



UFSM

Dissertação de Mestrado

**ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ENZIMA DELTA-AMINOLEVULINATO
DESIDRATASE (d-ALA-D) NO DIABETES MELLITUS E NO HIPOTIREOIDISMO**

João Baptista D'Andrea Souza

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2004

**ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ENZIMA DELTA-AMINOLEVULINATO
DESIDRATASE (d-ALA-D) NO DIABETES MELLITUS E NO HIPOTIREOIDISMO**

Por

João Baptista D'Andrea Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica
Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, 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
Departamento de Química
Curso de Mestrado em Bioquímica Toxicológica**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ENZIMA DELTA-AMINOLEVULINATO
DESIDRATASE (d-ALA-D) NO DIABETES MELLITUS E NO HIPOTIREOIDISMO**

elaborada por
João Baptista D'Andrea Souza

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger

Dra. Maria Ester Pereira

Dr. Marcos Luiz Santos Perry

Santa Maria, 27 de julho de 2004.

“...Tu hás de ver que as coisas mais leves são as únicas que o vento não conseguiu levar:
um estribilho antigo
um carinho no momento preciso
o folhear de um livro de poemas
o cheiro que tinha um dia o próprio vento...” (Mario Quintana)

Essa dissertação é dedicada à Rosele que traz no seu coração as coisas mais leves e me ajuda a enfrentar os “ventos” da vida.

Agradecimentos

Começo meus agradecimentos citando Cora Coralina: “Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

À minha orientadora Prof^a. Maria Rosa Chitolina Schetinger pelos conhecimentos transmitidos durante todo o transcorrer do curso. Além de minha gratidão, admiro-a por seu caráter, interesse pela docência e sua sabedoria na área de Bioquímica.

À Prof^a Cristina Wayne Nogueira que, através dos seus conhecimentos, foi decisiva na obtenção dos resultados técnicos dessa dissertação.

Ao Prof. Ayrton Figueiredo Martins pelo incentivo, amizade e orientação científica no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. João Batista Teixeira Rocha por sua sabedoria e ajuda nos momentos decisivos dessa dissertação.

À Prof^a Vera Maria Morsch por sua amizade e apoio durante o Curso.

Ao Dr. Dalnei Pereira pelo seu constante incentivo à minha pesquisa.

Ao Prof. Valderi Dressler pela realização das dosagens dos metais nas amostras de sangue de todos os grupos que fizeram parte desse estudo.

À Rosilene Rodrigues Kaiser por sua dedicação em todos os momentos.

Ao laboratório LABIMED, especialmente pela dedicação e sabedoria dos seguintes profissionais: Dra. Marta Duarte, Dra. Ana Maria Zimmermann e Dr. Waldir Pereira.

Ao Laboratório PASIN, especialmente ao Dr. Rogério Pasin por sua dedicação e profissionalismo.

À minha secretária Martha pela dedicação e carinho com que realiza seu trabalho.

Aos meus filhos Juan Bautista e Juan Lorenzo por terem cedido momentos importantes de sua infância para a realização desse curso e por serem tão amorosos comigo e com a Rosele.

À Rosenara, minha "irmã" gêmea, por ser tão importante dentro da minha família.

Ao Miguel e ao Rafael por serem meus verdadeiros irmãos.

Aos meus pais Miguel e Isabel porque são as pessoas que sempre me incentivaram para o aperfeiçoamento do meu conhecimento e as quais eu tenho como exemplo de vida.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURA	I
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	VI
1. Introdução	1
2. Objetivo	5
3. Revisão Bibliográfica	6
3.1. Delta-aminolevulinato desidratase	6
3.1.1. Características estruturais	9
3.1.2. Ação catalítica	13
3.1.3. Função do zinco	15
3.1.4. Importância toxicológica	18
3.2. Diabetes mellitus	20
3.2.1. Conceito	20
3.2.2. Diagnóstico	20
3.2.3. Classificação	21
3.2.4. Características fisiopatológicas	22
3.2.5. Complicações diabéticas crônicas	23
3.2.5.1 Glicosilação não-enzimática das proteínas	25
3.2.5.2 O papel dos PTGA nas complicações diabéticas tardias	29

3.3. d-ALA-D e Diabetes Mellitus	33
3.4. Hipotireoidismo	36
3.4.1. Tireoglobulina	38
3.5. d-ALA-D e Hipotireoidismo	39
3.6. d-ALA-D e Metais	41
4. Artigo	44
4.1. Abstract	45
4.2. Introducion	46
4.3. Materials and methods	47
4.3.1. Sample	47
4.3.2. d-ALA-D determination	49
4.3.3. Glycated hemoglobin A _{1c} dosage and glucose	49
4.3.4. TSH hormone dosage	49
4.3.5. Metal dosagens	50
4.3.6. Statistics	50
4.4. Result	50
4.5. Discussion	52
4.6. Conclusion	54
4.7. References	55
5. Discussão	66
6. Conclusão	71

7.Referências bibliográficas	72
8.Anexos	110
8.1. Anexo 1: Permissão de consentimento livre e esclarecido	110
8.2. Anexo 2: Instructions to Authors for Endocrinology	

LISTA DE ABREVIATURAS

δ -ALA-D – delta-aminolevulinato desidratase.

δ -ALA-D com DTT – delta-aminolevulinato desidratase com DL-ditioneitol

ALA – ácido 5-aminolevulínico.

ATPase – adenosina trifosfatase.

DIT–diiodotirosina

DTNB – ácido5-5' ditiobis (2-nitrobenzóico).

EDTA–etilenodiaminotetracetato.

Hb – hemoglobina.

heme – ferroprotoporfirina.

HESX₁–gem homeobox.

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio.

IAM – iodoacetamina.

K⁺ – potássio.

Mg²⁺ – magnésio.

MIT – monoiodotirosina.

MMS – metilmetanotiosulfonato.

Na⁺ – sodio.

NADPH – nicotinamida-fosfato, oxidases Thox 1 e Thox 2.

Na⁺/I ou NIS – importador de sódio e iodeto.

NEM – iodoacetato, N-etilmaleimida.

NFS – sódio-iodeto.

NIS – importador Na^+/I^- .

PBG – monopirrólico porfobilinogênio.

PDS – pendrina.

PTGA – produtos terminais de glicolização avançada.

Tg – tireoglobulina.

TPO – tireoperoxidase.

TSH – tireotrofina.

T_3 – L-tri-iodotironina.

T_4 – tiroxina.

Zn^{2+} – zinco.

Zn_A – sítio A.

Zn_B – sítio B.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Table 1. Characteristic of the five groups: Age (years), Sex (M:F), Glycemia, Glycated Hemoglobin A_{1c}; Hematocrit, Thyroid Stimulating Hormone (TSH).

Table 2. Correlation between diabetes, glucose, Hb glycosylated, δ -ALA-D, and body weight.

Table 3. Correlation between hypothyroidism, TSH, hematocrit, body weight, and δ -ALA-D activity.

Figure 1. δ -ALA-D activity from human blood obtained from compensated Diabetes mellitus (CDM), non-compensated Diabetes mellitus (NCDM), compensated hypothyroidism (CH), non-compensated hypothyroidism (NCH) and control group.

Figure 2. δ ALA-D activity with reactivation (DTT) from human blood obtained from compensated Diabetes mellitus (CDM), non-compensated Diabetes mellitus (NCDN), compensated hypothyroidism (CH), non-compensated hypothyroidism (NCH) and control group.

Título: Análise da atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) no diabetes mellitus e no hipotireoidismo

Aluno: João Baptista D'Andrea Souza

Orientador: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Co-Orientadores: Cristina Wayne Nogueira
Ayrton Figueiredo Martins

Resumo:

A atividade da delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) foi analisada em pacientes com diabetes mellitus e pacientes com hipotireoidismo primário. Foram estudados cinco grupos de pacientes: diabetes mellitus compensado, diabetes mellitus descompensado, hipotireoidismo compensado, hipotireoidismo descompensado e grupo controle.

A análise da δ -ALA-D nesses grupos mostrou os seguintes resultados: a atividade da δ -ALA-D nos pacientes com diabetes mellitus descompensados encontrava-se diminuída em relação ao grupo controle, ao grupo dos diabéticos compensados. Observamos que nos pacientes com hipotireoidismo descompensado, a atividade da δ -ALA-D encontrava-se aumentada em relação ao controle e também em relação ao grupo dos hipotireoideos compensados.

Foram realizadas análises *in vitro* das medicações utilizadas pelos pacientes diabéticos (metformina, glibenclamida, clorpropamida, glimepirida) e hipotireoideos (tiroxina), com o objetivo de verificar se havia alteração na atividade

da δ -ALA-D e como resultados obtivemos que as medicações não alteraram a atividade da referida enzima.

Os metais podem interferir na atividade da δ -ALA-D. Por isso foi medida a quantidade de metais (chumbo, zinco, cobre) presentes no sangue destes pacientes. Observamos que a quantidade dos referidos metais não foi diferente, do ponto de vista estatístico, entre os grupos.

Desta forma, concluímos que a atividade da δ -ALA-D estava aumentada no grupo de pacientes hipotireoideos descompensados e diminuída no dos diabéticos descompensados, podendo este fato ter relação com o desenvolvimento das complicações nestas doenças.

Palavras chave: Delta-aminolevulinato desidratase, diabetes mellitus, hipotireoidismo

Title: Analyses of Delta-aminolevulinic Dehydratase in the diabetes mellitus and hypothyroidism.

Student: João Baptista D'Andrea Souza

Advisers: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Cristina Wayne Nogueira

Ayrton Figueiredo Martins

Abstract:

The activity of Delta-Aminolevulinic Dehydratase (δ -ALA-D) was analyzed in patients suffering from diabetes mellitus and primary hypothyroidism. Five groups of patients were studied: compensated diabetes mellitus, non-compensated diabetes mellitus, compensated hypothyroidism, non-compensated hypothyroidism and control group.

The analysis of δ -ALA-D in these groups showed the following results: the activity of δ -ALA-D on non-compensated diabetes mellitus decreased comparing to the control group, to the compensated diabetes mellitus group. The activity of δ -ALA-D on non-compensated hypothyroidism increased compared to the control group and also to non-compensated hypothyroidism. *In vitro* analyses of the drugs used by the patients suffering diabetes mellitus (metformin, chlorpropamide, glibenclamide, glimepiride) and the drug used by the patients suffering primary hypothyroidism (thyroxine) were fulfilled to verify some change in

the activity of δ -ALA-D, and the findings showed that there was not any changes on δ -ALA-D activity.

Metals may interfere in the action of δ -ALA-D. Consequently, the quantity of metals (lead, zinc, copper) present in the patients blood was measured. One observed that the amount of those metals was not different, from a statistical, among the groups. Therefore, we can conclude that the activity of δ -ALA-D increased in the group of non-compensated hipothyroidism and decreased in the non-compensated diabetes, and may be it could be related to the complications observed in such pathologies.

Key words: Delta-Aminolevulinate Dehydratase (δ -ALA-D), diabetes mellitus, hipothyroidism

1.Introdução

A enzima citoplasmática delta aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D, E.C. 4.2.1.24), também conhecida como porfobilinogênio sintetase ou 5-aminolevulinato hidrolase foi isolada na década de 50. Esta enzima catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico (ácido 5-aminolevulínico, ALA), com perda de duas moléculas de água, formando o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG). A reação catalisada pela δ -ALA-D faz parte da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos (hemes, bilinas, clorofilas e corrinas), sendo que a grande importância destes compostos reside na sua função como grupo prostético de proteínas. O heme (ferroporfirina) faz parte da estrutura de proteínas que transportam e armazenam oxigênio (hemoglobina e mioglobina, respectivamente), transportam elétrons (citocromos a, b e c), biotransformam xenobióticos (citocromos p450) e protegem contra peróxidos através das catalases e peroxidases.

Independente de sua fonte, a δ -ALA-D é uma enzima de natureza sulfidrílica, sendo altamente sensível a bloqueadores de grupos tiólicos tais como iodoacetamida (IAM) e ácido 5-5' ditiobis (2-nitrobenzólico) (DTNB), iodoacetato, N-etilmaleimida (NEM) e metilmetanotiosulfonato (MMS).

Alguns semi-metais como o selênio e o arsênio e, principalmente alguns metais tais como o cobre, o chumbo, o mercúrio , o cádmio e a prata, são

capazes de inibir esta enzima. A δ -ALA-D é facilmente inibida durante a purificação e a perda de sua atividade está diretamente relacionada à oxidação de grupos - SH ou a remoção/perda do Zn^{2+} . A atividade da δ -ALA-D é altamente sensível à presença de oxidantes e, portanto, pode estar inibida em diversas patologias como no diabetes mellitus.

Doenças crônicas como o diabetes e o hipotireoidismo atingem uma grande parcela da população e apresentam elevados índices de prevalência e incidência, atingindo diferentes camadas sociais. Ambas constituem doenças de interesse em saúde pública e, portanto devem ser investigadas e tratadas adequadamente.

O diabetes mellitus compreende um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos de múltiplas etiologias caracterizado pela presença de hiperglicemia crônica acompanhada de alterações no metabolismo dos hidratos de carbono, gorduras e proteínas, conseqüências tanto de defeito da secreção de insulina como na ação insulínica. O diabetes mellitus tipo 1 é responsável por aproximadamente 10% dos casos e o tipo 2 corresponde à 90% dos casos. O diabetes mellitus tipo 1 é uma doença que ocorre principalmente na infância e no início da vida adulta, caracteriza-se por deficiência na produção de insulina. É uma doença do cromossoma 6 e acredita-se que ocorra uma destruição auto-imune das células beta, produtoras de insulina das Ilhotas de Langerhans. O diabetes mellitus tipo 2 é uma doença que se caracteriza, principalmente, por uma resistência à ação da insulina em suas células alvo. Uma das características

clínicas mais importantes do diabetes mellitus é sua associação com complicações tissulares crônicas. Essas, geralmente, ocorrem muitos anos após o surgimento do diabetes e afetam vários órgãos e sistemas.

O hipotireoidismo é a alteração mais freqüente da glândula tireóide. É uma síndrome clínica que resulta da secreção ou ação deficientes dos hormônios tireoideanos para as necessidades metabólicas normais do organismo, o que ocasionará uma diminuição dos processos metabólicos. A forma mais comum de hipotireoidismo é a primária, também denominada tireoideana (90 % dos casos) conseqüente a uma alteração da glândula, a qual provoca uma diminuição na produção e secreção do hormônio tireoideano, sendo esta, acompanhada invariavelmente por secreção aumentada de tireotropina (TSH). O hipotireoidismo é uma condição endócrina muito freqüente, apresenta prevalência na população em geral de 0,5 a 1 % e, na população acima de 65 anos, de 2 a 5 %. Atinge predominantemente as mulheres com 0,6 a 5,95 % contra 0,2 % do sexo masculino. Os índices de prevalência dependem do critério de diagnóstico e da população estudada e, como mencionado, a incidência tende a aumentar com a idade, situando-se o pico entre a quarta e a sexta décadas de vida. O hipotireoidismo congênito é diagnosticado em 1 em cada 4.000 recém-nascidos. A causa do hipotireoidismo é variável e depende de: fatores geográficos; fatores ambientais, como o iodo alimentar e ingestão de bociogênicos na dieta; características genéticas da população; idade de aparecimento ou seja, se criança

ou adulto. A função dos hormônios tireoideanos é regular o metabolismo tissular. Além disso, nas crianças, são também necessários para o desenvolvimento do sistema nervoso central e para o crescimento e maturação óssea. O mecanismo de ação dos hormônios tireoideanos dá-se pela ligação aos receptores nucleares de L-tri-iodotironina (T₃) presente na maioria das células, que influenciam de maneira positiva ou negativa a transcrição gênica, quando o promotor de um determinado gene tem a capacidade de interagir com o complexo T₃. Com relação ao sistema hematopoiético, os pacientes são habitualmente anêmicos, em razão da redução fisiológica da síntese de hemoglobina, causada pela diminuição do consumo de oxigênio e vários outros mecanismos envolvidos. Pelo que foi citado em relação ao hipotireoidismo e síntese de hemoglobina justifica-se nosso interesse em pesquisar a atividade da δ -ALA-D nessa patologia.

2.Objetivos

Este estudo teve os seguintes objetivos:

- Avaliar a atividade da enzima δ -ALA-D em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 compensados e descompensados.
- Avaliar a atividade da enzima δ -ALA-D em pacientes com hipotireoidismo primário compensados e descompensados.
- Relacionar a atividade da enzima δ -ALA-D entre os grupos citados anteriormente.
- Avaliar a atividade da enzima δ -ALA-D *in vitro* na presença dos medicamentos utilizados pelos pacientes diabéticos e hipotireoideos.
- Determinar a quantidade dos metais: chumbo, zinco e cobre nas amostras de sangue de todos grupos estudados.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Delta-aminolevulinato desidratase

A enzima citoplasmática delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D, E.C. 4.2.1.24), também conhecida como porfobilinogênio sintetase ou 5-aminolevulinato hidrolase foi isolada na década de 50 (DRESEL & FALK, 1953; GIBSON et al., 1955). Esta enzima catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico (ácido 5-aminolevulínico, ALA), com perda de 2 moléculas de água, para formar o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG) (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 do substrato (ALA), originando a cadeia lateral P (cadeia propiônica), enquanto uma segunda molécula do substrato dá origem à cadeia lateral A (acética) do porfobilinogênio (Figura 1) (CASTELFRANCO & BEABLE, 1983).

A reação catalisada pela δ -ALA-D faz parte da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e hemes) (Figura 2). A grande importância destes compostos reside na sua função como grupos prostéticos de proteínas. 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 xenobiótico

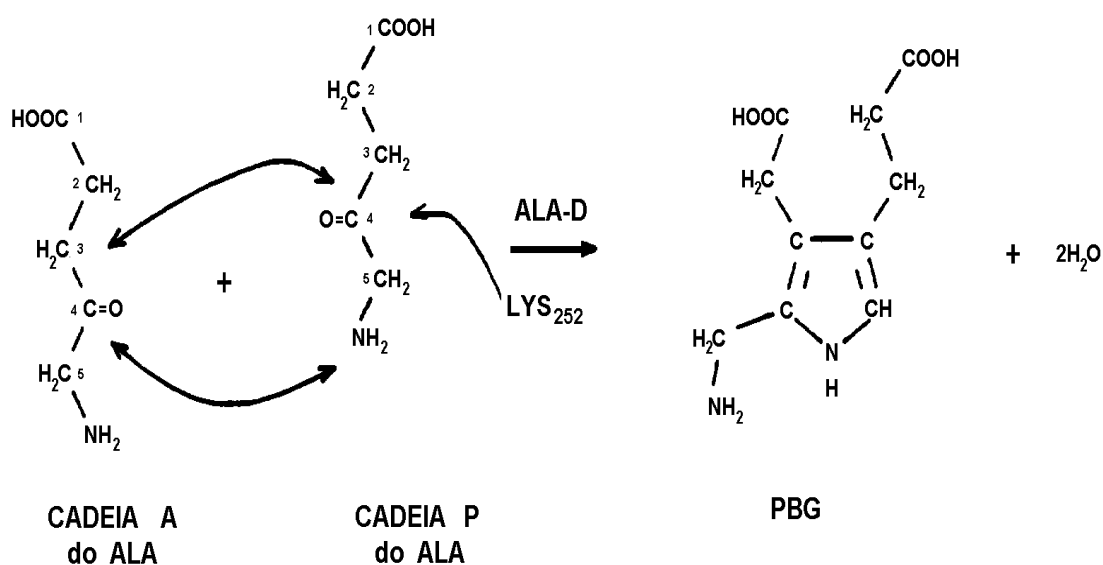


Figura 1. Condensação assimétrica de duas moléculas do ácido 5-aminolevulínico catalisada pela enzima δ -ALA-D.

Cadeia lateral P (-CH₂CH₂COOH) do ALA, originária da primeira molécula de substrato, a qual forma a porção propionil do PBG. O nitrogênio do grupo amino desta 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 (-CH₂COOH) do ALA, originária da segunda molécula de substrato, a qual forma a porção acetil do PBG. O nitrogênio do grupo amino desta porção permanece livre.

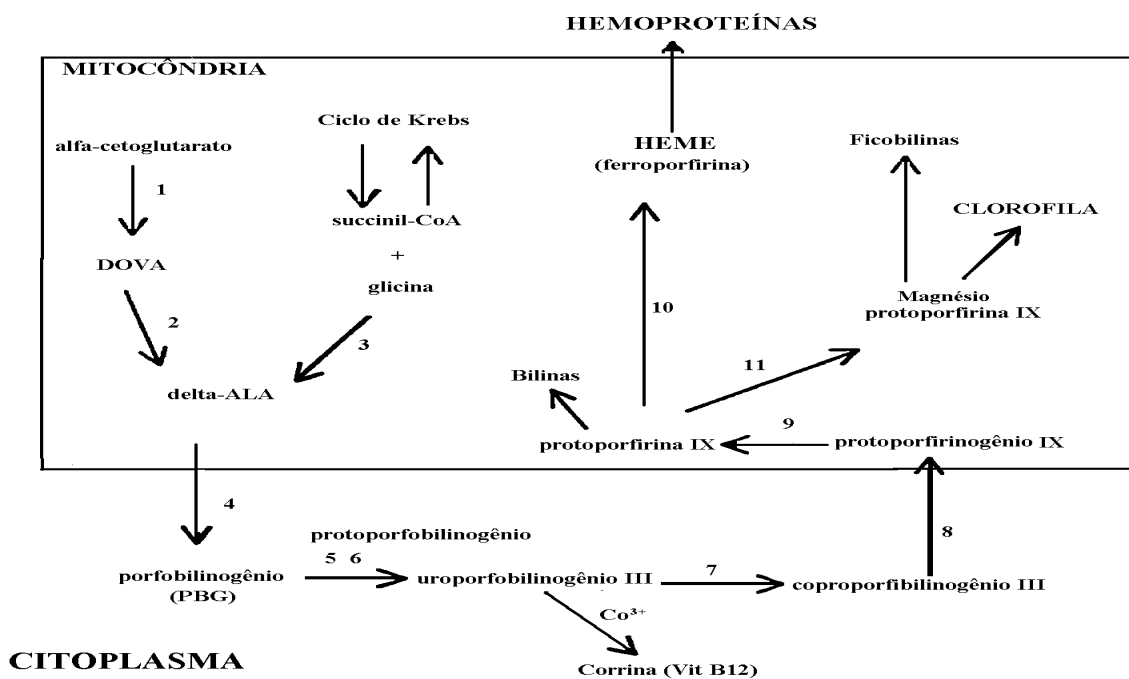


Figura 2. Via de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos.

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

(citocromo P₄₅₀) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalases e peroxidases) (TIMBRELL, 1991).

A via para a biossíntese de porfirinas é semelhante em bactérias, vegetais e animais, favorecendo à ampla distribuição da δ -ALA-D na natureza (BELLINASSO, 1985; AMAZARRAY, 1986; RODRIGUES, 1987). Em mamíferos, os tecidos que apresentam maior atividade são o hepático, o renal e os tecidos hematopoiéticos (GIBSON et al., 1955). Recentemente, 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 à 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).

3.1.2. 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 (CHEN & 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; TAMAI et al., 1979). A região rica em cisteína 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 ácido 5,5' ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB-reagente de Ellman) (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) e por metais pesados que possuem elevada afinidade por grupamentos sulfidrílicos, tais como o chumbo, o cobre e o mercúrio (GIBSON et al., 1955; WILSON et al., 1972; SHIBATA & OCHIAI, 1977; TAMAI et al., 1979; NELSON et al., 1981; GOERING & FOWLER, 1984, 1985; GOERING et al., 1986; RODRIGUES et al., 1989; 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 perda de 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 DTT, cisteína, glutatona 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 Km (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 Km 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 este metal, possivelmente devido à maior afinidade da enzima por este metal, determinada por este alelo (WETMUR, 1994).

3.1.3. 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 (JAFTE & MARKHAM, 1987). As duas moléculas de substrato interagem no sítio ativo da enzima, aparentemente, através de uma ligação carbono-nitrogênio (base de Schiff) (JAFTE et al., 1990). A δ -ALA-D possui 8 subunidades, no entanto, apenas metade das subunidades parece estar envolvida na catálise (SHEMIN, 1976; JAFTE & 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 na presença de ar, formar mercaptídeos por reação com metais pesados ou ser

modificados por agentes químicos. A oxidação desses resíduos leva inativação com concomitante perda do zinco ligado (TSUKAMOTO et al., 1979).

3.1.4. Função do zinco

A atividade da δ -ALA-D de mamíferos é inibida por quelantes como EDTA e 1,10-fenantrolina (CHEN & 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). Entretanto, isto não é obrigatoriamente uma evidência de que o zinco está ligado a grupamentos sulfidríla, uma vez que a redução de uma ponte dissulfeto poderia estar abrindo um canal através do qual o Zn^{2+} poderia entrar e ligar-se a outros grupamentos.

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., 1998).

3.1.5. Importância toxicológica

Devido a sua natureza sulfidrílica, 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, resultando em 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 vivo*, iniciando um processo de peroxidação lipídica no baço e no fígado destes animais (OTEIZA et al., 1994). 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 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ 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 a 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.

3.2.Diabetes mellitus

3.2.1.Conceito

O Diabetes mellitus (DM) compreende um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos de múltiplas etiologias caracterizado pela presença de hiperglicemia crônica acompanhada de alterações no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas, conseqüências tanto de defeito na secreção de insulina como na ação insulínica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998).

3.2.2. Diagnóstico do diabetes mellitus

Apesar do teste oral de tolerância à glicose (TOTG) ser um teste diagnóstico para o diabetes mellitus, não é recomendado na rotina clínica. A glicemia de jejum apresenta a vantagem da maior aceitação por parte do paciente, menor custo e maior reprodutibilidade que a glicemia 2 horas após sobrecarga de glicose. É considerado diabético todo o indivíduo que apresente duas glicemias, coletadas em datas diferentes, com valores maiores ou iguais a 126 mg/dL ou glicemia realizada ao acaso, maior ou igual a 200 mg/dL associado com sintomas clássicos da doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998-Figura 3).

Figura 3. Critérios Diagnósticos.

ADA 1998

▷ Sintomas sugestivos + glicemia ao acaso \geq 200 mg/dL
“Casual”: glicemia a qualquer momento, independente de refeição prévia.
Sintomas: poliúria, polidipsia e perda de peso inexplicada
Ou
⇒ Glicemia de jejum \geq 126 mg/dL
Jejum: ausência de consumo calórico há pelo menos 8 h
Ou
⇒ Glicemia 2 h pós-sobrecarga (TOTG*) \geq 200 mg/dL
Técnica do teste segundo recomendação da OMS

Na ausência de descompensação metabólica aguda, estes critérios devem ser confirmados noutra ocasião;
***Teste oral de tolerância à glicose, não recomendado de rotina**

3.2.3. Classificação

I. Diabetes mellitus tipo 1

___ Mediado por processo imune

___ Idiopático

II. Diabetes mellitus tipo 2

III. Outros tipos específicos

- Defeitos genéticos na função da célula β
- Defeitos genéticos na ação da insulina
- Doenças do pâncreas exócrino
- Endocrinopatias
- Induzido por drogas / produtos químicos

- Infecções
- Formas incomuns de diabetes auto-imune
- Síndromes genéticas associadas com diabetes

IV. Diabetes mellitus gestacional

Características fisiopatológicas

O DM tipo 1, também chamado de Diabetes mellitus insulino-dependente (IDDM) ou diabetes juvenil, compreende aproximadamente 10% da população diabética, e manifesta-se em crianças, adolescentes e adultos jovens, com pouca influência hereditária e suposta relação com doença auto-imune e órgão-específica. Resulta a quadros com destruição das células beta pancreáticas e conseqüente falta de fornecimento de insulina. Os pacientes são magros, com tendência à cetoacidose e com início repentino dos sintomas, havendo necessidade de tratamento com insulina (WHO, 1999; AKERBLOOM et al., 2002).

O DM tipo 2, também chamado de Diabetes mellitus não-insulino-dependente (NIDDM) ou diabetes senil, Compreende, aproximadamente, 90% da população diabética, que está estimada em 200 milhões de pessoas em todo mundo (MONEVA & DAGOGO, 2002). Manifesta-se em pacientes com idade superior a 40 anos, e tem elevado componente hereditário. São reconhecidos como fatores etiológicos a idade, a obesidade e a predisposição genética (FERRANNINI, 1995; BECK-NIELSE et al, 1995). Resulta de graus variáveis de

resistência à insulina e/ou deficiência relativa de secreção de insulina pelas células beta pancreáticas (ARNER et al., 1991; GERICH, 1998)

3.2.5. Complicações diabéticas crônicas

O diabetes mellitus como doença primária causa uma série de doenças secundárias, que são chamadas de complicações diabéticas crônicas, tardias ou de longo prazo, conseqüentes dos distúrbios bioquímicos produzidos pelo estado de hiperglicemia (GROSS, 2000). Existem várias rotas metabólicas que tentam explicar como a hiperglicemia, de longa duração, causa as complicações crônicas do diabetes mellitus, entre elas, a glicação de proteínas e o estresse oxidativo (GODIN et al., 1988; SCHNACKENBERG, 2002).

As proteínas glicosiladas podem mediar muitas das alterações microvasculares precoces do diabetes. As principais complicações crônicas para ambos os tipos de diabetes são: doenças vasculares, nefropatia, retinopatia, e neuropatia (MOHAMED et al. 1999, DAGOGO et al., 2002).

A doença microvascular é um aspecto importante do diabetes, e é responsável por muitas das complicações patológicas. Pequenas artérias e capilares mostram um espessamento da membrana basal, denominado de arterioesclerose hialina. O espessamento hialino da parede do vaso aumenta a sua rigidez, limita a capacidade de expansão e constrição, e reduz o diâmetro do

lúmen. Supõe-se que esta substância hialina seja resultado da glicação do colágeno, nos vasos. Esta anormalidade nos pequenos vasos é disseminada e responsável por alterações isquêmicas que são sintomáticas nos rins, retinas, cérebro e nervos periféricos (JANDELEIT & COOPER, 2002).

Nos rins, os capilares glomerulares mostram espessamento acentuado da membrana basal, associado ao aumento na permeabilidade das paredes capilares. Isto permite uma filtração plasmática no filtrado glomerular em quantidade superior à capacidade de reabsorção na parede tubular do néfron, ocasionando proteinúria e possível evolução para insuficiência renal. Atualmente, o diabetes é uma das causas mais comuns de insuficiência renal crônica (WAEBER et al., 2001). Os rins, encontram-se lesados de várias maneiras no diabetes. Há certas lesões renais que estão particularmente associadas ao diabetes, como o espessamento da membrana basal glomerular, a glomerulosclerose diabética (difusa ou nodular), lesões exsudativas glomerulares e necrose papilar. Estas lesões quando progressivas causam morte dos néfrons e podem levar ao longo do tempo à insuficiência renal crônica (CRITCHLEY et al., 2002; VALI & HENRICH, 2002).

3.2.5.1. Glicosilação não-enzimática das proteínas

É o processo pelo qual a glicose une-se quimicamente com proteínas, sem a ajuda de enzimas. A hiperglicemia existente nas condições diabéticas, altera a cinética de uma série de fenômenos bioquímicos naturais, conhecidos como “Reações de Maillard”. Este processo inicia com reações de glicosilação não-enzimática entre glicose e grupamento amino de proteínas (CABALLERO et al., 1998).

A glicose e outros açúcares reagem com resíduos N-terminais e/ou grupos amino de macromoléculas para formar inicialmente os adutos de “Bases de Schiff”. Em seguida estas aldíminas sofrem um rearranjo químico para formar uma cetoamina, que é um composto quimicamente mais estável (MOHAMED et al., 1999). Esta cetoamina é chamada de Produto de Amadori, nome do químico italiano que descreveu primeiramente este tipo de rearranjo (BROWNLEE et al., 1988).

Tanto as bases de Schiff, quanto os produtos de Amadori, são compostos intermediários quimicamente reversíveis, formam-se sem a ajuda de enzimas, e são chamados de Produtos Iniciais de Glicosilação não-enzimática (PIG). As bases de Schiff são formadas dentro de horas, enquanto que os produtos de Amadori são formados em questão de semanas (BROWNLEE et al., 1988; BROWNLEE et al., 1984).

A quantidade de PIG aumenta quando os níveis de glicose sanguínea são altos, e retorna para o normal quando os níveis de glicose são normalizados, uma vez que, são compostos reversíveis, e sua formação é dependente da concentração de glicose ao longo do tempo.

Visto que os PIG não se acumulam no colágeno ou outras proteínas estáveis de tecido, em diabetes crônica a sua concentração não está correlacionada com a presença ou com a severidade das complicações diabéticas tardias (VISHWANATH et al., 1986; BROWNLEE et al. 1988).

Os PIG sofrem um rearranjo químico complexo para formar os PTGA. Os níveis de PTGA não retornam para o normal quando a hiperglicemia é corrigida, acumulando-se, portanto, nas proteínas de longa duração, como nas proteínas dos vasos sanguíneos.

Os PTGA estão ligados irreversivelmente às proteínas e acumulam-se continuamente ao longo do tempo. A razão deste acúmulo é proporcional ao nível de glicose sanguínea e o tempo de exposição do tecido (BROWNLEE et al., 1988).

A formação de PTGA ocorre lentamente em condições glicêmicas normais, mas está aumentada na presença de hiperglicemia e/ou condições de estresse oxidativo, onde o “turnover” de proteínas e lipídeos é prolongado.

Conseqüentemente, a hiperglicemia crônica resulta na formação aumentada de PTGA, e esta é considerada um parâmetro de exposição dos tecidos à altas concentrações de glicose, ao longo do tempo (MAKITA et al., 1992; WOLFFENBUTTEL et al., 1996; MOHAMED et al., 1999).

A hemoglobina glicosilada, que resulta da glicosilação não-enzimática da hemoglobina, é considerada um marcador para a formação de PTGA, sendo portanto irreversível. O nível de hemoglobina glicosilada no sangue pode refletir o grau de glicosilação de outras proteínas que estão livremente expostas à altas concentrações de glicose, pela circulação sanguínea (PALMER & JAIN, 1997). Os efeitos deletérios da hiperglicemia foram observados também em outras proteínas abundantes fisiologicamente, tais como o colágeno e a albumina (SCHWARTZ, 1995; FU et al., 1992).

Existe uma correlação positiva significativa entre a formação aumentada de PTGA, e as complicações diabéticas tardias (BROWNLEE et al. 1988).

Existem algumas evidências de que a glicação de proteínas, por si só, pode induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, e esta, pode causar um dano oxidativo em moléculas endógenas (INOUYE et al., 1998).

Portanto, uma produção excessiva de radicais livres, e conseqüente depleção de antioxidantes, estão associadas com manifestações diabéticas

(HUNT et al., 1988; WOLFF & DEAN, 1987; RIZK et al., 1998) em eritrócitos de pacientes diabéticos (CABALLERO, 1995).

Evidências sugerem uma possível ligação entre o estresse oxidativo associado à hiperglicemia, e conseqüente dano celular, com desenvolvimento secundário de complicações diabéticas (Figura 5).

3.2.5.2. O papel dos PTGA nas complicações diabéticas tardias

Os PTGA tem um papel fundamental no desenvolvimento das complicações diabéticas tardias e, por isso, tem-se investigado muito para entender melhor esta rota metabólica (BROWNLEE, 1995). O aumento da formação de PTGA nos tecidos diabéticos precede, e está correlacionado, com as manifestações iniciais das complicações diabéticas tardias (BEISSWENGER et al., 1995). A glicosilação das proteínas foi originalmente caracterizada como um marcador de proteínas senescentes, para subsequente degradação pelos macrófagos (MOHAMED et al. , 1999). Recentemente, acredita-se que os PTGA, uma vez formados, podem ligar-se a vários receptores de superfície celular e, portanto, induzir a sinalização pós-receptor, ativação de transcrição, e a expressão de genes, tanto “in vivo” quanto “in vitro” (BIERHAUS et al., 1996; BIERHAUS et al., 1997; BIERHAUS et al., 1998; ESPOSITO et al., 1989; LI & SCHMIDT, 1997;

SCHMIDT et al., 1994; SCHMIDT et al., 1995; STITT et al., 1997; VLASSARA et al., 1994; VLASSARA et al., 1996; WAUTIER et al., 1996; YAN et al., 1994; YAN et al., 1997). Portanto, os PTGA não são apenas marcadores, mas também mediadores de complicações diabéticas tardias.

O papel dos PTGA como mediadores no desenvolvimento de complicações diabéticas tardias, foi pesquisado por alguns autores em modelos animais diabéticos, por meio da administração de PTGA, a curto e a longo prazo (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 administração a curto prazo de PTGA por várias horas, em até 6 dias, resultou em conseqüências como, o aumento da permeabilidade vascular, a diminuição do relaxamento endotelial, o recrutamento mononuclear subendotelial, a ativação do fator de transcrição NF-KB, e subsequente, expressão do gene dependente de NF-KB (BIERHAUS et al., 1998; SCHMIDT et al., 1995; SCHMIDT et al., 1995). A administração, a longo prazo, de PTGA, por várias semanas, levou ao espessamento na membrana basal das arteríolas, e uma complexa disfunção vascular. Também levou à expansão mesangial, à glomeruloesclerose e proteinúria (WAUTIER et al., 1996). Todas estas manifestações fisiológicas são também características das complicações diabéticas tardias em pacientes diabéticos.

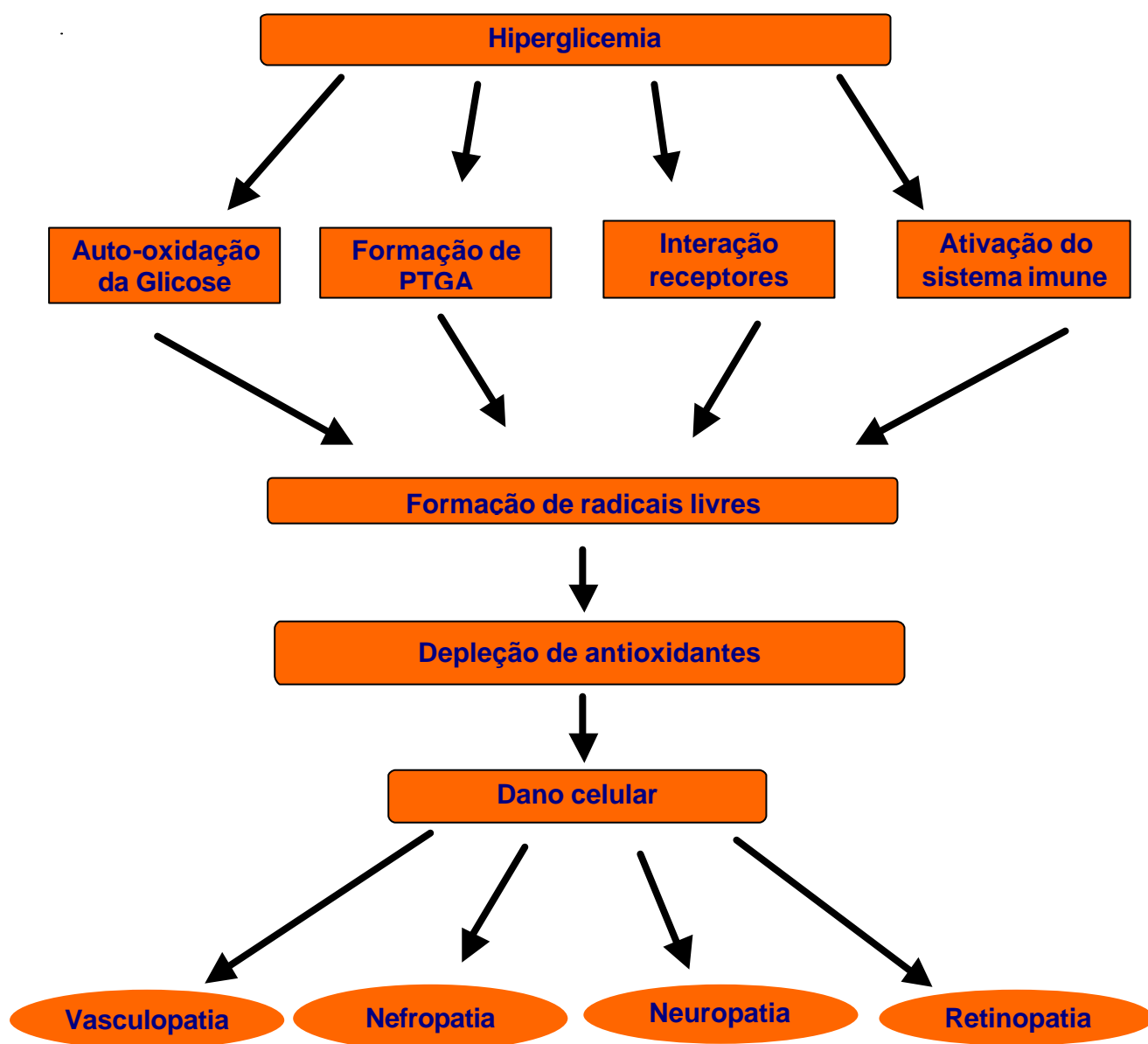


Figura 5. Possível ligação entre estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia e, subsequente desenvolvimento de complicações diabéticas (Figura modificada de Mohamed et al.,1999).

Um mecanismo suposto pelo qual os PTGA exercem seus efeitos nas células, é por meio de interações específicas com receptores celulares e com proteínas ligadas aos PTGA.

Um dos receptores que tem sido investigado em detalhes, é o receptor “RAGE” (receptor para AGE's), o qual está presente numa grande variedade de células, tais como células endoteliais e macrófagos (ABEL et al., 1995; BIERHAUS et al., 1996; BIERHAUS et al., 1997; BIERHAUS et al., 1998; BIERHAUS et al., 1998; ESPOSITO et al., 1989; LI & SCHMIDT, 1997; SCHMIDT et al., 1994; SCHMIDT et al., 1995; SCHMIDT et al., 1995; WAUTIER et al., 1996; YAN et al., 1994; YAN et al., 1997; VLASSARA, 2001).

A ligação dos PTGA com os “RAGE” resulta na geração intracelular de espécies reativas de oxigênio (ESPOSITO et al., 1989; SCHMIDT et al. 1995; YAN et al., 1997) e depleção paralela dos mecanismos de defesa antioxidantes (BIERHAUS et al., 1997).

O estresse oxidativo celular elevado, devido a formação exacerbada de PTGA, conseqüentemente, leva à uma ativação do fator de transcrição NF-KB, e subsequente expressão do gene dependente do fator NF-KB. Estes resultados foram observados em células endoteliais, células musculares lisas, monócitos, macrófagos e neurônios (BIERHAUS et al., 1997; BIERHAUS et al., 1997, BIERHAUS et al., 1998; ESPOSITO et al., 1989; SCHMIDT et al., 1994; SCHMIDT

et al., 1995; YAN et al., 1994; YAN et al., 1997). A indução da expressão do receptor “RAGE” endotelial foi identificada em vasos de pacientes com diabetes, uremia, arteriosclerose, e vasculite.

Em diabetes mellitus, há um aumento das espécies reativas de oxigênio, e conseqüente decréscimo na capacidade antioxidante, conduzindo para um estresse oxidativo elevado (GODIN et al., 1988; SUZUKI et al., 1992; BIERHAUS et al., 1997; SCHNACKENBERG, 2002).

3.3. d-ALA-D e Diabetes Mellitus

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 citocromos (JAFFE et al., 1995; SASSA, 1998).

A δ -ALA-D é uma das enzimas mais sensíveis da rota biossintética do grupo prostético heme e, portanto, ela tem sido investigada em várias patologias. A rota do heme está alterada em muitas doenças, entre elas as porfirias, as quais, freqüentemente, coexistem com diabetes mellitus (BURNHAM & FOSSNAUGH, 1961; GOERZ & KORDA, 1977; STRIFFLER et al., 1998; BITAR & WEINER, 1984; SCASSA et al., 1998).

Alguns autores têm relatado também que, em animais diabéticos experimentais, a atividade de várias enzimas está alterada (STRIFFLER et al., 1998; BITAR, 1984). 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). Essas alterações, ocorrem como consequência de bloqueios específicos na rota biossintética do heme, causadas pela inibição da primeira enzima desta rota bioquímica, a enzima δ -ALA-D (CABALLERO et al., 1995).

Outros estudos demonstram que algumas enzimas da rota biossintética do heme, tais como a δ -ALA-D, a porfobilinogênio desaminase, e a uroporfobilinogênio descarboxilase, são inibidas *in vitro* por altas concentrações de glicose, tanto em preparados de eritrócitos, como em eritrócitos de pacientes diabéticos (CABALLERO et al., 1995), e em animais com diabetes experimental induzida por estreptozotocina (POLO et al., 1995). De acordo com estes resultados recentes, conclui-se, que o índice de alterações na rota biossintética do grupo prostético heme na população diabética é elevado (FERNÁNDEZ-CUARTERO et al., 1999).

RATNAIKE et al.(1987), em seus relatos, sugeriram que o dano na atividade da δ -ALA-D de eritrócitos, em pacientes diabéticos, é paralelo ao

aumento da hemoglobina glicosilada, provavelmente como resultado da glicosilação desta enzima. Também, foi concluído que ocorre uma redução na atividade e/ou na concentração da enzima δ -ALA-D eritrocitária em pacientes diabéticos, e que isto é dependente do aumento da concentração de glicose e/ou de hemoglobina glicosilada (POLO et al., 1993). Semelhantemente, em experimentos com ratos diabéticos, pesquisas demonstram que há uma correlação inversa entre o nível de glicose sanguínea e a atividade da δ -ALA-D, tanto nos eritrócitos quanto no tecido hepático (POLO et al., 1990; GARRO et al., 1990; BITAR et al., 1984).

Em suas pesquisas Folmer et al. (2002) observaram que, no tecido renal, hepático e cerebral, houve 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 TBARS.

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).

3.4.Hipotireoidismo

O hipotireodismo uma síndrome clínica que resulta da secreção ou ação deficiente dos hormônios tireoideanos para as necessidades metabólicas normais do organismo (BRAVERMAN & UTIGER, 1996).

A forma mais comum de hipotireoidismo é a primária, também denominada tireoideana (90 % dos casos), conseqüente a uma alteração da glândula, a qual provoca uma diminuição na produção e secreção do hormônio tireoideano, sendo esta, acompanhada invariavelmente por secreção aumentada de tireotropina (TSH) (MULDER, 1998).

O hipotireoidismo é uma condição endócrina muito freqüente, apresenta prevalência na população geral de 0,5 a 1 % e, na população acima de 65 anos, de 2 a 5 %. Atinge predominantemente as mulheres com 0,6 a 5,95 % contra 0,2 % do sexo masculino (HELFAND & CRAPO,1990). Os índices de prevalência dependem do critério diagnóstico e da população estudada e, como mencionado, a incidência tende a aumentar com a idade, situando-se o pico entre a quarta e a sexta décadas de vida. O hipotireoidismo congênito é diagnosticado em 1 em cada 4.000 recém-nascidos (HELFAND & CRAPO, 1990). A causa do hipotireoidismo é variável e depende de: fatores geográficos; fatores ambientais, como o iodo alimentar e ingestão de bocígenos na dieta; características genéticas da

população; idade de aparecimento, ou seja, se criança ou adulto (LINDSAY & TOFT, 1997).

A síntese hormonal tireóidea é iniciada pelo transporte ativo do substrato iodeto pela membrana basolateral da célula folicular, por intermédio de um importador de sódio e iodeto (Na^+/I ou NIS) (De LA VIEJA et al., 2000). A pendrina, cambiador aniônico recentemente identificado, pode facilitar o transporte do iodeto através da membrana apical (EVERETT et al., 1999; KOPP, 2000). Na face luminal desta última, a tireoperoxidase (TPO) oxida o iodeto e, subsequentemente, introduz o iodo em resíduos tirosil da tireoglobulina (Tg) intrafolicular (incorporação de iodeto). As iodotirosinas (MIT e DIT) são conjugadas para formar T3 e T4, reação também catalisada pela TPO (conjugação).

As reações de incorporação e conjugação necessitam do agente oxidante H_2O_2 , gerada por um sistema dependente de flavoproteína. Recentemente, foram identificadas 2 nicotinamida-fosfato (NADPH) oxidases (Thox 1 e Thox 2) as quais participam do sistema gerador de peróxido de hidrogênio (DE DEKEN, et al., 2000).

A Tg contendo T3 e T4 é internalizada na célula folicular por micro e macropinose e digerida nos lisossomos. Enquanto o T3 e T4 são secretados na corrente sanguínea, o MIT e DIT são desalogenados e reciclados.

Até o presente foram identificados vários defeitos genéticos que afetam a biossíntese hormonal tireóidea. Estas moléstias decorrem de mutações inativadoras em genes codificadores de proteínas essenciais à síntese, armazenamento, secreção ou utilização dos hormônios (MEDEIROS-NETO; STANBURY,1994).

3.4.1.Tireoglobulina

A Tg é elemento chave na síntese hormonal e no armazenamento de iodo e hormônios tireóideos. Concentração baixa ou limítrofe de Tg pode indicar defeito quantitativo, enquanto pacientes com defeito qualitativo exibem níveis normais ou elevados. Em outros casos, a alteração genética provoca retenção intracelular ou modificações secundárias. Alguns indivíduos com Tg estruturalmente alterada exibem conjugação prejudicada das iodotirosinas onde a maioria do iodo incorporado encontra-se na forma de MIT e DIT. A situação metabólica oscila entre o eutireoidismo, hipotireoidismo subclínico e hipotireoidismo franco. O primeiro relato de mutação associada à expressão anormal de Tg foi descrita por LEIRI e cols. em 1991. Estudos de seqüenciamento mostraram a perda do exon 4 do gene da Tg, que levava à síntese de uma glicoproteína anormal, isto é, sem um segmento peptídico de 68 aminoácidos.

3.5. d-ALA-D e Hipotireoidismo

A função dos hormônios tireoideanos é regular o metabolismo tissular. Além disso, nas crianças, são também necessários para o desenvolvimento do sistema nervoso central e para o crescimento e maturação óssea (BRENT & LARSEN, 1996).

A biossíntese dos hormônios da tiróide depende do funcionamento normal de uma série de proteínas que são necessárias tanto para a captação de iodeto da membrana basolateral dos tireócitos como sua incorporação a proteína acetona, a tireoglobulina (Tg), o que ocorre na superfície apical da célula folicular. O co-transportador sódio-iodeto (NIS) é responsável pela tireoideana de iodeto, a primeira etapa da biossíntese hormonal tireoideana.

No pólo apical dos tireócitos, o iodeto é transportado através da membrana celular pela pendrina (PDS) e subseqüentemente incorporando a Tg, uma proteína de alto peso molecular secretado no lúmen folicular. A oxidação do iodeto e sua organificação parecem ocorrer principalmente na superfície apical da célula folicular e estas reações são catalisadas pela tireoperoxidase (TPO), na presença de peróxido de hidrogênio.

Assim, a organificação do iodo depende da TPO a qual é modulada pelas concentrações dos substratos tireoglobulina, iodeto e peróxido de hidrogênio.

A enzima responsável pela geração de peróxido de hidrogênio associada a hormonogênese tireoideana é a NADPH oxidase (Th Ox) que, se encontra no pólo apical dos tireócitos, ela é estimulada pela tireotrofina (TSH) e inibida pelo iodo. Aparentemente a geração de peróxido de hidrogênio é o passo limitante da biossíntese dos hormônios tireoideanos em concentrações suficientes de iodo.

O mecanismo de ação dos hormônios tireoideanos é feito através da ligação aos receptores nucleares de T_3 presente na maioria das células, que influenciam de maneira positiva ou negativa a transcrição gênica, quando o promotor de um determinado gene tem a capacidade de interagir com o complexo T_3 (TOFT, 1994). Um exemplo seria a célula cardíaca, que apresenta diversos genes condicionados por T_3 (receptores colinérgicos, Na/K ATPase, enzimas da miosina, adenilciclase, enzimas do retículo sarcoplasmático, hormônio natriurético atrial) (TOFT, 1994). Portanto, a consequência do hipotireoidismo na função cardíaca expressa-se pelos efeitos que a deficiência de T_3 causará na inibição ou na expressão dessas proteínas.

Com relação ao sistema hematopoiético, os pacientes são habitualmente anêmicos, em razão da redução fisiológica da síntese de hemoglobina, causada pela diminuição do consumo de oxigênio e vários outros mecanismos envolvidos (WERNER & INGBAR, 2000).

Observação: até esse momento, não há na literatura referências bibliográficas sobre hipotireoidismo e δ -ALA-D.

3.6. δ -ALA-D e Metais

Devido a sua natureza tiólica, 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.

A presença de íons metálicos em excesso aceleram a degradação de heme e prejudicam as funções oxidativas das células, principalmente aquelas dependentes de citocromo P450, o que determina um impacto biológico em relação às substâncias que são detoxificadas ou transformadas metabolicamente pelo mesmo (MAINES & KAPPAS, 1977).

A ação inibitória de metais sobre a enzima tem sido objeto de numerosos estudos.

O estudo desta enzima intensificou-se ao se constatar que a diminuição da sua atividade, em sangue humano, poderia ser significativamente correlacionada com a concentração sangüínea de chumbo e, desta forma, auxiliar no diagnóstico da intoxicação aguda e crônica por esse metal (BONSIGNORE et al.,1966; NAKAO et al.,1968; HERNBERG et al,1970; MEREDITH et al.,1979). GRANICK

(1973), para a avaliação do nível de inibição enzimática por chumbo, utilizou o quociente entre a atividade da enzima reativada por ditioneitol (DTT) e a atividade não reativada. O inverso desse quociente também foi utilizado por SAKAI et al., (1980). Em ambos os casos, foram encontrados índices de correlação ainda superiores ao observado entre a concentração sanguínea de chumbo e a atividade enzimática como tal. O zinco (Zn^{2+}) que apesar de ser, normalmente ativador da enzima em baixas concentrações (ABDULLA & HAEGER-ARONSEN, 1971), inibe-a em concentrações elevadas (na ordem de 10^{-3} M) (FINELLI et al., 1974; ANDERSON & DESNICK, 1979; SOMMER & BEYERSMANN, 1984). O cádmio (Cd^{2+}) *in vitro*, em baixas concentrações, exerce um efeito ativador da δ -ALA-D de sangue humano e, em concentrações elevadas um efeito inibidor (BELLINASSO, 1985). Um comportamento semelhante foi demonstrado para a enzima de fígado bovino (WILSON et al., 1972). No entanto, o efeito de Cd^{2+} *in vivo* sobre a δ -ALA-D parece não ser relevante. LAUWERYS et al., (1973) observaram uma correlação não significativa entre a concentração sanguínea de cádmio e o logaritmo da atividade da δ -ALA-D, em trabalhadores exposto, ocupacionalmente, ao cádmio.

Foi descrito por alguns pesquisadores que o cobre *in vitro* inibe a atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase (NELSON et al., 1981).

O Hg^{2+} , outro íon que apresenta elevada afinidade por grupos sulfidrilas, também é um inibidor da δ -ALA-D. WADDA et al., (1969) demonstraram que havia

uma diminuição da atividade da δ -ALA-D em trabalhadores expostos ao mercúrio que excretavam mais de 200 $\mu\text{g Hg}^{2+}/\text{g}$ de creatinina na urina. Contudo MITCHELL et al. (1977), demonstraram que o Hg^{2+} , quando presente em baixas concentrações *in vitro*, aumenta a atividade da δ -ALA-D de sangue humano, inibindo-a em altas concentrações. Segundo os autores, esta é a primeira evidência de um efeito ativador do Hg^{2+} sobre a δ -ALA-D.

Delta-Aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism

João Baptista D'Andrea Souza, João Batista Teixeira Rocha, Cristina Wayne Nogueira, Rosilene Rodrigues Kaizer, Vera Maria Morsch, Valderi Dressler, Ayrton Figueiredo Martins, Maria Rosa Chitolina Schetinger*

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

*Corresponding author:

Dr. Maria Rosa Chitolina Schetinger
Departamento de Química
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria RS Brasil - 97105-900

E-mail: mariarosa@smail.ufsm.br

4.1. ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the influence of type 2 diabetes mellitus and primary hypothyroidism on the activity of the delta-aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) enzyme in human blood. This enzyme is important for all aerobic organisms as it takes part in the route of tetrapyrrolic molecules as prosthetic groups. δ -ALA-D enzyme activity in the blood was determined in normal (healthy) people (n=29), compensated (n=11) and non-compensated diabetic patients (n=23), and in patients with compensated (n=19) and non-compensated primary hypothyroidism (n=10). The in vitro effect of medicines (metformin, chlorpropamide, glibenclamide, glimeperide and thyroxine) used by patients was evaluated and no alteration was found on δ -ALA-D activity. The amount of metal (lead, copper and zinc) present in the blood of the patients was also measured. There was no difference among the groups studied. A significant aspect of this study shows that δ -ALA-D activity was decreased ($p < 0.001$) in situations associated to hyperglycemia maintained for long periods (HbA_{1c} high). Another finding of this study suggests that states of hypofunction of the thyroid gland, when non-compensated, increase the activity of δ -ALA-D ($P < 0.001$). This result points out that there is a correlation among diabetes, hypothyroidism and δ -ALA-D activity.

Key words: δ -aminolevulinate dehydratase, diabetes mellitus, hypothyroidism.

4.2. INTRODUCTION

The δ -ALA-D enzyme is essential for all aerobic organisms and takes part in the route of formation of tetrapyrrolic molecules (heme and chlorophyll). The main importance of these compounds is their function as prosthetic groups of proteins, such as hemoglobin, myoglobin, cytochromes, catalases and peroxidases (1). This enzyme is sensitive to oxidant agents in vitro and also can be decreased in situations associated with oxidative stress, including diabetes (1).

Diabetes mellitus is a metabolic disturbance with multiple etiologies characterized by the presence of chronic hyperglycemia, which causes alterations in the metabolism of carbohydrates, fats and proteins. The main fact that determines the presence of abnormal glucose levels results either from the deficient or inappropriate action of insulin (2).

Advanced glycation end products (AGE's) are commonly generated in diabetic patients. The origin of these products depends on the long-term exposition to hyperglycemia (3) and associated with the production of free radicals (4). The glycation of proteins can cause changes in physiologically abundant proteins, such as collagen, which can be related to micro and macro-circulation problems found in diabetes. Furthermore, enzymes sensitive to pro-oxidant states, such as δ -ALA-D, are also inhibited in human and experimental diabetes (5-6).

Therefore, the study of δ -ALA-D activity in diabetic patients may be an additional parameter useful to evaluate whether the metabolic control of patients is suitable.

Hypothyroidism is a clinical syndrome that results from the insufficient production or action of thyroid hormones, leading to a total decrease of metabolic processes (7). Thyroid hormone biosynthesis depends on the normal functioning of a series of proteins such as thyroglobulin and thyroperoxidase, which is necessary for the uptake of iodine into thyrocytes (8-9). Although limited data are still available, there are points of evidence in the literature indicating that hypothyroidism is associated with oxidative stress. Thus, we have hypothesized that δ -ALA-D, which is sensitive to pro-oxidant states, could be altered by uncontrolled hypothyroidism.

The main objective of this study was to detect possible alterations on δ -ALA-D activity in diabetes mellitus and primary hypothyroidism with particular emphasis on the compensated and non-compensated states of these pathologies.

4.3. MATERIALS AND METHODS

4.3.1. Sample

Samples were obtained from patients of both genders, with ages varying from 13 to 90 years. They were recruited from the Astrogildo de Azevedo Caridade Hospital in Santa Maria or from the out-patient treatment center.

This study was approved by the Ethical Committee of the Universidade Federal de Santa Maria (resolution 196/96). All the patients gave written informed consent to participate in this study. δ -ALA-D activity was analyzed in 92 patients, 29 control patients (healthy, without disease or medications), 11 compensated diabetic patients, 23 non-compensated diabetic patients, 19 compensated hypothyroidism and 10 non-compensated hypothyroidism. All patients possess registered data (disease, glucose level, hematocrit, hemoglobin, glycated hemoglobin A_{1c} , leucocytes number, medicines, age, weight, time of the disease and gender).

For classification of diabetes patients

A patient was considered diabetic when he/she had 2 fasting glycemia tests equal or greater than 126 mg/dL or when his/her oral tolerance test (75 g of glucose) was equal or superior to 200 mg/dL (measured 2 hours after ingestion).

Compensated diabetics were those who had glycated hemoglobin A_{1c} smaller or equal to 7% and non-compensated diabetics were those who had glycated hemoglobin A_{1c} higher than 7%.

For classification of hypothyroidism patients

TSH (thyroid stimulating hormone) was used as the biochemical criterion. Further, patients with TSH equal or superior to 6 μ IU/mL were classified as non-

compensated (hypothyroidism), whereas the patients with TSH inferior to 6 μ IU/mL were considered compensated.

4.3.2. d-ALA-D determination

Blood δ -ALA-D activity was determined as described by Berlin and Schaller method, 1974 (10).

In order to determine whether δ -ALA-D activity alterations caused by diseases could be related to enzyme oxidation, a set of tubes was assayed using a similar incubation medium, except that 2 mmol/L of dithiothreitol (DTT) was added to obtain the reactivation index.

4.3.3. Glycated hemoglobin A_{1c} and glucose

HA_{1c} was measured by low pressure chromatography using DiaSTAT (BIO-RAD equipment) (11) and glucose was determined as described by Trinder (12).

4.3.4. TSH hormone

The determination of the thyroid stimulanting hormone (TSH) was carried out through a third generation method in a immunometric assay in chemiluminescent solid phase by IMMULITE 2000 equipment, which is the most appropriate test for this hormone determination (13).

4.3.5. Metal dosages

The concentration of metals was determined by spectrophotometer method of atomic absorption with generation of cold vapor (CVAAS) using a spectrometer of atomic absorption Perkin Elmer (mod.3030), with a generator of cold vapor Perkin Elmer (mod. MHS 10).

4.3.6. Statistics

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) (SPSS for Windows 8.0, SPSS 1998, Chicago, IL). When the one-way ANOVA was significant, differences between groups were determined using Duncan's Multiple Range test (SPSS for Windows 8.0, SPSS 1998, Chicago, IL). Differences between groups were considered to be significant when $P < 0.05$. Linear correlation between variables was also carried out.

4.4. RESULTS

Demographic data, gender, glycemia, hemoglobin A_{1c}, hematocrit and TSH are represented on table 1. The age of the patients varied from 13 to 90 years ($P < 0.001$). Glycemia was higher in the non-compensated diabetics when compared to the other groups studied ($P < 0.001$). Although the controlled diabetic patients had lower glyceimic levels than uncontrolled diabetic patients, their

glycemia was higher than the controls. Similarly, HbA1c was higher in uncontrolled diabetic patients, than in controlled patients, whereas controlled diabetic patients showed higher levels of HbA1c when compared to control subjects. The glycated hemoglobin was higher in non-compensated diabetics when compared to the control group (108.4%, $P < 0.0001$).

The TSH analysis was expressively high in the group of patients with non-compensated hypothyroidism when compared to the other groups (3,360.66 %, $P < 0.001$). More details about these data see table 1.

δ -ALA-D activity in non-compensated diabetic patients was decreased about 50 % when compared to that of the control and compensated diabetic subjects (Figure 1). Similar results were obtained when δ -ALA-D activity was determined in the presence of DTT (Figure 2).

δ -ALA-D activity in non-compensated hypothyroidism was increased when compared to the control group (79.31%), compensated hypothyroidism (79.31%), non-compensated diabetic (255.89%) and compensated diabetic group (93.38%) (Figure 1).

Analyzing only the groups of compensated and non-compensated diabetic patients ($n=34$) there was a statistically significant correlation between the diabetic state (controlled group was scored as 1 and non-controlled as 2) and blood glucose ($r=0.753$, $P < 0.001$), glycated hemoglobin A_{1c} ($r=0.812$, $P < 0.001$), and

δ -ALA-D activity ($r = -0.733$, $P < 1.0001$). The glycated hemoglobin levels were correlated with glucose levels ($r = 0.819$, $P < 0.0001$); body weight ($r = 0.419$, $P = 0.014$), and δ -ALA-D activity ($r = -0.718$, $P < 0.0001$). Glucose levels were correlated with body weight ($r = 0.375$, $P = 0.029$), and δ -ALA-D activity ($r = 0.596$, $P < 0.0001$). TSH level was correlated with δ -ALA-D activity ($r = 0.769$, $P < 0.001$).

There was no effect on δ -ALA-D activity *in vitro* in the presence of different concentrations of medicines used by the patients (Data not shown). Also, levels of lead, copper and zinc were not different among the groups (data not shown).

4.5. DISCUSSION

In this study we found that δ -ALA-D activity was decreased in patients with non-compensated diabetes mellitus. Our data are in accordance with Fernandez Cuartero et al. 1999 (5). The authors above mentioned showed that δ -ALA-D activity in the erythrocytes of insulin dependent diabetic and non insulin-dependent diabetic patients was decreased when compared with the control group. Fernandez-Cuartero et al. (5), found that in diabetic insulin-dependent patients the reduction of enzyme activity was related to the concentration of glycated hemoglobin; in non insulin-dependent diabetics, the reduction of δ -ALA-D activity was related to glicemic levels. However, to the best of our knowledge, our study compares δ -ALA-D activity between non-controlled and controlled diabetics for the

first time. Thus, we were able to show that control of the diabetic state can modify the activity of δ -ALA-D. Since δ -ALA-D is sensitive to pro-oxidant states, this indicates that controlled diabetic patients are exposed to a lower level of oxidative stress than uncontrolled diabetics patients.

Djordjevic (1985) (14) showed that δ -ALA-D activity in the blood of normal patients exposed *in vitro* to glucose was decreased, whereas the insulin addition did not alter the enzymatic activity. In this same study, the decrease in δ -ALA-D activity was correlated with the levels of glucose in the blood of diabetic patients. Similarly δ -ALA-D activity was impaired after the addition of high levels of glucose *in vitro* (15) and also in the erythrocytes of the diabetic patients (16). In our study, we showed a correlation among the elevation of glucose levels, glycated hemoglobin A_{1c} and the decrease in enzymatic activity in non-compensated diabetic patients.

Non-enzymatic glycation of hemoglobin is a slow process and it seems to reflect the degree of glycation of other proteins, which are often exposed to current glucose (17). Thus, the inhibition of δ -ALA-D in non-compensated diabetes mellitus is supposed to be a consequence of the glycation in the lysine residue from the active site of δ -ALA-D, which is involved in the formation of the Schiff basis with the first molecule of ALA. In addition, oxidation of essential cysteine from the enzyme, can contribute to the inhibitory effect of hyperglycemia (18).

The results of the present investigation are in accordance with data from animal models of diabetes (3,5,19,20) where a significant inhibition of δ -ALA-D is invariably described.

Our research also studied the δ -ALA-D activity in patients with primary hypothyroidism. A thyroperoxidase is a glycosylated heme protein, which has an important role in the synthesis of thyroid hormones (21-24). When precursors of heme biosynthesis were added, such as holotransferrin or aminolevulinic acid, thyroperoxidase activity saw an increase of 20% (23). Hence, aminolevulinic acid is a positive modulator of thyroperoxidase activity. Hypothyroidism is an altered metabolic state where the production of thyroperoxidase hormones are decreased and consequently, thyroperoxidase is as well. In hypothyroidism there is more aminolevulinic acid available and this could explain the elevation of δ -ALA-D activity observed in hypothyroidism.

4.6. CONCLUSION

We can conclude that the activity of δ -ALA-D is increased in the group of non-compensated hypothyroidism and non-compensated and decreased in the non-compensated diabetes, and may be it could be related to the complications observed in such pathologies. There was no effect on δ -ALA-D activity *in vitro* in the presence of different concentrations of medicines used by the patients (Data

not shown). Also, levels of lead, copper and zinc were not different among the groups (Data not shown).

4.7. REFERENCES

1. **Jaffe EK** 1995 Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. *J Bioenerget Biomem* 27:169-179
2. **American Diabetes Association** 1998 Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 21: S5-S19
3. **Mohamed AK, Bierhaus a, Schiekofer ST, Tritschler H; Ziegler R, Nawroth P** 1999 The role of oxidative stress and NF- κ B activation in late diabetic complications. *BioFactors* 10: 157-167
4. **Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S, Lowe JE, Abdel-Aleem S** 1999 Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism*, 48:1414-1417.
5. **Fernández-Cuartero B, Rebolar JL, Batlle A, Enriquez de Salamanca R** 1999 Delta aminolevulinate dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 479-488

6. **Folmer V, Soares JCM, Rocha, JBT** 2002 Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content in the diet. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1279-1285.

7. **Braverman LE, Utiger RD** 1996 Introduction hypothyroidism. *Werner and Ingbar's the thyroid*, 7thed. Lippincott Raven-publishes, Philadelphia, p. 736-737

8. **Civitareale D, Saiardi A, Falasca P** 1994 Purification and characterization of thyroid transcription factor 2. *J Biochem* 304:981-985

9. **Francis-Lang H, Price M, Polycarpou-Schwarz M, Di Lauro R** 1992 Cell-type-specific expression of rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Mol Cell Biol* 12:576-88

10. **Berlin A, Schaller KH** 1974 European standardized method for the determination of δ - aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem* 389 – 390

11. **DiaSTAT BIO-RAD equipment** 1998 This analysis was done through chromatography of low pressure. Catalog number 210-0002-USA

12. **Trinder P** 1969 Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen receptor. *Ann Clin Biochem* 6:24.

13. **IMMULITE equipment** 2000 The determination of the thyroid stimulanting hormone (TSH) was done in a immunometric assay in chemiluminescent solid phase. Catalog Immulite 200-number L2KTS2-USA

14. **Djordjevic V** 1985 Delta- aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocyte diabetic patients. *Arch Int Physiol Biochim* 93: 285 – 90

15. **Garro JC, Polo CF, Cirigliano A, Rossetti MV, Wider EA** 1990 Glucose effect on haem metabolism. *Mol Aspects Med* 11: 28

16. **Caballero F, Gerez, E.; Polo C, Mompo O, Vazquez, E, Schultz, R, Bernabo J, Batlle A** 1995 Alteraciones en el camino metabólico del hemo en pacientes diabéticos. *Med. Buenos Aires* 55: 117-124

17. **Palmer M & Jain SK** 1997 The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin e on glycosylation of proteins. *Free Radic Biol Med* 4: 593-596

18. **Jaffe EK** 2000 The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes. *Acta Cryst D – Biol Cryst* 56:115-128
19. **Polo C, Vazquez E, Gerez E, Cabellero F, Battle A** 1995 STZ-induced diabetes in mice and heme pathway enzymes. Effect of allylisopropylacetamide and alfa-tocopherol. *Chem Biochem Interact* 95: 327-334
20. **Folmer V, Soares JC, Gabriel D, Rocha JBT** 2003 A high fat diet inhibits delta-aminolevulinate dehydratase and increases lipid peroxidation in mice *J Nutr* 133: 2165-70
21. **Taugog A** 2000 Thyroid hormone synthesis. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *The thyroid: A fundamental and clinical text*, 8th ed. New York: Lippincott-Raven, p.85-91
22. **Medeiros-Neto GA, Billerbeck AE, Wajchenberg BL, Targovnik HM** 1993 Defective organification of iodide causing hereditary goitrous hypothyroidism. *Thyroid* 3:143-59

23. **Fayadat L, Niccoli-Sire P, Lanet J, and Franc JL** 1999 Role of heme in intracellular trafficking of thyroperoxidase and involvement of H₂O₂ generated at the apical surface of thyroid cells in autocatalytic covalent heme binding. *J Biol Chem* 274:10533-10538.

24. **DePillis G, Ozaki S, Kuo JM, Maltby DA, and Ortiz de Montellano PR** 1997 Autocatalytic processing of heme by lactoperoxidase produces the native protein-bound prosthetic. *J Biol Chem* 272: 8857-8960

Table 1: Characteristic of the five groups: Age (years), Sex (M:F), Glycemia, Glycated Hemoglobin A_{1c}; Hematocrit, Thyroid Stimulating Hormone (TSH).

	Controls	DM compensated	DM non-compensated	Hypothyroidism compensated	Hypothyroidism non-compensated	ONE-WAY P
Characteristic	n=29	n=11	n=23	n=19	N=10	P
Age, years	37.2±17.6 ^a	57.4±17.4 ^c	56.4±11.6 ^c	53.0±14.8 ^{b,c}	40.2±17.5 ^{a,b}	<0.001
Sex M:F	7:22	6:5	7:16	2:17	1:9	0.066
Glycemia:mg/dL	90.0±9.5 ^a	125.6±23.9 ^b	283.6±65.3 ^c	92.5±11.0 ^{a,b}	85.9±14.3 ^a	<0.001
HbA _{1c} , %	4.7±0.7 ^a	6.1±0.8 ^b	9.9±1.5 ^c	5.2±0.7 ^{a,b}	4.8±0.4 ^a	<0.001
Hematocrit, %	37.1±2.3	37.1±3.7	35.9±5.3	36.4±2.0	37.8±2.0	0.578
TSH, µIU/mL	1.9±0.9 ^a	2.1±1.1 ^a	2.2±1.1 ^a	2.6±1.5 ^a	66.0±55.6 ^b	<0.001

DM: diabetes mellitus; Hb glic: glycated hemoglobin A_{1c}; TSH: Thyroid stimulant hormone. Non-coinciding index letters represent statistically significant differences.

Table 2. Correlation between diabetes, glucose, Hb glycated, δ -ALA-D and body weight.

	Glucose	HbA _{1C}	δ -ALA-D	δ -ALA-D+DTT	Body weight
Diabetes Mellitus (n=34)	r= 0.753 P<0.000	r= 0.812 P<0.000	r= -0.733 P<0.000	r= -0.570 P<0.0001	r= 0.236 P= 0.179
HbA _{1C}	r= 0.819 P<0.000	r= 1.000 P= 1	r= -0.718 P<0.000	r= -0.626 P<0.0001	r= 0.419 P=0.014
Glucose	r= 1.000 P= 1	r= 0.819 P<0.000	r= -0.596 P<0.000	r= -0.476 P= 0.004	r= 0.375 P= 0.029
δ -ALA-D	r= -0.596 P<0.001	r= -0.718 P<0.000	r= 1.000 P= 1	r= 0.929 P<0.0001	r= -0.196 P= 0.267
Age, Years	r= -0.119 P= 0.502	r= -0.161 P= 0.361	r= 0.253 P= 0.148	r= 0.287 P= 0.100	r= -0.545 P= 0.001

Table 3. Correlation between hypothyroidism, TSH, hematocrit, body weight, and δ -ALA-D activity.

	Thyroid Stimulating Hormone	δ -ALA-D	δ -ALA-D With DTT
Hypothyroidism Plus Control (n=58)	r= 0.612 P<0.0001	r= 0.554 P<0.000	r= 0.522 P<0.0001
TSH	R= 1.000 P - - - -	r= 0.769 P<0.000	r= 0.744 P<0.0001
Hematocrit	r= 0.236 P= 0.074	r= 0.324 P= 0.013	r= 0.304 P= 0.020
Weight	r= -0.082 P= 0.539	r= -0.213 P= 0.107	r= -0.197 P= 0.137
δ -ALA-D	r= 0.769 P<0.0001	r= 1.000 P - - - -	r= 0.955 P<0.0001

FIGURE LEGENDS

Figure 1. δ - ALA-D activity human blood obtained from compensated Diabetes mellitus (CDM, n=11), non-compensated Diabetes mellitus (NCDM n=23), compensated hypothyroidism (CH, n=19), non-compensated hypothyroidism (NCH, n=10) and control (n=29). Activity is expressed as $\mu\text{mol PBG/h/mg}$ of protein. Results represent the mean \pm standard deviation of each group. * Different from the others to $p < 0.05$.

Figure 2. δ -ALA-D activity with reactivation (DTT) from human blood obtained from compensated Diabetes mellitus (CDM, n=11), non-compensated Diabetes mellitus (NCDN, n=23), compensated hypothyroidism (CH, n=19), non-compensated hypothyroidism (NCH, n=10) and control (n=29). Details are described in material and methods. Activity is expressed as $\mu\text{mol PBG/h/mg}$ of protein. Results represent the mean \pm standard deviation of each group. * Different from the others to $p < 0.05$.

Figure 1

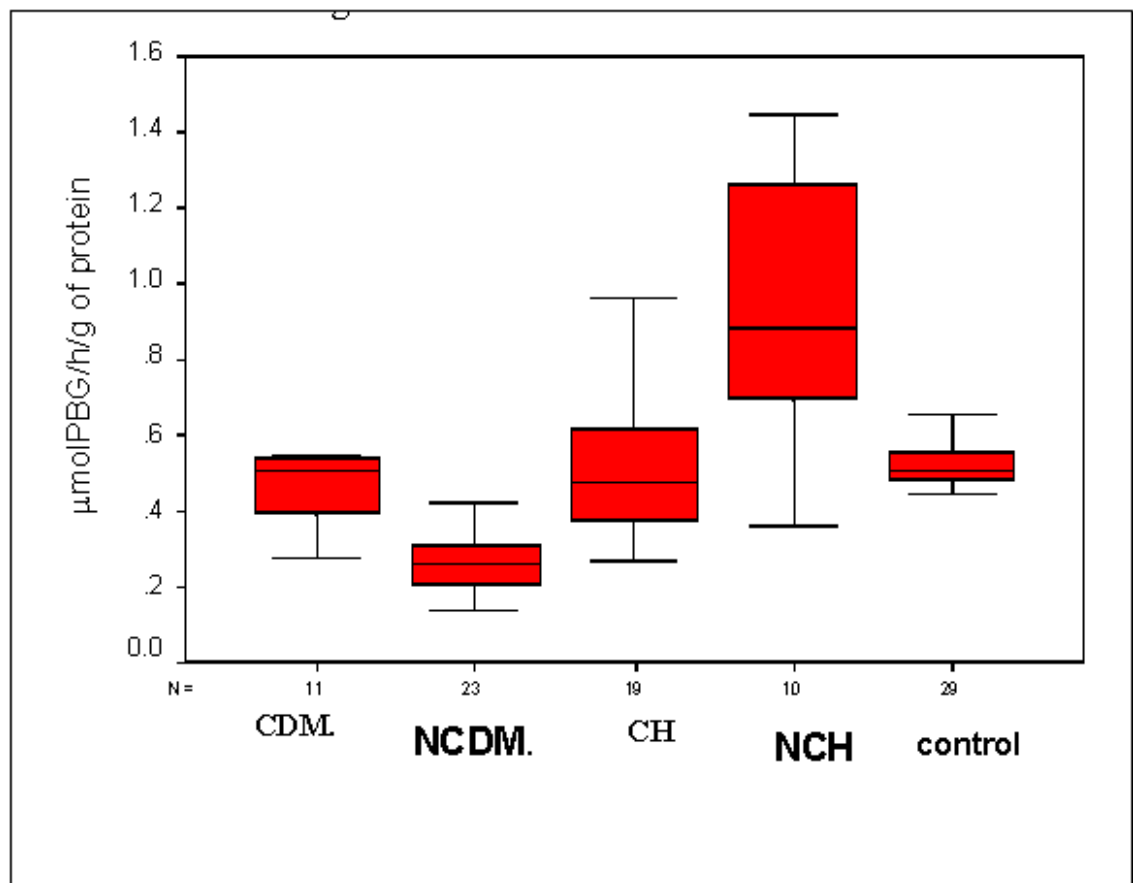
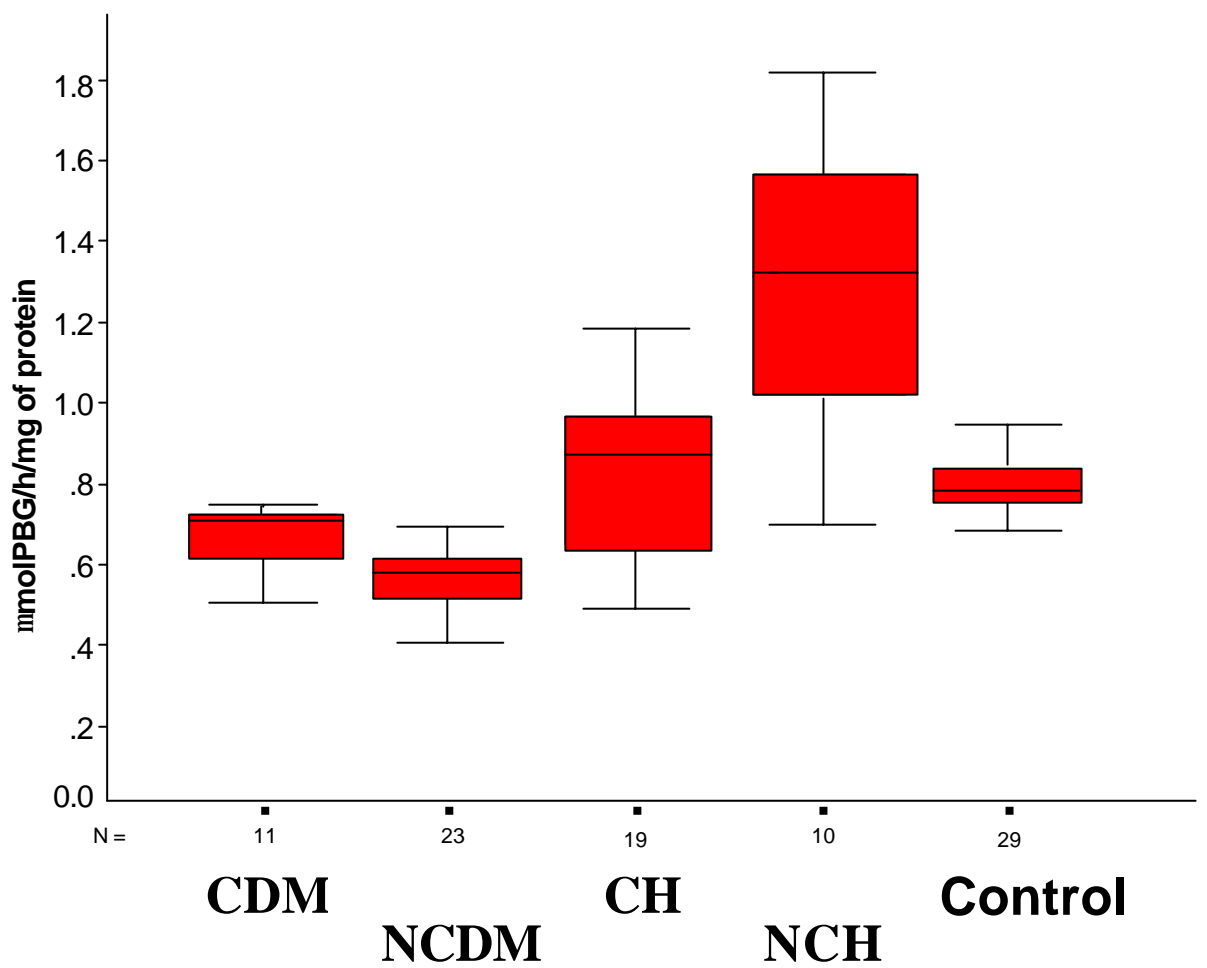


Figure 2



5. Discussão

As alterações na atividade da δ -ALA-D foram enfocadas nesse trabalho, numa tentativa de melhor compreender os mecanismos bioquímicos das alterações do diabetes mellitus e do hipotireoidismo primário. Pesquisadores concluíram que ocorre uma redução na atividade e/ou na concentração da enzima δ -ALA-D eritrocitária em pacientes diabéticos, e que isto é dependente do aumento da concentração de glicose e/ou de hemoglobina glicosilada (POLO et al., 1993).

Nesse trabalho, verificou-se que a atividade da δ -ALA-D apresenta-se diminuída nos pacientes com diabetes mellitus descompensados. Estes dados estão de acordo com aqueles de Fernandez-Cuartero et al. (1999). Os referidos autores demonstraram que a atividade da δ -ALA-D de eritrócitos de pacientes diabéticos insulino-dependentes e de pacientes diabéticos não insulino-dependentes encontrava-se diminuída quando comparada com o grupo controle. Nos diabéticos insulino dependentes a redução da atividade da enzima esteve relacionada diretamente com a concentração da hemoglobina glicosilada, já nos diabéticos não insulino-dependentes a redução da atividade da δ -ALA-D foi relacionada aos níveis glicêmicos. Também nesse mesmo estudo os autores verificaram a atividade da δ -ALA-D de ratos com diabetes induzido por

estreptozotocina, que mostrou-se diminuída nos eritrócitos e tecido hepático, quando comparados ao grupo controle.

Semelhantemente, experimentos com ratos diabéticos demonstraram que há uma correlação inversa entre o nível de glicose sanguínea e a atividade da δ -ALA-D, tanto de eritrócitos quanto de tecido hepático (POLO et al., 1990; GARRO et al., 1990; BITAR et al., 1984).

Djordjevic (1985) demonstrou, ao estudar a atividade da δ -ALA-D de sangue de pacientes normais, que após adição de glicose, houve diminuição considerável da atividade da enzima, porém a adição de insulina não alterou a atividade enzimática. Nesse mesmo estudo foi correlacionada o decréscimo na atividade da δ -ALA-D com os níveis de glicose no sangue.

RATNAIKE et al. (1987), sugeriram que a diminuição na atividade da δ -ALA-D de eritrócitos, de pacientes diabéticos, é paralelo ao aumento da hemoglobina glicosilada, provavelmente como resultado da glicosilação destas enzimas. No presente trabalho, demonstrou-se que tanto níveis glicêmicos como hemoglobina glicosilada A_{1c} elevados ocorrem em paralelo a diminuição da atividade enzimática nos pacientes com diabetes mellitus tipo 2. A porcentagem da hemoglobina glicosilada A_{1c} , um índice clássico de controle glicêmico a longo prazo apresentou-se elevada no grupo dos pacientes diabéticos descompensados. A glicosilação não enzimática da hemoglobina é um processo lento e parece refletir o grau de

glicosilação de outras proteínas que são expostas constantemente a glicose circulante (PALMER & JAIN, 1997). De acordo com isso tenta-se explicar porque a δ -ALA-D é inibida no diabetes mellitus. Acredita-se que ocorre a glicolisação do sítio ativo da lisina, envolvida na formação da base de Schiff com a primeira molécula ALA ou oxidação de resíduos essenciais de cisteína reduzida da enzima, contribuindo para a formação da cadeia lateral P da molécula de porfobilinogênio (JAFFE, 2000).

Autores demonstraram que os níveis de glicose plasmática e de triglicerídeos estão significativamente mais altos em ratos alimentados com dieta contendo 70 % de glicose livre (HG) do que em ratos alimentados com dieta com altos teores de amido (HS). Os mesmos autores demonstraram que os ratos alimentados com HG eram também mais pesados do que os ratos controle (FOLMER et al.,2003). Esses dados estão de acordo com esse trabalho que demonstrou que os paciente que apresentam peso mais elevado tem glicemias mais elevadas.

FOLMER et al. (2002) também demonstraram que os ratos alimentados com dieta HG apresentavam atividade da δ -ALA-D hepática diminuída em relação aos alimentados com dieta HS. Os resultados desse estudo suportam a hipótese que o consumo de uma dieta com altos teores de glicose livre pode promover o desenvolvimento do estresse oxidativo o qual experimentalmente foi atribuído à

hiperglicemia. Nesse aspecto, também, esse trabalho está de acordo com os autores citados, já que nos dados apresentados, a hiperglicemia apareceu como um importante fator de redução da atividade da δ -ALA-D.

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).

Avaliou-se também a atividade da δ -ALA-D nos pacientes com hipotireoidismo primário. A tireoperoxidase é uma hemoproteína glicosilada que tem um importante papel na síntese dos hormônios da tireóide. Foi observado que quando adicionava-se succinil acetona (um inibidor da biossíntese dos hormônios tireoideanos) a atividade da tireoperoxidase tinha uma diminuição de até 80% (FAYADAT et al., 1999). Porém, quando foram adicionados precursores da biossíntese da heme, como a holotransferrina ou ácido aminolevulínico a atividade da tireoperoxidase teve um aumento de 20 %. Já, quando foi adicionado holotransferina mais ácido aminolevulínico a atividade foi 120% superior ao grupo controle (DePILLIS et al., 1997). Como podemos notar, o ácido aminolevulínico é um modulador positivo da atividade da tireoperoxidase. O hipotireodismo é um estado metabólico alterado onde a produção de hormônios tireoideanos é diminuída e conseqüentemente a atividade da tireoperoxidase também. Sendo assim, no hipotireiodismo haverá mais ácido aminolevulínico disponível, o que

talvez explique nossos resultados. Nesse trabalho foi demonstrado que no hipotireoidismo descompensado há um aumento estatisticamente significativo da atividade da δ -ALA-D.

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

A- A atividade da enzima δ -ALA-D apresenta-se diminuída nos pacientes com diabetes mellitus descompensados. Nos pacientes com diabetes mellitus compensado a atividade da δ -ALA-D não apresentou-se alterada.

B- Nos pacientes com hipotireoidismo descompensado a atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase encontrava-se aumentada. No grupo dos pacientes com hipotireoidismo compensado não ocorreu alteração da atividade enzimática.

C- Os medicamentos utilizados pelos pacientes diabéticos e pelos pacientes com hipotireoidismo não alteraram a atividade *in vitro* da δ -ALA-D.

D- Por fim, a quantidade dos metais chumbo, zinco e cobre não foi diferente, do ponto de vista estatístico, nas amostras de sangue dos diferentes grupos analisados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

⇒ ABEL, M.; RITTHALER, U.; ZHANG, Y.; DENG, Y.; SCHMIDT, A. M.; GRETEN, J.; SERNAU, T.; WAHL, P.; ANDRASSY, K.; RITZ, E.; WALDHERR, R.; STERN, D. M.; NAWROTH, P. P. Expression of receptors for advanced glycosylated end-products in renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 10: 1662-1667 (1995).

⇒ ABDULLA, M. & HAEGER-ARONSEN, B. ALA dehydratase activation by zinc. *Enzyme* 12:708-710 (1971).

⇒ A.D.A. (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION): Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 21 (suppl. 1): S5-S19 (1998).

⇒ AKERBLOM, H. K.; VAARALA, O.; HYOTY, H.; ILONEN, J.; KNIP, M. Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *American Journal Of Medical Genetics.* 115: (1) 18-29 (2002).

⇒ ARNER P.; LITHELL H.; WAHRENBERG H.; BRÖNNEGARD M. Body composition and obesity. *J Lipid Res* 32: 423-429 (1991).

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

.⇒ANDERSON, P.M. & DESNICK, R.J. Purification and properties of δ -aminolevulinatase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 254:6924-6930 (1979).

⇒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 -aminolevulinatase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 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.* 252: 8965-8974 (1977).

⇒BARREIRO, O. L. C. 5-Aminolaevulinatase hydro-lyase from yeast. Isolation and purification. *Biochim. Biophys. Acta* 139:479-486 (1967).

⇒BATTLE, A. M. del C.; FERRAMOLA, A. M.; GRINSTEN, M. Purification and general properties of delta-aminolaevulinate dehydratase from cow liver. *Biochem. J.* 104:244-249 (1967).

⇒BATTLE, A.M. del C. & STELLA, A.M. Delta aminolaevulinate dehydratase: its mechanism of action. *Int. J. Biochem.* 9:861- 864 (1978).

⇒BATTISTUZZI, G.; PETRUCCI, R.; SILVAGNI, L.; URBANI, F. R.; CAIOLA, S. Delta-aminolevulinate dehydratase: a new genetic polymorphism in man. *Ann. Hum. Genet.* 45: 223-229 (1981).

⇒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. *Química Nova.* 16: 385-392 (1993).

⇒ BECK-NIELSEN, H.; HENRIKSEN, J. E.; VAAG, A.; HOTHER-NIELSEN, O. Pathophysiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Practice*. 28 (suppl.): S13-S25 (1995).

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

⇒ BEISSWENGER, P. J.; MAKITA, Z.; CURPHEY, T. J.; MOORE, L. L.; JEAN, S.; BRINCK-JOHNSEN, T.; BUCALA, R.; VLASSARA, H. Formation of immunochemical advanced glycosilation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes*. 44: 824-829 (1995).

⇒ 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, Dissertação de Mestrado (1985).

⇒BEVAN, D. R.; BODLAENDER, P.; SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn²⁺ for enzyme activity. J. Biol. Chem. 255(5):2030-2035 (1980).

⇒BEYERSMANN, D. & COX, M. Affinity labelling of 5-aminolevulinic acid dehydratase with 2-bromo-3-(5-imidazolyl)propionic acid. Biochim. Biophys. Acta 788:162-168 (1984).

⇒BIERHAUS, A.; RITZ, E.; NAWROTH, P. P. Expression of receptors for advanced glycation end-products in occlusive vascular and renal disease. Nephrol. Dial. Transplant.11: 87-90 (1996).

⇒BIERHAUS, A.; CHEVION, S.; CHEVION, M.; QUEHENBERGER, P.; HOFMANN, M.; ILLMER, T.; LUTHER, T.; BERENTSHEIN, E.; TRITSCHLER, H.; MÜLLER, M.; WAHL, P.; ZIEGLER, R.; NAWROTH, P. P. Advanced glycation endproducts (AGEs) induced activation of NF-κB is suppressed by α-lipoic acid in cultured endothelial cells . Diabetes. 46: 1481-1490 (1997).

⇒BIERHAUS, A.; ILLMER, T.; KASPER, M.; LUTHER, T.; BERENTSHEIN, H.; TRITSCHLER, H.; MÜLLER, M.; NAWROTH, P. P. Advanced glycation end

product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation*. 96: 2262-2271 (1997).

⇒BIERHAUS, A.; ZIEGLER, R.; NAWROTH, P. P. Molecular mechanisms of diabetic angiopathy – clues for innovative therapeutic interventions. *Horm. Res.* 50: 1-5 (Suppl. 1) (1998).

⇒BIERHAUS, A.; KANITS, M.; TRISCHLER H; ZIEGLER, R.; NAWROTH, P. P. A new pathway of perpetuated NF-κB activation potentially relevant in diabetes mellitus. *Exp. Clin. Endocrinal Diabetes*. 106: 20 (abstract) (1998).

⇒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.* 37: 586-600 (1998).

⇒BISHOP, T.R.; HODES, Z.I.; FRELIN, L.P.; BOYER, S.H. Cloning and sequence of mouse erythroid delta-aminolevulinatase dehydratase cDNA. *Nucleic Acid Res.* 17(4): 1775 (1989).

⇒BITAR, M. & WEINER, M. Diabetes-induced metabolic alterations in heme synthesis and degradation and various heme-containing enzymes in female rats. *Diabetes* 33: 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* 371: 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.* 266: 17060-17066 (1991).

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

⇒BORDER, E.A.; CANTRELL, A.C.; KILROE-SMITH, T. A. The in vitro effect of zinc and other metal ions on the activity of human erythrocyte δ -aminolaevulinic acid dehydratase. *Environ. Res.* 11:319-325 (1976).

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

⇒BRAGA, A. L.; SILVEIRA, C. C.; ZENI, G.; ANDRADE, L. H. Stereoselective formation and reaction of alpha-chalcogen-functionalized vinylic organolithium compounds from alpha-bromovinylic chalcogenides. *Synlett* . 595-596 (1997).

⇒BRAVERMAN, L. E., UTIGER, R. D. Introduction Hypothyroidism. *Werner and Ingbar's the thyroid*, 7th ed.Lippincott Raven- Publishers, Philadelphia, p. 736-7 (1996).

⇒BRENT, G.A., LARSEN, P.R.; Treatment of Hypothyroidism. In: Braverman, LE, Utiger, RD. *Werner and Ingbar's The Thyroid*, 7 ed. Lippincott Raven-Publishers, Philadelphia, p. 883-8 (1996).

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

⇒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.* 12; 833-835 (1980).

⇒BROWNLEE M.; VLASSARA H.; CERAMI A. Nonenzymatic glycation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Int. Med.* 101: 527-537 (1984).

⇒BROWNLEE, M.; CERAMI, A.; VLASSARA, H. Advanced Glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl Med.* 318: 1315-1321 (1988).

⇒BROWNLEE, M. The pathological implications of proteins glycation. *Clin. Invest. Med.* 18: 275-281 (1995).

⇒BURNHAM, 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. *Med. Buenos Aires* v.55: 117-124 (1995).

⇒CABALLERO, F. A.; GEREZ, E. N.; POLO, C. F.;VAZQUEZ, E. S.; BATLLE, A. M. Reducing Sugars Trigger δ -Aminolevulinic Dehydratase Inactivation: Evidence of In Vitro Aspirin Prevention. *Gen. Pharmacol.* 31: 441-445 (1998).

⇒CASTELFRANCO, P. A. & BATLE, A. M. Aminolevulinate dehydratase: Properties y mechanism de acción. *N. Arch. Fac. Med.* 45: 61-70 (1983).

⇒CHAUDHRY, A. G.; GORE, M. G.; JORDAN, P. M. Studies on the inactivation of 5-aminolevulinate dehydratase by alkylation. *Biochem. Soc. Trans.* 4: 301-303 (1976).

⇒CHEH, A. & NEILANDS, J. B. Zinc, an essential metal ion for beef liver delta-aminolevulinate dehydratase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55: 1060-1063 (1973).

⇒CHEH, A. & NEILANDS, J. L. The delta-aminolevulinate dehydratases: molecular and environmental properties. *Struct. Bonding (Berlin)* 29:123-169 (1976).

⇒CHINARRO, S.; STELLA, A. M.; BERGES, L.; SALAMANCA, R. E.; BATLLE, A. M. del C. Aminolevulinato dehidratasa: propiedades y mecanismo de acción. N. Arch. Fac. Med. 41: 61-70 (1983).

⇒CRITCHLEY, J. A. J. H.; ZHAO, H. L.; TOMLINSON, B.; LEUNG, W.; THOMAS, G.N.; CHAN, J. C. N.; COCKRAM, C. S. Management of nephropathy in patients with type 2 diabetes. Chin. Med. J. 115: (1) 129-135 (2002).

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

⇒DAGOGO et al. "Insulin Resistance and B-Cell Dysfunction: Changing the Consequences of the Disease Continuum" J. Biol. Chem. 277: 28795-28802 (2002).

⇒DE DEKEN X; WANG D; MANY MC; et al. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. J. Biol. Chem. 275:23227-33(2000).

⇒DE LA VIEJA; DOHAN O.; LEVY O.; et al. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol. Rev* 80:1083-105 (2000).

⇒DENT, A. J.; BEYERSMANN, D.; BLOCK, C.; HASNAIN, S. S. Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinate dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. *Biochemistry*. 29: 7822-7828 (1990).

⇒DePILLIS, G.; OZAKI, S.; KUO, J. M.; MALTBY, D.; ORTIZ DE MONELLANO, P. R., *J. Biol. Chem.* 272, 8857-8960 (1997).

⇒DJORDJEVIC, V. B. Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes of diabetic patients. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 91: 285-290 (1985)

⇒DRESEL, E. I. B. & FALK, J. E. Conversion of delta-aminolaevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system. *Nature*. 172:1185 (1953).

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

⇒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-aminolevulinate dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacol. Toxicol.* 79: 136-143 (1996).

⇒EMANUELLI, T.; ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; NASCIMENTO, P.C.; BEBER, F.A.; SOUZA, D.O.G. Delta-aminolevulinate 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.* 83,95-103 (1998).

⇒ESPOSITO, C.; GERLACH, J.; BRETT, D.; STERN, D.; VLASSARA, H. Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J. Exp. Med.* 170: 1387-1407 (1989).

⇒EVERETT L.A.; GREEN E.D. A family of mammalian anion transporters and their involvement in human genetic diseases. *Hum Mol Genet* 8:1883-91 (1999).

⇒FAYADAT, L.; NICCOLI-SIRE, P.; LANET, J.; FRANC, J.L. Role of heme in intracellular trafficking of thyroperoxidase and involvement of H₂O₂ generated at the apical surface of thyroid cells in autocatalytic covalent heme binding. J. Biol. Chem., Vol. 274, 10533-10538, 1999.

⇒FERNÁNDEZ-CUARTERO, B.; REBOLLAR, J. L.; BATLLE, A.; ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R. Delta aminolevulinate dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. J. Bio. Cell. 31: 479-488 (1999).

⇒ FERRANNINI, E. Insulin resistance and the pathogenesis of diabetes mellitus tipo 2. In: State of the Art Symposium. Insulin sensitivity in man: assessment and therapy. Review Publication of a Symposium held at the 31 st Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Stockholm, Sweden (1995).

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

⇒ FOLMER, V.; SOARES, J. C. M.; ROCHA, J. B. T. Oxidative estresse in mice is dependent on the free glucose content in the diet. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* in press. (2002).

⇒ FOLMER, V.; SOARES, J. C. M.; ROCHA, J. B. T. High-fat diet causes δ -aminolevulinate dehydratase inhibition and hemoglobin glycation related to lipid peroxidation in mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* in press. (2002).

⇒ FOLMER V.; SOARES, J.C.; GABRIEL, D., ROCHA, J.B.T A high fat diet inhibits delta-aminolevulinate dehydratase and increases lipid peroxidation in mice *J. Nutr.* 133(7):2165-70 (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.* 41:42-48 (1992).

⇒ FUJITA, H.; ORII, Y.; SAND, S. Evidence of increased syntesis of delta-aminolevulinic acid dehydratase in experimental lead-poisoned rats. *Biochim. Biophys. Acta* 678: 39-50 (1981).

⇒GARRO, J. C.; POLO, C. F.; CIRIGLIANO, A.; ROSSETTI, M. V.; WIDER, E.A .
Glucose effect on haem metabolism. Mol. Aspects Med. 11: 28 (1990).

⇒GERICH J.E. Determinación del índice de resistencia insulínica mediante HOMA en una población de la Región Metropolitana de Chile. Endocr Rev 19: 477-90 (1998).

⇒GIBBS, P. N. B.; GORE, M. G.; JORDAN, P. M. Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in human 5-aminolaevulinate dehydratase. Biochem. J. 225: 573-580 (1985).

⇒GIBBS, P. N. B. & JORDAN, P. M. Identification of lysine at the active site of human delta-aminolaevulinate dehydratase. Biochem. J. 236:447-451 (1986).

⇒GIBSON, K. D.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J. J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. Biochem. J. 61: 618-629 (1955).

⇒GODIN, D. V.; WOHAIEB, S. A.; GARNETT, M. E.; GOUMENIOUK, A.D.
Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. Mol. Cell. Biochem. 84: 223-231 (1988).

⇒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. 231: 66-71 (1984).

⇒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. 234: 365-371 (1985).

⇒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. 237: 220-225 (1986).

⇒GOERING, P. L. Lead protein interactions as a basis for lead toxicity. Neurotoxicology. 14:45-60 (1993).

⇒GOERZ, G & KORDA, S. Porphyria cutanea tarda (PCT) und Diabetes mellitus. Z. Haut. 52: 1165-74 (1977).

⇒ GRANICK, S. & MAUZERALL, D. Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting delta-aminolevulinic acid to coproporphyrinogen. J. Biol. Chem. 232: 1119-1140 (1958).

⇒ GRANICK, J. L.; SASSA, S.; GRANICK, S.; LEVERE, R.D.; KAPPAS, A. Studies in lead poisoning. II. Correlation between the ratio of activated to inactivated δ -aminolevulinic acid dehydratase of whole blood and the blood lead level. Biochem. Med. 8:149-159 (1973).

⇒ GROSS J.L. Aspectos Relevantes da Interface Entre Diabetes Mellitus e Infecção. Philadelphia: Churchill Livingstone, 40:354-6 (2000).

⇒ GUO, G. G.; GU, M.; ETLINGER, J. D. 24-kDa proteasome inhibitor (CF-2) is identical to delta-aminolevulinic acid dehydratase. The Journal of Biological Chemistry 269(17): 12399-12402 (1994).

⇒ HASNIAN, S. S.; WARDELL, E. M.; GARNER, C. D.; SCHLOSSER, M.; BEYERSMANN, D. Extended-X-ray-absorption-fine-structure investigations of zinc in 5-aminolaevulinate dehydratase. Biochem. J. 230:625-633 (1985).

⇒ HELFAND, M, CRAPO, LM.; Screening for thyroid disease. *Ann. Intern. Med.*; 112:840-9 (1990).

⇒ 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* 1056: 57-63 (1990).

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

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

⇒ HUNT, J. V.; DEAN, R. T.; WOLFF, S. P. Hidroxil radical production and autoxidative glycosilation, Glucose oxidation as the cause of protein damage in the

experimental glycation model of diabetes mellitus and aging. *Biochem. J.* 256: 205-212 (1988).

⇒INOUE, M.; HASHIMOTO, H.; MIO, T; SUMINO, K. Levels of lipid peroxidation product and glycated hemoglobin A_{1c} in the erythrocytes of diabetic patients. *Clinica Chimica Acta.* 276: 163-172 (1998).

⇒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.* 259: 5032-5036 (1984).

⇒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.* 261: 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.* 26:4258-4264 (1987).

⇒ 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.* 29: 8345-8350 (1990).

⇒ JAFFE, E. K.; ABRAMS, W. R.; KAEMPFFEN, H. X.; HARRIS, Jr. K. A. 5-Chlorolevulinate modification of porphobilinogen synthase identifies a potential role for the catalytic zinc. *Biochem.* 31: 2113-2123 (1992).

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

⇒ JAFFE, E. K.; VOLIN, M.; MYERS, 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.* 33: 11554-11562 (1994).

⇒ 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. *Biochemistry* 34: 224-251 (1995).

⇒JAFFE, E.K., The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes. *Acta Cryst. D – Biol. Cryst.* 56:115-128 (2000).

⇒JANDELEIT-DAHM, K. & COOPER, M. E. Hypertension and diabetes. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension.* 11: (2) 221-228 (2002).

⇒JORDAN, P. M.; GORE, M. G.; CHAUDHRY, A.G. Subunit modification of 5-aminolevulinate dehydratase involving cysteine residues *Biochem. Soc. Trans.* 4: 762-763 (1976).

⇒JORDAN, P. M. & SEEHRA, J. S. Carbon-13 NMR as a probe for the study of enzyme-catalyzed reactions. Mechanism of action of 5-aminolevulinic acid dehydratase. *FEBS lett.* 114: 283-286 (1980).

⇒JORDAN, P. M. & GIBBS, P. N. B. Mechanism of action of 5-aminolaevulinate dehydratase from human erythrocytes. *Biochem. J.* 227: 1015-1020 (1985).

⇒KOPP P. Pendred's syndrome and genetic defects in thyroid hormone synthesis. *Rev Endocrinol Metab Dis* 1/2:109-21 (2000).

⇒ LAUWERYS, R.R.; BUCHET, J.P.; ROELS, H.A. Comparative study of effect of inorganic lead and cadmium on blood δ -aminolevulinatase in man. Brit. J. Ind. Med. 30:359-364 (1973).

⇒ LEIRI T.; EMOTO T.; KURUDA H. et al. A 3'spliced site mutation in the thyroidlobulin gene responsible for congenital goiter with hipotiroidism. J Clin Invest 88:1901-5 (1991).

⇒ LI, J. & SCHMIDT, A. M. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. J. Biol. Chem. 272: 16498-16506 (1997).

⇒ LINDSAY, R.S., TOFT, A.D.; Hypothyroidism. Lancet. 349:413-7 (1997).

⇒ MAINES, M.D. & KAPPAS, A. Metals as regulartors of heme metabolism. Science, v .198, p.1215-1221 (1977).

⇒ MAKITA, Z.; VLASSARA, H.; RAYFIELD, E.; CARTWRIGHT, K.; FRIEDMAN, E.; RODBY, R.; CERAMI, A.; BUCALA, R. Hemoglobin-AGE: a circulating marker of advanced glycosylation. Science. 258: 651-653 (1992).

⇒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.* 23: 472-474 (1974).

⇒ McGILLION, F. B.; THOMPSON, G. G.; GOLDBREG, A. Tissue uptake of δ -aminolevulinic acid. *Biochem. Pharmacol.* 24: 299-301 (1975).

⇒MEDEIROS-NETO G.A.; STANBURY,J.B. Inherited disorders of thyroid metabolism. CRC Pres, Boca Raton,1994.

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

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

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

⇒ MOHAMED, A. K.; BIERHAUS, A.; SCHIEKOFER, S.; TRITSCHLER, H.; ZIEGLER, R.; NAWROTH, P. P. The role of oxidative estresse and NF-κB activation in late diabetic complications. 10: 157-167 (1999).

⇒ 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 porphyripathies. Arch. Biochem. Biophys. 271(1): 206-216 (1989).

⇒ MULDER, J.E.; Thyroid disease in woman. Med. Qin. North. Am., 82:103-25 (1998).

⇒ NANDI, D.L. δ-Aminolevulinic acid synthase of Rhodopseudomonas spheroids. Binding of pyridoxal phosphate to the enzyme. Z. Naturforsch. 33C:799-800(1978).

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

⇒ NELSON, H. M.; UGHES, M. A.; MEREDITH; P. A. Zinc, copper and delta-aminolevulinic acid dehydratase in vitro and in vivo. *Toxicology* 21:261-266 (1981).

⇒ OTEIZA, P. I.; KLEINMAN, C. G.; DEMASI, M.; 5Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* 316(1) 607-611 (1994).

⇒ PALMER, M. & JAIN, S. K. The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin e on glycosylation of proteins. *Free Radical Biology & Medicine.* 4: 593-596 (1997).

⇒ 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.* 72(1): 226-230 (1992).

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

⇒ POLO, C. F.; CIRIGLIANO, A.; NAVONE, N. M.; GARRO, J. C.; ROSSETTI, M. V.; WIDER, E. A. Haem biosynthesis in strep-tozotocin-induced diabetic mice. *Mol. Aspects Med.* 11: 29 (1990).

⇒ POLO, C.; VAZQUEZ, E.; GEREZ, E.; CABELLERO, F.; BATTLE, Further studies on the non-enzymatic glycosilation of ALA-D, PBG-D and rhodenase, Abstracts International Conference of Porphyrins, Porphyria and Photodynamic therapy, Melbourne, Australia. November (1993).

⇒ POLO, C.; VAZQUEZ, E.; GEREZ, E.; CABELLERO, F.; BATTLE, A. STZ-induced diabetes in mice and heme pathway enzymes. Effect of allylisopropylacetamide and alfa-tocopherol. *Chem. Biochem. Interact.* 95: 327-334 (1995).

⇒ RATNAIKE, S.; BLAKE, D.; SHEVENAN, P. Enzymic glycation may decrease activity of erythrocyte delta aminolevulinate dehydratase in diabetes mellitus. *Clin. Chem.* 33: 1807-1810 (1987).

⇒ RIZK, N. M.; MEIER, D. A.; KRAKOWER, G. R.; KISSEBAH, A. H. Mechanisms of insulin-resistant glucose utilization in rat skeletal muscle. *Molecular genetics and Metabolism*. 63: 126-133 (1998).

⇒ 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* 1083 (1993).

⇒ ROCHA, J. B. T.; PEREIRA, M. E.; EMANUELLI, T.; CHRISTOFARI, R. S.; SOUZA, D. O. Effect 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. *Toxicology* 100: 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.* 94B, 65-69 (1989).

⇒ 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).

⇒ SASSA, S. δ -ALA-D Porphyria. Seminars in liver Disease. 18: 95-101 (1998).

⇒ SCASSA, M. E.; VARONE C. L.; MONTERO, L.; CÁNEPA, E. T. Insulin inhibits δ -aminolevulinate synthase gene expression in rat hepatocytes and human hepatoma cells. Exp. Cell. Res. 244: 460-469 (1998).

⇒ SCHAUMBURG, A.; SCHNEIDER-POETSH, A. A. W.; ECKERSKORN, C. Characterization of plastid 5-aminolevulinate 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. 47C: 77-84 (1991).

⇒ SCHMIDT, A. M.; HORI, O.; BRETT, J.; YAN, S. D.; WAUTIER, J. L.; STERN, D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant estresse and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. Arterioscler. Thromb. 14: 1521-1528 (1994).

⇒SCHMIDT, A. M.; YAN, S. D.; STERN, D. M. The dark side of glucose. *Nature Med.* 1: 1002-1004 (1995).

⇒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.* 96: 1395-1403 (1995).

⇒SCHNACKENBERG, C. G. Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. *American J. of Physiology-regulatory integrative and comparative physiology.* 282: (2) R335-R342 (2002).

⇒SCHWARTZ, J. G. The role of glycohemoglobin and other proteins in diabetes management. *Diab. Rev.* 3: 269-287 (1995).

⇒SEYDOUX, F.; MALHOTRA, P. O.; BERNHARD, S. A. Half-site reactivity. *Crit. Rev. Biochem.* 2:227-257 (1974).

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

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

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

⇒SPENCER, P. & JORDAN, P. M. Purification and characterization of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* and a study of the reactive thiols at the metal-binding domain. *Biochem. J.* 290:279-287 (1993).

⇒SPENCER, P. & JORDAN, P. M. Investigation of the nature of the two metal-binding sites in 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 300: 373-381 (1994).

⇒ SPENCER, P. & JORDAN, P. M. Characterization of the two 5-aminolaevulinic acid binding sites, the A- and P-sites, of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 305: 151-158 (1995).

⇒ STEPPAN, C. M. & LAZAR, M. A. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends in endocrinology and metabolism.* 13: (1) 18-23 (2002).

⇒ 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.* 150: 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* 47: 396-400 (1998).

⇒ SUZUKI, Y. J.; TSUCHIYA, M.; PACKER, L. Lipoate prevents glucose-induced protein modifications. *Free Radic. Res. Commun.* 17: 211-217 (1992).

⇒TAMAI, H.; SHIOI, Y.; SASA, T. Purification and characterization of delta-aminolevulinic acid dehydratase from *Chlorella regularis*. *Plant & Cell Physiol.* 20(2): 435-444 (1979).

⇒TIGIER, H. A.; BATLLE, A. M. del C.; LOCASCIO, G. A. Porphyrin biosynthesis in soybean callus tissue system. Isolation, purification and general properties of delta-aminolaevulinate dehydratase. *Biochem. Biophys. Acta* 151: 300-302 (1968).

⇒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-aminolaevulinic acid dehydratase. *Enzymologia* 38: 43-56 (1970).

⇒TIMBRELL, J. A. *Principles of Biochemical Toxicology*. Second Edition. Taylor & Francis London, Washington DC. pp. 180 (1991).

⇒TOFT, A.D.; Thyroxine therapy. *N. Engl. J. Med.*; 331:174-80 (1994).

⇒ 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* 570: 167-178 (1979).

⇒ TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T.; SANO, S. Zinc and cysteine residues in the active site of bovine liver delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Int. J. Biochem.* 12: 751-756 (1980).

⇒ VERGNANO, C.; CARTASEGNA, C.; BONSIGNORE, D. Regolazione allosterica della attività delta-amino-levulinico-deidratasi eritrocitaria. - Nota I. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 64(7): 692-695 (1968).

⇒ VLASSARA, H. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes-metabolism research and reviews.* 17: (6) 436-443 (2001).

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

⇒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. 91: 11704-11708 (1994).

⇒VLASSARA, 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. 1: 447-456 (1995).

⇒VLASSARA, H.; Advanced glycation end-products and atherosclerosis. Ann. Med. 28: 419-426 (1996).

⇒VLASSARA, H.; BUCALA, R.; STRIKER, L. Pathogenetic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic and clinical implications for diabetes and aging. Lab. Invest. 70: 138-151 (1994).

⇒VISHWANATH, V.; FRANK, K. E.; ELMETS, C. A.; DAUCHOT, P. J.; MONNIER, V. M. Glycation of skin collagen in type I diabetes mellitus: correlation with long-term complications. Diabetes. 35: 916-921 (1986)

.

⇒WAEBER, B.; FEIHL, F. O.; RUILOPE, L. Diabetes and hypertension. Blood Pressure. 10: (5-6) 311-321 (2001).

⇒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. 96: 238-243 (1996).

⇒WERNER & INGBAR. Hardbound. ISBN: 0-7817-2193-8. Pages: 1104. Illustrations: 351 (2000).

⇒WETMUR, J. G.; BISHOP, D. F.; CANTELMO, C.; DESNICK, R. J. Human delta-aminolevulinate dehydratase: Nucleotide sequence of a full-length cDNA clone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7703-7707 (1986).

⇒WETMUR, J. G. Influence of the common human delta-aminolevulinate dehydratase polymorphism on lead body burden. Environmental Health Perspectives 102, sup. 3: 215-219 (1994).

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

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

⇒ WOLFF, S. P. & DEAN, R. T. Glucose autoxidation and protein modification - The potential role of 'autoxidative glycosilation' in diabetes. *Biochem. J.* 245: 243-250 (1987).

⇒ WOLFFENBUTTEL, B. H.; GIORDANO, D.; FOUNDS, H. W.; BUCALA, R. Long term assessment of glucose-control by haemoglobin-AGE measurements. *Lancet.* 327: 513-515 (1996).

⇒ 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. U.S.A.* 71: 1767-1770 (1974).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

⇒ YAN, S. D.; SCHMIDT, A. M.; ANDERSON, G. M.; ZHANG, J.; BRETT, J.; ZHOU, Y. S.; PINSKY, D.; SCHMIDT, D. M. Enhanced cellular oxidant estresse by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. L. Biol. Chem. 269: 9889-9897 (1994).

⇒ YAN, S. D.; STERN, D. SCHMIDT, A. M. What's the RAGE? The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the dark side of glucose. Eur. J. Clin. Invest. 27: 179-181 (1997).

PERMISSÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Título: Análise da atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) no diabetes mellitus e no hipotireoidismo

2. Objetivos:

- Avaliar a atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 compensados e descompensados.
- Avaliar a atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) em pacientes com hipotireoidismo primário compensados e descompensados.
- Avaliar a atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) *in vitro* na presença dos medicamentos utilizados pelos pacientes diabéticos e hipotireodeos.
- Mensurar, nas amostras de sangue, de todos grupos a quantidade dos metais: chumbo, zinco e cobre.

3. Registro

O estudo será desenvolvido no Laboratório de Enzimologia Toxicológica, do departamento de química, da Universidade Federal de Santa Maria. O presente estudo envolverá pacientes diabéticos tipo II e pacientes com hipotireoidismo primário, atendidos ambulatorialmente ou hospitalizados no HC de Santa Maria.

Esse estudo com voluntários humanos obteve a aprovação junto a Comissão de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria, com protocolo nº 9.569.

4. Procedimentos

Os pacientes serão submetidos a uma punção venosa. O material biológico, sangue total, será destinado para análise de atividade da δ -ALA-D. As amostras serão processadas no Laboratório de Enzimologia toxicológica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, RS.

5. Estocagem de amostras do sangue

As amostras após serem analisadas não serão estocadas, e sim descartadas, seguindo as normas técnicas da instituição.

6. Riscos Individuais

Os pacientes que voluntariamente se submeterem as punções venosas, poderão em casos de coleta mal realizada, desenvolver flebite, flebotrombose, hematoma local e petéquias.

7. Participação voluntária

A participação nesse estudo é livre e voluntária, não haverá nenhuma forma de compensação financeira e também não haverá custos para o participante. A recusa não acarretará nenhum prejuízo ou comprometimento dos cuidados médicos do paciente.

8. Confidencialidade

A identidade do paciente que participar desse estudo permanecerá sempre em sigilo. Os registros dos dados no prontuário também serão confidenciais.

9. Identificação do paciente

Nome:

Identidade:

Assinatura:

Instructions to Authors for Endocrinology

Purpose and Scope

Endocrinology primarily publishes original subcellular biochemical and physiological studies. The Endocrine Society also publishes the following journals: Endocrine Reviews publishes scholarly review articles in all areas of experimental and clinical endocrinology on a bimonthly basis. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism publishes endocrine and metabolic studies related to human and primate physiology and disease. Molecular Endocrinology published papers that use a molecular approach to study the regulatory mechanisms of hormones and related substances in nonprimate and primate cells.

Endocrinology is published by The Endocrine Society and functions under the auspices of the Publications Committee. The daily functions of the journal are managed by an appointed Editor-In-Chief, Editors, and Editorial Board Members. The policy of the journal is to administer the peer review and publication process of submitted manuscripts that encompass studies directed at understanding various aspects of endocrinology. The mission of Endocrinology is to increase and broaden the scientific knowledge base of its readers by publishing papers that provide significant and novel information at the molecular, cellular, tissue and organismal level of hormone function in the field of endocrinology.

General Information

Original investigative reports may be submitted to Endocrinology as a regular manuscript or as a Brief Communication. The former may be of any length and the latter is limited to four (4) journal publication pages. Brief Communications are short reports that must contain new observations of unusual interest, importance, or immediate benefit to the endocrine community. They should not be preliminary reports or incomplete studies. Authors should indicate in their cover letter that the paper is being submitted as a Brief Communication. Papers whose main emphasis is methodological must be submitted as Brief Communications. Brief communications are organized as indicated below for regular manuscripts except that should not contain more than 30 references. In addition, Brief Communications can no longer be submitted in camera-ready copy and can only be submitted electronically on the Endocrinology E-review site (<http://endo.endojournals.org/>). Manuscripts not written in idiomatic English or not conforming to the specifications set forth here will not be reviewed, but returned to the author for necessary revision. Manuscripts submitted to Endocrinology are evaluated by confidential peer review. Authors are given three (3) months to revise a manuscript that is not rejected. Editorial policy allows only one revision of a manuscript. A manuscript returned to the Editorial Office after three (3) months will be treated as a new

submission. Authors must present a written request (via email or regular mail) to the Editor-in-Chief for possible extension of any due date associated with a manuscript returned for revision. A rejected manuscript that is re-submitted will be treated and dated as a new manuscript. Manuscripts will not be returned after review.

Manuscript Submission

Electronic Submission

Endocrinology only uses electronic manuscript submission. See the link to E-Review on the Endocrinology web page (<http://endo.endojournals.org/>). If you have never had a manuscript reviewed through E-Review, click "New to Rapid Review" on the E-Review page to create an author account. If you already have an author account from a previous submission, enter your user name and password to submit a new or revised manuscript. Do not create a new author account if you forget your password. E-mail the editorial office for assistance.

Note that your author account will be the same for Endocrinology, Molecular Endocrinology, and The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.

Note to Authors

Beginning January 1, 2004, Endocrinology will only accept electronic submissions. There will be no submission fee for electronic submissions.

Authors who are unable to submit electronically are encouraged to first create a manuscript record in E-Review. Authors must complete the online submission form. When you have completed the manuscript submission form, click "Submit Manuscript by Mail" and contact the editorial office indicating why the electronic files are being mailed. Please note that submission by regular mail will result in a significant delay in the review process.

Send manuscripts by mail to:

Jeffrey E. Pessin, Ph.D., Editor-in-Chief
Endocrinology Editorial Office
8401 Connecticut Avenue, Suite 900
Chevy Chase, MD 20815-5817 USA
Phone: 301-951-2615; Fax: 301-951-2617
Email: endocrinology@endo-society.org

All submissions MUST INCLUDE:

Cover letter stating the authors' wish that the manuscript be evaluated for publication in Endocrinology. This letter must list the title and all authors of the

paper. Elsewhere on the submission form authors can include up to 5 suggested reviewers and 3 reviewers to exclude.

Completed Copyright Assignment & Affirmation of Originality form. This form should be faxed to the editorial office at 301-951-2617 and should include the manuscript number in the top right corner.

At least three (3) key terms.

Authors are encouraged to submit a PDF for the initial submission. See the instructions on the Endocrinology homepage. If you do submit original files, E-Review will create a PDF of your files, but it may take some time depending on the size of the files.

IF MAILED AUTHORS MUST INCLUDE

Printout of the submission numbers from E-Review.

Disks or CD of text and figures prepared according to Digital Art guidelines.

Manuscript Preparation

General Format

The manuscript should be typed, with all text double-spaced (including references, tables and legends). Use wide (1" or larger) margins, and print on one side only of standard paper. Number all pages. The following sections must begin on separate pages: title page, references, footnotes, tables, legends.

Title

The title page should include the following:

Full title (a concise statement of the article's major contents)

Abbreviated title of not more than 40 characters for page headings

Authors' names and institutions

Corresponding author's address, telephone and fax numbers, and email address

Name and address of person to whom reprint requests should be addressed

At least three key words to support indexing and information retrieval

Any grants or fellowships supporting the writing of the paper

Abstract

Do not exceed 250 words

Briefly describe in complete sentences the purpose of the investigation, the methods used, the results obtained, and the principal conclusions

Do not refer to the text or references

Write the abstract with a general audience in mind

Introduction

The article should begin with a brief introductory statement that places the work to follow in historical perspective and explains its intent and significance.

Experimental Subjects

It is assumed that all clinical investigation described in the paper was conducted in accordance with the guidelines in The Declaration of Helsinki and has been formally approved by the appropriate institutional review committees, or equivalent. All manuscripts should indicate that such approval was obtained. The study populations should be described in detail. In many studies details of age, race, and sex are important. In experiments involving human subjects, it should be documented that informed consent was obtained from the subjects and that an institutional human research committee had approved the investigations.

In text, tables, and figures subjects must be identified by number or letter rather than by initials or names.

Photographs of patients' faces should be included only if scientifically relevant. Authors must obtain written consent from the patient for use of such photographs. For further details, see the Ethical Guidelines.

Experimental Animals

A statement confirming that all animal experimentation described in the submitted manuscript was conducted in accord with accepted standards of humane animal care, as outlined in the Ethical Guidelines, should be included in the manuscript.

Materials and Methods

These should be described and referenced in sufficient detail for other investigators to repeat the work. The source of hormones, unusual chemicals and reagents, and special pieces of apparatus should be stated. For modified methods only the modifications need be described.

Results and Discussion

The Results section should briefly present the experimental data in text, tables, or figures (for details on the preparation of tables and figures, see below). The Discussion should focus on the interpretation and significance of the findings with concise objective comments that describe their relation to other work in that area. Results & Discussion may be presented separately or combined into a single section.

Acknowledgments (not required for submission)

A note of acknowledgment is appropriate recognition for contributors who may not be listed as authors, or for noting grant support of the research.

References

References to the literature should be cited in numerical order (in parentheses) in the text and listed in the same numerical order at the end of the manuscript on a separate sheet or sheets. There must be only one reference to a number.

The number of references cited should be kept to a reasonable minimum; to this end, appropriate recent reviews should be cited whenever possible.

Examples of the reference style that should be used are given below. The titles of journals should be abbreviated according to the style used in the Index Medicus.

Journal articles and abstracts: List all authors. The citation of unpublished observations, of personal communications, and of manuscripts in preparation or submitted for publication is not permitted in the bibliography. Such citations should be inserted at appropriate places in the text, in parentheses and without serial number, or be presented in the footnotes. The citation of manuscripts in press (i.e., accepted for publication) is permitted in the bibliography; the name of the journal in which they appear must be supplied. If references to personal communications are made, authors are encouraged to keep written proof of the exchange. If it is necessary to cite an abstract because it contains substantive data not published elsewhere, it must be designated at the end of the reference [e.g., . . .68:313 (Abstract)]. The author is responsible for the accuracy of references.

Books: List all authors or editors.

Sample References

Binoux M, Hossenlopp P 1986 Insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins: comparison of human serum and lymph. *J Clin Endocrinol Metab* 67:509-514

MacLaughlin DT, Cigarros F, Donahoe PK 1988 Mechanism of action of Mullerian inhibiting substance. Program of the 70th Annual Meeting of The Endocrine Society, New Orleans, LA, 1988, p 19

Bonneville F, Cattin F, Dietemann J-L 1986 Computed tomography of the pituitary gland. Heidelberg: Springer-Verlag; 15-16

Burrow GN 1987 The thyroid: nodules and neoplasia. In: Felig P, Baxter JD, Broadus AE, Frohman LA, eds. *Endocrinology and metabolism*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 473-507

For general aid in the preparation of manuscripts, authors should consult: CBE Style Manual: A Guide for Authors, Editors and Publishers. 5th ed. Bethesda, MD: Council of Biology Editors; 1983

Figure Legends

Figure legends and titles should be submitted on a separate page from the figures. Figure legends should add meaning and significance to the figure, and should not require reference back to the text.

Tables

Submit tables as printed text on plain paper only. Photographs of tables are not acceptable. Each table must have a concise heading and be constructed as simply as possible; it must be intelligible without reference to the text. At the foot of the table a description of experimental conditions may appear together with footnotes. Tables that duplicate text or figures are not acceptable. The width of the table must be designed to occupy one or both journal columns: no more than 4 table columns (one journal column), or no more than 8-10 table columns (two journal columns). See the chart under Figures for dimensions.

Figures

Digital art: Authors are encouraged to submit digital art to expedite the review and publication processes. Please review the detailed instructions for preparing digital art at Cadmus Digital Art. E-mail queries can be sent to Cadmus Digital Art. Authors must also review the instructions for submitting through E-Review.

Sizing and labeling the figure: The author is responsible for providing digital art that has been properly sized, cropped, and has adequate space between images. Plan the size of the figure to fill 1, 1.5, or 2 columns in the printed journal (see chart below for dimensions). In most cases, figures should be prepared for 1-column width. Produce original art at the size it should appear in the printed journal.

1 column = 18 picas, 7.5 cm, 3.0 in

1.5 columns = 30 picas, 12.5 cm, 5.0 in

2 columns = 38 picas, 16.0 cm, 6.4 in

At 100% size, no lettering should be smaller than 8 point (0.3 cm high) or larger than 12 point (0.4 cm high). Use bold and solid lettering. Lines should be thick, solid, and no less than 1-point rule. Avoid the use of reverse type (white lettering on a darker background). Avoid lettering on top of shaded or textured areas. Titles should be clear and informative. Keep wording on figures to a minimum, and confine any explanation of figures to their separate-page legends. Label only one vertical and one horizontal side of a figure. Freehand lettering or drawing is unacceptable.

Special requirements for 4-color art: Save files in CMYK mode (cyan-magenta-yellow-black). Color saturation of the shadow portion cannot exceed 280% (%cyan + %magenta + %yellow + %black cannot exceed 280%).

Shading: Avoid the use of shading, but if unavoidable, use a coarse rather than a fine screen setting (80-100 line screen is preferred). Avoid 1-20% and 70-99% shading; make differing shades vary by at least 20%, i.e., 25%, 45%, 65%. Instead of shading, denote variations in graphs or drawings by cross-hatching; solid black; or vertical, horizontal, or diagonal striping. Avoid the use of dots.

Grouped figures: For grouped figures, indicate the layout in a diagram. Place grouped figures so that they can be printed in 1 column width with uniform margins. Indicate magnification in the legends and by internal reference markers in the photographs. Their length should represent the fraction or multiple of a micrometer, appropriate to the magnification.

Hard copy submissions: Authors must submit two original sets of figures. In soft pencil or as a typed adhesive label on the back of each figure, indicate the following: 1) figure number; 2) corresponding author's name; 3) orientation (top). Because the figures will be scanned for on-line review, they must also be labeled with the figure number on the front of each figure. Figures must be clean and neat. Avoid writing in ink on the back of figures. Surface smoothness is critical: avoid tape and creases. Do NOT mount figures.

Graphs: Graphs with axis measures containing very large or small numbers should convert to easily readable notations. Example: For an ordinate range of "counts per minute" values from 1,000 to 20,000, the true value may be multiplied by 10⁻³ (scale would read from 1 to 20) and the ordinate axis display "cpm (x10⁻³)." Similarly, for a Scatchard plot with values ranging from 0.1 to 2 femtomolar (10⁻¹⁵ M), the scale may run from 0.1 to 2 with the abscissa labeled "M(x10¹⁵)." Three-dimensional bar graphs will not be published if the information they refer to is only two-dimensional.

Genomic, Proteomic and Bioinformatic Papers

Endocrinology encourages the submission of manuscripts using genomic, proteomic and bioinformatics approaches investigating problems related to hormone function. However, manuscript utilizing gene expression arrays or protein profiling methodologies must go beyond simply cataloging and validating changes under various conditions. These studies must include independent verification that the results obtained have physiological and/or functional significance. Bioinformatics studies require independent experimentation to confirm predicted models, hypotheses and/or conclusions. Manuscripts not meeting these criteria will not be accepted and may be returned prior to peer review.

Units of Measure

Results should be expressed in metric units. Système Internationale (SI units) must be added in parentheses. Temperature should be expressed in degrees Celsius (e.g., 28 C) and time of day using the 24-hour clock (e.g., 0800 h, 1500 h). Do not express molecular weight in daltons. Molecular weight is considered to be the relative molecular mass of a substance, i.e., the ratio of the mass of one molecule of the substance to 1/12 of the mass of one atom of carbon 12. Therefore, molecular weight is dimensionless. The dalton is a unit of mass equivalent to 1/12 of the mass of one atom of carbon 12.

Manuscripts Reporting New Amino Acid or Nucleotide Sequences

Manuscripts reporting amino acid or nucleotide sequences of proteins with sequences already known from other tissues or species will be considered only if they provide new biological insight. Manuscripts dealing with partial sequence data are not likely to be considered. The Endocrine Society has established policy that deals with submission of new protein or nucleic acid sequences. When a manuscript is accepted that contains novel sequences, such sequences must be deposited in the appropriate database (such as GenBank) and an accession number obtained before the manuscript is sent to the printer. It is recommended that the following statement containing the assigned accession number be inserted as a footnote: "These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345."

Manuscripts Reporting on Novel Compounds

Manuscripts describing experiments with new compounds must provide their chemical structures. For known compounds, the source and/or literature reference to the chemical structure and characterization must be provided.

Validation of Data and Statistical Analysis

Assay validation: Bioassay and radioimmunoassay potency estimates should be accompanied by an appropriate measure of the precision of these estimates. For bioassays, these usually will be the standard deviation, standard error of the mean, coefficient of variation, or 95% confidence limits. For both bioassays and radioimmunoassays, it is necessary to include data relating to within-assay and between-assay variability. If all relevant comparisons are made within the same assay, the latter may be omitted. Authors should be aware that the precision of a measurement depends upon its position on the dose-response curve.

In presenting results for new assays, it is necessary to include data on the following: 1) within-assay variability; 2) between-assay variability; 3) slope of the dose-response curve; 4) mid-range of the assay; 5) least-detectable concentration (concentration resulting in a response two standard deviations away from the zero dose response); 6) data on specificity; 7) data on parallelism of standard and unknown and on recovery; and 8) comparison with an independent method for

assay of the compound. When radioimmunoassay kits are utilized or hormone measurements are conducted in other than the authors' laboratories and the assay is central to the study, data regarding performance characteristics should be included.

Pulse analysis: Data from studies of pulsatile hormone secretion should be analyzed using a validated, objective pulse detection algorithm. The algorithm used should require that false-positive rates of pulse detection be defined in relation to the measurement error of the data set being analyzed, and the methods used to determine the measurement error should be described. The author(s) also should describe the methods used: 1) to deal with missing or undetectable values; 2) to determine peak frequency, interpeak interval, and pulse amplitude; and 3) For statistical comparisons of peak parameters.

Data Analysis: It is the author's responsibility to document that the results are reproducible and that the differences found are not due to random variation. No absolute rules can be applied, but in general quantitative data should be from no fewer than three replicate experiments. Appropriate statistical methods should be used to test the significance of differences in results. The term "significant" should not be used unless statistical analysis was performed, and the probability value used to identify significance (e.g., $P > 0.05$) should be specified.

When several t tests are employed, authors should be aware that nominal probability levels no longer apply. Accordingly, the multiple t test, multiple range test, or similar techniques to permit simultaneous comparisons should be employed. Also, in lieu of using several t tests, it is often more appropriate to utilize an analysis of variance (ANOVA) to permit pooling of data, increase the number of degrees of freedom, and improve reliability of results. Authors should use appropriate nonparametric tests when the data depart substantially from a normal distribution.

Analysis of variance tables should not be inserted in manuscripts. F values with the degrees of freedom as subscripts together with the P values are sufficient.

In presenting results of linear regression analyses, it is desirable to show 95% confidence limits.

When data points are fitted with lines (as in Scatchard or Lineweaver-Burk plots), the method used for fitting (graphical, least squares, computer program) should be

specified. If differences in slopes and/or axis intercepts are claimed for plotted lines, these should be supported by statistical analysis.

Useful references for statistical methods are McArthur, J. W., and T. Colten (eds.), *Statistics in Endocrinology*, MIT Press, Cambridge, 1970, and Finney, D. J., *Statistical Method in Biologic Assays*, ed. 2, Griffin, London, 1967.

Supplemental Data

Supplemental Data allows authors to enhance papers in *Endocrinology* by making additional substantive material available to readers. Supplemental Data may take the form of figures, tables, datasets, derivations, or videos, and is published only in *Endocrinology* online; it does not appear in the printed version of the journal. Authors who wish to include Supplemental Data should state so in the cover letter when the manuscript is submitted.

Supplemental Data files should be submitted through E-Review at the time of manuscript submission, and will be reviewed along with the manuscript. The files should be uploaded in the field marked "Upload Supplemental Data Files", and should NOT be attached with the manuscript and figure files. Authors submitting hard copies may submit Supplemental Data on a separate disk clearly marked "Supplemental Data for the Web", and with the manuscript title, corresponding author's name, file names, and name and version of programs used to create the files. Authors should refer to the Supplemental Data in the manuscript at an appropriate point in the text or figure/table legend.

The file formats listed below may be used for Supplemental Data. Provide a brief description of each item in a separate HTML or Word file (i.e., figure or table legends, captions for movie or sound clips, etc.). Do not save figure numbers, legends, or author names as part of an image. File sizes should not exceed 5 MB. Images should not exceed 500 pixels in width or height. Do not use tabs or spaces for Word or WordPerfect tables; please use the table functions available within these word processing programs to prepare tables. For web pages, provide a complete list of files and instructions for creating directories.

htm, HTML*
.jpg, JPEG image*
.gif, Graphical image
.pdf, Adobe Portable Document Format
.xls, MS Excel Spreadsheet
.mov Quick Time
.wav, Sound

.doc, MS Word 6 documents**
.txt, Plain ASCII*

*These files can be viewed directly on standard web browsers.

**MS Word may be used for text only.

Publication and Production Guidelines

Electronic Editing

For hard copy submissions, authors must submit electronic diskettes of the final accepted version of their manuscripts along with the typed revised manuscript. Please be sure that the file you send is the most recent version of the manuscript, and that it matches the printed copy that was accepted for publication. The file should contain all parts of the manuscript text in one file. Mathematics and tabular material, however, will be processed in the traditional manner and may be excluded from the diskette file. Digital art must be submitted on a separate disk.

The journal does not assume responsibility for errors in conversion of customized software, newly released software, or special characters.

Please label the outside of the diskette with the journal name; manuscript number; senior author's name, telephone and fax numbers; name of the file. Please be sure to also include the following information: name used to access file on diskette; type of hardware used (e.g., IBM/PS2); operating system and version (e.g., DOS 3.3); word processing program and version (e.g., WordPerfect 5.0); special characters used in the file (e.g., Greek, mathematical symbols).

Authors preparing diskettes on Macintosh computers should not use the Fastsave option. Files in ASCII can also be used, but are not preferred.

Proofs and Reprints

Proofs and a reprint order are sent to the corresponding author unless the Editorial Office is advised otherwise. The author should designate by footnote on the title page of the manuscript the name and address of the person to whom reprint requests should be directed. Questions about reprints should be referred to Cadmus Professional Communications at 410-819-3912 (direct) or 800-407-9190 (toll-free).

Page and Other Charges

There is no submission fee for The Endocrine Society journals. There will be a charge of \$90 per printed page in the journal. There will be a charge of \$300 per color figure if the author submits usable digital art that passes Cadmus's Rapid Inspector. Queries on page charges may be directed to Joy Williams at Cadmus

Professional Communications (410-691-6439; fax 410-684-2792). In extraordinary cases, on appeal by the author, the Publications Committee may consider waiving some of the color charges.

Archiving

The editorial office will retain all manuscripts and related documentation (correspondence, reviews, etc.) for 12 months following the date of publication or rejection.

HOME HELP FEEDBACK SUBSCRIPTIONS ARCHIVE SEARCH

Endocrinology Endocrine Reviews J. Clin. End. & Metab.

Molecular Endocrinology Recent Prog. Horm. Res. All Endocrine Journals

Copyright © 2004 by The Endocrine Society