant-antioxidant status and glycoprotein components in hyperlipidemic patients with/without diabetes. **Clin. Chim. Acta.**, v.362, p. 49-56, 2005.

KLEIN, S. et al. Weight management through lifestyle modification for the prevention and management of type 2 DM: rationale and strategies: a statement of the American DM Association, the North American Association for the study of obesity and the American society for Clinical Nutrition. **Diabetes Care**, v. 27, n. 8, p. 2067-73, 2004.

KRIEGER, E. M.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, J. E. Fisiopatologia da hipertensão. **Rev. Soc. Cardiol.**, v. 9, n. 1, p 1-7, 1999.

LAWRENCE, J. M. et al. Trends in the prevalence of preexisting diabetes and gestational diabetes mellitus among a racially/ethnically diverse population of pregnant women, 1999-2005. **Diabetes Care**, v. 31, n. 5, p. 899-904, 2008.

LEBOEUF, R. A.; HOESKSTRA, W. G. Adaptative changes in hepatic glutathione metabolism in response to excess selenium in rats. **J. Nutr.**, v. 113, p. 845-54, 1983.

LUNKES, G. I. et al. Serum cholinesterase activity in diabetes and associated pathologies. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 72, n. 1, p. 28-32, 2006.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, p. 233-41, 2000.

MALTA, D. C. et al. Doenças crônicas não-transmissíveis: mortalidade e fatores de risco no Brasil, 1990 a 2006. In: _____ **Saúde Brasil 2008**. Ministério da Saúde, Brasília. 2009. Pág 337-362.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. **Diabetes Care**, v. 15, n. 11, p. 1509-16, 1992.

MARKS, J.; RASKIN, P. Nefropatia e hipertension en la diabetes. **Clin. Med. de NA.**, v. 4, p. 817-44, 1998.

MAXWELL, S. R. J. et al. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin dependent and non insulin dependent diabetes mellitus. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 27, p. 484-90. 1997.

MAYES, P. A. Biologic oxidation. In: _____. **Harper's biochemistry**. San Mateo: Appleton & Lange, 1990; 105-11.

MAYNE, S. T. Antioxidants nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **J. Nutr.**, v. 133, p. 933-940, 2003.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 6049-55, 1969.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem. J.**, v. 219, p. 273-275, 1984.

MIGUEL JR., A. Resistência à Insulina – Fisiopatogenia, 2007. Disponível em: <http://www.medicinageriatrica.com.br/2007/11/02/resistencia-a-insulina/>. Acesso: 08 set, 2011.

MILAGRES, R. Hipertensão Arterial e Diabetes Mellitus. In: _____. **Enciclopédia da saúde: Diabetes Mellitus**. Rio de Janeiro: Médsi, 2001, v.1 n.3, p. 445-462.

MILLS, B. J.; LANG, C. A. Differential distribution of free and bound glutathione and cyst(e)ine in human blood. **Biochem. Pharmacol.**, v. 52, p. 401-406, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Cadernos de atenção básica. Diabetes mellitus. Normas e Manuais Técnicos**. Brasília, v. 16, 2006.

MONTERO, H. P. et al. Free radical generation during delta-aminolevulinic acid autoxidation: induction of hemoglobin and connections with porphyropathies. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 271, p. 206-16, 1989.

MORO, A. M. et al. Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. **Sci. Total Environ.**, v. 408, p. 4461-67, 2010.

NEAL, R., et al. Pro-oxidant effects of delta-aminolevulinic acid (delta-ALA) on Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Toxicology Letters**, v. 91, n.3, p. 169-78, 1997.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.

NOZAL, M. J. et al. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5-5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). **J. Chromatogr.**, v. 778, n. 1-2, p. 347-53, 1997.

PANDEY, K. B.; MISHRA, N.; RIZVI, S. I. Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. **Clin. Biochem.**, v. 43, p. 508-11, 2010.

PASAOGLU, H.; SANCAK, B.; BUKAN, N. Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. **Tohoku J. Exp. Med.**, v. 203, p. 211-18, 2004.

PETRUCCI, R.; LEONARDI, A.; BATTISTUZZI, G. The genetic polymorphism of human delta-aminolevulinatase dehydratase in Italy. **Hum. Genet.**, v.60, p.289-90, 1982.

PICONI, L.; QUAGLIARO, L.; CERIELLO, A. Oxidative stress in diabetes. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 41, n. 9, p. 1144-9, 2003.

POLI, G. et al. Oxidative stress and cell signaling. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1163-82, 2004.

POLIDORI, M. C. et al. Profiles of antioxidants in human plasma. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 30, n. 5, p. 456-62, 2001.

PORTE Jr, D. β -Cells in type II diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 40, p. 166-80, 1991.

POULIOT, M. C. et al. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. **Am. J. Cardiol.**, v. 73, p. 460-68, 1994.

RAFFA, R. B.; RAWLS, S. M.; BEYZAROV, E. P. **Atlas de Farmacologia de Netter**. Porto Alegre: Artmed, 2006, 440p.

REDON, J. et al. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. **Hypertension**, v. 41, p. 1096-101, 2003.

ROBERTSON, P. et al. Glucose Toxicity in Beta-Cells: Type 2 Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and the Glutathione Connection. **Diabetes**, v. 52,n. 3, p.581-7, 2003.

ROCHA, J.B.T. et al. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on deltaaminolevulinatase dehydratase of suckling rats. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.26, p.1077- 1083, 1993.

ROSÁRIO, T. M. et al. Prevalência, controle e tratamento da hipertensão arterial sistêmica em Nobres, MT. **Arq. Bras. Card.**, v. 93, n. 6, p. 672–678, 2009.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: _____. **Membrane lipid oxidation**. 1th ed. Boca Raton: CRC Press, 1991, 151-70.

SAAD, M. J. A; ZECCHIN, H. G. Resistência à insulina no diabetes tipo 2. In: _____. **Diabetes na Prática Clínica**, 2008. Sociedade Brasileira de Diabetes. Disponível em: www.diabetesbook.org.br, acesso em 7 set 2011.

SAEZ, G. T., BANNISTER, W. H., BANNISTER, J. V. Free radicals and thiol compounds – the role of glutathione against free radical toxicity. In: _____. Vina, J. (Ed.), **Glutathione: Metabolism and Physiological Functions**. Boca Raton, USA: CRC Press, 1990, p. 237–54.

SANTINI, A. S. et al. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. **Diabetes**, v. 11, n. 46, p. 1853-8, 1997.

SARTORELLI, D. S. et al. Primary prevention of type 2 diabetes through nutritional counseling. **Diabetes Care**, v. 27, n. 12, p. 3019, 2004.

SASSA, S.; FUJITA, H.; KAPPAS, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: _____. A. Kotyk, J. Skoda; V. Paces and V. Kostka (Eds.), **Highlights of modern Biochemistry**, Utrecht: VSP, v. 1, 1989, p.329-38.

SAXENA, A. K. et al. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. **Biochem. Pharmacol.**, v. 45, p. 539-42, 1993.

SERRANO, J. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Como Tratar**, v. 3, p. 83-95, 2008.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 87, n. 1, p. 4-14, 2010.

SHOOLINGIN-JORDAN, P. M. et al. 5-aminolevulinic acid dehydratase: metals, mutants and mechanism. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 30, n. 4, p. 584-90, 2002.

SHORR, R. I. et al. Glycemic control of older adults with type 2 diabetes: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v. 48, p. 264-67, 2000.

SIES, H. Strategies of antioxidants defenses. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experim. Physiol.**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SIGNORINI, R.; SIGNORINI, R. Atividade física e radicais livres. In: _____ GOHAYEB, N.; BARROS, T. **O exercício: preparação fisiológica, avaliação médica, aspectos gerais e preventivos**. São Paulo: Atheneu, 1995.

SILVA, A. C. et al. Oxidative stress and δ -ALA-D activity in chronic renal failure patients. **Biomed. Pharmacother.**, v. 61, n. 2-3, p. 180-85, 2007.

SLATER, T.F. Free radical mechanisms in tissue injury. **Biochem. J.**, v. 222, p.1-15, 1984.

SOARES, J. C. M. et al. High concentrations of glucose can activate or inhibit human erythrocyte aminolevulinatase in vitro depending exposure time. **Am. J. Biochem. Biotechn.**, v.2, n.4, p. 180-185, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq. Bras. Cardiol.**, p. 1-48, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA / SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO / SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 95, supl.1, p. 1-51, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Consenso Brasileiro sobre diabetes 2002. **Diagnóstico e classificação do diabetes mellito e tratamento do diabetes mellito do tipo 2**. Rio de Janeiro: Diagraphic Editora, 2003

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes 2009**. 3. ed. Itapevi-SP, 2009.

- SOLIMAN, G, Z. A. Blood lipid peroxidation (superoxide dismutase, malondialdehyde, glutathione) levels in Egyptian type 2 diabetic patients, **Singapore Med. J.**, v. 49, n. 2, p.129, 2008.
- SOUZA, J. B. et al. Delta-aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. **Clin. Biochem.**, v. 40, p. 321-325, 2007.
- STADTMAN, E. R.; BERLETT, B. S. Fenton chemistry. Amino acid oxidation. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 17201-11, 1991.
- STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v. 25, p. 207-218, 2003.
- SUPLICY, H.L. Obesidade visceral, resistência à insulina e hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 2, p. 136-41, 2000.
- TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. **Hypertension**, v. 42, p.1075-108, 2003.
- THE INTERNATIONAL EXPERT COMMITTEE. International Expert Committee report on the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 7, p. 1327-34, 2009.
- TIGIER, H. A.; BATLLE, A. M. del C.; LOCASCIO, G. A. Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system. II. Improved purification and some properties delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Enzymologia**, v. 38, p. 43-56, 1970.
- TIMBRELL, J. **Principles of Biochemical Toxicology**. 3^a ed. London: Taylor & Francis, 2000.
- TOUYZ, R. M. Reactive Oxygen Species, Vascular Oxidative Stress, and Redox Signaling in Hypertension. What is the clinical significance? **Hypertension**, v. 44, n. 3, p. 248-252, 2004.
- TRABER, M. G. et al. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. **Miner Electrolyte Metab.**, v.23, n.3/6, p.135-9, 1997.

TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T.; SANOS, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 570, p. 167-78, 1979.

TURK, H. M. et al. Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. **Acta. Diabetol.**, v. 39, p. 117-22, 2002.

UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet**, v. 352, n. 9131, p. 837-53, 1998.

VALENTINI, J. et al. Human erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients. **Clin. Biochem.**, v. 40, p. 591-594, 2007.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VASAN, R. S. et al. Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: the framingham heart study. **JAMA**, v. 287, n. 8, p. 1003-10, 2002.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia**: report of a WHO/IDF consultation. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications**: report of a WHO consultation. Geneva, World Health Organization, p. 59, 1999.



WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011. **Global Prevalence of Diabetes**. Disponível em http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index3.html>. Acesso em 18 de agosto de 2011.


YANG, H. et al. Review: Oxidative stress and diabetes mellitus. **Clin. Chem. Lab. Med.**, Epub ahead of print, 2011.

YOUNG, I. S. et al. The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 18, p. 833-40, 1995.

ANEXOS








ANEXO A – Comprovante de submissão do manuscrito “Hypertension strengthens δ -ALA-D activity inhibition and increases it reactivation index in type 2 diabetic patients” no periódico *Journal of diabetes and it's complications*.

JOURNAL OF DIABETES AND ITS COMPLICATIONS Contact us  Help   >> EES maintenance Sunday 11 September: Site down 8:00-11:30 UK time... [more](#)

[me](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#) Username: [thissiane goncalves](#) Role: [Author](#)  Version: EES 2

Submissions Being Processed for Author Thissiane de Lima Gonçalves

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display results per page.

 Action 	Manuscript Number 	Title 	Initial Date Submitted 	Status Date 	Current Status 
Action Links	JDC-D-11-00288	Hypertension strengthens δ -ALA-D activity inhibition and increases it reactivation index in type 2 diabetic patients	Aug 22, 2011	Sep 05, 2011	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display results per page.

ANEXO B – Produção bibliográfica obtida durante o período de realização do Mestrado:

Artigos publicados em periódicos:

1. Bonfanti, Gabriela, Ceolin, Ronise B., Valcorte, Tiago, De Bona, Karine S., de Lucca, Leidiane, Gonçalves, Thissiane L., Moretto, Maria Beatriz. *δ-Aminolevulinate dehydratase activity in type 2 diabetic patients and its association with lipid profile and oxidative stress*. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 1105 - 1109, 2011.

2. De Bonna, K, Bellé, LP, Bittencourt, PE, BONFANTI, G., Cargnelluti, LO, Pimentel, VC, Ruviano, AR, Schetinger, MR, Emanuelli, T., Moretto, M.B. *Erythrocytic enzymes and antioxidant status in patients with type 2 diabetes: Benefic effect of Syzygium cumini leaf extract in vitro*. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumos):

1. SILVA, P. S., De Bona, Karine S., Bittencourt, PE, BONFANTI, G., Ceolin, Ronise B., Cargnelluti, LO, TATSCH, E., MORETTO, M. B. *Avaliação de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes com síndrome metabólica* In: **IV Congresso Internacional de Bioanálises**, Novo Hamburgo, 2011.

2. BONFANTI, G., Ceolin, RB, De Lucca, L, De Bonna, K, Cargnelluti, LO, GONÇALVES, T.L, MORETTO, M.B. *δ-aminolevulinate dehydratase activity and reactivation index in type 2 diabetic patients* In: **XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE**, Rio de Janeiro, 2011.

3. Bittencourt, PE, De Bonna, K, Cargnelluti, LO, BONFANTI, G., MORETTO, M. B. *Efeito da exposição, in vitro, de metformina e glibenclamida sobre a atividade da enzima adenosina desaminase e dano oxidativo em eritrócitos de pacientes diabéticos* In: **Congresso Brasileiro de Patologia Clínica - Medicina Laboratorial**, Florianópolis, 2011.

4. Cargnelluti, LO, BONFANTI, G., Ceolin, Ronise B., De Lucca, L, De Bona, Karine S., Bittencourt, PE, GONÇALVES, T. L. *Hipertensão intensifica a inibição e a reativação da atividade da d-ALA-D em portadores de diabetes mellitus tipo 2* In: **IV Congresso Internacional de Bioanálises**, Novo Hamburgo, 2011.

5. Ceolin, RB, BONFANTI, G., Thissiane de Lima Gonçalves, MORETTO, M. B., De Bonna, K, De Lucca, L, Valcorte, T. *AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA δ-ALA-D EM PACIENTES PORTADORES DE DM2* In: **15º Farmápolis**, Florianópolis, 2010.

6. BONFANTI, G., Ceolin, RB, Gonçalves, Thissiane L. *Prevenção do Câncer do Colo Uterino em Gestantes Atendidas no Hospital Universitário de Santa Maria* In: **25ª Jornada Acadêmica Integrada**, Santa Maria, 2010.