

UFSM

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A INIBIÇÃO DA ENZIMA δ -AMINOLEVULINATO
DESIDRATASE POR MONOSSACARÍDEOS REDUTORES NÃO
É MEDIADA PELA OXIDAÇÃO DE GRUPOS -SH

Diogo Gabriel

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2004

A INIBIÇÃO DA ENZIMA δ -AMINOLEVULINATO
DESIDRATASE POR MONOSSACARÍDEOS REDUTORES NÃO
É MEDIADA PELA OXIDAÇÃO DE GRUPOS -SH

por

Diogo Gabriel

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
MESTRE EM BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

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

A INIBIÇÃO DA ENZIMA δ -AMINOLEVULINATO
DESIDRATASE POR MONOSSACARÍDEOS NÃO É MEDIADA
PELA OXIDAÇÃO DE GRUPOS -SH

Elaborada por

Diogo Gabriel

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha (Orientador)

Prof(a). Dr(a). Rosane Gomez

Prof(a). Dr(a). Maria Rosa C. Schetinger

Santa Maria, Agosto de 2004.

*Para Ana Paula, com muito amor,
pela presença e carinho em todos
esses anos maravilhosos.*

*Para meus pais, Arno e Alda
Pelo amor, apoio e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, o qual deu-me a vida.

A toda minha família que demonstrou muito interesse e apoio nessa etapa de minha formação.

Ao meu irmão, Dimas, pelo companheirismo e amizade.

Ao João, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório. Minha admiração especial pela sua inteligência, capacidade, humildade e principalmente, sua generosidade.

Às pessoas que doaram sangue para os experimentos, muito obrigado, de coração.

Às queridas amigas Vanessa e Fran, as quais sempre se dispuseram prontamente a ajudar nas coletas, adoro vocês.

À Néia, Gustavo Augusti, Gustavo e Robson Puntel, por trabalharem em conjunto comigo. Muitíssimo obrigado.

Ao amigo Helvio Velci Hermes, o qual ensinou-me a pipetar e a gostar de bioquímica. Será sempre um referencial para mim, pela inteligência, disciplina, competência, organização e principalmente por mostrar como se supera as adversidades que a vida pode trazer. Minha sincera admiração.

Aos meus mestres, desde o pré-escolar até a pós-graduação. Minha eterna gratidão.

Aos amigos Cristina e Gilson, pelos conselhos nas horas de dificuldade e pelo exemplo de dedicação.

Ao Juliano, pela amizade, sinceridade e companheirismo.

Ao Vanderlei, pela amizade. Minha admiração pela sua generosidade e capacidade.

Aos amigos Julio e Nilda, pela amizade e as preciosas dicas. Minha eterna

gratidão.

À Fernanda Centurião, Luiza e Janica, pela amizade e acolhida imediata, desde o primeiro dia.

Ao Professor Sydney H. Alves, por incentivar seus alunos a ingressar na pesquisa e docência.

Aos amigos pertencentes aos laboratórios do Prof. João, Prof. Gilson, Prof(a). Cristina, Prof. Braga e Prof. Cláudio, obrigado pela amizade, acolhida e respeito às minhas limitações.

Pela amizade de meus vizinhos de infância, Vinícius e Rogério, os quais caminham junto comigo nas várias etapas da vida pessoal e profissional.

E para todos que por ventura não listei acima, muito obrigado por tudo.

Sick of this life

Not that you'd care

I'm not the only one with

Whom these feelings i share

Nobody understands, quite why we're here

We're searchin' for answers that never appear

But maybe if i looked real hard i'd

See you're tryin' too

To understand this life,

That we're all going through

W. A. Rose

SUMÁRIO

Lista de Figuras	ix
Lista de Anexos	xi
Lista de Abreviaturas	xiii
1 Resumo	xiii
2 Abstract	xv
3 Introdução	1
4 Objetivos	4
5 Revisão Bibliográfica	5
5.1 Diabetes e Suas Complicações Crônicas	5
5.1.1 Histórico	5
5.1.2 Conceito	6
5.1.3 Classificação	6
5.1.4 Complicações Diabéticas Crônicas ou Tardias	6
5.1.5 O Papel da Glicose no Dano Tecidual	8
5.2 A Enzima Delta-Aminolevulinato Desidratase	15
5.2.1 Características Estruturais	18
5.2.2 Ação Catalítica	21
5.2.3 A Função do Zinco	19
5.2.4 Importância Toxicológica	21
5.2.5 Algumas Relações Entre a Atividade da δ -ALA-D e o Diabetes	22

6	Artigo	26
6.1	Abstract.....	30
6.2	Introduction	31
6.3	Material And Methods	34
6.4	Results	35
6.5	Discussion.....	36
6.6	References.....	38
6.7	Figure Legends	44
6.8	Figures	46
7	Discussão	54
8	Conclusão	58
9	Anexos	59
10	Referências Bibliográficas	63

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 5.1 Reação de Maillard com formação de produtos terminais de glicosilação avançada.....9
- Figura 5.2 Contribuição da autooxidação da glicose e da produção de radical hidroxil para produção de dano protéico induzido pela glicose 12
- Figura 5.3 Ligação entre estresse oxidativo e as possíveis reações da glicose no organismo durante o diabetes.15
- Figura 5.4 Condensação assimétrica de duas moléculas do ácido 5-aminolevulínico catalisada pela enzima δ -ALA-D. 16
- Figura 5.5 Via de Biossíntese dos Compostos Tetrapirrólicos. 17
- Figura 5.6 Possíveis Mecanismos de Inibição da δ -ALA-D por Monossacarídeos....55

ARTIGO

- Figura 1 Asymmetric condensation of 5-aminolevulinic acid (δ -ALA) molecules catalyzed by delta-aminolevulinate desidratase (δ -ALA-D)....46
- Figura 2 Inhibition of Human Erythrocyte δ Aminolevulinate Desidratase (δ -ALA-D) by Reducing Sugars.....47

Figura 3 Absence of Antagonism by DTT of δ -Aminolevulinate Desidratase (δ -ALA-D) activity from human erythrocytes inhibited by glucose (A), fructose (B) and ribose (C).....48

Figura 4 Glucose inhibition of delta-Aminolevulinate Desidratase (δ -ALA-D) activity from human erythrocytes: Absence of Antagonism by Lysine (A); or by t-butylamine (B).....51

Figura 5 Delta Aminolevulinate Desidratase (δ -ALA-D) activity in human erythrocytes: Influence of Zn^{2+} and lysine on enzyme inhibition by glucose.....53

LISTA DE ANEXOS

Anexo I. Efeito do Boridreto de Sódio sobre a inibição da atividade da enzima δ -ALA-D de eritrócitos humanos pela glicose.....	59
Anexo II. Estudo sobre a possível ligação entre a glicose e o substrato da enzima δ -ALA-D.....	60
Anexo III. Estudo sobre a possível interferência da glicose sobre a reação de cor na técnica usada para dosar a atividade da δ -ALA-D... ..	61
Anexo IV. Influência da glicose na produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

- δ -ALA-D – Delta aminolevulinato desidratase
- AGE – Advanced glycation end products
- ALA – Ácido 5-aminolevulínico ou delta-aminolevulínico
- ANOVA – Análise de Variância
- DMID – Diabetes mellitus insulino dependente
- DMNID – Diabetes mellitus independente de insulina
- DTT – Ditioneitol
- ERO/ROS Espécies reativas de oxigênio
- H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
- HO • - Radical hidroxil
- Mⁿ⁺/M⁽ⁿ⁻¹⁾⁺ - Metal de transição
- NPS – Nitroprussiato de Sódio
- O₂• - Radical ânion superóxido
- PBG – Porfobilinogênio
- PTGA – Produtos terminais de glicosilação avançada
- RAGE – Receptor para os produtos terminais de glicosilação avançada
- SOD – Superóxido dismutase
- TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
- TCA – Ácido Tricloroacético
- TFK – Tampão fosfato de potássio
- Zn²⁺ – Zinco

1 RESUMO

A metaloenzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) participa da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos como o heme. Ela é considerada um bom marcador de estresse oxidativo e de intoxicação por metais. Essa enzima sulfidrílica encontra-se inibida em várias patologias como a intoxicação por chumbo, mercúrio e alumínio, a exposição a alguns compostos orgânicos de selênio e no diabetes.

O estresse oxidativo é apontado como um dos causadores das chamadas complicações crônicas ou tardias da síndrome diabética. Segundo a literatura, uma das causas centrais responsáveis pelo desenvolvimento do estresse oxidativo no diabetes é o aumento dos níveis sanguíneos de glicose. Esse monossacarídeo sofre reações não-enzimáticas, as quais provocam produção de radicais livres, modificação da estrutura de proteínas e prejuízos ao funcionamento de algumas enzimas.

Neste estudo, a enzima δ -ALA-D de eritrócitos humanos foi exposta a altas concentrações de glicose, frutose e ribose *in vitro* para avaliar o papel desses açúcares redutores na inibição da enzima. Esses monossacarídeos inibiram a δ -ALA-D e a ordem de inibição foi frutose > ribose = glicose. A inibição não foi modificada pelo uso de compostos com grupamentos aminas tais como lisina e *t*-butilamina. Além disso, a inibição não foi revertida com uso de zinco e ditioneitol (DTT) nem tão pouco ocorreu um aumento significativo dos níveis de espécies reativas de oxigênio (TBARS). De acordo com a literatura, de maneira geral existem dois mecanismos para a inibição da enzima δ -ALA-D por concentrações anormais de glicose. O primeiro baseia-se na existência de estresse oxidativo e oxidação dos grupamentos tiólicos da enzima enquanto que o segundo é devido à glicosilação dos resíduos de lisina do sitio ativo da enzima. Nós concluímos então que a inibição da

δ -aminolevulinato desidratase não é mediada pela oxidação dos grupamentos tiólicos do sítio ativo da enzima, pois o emprego de zinco e DTT no meio reacional não preveniu a inibição. Além disso, no curto período de pré-incubação e incubação, não houve aumento de espécies reativas de oxigênio.

O mecanismo da inibição envolve, provavelmente, glicosilação do sítio ativo da enzima, o que causa uma modificação conformacional deletéria impedindo a sua ação catalítica.

2 ABSTRACT

Heme pathway enzyme δ -aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D) is a good marker for oxidative stress and metal intoxication. This sulfhydrylic enzyme is inhibited in several oxidative pathologies like lead, mercury and aluminum intoxication, selenium organic species exposition and diabetes. Oxidative stress is one of cause of diabetes complications. This occurs due non-enzymatic glucose-mediated reaction, which can change structure of proteins and impair enzymes function. In our study, influences of high glucose, fructose and ribose concentrations on δ -ALA-D activity were evaluated *in vitro*. The possible mechanism, which underlies δ -ALA-D inhibition, was investigated using lysine, DTT, and *t*-butylamine. Reducing sugars (glucose, fructose and ribose) inhibit δ -ALA-D and inhibition order was fructose>ribose=glucose. Enzyme inhibition did not involve oxidation of its critical sulfhydryl groups because DTT and sodium borohydride did not modify enzyme inhibition. Furthermore, medium TBARS were not modified by exposition to monosaccharide. Authors diverge to mechanism inhibition of δ -ALA-D by glucose. Either glycosilation or oxidative stress are implicated in model of enzyme impairment. We concluded that δ -ALA-D inhibition caused by high concentrations of reducing sugar is mediated by enzyme glycosilation that lead to conformational changes, which can impair enzyme catalytic function.

3 INTRODUÇÃO

O diabetes é uma síndrome caracterizada por hiperglicemia e, atualmente, tratada com drogas hipoglicemiantes (STROWIG AND RASKIN, 1992; PINERO-PILONA et al., 2002). Com o advento da insulino-terapia os pacientes alcançaram uma maior sobrevida, entretanto, a cronicidade da doença leva ao surgimento de uma série de distúrbios denominados complicações diabéticas crônicas ou tardias, os quais prejudicam a qualidade de vida dos pacientes bem como abreviam o seu tempo (BROWNLEE et. al., 1984).

Assim, atualmente, os pesquisadores dedicam seus estudos para caracterizar e amenizar essas complicações crônicas. Logo, surgiram diversas publicações que evidenciam a participação do estresse oxidativo no processo do envelhecimento precoce, vasculopatias, nefropatias e neuropatias que surgem nos pacientes com diabetes.

Algumas evidências sugerem a participação de reações não enzimáticas envolvendo a glicose, as quais podem produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) e depletar o sistema antioxidante do organismo levando ao estresse oxidativo. Assim, a autooxidação da glicose, as ligações cruzadas da glicose com proteínas e a formação dos chamados produtos terminais de glicosilação avançada (PTGA) foram identificados como os processos chave que levam aos problemas crônicos do diabetes (DAY et al., 1979; HUNT et al., 1988; WOLFF AND DEAN 1987a 1987b; STROWIG et al., 1992; CARUBELLI et al., 1994; PARTHIBAN et al., 1995; SENSI et al., 1995; SOLUIS et al., 1999; RAHBAR et al., 1999; CHEVALIER et al., 2002; FORBES et al., 2003).

A metaloenzima δ -aminolevulinato desidratase é essencial para todos os organismos aeróbicos. Ela catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas

de ácido 5-aminolevulínico produzindo o composto monopirrólico porfobilinogênio que sofre sucessivas transformações para gerar os compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e heme) (CASTELFRANCO & BEABLE, 1983; JAFFE et al., 1985; SASSA et al., 1889, 1998). Essa enzima é considerada um bom marcador de estresse oxidativo, pois sua natureza sulfidrílica faz com que a enzima seja sensível à presença de agentes que possam oxidar seus grupamentos tiólicos, os quais são indispensáveis para sua atividade catalítica (RODRIGUES et al., 1989; ROCHA et al., 1993, 1995; 2004; BARBOSA et al., 1998; MACIEL et al., 2000; FARINA et al., 2001; JACQUES-Silva et al., 2001; FOLMER et al., 2002a, 2002b; 2003). A inibição dessa enzima leva a distúrbios da rota biossintética do heme podendo levar ao acúmulo de seu substrato, o ácido aminolevulínico (ALA), o qual possui singular capacidade pró-oxidante conforme relatos na literatura (PEREIRA et al., 1992; BECHARA et al., 1993).

Existem alguns dados na literatura científica relatando a inibição da enzima δ -ALA-D em pacientes diabéticos, modelos animais da doença e experimentos *in vitro*. Entretanto, o mecanismo proposto para a inibição ainda é especulativo. Existe um grupo de pesquisadores relatando a inibição como sendo resultado da glicosilação dos resíduos de lisina do sítio ativo da δ -ALA-D e outro grupo enfatizando que o estresse oxidativo evidenciado no diabetes poderia ser responsável pela oxidação dos grupamentos tiólicos do sítio ativo da enzima (BITAR et al., 1984; CABALLERO et al., 1995; POLO et al., 1995; CABALLERO et al., 1998; Fernández-Cuartero et al., 1999; CABALLERO et al., 2000; FOLMER et al., 2002).

O objetivo do presente estudo foi tentar identificar o papel de monossacarídeos redutores na inibição da enzima. Para isso, foram realizados experimentos *in vitro* com eritrócitos humanos. Sabe-se que em condições de hiperglicemia fisiológica a concentração de glicose é muito menor daquela utilizada

em nossos experimentos, entretanto o tempo de exposição da enzima é muito mais longo. Assim, as concentrações dos monossacarídeos utilizadas em nosso estudo visam a reduzir o período de pré-incubação com a enzima, sendo para isso muito maiores que as concentrações encontradas em meio fisiológico.

4 OBJETIVOS

Tendo por base os dados obtidos em periódicos científicos especializados na enzima em questão e nas complicações diabéticas crônicas, foram elaborados os seguintes objetivos:

- Observar a exposição curta (60 minutos) da enzima δ -ALA-D de eritrócitos humanos, a concentrações não fisiológicas de glicose, frutose e ribose.
- Uma vez que ocorra uma inibição da enzima devido ao modelo experimental de exposição aos compostos acima mencionados, realizar uma série de experimentos complementares, com antioxidantes e substâncias moduladoras da atividade da δ -ALA-D, os quais possam permitir identificar o papel desses monossacarídeos na inibição da enzima.
- Após o término dos experimentos complementares, concluir se a inibição da enzima, se assim ocorrer, é devido á:
 - a) Produção de estresse oxidativo pela autoxidação da glicose;
 - b) Glicosilação dos resíduos de lisina do sitio ativo da enzima;
 - c) Glicosilação do substrato, impedindo sua ligação no sitio ativo da enzima.

5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 DIABETES E SUAS COMPLICAÇÕES CRÔNICAS

5.1.1 HISTÓRICO

O Diabetes é um mal reconhecido pela humanidade desde os seus primórdios. Ela é mencionada no papiro de Ebers (1500 a.C.), um documento médico egípcio onde é relatada uma doença caracterizada pela emissão anormalmente freqüente de urina. Posteriormente, os romanos, representados pelo Médico Aretaeus (30 a.C.), criaram o termo Diabetes que do Grego significa “passar através”, pois a excreção renal anormal de urina assemelhava-se a passagem por um sifão. Por volta do século XI d.C. os “provadores de água” provavam a urina dos pacientes para, através da presença de um gosto adocicado na urina, diagnosticar o diabetes. Nessa época a palavra latina para mel, “mellitus” foi adicionada ao termo diabetes com o sentido de caracterizar a urina dos pacientes como “doce de maneira semelhante ao mel”. No começo do século XIX d.C. foram realizados os primeiros testes para provar a presença de açúcar na urina dos pacientes diagnosticados como diabéticos. Em 1869, um estudante de medicina alemão, Paul Langerhans, observou que o pâncreas continha dois tipos de células, as responsáveis pela secreção de enzimas digestivas e outras, agrupadas em ilhotas ou ilhas, que ele suspeitou terem função endócrina. A evidência dessa função veio no final do século 19, quando Oskar Minkowski e Joseph vom Mering realizaram experimentos com cães pancreatomizados, evidenciando o surgimento dos sinais e sintomas do diabetes mellitus nesses animais. A partir desse ponto o desafio era tentar isolar a substância responsável pela regulação sanguínea da glicose. Entre 1916 e 1920, o fisiologista romeno Nicolas Paulesco realizou e publicou uma série de experiências

com extrato de pâncreas, provando que a injeção desse composto tinha a capacidade de diminuir a glicemia. O principal achado aconteceu em 1921 quando o cirurgião Frederic G. Banting e seu colaborador Charles H. Best, estudante do quarto ano de medicina, descobriram a insulina. Esse fato rendeu o prêmio Nobel de Medicina a Banting e J. J. R. Macleod que era o professor responsável pelos laboratórios de pesquisa, tendo participado diretamente da extração do hormônio (BANTING et al., 1922; MINKOWSKI, 1989).

A descoberta da insulina foi um verdadeiro divisor de águas na história da doença. A partir dela os pacientes puderam ter uma melhor qualidade de vida, entretanto, os enfermos acabavam sofrendo de complicações renais, vasculares, e cardíacas conforme a doença progredia.

5.1.2 CONCEITO

O diabetes mellitus tem etiologia bem variada e é caracterizado por um grupo de síndromes caracterizadas por hiperglicemia, metabolismo alterado de lipídios, carboidratos e proteínas; além de um risco aumentado para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (GOODMAN & GILMAN, 1996).

5.1.3 CLASSIFICAÇÃO

A maioria dos pacientes pode ser clinicamente classificada como portadora de diabetes mellitus insulino-dependente (DMID, ou diabetes do tipo I) ou diabetes mellitus não-insulino-dependente (DMNID, ou diabetes do tipo II) (GOODMAN & GILMAN, 1996).

5.1.4 COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS CRÔNICAS OU TARDIAS

Com a descoberta da insulina e o avanço na pesquisa e no tratamento da doença, os pacientes puderam experimentar uma maior sobrevida e uma melhor coexistência com a doença. Entretanto, a partir desse ponto observou-se que o

diabetes traz consigo uma série de doenças secundárias, isso é, moléstias que aparecem com o decorrer do diabetes, principalmente em indivíduos diabéticos com descontrole glicêmico. Essas enfermidades secundárias, arteriosclerose, falência renal, catarata, retinopatia, dentre outras, estão presentes na população em geral, mas afetam os diabéticos com maior intensidade causando uma maior mortalidade e diminuição da qualidade de vida (BROWNLEE et al., 1984). Assim, o principal objetivo dos pesquisadores em diabetes hoje é identificar as causas bioquímicas dessa degeneração tecidual acelerada e desenvolver drogas ou dietas para tentar diminuir esse processo (WOLFF et al., 1987).

Uma das principais causas das complicações tardias do Diabetes é o estresse oxidativo. Mas o que é o estresse oxidativo? Durante o metabolismo normal do corpo humano e em algumas patologias, a produção de radicais livres como as espécies reativas de oxigênio pode levar a danos teciduais por meio da peroxidação lipídica (TAPPEL, 1973). Como defesa natural a esse insulto, o organismo dispõe de substâncias como a vitamina E, a vitamina C e enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase. Essas substâncias neutralizam a cadeia de reações promovidas pelos radicais livres impedindo a peroxidação lipídica (HALLIWELL et al., 1986). O estresse oxidativo compreende um desbalanço no sistema antioxidante do organismo. Quando ele ocorre, uma série de substâncias pró-oxidantes são produzidas acima da capacidade de neutralização do sistema de defesa antioxidante do organismo. Isso pode acontecer por superprodução de pró-oxidantes e/ou por deficiência no sistema antioxidante (BAYNES et al., 1991; PARTHIBAN et al., 1995).

A hiperglicemia de longa duração e a glicosilação de proteínas são os principais contribuintes para o estresse oxidativo evidenciado no diabetes (SATO et al., 1979; BROWNLEE et al., 1984; FU et al., 1992; ANSARI et al., 1996; FOLMER et

al., 2002). Acompanhando esse processo, existem inúmeras evidências na literatura relatando a depleção de antioxidantes endógenos como a vitamina E (WATANABE et al., 1984), a vitamina C (STANKOCA et al., 1984), a glutathione (ILLING et al., 1951) etc; em indivíduos diabéticos.

Uma vez estabelecido o estresse oxidativo, o dano tecidual é eminente. Varias alterações microvasculares e em tecidos celulares de longa duração como o colágeno podem ser observadas (DAY et al., 1979; FU et al., 1991). Essas alterações, por sua vez, levam aos demais danos que acompanham o diabetes. De fato, relatos na literatura especializada evidenciam que a promoção do estresse oxidativo apóia-se na elevação dos níveis da glicose e suas possíveis reações no organismo humano (HUNT et al., 1988).

5.1.5 O PAPEL DA GLICOSE NO DANO TECIDUAL

Já está bem conhecida a capacidade da glicose em ligar-se a proteínas e que esse processo pode causar produção de radicais livres (DAY et al., 1979; WOLFF et al., 1987a; 1987b; FU et al., 1992; CARUBELLI et al., 1994; SCHWARTZ et al., 1995; GUGLIUCCI et al., 1996; RAHBAR et al., 1999; SOLUIS et al., 1999; CHEVALIER et al., 2002; FORBES et al., 2003).

A reação de Maillard (**Figura 1**) é iniciada por reações não enzimáticas da glicose ou outros açúcares redutores com proteínas. Ela também é chamada de reação de “browning” (escurecimento) e foi identificada pela primeira vez no início do século XX pela indústria alimentícia. A identificação da presença desse processo no meio biológico ficou evidente somente com a descoberta da hemoglobina glicosilada e seu aumento no diabetes. Nessa reação os monossacarídeos reagem com proteínas produzindo modificações estruturais e formação de novos fluoróforos (MAILLARD et al., 1916; RAHBAR et al., 1999).

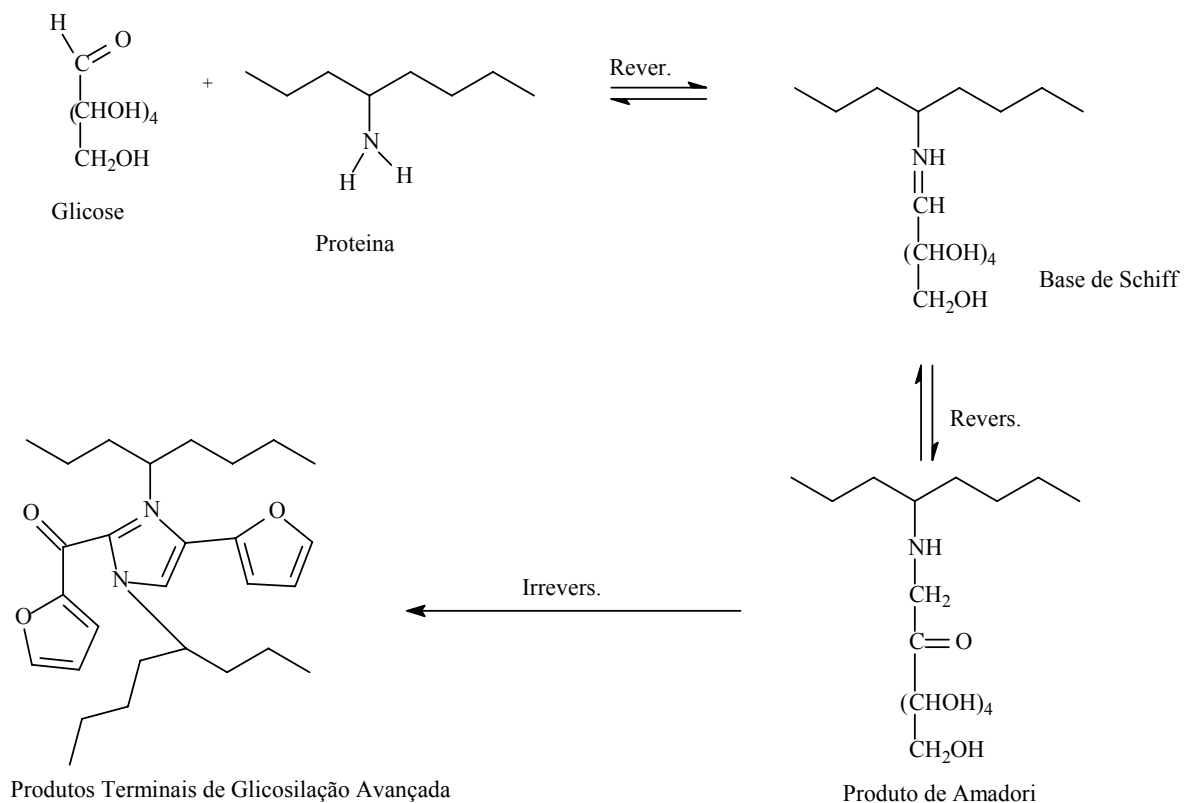


Figura 5.1 Reação de Maillard com formação de produtos terminais de glicosilação avançada (Brownlee et al., 1984 com modificações).

A glicosilação com formação da Base de Schiff e posterior rearranjo para os Produtos de Amadori são reações não enzimáticas reversíveis, enquanto a produção dos Produtos Terminais de Glicosilação Avançada (PTGAs) são reações irreversíveis.

Nesse modelo, a glicose reage com grupamentos amins de proteínas formando uma base de Schiff em uma reação reversível. Esse intermediário instável sofre um rearranjo reversível para uma cetoamina, mais estável, que é também chamada de produto de Amadori, em homenagem ao químico italiano que primeiramente observou esse composto. O termo “estresse carbonílico” é usado na literatura para salientar a produção excessiva desses compostos. Os produtos de Amadori, após um período de meses, podem reagir com grupamentos amins de outras proteínas e formar ligações cruzadas irreversíveis como de condensação, β

eliminação ou hidratação e, portanto, alterar a estrutura e a função dessas substâncias. Estas reações resultam na formação de produtos irreversíveis, chamados de Produtos Terminais de Glicosilação Avançada (PTGA), ou “Advanced Glycation End Products” (AGE’s), (VLASSARA et al., 1994; BIERHAUS et al., 1998; MOHAMED et al., 1999; RAHBAR et al., 1999).

Os produtos terminais de glicosilação avançada formam-se lentamente em pessoas normoglicêmicas, entretanto, quando os níveis de glicose aumentam a formação ocorre mais rapidamente. Assim, em pacientes diabéticos e em modelos animais de diabetes, essas reações não enzimáticas são aceleradas e, juntamente com a taxa de renovação (Turnover) aumentada de proteínas e lipídeos, causam um aumento da glicosilação e acúmulo de PTGAs em proteínas estruturais de vida longa como o colágeno, fibronectina, tubulina, mielina, actina, hemoglobina, albumina, lipoproteínas e outras. Além disso, o acúmulo dos PTGAs é irreversível, isso é, mesmo com o controle do diabetes e a normalização da glicemia os produtos terminais de glicosilação continuarão acumulados nas proteínas alvos. Logo, quanto maior a glicemia, o tempo de diabetes e o descontrole metabólico, maior a produção de PTGAs e maiores são os danos às proteínas (RAHBAR et al., 1999).

Recentemente, foi descoberto que vários tipos de células como as endoteliais, mesangliais, neuronais além dos monócitos/macrófagos expressam em sua superfície celular um receptor para os produtos terminais de glicosilação avançada chamados de RAGEs (BROWNLEE et al., 1988; VLASSARA et al., 1989). Da mesma forma, a ligação dos PTGAs com seus receptores levaria a prejuízos no funcionamento celular, culminando nos problemas angiopatológicos existente no diabetes (MITSUHASHI et al., 1993; YAMAGISHI et al., 1995). Experimentos com camundongos transgênicos conduzidos por Yamamoto e colaboradores (2000, 2001) mostram que a superexpressão dos RAGES em células vasculares aumenta a

nefropatia diabética.

Outros experimentos importantes foram realizados na década de noventa e caracterizavam-se pela administração, em animais diabéticos, de PTGAs a curto e longo prazo. A administração, por curto período de tempo (até seis dias), resultou em conseqüências como aumento da permeabilidade vascular, diminuição do relaxamento endotelial, recrutamento mononuclear subendotelial, ativação do fator de transcrição NF-KB e subsequente expressão do gene dependente de NF-KB. Já a administração de PTGAs por períodos prolongados levou ao espessamento na membrana basal das arteríolas e uma complexa disfunção vascular. Também levou á expansão mesangial, à glomeruloesclerose e proteinúria (BIERHAUS et al., 1998; SCHMIDT et al., 1995; STITT et al., 1997; VLASSARA et al., 1992; VLASSARA et al., 1994; VLASSARA et al., 1995; VLASSARA et al., 1996; WAUTIER et al., 1996).

A autoxidação da glicose é um bom exemplo de ligação entre hiperglicemia e estresse oxidativo. Nessas reações, compostos contendo uma estrutura de alfa-hidroxialdeído podem sofrer oxidação catalisada por metais de transição com geração de peróxido de hidrogênio, radicais livres intermediários e cetaldeídos.

Segundo WOLFF & DEAN (1987), o monossacarídeo se enolisa e seqüencialmente reduz um metal de transição e oxigênio molecular gerando radical superóxido e cetaldeído. A dismutação, promovida pela enzima antioxidante endógena, superóxido dismutase, gera peróxido de hidrogênio, (a partir dos radicais superóxidos) os quais reoxidam os metais de transição produzindo radicais hidroxil **(Figura 5.2)**.

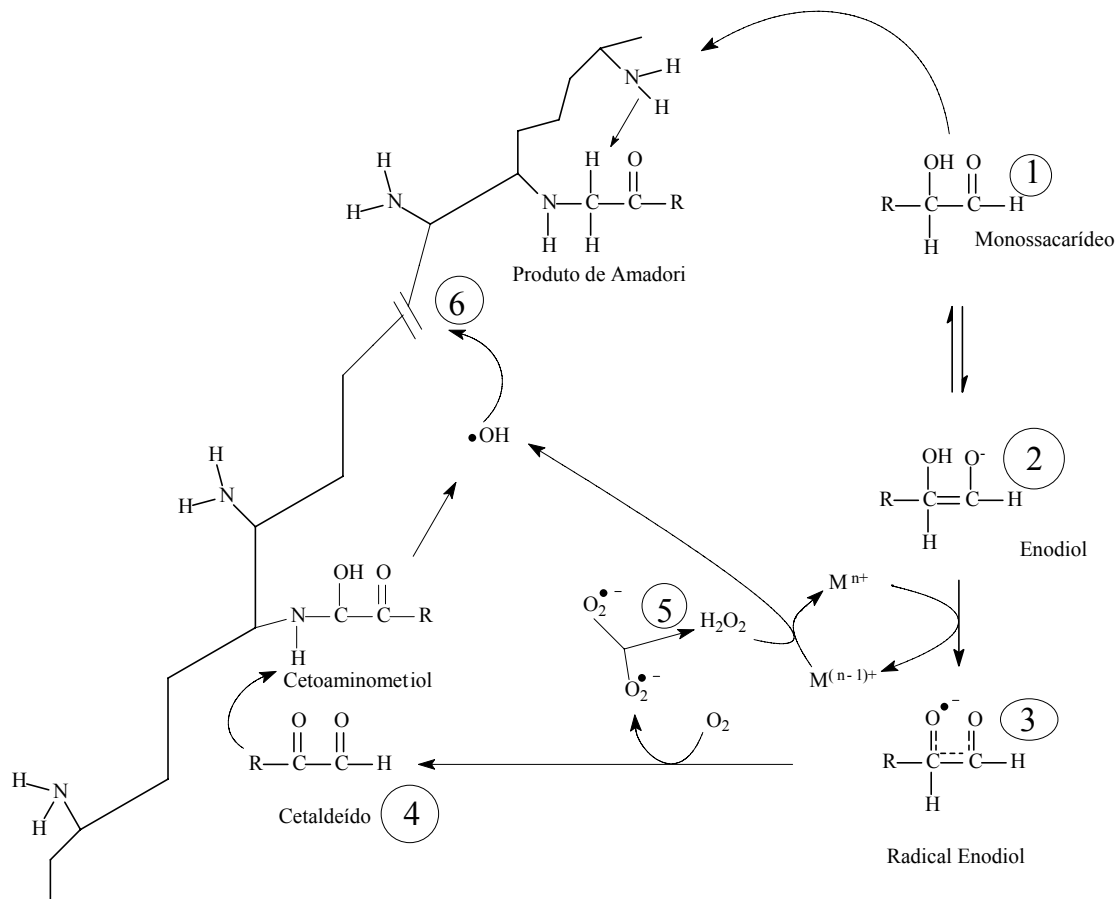


Figura 5.2 Contribuição da autoxidação da glicose e a produção de radical hidroxil para produção de dano protéico induzido pela glicose (Hunt et al., 1988 com modificações).

- 1, 2, 3 – Enólise espontânea da glicose com redução de metal de transição;
- 3, 4 – Produção de Cetaldeído e radical superóxido;
- 4, 5 – Neutralização do radical superóxido (SOD) e produção de peróxido de hidrogênio;
- 5, 6 – Reoxidação do metal de transição com produção de radical hidroxil culminando com o dano tecidual.

A glicose, portanto, nos meios biológicos, pode ligar-se a proteínas, formando produtos terminais de glicosilação avançada através da reação de Maillard ou pode ainda sofrer autooxidação. Ambos os processos culminam com a produção de radicais livres e posterior depleção de antioxidantes endógenos levando ao surgimento do estresse oxidativo. A partir do momento em que esses processos acontecem surgem lesões teciduais devido aos danos moleculares promovidos pelo estresse oxidativo e glicosilação. Com o passar do tempo de diabetes, os pacientes acumulam PTGAs e desenvolvem um envelhecimento vascular generalizado observado principalmente por nefropatia, retinopatia, neuropatia além de complicações vasculares generalizadas (**Figura 5.3**).

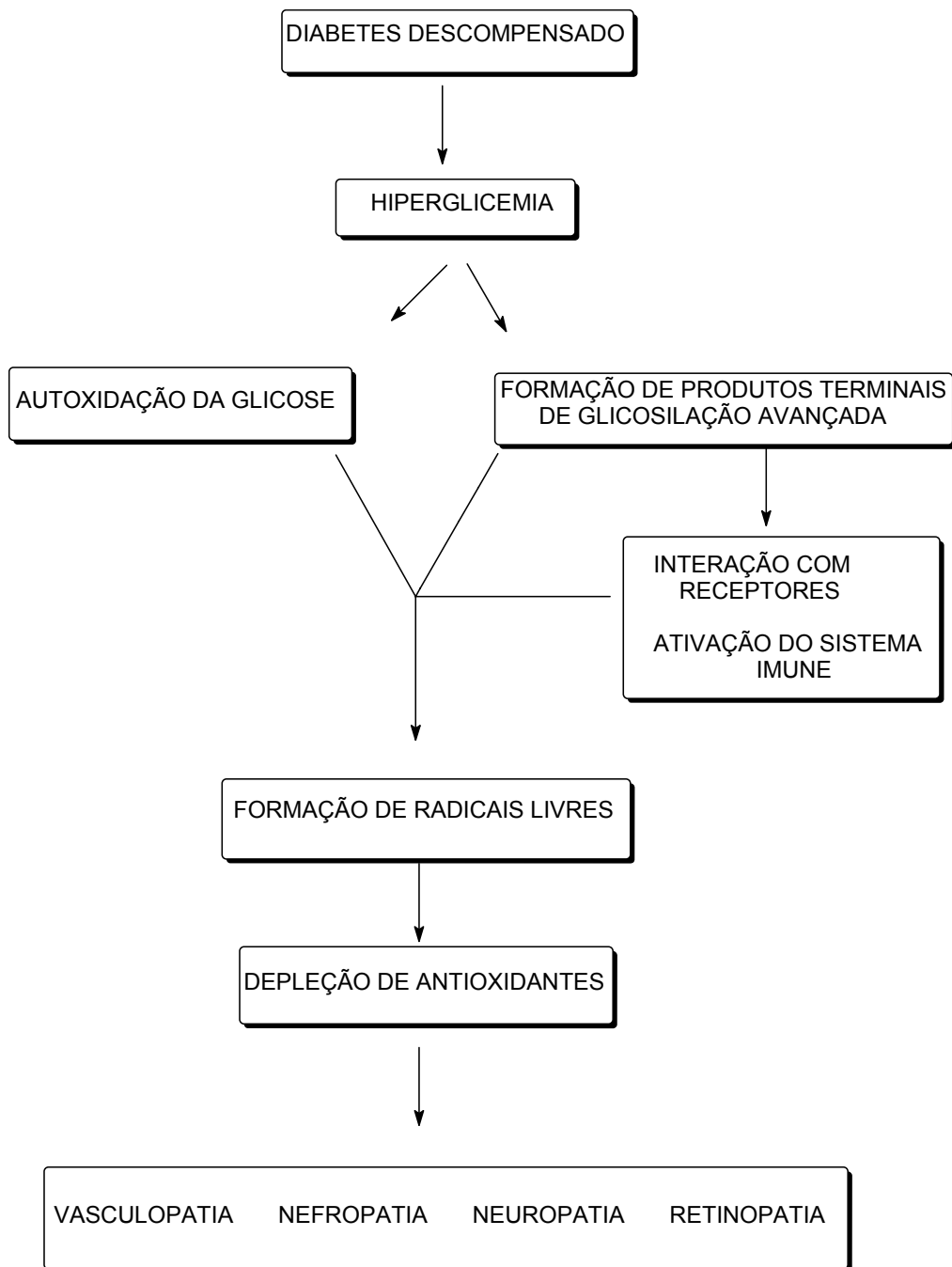


Figura 5.3. Ligação entre estresse oxidativo e as possíveis reações da glicose no organismo durante o diabetes (Mohamed et al., 1999 com modificações).

5.2 A ENZIMA DELTA-AMINOLEVULINATO DESIDRATASE

A metaloenzima citoplasmática δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), também conhecida por porfobilinogênio sintase ou 5-aminolevulinato hidrolase foi isolada na década de 50 (DRESEL & FALK, 1953; GIBSON et al., 1955). Essa enzima homo-octâmera catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido 5-aminolevulínico (ALA) para formar o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG) que é um precursor dos compostos tetrapirrólicos (JAFFE, 1995).

No mecanismo proposto para a síntese do porfobilinogênio, um resíduo lisil do sítio ativo da enzima forma uma base de Schiff com a primeira molécula de substrato (ALA). A base de Schiff é, por enquanto, o único intermediário caracterizado da reação, a qual origina a cadeia lateral P (cadeia propiônica). A segunda molécula do substrato envolvida na síntese do PBG dá origem a cadeia lateral A (acética) (**figura 5.4**) (CASTELFRANCO & BEABLE, 1983).

A reação catalisada pela δ -ALA-D faz parte da rota biossintética dos composto tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e hemes) como pode ser visto na (**figura 5.5**). Esses compostos ganham importância, pois participam da estrutura de várias proteínas por atuarem como grupos prostéticos. O heme (ferroprotoporfirina) 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 et al., 1995). A via para a biossíntese de porfirinas é semelhante em bactérias, vegetais e animais (BELLINASSO, 1985; AMAZARRAY, 1986; RODRIGUES, 1987).

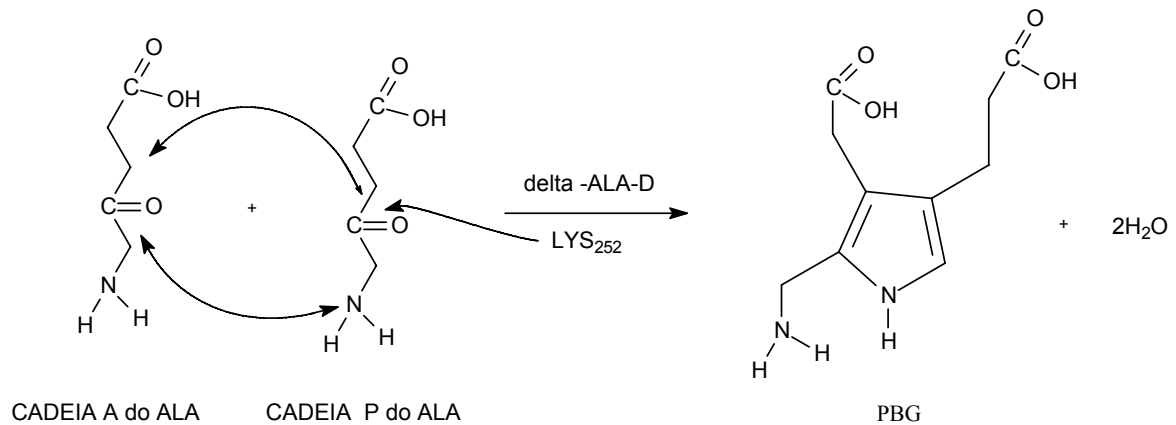


Figura 5.4 Condensação assimétrica de duas moléculas do ácido 5-aminolevulínico catalisada pela enzima δ -ALA-D

- **Cadeia Lateral P do ALA**, originária da primeira molécula de substrato, a qual forma a porção propionil do PBG. O nitrogênio do grupo amino dessa porção é incorporado no anel pirrólico do produto. Esta cadeia liga-se primeiro e forma uma base de Schiff com o resíduo lisil (lisina-252 na δ -ALA-D de mamíferos e lisina-246 na δ -ALA-D de *E. coli*).
- **Cadeia Lateral A do ALA**, originária da segunda molécula de substrato, a qual forma a porção acetil do PBG. O nitrogênio do grupo amino dessa porção permanece livre.

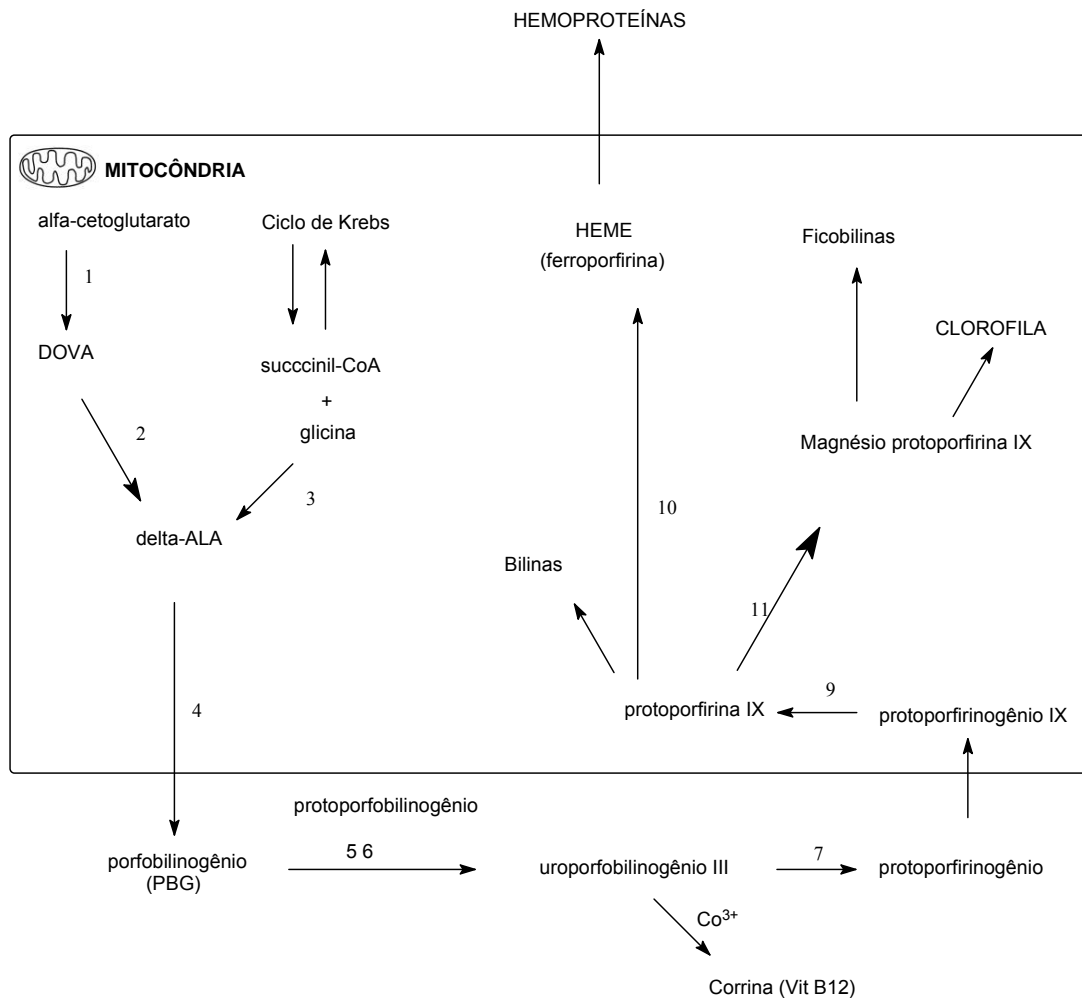


Figura 5.5 Via de Biossíntese dos Compostos Tetrapirrólicos

1. Redutase
2. DOVA-transaminase
3. δ -ALA sintase
4. δ -ALA desidratase
5. Uroporfirino I sintase
6. Uroporfirinogênio III Cossintase
7. Uroporfobilinogênio descarboxilase
8. Coproporfobilinogênio oxidase
9. Protoporfobilinogênio oxidase
10. Ferro-quelatase
11. Magnésio-quelatase

À Cerca de 10 anos atrás foi demonstrado que a enzima δ -ALA-D é idêntica ao inibidor de proteossoma de 240-kDa (CF-2) (GUO et al., 1994). Estes achados conferem a δ -ALA-D uma importância adicional, uma vez que os proteossomas atuam na degradação de proteínas anormais, fatores de transcrição, oncoproteínas, bem como no processamento de antígenos (WLODAWER, 1995).

5.2.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS:

Existe uma grande similaridade entre as seqüências do gene da δ -ALA-D isolado de diversas fontes (humano, WETMUR et al., 1986; *Escherichia coli*, ECHELARD et al., 1988; camundongo, BISHOP et al., 1989; ervilha, BOESE et al., 1991), sugerindo que a enzima apresenta estrutura e mecanismo básico de ação similares em diferentes organismos.

A δ -ALA-D de fígado bovino possui peso molecular de 280 KDa (TIGIER et al., 1970; WU et al, 1974; SHEMIN, 1976; FUJITA et al., 1981), sendo composta por 8 subunidades de 35 KDa cada uma (WILSON et al, 1972; WU et al., 1974; SHEMIN, 1976; FUJITA et al., 1981), arranjadas em uma estrutura cúbica octamérica, com simetria diédrica (WU et al., 1974).

Todas as enzimas δ -ALA-D isoladas até o momento requerem um íon metálico bivalente para estarem ativas, sendo em sua maioria inibidas por EDTA. Apesar do alto grau de similaridade entre os genes da δ -ALA-D provenientes de diversos organismos, a enzima requer metais diferentes para sua ativação, de acordo com a sua fonte. A δ -ALA-D proveniente de animais, leveduras e de algumas bactérias é uma enzima dependente de zinco (CHEH & NEILANDS, 1973; FINELLI et al., 1974), tendo sido demonstrado o envolvimento de resíduos de cisteína na união deste metal (DENT et al., 1990; MITCHELL & JAFFE, 1993; SPENCER & JORDAN, 1994). A enzima proveniente de vegetais, apesar de possuir uma

similaridade de 35-50 % com a δ -ALA-D de outras fontes, requer magnésio ao invés de zinco (SHIBATA & OCHIAI, 1977; TOMAI et al., 1979). A região rica em cisteínas presentes na enzima de origem animal, e que corresponde a região que supostamente liga zinco, é substituída na enzima de vegetais por uma região rica em aspartato, que caracterizaria o sítio para a união do magnésio (BOESE et al., 1991; SCHAUMBURG et al., 1991).

A δ -ALA-D, independente de sua fonte, é uma enzima de natureza sulfidrílica (SHEMIN, 1976; TSUKAMOTO et al., 1979; BEVAN et al., 1980), sendo, portanto, inibida por agentes bloqueadores de grupos tiólicos, tais como N-etilmaleimida, iodoacetato (BATLLE et al., 1967; CHAUDHRY et al., 1976; JORDAN et al., 1976; BARNARD et al., 1977), paracloromercuriobenzoato, monoiodoacetamida e DTNB (BARREIRO, 1967; BATLLE et al., 1967; TIGIER et al., 1970; WILSON et al., 1972; BARNARD et al., 1977; SHIBATA & OCHIAI, 1977; TAMAI et al., 1979; Rodrigues, 1989) e por metais pesados que possuem elevada afinidade por grupamentos sulfidrílicos, tais como chumbo, cobre e mercúrio (GIBSON et al., 1955; WILSON et al., 1972; FINELLI et al., 1975; SHIBATA & OCHIAI, 1977; TOMAI et al., 1979; NELSON et al., 1981; GOERING & FOWLER, 1984, 1985; GOERING et al., 1986; RODRIGUES et al., 1989, 1996; BORRALHO et al., 1990; ROCHA et al., 1993, 1995; EMANUELLI et al., 1996). Alguns compostos orgânicos e inorgânicos de selênio e de telúrio também podem inibir a enzima δ -ALA-D pela oxidação de seus grupamentos sulfidrílicos (BARBOSA et al., 1998).

A enzima é facilmente inativada durante a purificação e a diminuição da atividade está diretamente relacionada com a perda de 2 grupos sulfidrílica/subunidade. Para obtenção da atividade catalítica máxima é necessária, geralmente, a adição de ativadores tiólicos, como ditiltreitól (DTT), cisteína,

glutaciona e β -mercaptoetanol. Entretanto, quando a enzima é isolada na presença de zinco (TSUKAMOTO et al., 1979) ou de um agente redutor (GIBSON et al., 1955; TSUKAMOTO et al., 1979; BEVAN et al., 1980), ela apresenta atividade máxima mesmo sem a adição de um ativador tiólico no meio de incubação (TSUKAMOTO et al., 1979). O pH ótimo para a determinação da atividade da δ -ALA-D varia de 6,2 a 9,5, de acordo com a sua fonte (BARREIRO et al., 1967; HODSON et al., 1977). A enzima de origem animal apresenta valores mais baixos de pH ótimo (GRANICK & MAUZERALL, 1958; GIBSON et al., 1955) que a de origem vegetal (SHIBATA & OCHIAI, 1977; TAMAI et al., 1979). A atividade máxima da enzima geralmente é observada com temperaturas de incubação entre 55 e 65 °C (TIGIER et al., 1968; WILSON et al., 1972; BELLINASSO, 1985). Os valores de K_m (constante de Michaelis-Menten) variam de 0,14 mM para a enzima de fígado bovino (GIBSON et al., 1955) a 6,6 mM para folhas de *Ricinus communis* (“mamona”) (AMAZARRY, 1986). Recentemente foi observado que Mg^{2+} reduz o K_m da δ -ALA-D de *E. coli* (JAFFE et al., 1995).

A curva de velocidade da reação em função da concentração de substrato, para a δ -ALA-D de origem animal, apresenta um perfil sigmóide, indicando um caráter alostérico da enzima (VERGNANO et al., 1968; CHINARRO et al., 1983), enquanto que a δ -ALA-D de *Saccharomyces cerevisiae* exibe uma cinética tipicamente Michaeliana (BORRALHO et al., 1990).

Até o momento foram identificadas 3 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 et al., 1982), resultantes da expressão de 2 alelos comuns ALA-D¹ e ALA-D². Recentemente foi observado que indivíduos portadores do alelo ALA-D² apresentam um maior conteúdo de chumbo no organismo e maior risco de

intoxicação por chumbo, possivelmente devido à maior afinidade da enzima pelo chumbo, determinada por este alelo (WETMUR, 1994).

5.2.2 AÇÃO CATALÍTICA:

O sítio ativo da enzima parece ser composto por resíduos de cisteína, dois átomos de zinco, um resíduo de histidina, um resíduo de lisina e resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (TSUKAMOTO et al., 1979; CHINARRO et al., 1983; JAFFE et al., 1994).

Estudos utilizando substrato marcado ([5-¹³C]ALA, JORDAN & SEEHRA, 1980; [5-¹⁴C]ALA, JORDAN & GIBBS, 1985) demonstraram que um grupamento ε-amino de um resíduo de lisina presente no sítio ativo forma uma base de Schiff com o C₄ da primeira molécula de substrato, a qual origina a cadeia lateral P (propiónica) da molécula de porfobilinogênio. A união desta primeira molécula de substrato não requer zinco ou grupamentos sulfidrílicos reduzidos. No entanto, para a união da segunda molécula de ALA, a qual originará a cadeia lateral A (acética) do porfobilinogênio, são necessários zinco e/ou grupamentos sulfidrílicos (JAFFE & MARKHAM, 1987). As duas moléculas de substrato interagem no sítio ativo da enzima, aparentemente, através de uma ligação carbono-nitrogênio (base de Schiff) (JAFFE et al., 1990). A δ-ALA-D possui 8 subunidades, no entanto, apenas metade das subunidades parece estar envolvida na catálise (SHEMIN, 1976; JAFFE & HANES, 1986), ocorrendo o fenômeno de “half-site reactivity” (SEYDOUX et al., 1974).

Atualmente sabe-se que 3 tipos diferentes de aminoácidos são essenciais para a atividade da δ-ALA-D:

a- um resíduo de lisina ao qual se liga a primeira molécula de substrato, através de uma base de Schiff (NANDI, 1978; GIBBS & JORDAN, 1986);

- b- um resíduo de histidina, o qual pode sofrer fotooxidação, reduzindo tanto a atividade enzimática quanto a ligação ao zinco (TSUKAMOTO et al., 1979). Este resíduo poderia participar no mecanismo de transferência de prótons do meio aquoso ao sítio ativo hidrofóbico (BATLLE & STELLA, 1978);
- c- dois resíduos de cisteína, os quais devem estar reduzidos para que a enzima apresente atividade (CHEN & NEILANDS, 1976). Estes resíduos são altamente reativos (GIBBS et al, 1985), podendo formar uma ponte dissulfeto em presença de ar, formar mercaptídeos por reação com metais pesados ou ser modificados por agentes químicos. A oxidação desses resíduos leva à inativação com concomitante perda do zinco ligado (TSUKAMOTO et al., 1979).

5.2.3 A FUNÇÃO DO ZINCO

A atividade da δ -ALA-D de mamíferos é inibida por quelantes como o EDTA e a 1,10-fenantrolina (CHEH & NEILANDS, 1976; SOMMER & BEYERSMANN, 1984). Esta inibição pode ser revertida pela adição de zinco (BEVAN et al., 1980), demonstrando que o zinco faz parte da estrutura da enzima. A δ -ALA-D de mamíferos requer zinco para estar ativa. Quando isolada, esta liga 8 Zn^{2+} /octâmero (TSUKAMOTO et al., 1979; BEVAN et al., 1980; SOMMER & BEYERSMANN, 1984), no entanto existe controvérsia quanto ao número de átomos de zinco que seria necessário para a atividade máxima da enzima, com este número variando entre 4 e 8 (SHEMIN, 1976; BEVAN et al., 1980; TSUKAMOTO et al., 1980; JAFFE et al., 1984). Aparentemente, quando ensaiada na presença de altas concentrações de um agente redutor, a enzima requer apenas 4 íons zinco por octâmero para apresentar atividade máxima (BEVAN et al., 1980; JAFFE et al., 1984). Estes quatro íons zinco foram denominados catalíticos.

Durante a purificação da δ -ALA-D o Zn^{2+} freqüentemente é perdido. Após a

remoção deste metal por EDTA, os grupos –SH da enzima são facilmente oxidados, com perda da atividade enzimática. A apoenzima oxidada obtida então, não incorpora zinco na ausência de um ativador tiólico (TSUKAMOTO et al., 1979; BEVAN et al., 1980).

O papel do zinco na atividade da δ -ALA-D ainda não está completamente elucidado. Algumas evidências sugerem uma função catalítica direta, enquanto outras apontam para uma função estrutural do zinco na δ -ALA-D (BORDER et al., 1976; TSUKAMOTO et al., 1979; BEVAN et al., 1980; SOMMER & BEYERSMANN, 1984; BEYERSMANN & COX, 1984; GIBBS et al., 1985; HASNIAN et al., 1985; BLOCK et al., 1990; DENT et al., 1990; SPENCER & JORDAN, 1995).

Atualmente, sabe-se da existência de 2 sítios estruturalmente distintos para a ligação do zinco na δ -ALA-D bovina (DENT et al., 1990). Um deles seria composto por 5 ligantes: 2 ou 3 histidinas, 1 ou nenhum oxigênio de um grupo como tirosina ou uma molécula de solvente, 1 tirosina ou aspartato e 1 –SH da cisteína. Este tipo de sítio estaria envolvido na ligação dos 4 íons zinco essenciais para a completa ativação da δ -ALA-D, os quais têm sido referidos como catalíticos. O zinco catalítico parece ser importante para a união da segunda molécula de substrato, para a formação da primeira ligação entre as duas moléculas de ALA (ligação carbono-nitrogênio) e para a união do produto (JAFFE et al., 1992; SPENCER & JORDAN, 1994). O segundo sítio seria composto por 4 resíduos de cisteína e estaria envolvido na ligação dos outros 4 átomos de zinco não essenciais, os quais têm sido referidos como estruturais. O primeiro tem sido designado sítio A (Zn_A) e o segundo sítio B (Zn_B).

A δ -ALA-D de *E. coli* possui as seqüências que supostamente correspondem aos sítios A e B para a união de zinco, encontrados na δ -ALA-D de mamíferos

(JAFFE, 1993). Esta enzima apresenta 2 mol Zn^{2+} /mol de subunidade, possuindo 2 sítios diferentes de ligação para o metal, sítios alfa ou A e os sítios beta ou B (SPENCER & JORDAN, 1995). A presença de 2 sítios diferentes para a ligação do metal (Zn^{2+} , na enzima de origem animal e Mg^{2+} na enzima de origem vegetal) pode indicar mais de uma função para os íons metálicos, possivelmente catalítica e estrutural (SPENCER & JORDAN, 1993). Jaffe et al. (1994) obtiveram evidências de que o sítio B para a união de zinco na enzima de mamíferos estaria localizado no sítio ativo da enzima, mas não possuiria ação catalítica, tendo sido especulado que o zinco ligado a este sítio poderia ter a função de manter grupos -SH no estado reduzido. Evidências experimentais recentes confirmam a hipótese de que o zinco ligado ao sítio B na δ -ALA-D de mamíferos possui um papel antioxidante (EMANUELLI et al., 1996).

5.2.4 IMPORTÂNCIA TOXICOLÓGICA

Devido a sua natureza sulfidrídica, a enzima δ -ALA-D pode ser inibida por uma variedade de metais pesados e não metais que possuam a propriedade química de oxidar grupamentos -SH. Sabe-se que o prognóstico de pacientes que sofreram intoxicação por chumbo pode ser avaliado de acordo com a inibição da δ -ALA-D de eritrócitos e seu índice de reativação por DTT (BONSIGNORE, 1966; NAKAO et al., 1968; HERNEBERG et al., 1970; MITCHELL et al., 1977; MEREDITH et al., 1979). A inibição da δ -ALA-D pode prejudicar a rota biossintética do heme, tendo conseqüências patológicas (SASSA et al., 1989; GOERING, 1993). Além da insuficiente produção de heme, a inibição da δ -ALA-D pode resultar no acúmulo do substrato ALA no sangue, com conseqüente aumento na excreção urinária do mesmo. O acúmulo de ALA está relacionado com a superprodução de espécies

reativas de oxigênio (MONTEIRO et al., 1989; PEREIRA et al., 1992; BECHARA et al., 1993). Pesquisas recentes demonstram que, em ratos, a oxidação aeróbica do ALA promove um aumento anormal no tamanho de mitocôndrias (HERMES-LIMA et al., 1990). Em estudos feitos com eqüinos e roedores, o excesso de ALA induz a liberação do íon ferro da ferritina *in vitro*, iniciando um processo de peroxidação lipídica no baço e no fígado destes animais (OTEIZA et al., 1994). Isto pode estar associado com o fato de que pacientes com porfiria intermitente aguda e que, por conseqüência, possuem elevadas concentrações de ALA no sangue, apresentam altos níveis eritrocitários de SOD e GSHPx. O ALA gerado no fígado e medula óssea pode atravessar a barreira hematoencefálica, sendo distribuído pelo sistema nervoso central, além de outros órgãos (McGILLION et al., 1974; 1975). A nível neuroquímico, 1 μ M de ALA é capaz de inibir a liberação do neurotransmissor ácido- γ -aminobutírico, assim como a sua ligação nas membranas sinápticas (BRENNAN et al., 1979; 1980). ALA também demonstrou poder inibitório sobre a atividade da Na⁺ K⁺ ATPase de cérebro e eritrócitos de coelhos (BECKER et al., 1971), além de diminuir a velocidade de condução de impulsos nervosos motores em camundongos (CUTLER et al., 1979). Assim, o aumento na concentração de ALA, devido à inibição da enzima δ -ALA-D, pode acarretar em conseqüências patológicas inespecíficas, uma vez que a produção exagerada de espécies reativas de oxigênio pode atuar nos mais diferentes órgãos e compartimentos celulares dos organismos nos quais são gerados.

5.2.5 ALGUMAS RELAÇÕES ENTRE A ATIVIDADE DA δ -ALA-D E O DIABETES

Como já foi mencionado anteriormente, a δ -ALA-D é uma enzima essencial

para todos os organismos aeróbicos, uma vez que ela participa da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos, os quais formam grupos prostéticos de proteínas fisiologicamente importantes como a hemoglobina e os citocromos, as quais possuem papel central em muitos processos metabólicos na célula (JAFFE et al., 1995; SASSA, 1998).

A δ -ALA-D é uma das enzimas mais sensíveis da rota biossintética do heme e, portanto, tem sido investigada em várias patologias. Existem diversos dados na literatura correlacionando disfunções na rota de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos com patologias. Dentre eles figuram relatos de coexistência de porfirias e diabetes mellitus, principalmente a porfiria cutânea tardia. (BURNHAM & FOSSNAUGH, 1961; GOERZ & KORDA, 1977; STRIFFLER et al., 1998; BITAR & WEINER, 1984; SCASSA et al., 1998). Os estudos relatam que 25% dos pacientes com porfirias tem associação clínica com diabetes, sugerindo, portanto, que é alta a prevalência de diabetes na população porfírica, e também que a porfiria pode fazer parte da relação das chamadas complicações diabéticas tardias (CABALLERO et al., 1995).

Alguns trabalhos evidenciam a inibição de enzimas como a δ -ALA-D, porfobilinogênio desaminase e rodanase em fígado de camundongos com diabetes induzido por estreptozotocina (STZ). A inibição dessas três enzimas é impedida pela administração de α -tocoferol. Esse fato remete à participação da glicosilação protéica na inibição dessas enzimas, pois o α -tocoferol é um potente inibidor de glicosilação (CERIELLO et al., 1988; POLO et al., 1995).

O estresse oxidativo é relacionado como causa principal da inibição da δ -ALA-D em alguns trabalhos com eritrócitos de camundongos com diabetes induzido

por STZ em eritrócitos humanos. Nesse mecanismo a atividade é recuperada pela adição de tióis e zinco (BITAR et al., 1984; FERNÁNDEZ-CUARTERO et al., 1999).

Caballero e colaboradores (1998), realizaram um estudo onde eritrócitos humanos foram incubados por vinte horas com 500 mM de glicose. Nessas condições, o grupo de pesquisa evidenciou uma inibição da enzima δ -ALA-D proporcional à formação de hemoglobina glicada (HbA). Além disso, esses resultados não foram acompanhados de um aumento da produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) sugerindo, conforme os autores do trabalho, que a autooxidação da glicose com posterior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), não estaria envolvida na inibição da enzima. Nesse trabalho, a atividade da enzima foi preservada com a pré-incubação da enzima com ácido acetil salicílico que também diminuiu os níveis de hemoglobina glicada. O mesmo grupo, posteriormente, achou resultados diferentes sobre a inibição da δ -ALA-D *in vivo*. Nesse último trabalho, experimentos com camundongos diabéticos induzido por administração de STZ mostraram um aumento nos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e a inibição da enzima foi também prevenida pela administração de AAS. Nos dois trabalhos os autores citam que a enzima está inibida pela glicosilação e a proteção conferida pelo AAS seria baseada na acetilação de grupamentos aminas livres de proteínas. Todavia, esta explicação parece falha, pois a acetilação de grupos aminas livres essenciais à catálise levariam obrigatoriamente a inibição da enzima.

Em suas pesquisas Folmer et al. (2002) observaram que, no tecido renal, hepático e cerebral, há uma correlação negativa entre a atividade da δ -ALA-D e a porcentagem de HbA, e da mesma forma entre a atividade da δ -ALA-D e os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nesse trabalho o estresse

oxidativo e/ou a glicosilação de resíduos de lisina são numerados como possíveis fatores responsáveis pela inibição da enzima.

Algumas pesquisas obtiveram evidências de que a hipoatividade da δ -ALA-D não é dependente do tipo de diabetes, do tipo de terapia utilizada pelos pacientes, e nem das complicações fisiopatológicas (SALAMANCA et al., 1999). Estes autores concluíram também que a atividade da δ -ALA-D eritrocitária, inibida em pacientes diabéticos, pode ser um parâmetro usual na avaliação do metabolismo alterado dos carboidratos (FERNÁNDEZ-CUARTERO et al., 1999).

Assim, ocorrem divergências sobre o mecanismo de inibição da enzima delta-aminolevulinato desidratase pelo diabetes e exposição da enzima à glicose *in vitro*. Os principais mecanismos supostos são a glicosilação dos resíduos de lisina do sitio ativo da enzima é a presença de estresse oxidativo que levaria a oxidação dos grupamentos sulfidrílicos da mesma.

6 ARTIGO

HUMAN ERYTHROCYTE PORPHOBILINOGEN SYNTHASE INHIBITION BY MONOSACCHARIDES IN IS NOT MEDIATED BY OXIDATION OF ENZYME SULFHYDRYL GROUPS

D. Gabriel, L. Pivetta, V. Folmer, J.C.M. Soares, G. R. Augusti and J.B.T. Rocha*

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas Universidade
Federal de Santa Maria 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

*Artigo submetido para revista Cell Biology International – ISSN 1065 – 6995 -
Publisher - Academic Press*

* CORRESPONDING AUTHOR:
JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA
Fax: 0+55552208031
e-mail: jbtrocha@yahoo.com.br

6.1 ABSTRACT

The heme pathway enzyme δ -aminolevulinate dehydratase is a good marker for oxidative stress and metal intoxication. This sulfhydryl enzyme is inhibited in such oxidative pathologies as lead, mercury and aluminum intoxication, exposure to selenium organic species and diabetes. Oxidative stress is one complicating factor in diabetes, inducing non-enzymatic glucose-mediated reactions that change protein structures and impair enzyme functions. We have studied the effects of high glucose, fructose and ribose concentrations on δ -ALA-D activity *in vitro*. These reducing sugars inhibited δ -ALA-D with efficacies in the order fructose=ribose>glucose. The possible mechanism of glucose inhibition was investigated using lysine, DTT, and *t*-butylamine. Oxidation of the enzyme's critical sulfhydryl groups was not involved because DTT had no effect. We concluded that high concentrations of reducing sugars or their autoxidation products result in glycosilation of the enzyme critical lysine residue.

6.2 Introduction

Diabetes is characterized by hyperglycemia and is treated with insulin or drugs to ameliorate this symptom (STROWIG AND RASKIN, 1992; PINERO-PILONA et al., 2002). The disease leads to debilitating secondary complications that shorten the patient's life span (BROWNLEE *et al.*, 1984). Recently, the molecular mechanisms underlying these secondary complications have been more thoroughly investigated. Evidence suggests that non-enzymatic glucose-mediated reactions such as autoxidation (HUNT et al., 1988; WOLFF AND DEAN 1987a 1987b; CARUBELLI et al., 1994; PARTHIBAN et al., 1995), protein cross-linking (NAMIKI et al., 1977; LI et al., 1996; DAY et al.; 1979; BESWICK et al., 1985) and AGEs formation (STROWIG et al., 1992; SENSI et al., 1995; SOLUIS et al., 1999; RAHBAR et al., 1999; CHEVALIER et al., 2002; FORBES et al., 2003) are involved. There have been numerous studies of the deleterious effects of hyperglycemia on the properties of physiologically abundant proteins such as hemoglobin (SCHWARTZ et al., 1995), albumin (DAY et al., 1979), and collagen (FU et al., 1991). However, published data on the effects of hyperglycemia on less abundant proteins, such as δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D), are rare (CABALLERO et al., 1998).

δ -Aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D), an enzyme in the heme biosynthesis pathway, is essential for all aerobic organisms. It is a marker for oxidative stress because its active sulfhydryl group renders it highly sensitive to pro-oxidant elements (MACIEL et al., 2000; FOLMER et al., 2002a, 2002b), which impair its function (RODRIGUES et al., 1989; ROCHA et al., 1993, 1995; 2004; BARBOSA et al., 1998; FLORA, 1999, 2000; FARINA et al., 2001; JACQUES-SILVA et al., 2001). This enzyme catalyzes the asymmetric condensation of two molecules of 5-

aminolevulinic acid (δ -ALA) to form the monopyrrole porphobilinogen (PBG) (JAFJE et al., 1985; SASSA et al., 1889, 1998) (**Figure 1**). In subsequent steps, PBG is assembled into tetrapyrrole molecules, which constitute the prosthetic groups of physiologically significant proteins such as hemoglobin and cytochromes and enzymes such catalase.

In the presumed mechanism of PBG assembly, a lysyl amino group in δ -ALA-D reacts with the carbonyl group of the first molecule of δ -ALA forming a Schiff base (JAFJE 1995). Subsequently, the free amino group of the δ -ALA-D bound δ -ALA reacts with the carbonyl group of the second δ -ALA molecule, forming a second Schiff base. This latter step requires Zn^{2+} and reduced sulfhydryl groups (JAFJE, 1995) and is blocked by sulfhydryl reagents such as MMTS (methyl methanethiosulfonate). Inhibition of the enzyme leads to disturbances of heme biosynthesis as well as intermediate accumulation, which has shown been to induce pro-oxidant events (PEREIRA et al., 1992; BECHARA et al., 1993).

Importantly, δ -ALA-D activity is impaired in diabetic patients and in animal models of the disease (CABALLERO et al. 2000; FOLMER et al. 2002, 2003). Furthermore, high concentration of glucose and other reducing sugars inhibit δ -ALA-D *in vitro* (CABALLERO et al. 1998). This inhibition is prevented by acetyl salicylic acid and is not associated with increased production of thiobarbituric acid species. The molecular mechanism underlying δ -ALA-D impairment after *in vitro* (or even *in vivo*) exposure to glucose is still not completely understood, but may be caused either by glycation of the active site lysine residue involved in Schiff's base formation with the first δ -ALA molecule, or by oxidation of the essential reduced cysteinyl residues of the enzyme (CABALLERO et al., 1998; FERNÁNDEZ-CUARTERO et al., 1999). In this study, we investigated the capacities of amino-containing substance,

DTT (a sulfhydryl reducing agent) to modulate the inhibitory action of reducing sugars. Furthermore, we showed that short term pre-incubation of blood δ -ALA-D with high concentrations of reducing sugar (glucose, fructose or ribose) had a similar inhibiting effect on the enzyme to long term pre-incubation.

6.3 Material and Methods

Blood Preparation

Venous blood (10 ml) was collected from 30 male and woman normoglycemic fasting young volunteers into heparinized tubes and centrifuged. The concentrated erythrocytes were mixed with Triton X 100 to effect hemolysis.

δ-ALA-D assay

Blood δ-ALA-D activity was assayed by the method of Berlin and Schaller (1974) by measuring the rate of product formation (porphobilinogen), except that 84 mM potassium phosphate buffer, pH 6.4, and 2.4 mM δ-ALA were used. Time of pre-incubation with monosaccharides was 1 h. The reaction was started by adding 200 µl hemolyzed blood to the above medium and stopped after 90 min with 10% TCA containing 10 mM HgCl₂. 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 reaction rates were linear with respect to incubation time and protein concentration under all experimental conditions.

Statistics

Statistical analyses were performed by one or two way ANOVA. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

6.4 RESULTS

Fructose, ribose and glucose caused significant inhibition of δ -ALA-D activity (**Figure 2**). However, glucose inhibited δ -ALA-D with lower potency than fructose and ribose. δ -ALA concentration did not modify the inhibitory effect of glucose regardless of whether the enzyme activity was determined in the presence or absence of ZnCl_2 (data not shown).

DTT, which maintains δ -ALA-D activity *in vitro* when the enzyme is challenged with oxidizing agents, afforded no protection against inhibition by glucose, fructose or ribose (**Figure 3**). This indicates that sulfhydryl group oxidation is not involved in the inhibition. Moreover, ebselen (3 $\mu\text{mol/l}$), an organochalcogenide with antioxidant activity, was similarly ineffective (data not shown). Low-molecular weight amines (lysine and t-butylamine) also failed to protect δ -ALA-D from inhibition by glucose (**Figure 4a and b**).

Zn^{2+} , an essential ion for mammalian δ -ALA-D, caused a small but significant activation of the blood enzyme at 1 mmol/l but was inhibitory at higher concentrations (**Figure 5**). Zn^{2+} had no effect on the inhibition of δ -ALA-D by high concentrations of glucose. The effects of glucose and Zn^{2+} were not modified by the inclusion of lysine in the reaction medium (**Figure 5**).

6.5 DISCUSSION

Glycosylation plays a significant role in protein aging (DAY et al., 1979; HUNT et al., 1988; CURUBELLI et al., 1994; JAIN et al., 1997, 1998, 2001). The reaction starts with the reversible formation of a Schiff base between glucose (or other reducing sugar) and protein amino groups. Subsequently, the unstable Schiff base is rearranged to form a stable Amadori product (SENSI et al., 1995). *In vivo*, Amadori products are formed slowly and play an important role in the development of diabetes complications (CHEVALIER et al. 2002). *In vitro* protein glycosylation can be achieved in short-term experiments with high non-physiological concentrations of reducing sugars. In the present study we showed that exposure to high concentrations of glucose, fructose or ribose caused significant inhibition of blood δ -ALA-D. The possible mechanisms of inhibition were investigated and we reached the following conclusions. First, the oxidation of essential thiol groups is not involved because the thiol protecting and reducing agent DTT was ineffective in counteracting inhibition by glucose and fructose. Consequently, in short-term *in vitro* models of glycosylation, the formation of free radicals that accompanies the glycosylation of amino groups and sugar autoxidation (NAMIKI et al., 1977), which could potentially oxidize essential enzyme –SH groups, seems to play no significant role in δ -ALA-D inhibition. This was further confirmed by the failure of sodium borhydride, an antioxidant, to modify inhibition by glucose or fructose and for literature dates (CABALLERO et al., 1998). Second, high concentrations of compounds containing amino groups such as lysine and tert-butylamine were similarly ineffective. This that the amino groups of these low molecular weight amines are much less reactive than the lysyl amino group at the active center of blood δ -ALA-D. This might not be surprising: amino groups in free amino acids react rapidly with reducing sugars only

under extreme conditions of temperature and pH (NAMIKI et al., 1977), but *in vitro* glycosylation of hemoglobin occurs within a few hours of exposure to high glucose concentrations (CABALLERO et al., 1998). In a previous study, we observed that *in vivo*, hemoglobin glycosylation correlates with δ -ALA-D inhibition in mice (FOLMER et al. 2003).

Consequently, we proposed that the reducing sugar inhibits δ -ALA-D by binding to enzyme critical lysine residues. The relationship of these artificial conditions (high reducing sugar concentrations) to the inhibition of δ -ALA-D *in vivo* after dietary or pathological hyperglycemia deserves further investigation (GUGLIUCCI et al., 1996; AL-ZUHAIR et al., 1998; MONTENEGRO, 2002). However, the fact that δ -ALA-D inhibition promoted by hyperglycemia *in vivo* (FOLMER et al. 2002; 2003) is not reversed by DTT suggests that the mechanism underlying ALA-D inhibition both *in vitro* and *in vivo* does not involve-SH group oxidation.

ACKNOWLEDGEMENTS: Financial support by FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged.

6.6 REFERENCES

- AL-ZUHAIR, H.; MOHAMED, H. E. Vitamin C attenuation of the development of type I diabetes mellitus by interferon-alpha. **Pharmacol Res**, v. 38, p. 59-64, 1998.
- ANSARI, N. H.; WANG, L.; ERWIN, A. A.; CHURCH, D. F. Glucose-dependent formation of free radical species in lens homogenates. **Biochem Mol Med**, v. 59, p. 68-71, 1996.
- BERLIN, A. AND SCHALLER, K. H. European standardized method for the determination of δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. **Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.**, v. 13, p. 389–390, 1974.
- BARBOSA, N. B. V.; ROCHA, J. B. T.; ZENI, G.; EMANUELLI, T.; BEQUE, M.C.; BRAGA, A. L. Effect of organic forms of selenium on δ -aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 149, p. 243-253, 1998.
- BECHARA, E. J. H.; MEDEIROS, M. H. G.; MONTEIRO, H. P.; HERMES-LIMA, M.; PEREIRA, B.; DEMASI, M.; COSTA, C. A.; ADBALLA, D. S. P.; ONUKI, J.; WENDEL, C. M. A.; MASCI, P. D. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Quim. N.**, v. 16, p. 385-392, 1993.
- BESWICK, H. T.; HARDING, J. J. Aldehydes or dicarbonyls in non-enzymic glycosylation of proteins. **Biochem J.**, v. 226, p. 385-389, 1985.
- CABALLERO, F. A.; GEREZ, E. N.; POLO, C. F.; VAZQUEZ, E. S.; BATLLE, A. M. C. Reducing sugars trigger δ -aminolevulinic acid dehydratase inactivation: evidence of in vitro aspirin prevention. **Gen Pharmac.**, v. 31, p. 441-445, 1998.
- CARUBELLI, R.; SCHNEIDER, J. E.; FLOYD, R. Cytotoxic Effects of Autoxidative

- Glycation. **Free Radic Biol Mol.**, v. 18, p. 265-269, 1994.
- CASTELFRANCO, P. A. AND BATLE, A. M. Aminolevulinate dehydratase: Properties y mechanism de acción. **N Arch Fac Med**, v. 45, p. 61-70, 1983.
- CHEVALIER, F.; CHOBERT, J. M.; DALGALARRONDO, M.; CHOISSET, Y.; HAERTLE, T. Maillard glycation of beta-lactoglobulin induces conformation changes. **Nahrung**, v. 46, p. 58-63, 2002.
- DAY, J. F.; THORNBURG, S. R.; BAYNES, J. W. Non-enzymatically glycosylated albumin. **J Biol Chem**, v. 254, p. 595-597, 1979.
- FARINA, M.; FOLMER, V.; BOLZAN, R. C.; ANDRADE, L. H.; ZENI, G.; BRAGA, A. L.; ROCHA, J. B. T. Selenoxides inhibit δ -aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicol Lett**, v. 119, p. 27-37, 2001.
- FERNANDEZ-CUARTERO, B.; REBOLLAR, J. L.; BATLLE, A.; ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R. Delta aminolevulinate dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 31, p. 479-88, 1999.
- FLORA, S. J. S. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of N-acetylcysteine and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 26, p. 865-869, 1999.
- FLORA, S. J. S. Possible Health Hazards Associated with the use of Toxic Metals in Semiconductor Industries. **J Occup Health**, v. 42, p. 105-110, 2000.
- FOLMER, V.; SOARES, J. C. M.; ROCHA, J. B. T. Oxidative Stress in Mice is Dependent on the Free Glucose Content in the Diet. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 34, p. 1279-11285, 2002.
- FOLMER, V.; SOARES, J. C. M.; ROCHA, J. B. T. Influence of Dietary Selenium Supplementation and Exercise on Thiol-Containing Enzymes In Mice. **Nutrition**,

- v. 19, p. 627-632, 2002.
- FORBES, J. M.; THALLAS, V.; THOMAS, M. C.; FOUNDS, H. W.; BURNS, W. C.; JERUMS, G.; COOPER, M. E. The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes. **FASEB J**, v. 17, p. 1762-1764, 2003.
- FU, M. X.; KNECHT, K. J.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Role of oxygen in crosslinking and chemical modification of collagen by glucose. **Diabetes**, v. 41, p. 42-48, 1992.
- GUGLIUCCI, A.; ALLARD, M. F. Glycation of Hepatocyte Cytosolic Proteins in Streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 229, p. 952-958, 1996.
- HUNT, J. V.; DEAN, R. T.; WOLFF, S. P. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation, Glucose oxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and aging. **Biochem J**, v. 256, p. 205-212, 1988.
- JAFFE, E. K.; ALI, S.; MITCHELL, L. W.; TAYLOR, K. M.; VOLIN, M.; MARKHAM G. D. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. **Biochem**, v. 34, p. 244-251, 1995.
- JACQUES-SILVA, M. C.; NOGUEIRA, C. W.; BROCH, L. C.; FLORES, E. M. M.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in brain of mice. **Pharmacol Toxicol**, v. 44, p. 119-125, 2001.
- LI, D.; DEVARAJ, S.; FULLER, C.; BUCALA, R.; JIALAL, I. Effect of alpha-tocopherol on LDL oxidation and glycation: in vitro and in vivo studies. **J Lipid Res**, v. 37, p. 1978-1986, 1996.

- MACIEL, E. M.; BOLZAN, R. C.; BRAGA, A. L.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affects δ -aminolevulinate dehydratase from liver, kidney and brain of mice. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 14, p. 310-319, 2000.
- MOHAMED, A. K.; BIERHAUS, A.; SCHIEKOFER, S.; TRITSCHLER, H.; ZIEGLER R.; NAWROTH, P. P. The role of oxidative stress and NF- κ B activation in late diabetic complications. **Biofactors**, v. 10, p. 157-167, 1999.
- MONTENEGRO, R. M. J.; MONTENEGRO, A. P.; FERNANDES MI DE MORAES, R. R.; ELIAS, J. J.; GOUVEIA, L. M.; MUGLIA, V. F.; FOSS, M. C.; MOREIRA, A. C.; MARTINELLI, C. E. J. Triglyceride-induced diabetes mellitus in congenital generalized lipodystrophy. **J Pediatr Endocrinol Metab.**, v. 15, p. 441-447, 2002.
- NAMIKI, M.; HAIASHI, T.; OHTA, Y. Novel Free Radical formed by the amino-carbonyl reactions of sugars with amino acids, amine and proteins. **Adv Exp Med Biol**, v. 86B, p. 471-501, 1977.
- PARTHIBAN, A.; VIJAYALINGAM, S.; SHANMUGASUNDARAM, K. R.; MOHAN, R. Oxidative Stress and the development of diabetic complications - Antioxidants and lipid peroxidation in erythrocytes and cell membrane. **Cell Biol Interc**, v. 19, p. 987-993, 1995.
- PEREIRA, B.; CURI, R.; KOKUBUN, E.; BECHARA, J. H. 5-aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. **J. Appl. Physiol**, v. 72, p. 226-230, 1992.
- PINERO-PILONA, A.; LITONJURA, P.; DEVARAJ, S.; AVILES-SANTA, L.; RASKIN, P. Anemia associated with new-onset diabetes: improvement with blood glucose control. **Endocr Pract**, v. 8, p. 276-281, 2002.
- RAHBAR, S.; YEMENI, K. K.; SCOTT, S.; GONZALES, N.; LALEZARI, I. Novel

- Inhibitors of Advanced Glycation End products. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 262, p. 651-656, 1999.
- ROCHA, J. B. T.; FREITAS, A. J.; MARQUEZ, M. B.; PEREIRA, M. E.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D. O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinate dehydratase (E. C. 4.2.1.2.4) of suckling rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, p. 1077-1083, 1993.
- ROCHA, J. B. T.; TUERLINCKX, S. M.; SCHETINGER, M. R. C.; FOLMER, V. Effects of group 13 metals on porphobilinogen synthase *in vitro*. **Toxicol App Pharmacol In Press**, 2004.
- ROCHA, J. B. T.; PEREIRA, M. E.; EMANUELLI, T.; CHRISTOFARI, R. S.; SOUZA, D. O. Effects of mercury chloride and lead acetate treatment during the second stage of rapid postnatal brain growth on ALA-D activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicol.**, v. 100, p. 27-37, 1995.
- RODRIGUES, A. L.; BELLINASSO, M. L.; DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus malacatus* (pisces, Pimelodidae). **Comp Biochem Physiol B**, v. 94, p. 65-69, 1989.
- SASSA, S.; FUJITA, H.; KAPPAS, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. **High mod biochem**, v. 1, p. 329-338, 1989.
- SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**, v. 28, p. 133-145, 1982.
- SASSA, S. ALA-D porphyria. **Semin liver dis**, v. 18, p. 95-101, 1998.
- SCHWARTZ, J. G. The role of glycohemoglobin and other proteins in diabetes management. **Diab. Rev**, v. 3, p. 269-287, 1995.
- SENSI, M.; PRICCI, F.; PUGLIESE, G.; DE ROSSI, M. G.; PETRUCCI, A. F. G.; CRISTINA, A.; MORANO, S.; POZZESSERE, G.; VALLE, E.; ANDREANI, D.;

- DI MARIO, U. Role of advanced glycation end-products (AGE) in late diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pr**, v. 28, p. 9-17, 1995.
- SOLUIS, T.; SASTRA, S.; THALLAS, V.; MMORTENSEN, S. B.; WILKEN, M.; CLAUSEN, J. T.; BJERRUM, O. J.; PETERSEN, H.; LAU, J.; JERUMS, G.; BOEL, E.; COOPER, M. E. A novel inhibitor of advanced glycation end-products formation inhibits mesenteric vascular hypertrophy in experimental diabetes. **Diabetologia**, v. 42, p. 472-479, 1999.
- STROWIG, S.; RASKIN, P. Glycemic control and diabetic complications. **Diabetes Care**, v. 15, p. 1126-1140, 1992.
- WOLFF, S. P.; DEAN, R. T. Glucose autoxidation and protein modification - The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. **Biochem J**, v. 245, p.243-250, 1987.
- WOLFF, S. P.; DEAN, R. T. Monosaccharide autoxidation: a potential source of oxidative stress in diabetes? **Bioel Bioen**, v. 18, p. 283-293, 1987.

6.7 FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Asymmetric condensation of two 5-aminolevulinic acid (δ -ALA) molecules catalyzed by delta-aminolevulinic acid deshydratase (δ -ALA-D).

FIGURE 2. Inhibition of Human Erythrocyte δ Aminolevulinic Acid Deshydratase (δ -ALA-D) by Reducing Sugars. Values are means \pm SE (Glucose (n = 6), ribose (n = 5) and fructose (n = 4). (Control = absorbance without glucose, ribose or fructose, 256.72 nmol of PBG/ml of erythrocytes/h).

FIGURE 3. Absence of Antagonism by DTT of δ -Aminolevulinic Acid Deshydratase (δ -ALA-D) activity from human erythrocytes inhibited by glucose (A), fructose (B) and ribose (C) (400 mmol/l, n = 4). Values are means \pm SE. (Control = absorbance of basal, 203.06 nmol of PBG/ml of erythrocytes/h to A, 201.10 nmol of PBG/ml of erythrocytes/h to B and 207.43 nmol of PBG/ml of erythrocytes/h to C).

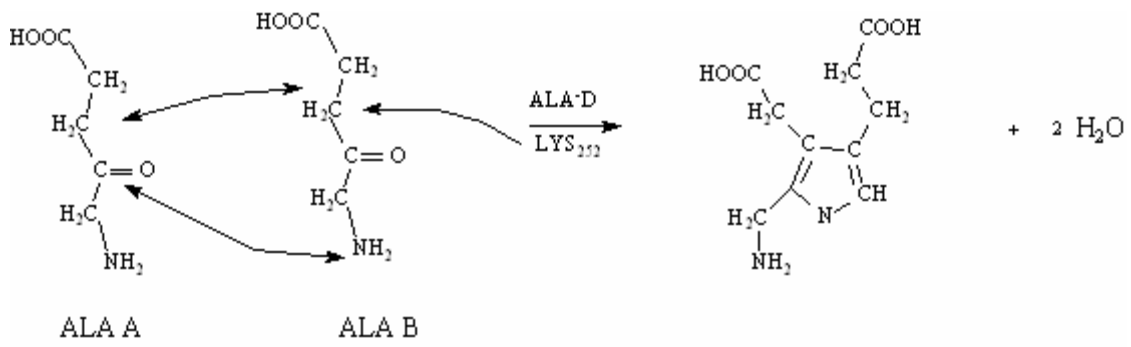
FIGURE 4 Glucose inhibition of delta-Aminolevulinic Acid Deshydratase (δ -ALA-D) activity from human erythrocytes: Absence of Antagonism by Lysine (A), (n = 6); or by t-butylamine (B), (n = 5). Values are means \pm SE. (Control = absorbance of basal, 201.96 nmol of PBG/ml of erythrocytes/h to A. and 187.10 nmol of PBG/ml of erythrocytes/h for B).

FIGURE 5. Delta Aminolevulinic Acid Deshydratase (δ -ALA-D) activity in human erythrocytes: Influence of Zn²⁺ and lysine on enzyme inhibition by glucose (n = 4).

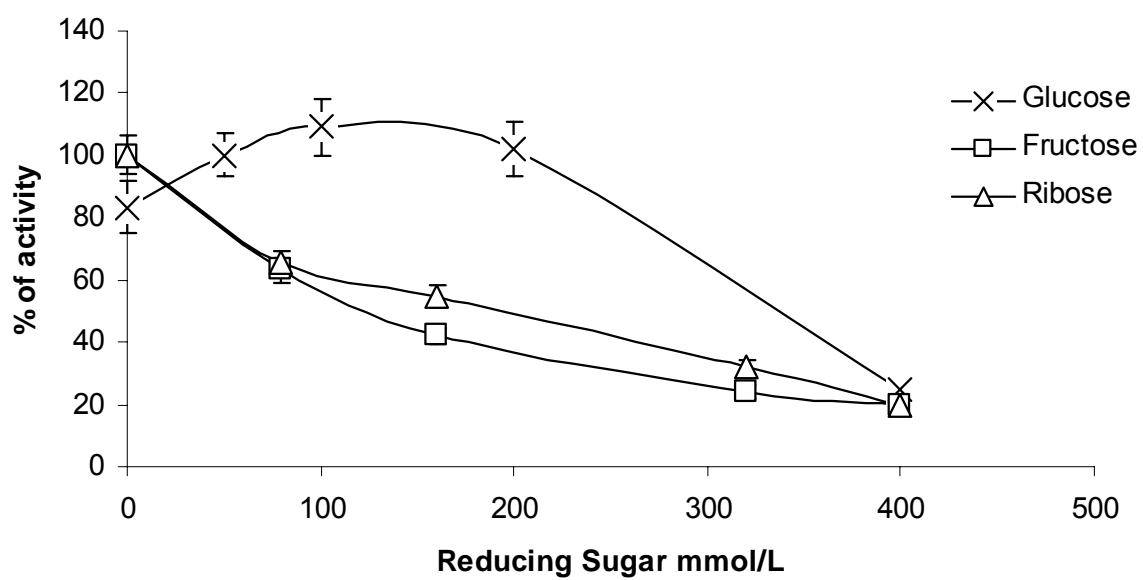
Values are means \pm SE. (Control = absorbance of basal 184.70 nmol of PBG/ml of erythrocytes/h).

6.8 FIGURES

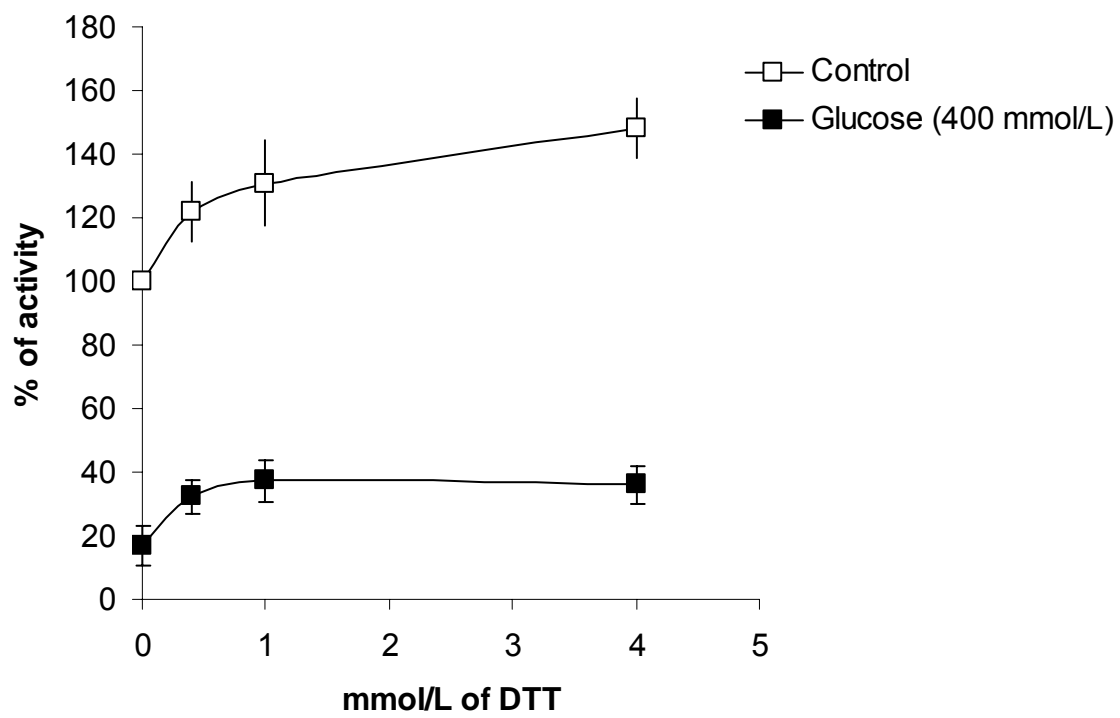
Gabriel et al., Figure 1



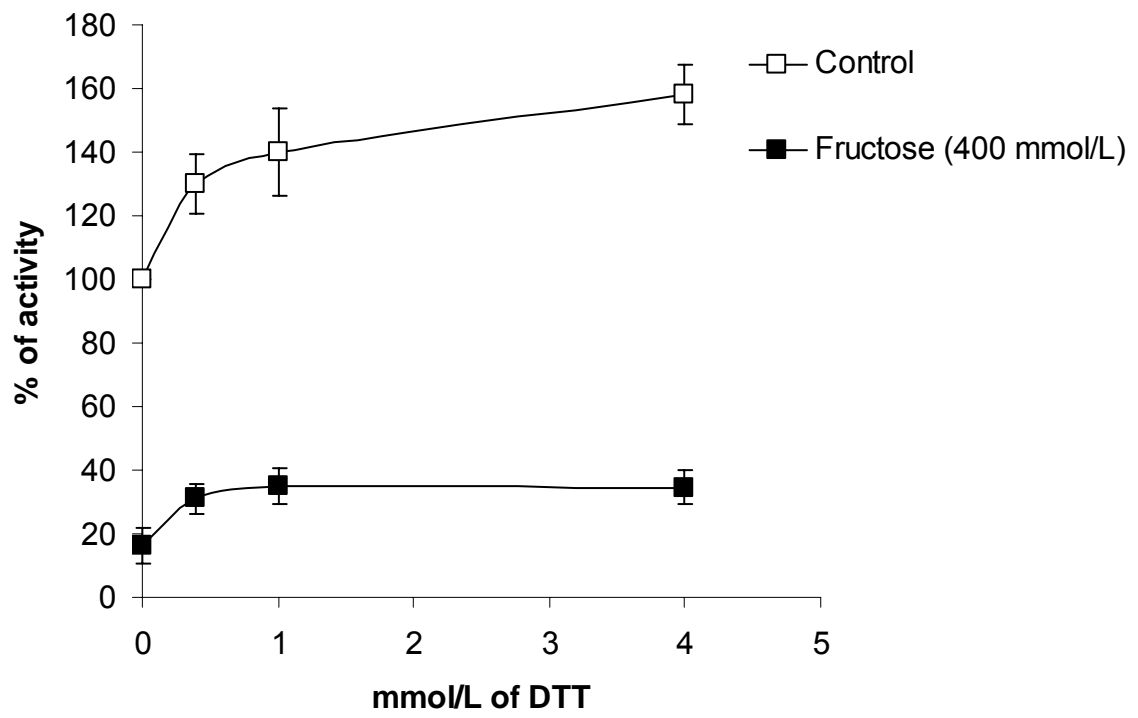
Gabriel et al., Figure 2



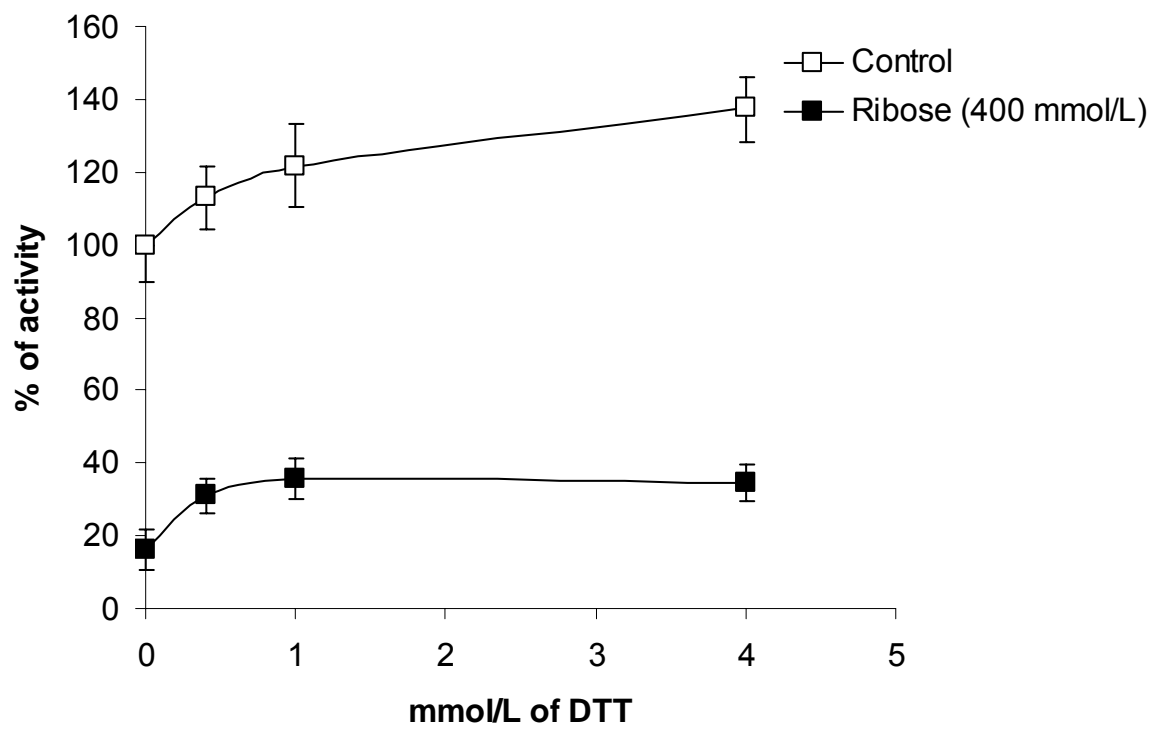
3A)



3B)

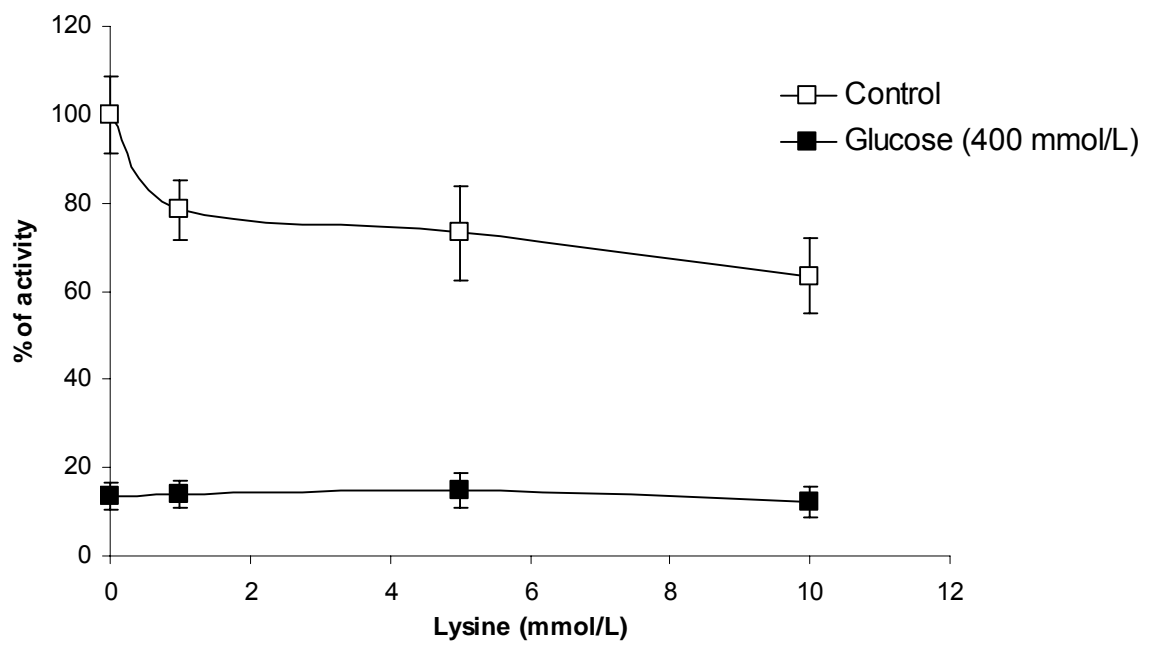


3C

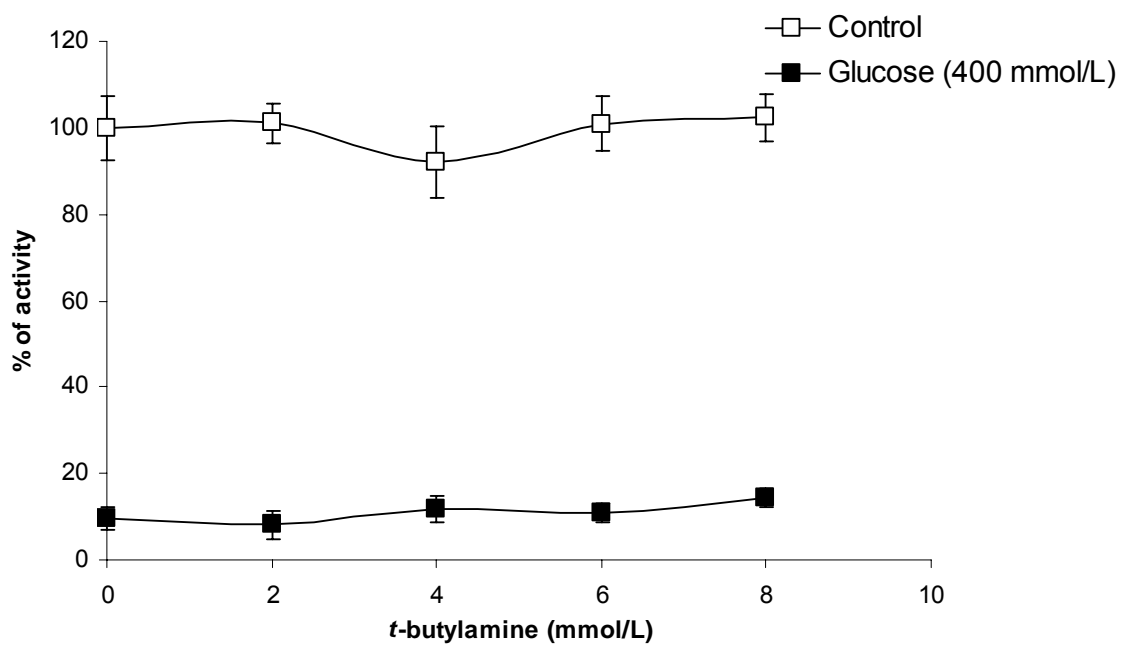


Gabriel et al., Figure 4

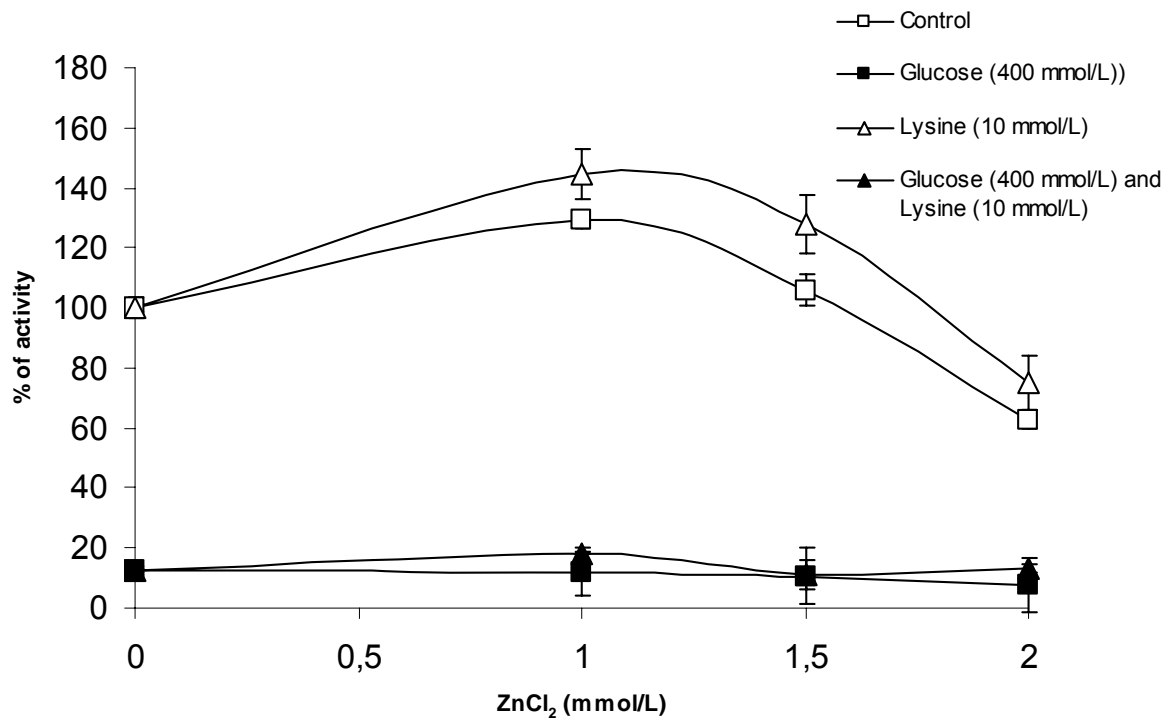
A)



B)



Gabriel et al., Figure 5



7 DISCUSSÃO

A hiperglicemia é a causa central das complicações crônicas observadas nos pacientes com diabetes mellitus. A glicose pode sofrer autooxidação formando cetaldeídos e radicais superóxidos, os quais sofrem uma série de reações químicas produzindo radicais HO[•] e radicais centrados no carbono. Esses radicais depletam os antioxidantes endógenos e, posteriormente, atacam proteínas e elementos celulares provocando dano tecidual (HUNT et al., 1988). Além disso, com a presença de hiperglicemia, a glicosilação de proteínas está aumentada causando o envelhecimento dessas macromoléculas (DAY et al., 1979; HUNT et al., 1988; CURUBELLI et al., 1994). Essa reação começa com a formação de uma base de schiff instável com a ligação entre o monossacarídeo redutor e um grupamento amina de um resíduo de aminoácido da proteína. Esse composto sofre um rearranjo com formação de um composto mais estável, denominado produto de Amadori. Esse composto liga-se com proteínas em uma reação irreversível formando os PTGAs, os quais podem modificar a conformação das proteínas e produzem eventos pró-oxidantes nos tecidos (CHEVALIER et al. 2002). Da mesma forma, a glicose pode ainda ligar-se a enzimas como a δ -ALA-D produzindo mudanças conformacionais, as quais prejudicam a ação catalítica. Esse dado é reforçado por estudos evidenciando correlação entre o aumento de hemoglobina glicada e hipoatividade da δ -ALA-D (CABALLERO et. al., 1998; FOLMER et al., 2002).

Assim, segundo a literatura, há dois mecanismos supostos para a inibição da δ -ALA-D pela glicose. O primeiro diz respeito à oxidação de grupos –SH do centro ativo e a segunda, sobre a glicosilação da enzima.

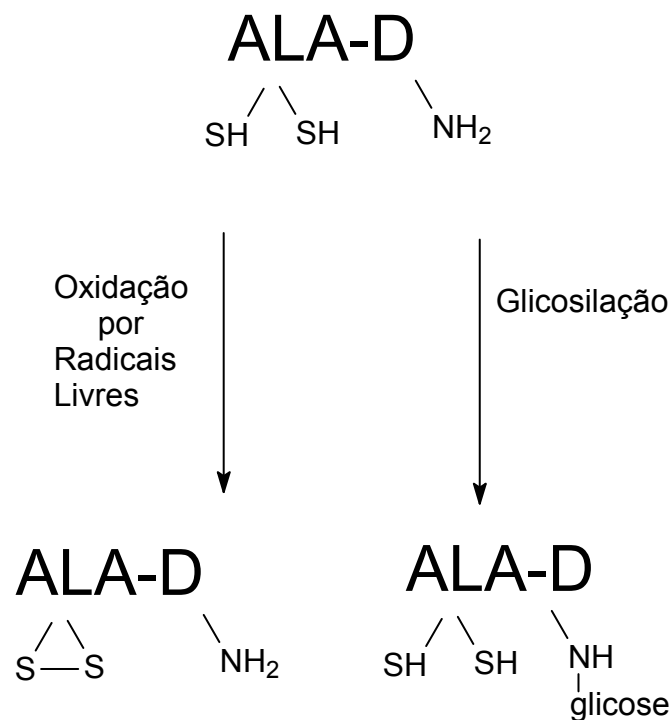


Figura 7.1. Possíveis mecanismos de inibição da δ -ALA-D por monossacarídeos

Em nosso estudo, a glicose, a ribose e a frutose inibiram a atividade da enzima quando comparada com o controle e a ordem de inibição foi frutose > ribose = glicose (**Figura 2**). De fato a inibição da enzima pela glicose está em acordo com os resultados obtidos por Caballero e colaboradores (1998), entretanto, em nosso estudo a inibição da enzima pela presença de frutose e ribose no meio de incubação foi maior. Além disso, devemos ressaltar que no presente trabalho a enzima foi exposta por apenas 1h aos açúcares redutores, enquanto que no trabalho de CABALLERO e seu grupo (1998) os eritrócitos foram expostos por 20h a concentrações semelhantes destes compostos.

Nosso trabalho mostra claramente que a inibição da δ -ALA-D pelos três açúcares redutores não é mediada pela oxidação dos grupamentos -SH do centro ativo da enzima, pois a pré-incubação da enzima com DTT, o qual têm capacidade

de restabelecer ou ainda proteger os grupamentos tiólicos da enzima de agentes oxidantes, não foi capaz de aumentar ou restaurar a atividade (**Figura 3**). Da mesma forma, o Boridreto de Sódio, um conhecido agente redutor e a adição de Zinco ao meio, um reativador clássico da enzima, foram inábeis em proteger a enzima da inibição pela glicose.

Não houve aumento significativo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico durante o curto período de incubação da enzima com os monossacarídeos. Isso ajuda a evidenciar que não ocorre estresse oxidativo quando se incuba a enzima sanguínea com esses monossacarídeos em curto espaço de tempo *in vitro*.

Substâncias com grupamentos aminas como a lisina e a *t*-butilamina foram empregadas para avaliar a participação da glicosilação na inibição da δ -ALA-D. A idéia original foi verificar se esses compostos poderiam competir com a enzima pelos monossacarídeos diminuindo a inibição da enzima. No entanto, não houve modificações na inibição da enzima quando a ela foi pré-incubada com esses compostos. Esse fato deve-se, segundo nossa interpretação, à baixa reatividade dos grupos aminas dessas substâncias (os quais requerem condições extremas de temperatura e pressão para reagirem em pequenos espaços de tempo) quando comparados aos grupos aminas pertencentes ao micro-ambiente do sitio ativo da enzima (Namiki et al., 1977). Assim, não se pode descartar, somente com base nesse experimento, a participação da glicosilação de resíduos de lisina da enzima como mecanismo de inibição.

Os resultados contidos no **anexo II** comprovam que não há ligação da glicose com o δ -ALA, pois quando uma solução de substrato foi deixada em contato com alta concentração de glicose por até 24 horas em 37°C, não ocorreu alteração na atividade da enzima em relação ao controle. Da mesma forma, a glicose não interfere na reação de cor como indica o **anexo III**, onde o açúcar foi adicionado

somente durante a reação de cor, não estando presente no meio de incubação do substrato com a enzima.

Logo, nosso estudo remete ao mecanismo de inibição por glicosilação, pois os experimentos com antioxidantes não restauraram a atividade da δ -ALA-D nem houve aumento de espécies reativas de oxigênio quando os monossacarídeos foram pré-incubados com a enzima. Esses resultados demonstram que a inibição da enzima exposta a altas concentrações de monossacarídeos *in vitro* por curto período não é mediada por oxidação dos grupos –SH do sítio ativo.

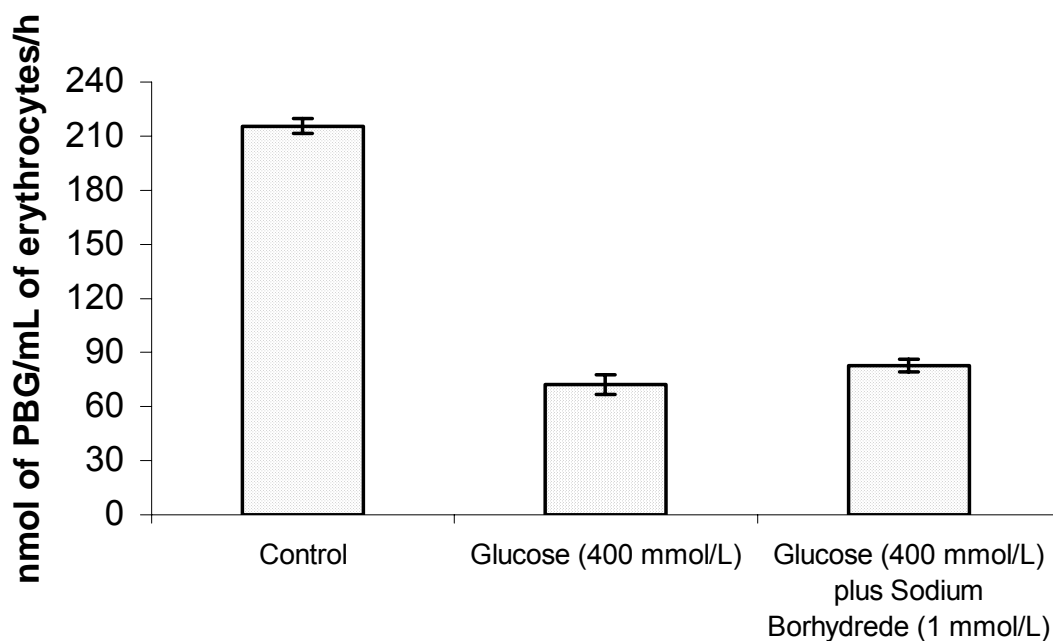
8 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho podemos inferir o seguinte:

- A inibição da enzima delta-aminolevulinato pelos açúcares redutores glicose, frutose e ribose em 60 minutos de pré-incubação não é mediada pela oxidação dos grupos –SH do sitio ativo da enzima;
- A inibição não é devido à ligação dos monossacarídeos com o substrato da enzima (δ -ALA);
- A inibição não é devido à interferência dos monossacarídeos com a reação de cor na técnica usada no estudo;
- O mecanismo mais provável para a inibição da enzima pela glicose, frutose e ribose em 60 minutos de pré-incubação é a ligação desses compostos com grupamentos aminas de lisinas do sitio ativo da enzima, provocando modificações conformacionais que inviabilizam a sua atividade.

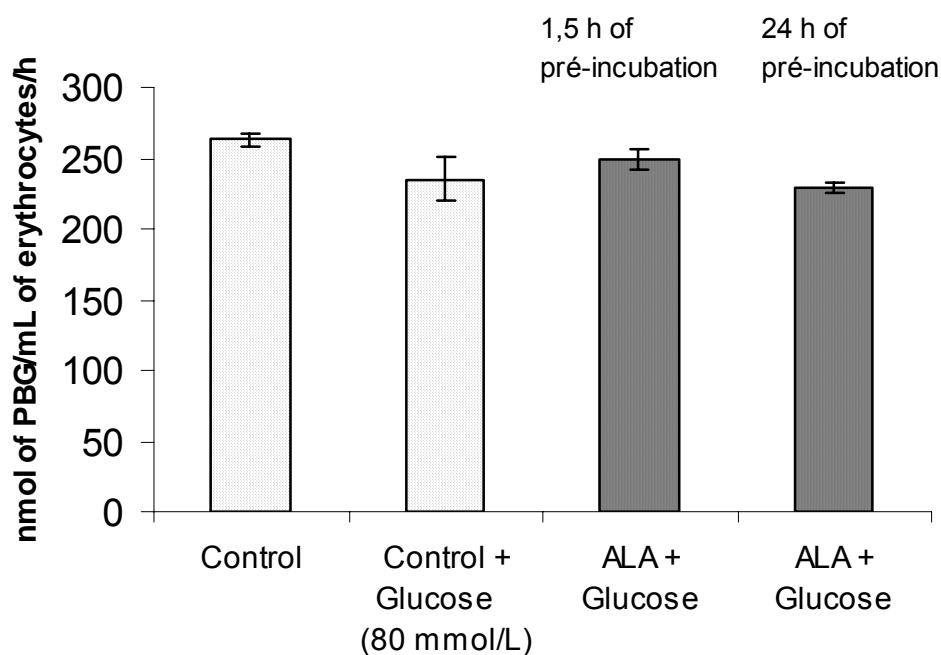
9 ANEXOS

9.1 Anexo I – Efeito do Boridreto de Sódio sobre a inibição da atividade da enzima δ -ALA-D de eritrócitos humanos pela glicose.



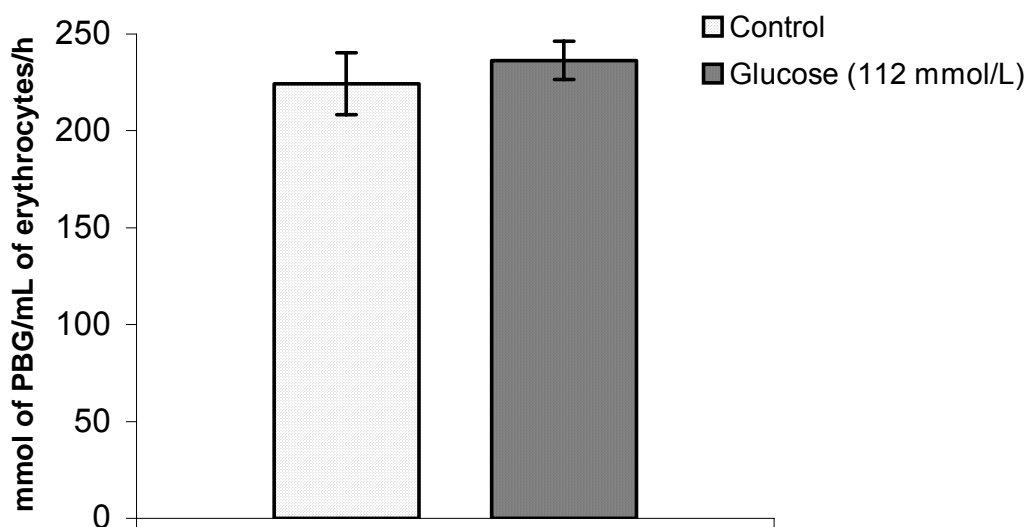
A figura acima demonstra que o emprego do agente redutor boridreto de sódio no meio de incubação não foi capaz de alterar a inibição da enzima δ -ALA-D pela glicose. O experimento foi realizado conforme indicado nos materiais e métodos. Os dados estão representados como média \pm EP para um $n = 4$.

9.2 Anexo II - Estudo sobre a possível ligação entre a glicose e o substrato da enzima δ -ALA-D



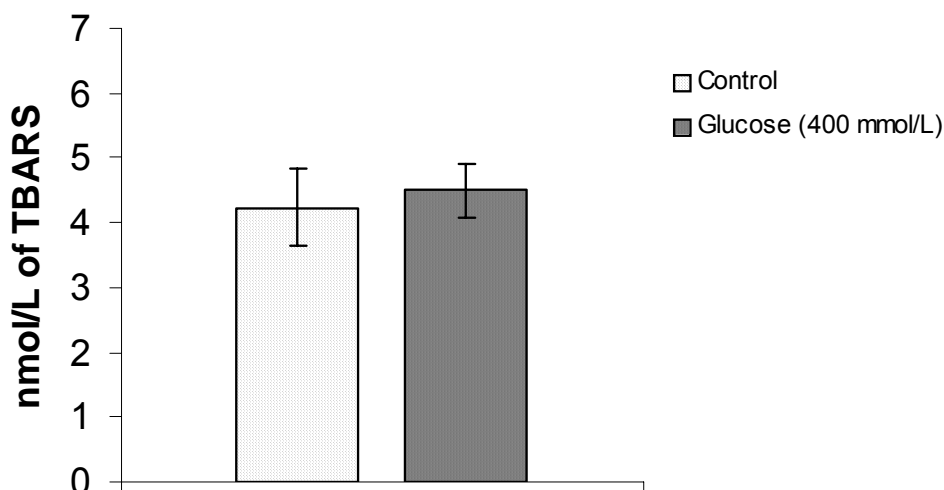
A solução de ALA, 28,8 mM foi deixada em contato com 400 mM de glicose em 84 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,8. Uma das alíquotas ficou em contato com a glicose por 24 horas em temperatura de 37°C, enquanto a outra ficou em contato por 1,5 horas nas mesmas condições de temperatura. De acordo com o resultado, não há diferença significativa de atividade da enzima nem com relação ao controle em ausência de glicose, tão pouco em relação ao controle com presença de 80 mM de glicose, indicando que a glicose não se liga ao substrato da enzima. Observação: como ao adicionar a solução de ALA com glicose nos tubos testes a reação passa a acontecer em presença de 80 mM de glicose (quantidade calculada a partir da solução original de ALA com glicose), foi estipulado um controle com essa concentração do monossacarídeo. Os dados estão representados como média \pm EP para um n = 4.

9.3 Anexo III - Estudo sobre a possível interferência da glicose sobre a reação de cor na técnica usada para dosar a atividade da δ -ALA-D



De acordo com o resultado dos experimentos representados pela figura acima não houve qualquer participação da glicose na reação de cor da técnica usada nos experimentos que poderia vir a mascarar a real atividade da δ -ALA-D. A concentração de glicose usada nesse experimento foi calculada para representar aquela que entraria em contato com o reagente de Ehrlich (o qual é utilizado na técnica escolhida) nos demais experimentos do presente estudo, já que não houve lavagem do meio de incubação após a precipitação das proteínas com TCA, composto utilizado para encerrar a reação na técnica. Os dados estão representados como média \pm EP para um $n = 4$).

9.4 Anexo IV – Influência da glicose na produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico



Os experimentos representados pelo gráfico acima evidenciam a ausência de produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico pela glicose. Já no estudo com a frutose e a ribose houve o surgimento de uma coloração interferente em 532 nm (dado não apresentado). Os testes para evidenciar um possível aumento no TBARS foram realizados pelo método de Ohkawa e colaboradores (1979). Os açúcares redutores foram incubados com as células sanguíneas por 90 minutos e, posteriormente, o meio foi lavado três vezes com salina para a retirada dos compostos na tentativa de minimizar a produção de cor interferente. Os dados estão representados como média \pm EP para um $n = 3$.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAZARRY, M. T. R. Efeito de metais pesados em plantas: delta-aminolevulinato desidratase em *Ricinus communis*. Porto Alegre, Curso de Pós-graduação em Ecologia, UFRGS, 1986. Dissertação de Mestrado.

ANSARI, N. H.; WANG, L.; ERWIN, A. A; CHURCH, D. F. Glucose dependent formation of free radical species in lens homeogenates. **Biochem. Mol. Med.**, v. 59, p. 68-71, 1996.

BARBOSA, N. B. V.; ROCHA, J. B. T.; ZENI, G.; EMANUELLI, T.; BEQUE, M. C.; BRAGA, A. L. Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 149, 243-253, 1998.

BARNARD, G. F.; ITOH, R.; HOHBERGER, L. H.; SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase – Possible role of essential thiol groups. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 8965-8974, 1977.

BATING, F. G; BEST, C. H.; COLLIP, J. B.; CAMPBELL, W. R., FLATCHER, A. A. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. **Con. Med. Assoc. J**, v. 12, p. 141, 1922.

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

BATTISTUZZI, G.; PETRUCCI, R.; SILVAGNI, L.; URBANI, F. R.; CAIOLA, S. Delta-aminolevulinatase dehydratase: a new genetic polymorphism in man. **Ann. Hum. Genet.**, v. 46, p. 223-229, 1981.

BATTLE, A. M. DEL C.; & STELLA, A. M. Delta-aminolevulinate dehydratase: its mechanism of action. **Int. J. Biochem.**, v. 9, p. 861-864, 1978.

BAYNES, J. W. Perspectives in diabetes. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, p. 405-412, 1991.

BECHARA, E. J. H.; MEDEIROS, M. H. G.; MONTEIRO, H. P.; HERMES-LIMA, M.; PEREIRA, B.; DEMASI, M.; COSTA, C. A.; ADBALLA, D. S. P.; ONUKI, J.; WENDEL, C. M. A.; NASCI, P. D. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Química Nova**, v. 16, p. 385-392, 1993.

BECKER, D. M.; VILJOEN, J. D.; KRAMER, S. The inhibition of red cell and brain ATPase by δ -aminolevulinic acid. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 255, p. 26-34, 1971.

BELLINASSO, M. L. Estudo comparativo da delta-aminolevulinato desidratase em eritrócito humano e fígado de peixes (*Pimelodus maculatus*) e o efeito de metais pesados. Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, UFRGS, 1985. Dissertação de Mestrado.

BEVAN, D. R.; BODLAENDER, P.; SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn^{2+} for enzyme activity. **J. Biol. Chem.**, v. 255, p. 2030-2035, 1980.

BIERHAUS A.; HOFMANN, M. A.; ZIEGLER, R.; NAWROTH, P. P. The AGE/RAGE pathway in vascular disease and diabetes mellitus. Part I. The AGE-concept. **Cardiovascular Res.**, v. 37, p. 586-600, 1998.

BISHOP, T. R.; HODES, Z. I.; FRELIN, L. P.; BOYER, S. H. Cloning and sequence of mouse erythroid delta-aminolevulinic acid dehydratase cDNA. **Nuc. Acid. Res.**, v. 17, p. 1775, 1989.

BITAR, M. & WEINER, M. Diabetes-induced metabolic alterations in heme synthesis and degradation and various heme-containing enzymes in female rats. **Diab.**, v. 33, p. 37-44, 1984.

BLOCK, C.; LOHMANN, R. D.; BEYERSMANN, D. Probing of active site residues of the zinc enzyme 5-aminolevulinic acid dehydratase by spin and fluorescence labels. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, v. 371, p. 1145-1152, 1990.

BOESE, Q. F.; SPANO, A. J.; LI, J.; TIMKO, M. P. δ -aminolevulinic acid dehydratase in pea (*Pisum sativum* L.). Identification of an unusual metal-binding domain in the plant enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 17060-17066, 1991.

BONSIGNORE, D. L. 'attività ALA-deidratasica eritrocitaria quale test diagnostico nel saturnismo professionale. **Med. Lav.**, v. 57, p. 647-654, 1966.

BORRALHO, L. M.; ORTIZ, C. H. D.; PANEK, A. D.; MATTOON, J. R. Purification of delta-aminolevulinic acid dehydratase from genetically engineered yeast. **Yeast.**, v. 6, p. 319-330, 1990.

BRENNAN, M. J. W. & CANTRILL, R. C. Delta aminolevulinic acid is a potent agonist for GABA autoreceptors. **Nature**, v. 280, p. 514-515, 1979.

BRENNAN, M. J. W. & CANTRILL, R. C.; KRAMER, S. Effect of delta-aminolevulinic acid on GABA receptor binding in synaptic plasma membranes. **Int. J. Biochem.**, v. 12, p. 833-835, 1980.

BROWNLEE, M.; VLASSARA, H.; CERAMI, A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. **Ann. Intern. Med.**, v. 101, p. 527-537. Review, 1984.

BURNHAN, T. & FOSSNAUGH, F. Porphyrin, diabetes and their relation. **Arch. Dermatol.**, 1961.

CABALLERO, F.; GEREZ, E.; POLO, C.; MOMPO, O.; VAZQUEZ, E.; SCHULTZ, R.; BERNABO, J.; BATLLE, A. Alteraciones en el camino metabólico del hemo en pacientes diabéticos., v. 55, p. 117-124, 1995.

CABALLERO, F.A.; GEREZ, E.N.; POLO, C.F.; VAZQUEZ, E.S.; BATLLE, A.M.C. Reducing sugars trigger δ -aminolevulinic acid dehydratase inactivation: evidence of in vitro aspirin prevention. **Gen Pharmac.**, v. 31, p. 441-445, 1988.

CABALLERO, F.A.; GEREZ, E.N.; BATLLE, A. M. C.; VAZQUEZ, E. Preventive aspirin treatment of streptozotocin induced diabetes: blockage of oxidative status and reversion of heme enzymes inhibition.

CARUBELLI, R.; SCHNEIDER, J. E.; PYE, Q. N.; FLOYD, R. Cytotoxic effects of autooxidative glycation. **Free Radic. Biol. Mol.**, v. 18, p. 265-269, 1994.

CASTELFRANCO, P. A. & BATLLE, A. M. Aminolevulinic acid dehydratase: properties y mechanism de acción. **N. Arch. Fac. Med.**, v. 45, p. 61-70, 1983.

CHAUDHRY, A. G.; GORE, M. G.; JORDAN, P. M. Studies on the inactivation of 5-aminolevulinic acid dehydratase by alkylation. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 4, p. 301-303, 1976.

CHEH, A. & NEILANDS, J. B. Zinc, an essential metal ion for beef liver delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 55, p. 1060-1063, 1973.

CHEH, A. & NEILANDS, J. L. The delta-aminolevulinic acid dehydratase: molecular and environmental properties. **Struct. Bonding.**, v. 29, p. 123-169, 1976.

CHEVALIER, F.; CHOBERT, J. M.; DALGALARRONDO, M.; CHOISSET, Y.; HAERTLE, T. Maillard glycation of beta-lactoglobulin induces conformation changes. **Nahrung**, v. 46, p. 58-63, 2002.

CHINARRO, S.; STELLA, A. M.; BERGES, L.; SALAMANCA, R. E.; BATTLE, A. M. DEL C. Aminolevulinato dehidratasa properties y mecanismo de acción. **N. Arch. Fac. Med.**, v. 41, p. 61-70, 1983.

CUTLER, M. G.; MOORE, M. R.; EWART, F. G. Effects of δ -aminolevulinic acid administration on social behavior in the laboratory mouse. **Psychopharmacology.**, v. 61, p. 131-135, 1979.

DAY, J. F.; THORNBURG, S. R.; BAYNES, J. W. Non-enzymatically glycosylated albumin. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 595-597, 1979.

DENT, A. J.; BEYERSMANN, D.; BLOCK, C.; HASNAIN, S. S. Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinic acid dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. **Biochemistry.**, v. 29, p. 7822-7828, 1990.

DRESEL, E.I.B. & FALK, J. E. Conversion of delta aminolevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system. **Nature**, v. 172, p. 1185, 1955.

ECHELARD, Y.; DYMETRYZYN, J.; DROLET, M.; SASARMAN, A. Nucleotide sequence of the hemB gene of *Escherichia coli*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 214, p. 503-508, 1988.

EMANUELLI, T.; ROCHA, J. B. T.; PEREIRA, M. E.; PORCIUNCULA, L. O.; MORSCH, V. M.; MARTINS, A. F.; SOUZA, D.O. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinic dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 79, p. 136-143, 1996.

EMANUELLI, T.; ROCHA, J. B. T.; PEREIRA, M. E.; NASCIMENTO, P. C.; BEBER, F. A.; SOUZA, D. O. G. Delta-aminolevulinic dehydratase inhibition by 2,3-dimercaptopropanol is mediated by chelation of zinc from a site involved in maintaining cysteinyl residues in a reduced state. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 83, p. 95-103, 1998.

EMANUELLI, T.; ROCHA, J. B. T.; PEREIRA, M. E.; PORCIUNCULA, L. O.; MORSCH, V. M.; MARTINS, A. F.; SOUZA, D. O. G. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinic dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 79, p. 136-143, 1996.

FARINA, M.; FOLMER, V.; BOLZAN, R.C.; ANDRADE, L. H.; ZENI, G.; BRAGA, A. L.; ROCHA, J. B. T. Selenoxides inhibit delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicol. Lett.**, v. 119, p. 27-37, 2001.

FERNÁNDEZ-CUARTEIRO, B.; REBOLLAR, J. L.; BATLLE, A.; ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R. Delta aminolevulinic dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. **J. Bio. Cell. Bio.**, v. 31, p. 479-488, 1999.

FINELLI, V. N.; KLAUDER, D. S.; KARAFFA, M. A.; PETERING, H. G. Interaction of zinc and lead on delta-aminolevulinate dehydratase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 65, p. 303-311, 1975.

FINELLI, V. N.; MURHTY, L.; PEIRANO, W. B.; PETERING, H. G. Delta-aminolevulinate dehydratase, a zinc dependent enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 60, p. 1418-1424, 1974.

FOLMER, V.; SOARES, J. C. M.; ROCHA, J. B. T. Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice. **Nutrition**, v. 19 p. 627-632, 2002a.

FOLMER, V.; SOARES, J. C. M.; ROCHA, J. B. T. Oxidative stress in Mice is dependent on the free glucose content in the diet. **Int J. Biochem Cell Biol.** v. 34 p. 1279-1285, 2002b.

FOLMER, V.; SOARES, J. C. M.; GABRIEL, D.; ROCHA, J. B. T. A high fat diet inhibits delta-aminolevulinate dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). **J. Nutr.**, v. 133, p. 2165-70, 2003.

FORBES JM, THALLAS V, THOMAS MC, FOUNDS HW, BURNS WC, JERUMS G, COOPER ME. The breakdown of preexisting advanced glycation endproducts is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes. **FASEB. J.**, v. 17, p. 1762-1764, 2003.

FU, M. X.; KNECHT, K. J.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Role of oxygen in crosslinking and chemical modification of collagen by glucose. **Diabetes**, v. 41 p. 42-48, 1992.

FUJITA, H.; ORII, Y.; SAND, S. Evidence of increased synthesis of delta-aminolevulinic acid dehydratase in experimental lead poisoned rats. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 678, p. 39-50, 1981.

GIBBS, P. N. B. & JORDAN, P. M. Identification of lysine at the active site of human delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. J.**, v. 236, p. 447-451, 1986.

GIBBS, P. N. B.; GORE, M. G.; JORDAN, P. M. Investigation on the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in human 5-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. J.**, v. 225, p. 573-580, 1985.

GIBSON, K. D.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J.J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. J.**, v. 61, p. 618-629, 1955.

GOEREZ, G. & KORDA, S. Porphyria cutanea tarda (PCT) und Diabetes Mellitus. **Z. Haut.**, v. 52, p. 1165-1174, 1977.

GOERING, P. L. & FOWLER, B. A. Mechanism of renal lead-binding protein reversal of delta-aminolevulinic acid dehydratase inhibition by lead. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 234, p. 365-371, 1985.

GOERING, P. L. & FOWLER, B. A. Regulation of lead inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase by a low molecular weight, high affinity renal lead-binding protein. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 231, p. 66-71, 1984.

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

GOERING, P. L.; MISTRY, P.; FOWLER, B. A. A low molecular weight lead-binding protein in brain attenuates lead inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase:

comparison with a renal lead-binding protein. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 237, p. 220-225, 1986.

GOODMAN & GILMAN (ed. 09). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, p. 1436, RJ; **McGraw-Hill Interamericana Editores**, 1996.

GRANICK, S. & MAUZARALL, D. Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting delta-aminolevulinic acid to coproporphyrinogen. **J. Biol. Chem.**, v. 232, p. 11190-1140, 1958.

GUGLIUCCI, A.; ALLARD, M.F. Glycation of Hepatocyte Cytosolic Proteins in Streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochem Biophys Res. Com.**, v. 229, p. 952-958, 1996.

GUO, G. G; GU, M; ETLINGER, J. D. 24—kDa proteasome inhibitor (CF-2) is identical to delta-aminolevulinic acid dehydratase. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 12399-12402, 1994.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radical and iron in relation to biology and medicine: some problem and concepts. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 246, p. 501-514, 1986.

HASNAN, S. S.; WARDELL, E. M.; GARNER, C. D.; SCHLOSSER, M.; BEYERSMANN, D. Extended-X-ray-absorption-fine-structure investigations of zinc in 5-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. J.**, v. 230, p. 625-633, 1985.

HERMES-LIMA, M.; VALLE, V. G. R.; VERCESI, A. E.; BECHARA, E. J. H. Damage to rat mitochondria promoted by δ -aminolevulinic acid generated oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1056, p. 57-63, 1990.

HERNEBERG, S.; NIKKANEN, J.; MELLIN, G.; LILIUS, H. Delta-aminolevulinic acid dehydratase as a measure of lead exposure. **Arch. Environ. Health.**, v. 21, p. 140-145, 1970.

HODSON, P. V.; BLUNT, B. R.; SPRY, D. J.; AUSTEN, K. Evaluation of erythrocyte delta-aminolevulinic acid dehydratase activity as a short-term indicator in fish of a harmful exposure to lead. **J. Fish. Res. Board. Can.**, v. 33, p. 501-508, 1977.

HUNT, J. V.; DEAN, R. T.; WOLFF, P. Hydroxyl radical production and outoxidative glycosylation. **Biochem. J.**, v. 256, p. 205-212, 1988.

ILLING E. K.; GRAY, C. H.; LAWRENCE, R. D. Blood glutathione and non-glucose reducing substances in diabetes. **J. Biochem.**, v. 48, p. 637-640, 1951.

JAFFE, E. K. & HANES, D. Dissection of the early steps in the porphobilinogen synthase catalysed reaction – Requirement for Schiff's base formation. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 9348-9353, 1986.

JAFFE, E. K. & MARKHAN, G. D. Carbon-13 NMR studies of porphobilinogen synthase: observation of intermediates bound to a 280,000-dalton protein. **Biochem.**, v. 26, p. 4258-4264, 1987.

JAFFE, E. K. Predicting the Zn (II) ligands in metalloproteins: case study, porphobilinogen synthase. **Comm. Inorg. Chem.**, v. 15, p. 67-93, 1993.

JAFFE, E. K.; ABRAMS, W. R.; KAEMPFFEN, H. X.; HARRIS, JR. K. A. 5-Chlorolevulinic acid modification of porphobilinogen synthase identifies a potential role for the catalytic zinc. **Biochem.**, v. 31, p. 2113-2123, 1992.

JAFFE, E. K.; ALI, S.; MITCHELL, L. W.; TAYLOR, K. M.; VOLIN, M.; MARKHAM, G. D. Characterization of the role of stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. **Biochem.**, v. 34, p. 244-251, 1995.

JAFFE, E. K.; MARKHAM, G. D.; RAJAGOPALAN, J. S. ^{15}N and ^{13}C NMR studies of ligands bound to the 280 000 dalton protein porphobilinogen synthase elucidate the structures of enzyme-bound product and a schiff base intermediate. **Biochem.**, v. 29, p. 8345-8350, 1990.

JAFFE, E. K.; SALOWE, S. P.; CHEN, N. T.; DE HAVEN, P. A. Porphobilinogen synthase modification with methylmethanethiosulfonate-A protocol for the investigation of metalloproteins. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 5032-5036, 1984.

JAFFE, E. K.; VOLIN, M.; NYERS, C. B. 5-Chloro[1,4- ^{13}C]levulinic acid modification of mammalian and bacterial porphobilinogen synthase suggests an active site containing two Zn (II). **Biochem.**, v. 33, p. 11554-11562, 1994.

JACQUES-SILVA M. C.; NOGUEIRA C.W.; BROCH L. C.; FLORES E. M.; ROCHA J. B. T. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 88, p. 119-125, 2001.

JORDAN, P. M.; & GIBBS, P. N. B. Mechanism of action of 5-aminolevulinatase dehydratase from human erythrocytes. **Biochem. J.**, v. 227, p. 1015-1020, 1985.

JORDAN, P. M.; GORE, M. G.; CHAUDHRY, A. G. Subunit modification of 5-aminolevulinatase dehydratase involving cysteine residues. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 4, p. 762-763, 1976.

MACIEL, E. N.; BOLZAN, R. C.; BRAGA, A. L.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. **J Biochem Mol Toxicol.**, V. 14, P. 310-319, 2000.

MCGILLION, F. B.; THOMPSON, G. G.; GOLDBREG, A. The passage of delta-aminolevulinic acid across the blood brain barrier of the rat: effect of ethanol. **Biochem. Pharmacol.**, v. 23, p. 472-474, 1974.

MCGILLION, F. B.; THOMPSON, G. G.; GOLDBREG, A. Tissue uptake of δ -aminolevulinic acid. **Biochem. Pharmacol.**, v. 24, p. 299-301, 1975.

MEREDITH, P. A.; MOORE, M. R.; GOLDBERG, A. Erythrocyte ALA dehydratase activity and blood protoporphyrin concentrations as indices of lead exposure and altered haem biosynthesis. **Clin. Sci. Mol. Med.**, v. 56, p. 61-69, 1979.

MINKOWSKI, O. Historical development of the theory of pancreatic diabetes (Introduction and translation by R. Levine). **Diabetes**, v. 38, p. 1, 1989.

MITCHELL, L. W. & JAFFE, E. K. Porphobilinogen synthase from *Escherichia coli* is a Zn(II) metalloenzyme stimulated by Mg(II). **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 300, p. 169-177, 1993.

MITCHELL, R. A.; DRAKE, J. E.; WITTLIN L. A.; REJENT, T. A. Erythrocyte porphobilinogen synthase (Delta-aminolevulinic acid dehydratase) activity: a reliable and quantitative indicator of lead exposure in humans. **Clin. Chem.**, v. 23, p. 105-111, 1977.

MITSUHASHI, T.; NAKAYAMA, H.; ITOH, T.; KUWAJIMA, S.; AOKI, S.; ATSUMI, T.; KOIKE, T. Immunochemical detection of advanced glycation endproducts in renal cortex from STZ-induced diabetic rats. **Diabetes**, v. 42, p. 826-832, 1993.

MONTEIRO, H. P.; ABDALLA, D. S. P.; AUGUSTO, O.; BECHARA, E. J. H. Free radical generation during δ -aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 271, p. 206-216, 1989.

NAKAO, K.; WADA, O.; YANO, Y. Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes for the evaluation of lead poisoning. **Clin. Chim. Acta.**, v. 19, p. 319-325, 1968.

NANDI, D. L. δ -aminolevulinic acid synthase of *Thiodopseudomonas spheroides*. Binding of pyridoxal phosphate to the enzyme. **Z. Naturforsch.**, v. 33C, p. 799-800, 1978.

NELSON, H. M.; UCHES, M. A.; MEREDITH, P. A. Zinc, copper and delta-aminolevulinic acid dehydratase *in vitro* and *in vivo*. **Toxicology.**, v. 21, p. 261-266, 1981.

OTEIZA, P. I.; KLEINMAN, C. G.; DEMASI, M.; BECHARA, E. J. H. 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 316, p. 607-611, 1994.

PARTHIBAN, A.; VIJAYALINGAM, S.; SHANMUGASUNDARAM, K. R.; MOHAN, R. Oxidative stress and the development of diabetic complications – Antioxidants and lipid peroxidation in erythrocytes and cell membrane. **Cell Biol. Int.** v. 19, p. 987-992, 1995.

PEREIRA, B.; CURI, R.; KOKUBUN, E.; BECHARA, J. H. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 72, p. 226-230, 1992.

PETRUCCI, R.; LEONARDI, A.; BATTISTUZZI, G. The genetic polymorphism of human delta-aminolevulinic acid dehydratase in Italy. **Hum. Genet.**, v. 60, p. 289-290, 1982.

POLO, C.; VAZQUEZ, E.; GEREZ, E.; CABALLERO, F.; BATLLE, A. STZ-induced diabetes in mice and heme pathway enzymes. Effect of allylisopropylacetamide and alfa-tocopherol. **Chem. Biochem. Interact.**, v. 95, p. 327-334, 1995.

RAHBAR, S.; YERNINI, K. K.; SCOTT, S.; GONZALES, N.; LALEZARI, I. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 262, p. 651-656, 1999.

ROCHA, J. B. T.; FREITAS, A. J.; MARQUES, M. B.; PEREIRA, M. E.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D. O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 26, 1077-1083, 1993.

ROCHA, J. B. T.; PEREIRA, M. E.; EMANUELLI, T.; CHRISTOFARI, R. S.; SOUZA, D. O. Effects of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicol.**, v. 100, 27-37, 1995.

RODRIGUES, A. L. S. Delta-aminolevulinato desidratase (E.C.: 4.2.1.24) em sangue de *Pimelodus Maculatus* (Pisces, Pimelodidae): características bioquímicas e efeitos

de metais pesados. Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, UFRGS, 1987. Dissertação de Mestrado.

RODRIGUES, A. L. S.; BELLINASSO, M. L.; DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus malacatus* (Pisces, Pimelodidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 94B, p. 65-69, 1989.

RODRIGUES, A. L. S.; ROCHA, J. B. T.; PEREIRA, M. E.; SOUZA, D. O. Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in weanling and adult rats exposed to lead acetate. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 57, p. 47-53, 1996.

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, VSP, Utrecht, Vol. 1, pp. 329-338, 1989.

SATO, Y.; HOTTA, N.; SAKAMOTO, N.; MATSUOKA, S.; OHISHI, N.; YAGI, K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. **Biochem. Med.**, v. 21, p. 104-107, 1979.

SASSA, M. E.; VERONE, C. L.; MONTERO, L.; CÁNEPA, E. T. Insulin inhibits delta-aminolevulinic acid synthase gene expression in rat hepatocytes and human hepatoma cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 244, p. 460-469, 1998.

SCHAUMBURG, A.; SCHNEIDER-POETSH, A. A. W.; ECKERSKORN, C. Characterization of plastid 5-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D, EC 4.2.1.24) from spinach (*Spinacia oleracea* L.) by sequencing and comparison with non plant ALA-D enzymes. **Z. Naturforsch.**, v. 47C, p. 77-84, 1991.

SCHMIDT, A. M.; HORI, O.; CHEN, J. X.; LI, J. F.; CRANDALL, J.; ZHANG, J.; CAO, R.; YAN, S. D.; BRETT, J.; STERN, D. Advanced glycation end products interacting

with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VACAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p. 1395-1403, 1995.

SCHMIDT, A. M.; YAN, S. D.; STERN, D. M. The dark side of glucose. **Nature Med.**, v. 1, p. 1002-1004, 1995.

SCHWARTZ, J.G. The role of glycohemoglobin and other proteins in diabetes management. **Diab. Rev.**, v. 3, p. 269-287, 1995.

SENIOR, N. M.; SILIGARDI, G.; DRAKE, A.; THOMAS, P. G.; WARREN, M. J. Structural studies on 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae* (yeast). **Biochem. Societ. Transact.**, v. 78, p. 25, 1997.

SENSI, M.; PRICCI, F.; PUGLIESE, G.; DE ROSSI, M.G.; PETRUCCI, A.F.G.; CRISTINA, A.; MORANO S.; POZZESSERE, G.; VALLE, E.; ANDREANI, D.; DI MARIO, U. Role of advanced glycation end-products (AGE) in late diabetic complications. **Diabetes Res. Clin. Pr.**, v. 28, p. 9-17, 1995.

SEYDOUX, F.; MALHOTRA, P. O.; BERNHARD, S. A. Half-site reactivity. **Crit. Ver. Biochem.**, v. 2, p. 227-257, 1974.

SHEMIN, D. 5-aminolevulinic acid dehydratase: structure, function, and mechanism. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 273B: 109-115, 1976.

SHIBATA, H. & OCHIAI, H. Purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase from radish cotyledons. **Plant & Cell Physiol.**, v. 18, p. 421-429, 1977.

SOLUIS, T.; SASTRA, S.; THALLAS, V.; MMORTENSEN, S.B.; WILKEN, M.; CLAUSEN, J.T.; BJERRUM O.J.; PETERSEN, H.; LAU, J.; JERUMS, G; BOEL, E.;

COOPER, M.E. A novel inhibitor of advanced glycation end-products formation inhibits mesenteric vascular hypertrophy in experimental diabetes. **Diabetologia**, v. 42, p. 472-479, 1999.

SOMMER, R. & BEYERSMANN, D. Zinc and cadmium in 5-aminolevulinic acid dehydratase. Equilibrium, kinetic, and ^{113}Cd -nmr-studies. **J. Inorg. Biochem.**, v. 20, p. 131-145, 1984.

SPENCER, P. & JORDAN, P. M. Characterization of the two 5-aminolevulinic acid binding sites, the A- and P- sites, of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. **Biochem. J.**, v. 305, p. 151-158, 1995.

SPENCER, P. & JORDAN, P. M. Investigation of the nature of the two metal-binding sites in 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. **Biochem. J.**, v. 300, p. 373-381, 1994.

STANKOVA, L.; RIDDLE, M.; LARNED, J.; BURRY, K.; MENASHE, D.; HART, J.; BIGLEY, R. Plasma ascorbate concentrations and blood cell dehydroascorbate transport in patients with diabetes mellitus. **Metabolism.**, v. 33, p. 347-353, 1984.

STITT, A. W.; LI, Y. M.; GARDINER, T. A.; BUCALA, R.; ARCHER, D. B.; VLASSARA, H. Advanced glycation end products (AGEs) colocalize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. **Am. J. Pathol.**, v. 150, p. 523-539, 1997.

STRIFFLER, J. S.; POLANSKY, M. M.; ANDERSON, R. A. Dietary chromium decrease insulin resistance in rats fed a high-fat, mineral imbalanced diet. **Metabolism.**, v. 47, p. 396-400, 1998.

STROWIG, S.; RASKIN, P. Glycemic control and diabetic complications. **Diab. Care**, v. 15, p. 1126-1140, 1992.

TAPPEL, A. L. Lipid peroxidation damage to cell components. **Fed. Proc.** v. 32, p. 1870-1974, 1973.

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. **Enzymol.**, v. 38, p. 43-56, 1970.

TIMBRELL, H. A. Principles of Biochemical Toxicology. Second Edition. Taylor & Francis London, Washington DC, pp. 180, 1991.

TOMAI, H.; SHIOI, Y.. SASA, T. Purification and characterization of delta-aminolevulinic acid dehydratase from *Chlorella regularis*. **Plant & Cell Physiol.**, v. 20, p. 435-444, 1979.

TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T.; SANO, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 570, p. 167-178, 1979.

VERGANANO, C.; CARTASEGNA, C.; BONSIGNORE, D. Regolazione allosterica della attivita 'delta-amino-levulinico-deidratasica eritrocitaria. Nota I. **Bioll. Soc. Ital. Biol. Sper.**, v. 64, p. 692-695, 1968.

VLASSARA H.; STRIKER, L. J.; TEICHBERG, S.; FUH, H.; LI, Y. M.; STEFFES, M. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 91, p. 11704-11708, 1994.

VLASSARA, H. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. **Diab. Metab. Res. Rev.**, v.17, p. 436-443, 2001.

VLIASSARA, H.; Advanced glycation end-products and atherosclerosis. **Ann. Med.**, v. 28, p. 419-426, 1996.

VLIASSARA, H.; BROWNLEE, M.; CERAMI, A. Macrophage receptor-mediated processing and regulation of advanced glycosylation endproduct (AGE)-modified proteins: role in diabetes and aging. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 304, p. 205-218, 1989.

VLIASSARA, H.; BUCALA, R.; STRIKER, L. Pathogenetic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic and clinical implications for diabetes and aging. **Lab. Invest.**, v. 70, p. 138-151, 1994.

VLIASSARA, H.; FUH, H.; DONNELLY, T.; CYBULSKY, M. Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VACM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. **Mol. Med.**, v. 1, p. 447-456, 1995.

VLIASSARA, H.; FUH, H.; MAKITA, Z.; KRUNGKRAI, A.; CERAMI, A.; BUCALA, R. Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 89, p. 10043-12047, 1992.

WATANABE, J.; UMEDA, F.; WAKASUGI, H.; IBAYASHI, H. Effect of vitamin E on platelet aggregation in diabetes mellitus. **Thromb. Haemost.**, v. 51, p. 316-316, 1984.

WAUTIER, J.L.; ZOUKOURIAN, C.; CHAPPEY, O.; WAUTIER, M. P.; GUILLAUSSEAU, P. J.; CAO, R.; HORI, O.; STERN, D. M.; SCHMIDT, D. M. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p. 238-243, 1996.

WETMUR, J. G. Influence of the common human delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on lead body burden. **Environ. Health Perspec.**, v. 102, p. 215-219, 1994.

WETMUR, J. G.; BISHOP, D. F.; CANTELMO, C.; DESNICK, R. J. Human delta-aminolevulinic acid dehydratase: Nucleotide sequence of a full-length cDNA clone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 7703-7707, 1986.

WILSON, E. L.; BURGER, P. E.; DOWDLE, E. B. Beef-liver 5-aminolevulinic acid dehydratase – Purification and properties. **Eur. J. Biochem.**, v. 29, p. 563-571, 1972.

WLODAWER, A. Proteasome: a complex protease with a new fold and a distinct mechanism. **Structure**, v. 3, p. 417, 1995.

WOLFF, S.P.; DEAN, R.T. Glucose autoxidation and protein modification - The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. **Biochem. J.**, v. 245, p. 243-250, 1987(a).

WOLFF, S.P.; DEAN, R.T. Monosaccharide autoxidation: a potential source of oxidative stress in diabetes? **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 18, p. 283-293, 1987(b).

WU, W.; SHEMIN, D.; RICHARDS, K. E.; WILLIAMS, R. C. The quaternary structure of delta-aminolevulinic acid dehydratase from bovine liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 71, p. 1767-1770, 1974.

YAMAGISHI, S.; HSU, C. C.; TANIGUCHI, M.; HARADA, S.; YAMAMOTO, Y.; OHSAWA, K.; KOBAYASHI, K.; YAMAMOTO, H. Receptor-mediated toxicity to pericytes of advanced glycosylation end products: a possible mechanism of pericyte loss in diabetic microangiopathy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 213, p. 681-687.

YAMAMOTO, Y.; KATO, I.; DOI, T.; YONEKURA, H.; OHASHI, S.; TAKEUCHI, M.; WATANABE, T.; YAMAGISHI, S.; SAKURAI, S.; TAKASAWA, S.; OKAMOTO, H.; YAMAMOTO, H. Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. **J. Clin. Invest.**, v. 108, p. 251-258, 2001.

YAMAMOTO, Y.; YAMAGISHI, S.; YONEKURA, H.; DOI, T.; TSUJI, H.; KATO, I.; TAKASAWA, S.; OKAMOTO, H.; ABEDIN, J.; TANAKA, N.; SAKURAI, S.; UNOKI, H.; WANG, H.; ZANDA, T.; WU, P. S.; SEGAWA, Y.; HIGASHIDE, T.; KAWASAKI, K.; YAMAMOTO, H. Role of the AGE-RAGE system in vascular injury in diabetes. **An. N. Y. Acad. Scien.**, v. 902, p. 163-172, 2000.